

# 全反式维甲酸对肝癌细胞HepG2的分化、侵袭迁移的影响

陈宏辉, 彭蕾

陈宏辉, 彭蕾, 湖南省衡阳市南华大学附属第二医院消化内科 湖南省衡阳市 421001  
陈宏辉, 副教授, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的研究。  
作者贡献分布: 此课题由陈宏辉设计; 研究过程由彭蕾完成; 研究所用试剂及分析工具由陈宏辉提供; 数据分析与文章起草由彭蕾完成; 文章修改及审阅由陈宏辉完成。  
通讯作者: 陈宏辉, 副教授, 副主任医师, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院消化内科. chhhcchh@sina.com  
收稿日期: 2011-09-15 修回日期: 2011-10-15  
接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation, invasion and metastasis of liver cancer HepG2 cells

Hong-Hui Chen, Lei Peng

Hong-Hui Chen, Lei Peng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China  
Correspondence to: Hong-Hui Chen, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. chhhcchh@sina.com  
Received: 2011-09-15 Revised: 2011-10-15  
Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the differentiation, invasion and metastasis of liver cancer HepG2 cells.

**METHODS:** After HepG2 cells were treated with different concentrations of ATRA, the proliferation of HepG2 cells was evaluated by MTT assay; anchorage-dependent growth was evaluated by colony formation assay; AFP secretion was determined by ELISA; the transcription levels of Nanog and MMP-9 were assessed by RT-PCR, and their protein levels were assessed by Western blot; and cell invasion and migration were evaluated by scratch test and transwell assay.

**RESULTS:** ATRA suppressed the proliferation and anchorage-dependent growth of HepG2 in a dose- and time-dependent manner. ATRA induced cell differentiation and decreased AFP secretion in HepG2 cells (both  $P < 0.05$ ). Treatment with ATRA down-regulated the mRNA and

protein levels of Nanog and MMP-9 (within 24 hours) in a dose- and time-dependent manner. In addition, ATRA could inhibit the invasion and metastasis of HepG2 cells.

**CONCLUSION:** ATRA may induce cell differentiation, reduce cell invasion and migration and down-regulate the levels of Nanog in HepG2 cells.

**Key Words:** All-trans retinoic acid; Liver cancer; Proliferation; Differentiation; Invasion; Migration

Chen HH, Peng L. Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation, invasion and metastasis of liver cancer HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3381-3389

### 摘要

**目的:** 探讨全反式维甲酸(ATRA)对肝癌细胞HepG2的诱导分化作用及侵袭迁移的影响。

**方法:** MTT法测定ATRA对肝癌细胞HepG2的抑制作用; 平皿集落形成法检测ATRA对HepG2细胞锚定依赖性生长作用; ELISA法检测ATRA作用前后HepG2 AFP分泌量的变化; RT-PCR检测ATRA对HepG2细胞MMP-9及Nanog的mRNA表达的影响; Western blot检测ATRA对HepG2细胞MMP-9及Nanog蛋白表达的影响; Transwell及划痕实验检测其对侵袭及迁移能力的影响。

**结果:** MTT法显示ATRA抑制体外培养人肝癌细胞HepG2细胞生长, 呈剂量和时间依赖性; ELISA显示ATRA诱导HepG2细胞分化和凋亡, 使代表肝细胞恶变的AFP分泌量明显下降( $P < 0.05$ ); 平皿克隆形成实验结果表明未经ATRA处理的HepG2可形成克隆, 但经ATRA刺激后, 其形成克隆变小且数目明显减少; ATRA呈时间及浓度依赖性下调Nanog mRNA及蛋白的表达, 并在24 h呈浓度依赖性下调MMP-9 mRNA及蛋白表达; Transwell实验和划痕实验结果显示ATRA能抑制HepG2细胞的侵袭和迁移能力。

**结论:** ATRA可诱导HepG2细胞分化, 降低

### ■背景资料

肿瘤的复发与转移, 其主要原因在于肿瘤细胞侵袭及迁移性的生物学行为, 降低肿瘤细胞侵袭及迁移能力可抑制肿瘤的复发与转移, ATRA是目前为止最重要的一种分化剂, 已成功应用于诱导白血病分化, 目前的研究表明, 他在一些实体肿瘤中也起着非常重要的作用。

### ■同行评议者

秦建民, 副教授, 上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科

## ■ 研发前沿

通过研究ATRA对肿瘤干细胞分化基因Nanog的影响,进一步阐明ATRA是否通过下调肿瘤干细胞分化调节基因达到治疗肿瘤的目的,将对ATRA抗肿瘤作用机制起到推动作用。

HepG2的侵袭迁移能力,并可下调肿瘤干细胞分化调节基因Nanog的表达从而达到治疗肿瘤的目的。

**关键词:** 全反式维甲酸; 肝癌; 增殖; 分化; 侵袭; 迁移

陈宏辉, 彭蕾. 全反式维甲酸对肝癌细胞HepG2的分化、侵袭迁移的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3381-3389  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3381.asp>

## 0 引言

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,其死亡率在所有恶性肿瘤中居第3位,全球每年约600 000人死于肝癌<sup>[1]</sup>,恶性肿瘤细胞丧失了正常分化的能力,表现为分化障碍及失控性增殖.利用分化诱导剂可使肿瘤细胞部分或全部恢复分化潜能,转变为正常细胞或导致细胞凋亡,从而达到治疗肿瘤的目的.肿瘤的复发与转移,其主要原因在于肿瘤细胞侵袭及迁移性的生物学行为,降低肿瘤细胞侵袭及迁移能力可抑制肿瘤的复发与转移. ATRA是目前为止最重要的一种分化剂,已成功应用于诱导白血病分化,目前的研究表明,他在一些实体肿瘤中也起着非常重要的作用<sup>[2-5]</sup>.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌HepG2细胞由中南大学肿瘤所引进; ATRA购自Sigma公司; RPMI-1640培养基购自Gibco公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; 人肝癌细胞AFP ELISA试剂盒购自于上海申科生物公司; RNA引物设计由康为生物试剂公司合成; RNA提取试剂盒购自北京康为试剂公司; Nanog抗体及MMP-9抗体购自EP-Tomic公司; Transwell小室购自于Corning公司; Matrigel基质胶购自于BD公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 用含100 mL/L新生牛血清的RPMI-1640培养液培养于37 °C, 含50 mL/L CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中。

**1.2.2 MTT法:** 取对数生长期细胞,胰酶消化贴壁细胞,吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度为4 × 10<sup>4</sup>/mL,以每孔200 μL接种于96孔板,待6 h细胞贴壁后分别加入不同浓度的ATRA,终浓度为(1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L),溶媒对照组加入相同体积0.1%的DMSO,空白对照组加入相同体积完全培养基,每浓度设5个复孔,分别培养24、48和72 h,培养终止前每孔加入

20 μL MTT, 孵育4 h,取出96孔板,弃除培养基,每孔加入100 μL DMSO,置于摇床上摇10 min,酶标仪上570 nm检测吸光度(A)值。

**1.2.3 平皿集落形成法:** 取对数生长期细胞,胰酶消化贴壁细胞,吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度为4 × 10<sup>2</sup>/mL,每孔加入1 mL细胞悬液,待6 h细胞贴壁后分别加入不同浓度的ATRA,终浓度为(1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L),空白对照组加入相同体积完全培养基,每浓度设3个复孔,置37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养,对照组形成50个以上细胞团即集落时结束培养,约6 d,在倒置荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.4 ELISA法检测ATRA对HepG2表达AFP的影响:** 按试剂盒说明书操作: 收集各组细胞上清,将标准品分别稀释为8 μg/L、4 μg/L、2 μg/L、1 μg/L、0.5 μg/L,分别设空白孔,标准品孔和待测样品孔,空白孔加样品稀释液50 μL,标准品孔加稀释好的标准品50 μL,待测样品孔先加入样品稀释液40 μL,再加待测样品10 μL; 待测样品每孔设3个复孔,上样完成后,将酶标板加盖,置于垫有湿纱布的铝盒中,再将铝盒放于37 °C恒温生化箱孵育30 min; 弃去液体,每孔加满稀释后洗涤液振荡30 s,甩干洗涤液,用滤纸拍干,重复5次,拍干; 每孔加入酶标试剂50 μL,空白孔除外,轻轻晃动混匀,37 °C恒温生化箱孵育30 min; 弃去液体,每孔加满稀释后洗涤液振荡30 s,甩干洗涤液,用滤纸拍干,重复5次,拍干; 每孔先加入显色剂A50 μL,再加入显色剂B50 μL,轻轻振荡混匀,37 °C避光显色10 min; 取出酶标板,每孔加入终止液50 μL,终止反应(此时蓝色立刻转为黄色); 以空白孔调零,于酶标仪上在450 nm波长下测量各孔的A值。

**1.2.5 RT-PCR:** Nanog实验分组: 溶媒对照组(含0.1%DMSO的培养基); 空白组(完全培养基); 24 h组(终浓度为1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L); 48 h组(终浓度为1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L); 72 h组(终浓度为1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L)。MMP-9实验分组: 24 h: 空白组、溶媒对照组、1 μmol/L组、10 μmol/L组、100 μmol/L组。

引物设计参照GenBank基因序列设计,设计好后Blast,比对结果与目的基因相符(表1); 抽提RNA; 逆转录; PCR扩增; 20 μL反应体系, Master mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL, 10 μmol/L的PCR特异上下游引物各1 μL, cDNA 2 μL; 各反应条件如下: β-actin: 94 °C, 5 min; 30个PCR循环(94 °C,

表 1 RT-PCR引物

基因	引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
β-actin	F 5'-ATCTGGCACCACACCT-3'	54.8	837
	R 5'-CGTATACTCCTGCTT-3'		
nanog	F 5'-ATGCCTCACACGGAGACTG-3'	51.9	369
	R 5'-CTGCGTCACACCATTGCTA-3'		
mmp-9	F 5'-TGGGCTACGTGACCTATGACAT-3'	48.8	165
	R 5'-CACCTCCACTCCTCCCTTC-3'		

30 s; 54.8 °C, 30 s; 72 °C, 60 s); 72 °C, 5 min. Nanog: 94 °C, 5 min; 30个PCR循环(94 °C, 30 s; 51.9 °C, 30 s; 72 °C, 60 s); 72 °C, 5 min. mmp-9: 94 °C, 5 min; 30个PCR循环(94 °C, 30 s; 48.8 °C, 30 s; 72 °C, 60 s); 72 °C, 5 min. 电泳后的产物用自动电泳凝胶成像分析仪(Bio-Rad, USA)及Image-2200分析软件(Bio-Rad, USA)进行图像分析, 与β-actin灰度值的比值作为Nanog、MMP-9的相对含量。

1.2.6 Western blot: Nanog实验分组: 溶媒对照组(含0.1% DMSO的培养基); 空白组(完全培养基组); 24 h组(终浓度为1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L); 48 h组(终浓度为1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L); 72 h组(终浓度为1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L). MMP-9实验分组: 24 h: 空白组、1 μmol/L组、10 μmol/L组、100 μmol/L组。

提取蛋白后进行蛋白定量, 定量后加入上样缓冲液并行SDS-PAGE, 将蛋白转移到PVDF膜, 丽春红染色观察条带, 自来水冲洗后加5%脱脂奶粉封闭2 h, 分别加入抗Nanog、MMP-9及β-actin抗体, 4 °C孵育过夜, PBS洗膜后加HRP标记的IgG, 室温孵育3 h, 洗膜后加入ECL发光试剂, X线胶片上曝光, 显影, 定影<sup>[6]</sup>. Image-2200分析软件测定Western blot条带的灰度值, 与β-actin灰度值的比值作为Nanog、MMP-9的相对含量。

1.2.7 划痕实验: 按每孔 $2 \times 10^6$ 个HepG2细胞接种在6孔板, 常规培养至90%的融合状态. 用无血清培养液洗细胞3次, 加入新鲜的无血清培养基. 用10 μL Eppendorf Tip在细胞板上划痕<sup>[7]</sup>, 用含1%血清培养基洗细胞3次, 加入新鲜的含1%血清培养基. 加入不同浓度(0 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L)的ATRA, 放入37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱按0 h、24 h取样, 拍照. 计算划痕的距离, 以未加ATRA组为对照, 进行组间比较。

1.2.8 体外细胞侵袭实验: 体外细胞侵袭实验采

用Transwell培养板, 迁移孔上下槽间为直径6.3 mm, 孔径8.0 μm的多聚碳酸膜. 具体的步骤为: 于4 °C融解Matrigel, 每孔50 μL加入预冷的Transwell侵袭小室各孔的上室中, 将培养板置于37 °C孵育过夜. 少量PBS清洗各孔, 用含不同浓度(0 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L) ATRA的无血清培养液制备HepG2细胞悬液, 使细胞浓度为 $1.0 \times 10^5$ /mL, 分别加入各孔的上室中, 每孔100 μL, 在下室加入含有100 mL/L FBS条件培养基500 μL. 每个孔重复3次, 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育24 h. 取出带微孔滤膜的小室, PBS洗涤数次, 4%多聚甲醛固定10 min, 用棉棒擦去微孔滤膜上的Matrigel和未侵袭的细胞, 加入结晶紫(0.1%)染色20 min, PBS洗2遍, 显微镜下观察. 以200倍高倍视野侵袭至滤膜下表面的细胞数目多少反映肿瘤细胞侵袭能力的高低. 随机计数10个视野内的细胞数, 计算平均值进行统计学分析, 以未加ATRA组为对照, 进行组间比较, 实验重复3次。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计学软件进行结果处理. 实验所得数据采用mean±SD, 实验组与对照组的区别用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 MTT ATRA 1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L分别作用于肝癌HepG2细胞24 h、48 h、72 h后, 其A<sub>570</sub>值均较空白对照组明显下降( $P < 0.05$ , 表2). 溶媒组与空白对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ). 其中100 μmol/L的ATRA作用HepG2细胞72 h A<sub>570</sub>值下降明显, 1 μmol/L在24 h A<sub>570</sub>值下降不明显. 说明高浓度ATRA能有效抑制肝癌HepG2细胞的增殖能力。

2.2 平皿克隆实验 肝癌HepG2细胞在平皿中6 d可以形成克隆, 但ATRA作用后能抑制其克隆形成, 且ATRA的抑制程度与作用的浓度相关, 100 μmol/L ATRA作用后几乎无克隆生长, 1 μmol/L及10 μmol/L ATRA作用后仍可见

## ■ 相关报道

研究已发现ATRA对胃癌、乳腺癌、结肠癌等恶性肿瘤有一定的抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡, 降低其侵袭迁移能力的作用。

### ■创新盘点

本研究发  
现 ATRA 可  
诱导肝  
癌 HepG2  
细胞分  
化, 抑制  
其增殖、  
侵袭及  
迁移能  
力. Nanog  
作为肝  
癌 HepG2  
分化的  
一个指  
标, ATRA  
可降低  
其在肝  
癌 HepG2  
中的表  
达.

表 2 ATRA对HepG2细胞增殖能力的影响 (mean ± SD,  $A_{570}$ 值)

分组	空白对照组	溶媒组	1 μmol/L ATRA	10 μmol/L ATRA	100 μmol/L ATRA
24 h	0.769 ± 0.009	0.769 ± 0.010	0.767 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.683 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.384 ± 0.007 <sup>b</sup>
48 h	0.970 ± 0.008	0.957 ± 0.010	0.813 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.693 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.341 ± 0.006 <sup>b</sup>
72 h	1.099 ± 0.005	1.094 ± 0.009	0.877 ± 0.023 <sup>b</sup>	0.713 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.274 ± 0.011 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组.

表 3 ATRA对HepG2细胞AFP分泌的影响 (mean ± SD, μg/L)

分组	空白对照组	1 μmol/L ATRA	10 μmol/L ATRA	100 μmol/L ATRA
24 h	24.075 ± 0.009	24.022 ± 0.006 <sup>a</sup>	23.616 ± 0.007 <sup>a</sup>	16.951 ± 0.007 <sup>b</sup>
48 h	24.311 ± 0.008	22.606 ± 0.007 <sup>b</sup>	20.455 ± 0.008 <sup>b</sup>	16.646 ± 0.006 <sup>b</sup>
72 h	22.317 ± 0.005	17.920 ± 0.023 <sup>b</sup>	15.062 ± 0.006 <sup>b</sup>	16.468 ± 0.011 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组.

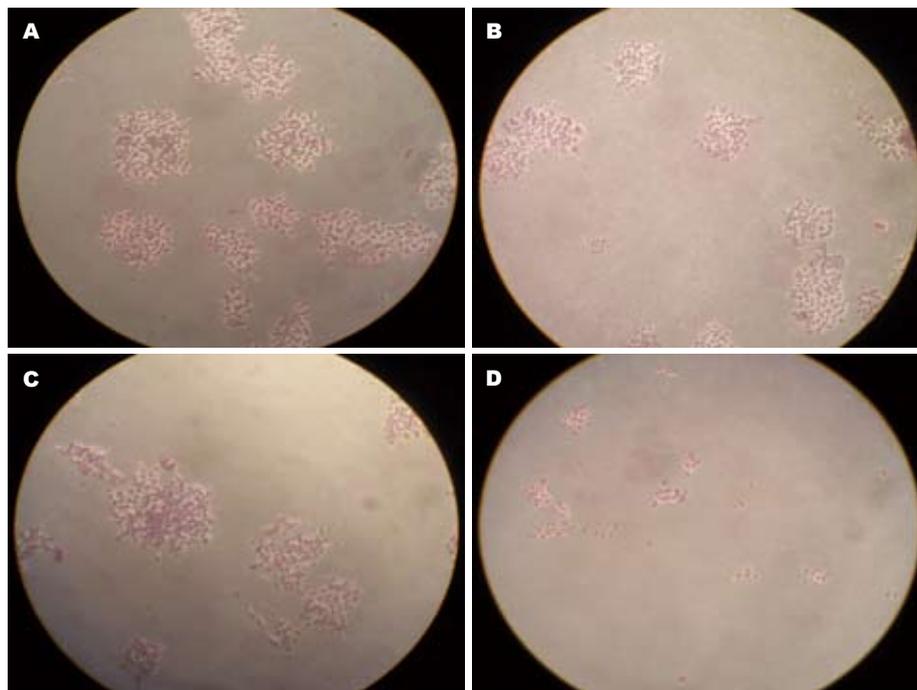


图 1 ATRA对HepG2细胞锚定依赖性生长能力的影响(×100). A: 空白对照组; B: 1 μmol/L ATRA组; C: 10 μmol/L ATRA组; D: 100 μmol/L ATRA组.

少量克隆(图1). 表明ATRA可抑制HepG2细胞锚定依赖性生长能力.

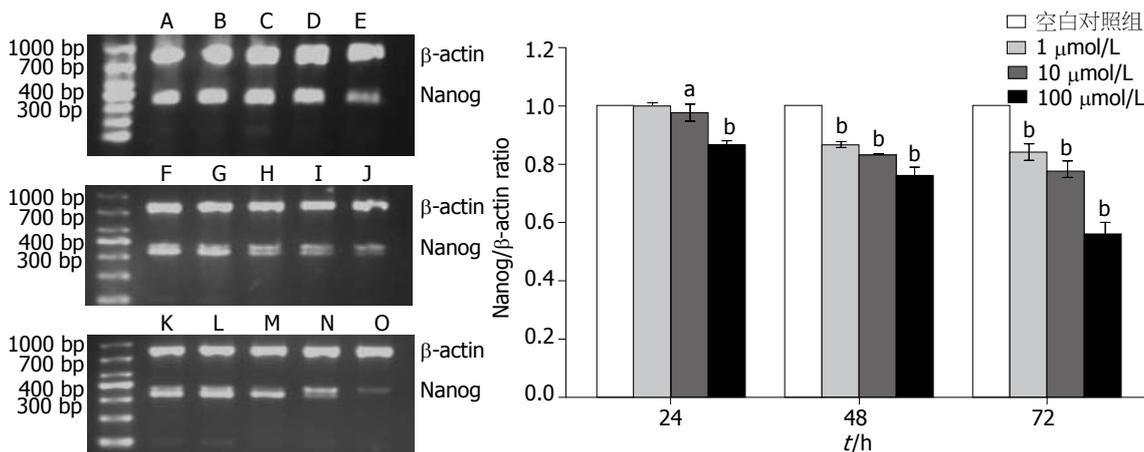
2.3 ELISA ATRA在诱导肝癌细胞分化过程中, AFP分泌量均随处理天数的延长而呈降低趋势, 且组内不同浓度之间有显著性差异( $P < 0.05$ , 表3), 且无浓度-时间交互效应, 说明ATRA有诱导HepG2细胞分化的作用.

2.4 Nanog表达水平 ATRA作用于HepG2细胞后, 与空白对照组比较, Nanog的mRNA及蛋白表达

呈时间及浓度依赖性下降( $P < 0.05$ , 图2, 3), 无时间-浓度交叉效应.

2.5 MMP-9表达水平 ATRA作用于HepG2细胞24 h后, 与空白对照组比较, MMP-9的mRNA及蛋白表达呈浓度依赖性下降( $P < 0.05$ , 图4, 5).

2.6 划痕实验 细胞划痕24 h后, ATRA处理的HepG2细胞组分别较各自空白对照组划痕距离明显增宽( $P < 0.05$ , 图6), 表明ATRA可抑制人肝癌HepG2细胞迁移能力.



**应用要点**  
 探讨ATRA对肝癌细胞系HepG2的诱导分化作用及侵袭迁移的影响, 并且探讨了ATRA与肿瘤干细胞分化调节基因Nanog的关系, 为ATRA治疗肝癌进一步提供了临床依据。

图 2 ATRA对HepG2细胞Nanog mRNA表达的影响。A: 空白对照组24 h; B: 溶媒组24 h; C: 1 μmol/L ATRA组24 h; D: 10 μmol/L ATRA组24 h; E: 100 μmol/L ATRA组24 h; F: 空白对照组48 h; G: 溶媒组48 h; H: 1 μmol/L ATRA组48 h; I: 10 μmol/L ATRA组48 h; J: 100 μmol/L ATRA组48 h; K: 空白对照组72 h; L: 溶媒组72 h; M: 1 μmol/L ATRA组72 h; N: 10 μmol/L ATRA组72 h; O: 100 μmol/L ATRA组72 h。\**P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 空白对照组。

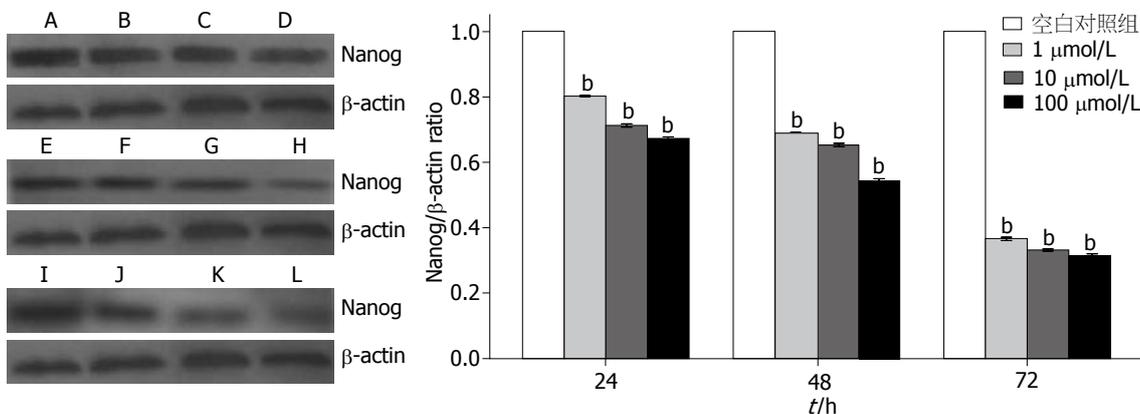


图 3 ATRA对HepG2细胞Nanog蛋白表达的影响。A: 空白对照组24 h; B: 1 μmol/L ATRA组24 h; C: 10 μmol/L ATRA组24 h; D: 100 μmol/L ATRA组24 h; E: 空白对照组48 h; F: 1 μmol/L ATRA组48 h; G: 10 μmol/L ATRA组48 h; H: 100 μmol/L ATRA组48 h; I: 空白对照组72 h; J: 1 μmol/L ATRA组72 h; K: 10 μmol/L ATRA组72 h; L: 100 μmol/L ATRA组72 h。\**P*<0.01 vs 空白对照组。

2.7 侵袭小室实验 ATRA作用HepG2细胞24 h后, 侵袭至滤膜下表面的细胞数目较空白对照组明显减少(*P*<0.05, 图7), 表明ATRA可抑制人肝癌HepG2细胞的体外侵袭能力。

### 3 讨论

维甲酸(RA)类药物包括维生素A的天然及人工合成的衍生物。维生素A(视黄醇)进入人体后转变成视黄醛, 再经氧化变成RA。RA是维持生长发育不可缺少的一种脂溶性维生素, 尤其在促进上皮组织分化生长及维持其正常功能方面起重要作用<sup>[8]</sup>。RA结构式由环状末端、多烯肽侧链和极性末端基团3部分组成, 当这3部分结构各自由不同基团取代时, 可得到生物活性不同的化合物。目前RA类化合物根据结构不同分为3代: 第1代为极性末端被不同基团取代; 第2代

为环状末端基团的改变; 第3代RA则是多烯肽侧链的改变, 并由于羧基方向不同分为2种异构体, 即顺式维甲酸及全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA), 其中全反式构型最为稳定和常见。

RA的生物活性是通过核内可被配体饱和的维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和维A类化合物X受体(retinoic X receptor, RXR)激活而介导的<sup>[9]</sup>。RA诱导细胞分化的机制上不明确, 但是大量研究表明ATRA诱导肿瘤细胞分化的作用可用于治疗肿瘤。其可能的机制有: (1)RA受体的作用。RA受体包括RAR和RXA两种, 各有α、β、γ、δ 4种构体, 他们有不同的调节功能, 可通过与特异的RA结合发挥作用<sup>[10]</sup>; (2)对细胞周期的影响。大量研究表明, RA可抑制肝癌细胞生长, 使细胞周期G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>延长, 影响DNA合成, 最终产生增殖抑制, 诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>; (3)调控基因和

■同行评价

本研究采用肿瘤细胞诱导分化剂ATRA体外诱导人肝癌细胞,采用分子生物学方法检测ATRA对人肝癌细胞HepG2的生长、分化、侵袭和迁移能力的影响,研究内容翔实,对临床肝癌的治疗具有一定的参考价值.

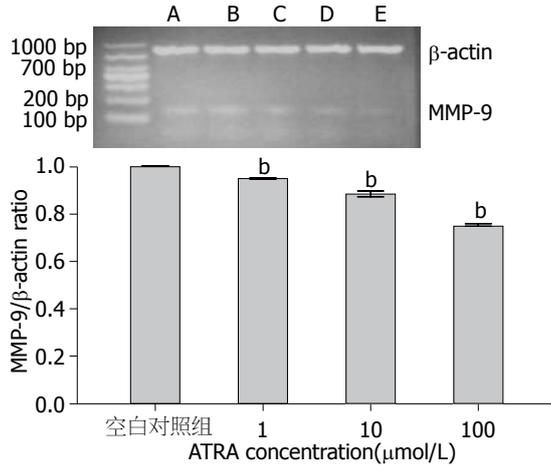


图4 ATRA对HepG2细胞MMP-9 mRNA表达的影响. A: 空白对照组; B: 溶媒组; C: 1 μmol/L ATRA组; D: 10 μmol/L ATRA组; E: 100 μmol/L ATRA组. <sup>b</sup>P<0.01 vs 空白对照组.

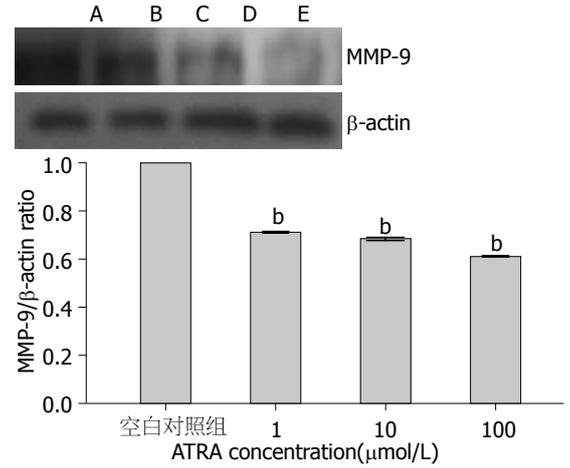


图5 ATRA对HepG2细胞MMP-9蛋白表达的影响. A: 空白对照组; B: 1 μmol/L ATRA组; C: 10 μmol/L ATRA组; D: 100 μmol/L ATRA组. <sup>b</sup>P<0.01 vs 空白对照组.

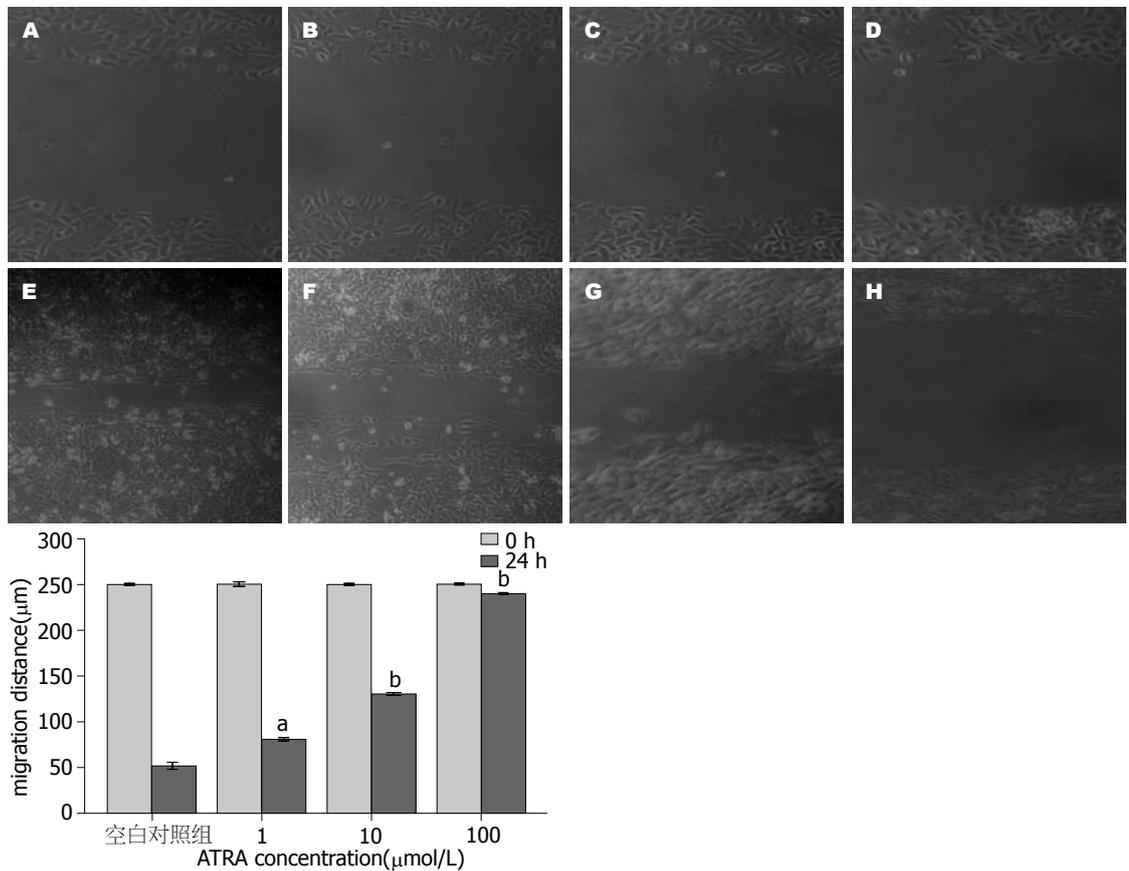


图6 ATRA作用于HepG2细胞24 h划痕实验(x100). A: 空白对照组0 h; B: 1 μmol/L ATRA组0 h; C: 10 μmol/L ATRA组0 h; D: 100 μmol/L ATRA组0 h; E: 空白对照组24 h; F: 1 μmol/L ATRA组24 h; G: 10 μmol/L ATRA组24 h; H: 100 μmol/L ATRA组24 h. <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 空白对照组.

细胞因子的表达. Feng等<sup>[12]</sup>也报道ATRA能够提高肝癌细胞株SMMC27721细胞表面整合素α5β的表达,抑制细胞生长并引起凋亡,使肝癌细胞凋亡相关基因*Fas*和*P53*的蛋白表达增高,并抑制*bcl-2*的表达,从而诱导肝癌细胞凋亡.有研究表明, TGF-β1是一重要的多功能的生长因子,并已

发现TGF-β1与ATRA的功能有一定关系<sup>[13]</sup>. Masaki等<sup>[14]</sup>表明ATRA通过诱导C/EBPβ-LIP的产生来降低人白蛋白的产生,而白蛋白是诊断肝脏疾病的一项可靠的依据<sup>[15,16]</sup>.

肿瘤细胞的锚定依赖性生长特性是肿瘤细胞区别于正常细胞的重要标志,与肿瘤在体内

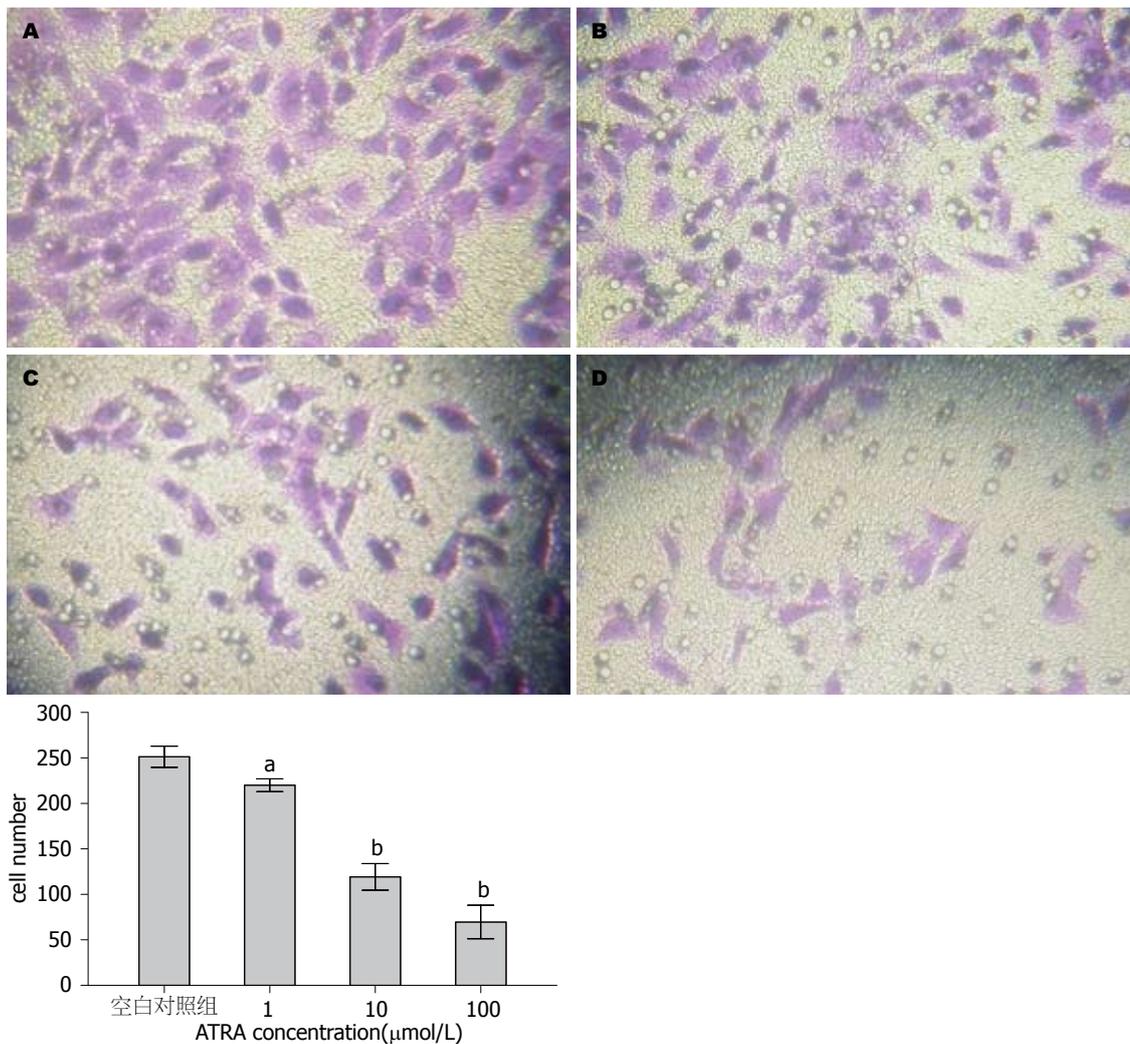


图 7 ATRA作用于HepG2细胞24 h侵袭实验( $\times 200$ )。A: 空白对照组; B: 1  $\mu\text{mol/L}$  ATRA组; C: 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA组; D: 100  $\mu\text{mol/L}$  ATRA组。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组。

的生长能力高度相关<sup>[17]</sup>。在体外培养条件下, 细胞生长和锚定依赖等恶性特征消失, 可以代表肿瘤细胞的去恶化表现, 因此, 我们应用MTT及平皿集落形成法检测ATRA对体外培养肝脏细胞的生长及增殖能力的影响。结果表明, ATRA能抑制肝癌HepG2的增殖及锚定依赖生长能力。

AFP是一种胚胎性蛋白, 主要由胚肝产生, 在早期胎肝组织中高表达而分化成熟肝细胞不表达。随着肝细胞的分化, 抗原会逐渐消失, 在肝癌中分泌量增高, 而在正常成人肝中则无分泌<sup>[18]</sup>。因此AFP是肝谱系的早期表面分子, 与肝癌的恶性程度密切相关<sup>[19]</sup>, 可阻止肝癌细胞分化、凋亡, 促进肝癌细胞增殖, 起生长调节作用。许多分化诱导剂可下调AFP的表达, 因此, AFP是肝癌细胞诱导分化的一个重要鉴定指标, 并被认为是诊断肝癌的标志蛋白<sup>[20-22]</sup>。因此本实验通过ELISA法检测ATRA对肝癌HepG2的诱导分化作用, 结果表明, ATRA在诱导肝癌细胞分

化过程中, AFP分泌量均随处理天数的延长而呈降低趋势, 且组内不同浓度之间有显著性差异( $P < 0.05$ ), 无浓度-时间交互效应。说明ATRA有诱导HepG2细胞分化的作用。

近年来, 随着“干细胞”的概念被引入肿瘤学研究, 以及多种肿瘤干细胞得到分离和鉴定, 肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)学说逐渐形成。具有自我更新和无限增殖能力以及多向分化潜能, 是肿瘤形成的起始细胞并维持肿瘤的持续生长, 也称为“肿瘤起始细胞”(tumor-initiating cells, TICs), 在肿瘤的发生、进展、转移、复发中起关键作用<sup>[23,24]</sup>。越来越多的研究表明原发性肝癌来源于肝癌干细胞, 肝癌可能来源于肝干细胞的分化成熟受阻。肿瘤干细胞生物学作用的物质基础是表达于肿瘤干细胞膜表面的蛋白分子, 即肿瘤干细胞表面标志。这些表面标志犹如肿瘤干细胞的“指纹”, 研究者可以通过识别和利用这些表面标志来准确

地筛选与分离肿瘤干细胞. 肿瘤干细胞的存在最早是从急性髓细胞白血病(AML)中得到证实的. Bonnet和Dick<sup>[25]</sup>在研究中发现, 只有表面标志为CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的白血病细胞能在其他小鼠体内重建AML. Oct4、Sox2、Nanog、SMO、 $\beta$ -Catenin、Wnt5b是近年来发现的干细胞相关基因. Nanog、Oct4和Sox2位于维持干细胞全能性调控网络的顶端, 共同调控与自我更新、分化有关的下游基因<sup>[26]</sup>. Nanog在维持胚胎干细胞的全能性中是必须的<sup>[27-28]</sup>, 研究表明, Nanog在早期胚胎发育中表达, 而在已分化的细胞及成体组织中不再表达<sup>[29]</sup>, 因此Nanog可作为肿瘤干细胞分化的指标. Nanog不仅与生殖系统肿瘤关系密切, 在胃肠道及肝癌中也存在表达, 且与实体瘤分化状态密切相关<sup>[30-32]</sup>. 肝癌细胞系HepG2细胞是一种来源于人肝母细胞瘤且被国际公认的细胞株, 具有典型的肝干细胞特性<sup>[33]</sup>, 有研究表明, ATRA在诱导P19胚胎癌性干细胞分化过程中分化调节基因Nanog、oct4、coAA表达均下降<sup>[34]</sup>, 表明ATRA诱导肿瘤分化与肿瘤干细胞分化调节基因有关. 因此本实验通过RT-PCR及Western blot检测ATRA作用于肝癌HepG2前后Nanog的mRNA及蛋白表达的变化, 结果显示, 肝癌HepG2细胞表达Nanog, 反式RA作用于HepG2细胞后, Nanog的mRNA表达及蛋白表达呈时间及浓度依赖性下降. 说明肝癌HepG2细胞中存在肝癌干细胞, Nanog不仅可作为肝癌干细胞的表面标记, 还可作为肝癌HepG2分化的一个指标.

肿瘤细胞和机体的协调关系被打破, 细胞间的黏附, 以及细胞基质的黏附, 基质金属蛋白酶(Mmps)的异常表达与活性都与肿瘤的侵袭及迁移行为有关<sup>[35]</sup>. Mmps是近年来发现的一组锌离子依赖性内肽酶, 为重要的细胞外基质降解酶, 他通过对细胞外基质不同成分的降解在肿瘤侵袭、转移中起关键作用<sup>[36]</sup>. Mmps家族包括多种, 已发现的有22个<sup>[37]</sup>, 其中MMP-9是Mmps家族中最主要的成员之一, 研究表明ATRA可以增加甲状腺癌细胞对细胞外基质的黏附能力, 从而降低甲状腺癌细胞的侵袭能力; 也有研究表明ATRA可通过RA受体机制降低耐酸肠癌细胞的MMP-9及MMP2水平, 从而降低这种细胞的侵袭迁移能力; 最近研究表明, ATRA是抑制胃癌GIST细胞侵袭及能力的一种潜在试剂<sup>[38]</sup>. 因此本实验通过检测ATRA对肝癌HepG2 MMP-9 mRNA及蛋白的表达的影响, 侵袭小室及划痕实验检测ATRA对其侵袭及迁移能力的影响, 实验

结果表明, 肝癌HepG2细胞可分泌MMP-9, 其分泌量随ATRA的浓度升高而下降; 侵袭实验表明, ATRA可呈浓度依赖性降低人肝癌细胞HepG2的体外侵袭能力; 划痕实验表明ATRA可成时间-浓度依赖性降低人肝癌细胞的迁移能力.

#### 4 参考文献

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Uruno A, Noguchi N, Matsuda K, Nata K, Yoshikawa T, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C-delta. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 235-247
- Wang T, Jia L, Yang G, Ji S, Yao L, Zhang B. Identification of Juxtandin promoter and its transcriptional regulation during the ATRA-induced differentiation of C6 cells. *Mol Cell Biochem* 2011; 350: 177-183
- Cho HY, Choi EK, Lee SW, Kim KH, Park SJ, Lee CK, Lee SW. All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. *Immunol Lett* 2011; 136: 97-107
- Suzukawa M, Nakazora T, Kawasaki Y, Tominaga T, Shinohara K. Massive ascites associated with all-trans retinoic acid treatment in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Intern Med* 2010; 49: 457-460
- Li C, McFadden SA, Morgan I, Cui D, Hu J, Wan W, Zeng J. All-trans retinoic acid regulates the expression of the extracellular matrix protein fibulin-1 in the guinea pig sclera and human scleral fibroblasts. *Mol Vis* 2010; 16: 689-697
- Hoang TC, Bui TK, Taguchi T, Watanabe T, Sato Y. All-trans retinoic acid inhibits KIT activity and induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor GIST-T1 cell line by affecting on the expression of survivin and Bax protein. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 165
- Collins MD, Mao GE. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 399-430
- Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004; 328: 1-16
- Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, Dedieu S, Billaut X, Lefebvre B. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm* 2005; 70: 199-264
- Arce F, Gätjens-Boniche O, Vargas E, Valverde B, Díaz C. Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Lett* 2005; 229: 271-281
- Feng Y, Wang LY, Cai T, Jin JW, Zhou GF, Cao LH, Zha XL. All-trans-retinoic acid increased the expression of integrin alpha5beta1 and induced "anoikis" in SMMC-7721 hepatocarcinoma cell. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 429-438
- Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. *Hepatology* 1997; 26: 913-921
- Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T,

- Okazaki I, Watanabe T, Suzuki T. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem J* 2006; 397: 345-353
- 15 Chlebowski RT, Grosvenor MB, Bernhard NH, Morales LS, Bulcavage LM. Nutritional status, gastrointestinal dysfunction, and survival in patients with AIDS. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 1288-1293
- 16 Phillips A, Shaper AG, Whincup PH. Association between serum albumin and mortality from cardiovascular disease, cancer, and other causes. *Lancet* 1989; 2: 1434-1436
- 17 Liu L, Shack S, Stetler-Stevenson WG, Hudgins WR, Samid D. Differentiation of cultured human melanoma cells induced by the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 335-340
- 18 Hu ZJ, Lang ZW, Song CZ, Zhang SJ. [Detection of hepatic progenitor cells in patients with severe hepatitis and their distribution]. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003; 11: 394-397
- 19 Kobashi H, Miyake Y, Ikeda F, Yasunaka T, Nishino K, Moriya A, Kubota J, Nakamura S, Takaki A, Nouse K, Yamada G, Yamamoto K. Long-term outcome and hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis B or cirrhosis patients after nucleoside analog treatment with entecavir or lamivudine. *Hepatol Res* 2011; 41: 405-416
- 20 Alqutub A, Peck D, Marotta P. Spontaneous regression of a large hepatocellular carcinoma: case report. *Ger Med Sci* 2011; 9: Doc07
- 21 Kalva SP, Iqbal SI, Yeddula K, Blaszkowsky LS, Akbar A, Wicky S, Zhu AX. Transarterial chemoembolization with Doxorubicin-eluting microspheres for inoperable hepatocellular carcinoma. *Gastrointest Cancer Res* 2011; 4: 2-8
- 22 Behboudi S, Pereira SP. Alpha-fetoprotein specific CD4 and CD8 T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2010; 2: 256-260
- 23 Gil-Benso R, Martinez-Lorente A, Pellin-Perez A, Navarro-Fos S, Gregori-Romero MA, Carda C, Callaghan R, Peydro-Olaya A, Llombart-Bosch A. Characterization of a new rat cell line established from 2'AAF-induced combined hepatocellular cholangiocellular carcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001; 37: 17-25
- 24 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 25 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 26 Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-956
- 27 Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007; 17: 42-49
- 28 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113: 631-642
- 29 Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643-655
- 30 Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2876-2882
- 31 Xu XL, Xing BC, Han HB, Zhao W, Hu MH, Xu ZL, Li JY, Xie Y, Gu J, Wang Y, Zhang ZQ. The properties of tumor-initiating cells from a hepatocellular carcinoma patient's primary and recurrent tumor. *Carcinogenesis* 2010; 31: 167-174
- 32 Amin R, Mishra L. Liver stem cells and tgf-Beta in hepatic carcinogenesis. *Gastrointest Cancer Res* 2008; 2: S27-S30
- 33 Ruck P, Xiao JC, Kaiserling E. Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. Electron microscopic, immunoelectron microscopic, and immunohistochemical findings. *Am J Pathol* 1996; 148: 321-329
- 34 杨哲琼, 彭仁秀. 分化调节基因在ATRA诱导干细胞分化过程中的变化. *药理学报* 2007; 26: 122
- 35 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 Suppl: S42-S51
- 36 Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2931-2935
- 37 Farias E, Ranuncolo S, Cresta C, Specterman S, Armanasco E, Varela M, Lastiri J, Pallotta MG, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer* 2000; 89: 389-394
- 38 García-Alonso I, Palomares T, Alonso-Varona A, Castro B, Del Olmo M, Portugal V, Méndez J. Effects of all-trans retinoic acid on tumor recurrence and metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 240-248

编辑 李军亮 电编 闫晋利

# NF- $\kappa$ B、HMGB1在重症急性胰腺炎肠黏膜损伤中的时点表达及其意义

卿伯华, 曾之耀, 王湘英, 骆永富, 李振华, 张兴文, 卢义展

## ■背景资料

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)容易发生肠黏膜损伤。目前对于SAP时并发肠黏膜损伤的发生机制尚不明确。控制SAP肠黏膜损伤的发展,对改善SAP预后至关重要。

卿伯华, 曾之耀, 骆永富, 湖南省永州市中心医院普外科 湖南省永州市 425000

王湘英, 张兴文, 湖南省人民医院肝胆胰外科 湖南省长沙市 410005

李振华, 河北省唐山市开滦煤矿医院 河北省唐山市 063000

卢义展, 湖南省湘西自治州人民医院普外科 湖南省湘西自治州 416000

作者贡献分布: 卿伯华与王湘英对此文所作贡献均等; 此课题由王湘英、骆永富、张兴文及卢义展设计; 研究过程、数据分析由卿伯华、曾之耀、骆永富及张兴文操作; 本论文写作由卿伯华、王湘英及骆永富完成。

通讯作者: 王湘英, 主任医师, 410005, 湖南省长沙市, 湖南省人民医院肝胆胰外科, luoyongfu0746@sina.com

收稿日期: 2011-08-28 修回日期: 2011-10-30

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Significance of temporal expression of NF- $\kappa$ B and HMGB1 in intestinal mucosal injury in rats with severe acute pancreatitis

Bo-Hua Qing, Zhi-Yao Zeng, Xiang-Ying Wang, Yong-Fu Luo, Zhen-Hua Li, Xing-Wen Zhang, Yi-Zhan Lu

Bo-Hua Qing, Zhi-Yao Zeng, Yong-Fu Luo, Department of General Surgery, Yongzhou Central Hospital, Yongzhou 425000, Hunan Province, China

Xiang-Ying Wang, Xing-Wen Zhang, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, Hunan Province, China  
Zhen-Hua Li, Kailuan Coal Mine Hospital of Tangshan City, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Yi-Zhan Lu, Department of General Surgery, People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Xiangxi 416000, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiang-Ying Wang, Chief Physician, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, Hunan Province, China. luoyongfu0746@sina.com

Received: 2011-08-28 Revised: 2011-10-30

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the significance of temporal expression of NF- $\kappa$ B and HMGB1 in intestinal mucosal injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

**METHODS:** Seventy SD rats were randomly divided into two groups: A ( $n = 40$ ) and S ( $n =$

30). The two groups were divided into five subgroups for testing at 3, 6, 12, 24, and 36 h. Group A was used to induce SAP by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct, while group S underwent a sham operation. At various time points, serum and intestinal samples were taken to measure serum concentrations of AMY and DAO by ELISA and to detect the expression of NF- $\kappa$ B and HMGB1 in the intestine by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Serum concentrations of DAO increased with the aggravation of SAP. The expression of NF- $\kappa$ B in intestine mucosal injury reached the peak at 3 h, gradually decreased over time, and returned to normal level at 24 h and 36 h. The expression of HMGB1 in intestinal mucosal injury significantly increased at 6 h, gradually increased over time, reached the highest level at 24 h, and remained at a high level at 36 h.

**CONCLUSION:** Intestinal mucosal injury occurs in the early stage of SAP. Intestinal mucosal injury in SAP may be related with the high expression of NF- $\kappa$ B in the small intestinal. HMGB1 as a "late" inflammatory mediator may be involved in the development of SAP-associated intestinal mucosal injury.

**Key Words:** Nuclear factor- $\kappa$ B; High mobility group box protein 1; Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal injury

Qing BH, Zeng ZY, Wang XY, Luo YF, Li ZH, Zhang XW, Lu YZ. Significance of temporal expression of NF- $\kappa$ B and HMGB1 in intestinal mucosal injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3390-3396

## 摘要

**目的:** 探讨NF- $\kappa$ B、HMGB1在SAP大鼠肠黏膜损伤发生发展过程中的时点表达规律及其意义。

**方法:** 将70只SD大鼠随机分为A组( $n = 40$ )和S

## ■同行评议者

施晓雷, 副主任  
医师, 南京大学  
医学院附属鼓楼  
医院肝胆外科

组( $n = 30$ ), 再分别按3、6、12、24、36 h时点随机均等分成5个亚组. A组大鼠行逆行胰胆管匀速泵入5%牛磺胆酸钠建立SAP模型, S组大鼠开腹仅翻动十二指肠. 两组大鼠均在建模后按时点开腹, 门静脉取血检测AMY、DAO浓度, ELISA法和免疫组化法检测小肠黏膜NF- $\kappa$ B和HMGB1的表达.

**结果:** (1)A组大鼠血DAO浓度随时点延迟逐渐增加; (2)肠黏膜NF- $\kappa$ B表达在3 h最高, 随时点延迟逐渐下降, 24 h、36 h降至正常水平; (3)肠黏膜HMGB1表达6 h开始明显升高, 且随时点延迟逐渐增高, 在24 h最高, 一直持续到36 h仍然保持在较高水平.

**结论:** (1)SAP大鼠早期即出现肠黏膜损伤; (2)SAP肠黏膜早期的损伤可能与小肠组织NF- $\kappa$ B的表达增加有关; (3)HMGB1作为“晚期”炎症介质可能介导了SAP肠黏膜损伤的发生发展; (4)HMGB1的调控可能受到了NF- $\kappa$ B的调节.

**关键词:** 核因子- $\kappa$ B; 高迁移率族蛋白1; 重症急性胰腺炎; 肠黏膜损伤

卿伯华, 曾之耀, 王湘英, 骆永富, 李振华, 张兴文, 卢义展. NF- $\kappa$ B、HMGB1在重症急性胰腺炎肠黏膜损伤中的时点表达及其意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3390-3396  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3390.asp

## 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种发病率高、病情重、发病机制复杂的急腹症, 死亡率达20%-30%<sup>[1,2]</sup>. 肠道是SAP发生应激反应的中心器官之一<sup>[3]</sup>. SAP容易发生肠黏膜损伤(intestinal mucosal damage), 使SAP并发肠源性感染, 诱发和加重全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 且病死率居高不下的症结所在<sup>[4]</sup>. 目前, 对于SAP时并发肠黏膜损伤的发生机制尚不明确, 控制SAP肠黏膜损伤的发生发展, 对改善SAP预后至关重要.

研究报道<sup>[5]</sup>, 核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)属于前炎性转录因子, 在SAP发病的早期即被激活, 在SAP的发生、发展以及由此引起的SIRS、MODS中起着关键性作用, 他可能是作为SAP中细胞因子级联瀑布反应的上游靶点, 进而在SAP整个复杂的细胞因子调控网络中起枢纽性作用. 进一步研究发现<sup>[6]</sup>, 高迁

移率族蛋白1(high mobility group box protein 1, HMGB1)由于产生明显晚于TNF- $\alpha$ , IL-1等“早期”炎症介质, 且持续时间较长, 因而被称为“晚期”炎症介质, 参与SAP全身炎症反应综合征和脓毒症的病理过程. 然而, 目前NF- $\kappa$ B、HMGB1在SAP肠黏膜损伤病程中的作用机制尚不明确, 若同时检测NF- $\kappa$ B和HMGB1的动态变化, 将为SAP肠黏膜损伤的研究提供新的思路和方法, 有助于全面了解NF- $\kappa$ B和HMGB1在SAP肠黏膜损伤发生、发展过程中的作用, 为临床进一步研究SAP肠黏膜损伤的防治提供理论依据和实验基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康SD大鼠70只, 清洁级, 雌雄不拘, 体质量250-300 g, 湖南农业大学动物实验中心提供, 许可证编号SCXK(湘)2006-0001. Rabbit Anti-HMGB1、Rabbit Anti-NF- $\kappa$ B、Rat DAO ELISA Kit、Rat HMGB1 ELISA Kit、Rat NF- $\kappa$ B ELISA Kit均购自武汉博士德生物工程有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 70只SD大鼠, 随机(抽签法)分成A组(实验组, SAP组,  $n = 40$ )和S组(假手术组, SO组,  $n = 30$ ). A组和S组再分别按3、6、12、24、36 h时点随机均等分成5个时点组, A组和S组各时点组大鼠数量分别为8只、6只.

**1.2.2 造模:** (1)SAP组模型建立: 建模前禁食12 h, 禁饮4 h, 采用10%水合氯醛腹腔注射(0.3 mL/100 g)麻醉, 腹部手术视野剪毛, 2%络合碘消毒, 铺无菌孔巾, 取上腹正中线切口, 长约3 cm, 依次切开进入腹腔. 入腹后沿胰胆管向十二指肠方向找到十二指肠乳头开口, 1号注射器针头于乳头对侧十二指肠壁无血管区刺一小孔, 将处理消毒后的硬膜外导管沿十二指肠刺孔经乳头开口置入胰胆管内约0.5 cm, 显微血管夹2枚分别夹闭肝门部胆管与胰胆管末端, 匀速泵入5%的牛磺胆酸钠, 0.1 mL/100 g, 速度0.2 mL/min, 3 min后可见胰腺区弥漫性充血肿胀, 观察8 min后松开血管夹并拔管, 8-0无损伤缝线缝合十二指肠穿孔, 关腹(图1A-E). (2)SO组模型建立: 假手术组大鼠开腹仅翻动十二指肠, 关腹(图1F).

**1.2.3 标本采集:** A、S两组大鼠均在建模后按3 h、6 h、12 h、24 h、36 h时点剖腹, 观察腹腔及胰腺大体情况; 门静脉收集血液, 切取胰腺组织和距回盲部约5 cm处小肠一段.

## ■应用要点

本研究同时检测NF- $\kappa$ B和HMGB1的动态变化, 有助于全面了解NF- $\kappa$ B和HMGB1在SAP肠黏膜损伤发生、发展过程中的作用, 为临床进一步研究SAP肠黏膜损伤的防治提供理论依据和实验基础.

### ■名词解释

肠黏膜屏障功能障碍(IBD):指各种原因引起的肠黏膜损伤、肠通透性增加,使肠道防止肠腔内有害物质进入体内其他组织器官和血液循环的功能被破坏,从而导致细菌和(或)内毒素移位。

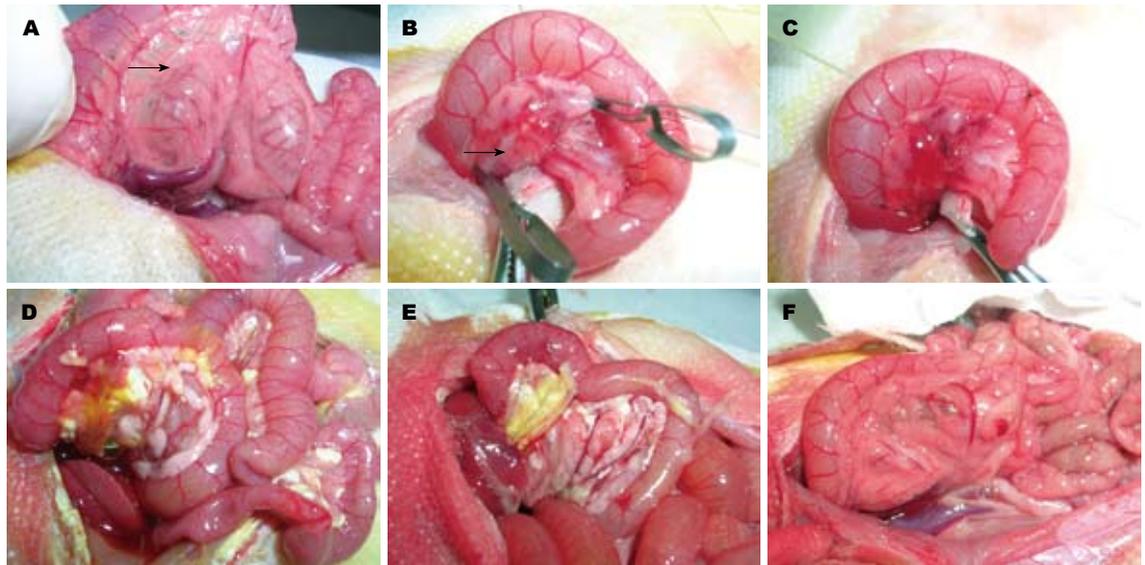


图1 SAP和SO组模型的建立过程。A: 显露胰胆管; B: 泵入5%牛磺胆酸钠后胰管扩张, 胰腺组织充血; C: 8#无损伤缝线缝合后未见十二指肠扩张, 肠壁变色、坏死; D: A24 h时点组 淡红色性腹水, 大量皂化斑; E: A36 h时点组 淡红色性腹水, 大量皂化斑, 肠管明显扩张; F: SO组未见血性腹水、皂化斑及胃肠扩张。

1.2.4 指标检测: (1)全自动生化检测仪检测血AMY; (2)酶联免疫吸附法(ELISA法)检测血DAO; (3)酶联免疫吸附法(ELISA法)检测小肠组织NF- $\kappa$ B和HMGB1浓度。取距回盲瓣5 cm处的一段小肠组织, 纵型剪开, 用冰生理盐水漂洗干净, 用滤纸吸干, 准确称取0.1 g小肠组织, 用组织剪将其剪成碎片, 加入1 mL冰生理盐水, 在冰水浴中用玻璃匀浆器充分研磨6-8 min, 制成10%匀浆液, 于4 °C离心机中, 4 000 r/min离心10 min, 提取上清液分别置入2个EP管中(0.25 mL/管), -20 °C低温冰箱保存; (4)免疫组化法(SP法)检测小肠黏膜NF- $\kappa$ B、HMGB1的表达。石蜡切片经脱蜡, 80 °C恒温箱中烘烤, 二甲苯中浸泡, 梯度酒精水化, 3% $H_2O_2$ 室温孵育10 min, 0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)抗原修复, 加入正常血清封闭液孵育30 min后, 再滴加一抗(1:100)兔抗大鼠50  $\mu$ L, 室温静置2 h, 再加入生物素标记山羊抗兔IgG二抗50  $\mu$ L, 再滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液覆盖, DAB显色, 苏木精复染, 1%盐酸酒精分化, 95%酒精脱水, 恒温箱烘干, 镜检。用PBS代替一抗为阴性对照。

之后, NF- $\kappa$ B显微镜观察, 若为阳性, 棕黄色表达于细胞核内, 少量表达在细胞质; 若为阴性, 细胞核和细胞质均为蓝色(图2)。HMGB1显微镜观察, 若为阳性, 棕黄色表达于胞浆, 少量表达细胞核内; 若为阴性, 细胞核和细胞质均为蓝色(图3)。

使用美国Image proplus 6.0专业图像分析软件进行分析, 每个时点组各张切片高倍镜下

(400倍)随机取5个视野, 按照双盲法原则由病理医师指导在光镜下观察阳性表达的情况, 取平均值作为结果做半定量分析。小肠黏膜细胞NF- $\kappa$ Bp65的阳性表达采用测定阳性细胞数(N); 小肠黏膜细胞HMGB1的阳性表达采用测定阳性染色部位的累积吸光度(LA), 即将图片上每个阳性染色部位的像素点的强度值全部累加起来得到的值。

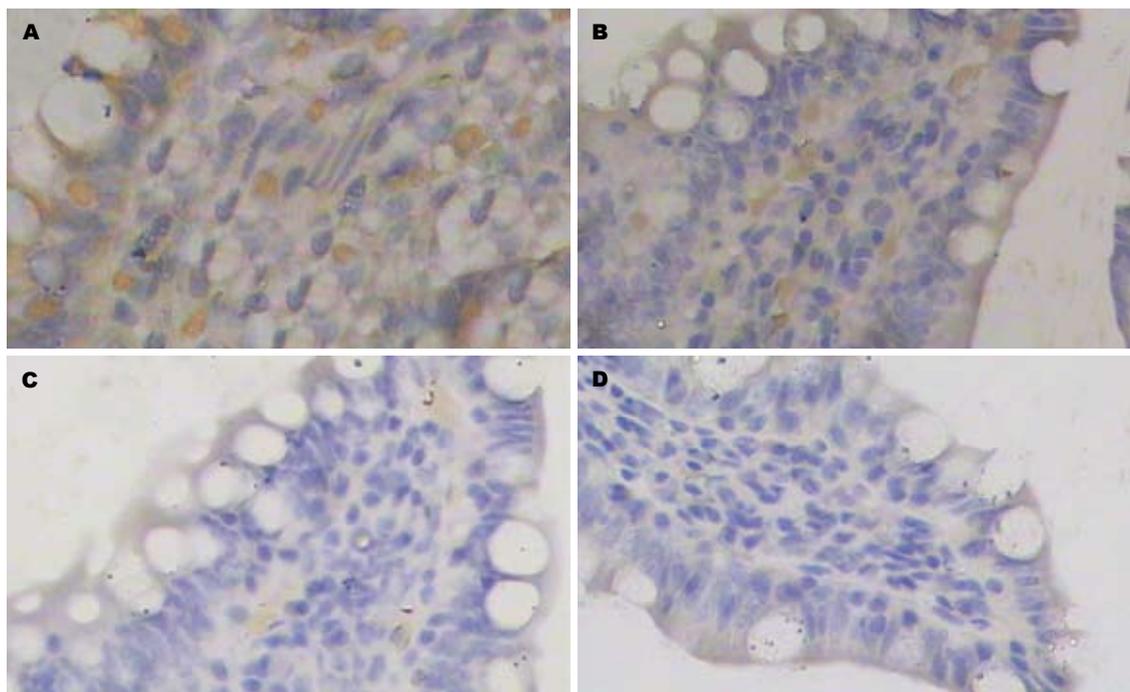
**统计学处理** 实验数据以mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS13.0统计软件对各组数据进行统计学处理。随机设计资料的多个样本均数比较及样本均数间多重比较采用One-Way ANOVA分析, 两因素相关分析采用Person法;  $P<0.05$ 表示统计学差异。

## 2 结果

**2.1 血AMY浓度** A组大鼠各时点组血AMY浓度均高于相应的S组各时点组。血AMY浓度, 有统计学差异( $P<0.05$ ), 且浓度在3 h时点开始升高, 24 h时点达到最高, 36 h时点仍在较高水平(表1)。

**2.2 血浆DAO浓度** A组大鼠3 h时点血浆DAO浓度与相应的S组同时点血浆DAO浓度比较, 无统计学差异( $P>0.05$ ), 其余各时点血浆DAO浓度均高于相应的S组同时点血浆DAO浓度, 有统计学差异( $P<0.05$ )。A组大鼠血浆DAO浓度在6 h时点开始升高, 随时点延迟逐渐升高, 36 h时点仍处于较高水平(表1)。

**2.3 肠黏膜NF- $\kappa$ B表达结果** 小肠黏膜ELISA法和免疫组化结果均显示, A组大鼠3 h、6 h、12 h



**■同行评价**  
本研究同时检测了NF- $\kappa$ B和HMGB1在SAP肠黏膜损伤中的动态变化,为临床上这一疾病的防治提供了一定的理论依据和实验基础,有较好的意义.

图 2 免疫组织化学染色检测大鼠肠黏膜细胞NF- $\kappa$ B的表达(HE染色,  $\times 400$ ). A: SAP组3 h; B: SAP组6 h; C: SAP组12 h; D: SO组.

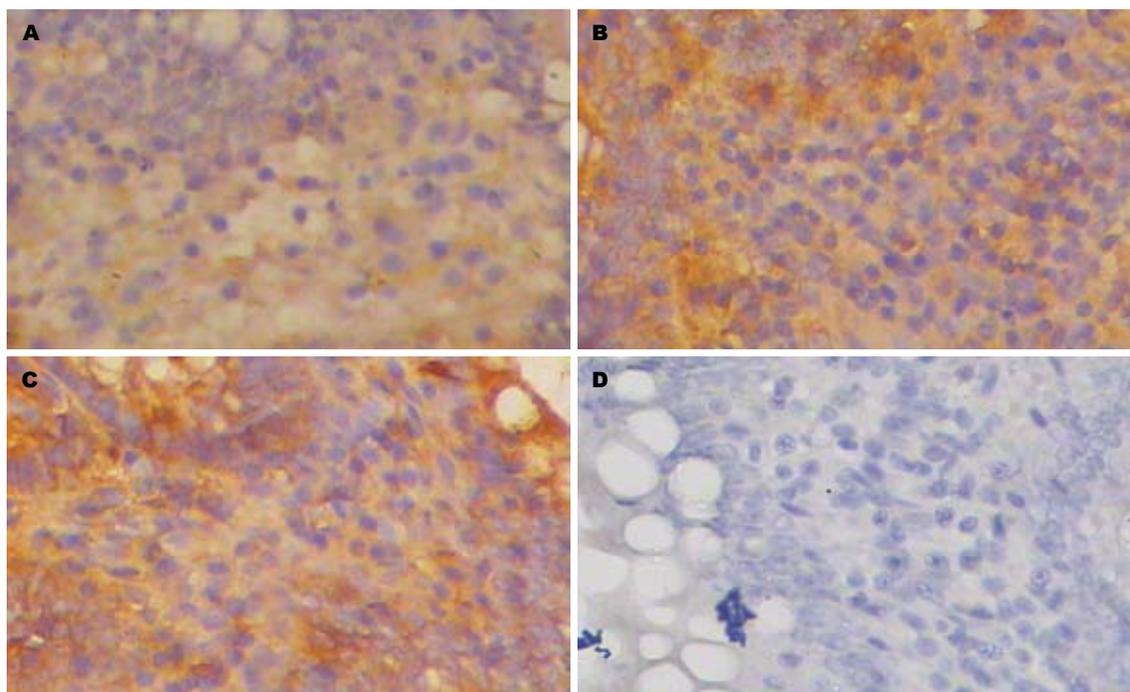


图 3 免疫组织化学染色检测大鼠肠黏膜细胞HMGB1的表达(HE染色,  $\times 400$ ). A: SAP组12 h; B: SAP组24 h; C: SAP组36 h; D: SO组.

时点组小肠组织NF- $\kappa$ B浓度均高于S组同时点组小肠组织NF- $\kappa$ B浓度,有统计学显著性差异( $P < 0.05$ ),24 h和36 h时点组小肠组织NF- $\kappa$ B浓度与相应的S组同时点组比较,无统计学差异( $P > 0.05$ ).A组大鼠小肠组织NF- $\kappa$ B浓度在3 h时点最高,6 h时点开始下降,12 h时点降至较低水

平,24 h时点降至正常水平(表1,2).

**2.4 肠黏膜HMGB1表达结果** 小肠黏膜ELISA法和免疫组化结果均显示,A组大鼠3 h时点组小肠组织HMGB1浓度与相应的S组同时点组比较,无统计学差异( $P > 0.05$ ),其余各时点组小肠组织HMGB1浓度高于相应的S组同时点组,有统计

表 1 成模后各时点组血AMY、DAO、小肠组织NF- $\kappa$ B和HMGB1浓度结果比较

时间点	分组	血淀粉酶(U/L)	DAO(U/ml)	NF- $\kappa$ B	HMGB1
3 h	A组	4102.06 ± 1513.98 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.02	8.88 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.026
	S组	1617.10 ± 320.82	0.14 ± 0.011	3.36 ± 0.23	0.42 ± 0.06
6 h	A组	7610.88 ± 4068.27 <sup>a</sup>	0.245 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.01 ± 0.52 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>a</sup>
	S组	1782.96 ± 433.34	0.14 ± 0.021	3.26 ± 0.22	0.40 ± 0.03
12 h	A组	8005.88 ± 2089.58 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.26 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.05 <sup>a</sup>
	S组	1886.26 ± 463.62	0.15 ± 0.03	3.27 ± 0.16	0.42 ± 0.04
24 h	A组	10525.15 ± 3000.21 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.39 ± 0.16	0.76 ± 0.06 <sup>a</sup>
	S组	1613.90 ± 99.44	0.14 ± 0.01	3.22 ± 0.17	0.41 ± 0.03
36 h	A组	7290.46 ± 1231.47 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.24	0.70 ± 0.07 <sup>a</sup>
	S组	1608.71 ± 349.33	0.14 ± 0.02	3.19 ± 0.15	0.39 ± 0.01

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs S组.

表 2 成模后各时点小肠肠黏膜细胞NF- $\kappa$ B、HMGB1阳性表达结果比较

时间点	分组	阳性细胞数	I $\lambda$
3 h	A组	55.00 ± 6.50 <sup>a</sup>	2864.25 ± 337.78
	S组	1.83 ± 0.75	2704.33 ± 276.88
6 h	A组	19.75 ± 3.37 <sup>a</sup>	4939.50 ± 1314.53 <sup>a</sup>
	S组	1.50 ± 0.83	2713.66 ± 224.58
12 h	A组	8.62 ± 1.59 <sup>a</sup>	6233.75 ± 841.81 <sup>a</sup>
	S组	1.66 ± 0.81	2537.33 ± 289.80
24 h	A组	1.87 ± 0.83	53733.75 ± 9849.22 <sup>a</sup>
	S组	1.50 ± 0.54	2764.16 ± 325.97
36 h	A组	1.75 ± 0.70	46635.37 ± 9081.32 <sup>a</sup>
	S组	1.66 ± 0.51	2664.33 ± 277.99

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs S组.

学差异( $P < 0.05$ ). A组大鼠小肠组织HMGB1浓度在6 h时点开始升高, 随时点延迟逐渐升高, 24 h时点达到高峰, 一直持续到36 h时点仍然保持较低水平(表1, 2).

### 3 讨论

正常肠黏膜屏障包括机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障<sup>[7]</sup>. 肠道是人体最大的“贮菌库”, 正常肠道内细菌种类达500种以上, 主要为需氧菌和兼性菌, 95%以厌氧菌为主, 末端回肠和结肠细菌较多. 肠黏膜不仅是人体营养物质消化、吸收的重要场所, 同时也是致病微生物和毒素侵入的主要门户. 肠黏膜屏障功能障碍(intestinal mucosal barrier dysfunction, IBD)是指各种原因引起的肠黏膜损伤、肠通透性增加, 使肠道防止肠腔内有害物质进入体内其他组织器官和血液循环的功能被破坏, 从而导致细菌

和(或)内毒素移位<sup>[8]</sup>. Banks等<sup>[9]</sup>利用糖分子探针, 对SAP患者肠通透性进行研究, 表明SAP肠通透性明显增加, 存在肠屏障功能障碍. SAP时肠黏膜屏障功能障碍的直接危害是肠道细菌移位导致胰腺坏死组织及其他远隔脏器感染, 而间接危害是肠道细菌、内毒素进入体循环导致肠源性内毒素血症, 刺激已经活化的单核和巨噬细胞释放过量的细胞因子和炎性介质, 促使SIRS的发生, 对胰腺等脏器构成严重的“第二次打击”, 甚至诱发和加重MODS, 导致较高死亡率<sup>[10]</sup>.

血浆二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)是特异性存在于哺乳动物肠黏膜上皮细胞的细胞质中, 具有高度活性的细胞内酶, 在小肠黏膜上皮层绒毛中含量高、活性强. 正常情况下DAO不会出现在血浆中, 只有当肠黏膜上皮细胞受损, 细胞内的DAO释放进入组织间隙、淋巴管和血循环, 使血中DAO含量升高. 因此, 外周血的DAO活性稳定, 血液DAO含量可客观反映肠黏膜结构完整性, 而肠黏膜结构的破坏是发生肠黏膜屏障功能障碍的基础, 故检测血液DAO也可间接反映肠黏膜屏障功能. 动物实验证实<sup>[11]</sup>, 血浆DAO活性的升高和降低, 与病理检查证实的肠黏膜结构的破坏与恢复是一致的. 黄晓曦等<sup>[12]</sup>临床研究53例危重病患者中, 提示存在肠黏膜屏障功能障碍的患者血浆DAO增高. 这与我们前期的研究结果相吻合<sup>[13]</sup>. 动态监测血中DAO活性的改变, 可准确了解早期肠黏膜屏障功能的变化, 有望应用于临床<sup>[14]</sup>. 本实验研究中A组大鼠血DAO浓度6 h时点与S组同时点比较, 有统计学差异, 随时点的延迟逐渐升高, 提示SAP模型建立后6 h时点即开始出现明显的肠黏膜受损, 且随时点的延迟, 逐渐加重.

NF- $\kappa$ B是Sen等<sup>[15]</sup>1986年首次在成熟B细胞、浆细胞中发现的能与免疫球蛋白K轻链启动子KB序列特异结合的一种高度保守的免疫反应性蛋白. 现已发现5种蛋白属于NF- $\kappa$ B/Rel家族, 根据C末端序列的不同可分为2大类, 一类包括cRel A(P65)、cRel B和c-Rel; 另一类包括P50(NF- $\kappa$ B1)和P65(NF- $\kappa$ B2). 我们通常所说的NF- $\kappa$ B通常指NF- $\kappa$ B P65, 他在细胞内含量最多, 是其活性的主要形式. NF- $\kappa$ B是具有基因转录调节作用的蛋白质因子, 参与许多炎性因子的调控. 在未受刺激时, 细胞质中的NF- $\kappa$ B与抑制因子I- $\kappa$ B结合处于非活化状态, 受到刺激时, I- $\kappa$ B与NF- $\kappa$ B解离, NF- $\kappa$ B进入细胞核与特异的启动子结合, 调节基因表达. 而NF- $\kappa$ B的不适当激活是引起过度炎症反应及炎症损伤的关键因素, 从而可加重急性炎症反应, NF- $\kappa$ B激活后, 可刺激TNF- $\alpha$ 、IL-1的产生, 这些蛋白的增多又促进NF- $\kappa$ B的活化. 在SAP中, 无论是胰腺组织还是胰外脏器, NF- $\kappa$ B均明显被激活, 这说明NF- $\kappa$ B在其中起着至关重要的作用. 但目前NF- $\kappa$ B对于SAP肠黏膜屏障功能障碍损伤的具体机制尚不明确.

Wang等<sup>[16]</sup>证实, SAP时大鼠肠黏膜细胞的NF- $\kappa$ B P65表达升高, 给予NF- $\kappa$ B激活的抑制剂, 代表肠黏膜屏障功能的指标血DAO降低, 肠黏膜屏障功能障碍损害减轻, 提示NF- $\kappa$ B介导了SAP肠黏膜屏障功能障碍的发生发展. 本组资料从定量和半定量检测SAP大鼠小肠组织NF- $\kappa$ B的表达, 显示SAP大鼠小肠组织NF- $\kappa$ B的表达3 h时点达到高峰, 6 h时点开始降低, 12 h时点降至较低水平, 24 h、36 h时点降至正常水平. 结合我们血DAO检测结果: A组大鼠6 h时点才开始出现明显的肠黏膜功能受损, 随着时点的延迟, 其肠黏膜的受损程度逐渐增加. 基于以上事实, 提示: (1)SAP大鼠肠黏膜NF- $\kappa$ B表达的增加早于肠黏膜屏障功能的明显损伤; (2)SAP肠黏膜屏障功能早期的损伤可能与小肠肠黏膜NF- $\kappa$ B的表达增加有关.

1973年, Goodwin等<sup>[17]</sup>在牛胸腺中首次提取鉴定了一种含量丰富的非组蛋白核蛋白, 该蛋白分子量30 kDa左右, 富含电荷, 并因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率快的特性而命名为高迁移率族蛋白(high mobility group, HMG). 随后研究发现HMG是一个大家族, HMG包括HMGA、HMGB、HMGN家族, HMGB又可分为HMGB1及HMGB2. HMGB1作为HMGB家族的一个亚族,

是含量最丰富的HMG蛋白, 平均10-15个核小体中含有一个HMGB1分子. HMGB1广泛存在于各种细胞中, 在一般环境条件下, HMGB1的表达量维持在基础水平, 而HMGB2一般只在胚胎期才大量表达, 部位也比较局限.

HMGB1曾经作为一种转录因子和促生长因子而被广泛研究. 然而, 近年来研究表明, HMGB1在感染性脓毒血症、败血症和烧伤等情况下, 作为“晚期”炎症介质在循环和组织中显示出延迟和高水平表达, 以一种时间-剂量依赖方式释放, 可明显影响肝、肺、肠等重要器官的功能, 并可与其他重要的炎性细胞因子如TNF- $\alpha$ 和IL-1等相互诱导, 是内毒素血症致死效应的重要细胞介质, 参与了脓毒症、SIRS及MODS的发生、发展过程<sup>[18,19]</sup>.

我们的实验研究, 采用定量和半定量检测SAP大鼠小肠组织HMGB1的表达, 显示A组大鼠3 h时点小肠组织HMGB1浓度与S组同时点比较( $P>0.05$ ), 随着病程延长, SAP大鼠小肠组织HMGB1的表达强度不断升高, 6 h时点即开始明显升高, 在24 h时点达到高峰, 一直持续到36 h时点. 由此认为, HMGB1可能作为“晚期”炎症介质呈时间-剂量依赖性地增加肠黏膜上皮的损伤, 参与了SAP肠黏膜屏障功能障碍的病理过程. 其机制可能为: HMGB1以及B box能以一种时间剂量方式, 通过增加Caco-2人肠上皮细胞诱导一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA的表达以及NO的合成, 从而增加该细胞的通透性, 对野生型小鼠给予B盒可增加回肠黏膜的通透性, 并使肠道细菌移位至肠系膜淋巴结<sup>[20]</sup>, 该效应在iNOS基因敲除的小鼠中则不能观察到, 表明HMGB1和HMGB1 B盒都能通过依赖于NO的生成, 引起肠屏障功能的变化. 结合我们实验中A组大鼠肠黏膜NF- $\kappa$ B表达3 h即达到高峰, 12 h时点降至正常水平, 而HMGB1表达在6 h时点才开始明显升高, 24 h时点达到高峰, 一直持续到36 h时点. 由此衍生开来: NF- $\kappa$ B可能作为重要的前炎性转录因子, 参与了HMGB1的调控, 可能是SAP肠黏膜屏障功能损伤的上游因子. 因此, 笔者认为, 如能“早期”及时选用特异性的NF- $\kappa$ B抑制剂抑制NF- $\kappa$ B的活化, 而“晚期”选用HMGB1抑制剂抑制HMGB1的活化, 则有可能可以阻断“早期”与“晚期”炎症介质的相互诱导, 必定可以减轻SAP的病情进展, 降低胰腺炎对机体所造成的损害, 从而改善SAP肠黏膜屏障功能, 进而阻止SIRS、MODS的发生, 这将为今后SAP临床

治疗肠黏膜屏障功能障碍提供了一条新的途径。

总之, SAP早期可引起肠黏膜受损, 破坏肠黏膜屏障结构的完整性, 从而引发肠道细菌及内毒素的易位, 发生肠源性感染, 进而导致SIRS、MODS, 严重影响病人的预后。但是, 目前对于其发生机制尚不明确, 本实验初步探讨了SAP肠黏膜屏障损伤NF- $\kappa$ B、HMGB1不同时间点的表达及其意义, 显示在SAP发生发展的病程中, NF- $\kappa$ B、HMGB1分别作为“早期”炎症介质和“晚期”炎症介质在SAP肠黏膜受损的不同病理阶段中起到了很重要的作用。所以, 针对NF- $\kappa$ B、HMGB1靶向治疗的研究为临床不同阶段救治SAP肠黏膜损伤提供了新的治疗思路, 因而具有重要意义。

#### 4 参考文献

- Gaisano HY, Gorelick FS. New insights into the mechanisms of pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; 136: 2040-2044
- Warshaw AL. Improving the treatment of necrotizing pancreatitis—a step up. *N Engl J Med* 2010; 362: 1535-1537
- 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
- Derveniz C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 415-418
- Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998; 43: 856-860
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251
- 高金生, 杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1540-1544
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471
- Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2379-2400
- 刘晓臣, 彭燕. 肠黏膜屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3131-3135
- 吴承堂, 黎洁良. 二胺氧化酶在急性坏死性胰腺炎肠道损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 64-65
- 黄晓曦, 王兴鹏, 吴恺, 马晶晶, 徐铭益. 肠屏障功能障碍临床评估指标建立的初步研究. *中华消化杂志* 2006; 28: 519-522
- 王湘英, 张兴文, 肖彦, 李想, 卢义展. 清胰汤对急性出血坏死性胰腺炎肠道细菌及内毒素移位的影响. *中国普通外科杂志* 2010; 19: 255-258
- Kamei H, Hachisuka T, Nakao M, Takagi K. Quick recovery of serum diamine oxidase activity in patients undergoing total gastrectomy by oral enteral nutrition. *Am J Surg* 2005; 189: 38-43
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716. *J Immunol* 2006; 177: 7485-7496
- Wang YL, Zheng YJ, Zhang ZP, Su JY, Lei RQ, Tang YQ, Zhang SD. Effects of gut barrier dysfunction and NF- $\kappa$ B activation on aggravating mechanism of severe acute pancreatitis. *J Dig Dis* 2009; 10: 30-40
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 38: 14-19
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195
- Angus DC, Yang L, Kong L, Kellum JA, Delude RL, Tracey KJ, Weissfeld L. Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 1061-1067
- Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 790-802

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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。

# RNA干扰*DNMT1*基因对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及相关机制

肖卫东, 李勇, 李学明, 蔡军, 曾林山, 胡伟

肖卫东, 李勇, 李学明, 蔡军, 曾林山, 胡伟, 南昌大学第一附属医院普外科 江西省南昌市 330006  
肖卫东, 副教授, 医学博士, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究, 江西省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. GJJ08077  
江西省自然科学基金资助项目, No. 2010GZY0316  
作者贡献分布: 此课题由肖卫东与李勇设计; 研究过程由肖卫东、李学明、蔡军、曾林山及胡伟操作完成; 数据分析和论文写作由肖卫东与李勇完成。  
通讯作者: 肖卫东, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院普外科, frankxwd@126.com  
收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-10-28  
接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## RNA interference-mediated silencing of the *DNMT1* gene inhibits cell proliferation in human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3

Wei-Dong Xiao, Yong Li, Xue-Ming Li, Jun Cai, Lin-Shan Zeng, Wei Hu

Wei-Dong Xiao, Yong Li, Xue-Ming Li, Jun Cai, Lin-Shan Zeng, Wei Hu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Supported by: the Scientific Research Foundation of the Education Office of Jiangxi Province, No. GJJ08077; the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 2010GZY0316  
Correspondence to: Wei-dong Xiao, Associate Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. frankxwd@126.com  
Received: 2011-09-01 Revised: 2011-10-28  
Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of RNA interference-mediated silencing of the DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) gene on the proliferation of pancreatic carcinoma BxPC-3 cells and to explore the possible mechanisms involved.

**METHODS:** BxPC-3 cells were divided into three groups: experimental group, negative control group and blank control group, which were transfected with a *DNMT1*-specific siRNA, a negative siRNA and empty liposomes using Lipofectamine™ 2000, respectively. The expression

of *DNMT1* mRNA and protein in the transfected cells was analyzed by real-time PCR and Western blot, respectively. Cell growth was measured by MTT assay, and cell apoptosis was examined by flow cytometry. The methylation of tumor suppressor genes (*p16*, *ppENK* and *RASSF1A*) was detected by methylation-specific PCR (MSP) 48 h after transfection.

**RESULTS:** The expression of *DNMT1* mRNA and protein in the experimental group was markedly down-regulated compared to that in the negative control group and blank control group (all  $P < 0.01$ ). Cell growth was significantly slower (both  $P < 0.05$ ) and the apoptosis rate was significantly higher ( $44.46\% \pm 5.98\%$  vs  $3.74\% \pm 1.02\%$  vs  $5.07\% \pm 1.16\%$ , both  $P < 0.01$ ) in the experimental group than in the negative and blank control groups. The methylation of the *p16* and *ppENK* genes was detected in the blank and negative control groups but not in the experimental group. The methylation of *RASSF1A* gene was detected in the two control groups, while only partial methylation of this gene was detected in the experimental group.

**CONCLUSION:** Down-regulation of *DNMT1* inhibited cell growth and promoted apoptosis in human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 possible via mechanisms associated with the demethylation of tumor suppress genes (*p16*, *ppENK* and *RASSF1A*).

**Key Words:** Pancreatic cancer; DNA methyltransferase 1; RNA interference; Cell proliferation; Cell apoptosis; Tumor suppressor gene

Xiao WD, Li Y, Li XM, Cai J, Zeng LS, Hu W. RNA interference-mediated silencing of the *DNMT1* gene inhibits cell proliferation in human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3397-3401

### 摘要

**目的:** 探讨RNA干扰*DNMT1*基因对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及相关机制。

### ■背景资料

胰腺癌的发生发展是一个多因素、多阶段的过程, 其中DNA甲基化等表观遗传学改变发挥了重要作用, 其中*DNMT1*所起的维持甲基化的作用尤为重要。

### ■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

## ■ 研究前沿

去甲基化治疗是当前胰腺癌治疗的研究热点和发展方向之一,亟待解决的问题是靶基因的选择和以何种安全、方便、有效的方式导入受体并实现治疗目的。

**方法:** 利用Lipofectamine<sup>TM</sup>2000转染*DNMT1*-siRNA至胰腺癌细胞BxPC-3。实验共分为3组: 实验组(转染*DNMT1*-siRNA)、阴性对照组(转染negative-siRNA)和空白对照组(转染脂质体)。转染48 h后,应用荧光定量PCR法和Western blot法分别检测细胞中*DNMT1* mRNA和蛋白的表达水平; MTT法检测细胞体外增殖活力; FCM法检测细胞凋亡; 甲基化特异性PCR法(MSP)检测抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*的启动子甲基化状态。

**结果:** 与空白对照组和阴性对照组相比,实验组的*DNMT1* mRNA及蛋白表达量均显著降低( $P < 0.01$ ); 实验组细胞增殖明显受到抑制( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率明显增加( $44.46\% \pm 5.98\%$  vs  $3.74\% \pm 1.02\%$  vs  $5.07\% \pm 1.16\%$ ,  $P < 0.01$ )。空白对照组与阴性对照组的*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因甲基化阳性,而实验组的*p16*和*ppENK*基因甲基化阴性,*RASSF1A*基因部分甲基化。

**结论:** *DNMT1*基因表达下调后,能抑制胰腺癌细胞BxPC-3细胞增殖,并能诱导其发生细胞凋亡; 其作用机制与抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*去甲基化有关。

**关键词:** 胰腺肿瘤; DNA甲基转移酶1; RNA干扰; 细胞增殖; 细胞凋亡; 抑癌基因

肖卫东, 李勇, 李学明, 蔡军, 曾林山, 胡伟. RNA干扰*DNMT1*基因对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及相关机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3397-3401

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3397.asp>

## 0 引言

胰腺癌的发病率在世界范围内呈逐年上升趋势,美国癌症协会的最新资料显示其发病率达11/10万,居恶性肿瘤的第10位,病死率已跃居恶性肿瘤的第4位<sup>[1]</sup>。国内的流行病学资料也显示胰腺癌发病率在逐年上升<sup>[2,3]</sup>。胰腺癌的发生发展是一个多因素、多阶段的过程,其中DNA甲基化等表观遗传学改变发挥了重要作用<sup>[4,5]</sup>。DNA甲基化过程有赖于DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的介导,其中*DNMT1*所起的维持甲基化的作用尤为重要<sup>[6-8]</sup>。本研究通过脂质体将*DNMT1*小干扰RNA片段(small interference RNA, siRNA)稳定转染入胰腺癌细胞BxPC-3,观察其对细胞增殖和凋亡的影响,并探讨相关作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞株BxPC-3购自上海细胞生物研究所细胞库, *DNMT1*以及阴性对照siRNA由Thermo公司设计合成, *DNMT1*-siRNA的靶序列为: 5'-GGAAGAAGAGUUACU-AUAA-3'。兔抗人*DNMT1*单克隆抗体购于Santa Cruz公司,二抗及发光试剂等购于晶美生物工程公司; 逆转录试剂盒购于TaKaRa公司; RPMI-1640培养基、Trizol RNA分离试剂和Lipofectamine<sup>TM</sup>2000购于Invitrogen公司; Wizard DNA clean-up system购于Promega公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物; RealMasterMix(probe)购于北京天根生化科技有限公司; PCR引物和荧光探针由上海生工生物工程股份有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和siRNA转染:** 用含有100 mL/L胎牛血清RPMI-1640培养液在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养胰腺癌细胞BxPC-3,取对数生长期的细胞用于实验。将细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于96孔培养板中,实验分3组: 实验组(转染*DNMT1*-siRNA); 阴性对照组(转染negative-siRNA); 空白对照组(转染脂质体)。采用Lipofectamine<sup>TM</sup>2000脂质体转染siRNA, siRNA终浓度为40 nmol/L, 每组设3个复孔。转染6 h后更换成RPMI-1640培养液,继续常规培养,48 h时收集细胞。

**1.2.2 荧光定量PCR检测*DNMT1* mRNA表达水平:** *DNMT1*引物序列: 上游: 5'-GTTCTTCCTCC-TGGAGAATGTCA-3', 下游: 5'-GGGCCAC-GCCGACTG-3', 探针5'-TTGTCTCCTTCAAGC GCTCCATGGTC-3', 扩增产物138 bp; 内参3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)引物序列: 上游: 5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3', 下游: 5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3', 探针: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3', 扩增产物145 bp。

Trizol法提取总RNA,用逆转录试剂盒将总RNA逆转录合成cDNA。PCR总反应体系为25  $\mu$ L,其中含2.5  $\times$  RealMasterMix、引物(目的基因/内参)、探针、cDNA模板、20  $\times$  Probe Enhancer solution和ddH<sub>2</sub>O。PCR反应条件: 94 °C预变性2 min, 94 °C变性15 s, 62 °C退火延伸30 s, 共40个循环。实验重复3次。由PCR反应曲线得到域值循环数(Ct),以*GAPDH*作为内参照,计算基因相对表达量(RQ值 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )。

1.2.3 Western blot检测*DNMT1*蛋白表达水平: 收集各组细胞, 蛋白提取液提取蛋白, Bradford法测蛋白含量. 每泳道25 μg蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 转硝酸纤维素膜(NC膜), 鼠抗人*DNMT1*(1:100)过夜, 二抗羊抗兔(1:5000)室温孵育1 h, 二氨基联苯胺(DAB)显色, Bio-Rad凝胶成像系统摄影. 以β-肌动蛋白(β-actin)作为参照.

1.2.4 MTT法检测细胞增殖活性: 将细胞接种96孔板(2×10<sup>4</sup>个/孔), 每孔100 μL, 每组设3个复孔. 细胞铺板密度达到90%-95%后进行转染, 转染6 h后加入完全培养基, 培养12、24、48、72 h后, 每孔加入浓度为5 g/L MTT 30 μL, 在37 °C下作用4 h后弃去. 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次后每孔加入150 μL二甲基亚砷(DMSO), 振荡15 min使结晶充分溶解. 在酶标仪测定492 nm波长下的吸光度值(A), 以A值为纵坐标, 培养时间(h)为横坐标绘制细胞生长曲线, 并计算细胞生长抑制率, 抑制率(%) = (A<sub>空白对照组</sub> - A<sub>实验组</sub>) / A<sub>空白对照组</sub> × 100%.

1.2.5 FCM检测细胞凋亡: 用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集各组细胞; 加入PBS洗涤细胞2次, 收集5×10<sup>5</sup>个细胞; 加入250 μL Banding Buffer悬浮细胞; 加入5 μL Annexin V-FITC混匀, 再加入5 μL碘化丙啶(PI)混匀; 室温、避光反应5-10 min; 在1 h内进行流式细仪分析, 分别检测各组细胞凋亡.

1.2.6 甲基化特异性PCR法(MSP)检测*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因启动子甲基化: 收集各组细胞, 按DNA纯化试剂盒说明书步骤提取DNA. 取1 μg DNA溶解于36 μL ddH<sub>2</sub>O中, 加入新鲜配制的3M NaOH(终浓度为0.3 mol/L) 4 μL变性, 37 °C水浴15 min, 加入新鲜配制的10 mmol/L对苯二酚30 μL和3.6 mol/L(PH5.0)重亚硫酸钠520 μL, 55 °C水浴16 h, 用Wizard DNA clean-up system纯化. 同一标本以甲基化和未甲基化引物分别扩增, *p16*基因未甲基化引物序列: 上游: 5'-GGGTGGATTGTGTGTGTTG-3', 下游: 5'-CCATAACCAACCAATCAACCA-3'; 甲基化引物序列: 上游: 5'-GGCGGATCGCGTGCGTTC-3', 下游: 5'-CGTAACCAATCAACCG-3'. *RASSF1A*基因未甲基化引物序列: 上游: 5'-TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG-3', 下游: 5'-CAAACCCACAACTAAAAACAA-3'; 甲基化引物序列: 上游: 5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3', 下游: 5'-AACCCCGCGAACTA-

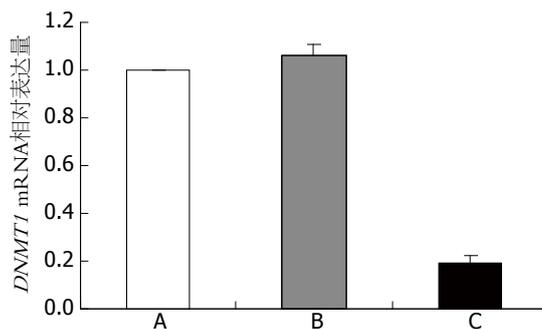


图1 荧光定量PCR检测转染后*DNMT1* mRNA. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组.

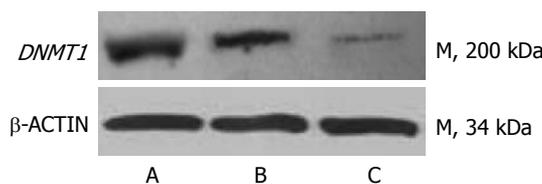


图2 Western blot检测转染后*DNMT1*蛋白. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组.

**■ 相关报道**  
许多研究显示在多种不同的肿瘤组织或细胞中检测出*DNMT1*的高表达, 并密切参与肿瘤的发生发展, 其作用机制可能与*DNMT1*的高表达导致多种抑癌基因启动子高甲基化而表达失活有关.

AAAACGA-3'. *ppENK*基因未甲基化引物序列: 上游: 5'-TTGTGTGGGGAGTTATTGAGT-3', 下游: 5'-CACCTTCACAAAAAATCAATC-3'; 甲基化引物序列: 上游: 5'-TGTGGGGAGTTATCGAGC-3', 下游: 5'-GCCTTCGC-GAAAAAATCG-3'. PCR总反应体系25 μL, 含ddH<sub>2</sub>O、10×PCR buffer、dNTP、上游和下游引物、模板DNA、Taq酶. 循环参数: 95 °C预变性10 min; 80 °C加入Taq DNA聚合酶; 94 °C 45 s, 退火温度62 °C 45 s, 72 °C 50 s; 共36个循环, 最后72 °C延伸3 min. 取6 μL扩增产物于3%琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶图像成像仪下观察结果.

**统计学处理** 数据采用均数±标准差(mean ± SD)表示, 应用SPSS11.0统计软件中的t检验和单因素方差分析(ANOVA), P<0.05为差异具有显著性.

## 2 结果

2.1 siRNA转染对*DNMT1* mRNA和蛋白表达的影响 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组*DNMT1* mRNA和蛋白表达量显著降低(P<0.01), 而阴性对照组与空白对照组无明显差异(P>0.05, 图1, 2).

2.2 siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3细胞增殖的影响 MTT法检测结果显示, 转染后24-72 h, 实验组的细胞生长速度较空白对照组和阴性对照组明显减慢, 差异有统计学意义(P<0.05). 24 h、

### ■同行评价

本研究通过干扰 *DNMT1* 基因表达, 证明该基因可抑制胰腺癌细胞生长并诱导其凋亡, 为临床上甲基化治疗提供了一个新靶点。

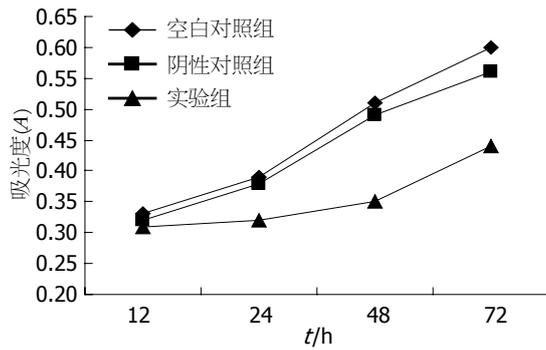


图3 *DNMT1*-siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3细胞增殖的影响。

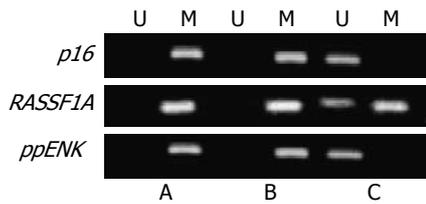


图4 MSP检测*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因启动子甲基化(U: 未甲基化引物; M: 甲基化引物)。A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组。

48 h和72 h时实验组的细胞生长抑制率分别为17.9%、30.9%和26.8%(图3)。

2.3 siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3细胞凋亡的影响 FCM检测结果显示, 转染后48 h, 空白对照组、阴性对照组和实验组的细胞凋亡率分别为 $3.74\% \pm 1.02\%$ 、 $5.07\% \pm 1.16\%$ 和 $44.46\% \pm 5.98\%$ 。与空白对照组和阴性对照组比较, 实验组的细胞凋亡率显著增加( $P < 0.01$ )。

2.4 siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*启动子甲基化的影响 MSP检测结果显示, 空白对照组与阴性对照组的*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因甲基化阳性, 而实验组*p16*和*ppENK*基因甲基化阴性, *RASSF1A*基因部分甲基化(图4)。

### 3 讨论

目前, 许多研究显示在多种不同的肿瘤组织或细胞中检测出*DNMT1*的高表达, 并密切参与肿瘤的发生发展, 其作用机制可能与*DNMT1*的高表达导致多种抑癌基因启动子高甲基化而表达失活有关。以往的实验研究发现, 在非小细胞肺癌细胞NCI-H1299<sup>[9]</sup>和乳腺癌细胞HCC1954<sup>[9]</sup>、食管鳞癌细胞EC9706<sup>[10]</sup>以及膀胱癌细胞T24<sup>[11]</sup>等癌细胞株中, 以*DNMT1*为靶点的基因治疗能有效抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡。

在对胰腺癌的研究中, Peng等<sup>[12,13]</sup>报道,

*DNMT1*在胰腺癌组织中高表达, 并与肿瘤T分期及TNM分期密切相关。*DNMT1*高表达预示患者预后不良, 而且*BRCA1*、*APC*、*p16*、*TIMP-3*等基因的高甲基化与*DNMT1*表达上调有关。因此, 推测*DNMT1*也可作为胰腺癌基因治疗的靶点。国内学者徐岷等<sup>[14,15]</sup>报道转染*DNMT1* siRNA能有效抑制胰腺癌PaTu8988细胞*DNMT1* mRNA的表达, 同时抑制细胞增殖、促进细胞凋亡, 其机制可能与上调细胞周期调控基因*p21*的表达有关。本研究同样以*DNMT1*为靶基因, 在胰腺癌细胞BxPC-3中利用RNAi技术沉默靶基因的表达, 从而观察其对细胞增殖和凋亡的影响。实验结果显示, 在*DNMT1*基因表达下调后, 胰腺癌细胞BxPC-3生长速度明显减缓, 细胞凋亡率明显增加。

*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*是与多种肿瘤发生发展密切相关的重要抑癌基因, 参与细胞周期的调控, 负调节细胞增殖及分裂, 他们在胰腺癌中都因基因启动子CpG岛高甲基化而表达失活<sup>[16-19]</sup>。Ueki等<sup>[16]</sup>报道胰腺癌组织中*ppENK*基因启动子甲基化发生率为93%; Dammann等<sup>[19]</sup>的研究结果显示, 胰腺癌组织中*RASSF1A*和*p16*基因启动子甲基化发生率分别为64%和43%; 在8株胰腺癌细胞系中, *RASSF1A*和*p16*基因启动子甲基化发生率则分别高达87.5%和63%。为进一步探讨*DNMT1*-siRNA对胰腺癌细胞BxPC-3的相关抑癌作用机制, 本研究观察了沉默*DNMT1*基因对*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因启动子甲基化状态的影响, 结果显示, 空白对照组与阴性对照组的*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因甲基化阳性, 而实验组的*p16*和*ppENK*基因甲基化阴性, *RASSF1A*基因部分甲基化。该结果提示, *DNMT1*基因表达下调后抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*不同程度去甲基化, 抑癌基因去甲基化后可以在细胞中重新表达, 从而通过多种途径发挥其抑癌作用。

总之, 本研究结果表明, *DNMT1*基因表达下调后, 能抑制胰腺癌细胞BxPC-3细胞生长, 并能诱导其发生细胞凋亡, 其作用机制与抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*去甲基化有关, 提示*DNMT1*是胰腺癌去甲基化治疗的一个有效靶点。

### 4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 赵玉沛. 胰腺癌的诊断与治疗的现状与未来. *中华肝胆外科杂志* 2009; 15: 321-323
- 倪泉兴. 胰腺癌的临床流行病学研究现状. *胰腺病学*

- 2006; 2: 65-68
- 4 宋天强, 李强. 胰腺癌的表遗传学研究进展. 中华实验外科杂志 2009; 26: 267-269
  - 5 Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 310-326
  - 6 Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003; 33: 61-65
  - 7 Jung Y, Park J, Kim TY, Park JH, Jong HS, Im SA, Robertson KD, Bang YJ, Kim TY. Potential advantages of DNA methyltransferase 1 (DNMT1)-targeted inhibition for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85: 1137-1148
  - 8 Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TW, Saito Y, Yoo CB, Jones PA, Liang G. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14080-14085
  - 9 Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3137-3143
  - 10 刘莺, 李克, 刘文静, 王居峰, 樊青霞. 下调DNMT1对食管鳞癌EC9706细胞增殖、迁移的影响及相关机制的研究. 中国癌症杂志 2009; 19: 826-829
  - 11 张士龙, 曾甫清, 彭世波, 董继华, 廖贵益, 汪良. shRNA沉默基因DNMT1的表达对膀胱癌T24细胞增殖与凋亡的影响. 华中科技大学学报(医学版) 2009; 38: 165-168
  - 12 Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* 2005; 96: 403-408
  - 13 Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1160-1168
  - 14 徐岷, 高道健, 张玉琦, 高军, 李兆申, 龚燕芳, 吴洪玉, 杜奕奇, 金晶, 满晓华. RNA干扰DNA甲基转移酶1对人胰腺癌PaTu8988细胞增殖和凋亡的影响. 中华胰腺病杂志 2008; 8: 92-94
  - 15 徐岷, 高军, 高道健, 张玉琦, 杜奕奇, 刘枫, 龚燕芳, 吴洪玉, 李兆申. DNMT1 siRNA对人胰腺癌PaTu8988细胞周期的调控机制研究. 中华胰腺病杂志 2009; 34: 21-23
  - 16 Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8540-8546
  - 17 Sato N, Ueki T, Fukushima N, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of CpG islands in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123: 365-372
  - 18 Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 1573-1581
  - 19 Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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等”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<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.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.

# ShRNA靶向干扰EGFR抑制结直肠癌细胞增殖的机制

闵寒, 陈志荣, 张舒羽, 周俊东, 胡群超, 孟星君, 吴锦昌

## ■背景资料

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,在我国发病率逐年上升。在目前抗肿瘤分子靶向治疗中,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是最受关注的治疗靶点之一。

闵寒, 陈志荣, 南京医科大学附属苏州医院 苏州市立医院东区消化科 江苏省苏州市 215001

张舒羽, 苏州大学放射医学与公共卫生学院 江苏省苏州市 215000

周俊东, 胡群超, 孟星君, 吴锦昌, 南京医科大学附属苏州医院 苏州市立医院东区肿瘤放疗科 江苏省苏州市 215001

闵寒, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的靶向治疗研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81102078

苏州市科教兴卫青年科技基金资助项目, No. SWKQ1026

苏州市科技发展指导基金资助项目, No. SZD09132

作者贡献分布: 闵寒与陈志荣对此文所作贡献均等; 此课题由闵寒、陈志荣、周俊东及张舒羽共同设计; 研究所用试剂及分析工具由闵寒、吴锦昌及张舒羽提供; 研究过程由闵寒、胡群超、孟星君及张舒羽操作完成; 数据分析由闵寒与陈志荣完成; 本论文写作由闵寒、陈志荣及吴锦昌完成。

通讯作者: 吴锦昌, 教授, 主任医师, 博士生导师, 215001, 江苏省苏州市, 南京医科大学附属苏州医院, 苏州市立医院东区肿瘤放疗科。wjinchang@sina.com

电话: 0512-62364002

收稿日期: 2011-09-25 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## ShRNA-mediated silencing of the epidermal growth factor receptor gene inhibits proliferation of human HCT-15 colorectal cancer cells

Han Min, Zhi-Rong Chen, Shu-Yu Zhang, Jun-Dong Zhou, Qun-Chao Hu, Xing-Jun Meng, Jin-Chang Wu

Han Min, Zhi-Rong Chen, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (East Branch) Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China

Shu-Yu Zhang, School of Radiation Medicine and Public Health, Medical College of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Jun-Dong Zhou, Qun-Chao Hu, Xing-Jun Meng, Jin-Chang Wu, Department of Radiation Oncology, Suzhou Municipal Hospital (East Branch) Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81102078; Suzhou Science and Education Youth Health Foundation, No. SWKQ1026; Suzhou Scientific and Technological Development Foundation, No. SZD09132

Correspondence to: Jin-Chang Wu, Professor, Department of Radiation Oncology, Suzhou Municipal Hospital (East Branch) Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China. wjinchang@sina.com

Received: 2011-09-25 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## ■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科

## Abstract

**AIM:** To examine the effect of short hairpin RNA

(shRNA)-mediated silencing of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene on the proliferation of human colorectal cancer cells and to explore the potential mechanisms involved.

**METHODS:** Vectors containing shRNA targeting EGFR were constructed. HCT-15 cells were transfected with EGFR-shRNA-1, EGFR-shRNA-2, EGFR-shRNA-3 or shRNA-NC expression vectors, and stably transfected cell lines were screened. The mRNA level of EGFR was assessed by semi-quantitative RT-PCR. Protein expression and cell cycle changes were determined by flow cytometry. Cell proliferative capacity was assessed by colony formation assay.

**RESULTS:** Compared to shRNA-NC, transfection of the three shRNA vectors significantly inhibited EGFR expression, especially shRNA-1 and shRNA-2 vectors ( $40.2\% \pm 3.2\%$  and  $52.8\% \pm 11.3\%$ , respectively). The mRNA expression of EGFR in shRNA-1- and shRNA-2-transfected cells also decreased significantly. The colony size and number decreased significantly in cells transfected with shRNA-1 or shRNA-2 ( $P < 0.05$ ). The percentage of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase increased ( $63.69\% \pm 2.75\%$ ,  $60.10\% \pm 2.00\%$ ; both  $P < 0.05$ ) and that of in S phase decreased ( $28.20\% \pm 2.42\%$ ,  $27.19\% \pm 1.95\%$ ; both  $P < 0.05$ ) in shRNA-1- and shRNA-2-transfected cells.

**CONCLUSION:** Transfection with shRNAs targeting the EGFR gene was capable of suppressing EGFR expression, decreasing cell proliferative capacity and inducing cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase.

**Key Words:** RNAi; Epidermal growth factor receptor; Cell cycle; Colorectal cancer

Min H, Chen ZR, Zhang SY, Zhou JD, Hu QC, Meng XJ, Wu JC. ShRNA-mediated silencing of the epidermal growth factor receptor gene inhibits proliferation of human HCT-15 colorectal cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3402-3408

## 摘要

**目的:** 从细胞周期的角度探讨RNA干扰抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor

receptor, EGFR)表达对结直肠癌细胞增殖影响的机制。

**方法:** 以人结直肠癌细胞HCT-15为研究对象, 构建EGFR-短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)载体, 采用脂质体转染的方法转染细胞, G418筛选稳定细胞株以获得稳定的转染细胞模型, 分为4组: 转染shRNA-NC, 转染shRNA-1组, 转染shRNA-2组, 转染shRNA-3组; 应用半定量RT-PCR和流式细胞术检测转染细胞模型的mRNA和蛋白表达水平; 应用平板克隆实验检测转染后细胞增殖能力; 应用流式细胞术检测转染后细胞周期的变化。

**结果:** 正确构建了shRNA质粒表达载体, 成功转染; 转染shRNA-1、2、3组较转染shRNA-NC组mRNA、蛋白表达水平均有下降, 以转染shRNA-1和2组的抑制效应好(40.2% ± 3.2%, 52.8% ± 11.3%); 转染shRNA-1、2两组较对照组增殖能力下降, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞增多(63.69 ± 2.75%, 60.10 ± 2.00% vs 51.08 ± 3.42%), S期细胞减少(28.20% ± 2.42%, 27.19% ± 1.95% vs 36.11 ± 1.84%), 差异有统计学意义(P < 0.05)。

**结论:** RNA干扰技术可以有效地抑制HCT-15细胞EGFR表达, 并抑制了细胞增殖能力, 这可能与诱导细胞出现G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞有关。

**关键词:** RNA干扰; 表皮生长因子受体; 细胞周期; 结直肠癌

闵寒, 陈志荣, 张舒羽, 周俊东, 胡群超, 孟呈君, 吴锦昌. ShRNA靶向干扰EGFR抑制结直肠癌细胞增殖的机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3402-3408  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3402.asp>

## 0 引言

结直肠癌是常见的恶性肿瘤, 其中直肠癌约占70%, 发病率世界排名第3, 居癌症死因的第4位<sup>[1,2]</sup>. 其在我国发病率也呈逐年上升趋势, 以上海为例, 增长速度约4%, 高于世界平均增速(2%)<sup>[3]</sup>. 针对结直肠癌, 手术是主要治疗手段<sup>[4]</sup>, 但并不理想, 近40年来术后5年生存率徘徊在50%左右, 局部复发率高达20%-40%, 辅助放疗也只能延长部分晚期患者的生存期<sup>[5]</sup>. 近年来分子靶向治疗在结直肠癌中取得了突破性的进展<sup>[6,7]</sup>, 其中抑制结直肠癌增殖的治疗靶点显得尤为重要. 因为与其他肿瘤细胞一样, 在结直肠癌的发生发展过程中, 增殖与凋亡这一对矛

盾起着重要的调控作用. 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是原癌基因c-ErbB 1的表达产物, 属于表皮生长因子受体家族, 在25%-77%的结直肠癌组织中高表达, 与肿瘤细胞的增殖、凋亡等关系密切, 是重要的抑制肿瘤增殖的治疗靶点<sup>[8,9]</sup>. RNA干扰(RNA interference, RNAi)是双链RNA介导的、序列特异的转录后基因沉默现象, 广泛存在于各种生物体中. 因为RNAi技术较其他抑制基因手段能高效、特异地降低或关闭某些基因的表达, 产生基因功能缺失或基因敲除模型, 所以已正被广泛的应用在肿瘤学的机制研究中<sup>[10-15]</sup>. 本研究旨在通过构建RNAi抑制EGFR基因表达的结直肠癌细胞模型, 探索其对增殖的影响, 及细胞周期在其中的可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 针对EGFR基因的小片段RNA(small interference RNAs, siRNAs)寡核苷酸序列设计, 通过在GenBank上比对, 分别选择EGFR基因(NM 005228)CDs编码序列中的第456-476、648-668、767-787特异性序列为siRNA的正义链, 按siRNA设计原则, 由上海吉玛制药技术有限公司设计、合成EGFR-shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3表达载体, 靶序列分别为: 5'-GCAGAGGAATTATGATCTTTC-3'、5'-GCTGCCCATGAGAAATTTACA-3'、5'-GCAACA-TGTCGATGGACTTCC-3', shRNA-NC的靶序列为5'-GTCAATGGTCGTGTCGTGC-3'. 人结直肠癌细胞株HCT-15购自中科院上海细胞库, 试剂用脂质体Lipofectamine 2000 (Polyplus公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和转染:** 人结直肠癌细胞株HCT-15常规培养传代. 按产品说明书进行转染. 转染48 h后去掉培养液, PBS漂洗1次, 加入终浓度为600 mg/L的G418培养基进行筛选, 连续筛选3-4 wk获得抗性克隆. 分为4组: 1组为转染shRNA-NC组; 2组为转染shRNA-1组; 3组为转染shRNA-2组; 4组为转染shRNA-3组。

**1.2.2 RT-PCR检测EGFR mRNA的表达:** 按TRIzol法分别提取细胞RNA, 逆转录后进行RT-PCR. 通过引物设计软件Primer 5, 参照Gene Bank基因序列自行设计, 由生工生物工程(上海)有限公司合成. 内参照GADPH上、下游引物序列分别为5'-GGTGTGTG-CAGATCGCAAAG-3'、5'-GACATGCTGCG-

## ■ 研发前沿

近年来国内外围绕EGFR单抗在结直肠癌中的应用进行了广泛深入的研究, 取得了巨大的进展, 但仍有很多亟待解决的问题, 解决问题的关键在于对其抗肿瘤的具体机制仍不明确。

### ■ 相关报道

Spano等报道在结直肠癌中EGFR高表达,并与肿瘤细胞的增殖、凋亡等关系密切,是重要的抑制肿瘤增殖的治疗靶点。

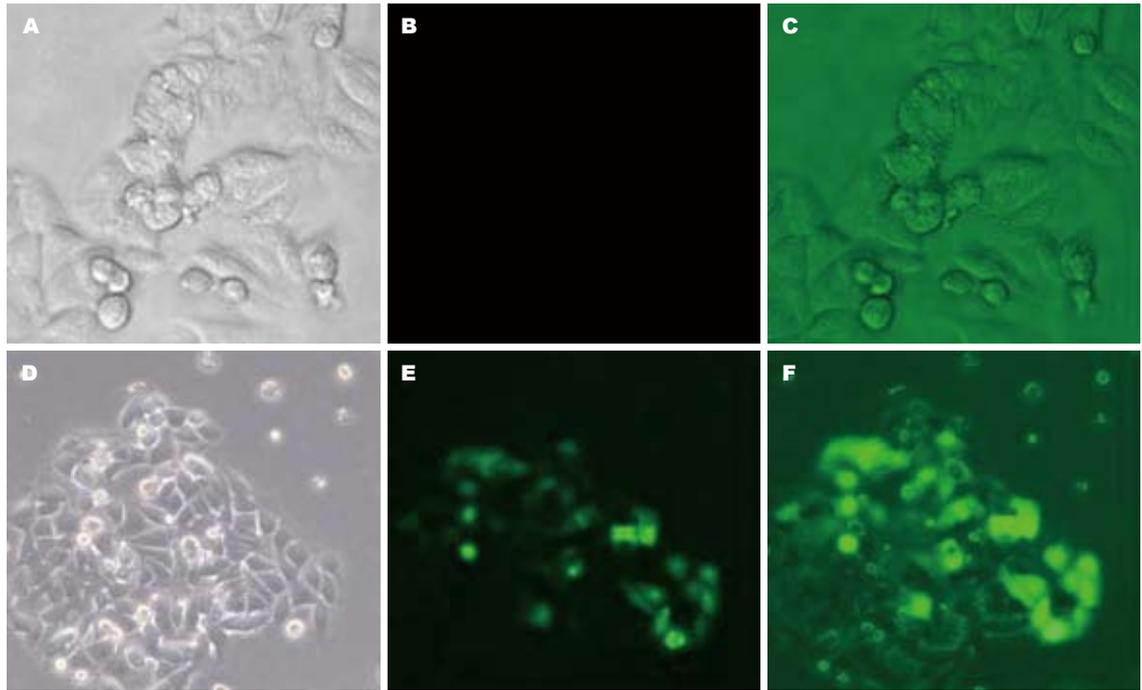


图1 细胞转染24 h后荧光显微镜下转染带有绿色荧光蛋白基因的shRNA载体组与未转染组24 h后的荧光显微镜下观察( $\times 200$ , 拍摄后裁剪)。A, B, C: 阴性对照组; D, E, F: 转染组。

GTGTTTTCAC-3'。EGFR上、下游引物序列分别为5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'、5'-GAAGGTGAAGTCCGAGTC-3'。

1.2.3 流式细胞术检测蛋白表达抑制率: 用0.25%胰酶消化并收集转染后的细胞。2 000 r/min, 5 min离心, 弃上清, 取细胞沉淀。每管加1 mL 40 g/L多聚甲醛, 固定15 min。2 000 r/min, 5 min离心, 弃上清。PBS洗涤细胞2次, 收集细胞沉淀。加100  $\mu$ L打孔剂混匀后, 分2管移至流式的检测管, 每管50  $\mu$ L, 分别为A、B管。A管中加入一抗(鼠抗EGFR基因的单克隆抗体, 1:50稀释), 避光放置30 min; B管为只加二抗(兔抗鼠FITC-IgG)的对照。A管加PBS洗涤2次。A、B管中均加入二抗(1:50稀释), 避光放置30 min。PBS洗涤A、B管中未结合的二抗, 洗涤3次, 取沉淀。每管加500  $\mu$ L PBS重悬细胞, 上机检测。EGFR的抑制率 = (实验组表达-对照组表达)/对照组表达。以上实验重复3次, 实验结果为3次平均值。

1.2.4 平板克隆形成实验法检测细胞增殖能力: 将对数生长期的转染后HCT-15细胞用胰蛋白酶消化制备细胞悬液, 调整细胞密度, 接种到6孔板中, 每组细胞接种3个孔, 1 000个/孔, 轻轻晃动6孔板使细胞分散均匀, 于37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中静置培养约10 d, 出现肉眼可见的克隆, 弃去培养液, PBS小心冲洗细胞2次, 甲醛

固定15 min, 0.4%结晶紫染色10 min, 流水缓慢洗去染色液, 空气干燥。镜下计数大于50个细胞的克隆数, 并按公式计算克隆形成率: 克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数)  $\times$  100%。

1.2.5 流式细胞术分析细胞周期: 用0.25%胰酶消化并收集转染后的细胞。用PBS洗涤细胞1次, 2000 r/min, 5 min离心, 弃上清, 取细胞沉淀。加500  $\mu$ L的700 mL/L乙醇固定细胞, 室温放置3 h。PBS洗涤细胞, 2 000 r/min, 5 min离心, 弃上清。每管加100  $\mu$ L的RNaseA, 37  $^{\circ}$ C水浴30 min。再加入400  $\mu$ L的PI染色混匀, 4  $^{\circ}$ C, 避光放置30 min。上流式检测, 记录激发波长488 nm处红色荧光。实验重复3次, 进行统计学分析处理。

**统计学处理** 实验结果采用SPSS13.0统计软件检验分析, 数据均以mean  $\pm$  SD表示, 组间比较采用成组设计两两比较的 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 shRNA表达载体成功转染细胞 编码shRNA的带绿色荧光蛋白的质粒载体转入细胞后, 在绿色荧光激发波长下细胞显示为绿色, 转染后24 h荧光显微镜拍片证实转染成功(图1)。

2.2 RT-PCR检测shRNA对EGFR mRNA表达的影响 采用RT-PCR的方法来检测转染不同的shRNA载体后的细胞中EGFR的mRNA表达情

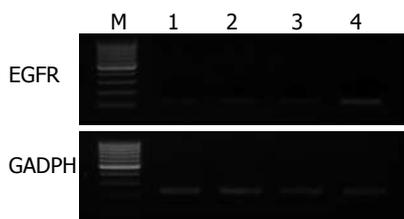


图 2 RT-PCR检测稳定转染细胞株中EGFR的mRNA表达检测. M: 100 bp ladder Marker; 1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: shRNA-3; 4: shRNA-NC.

■ 创新盘点

本研究从细胞周期的角度来探讨RNA干扰抑制EGFR表达对结直肠癌细胞增殖影响的机制.

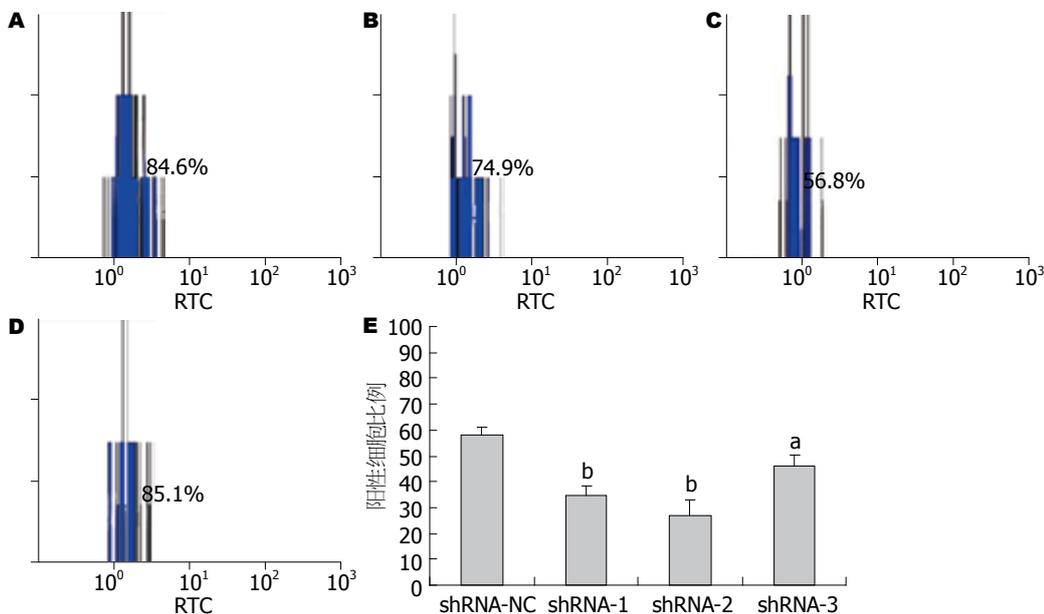


图 3 流式细胞术检测稳定株中EGFR蛋白表达水平. A-D:shRNA-NC、-1、-2、-3组对应的EGFR蛋白抑制率; E: 各组EGFR表达阳性细胞比例. <sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs shRNA-NC组.

况(图2). 从图2中可以看出, 转染shRNA-1、2、3三组EGFR的mRNA表达水平较转染shRNA-NC组均有下降, 这表明shRNA能干扰EGFR的mRNA表达.

2.3 流式细胞术检测EGFR蛋白抑制率 采用流式细胞术间接免疫荧光法来检测转染不同的EGFR-shRNA载体后的细胞中EGFR的蛋白阳性细胞比例及蛋白抑制率(图3). 从中可以看出: 与转染shRNA-NC组相比, 转染shRNA-1、2、3组的EGFR表达阳性细胞比例均下降, 且有统计学意义( $t = 8.096, P < 0.01; t = 8.155, P < 0.01; t = 3.754, P < 0.05$ ). 其中以前两组下降明显, EGFR的抑制率分别为 $40.2\% \pm 3.2\%$ 和 $52.8\% \pm 11.3\%$ , 这一结果与实验2结果一致, 说明shRNA能干扰EGFR的mRNA和蛋白表达. 并从中可以看出, 转染shRNA-1、2两组的EGFR蛋白表达抑制率高, 结合实验2, 表明EGFR抑制效应最好, 故挑选这两组作为下面实验的实验组.

2.4 平板克隆形成实验法检测细胞增殖能力 通过平板克隆形成实验法, 并采用Image J软件扫描克隆点大小, 重复3次, 统计发现, 转染shR-

NA-1和转染shRNA-2组细胞克隆形成大小与转染shRNA-NC组相比明显减小( $t = 3.941, P < 0.05; t = 4.414, P < 0.05$ , 图4), 转染shRNA-1组细胞克隆形成率为 $81.5\% \pm 2.2\%$ , 转染shRNA-2组为 $71.5\% \pm 5.65\%$ , 与对照组( $107.8\% \pm 6.37\%$ )相比, 差异有统计学意义( $t = 6.819, P < 0.01; t = 7.393, P < 0.01$ , 图5), 反映转染shRNA-1和转染shRNA-2细胞增殖能力受到抑制.

2.5 流式细胞术检测细胞周期结果 转染shRNA-1及shRNA-2质粒载体的HCT-15细胞的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例增多、S期细胞比例减少, 与shRNA-NC组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 表明EGFR-shRNA诱导结直肠癌HCT-15细胞出现G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞(图6, 表1).

3 讨论

EGFR是表皮生长因子细胞增殖和信号传导的受体, 他是一种总相对分子量约170 kDa的跨膜糖蛋白, 属于I型跨膜酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor, TKR)<sup>[16]</sup>. EGFR在很多肿瘤组织中高表达(如25%-77%的结直肠肿瘤呈高表达<sup>[8]</sup>),

### ■应用要点

本研究以人结肠癌细胞HCT-15为研究对象,构建EGFR-短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)载体,采用脂质体转染的方法构建了稳定可信的转染细胞模型,为进一步细胞周期调控因子的研究奠定基础。

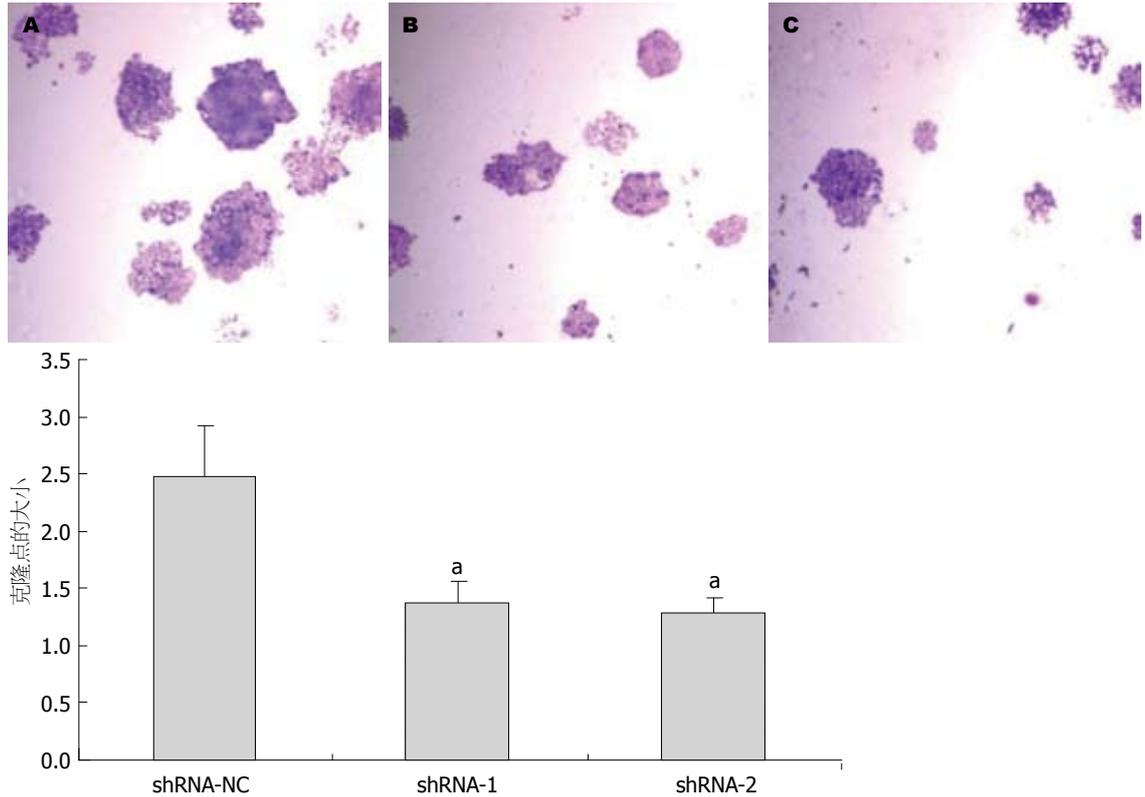


图4 各转染细胞组克隆形成大小(同一时间,随机视野,  $\times 100$ ). A: shRNA-NC组; B: shRNA-1组; C: shRNA-2组.  $^*P < 0.05$  vs shRNA-NC组.

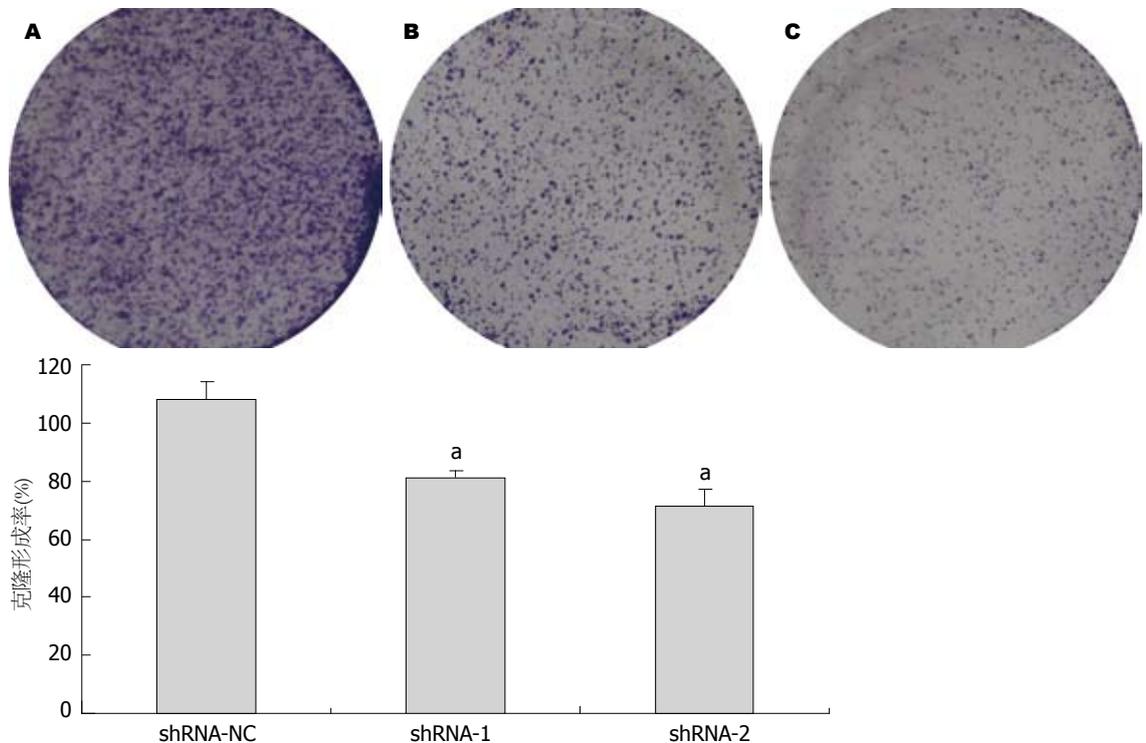


图5 各稳定细胞株的克隆形成率(%). A: shRNA-NC组; B: shRNA-1组; C: shRNA-2组.  $^*P < 0.05$  vs shRNA-NC组.

并与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移、对放化疗的敏感性及细胞凋亡有关<sup>[17,18]</sup>, 目前临床上应用的EGFR靶向药物主要是单克

隆抗体和酪氨酸激酶抑制剂<sup>[19]</sup>, 更多的EGFR靶向治疗手段正在探索中。

RNAi是双链RNA介导的、序列特异的转录

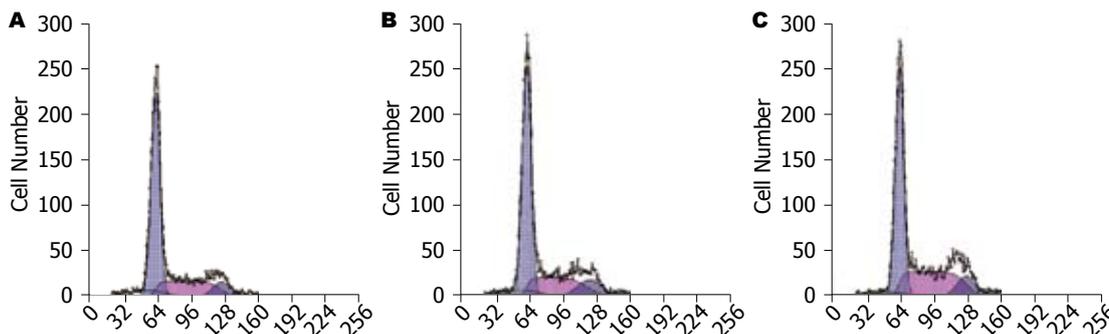


图 6 HCT-15细胞不同转染组细胞周期变化. A: shRNA-NC组; B: shRNA-1组; C: shRNA-2组.

■同行评价  
 课题设计合理, 方法科学, 手段先进, 统计分析得当, 结论可信, 是一篇较好的实验论文.

表 1 HCT-15细胞不同转染组细胞周期变化 (% , mean ± SD)

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	值	P值	S	值	P值	G <sub>2</sub> /M
shRNA-NC	51.08 ± 3.42			36.11 ± 1.84			11.81 ± 5.29
shRNA-1	63.69 ± 2.75 <sup>a</sup>	-4.581	0.010	28.20 ± 2.42 <sup>a</sup>	4.506	0.011	8.10 ± 0.92
shRNA-2	60.10 ± 2.00 <sup>a</sup>	-3.502	0.025	27.19 ± 1.95 <sup>b</sup>	5.759	0.005	12.60 ± 3.97

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs shRNA-NC组.

后基因沉默现象, 最早是1998年在线虫中发现的, 目前研究发现这不仅是线虫独有的现象, 而是广泛存在于从真菌到植物, 从无脊椎动物到哺乳动物的各种生物体中. 其核心生物学功能是真核生物的遗传监视器和基因组水平的免疫系统, 可能是生物体行使其正常生物学功能所必需的一种调控方式<sup>[20]</sup>. 在体外, RNAi技术已经作为基因功能研究、基因治疗及药物筛选的一种有效方法得到广泛应用. 目前, 因为RNAi技术能高效、特异地降低或关闭某些基因的表达, 产生基因功能缺失或基因敲除模型, 所以被广泛的应用在肿瘤学的研究中<sup>[10-15]</sup>.

在哺乳动物细胞中, 只有21个核苷酸大小的siRNA才能有效引发特异的基因沉默, 所以RNAi的设计较为复杂, 目前制备siRNA的方法主要有2类, 即体外制备和体内表达. 本实验中采用的是siRNA表达载体的办法, 其包含了1种RNA聚合酶启动子(PolIII)以启动体内的转录, 另外还有4-5个T的转录终止位点, 通过转染, 体内表达shRNA. 由于质粒可以在细胞内复制扩增, 这种带有抗生素标记的载体抑制基因, 表达的效果可以储蓄几周甚至更长, 是唯一适用于长周期研究的方法. 缺点是制备时间较长, 且对细胞的转染效率要求比较高<sup>[21]</sup>. 鉴于本实验的实验周期及研究内容, 是一种比较适宜的方法. 从本实验中可以看出, 在转染EGFR表达载体后, 通过实验筛选出基因沉默效应较好的两组

shRNA-1及shRNA-2转染细胞株, 在这2个细胞株中, EGFR基因mRNA及蛋白水平的表达均有下降(P<0.05), 证实通过RNAi技术成功构建了EGFR抑制细胞株, 为下一步实验做准备.

细胞增殖异常是肿瘤的一个重要特征, 正常细胞所存在的凋亡和增殖的平衡一旦被打破, 就会向肿瘤发展. 在结直肠癌的发生和发展过程中, 增殖和凋亡的失衡参与了每个阶段<sup>[22]</sup>. 而EGFR被发现与肿瘤细胞的增殖密切相关, 通过抑制EGFR表达可以抑制肿瘤细胞的增殖能力. 通过本次实验可以看出, EGFR表达受到抑制的肿瘤细胞, 其增殖能力受到了抑制, 与对照组相比, 差异有统计学意义(P<0.05). 肿瘤的无限制增殖的机制与细胞增殖周期的失控有关, 细胞周期主要分为G<sub>1</sub>期、S期(DNA复制)、G<sub>2</sub>期、M期(染色体分离), 其中G<sub>1</sub>期是细胞增殖的关键时相. 检测点(checkpoint)又称关卡, 是在细胞周期的暂停中允许编辑和修复遗传信息, 并使每个子细胞接受与亲代细胞相同的整套遗传信息, 其中G<sub>1</sub>/S检测点又是细胞增殖的关键步骤<sup>[23-26]</sup>. 通过对EGFR靶向药物的研究发现, EGFR的抑制可以诱导G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞, 从而使细胞不能进入S期进行DNA合成, 最终使肿瘤细胞的体外增殖受到抑制<sup>[27,28]</sup>. 本实验也通过RNA干扰, 抑制EGFR表达, 诱导了结直肠癌HCT-15细胞出现了G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞, 从而体外抑制了结直肠癌肿瘤细胞的增殖能力. 与EGFR靶向药物的研究结果是相符合

的, 另一方面也证实了本实验构建的EGFR抑制细胞模型是稳定可信的, 为下一步机制的研究奠定了实验基础。

在真核动物的细胞周期的调控中, 其核心成分是细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin dependent kinase, CDKs)以及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)。Cyclin能够与CDKs结合形成复合物, 是推动细胞周期运行的动力因素, 而CKIs则作为抑制因子的角色出现, 无论哪一个成分失控, 则会出现细胞的增殖失控, 以至肿瘤的发生<sup>[24]</sup>。有研究发现, 通过EGFR的抑制, 可以引起下游的Cyclin D1、P16、CDK-4/6等因子的系列反应, 从而影响肿瘤细胞的增殖与凋亡<sup>[29]</sup>。而通过对结直肠癌的研究发现, 在肿瘤的发生发展过程中, Cyclin-CDKs-CKIs调控网络同样非常重要, 特别是CyclinD1、E以及CDK2、4等, 他们的表达异常往往与肿瘤的侵袭性和患者的生存期有关<sup>[30]</sup>。故我们设想, 在结直肠癌细胞中, EGFR介导的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞的机制是否与其中的某些通路或因子有关, 这是我们进一步的研究方向。

#### 4 参考文献

- Li M, Gu J. Changing patterns of colorectal cancer in China over a period of 20 years. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4685-4688
- Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165
- 何科基, 弥海宁. 结直肠癌新辅助治疗的现状. *甘肃医药* 2010; 29: 142-145
- Goodwin RA, Asmis TR. Overview of systemic therapy for colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22: 251-256
- 陆颖影, 靖大道. EGFR靶向治疗在结直肠癌中的研究进展. *国际消化病杂志* 2009; 29: 136-138
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342
- 郁宝铭. 结直肠癌分子靶向治疗药物研究现状. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3705-3712
- Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005; 16: 102-108
- Italiano A, Saint-Paul MC, Caroli-Bosc FX, François E, Bourgeon A, Benchimol D, Gugenheim J, Michiels JF. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Oncol* 2005; 16: 1503-1507
- Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002; 296: 1263-1265
- 郭勇杭, 刘中宏, 许军, 姚媛媛, 黄平. 联合转染Survivin shRNA和CD44v3 shRNA对结直肠癌SW480细胞增殖和侵袭能力的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 905-911
- Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM. RNA: guiding gene silencing. *Science* 2001; 293: 1080-1083
- 陶俊. RNA技术在肿瘤研究中的现状. *放射免疫学杂志* 2010; 23: 37-38
- 张朝晖, 张志伟, 王名伟, 黄滔, 楚晨龙, 赵晨晖, 杨安卿, 沈周俊, 周文龙. 应用RNA干扰技术抑制人膀胱癌细胞EGFR基因表达的研究. *中华肿瘤防治杂志* 2011; 18: 755-757, 761
- McInroy L, Määttä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 109-114
- Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2787-2799
- Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androustos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie* 2008; 31: 702-706
- Modjtahedi H, Essapen S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities. *Anticancer Drugs* 2009; 20: 851-855
- 王丽, 余英豪. EGFR靶向药物在结直肠癌中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1057-1062
- Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000; 2: E31-E36
- 石燕. RNAi实验技术研究进展. *标记免疫分析与临床*. 2003; 10: 235-238
- 李文英, 叶婷, 朱红音, 陈紫暉, 房静远. 抑制细胞外信号调节激酶转导结直肠癌细胞组蛋白磷酸化和基因表达的影响. *中华消化杂志* 2010; 30: 317-231
- 童锦禄, 冉志华. G1/S检测点调控机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2036-2039
- 王鸿鹤, 刘宗潮. Cyclins/CDKs及其抑制剂的抗肿瘤作用. *中国癌症杂志* 2002; 12: 368-372
- Adamsen BL, Kravik KL, Clausen OP, De Angelis PM. Apoptosis, cell cycle progression and gene expression in TP53-depleted HCT116 colon cancer cells in response to short-term 5-fluorouracil treatment. *Int J Oncol* 2007; 31: 1491-1500
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348
- Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2166-2174
- Ling YH, Li T, Yuan Z, Haigentz M, Weber TK, Perez-Soler R. Erlotinib, an effective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27KIP1 up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 248-258
- 闫琳, 孙霞, 张书理, 李成伟, 金昕, 孙谧, 王春波. 扇贝多肽经由EGFR-CDK-4通路抑制UVA诱导的HaCaT细胞凋亡. *中国海洋药物杂志* 2010; 29: 17-23
- 潘长海, 彭洪云. Cyclin-CDKs-CKIs调控系统与大肠癌关系的研究进展. *大肠肛门病外科杂志* 2005; 11: 163-167

## 胰腺癌*MiR-224*的表达与细胞增殖和凋亡

邹叶青, 刘川, 贺文凤, 吴琼, 余新, 肖卫东

邹叶青, 刘川, 贺文凤, 吴琼, 余新, 南昌大学第二附属医院  
分子实验室 江西省南昌市 330006  
肖卫东, 南昌大学第一附属医院普外科 江西省南昌市  
330006

邹叶青, 主管技师, 主要从事分子生物学研究.

江西省科技厅基金资助项目, No. 2009ZDS13700

作者贡献分布: 此课题由肖卫东设计; 研究过程由邹叶青、刘川、贺文凤、吴琼及余新操作完成; 研究所需标本由余新与刘川收集; 荧光定量PCR由邹叶青完成; 流式细胞术由贺文凤与吴琼完成; 数据分析由邹叶青完成; 本论文写作由邹叶青完成.

通讯作者: 肖卫东, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院普外科. frankxwd@126.com

收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

### Association between *miR-224* expression and cell proliferation and apoptosis in pancreatic cancer

Ye-Qing Zou, Chuan Liu, Wen-Feng He, Qiong Wu, Xin Yu, Wei-Dong Xiao

Ye-Qing Zou, Chuan Liu, Wen-Feng He, Qiong Wu, Xin Yu, Department of Molecular Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Wei-dong Xiao, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Department of Jiangxi Province, No. 2009ZDS13700

Correspondence to: Wei-dong Xiao, Associate Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. frankxwd@126.com

Received: 2011-09-06 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of *miR-224* in pancreatic carcinoma and to evaluate the role of *miR-224* in pancreatic cancer cell proliferation and apoptosis.

**METHODS:** The expression of *miR-224* in 40 pancreatic carcinoma tissue specimens and matched tumor-adjacent nontumorous tissue specimens was detected by real-time fluorescence PCR. After using the antisense technology to decrease the expression of *miR-224* in pancreatic cancer cells (Aspc-1 and Bxpc-3), MTT assay

and flow cytometry were performed to investigate the impact of *miR-224* down-regulation on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis.

**RESULTS:** *MiR-224* was found to be overexpressed in 43% of pancreatic carcinoma cases ( $P < 0.05$ ). After antisense microRNA-mediated knockdown of *miR-224*, the proliferation of Aspc-1 and Bxpc-3 cells was significantly inhibited. Aspc-1 and Bxpc-3 cells were mainly arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, and the percentage of cells in S and G<sub>2</sub>/M phases decreased. In addition, *miR-224* knockdown in Aspc-1 and Bxpc-3 cells resulted in an increase in early apoptosis.

**CONCLUSION:** *MiR-224* is overexpressed in human pancreatic carcinoma. Inhibition of *miR-224* expression can not only effectively suppress growth but also induce cell apoptosis of Aspc-1 and Bxpc-3 cells. *MiR-224* may serve as a new molecular target for the treatment of pancreatic carcinoma.

**Key Words:** Pancreatic carcinoma; *MiR-224*; Anti-sense oligonucleotides

Zou YQ, Liu C, He WF, Wu Q, Yu X, Xiao WD. Association between *miR-224* expression and cell proliferation and apoptosis in pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3409-3414

### 摘要

**目的:** 分析*miR-224*在胰腺癌组织中的表达, 探讨其在胰腺癌细胞增殖、细胞周期及凋亡中的意义.

**方法:** 采用TagMan MGB探针法定量分析40例原发性胰腺癌及对应的癌旁组织*MiR-224*的表达; 利用反义技术降低胰腺癌细胞(Aspc-1和Bxpc-3)中*miR-224*的表达; 采用MTT比色法检测细胞增殖的改变, 利用流式细胞技术检测胰腺癌细胞周期和凋亡情况.

**结果:** 在40例胰腺癌病例中, 43%(17/40)的胰腺癌组织*miR-224*表达明显高于癌旁组织

### 背景资料

在恶性肿瘤发生发展中, miRNAs扮演着“癌基因”和(或)“抑癌基因”的重要角色.

### 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

## ■ 研究前沿

Li等发现miR-224在肝癌细胞HepG2中表达上调且参与细胞的侵袭和转移,然而miR-224在胰腺癌中的表达及功能研究尚未见报道.

( $P < 0.05$ ); 反义miR-224转染胰腺癌细胞Aspc-1和Bxpc-3后, miR-224的表达明显降低, Aspc-1和Bxpc-3胰腺癌细胞生长受到明显抑制, 其生长主要停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 而S期和G<sub>2</sub>/M期细胞的比例下降; 另外降低miR-224的表达, Aspc-1和Bxpc-3胰腺癌细胞早期凋亡明显增加.

**结论:** miR-224在胰腺癌组织中表达上调, 降低其表达能明显抑制Aspc-1和Bxpc-3细胞的生长和诱导细胞早期凋亡增加, miR-224有可能成为胰腺癌基因表达调控的新靶点.

**关键词:** 胰腺癌; MiR-224; 反义单核苷酸

鄧叶青, 刘川, 贺文凤, 吴琼, 余新, 肖卫东. 胰腺癌MicroRNA-224的表达与细胞增殖和凋亡. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3409-3414

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3409.asp>

## 0 引言

胰腺癌(Pancreatic cancer)是胰腺恶性肿瘤中最常见的一种, 且是引起癌症相关死亡的第4大原因<sup>[1-4]</sup>. 由于其临床表现和症状往往不典型, 恶性程度高, 加上病程发展速度快, 所以胰腺癌患者预后非常差<sup>[5-7]</sup>. 因此发现胰腺癌的早期诊断标记物和治疗靶点具有重要意义. MicroRNAs(miRNAs)是内源性非编码RNA经过一系列加工后产生的一类大小约20-22 nt的单链小分子RNA, 其功能为调控基因转录后的表达<sup>[8-10]</sup>. 在恶性肿瘤发生发展中, miRNAs扮演着“癌基因”和(或)“抑癌基因”的重要角色<sup>[11-17]</sup>. 近年研究发现miR-224在肝癌、肠癌等恶性肿瘤中表达上调<sup>[18-19]</sup>, 另外Wang等<sup>[20]</sup>报道miR-224不但在肝癌中表达上调, 且可以通过降低凋亡抑制因子-5(apoptosis inhibitor-5, API-5)而参与细胞凋亡活性的影响. Li<sup>[21]</sup>等发现miR-224在肝癌细胞HepG2中表达上调且参与细胞的侵袭和转移, 然而miR-224在胰腺癌中的表达及功能研究尚未见报道, 本研究拟采用TagMan MGB探针法检测miR-224在胰腺癌组织中的表达情况, 同时利用反义技术降低胰腺癌细胞miR-224的表达, 观察其生长、细胞周期和凋亡情况, 以便为胰腺癌早期诊治提供新的理论和试验基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2006-01/2011-01南昌大学第二附属医院和南昌大学第一附属医院肝胆外科胰腺癌及癌旁组织手术标本( $n = 40$ ). 所有标本均经病理学检查确诊, 其中男( $n = 22$ ), 女( $n = 18$ ), 年

龄30-69岁.

TaqMan miRNA分析试剂盒(美国ABI公司); DMEM高糖培养基(美国Gibco公司)、胎牛血清(美国Hyclone公司)、脂质体Lipfectamine 2000(美国Invitrogen公司); 反义miR-224寡核苷酸(AMO-miR-224)(大连宝生物公司); Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(南京凯基公司); 人胰腺癌细胞系Aspc-1和Bxpc-3购自上海细胞研究所; 实时荧光定量PCR分析仪(美国ABI公司), 流式细胞仪(美国BD公司).

## 1.2 方法

**1.2.1 实时荧光定量PCR检测miR-224的表达:** 采用TRIzol试剂提取组织总RNA, 紫外分光光度计测定浓度, -70 °C保存备用, 用miR-224检测试剂盒检测miR-224的表达<sup>[22]</sup>. 取2 μg总RNA作为模板与3 μL逆转录酶混合, 在20 μL反应体系中, 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 进行逆转录反应; 收集cDNA, 将其稀释150倍, 取1 μL稀释的cDNA与2 μL TaqMan引物混合, 20 μL反应体系: 95 °C 10 min, 随后95 °C 15 s, 61 °C 60 s, 40个循环. 相对miRNA表达水平用CT值准确计算, U6 snRNA为内参.

**1.2.2 反义miR-224单核苷酸序列设计:** 根据MiRBase(<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam/mirna>)提供的miRNA基因序列, 获取人miR-224的序列, 设计相应的反义寡核苷酸序, 采用核酸序列数据库检索程序排除其他的可能同源序列. 同时确定一条随机对照序列, 如下所示: miR-224 sense: 5'-AGUCACUAGUGGUUCCGUUUA-3', 反义miR-224 antisense: 5'-TAAACGGAACCAC-TAGTGACT-3', 随机序列sense: 5'-UUCUCC-GAACGUGUCACGUTT-3', antisense: 5'-AC-GUGACACGUUCGGAGAATT-3', 提交大连宝生物合成, PAGE纯化, 全硫代修饰.

**1.2.3 细胞株的培养及转染:** Aspc-1和Bxpc-3细胞株接种于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养. 严格按照脂质体Lipfectamine™ 2000转染试剂说明书进行转染, 反义miR-224寡核苷酸终浓度分别为: 50 nmol/L、100 nmol/L、150 nmol/L、200 nmol/L. 初步筛选出最佳终浓度为100 nmol/L; 分别培养24、48、72 h, 初步筛选出最佳作用时间为48 h. 将荧光对照反义寡核苷酸转染后在倒置荧光显微镜下观察, 重复3次, 转染效率为89%±5%.

**1.2.4 反义miR-224单核苷酸转染后对miR-224表达的影响:** 转染反义miR-224单核苷酸48 h后, 抽

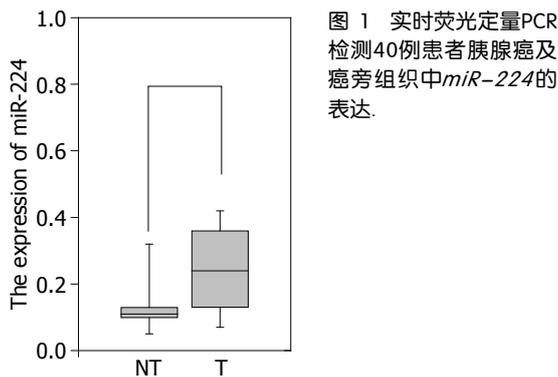


图 1 实时荧光定量PCR检测40例患者胰腺癌及癌旁组织中*miR-224*的表达。

提总RNA经纯度分析, 逆转录为cDNA, (反应条件同1.3.1), 测定cDNA浓度, 同时设立空白对照组、干扰无意义组及转染PBS组. 用*miR-224*检测试剂盒检测*miR-224*的表达(具体条件同1.3.1).  
 1.2.5 MTT检测各组细胞的增殖: 在离心管内将各组细胞悬液充分打匀, 按 $8 \times 10^3$ /孔接种于96孔培养板, 每孔加液量200  $\mu$ L, 24 h后换液. 实验分组同1.3.4, 每组设6个复孔. 于转染后1 d-4 d每孔加入5 mg/mL MTT试剂20  $\mu$ L, 于37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下继续孵育4 h. 吸取各孔上清, 加入DMSO 150  $\mu$ L/孔, 室温下置水平摇床摇10 min以充分溶解MTT结晶. 在酶联免疫测定仪上选择波长490 nm, 空白孔调零, 测定各孔吸光度(A)值. 每组重复3次. 按下列公式计算细胞生长抑制率(%): 细胞生长抑制率 = (实验组平均A<sub>490</sub>-对照组平均A<sub>490</sub>)/对照组平均A<sub>490</sub>  $\times$  100%

1.2.6 流式细胞术分析细胞周期变化情况: 实验分组同1.3.4, 细胞接种6孔板, 转染反义*miR-224*寡核苷酸48 h后收集细胞, 制成单细胞悬液, PBS洗2次, 离心、弃上清, 加PBS重悬细胞, 加-20  $^{\circ}$ C预冷的75%乙醇并振荡, 4  $^{\circ}$ C固定1 h, 离心、弃冰乙醇, PBS洗1遍, 弃上清; 加入含有50  $\mu$ g/mL PI(碘化吡啶)和100  $\mu$ g/mL无DNA酶污染的RNA酶PBS染色液, 4  $^{\circ}$ C避光静置1 h, 上机检测. 每组重复3次.

1.2.7 流式细胞术分析细胞早期凋亡: 实验分组同1.3.4, 细胞接种6孔板, 转染反义*miR-224*寡核苷酸. 48 h后收集细胞, 制成单细胞悬液, PBS洗2次, 离心、弃上清. 利用Annexin V-FITC早期凋亡试剂盒, 流式细胞仪检测细胞早期凋亡情况.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件, 计量资料以(mean  $\pm$  SD)表示, 流式细胞数据经 $\chi^2$ 检验分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 胰腺癌组织*miR-224*的表达情况 采用Trizol提取总RNA, 以U6 RNA为内参, 利用实时荧光

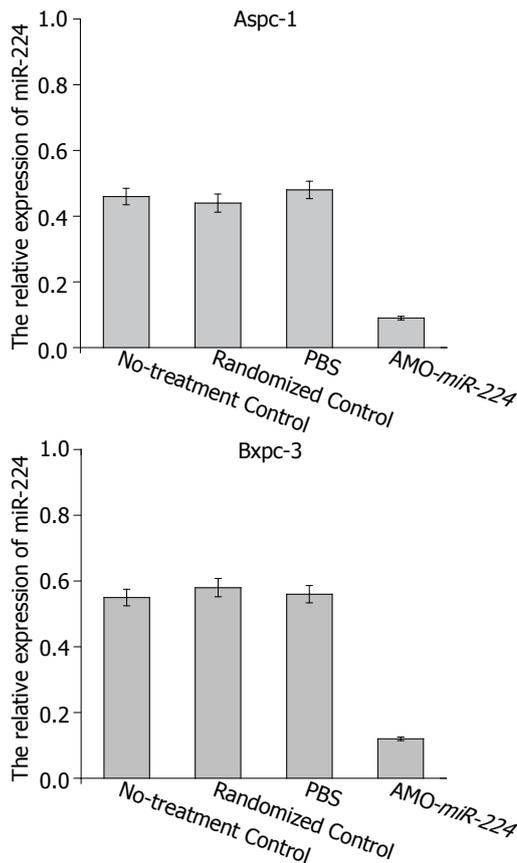


图 2 荧光定量PCR检测*miR-224*在不同转染组的ASPC-1和BXPc-3细胞中的表达。

定量PCR检测发现, 40例胰腺癌病人癌及癌旁组织中, 43%(17/40)的病例胰腺癌组织*miR-224*的表达明显高于相对应的癌旁组织, 结果有统计学意义( $P < 0.05$ , 图1).

2.2 AMO-*miR-224*转染后*miR-224*表达的变化 利用反义技术, 将浓度为100 nmol/L反义*miR-224*寡核苷酸转染到胰腺癌细胞Aspc-1和Bxpc-3中48 h后, 实时荧光定量PCR检测发现, *miR-224*的表达较对照组降低( $P < 0.05$ ), 而空白对照组、随机对照组及PBS组间无明显差异(图2).

2.3 AMO-*miR-224*作用后对胰腺癌细胞生长的抑制作用 转染AMO-*miR-224*胰腺癌细胞生长明显慢于对照组( $P < 0.05$ ), 而空白对照组、随机对照组及转染PBS组间肝癌细胞的生长无明显差异(图3).

2.4 流式细胞术分析转染AMO-*miR-224*后胰腺癌细胞周期变化情况 转染AMO-*miR-224*后的胰腺癌细胞Aspc-1和Bxpc-3通过流式细胞周期分析, 转染AMO-*miR-224*组细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 而S期和G<sub>2</sub>/M期明显降低. 数据经 $\chi^2$ 检验, 转染AMO-*miR-224*组较空白对照组、随机对照组、转染PBS组有明显抑制作用( $P < 0.05$ ), 而空白对

**■ 相关报道**  
 Wang等报道*miR-224*不但在肝癌中表达上调, 且可以通过降低凋亡抑制因子-5(apoptosis inhibitor-5, API-5)而参与细胞凋亡活性的影响.

### 同行评价

本研究试验设计合理,思路严密,具有较好的临床参考价值。

表 1 AMO-miR-224转染Aspc-1细胞,降低miR-224表达后细胞周期变化

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S(%)	G <sub>2</sub> /M(%)
空白对照组	49.55	26.57	23.87
随机对照组	46.98	21.93	31.09
PBS组	49.02	17.05	33.93
AMO-miR-224组	82.82	8.58	8.60

表 2 AMO-miR-224转染Bxpc-3细胞,降低miR-224表达后细胞周期变化

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S(%)	G <sub>2</sub> /M(%)
空白对照组	61.74	33.74	4.52
随机对照组	69.39	20.40	10.21
PBS组	68.01	21.50	10.49
AMO-miR-224组	86.54	10.00	3.45

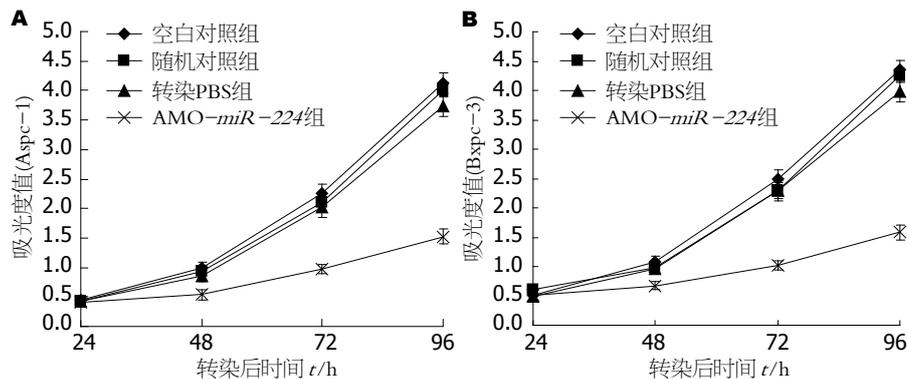


图 3 转染AMO-miR-224及其他组的胰腺癌细胞生长. A: Aspc-1细胞系; B: Bxpc-3细胞系。

照组、随机对照组、转染PBS组间无显著变化(表1, 2)。

2.5 流式细胞术分析转染AMO-miR-224后胰腺癌细胞凋亡情况 胰腺癌细胞Aspc-1和Bxpc-3转染AMO-miR-224后,转染AMO-miR-224组较空白对照组、随机对照组、转染PBS组早期凋亡明显增加( $P < 0.05$ ),而晚期凋亡无明显改变;空白对照组、随机对照组、转染PBS组之间各期细胞未见变化(图4)。

### 3 讨论

miRNAs是一类新的基因调控因子,参与调控细胞分化、血管形成以及细胞存活和生长等许多复杂的生命过程<sup>[11,23]</sup>。近年发现,miRNAs与恶性肿瘤密切相关,约52%调控miRNAs的编码基因位于肿瘤相关基因位点和染色体区域<sup>[24,25]</sup>。因此miRNAs可能成为诊断肿瘤的新的分子标志和判断肿瘤治疗及预后的分子靶点。且由于miRNAs在转录后调节目的基因的表达,这将更有利于肿瘤的早发现、早诊断和早治疗,这一发现必将具有广泛的临床应用前景<sup>[26]</sup>。

胰腺癌起病隐匿、发展迅速、死亡率高、预后差,被全球医学界列为“21世纪的顽固堡垒”。由于其不典型临床症状常被患者和医生忽视而延误诊断,早期诊断非常困难<sup>[27]</sup>。从而迫切需要寻找新的肿瘤标志物来进一步提高胰腺

癌的诊疗水平。近年随着miRNAs研究的不断深入,发现大量异常表达的miRNAs通过调控靶基因的表达而调节包括胰腺癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展,因此大规模的筛选肿瘤发生发展过程中异常表达的miRNAs将为人们全面认识肿瘤的生物学特性发挥重要作用,也为胰腺癌的早期诊治提供了新的希望。Murakami等<sup>[18]</sup>首次研究发现miR-224在肝癌呈过表达,最近又研究发现miR-224在大肠癌、卵巢癌以及前列腺癌中的表达也失调<sup>[19,28,29]</sup>,但miR-224在胰腺癌中的表达及其作用目前还不清楚。

我们首先通过TagMan MGB探针法定量分析40例胰腺癌病人癌组织及对应的癌旁组织miR-224的表达,发现43%(17/40)的胰腺癌病人癌组织miR-224表达上调( $P < 0.05$ )。Krützfeldt等<sup>[30]</sup>针对miRNA122及miRNA192的反义寡核苷酸能够明显抑制小鼠不同组织中对应microRNAs的表达,表明针对miRNAs的反义寡核苷酸可以有效抑制microRNAs的表达。随后本研究同样利用反义技术成功降低胰腺癌细胞Aspc-1和Bxpc-3的miR-224表达,并筛选出最佳作用浓度和时间。转染终浓度为100 nmol/L的AMO-miR-224经过48 h后,经荧光定量PCR反应检测发现miR-224表达抑制率达74%,同时我们利用MTT法检测发现Aspc-1和Bxpc-3胰腺癌细胞的生长受到抑制。最后我们应用流式细胞术对转染AMO-miR-224

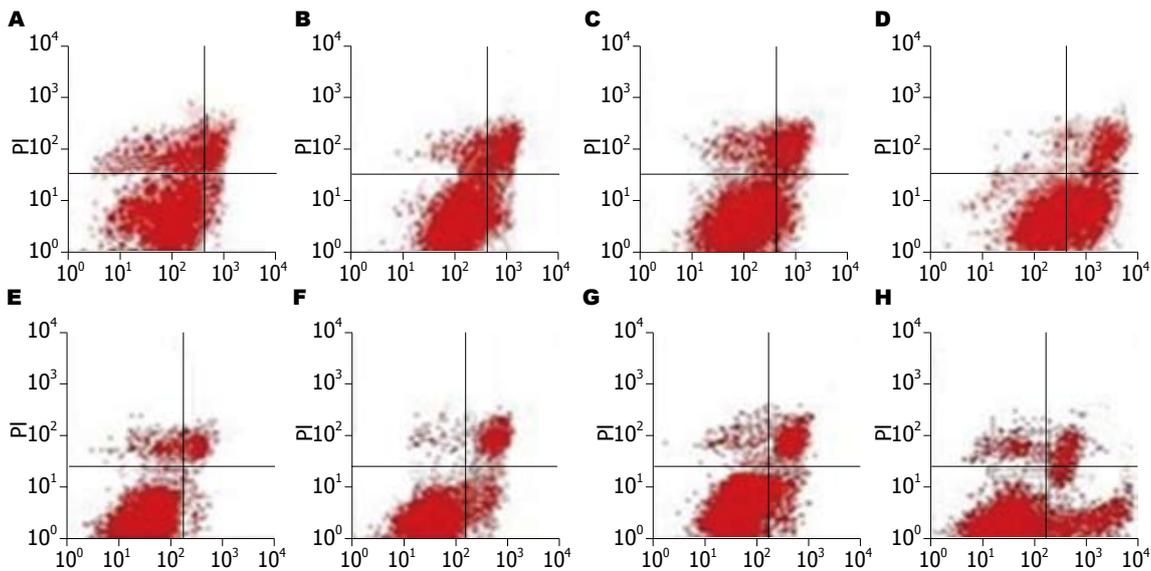


图 4 降低胰腺癌细胞Aspc-1和Bxpc-3中*miR-224*表达后的细胞凋亡情况. A-D: Aspc-1; E-H: Bxpc-3; A, E: 空白对照组; B, F: 随机对照组; C, G: PBS组; D, H: AMO-*miR-224*转染组.

后的细胞的细胞周期各期DNA的含量及细胞凋亡情况进行分析, 其结果发现降低*miR-224*表达后, 两组细胞的细胞周期主要停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 而S期和G<sub>2</sub>/M期细胞的比例明显下降, 且两组细胞的早期凋亡也明显增加.

总之, *miR-224*在胰腺癌的发生中发挥重要作用, 很可能成为一个新的胰腺癌的癌前标记物, 为胰腺癌基因治疗提供新的靶点. 但其具体的作用机制, 如*miR-224*如何调控胰腺癌细胞的生长? 下游靶基因是什么? 都有待于进一步深入研究.

#### 4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 2 Castellanos EH, Cardin DB, Berlin JD. Treatment of early-stage pancreatic cancer. *Oncology (Williston Park)* 2011; 25: 182-189
- 3 Krejs GJ. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis* 2010; 28: 355-358
- 4 Welsch T, Büchler MW, Schmidt J. [Surgery for pancreatic cancer]. *Z Gastroenterol* 2008; 46: 1393-1403
- 5 Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis* 2010; 28: 645-656
- 6 Orr RK. Outcomes in pancreatic cancer surgery. *Surg Clin North Am* 2010; 90: 219-234
- 7 Löhr JM. Medical treatment of pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 533-544
- 8 Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 2006; 25: 6156-6162
- 9 Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006; 11: 441-450
- 10 Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development

- and disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 827-887
- 11 Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 704-714
- 12 Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 141-158
- 13 Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoouj A, Labourier E, Hahn SA. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 4442-4452
- 14 Yu DC, Li QG, Ding XW, Ding YT. Circulating MicroRNAs: Potential Biomarkers for Cancer. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 2055-2063
- 15 Tricoli JV, Jacobson JW. MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Cancer Res* 2007; 67: 4553-4555
- 16 Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 2007; 171: 728-738
- 17 Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- 18 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545
- 19 Oberg AL, French AJ, Sarver AL, Subramanian S, Morlan BW, Riska SM, Borralho PM, Cunningham JM, Boardman LA, Wang L, Smyrk TC, Asmann Y, Steer CJ, Thibodeau SN. miRNA expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer. *PLoS One* 2011; 6: e20465
- 20 Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem* 2008; 283: 13205-13215
- 21 Li Q, Wang G, Shan JL, Yang ZX, Wang HZ, Feng J, Zhen JJ, Chen C, Zhang ZM, Xu W, Luo XZ, Wang D. MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells

- and involved in cellular migration and invasion. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 164-171
- 22 Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D140-D144
- 23 Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 219-230
- 24 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- 25 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866
- 26 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- 27 Klapman J, Malafa MP. Early detection of pancreatic cancer: why, who, and how to screen. *Cancer Control* 2008; 15: 280-287
- 28 White NM, Chow TF, Mejia-Guerrero S, Diamandis M, Rofael Y, Faragalla H, Mankaruous M, Gabril M, Girgis A, Yousef GM. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2010; 102: 1244-1253
- 29 Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG, Lee DH, Stephens RM, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Ambs S. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68: 1152-1164
- 30 Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-689

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 (print), ISSN 2219-2859 (online), 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, 以及胃肠运动对神经的影响、传递、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。

# 肝星状细胞的可塑性及其对肝纤维化的意义

张贺吉, 吴江峰, 柳长柏

张贺吉, 柳长柏, 三峡大学分子生物学研究所 湖北省宜昌市 443002

吴江峰, 三峡大学医学院 湖北省宜昌市 443002

国家自然科学基金资助项目, No. 81070348

湖北省卫生厅青年科技人才基金资助项目, No. QUX2010-28

作者贡献分布: 本综述由张贺吉与吴江峰完成, 柳长柏审校。

通讯作者: 柳长柏, 博士, 教授, 443002, 湖北省宜昌市, 三峡大学分子生物学研究所. cblu@ctgu.edu.cn

电话: 0717-6397179 传真: 0717-6397179

收稿日期: 2011-09-13 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Plasticity of hepatic stellate cells: implications for the treatment of hepatic fibrosis

He-Ji Zhang, Jiang-Feng Wu, Chang-Bai Liu

He-Ji Zhang, Chang-Bai Liu, Institute of Molecular Biology, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China

Jiang-Feng Wu, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070348; the Youth Talent Foundation of Health Department of Hubei Province, No. QUX2010-28

Correspondence to: Chang-Bai Liu, Professor, Institute of Molecular Biology, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China. cblu@ctgu.edu.cn

Received: 2011-09-13 Revised: 2011-10-18

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

Activation of hepatic stellate cells (HSCs) plays an important role in hepatic fibrogenesis. More and more experimental and clinical data have shown that HSCs have the capacity of multidirectional differentiation in special niches. Hepatic fibrosis may be prevented and reversed in part, if not all, by changing HSC fate. Thus, the research of HSC plasticity may break a new path for therapy of chronic hepatic diseases. This review aims to elucidate the origin, structure and plasticity of HSCs, and identify HSCs as a potential therapeutic target for liver fibrosis.

Key Words: Hepatic stellate cells; Hepatic fibrosis; Stem cell; Differentiation

Zhang HJ, Wu JF, Liu CB. Plasticity of hepatic stellate cells: implications for the treatment of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3415-3419

## 摘要

在肝纤维化形成过程中, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)发挥着重要的作用. 基础和临床研究结果显示, 在特殊的内环境因素的影响下HSC具有朝多方向分化的潜能. 对HSC命运的干预能够在一定程度上预防肝纤维化的发生, 甚至逆转肝纤维化, 因此HSC的可塑性研究可能为慢性肝病治疗开辟一条新途径. 本文就HSC的起源、结构、可塑性及其对肝纤维化的潜在治疗意义作一综述.

关键词: 肝星状细胞; 肝纤维化; 干细胞; 分化

张贺吉, 吴江峰, 柳长柏. 肝星状细胞的可塑性及其对肝纤维化的意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19(33): 3415-3419

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3415.asp>

## 0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)位于肝脏的狄氏间隙, 处于肝细胞基底面与血管内皮细胞之间, 其与肝纤维化的形成密切相关<sup>[1-3]</sup>. HSC表面存在多种干细胞标记分子, 在一定体外条件诱导下有继续分化的潜能<sup>[4,5]</sup>, 可塑性极强, HSC所处的狄氏间隙具有与干细胞内环境相类似的特点, 为HSC作为靶点的慢性肝病治疗提供了更为广阔的空间. 本文就HSC的可塑性及其对肝纤维化的潜在应用价值作一综述.

## 1 HSC的起源和结构

1.1 HSC的起源 1876年, 德国Kupffer发现了肝星状细胞(sternzellen)的存在, 但具体结构并不明确<sup>[6,7]</sup>. 日本学者发现肝窦周围有一种富含脂质小滴、并且有网状纤维包绕的细胞, 并将其命名为伊东细胞(Ito Cells)或贮脂细胞(lipocytes). 直到1971年, Wake等<sup>[7]</sup>证实贮脂细胞就是肝星状细胞, 至此人们才揭开了肝星状细胞的真实面目, 并开始对其功能进行了研究, 逐渐发现了它与肝纤维化的相关关系<sup>[1-3,8]</sup>. 1995年国际上正式将其命名为HSC.

HSC的胚胎起源尚不确定, 一些学者认为HSC可能是神经来源, 因为HSC中存在神经胶质

## ■背景资料

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)在肝纤维化的发生、发展过程中发挥重要作用. 静止的HSC被TGF- $\beta$ 等炎症因子激活, 转化为MFB, 过度合成、分泌胶原蛋白等细胞外基质, 以及基质金属蛋白酶抑制剂的表达升高等是肝纤维化的关键.

## ■同行评议者

唐南洪, 教授, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

## ■ 研发前沿

关于HSC的研究提示, 干预HSC的活化及分化方向将可能成为治疗肝纤维化的靶点, 但HSC的分化机制尚不明确, 有待进一步研究。

原纤维酸性蛋白质(gial fibrillary acidic protein, GFAP)和其他神经外胚层蛋白, 也有学者认为可能来自于内胚层的CD34<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>细胞<sup>[8]</sup>。最近研究证实小鼠的HSC来源于间充质细胞<sup>[9,10]</sup>。Baba等<sup>[11]</sup>将带有绿色荧光标记的小鼠骨髓细胞移植到年龄一致的C57BL/J小鼠骨髓中1 wk后, 在肝脏中分离出了含有绿色荧光蛋白的细胞, 其中一部分细胞存在结蛋白(desmin<sup>+</sup>)和GFAP<sup>+</sup>标记, 提示HSC可能来自骨髓。

1.2 HSC的结构 HSC位于肝脏的狄氏间隙内, 约占肝内细胞总数的5%-15%, 同肝细胞、肝窦内皮细胞、肝前体细胞及Kupffer细胞共处于一个微环境, 通过细胞因子及信号通路相互交谈(cross talking), 共同维持肝脏内环境的稳定<sup>[12,13]</sup>。HSC形态不规则、常伸出数个星状突起<sup>[14]</sup>。正常状态下, HSC胞质内富含大量维生素A(其中以视黄醛居多)形成的脂质泡<sup>[15]</sup>, 合成和分泌多种胶原酶和少量细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 释放肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF), 转移生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ )等参与肝脏的自我更新及修复<sup>[16,17]</sup>。

## 2 HSC的可塑性

2.1 HSC的表面特征 一般而言, 干细胞(stem cells, SC)是一类具有自我复制能力的多潜能细胞, 在一定条件下, 可以分化成各种不同功能细胞。干细胞表面的一些独特分子在已分化的细胞中不再表达, 如中间丝蛋白Nestin, CD133, Oct-4等。

Wiese等<sup>[18]</sup>研究表明, 在胚胎发育过程中, Nestin表达于迁移和增殖的细胞, 在成熟组织中, Nestin仅出现于一些再生区域, 是一典型的干细胞标记分子。2009年De Kock等<sup>[4]</sup>进一步发现, 肝脏内前体细胞也会表达Nestin蛋白。2011年Reister等<sup>[19]</sup>发现, HSC表达干细胞标记分子, 具有分化潜能, 可能受HSC活化过程中的DNA甲基化调控, 其中一些蛋白, 如CD133、Notch1、Notch3基因在HSC活化过程中DNA被甲基化, 而Nestin蛋白基因在HSC或者其他干细胞(如胚胎干细胞和脐带血干细胞)中无DNA甲基化现象, 而在已分化细胞(如肝细胞)中发现有DNA甲基化, 推测Nestin蛋白在未分化的HSC中可能受制于其他调控机制, 如H3组蛋白甲基化作用。CD133(又称AC133), 是一类跨膜蛋白, 属于造血干细胞和其他前体细胞的标记分子<sup>[20,21]</sup>。Kordes

等<sup>[22]</sup>通过分离大鼠HSC时发现, 一类CD133阳性的HSC具有典型的中间干细胞特性, 表达HSC、内皮前体细胞和单核细胞的标记分子, 如Oct-4蛋白(Oct-4是一类胚胎干细胞和生殖细胞的标记分子, 与很多细胞的分化相关<sup>[23]</sup>), 可继续分化成为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)。2010年Fujii等<sup>[24]</sup>利用四氯化碳损伤小鼠肝脏后, 发现CD133的表达显著增加, 同时HSC的标记蛋白desmin和GFAP表达亦增加, 并且CD133与desmin呈共定位表达。肝窦内皮细胞释放的基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)是骨髓干细胞迁徙和归巢的一类必须蛋白<sup>[25]</sup>, 而无论是静止期HSC还是活化期HSC, 都会表达SDF-1特异性受体CXCR4, 在肝脏受损的早期阶段, HSC表面的CXCR4会与SDF-1蛋白特异性结合, 促使活化的HSC迁移并与机体免疫反应有关<sup>[26,27]</sup>。

### 2.2 HSC的分化潜能及相关信号通路

2.2.1 HSC的分化潜能: Sawitza等<sup>[26,27]</sup>发现HSC除表达SDF-1特异性受体外, 还有大量干细胞信号通路分子的表达, 如Notch信号配体Jagged 1和其靶基因Hes 1, 以及Wnt信号通路中的粘连素等。Friedman<sup>[8]</sup>发现, HSC处于肝脏内前体细胞的微环境中, 在肝脏再生的过程中也发挥着重要作用。这些都间接说明狄氏间隙具有干细胞微环境的特点, 为其多方向分化提供可能。实验还证明, HSC具有分化为肝细胞和内皮细胞的潜能。其中, Kordes等<sup>[27,28]</sup>在分离培养大鼠CD133<sup>+</sup>HSC时发现, CD133<sup>+</sup>HSC除表达HSC特有蛋白外, 还表达内皮前体细胞和单核细胞的标记分子, 在CD133<sup>+</sup>HSC培养期间, 若在培养基中加入血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、红细胞生成素以及白介素-6, HSC则会出现管状分支样结构, 同时表达内皮细胞标记分子一氧化氮合酶和血管内皮细胞钙E粘连蛋白; 若在培养基中加入成纤维细胞生长因子、HGF、碱性成纤维细胞生长因子以及白介素-6, 则导致HSC逐渐变圆, 同时表达肝细胞标志分子甲胎球蛋白和白蛋白; 而当CD133<sup>+</sup>HSC与血小板来源的生长因子(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)共培养后, HSC表达内皮细胞和肝细胞的标记分子就会被抑制<sup>[27]</sup>。2010年Tuleuova等<sup>[28]</sup>发现, 在胚胎干细胞中加入大量生长因子的混合物(HGF, 碱性成纤维细胞生长因子, 骨形态生成蛋白4)会促进其向肝细胞的转化, 若在培养过程中加入HSC, 这种转化的能力则被增强。

国内外大量研究已证明, 肝脏受损后产生大量炎症因子可以促使静止的HSC活化, 进而向MFB转化<sup>[29-33]</sup>. 最近有研究表明, 活化的HSC参与上皮-间质细胞转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)过程, HSC与内皮前体细胞的标记分子在2个细胞系间相互交叉, 二者共同表达内皮细胞与间质细胞的标记蛋白<sup>[34]</sup>. Choi等<sup>[35]</sup>发现, 静止期HSC向肌成纤维样细胞转变的过程就是EMT的过程, 此间促进EMT的典型分子TGF- $\beta$ 大量表达, 静止期HSC具有的内皮细胞特点逐渐消失, E钙粘蛋白的表达降低, 当加入EMT抑制剂BMP7后,  $\alpha$ -SMA和I型胶原蛋白的表达受到抑制.

**2.2.2 HSC分化的相关信号通路:** HSC的生长存在类似干细胞的自我更新或自我调节的分子机制, 如Wnt<sup>[36]</sup>, Notch<sup>[37]</sup>, Jak-Stat<sup>[38]</sup>, Bmp, Activin/TGF/ Nodal, Hedgehog等信号转导. 研究发现分离的大鼠HSC中, Wnt信号通路处于活化状态, 粘连素的降解加剧, Pitx2c蛋白表达增加<sup>[39]</sup>, 并有靶基因Myc高表达, 以维持HSC的静止状态<sup>[40]</sup>. Sawitza等<sup>[27]</sup>发现HSC中Notch1蛋白会与邻近实质细胞表面的Jag1结合, 调控HSC处于静止期, 同时HSC中Notch1信号通路的靶基因(Hes 1和Hey 1)表达上调. Hedgehog信号通路则主导着HSC的活化<sup>[41]</sup>, Hedgehog存在3种同源基因SonicHedgehog(SHH)、Indian Hedgehog(IHH)和Desert Hedgehog(DHH), 分别编码Shh、Ihh和Dhh 3种蛋白, 在静止期HSC向肌成纤维样细胞转变(即EMT)的过程中, Hedgehog的配体(Shh配体)蛋白及其信号转导下游靶基因的表达均明显升高, 而静止期HSC内Hhip(Hedgehog配体的竞争性拮抗剂)的表达高于Shh配体, 发挥主导作用, 若在培养4 d的肌成纤维样细胞中加入Hedgehog信号通路的特异性阻断剂环杷明,  $\alpha$ -SMA和I型胶原蛋白的表达则明显降低<sup>[33]</sup>. 在大鼠、小鼠和人的HSC中都有Hedgehog信号转导通路下游分子 $\alpha$ 半乳糖苷酶的表达上调, 当使用该信号通路的抑制剂Cyc后, HSC的活化程度降低约50%<sup>[42]</sup>.

### 3 HSC可塑性与肝纤维化

在各种病因导致的慢性肝损伤启动肝纤维化, 进展成为肝硬化、甚至肝癌<sup>[43,44]</sup>过程中, 静止的HSC被炎症因子(如转化生长因子, 结缔组织生长因子, 血小板衍生因子, 表皮生长因子等)激活, 活化的HSC向MFB转化, MFB异常增殖, 过

度合成、分泌ECM, 促进内皮素 I、血管加压素和血管紧张素 II 产生血管收缩性应答, 导致肝内门静脉高压, 活化的HSC持续分泌的炎症因子进一步放大对静止HSC的作用, 促进其活化, 上调基质金属蛋白酶抑制剂的表达等, 使过度沉积的ECM最终难以降解<sup>[45,46]</sup>. 新近的研究表明, 在去除肝脏的损伤因素后, 肝纤维化尚有逆转的可能<sup>[47]</sup>. 鉴于HSC在肝纤维化形成过程中发挥的重要病理作用以及其潜在的可塑性, 我们可能就以下两方面来调控肝纤维化的发展.

**3.1 通过改变HSC的内环境来控制其分化方向** 新近研究<sup>[48]</sup>发现, 以表达HGF的HSC株作为饲养细胞, 可以成功地将大鼠骨髓来源的Thy-1<sup>+</sup> $\beta$ 2M细胞诱导为肝细胞, 分析HGF、HSC及其产生的细胞外基质为骨髓干细胞向肝细胞分化提供了适宜的微环境. 临床研究显示, 将骨髓间充质干细胞移植入受损的肝脏后, 可以改善肝脏的微环境, 在一定程度上预防肝纤维化的发生<sup>[49]</sup>. Kordes等<sup>[22,27]</sup>通过对大鼠肝脏内炎症因子类型的控制, 间接地影响了HSC的分化方向, 避免MFB的大量产生, 取而代之的是向内皮细胞和肝细胞转化, 从而实现了定向诱导的作用.

**3.2 通过逆转EMT的发生来降低MFB的病理作用** 实验证明, 在EMT过程中, 大量细胞因子及信号通路参与其中, 典型的如TGF- $\beta$ 及Hedgehog信号通路<sup>[49-51]</sup>. 因此, 控制相关细胞因子的活性以及抑制信号通路的活化将可能成为逆转EMT的关键. Kinoshita等<sup>[52]</sup>将表达BMP7的病毒载体感染到大鼠的HSC中, 抑制了TGF- $\beta$ 的表达, 通过smad1/5/8磷酸化转导BMP7介导的信号通路, 降低了I型胶原蛋白的表达, 减少了细胞外基质的沉积, 缓解了肝门静脉压力, 抑制了大鼠肝纤维化的发展. 以TGF- $\beta$ 为靶点的抗肝纤维化的治疗过程中发现, 特异性抑制大鼠HSC中TGF- $\beta$ 受体的表达, 可以有效降低 $\alpha$ -SMA和胶原蛋白的表达, 并进一步抑制MFB的形成<sup>[53]</sup>.

## 4 结论

迄今, 临床上尚无特异、有效的抗肝纤维化治疗, 抗肝纤维化的基础研究主要集中在抑制HSC的活化或者促进HSC的凋亡, 但效果尚不理想. HSC表面存在干细胞标记分子, 狄氏间隙与干细胞微环境类似, 这些都为HSC的多向分化提供了条件. 进一步摸索肝纤维化过程中不同状态下HSC的特征, 尤其是HSC活化过程中炎症因子种类或者比例等, 探索控制其分化方向的关键因

**■ 相关报道**  
Sawitza等的最新研究报道发现, HSC所处的内环境具有前体细胞内环境的特点, CD133<sup>+</sup>的HSC具有前体细胞的特点, 分化方向可被调控.

**■ 创新盘点**  
本文总结了HSC的可塑性, 并提出其在肝纤维化治疗应用中的可能性, 为临床肝纤维化的防治提供一个新思路.

### ■应用要点

通过了解HSC的特点可以发现,改变肝脏狄氏间隙的微环境来促使HSC的定向分化,以及调控HSC活化过程可能为预防或逆转肝纤维化提供新的方法。

素,通过人工干预HSC的命运可能改变肝纤维化进程,这一策略可能为预防或逆转肝纤维化提供新的思路。

### 5 参考文献

- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 425-436
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, and Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8681-8685
- Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989; 84: 1780-1785
- De Kock J, Vanhaecke T, Biernaskie J, Rogiers V, Snykers S. Characterization and hepatic differentiation of skin-derived precursors from adult foreskin by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 1522-1527
- Castilho-Fernandes A, de Almeida DC, Fontes AM, Melo FU, Picanço-Castro V, Freitas MC, Orellana MD, Palma PV, Hackett PB, Friedman SL, Covas DT. Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Mol Pathol* 2011; 91: 664-672
- Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1639-1642
- Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132: 429-462
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172
- Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE, Sucov HM, Tsukamoto H. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 2009; 49: 998-1011
- Ramadori G, Mansuroglu T. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* 2009; 50: 320; author reply 320
- Baba S, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Hoppo T, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 2004; 40: 255-260
- Suh YG, Jeong WI. Hepatic stellate cells and innate immunity in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2543-2551
- 黄艳, 黄成, 李俊. 肝纤维化病程中Kupffer细胞分泌的细胞因子对肝星状细胞活化增殖、凋亡的调控. *中国药理学通报* 2010; 26: 9-13
- 饶葱瑛, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 671-674
- D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. *PLoS One* 2011; 6: e24993
- 曲颖, 宗蕾, 陆伦根. 转化生长因子- $\beta$ 信号通路与肝纤

### ■名词解释

HSC的可塑性: 在特定条件下, HSC可以分化为肌成纤维细胞, 肝细胞或胆管内皮细胞等, 这种多方向分化的能力被称之为HSC的可塑性。

- Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell Biol Int* 2010; 34: 1247-1272
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2510-2522
- Reister S, Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. The epigenetic regulation of stem cell factors in hepatic stellate cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 1687-1699
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-5012
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013-5021
- Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417
- Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 1990; 344: 435-439
- Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM, Lanuti M, Tanabe KK. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 79
- Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000; 106: 1331-1339
- Sawitza I, Kordes C, Reister S, Häussinger D. The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology* 2009; 50: 1617-1624
- Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus. *Biol Chem* 2009; 390: 1003-1012
- Tuleuova N, Lee JY, Lee J, Ramanculov E, Zern MA, Revzin A. Using growth factor arrays and micropatterned co-cultures to induce hepatic differentiation of embryonic stem cells. *Biomaterials* 2010; 31: 9221-9231
- 尤俊勇, 王效民. 肝星状细胞的激活与凋亡相关信号通路研究进展. *中外医学研究* 2011; 9: 155-158
- 李伟琴, 徐光华, 袁致海. 肝星状细胞与肝纤维化关系研究进展. *延安大学学报* 2009; 7: 7-9
- Cheng K, Yang N, Mahato RI. TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis. *Mol Pharm* 2009; 6: 772-779
- Choi SS, Syn WK, Karaca GF, Omenetti A, Moylan CA, Witek RP, Agboola KM, Jung Y, Michelotti GA, Diehl AM. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway. *J Biol Chem* 2010; 285: 36551-36560
- Ikeda N, Murata S, Maruyama T, Tamura T, Nozaki R, Kawasaki T, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R,

- Homma M, Ohkohchi N. Platelet-derived adenosine 5'-triphosphate suppresses activation of human hepatic stellate cell: In vitro study. *Hepato Res* 2012; 42: 91-102
- 34 Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G575-G583
- 35 Choi SS, Omenetti A, Witek RP, Moylan CA, Syn WK, Jung Y, Yang L, Sudan DL, Sicklick JK, Michellotti GA, Rojkind M, Diehl AM. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1093-G1106
- 36 Luis TC, Naber BA, Roozen PP, Brugman MH, de Haas EF, Ghazvini M, Fibbe WE, van Dongen JJ, Fodde R, Staal FJ. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 345-356
- 37 Loeffler D, Kokkaliaris KD, Schroeder T. Wnt to notch relay signaling induces definitive hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 2-4
- 38 Lakner AM, Moore CC, Gullidge AA, Schrum LW. Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5047-5056
- 39 Degar BA, Baskaran N, Hulspas R, Quesenberry PJ, Weissman SM, Forget BG. The homeodomain gene *Pitx2* is expressed in primitive hematopoietic stem/progenitor cells but not in their differentiated progeny. *Exp Hematol* 2001; 29: 894-902
- 40 Kordes C, Sawitzka I, Häussinger D. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 116-123
- 41 Sicklick JK, Li YX, Choi SS, Qi Y, Chen W, Bustamante M, Huang J, Zdanowicz M, Camp T, Torbensohn MS, Rojkind M, Diehl AM. Role for hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability. *Lab Invest* 2005; 85: 1368-1380
- 42 吴盛迪, 王吉耀. 抗肝纤维化治疗研究进展. *肝脏* 2009; 14: 71-73
- 43 Veidal SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, Nawrocki A, Larsen MR, Nguyen QH, Hägglund P, Luo Y, Zheng Q, Vainer B, Leeming DJ. MMP Mediated Degradation of Type VI Collagen Is Highly Associated with Liver Fibrosis-Identification and Validation of a Novel Biochemical Marker Assay. *PLoS One* 2011; 6: e24753
- 44 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 197-199
- 45 Kwiecinski M, Noetel A, Elfimova N, Trebicka J, Schievenbusch S, Strack I, Molnar L, von Brandenstein M, Töx U, Nischt R, Coutelle O, Dienes HP, Odenthal M. Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS One* 2011; 6: e24568
- 46 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 47 王韞芳, 南雪, 张锐, 李艳华, 岳文, 闫舫, 裴雪涛. 转基因肝星状细胞定向诱导骨髓Thy-1 $\beta$ 2M-细胞向肝细胞分化. *科学通报* 2004; 49: 549-553
- 48 徐静, 陈光. 骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2291-2295
- 49 沈克平, 王海永, 胡兵. 上皮间质转化分子机制研究进展. *世界中西医结合杂志* 2011; 6: 81-89
- 50 Venkov C, Plieth D, Ni T, Karmaker A, Bian A, George AL, Neilson EG. Transcriptional networks in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2011; 6: e25354
- 51 Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, Kim BH, Park JK, Kim HK, Kim JS, Oh SC. Sonic Hedgehog Pathway Promotes Metastasis and Lymphangiogenesis via Activation of Akt, EMT, and MMP-9 Pathway in Gastric Cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 7061-7070
- 52 Kinoshita K, Iimuro Y, Otogawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 2007; 56: 706-714
- 53 Fu R, Wu J, Ding J, Sheng J, Hong L, Sun Q, Fang H, Xiang D. Targeting transforming growth factor  $\beta$ RII expression inhibits the activation of hepatic stellate cells and reduces collagen synthesis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2011; 236: 291-297

■同行评价  
本综述引用的材料较新颖, 语言通顺, 借鉴性较强。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG)被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力. WJG在PubMed Central (PMC)统计, 单月独立IP地址访问58 257次, 全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次, 全文PDF下载59 694次. 另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种, 总被引频次排名, WJG位于第174名. (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

# AFP阴性肝癌的肿瘤标志物诊断的研究进展

王婷, 张焜和

## ■背景资料

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是诊断肝细胞癌的主要血清标志物,但其敏感性只有60%-70%,即1/3左右的肝细胞癌患者为AFP阴性。AFP阴性肝细胞癌是目前肝癌诊断中的瓶颈问题,成为近年来的研究热点。

王婷, 张焜和, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省消化疾病重点实验室 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 81060197

江西省自然科学基金资助项目, No. 2010GZY0318

作者贡献分布: 本综述由王婷完成初稿; 张焜和审校修改。

通讯作者: 张焜和, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科, 江西省消化疾病研究所. yfyzkh@sina.com

收稿日期: 2011-08-28 修回日期: 2011-10-30

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Progress in research of tumor markers for diagnosis of hepatocellular carcinoma in AFP-negative patients

Ting Wang, Kun-He Zhang

Ting Wang, Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory for Digestive Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81060197; the Jiangxi Provincial Natural Science Foundation, No. 2010GZY0318

Correspondence to: Kun-He Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwai Zheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzkh@sina.com

Received: 2011-08-28 Revised: 2011-10-30

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

Alpha-fetoprotein (AFP) is an important marker for hepatocellular carcinoma (HCC), and the detection of serum AFP is currently the principal method for the diagnosis of HCC. About one-third of HCC patients have normal serum AFP concentration, and the diagnosis of HCC in these patients is challenging. In recent years, many studies have been done to seek other tumor markers for HCC. In this paper, we review the recent progress in research of tumor markers for the diagnosis of HCC in AFP-negative patients.

Key Words: Alpha-fetoprotein; Hepatocellular carcinoma; Tumor markers; Diagnosis

Wang T, Zhang KH. Progress in research of tumor markers for diagnosis of hepatocellular carcinoma in AFP-

negative patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3420-3425

## 摘要

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要标志物,测定血清AFP水平是目前诊断HCC的主要手段。约1/3的HCC患者血清AFP水平正常,即所谓的AFP阴性肝癌,这部分患者的诊断是目前肝癌诊断中需解决的关键问题。多年来,人们一直在寻找能弥补AFP不足的肝癌标志物,以提高HCC的诊断水平。本文综述了有关AFP阴性肝癌的肿瘤标志物诊断研究进展,主要内容包括传统肝癌标志物对AFP阴性肝癌的诊断价值,新肝癌标志物对AFP阴性肝癌的诊断价值,以及对AFP阴性HCC具有潜在诊断价值的生物标志物。

关键词: 甲胎蛋白; 肝细胞癌; 肿瘤标志物; 诊断

王婷, 张焜和. AFP阴性肝癌的肿瘤标志物诊断的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3420-3425

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3420.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发病率在世界范围内位列第5,在我国位列第3,且呈逐年上升趋势<sup>[1,2]</sup>。HCC的5年生存率不足5%,早期诊断及手术治疗仍是目前改善患者预后最有效的方法。甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是目前临床上最主要、应用最广泛的HCC早期筛查血清标志物,但因其在转录水平上受多种因素调控,使部分HCC患者血清AFP水平正常(<20 μg/L),即所谓的AFP阴性HCC。约1/3的HCC患者血清AFP呈阴性,小肝癌(瘤体≤3 cm)尤为常见。AFP阴性HCC,多为低分化型肝癌,预后较差。AFP阴性HCC的诊断多依赖于影像学 and 病理学检查,缺乏有价值而实用的标志物。为了提高AFP阴性肝癌的诊断水平,人们进行了大量研究。本文就近几年对AFP阴性HCC的标志物诊断研究进展作一综述。

## ■同行评议者

施晓雷, 副主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

## 1 传统肝癌标志物对AFP阴性肝癌的诊断价值

1.1 甲胎蛋白异质体 AFP是一组异质糖蛋白质,因糖基不同而与植物凝集素有不同的结合特性.能与扁豆凝集素(LCA)结合的甲胎蛋白异质体(AFP-L3)是HCC的特异性蛋白,其表达水平与AFP并非一致<sup>[3]</sup>,测定血清中AFP-L3占总AFP的比值,对HCC的诊断价值优于AFP<sup>[4]</sup>.因常规方法检测AFP-L3的灵敏度不够,临床上未被广泛应用,但若建立灵敏度高且临床实用检测方法,可能对AFP阴性肝癌的诊断有较大的价值. Toyoda等<sup>[5]</sup>建立了一种高敏感性方法测定血清AFP-L3,诊断AFP阴性HCC的敏感度达41.5%,特异度达85.1%,而常规方法的敏感度只有7%.

1.2 异常凝血酶原 异常凝血酶原(Des- $\gamma$ -carboxy-prothrombin, DCP)又称维生素K缺乏或拮抗诱导蛋白(PIVKA-II),1984年首次发现其在HCC患者和HCC手术切除后复发病例中显著升高,因而认为可作为HCC诊断和治疗后复发的标志物.血清中DCP水平与AFP水平无相关性<sup>[6]</sup>,对AFP阴性HCC的诊断有一定的价值,若与AFP联合应用可有效提高HCC的早期诊断效率. Yoon等<sup>[7]</sup>检测了45例AFP阴性肝癌患者血清中的DCP,发现有22例阳性,即约半数AFP阴性肝癌血清DCP呈阳性结果.

1.3  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶同工酶II  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶同工酶II(GGT II)是 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)同工酶的一种,在健康人体内几乎检测不到,但在肝癌患者血清中明显升高<sup>[8]</sup>,被认为是HCC特异性标志物,用于HCC的诊断敏感性可达74%左右. GGT II与AFP水平及HCC大小无明显相关性,在AFP阴性HCC和小肝癌中有较高的阳性率<sup>[9]</sup>.因此,GGT II在诊断AFP阴性HCC中有较大的价值.

1.4  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶(AFU)是一种溶酶体酸性水解酶,广泛分布于机体的组织细胞、血液和体液内,参与含岩藻糖基的糖蛋白、糖脂的分解代谢.有研究在1984年首先提出AFU有可能成为诊断肝癌的标志物.由于AFU在HCC与其他肝脏病中鉴别诊断不太理想,存在较明显的假阳性和假阴性,因此未广泛用于HCC的诊断. AFU活性与HCC恶性程度、肿瘤大小、AFP浓度无明显相关性,在排除其他肝脏病变情况下,可用于AFP阴性HCC的诊断,尤其对小肝癌患者有一定的诊断意义<sup>[10]</sup>.

## 2 肝癌新标志物对AFP阴性肝癌的诊断价值

2.1 高尔基体蛋白73 高尔基体蛋白73(Golgi

membrane protein 73, GP73)是一种II型高尔基体跨膜糖蛋白,是维持肝脏、肾脏等内脏器官生长发育的重要分子,主要表达于人类多种组织的上皮细胞,正常肝脏组织表达甚微,但在肝炎、肝硬化和HCC患者血清中水平升高. Marero等<sup>[11]</sup>研究显示, HCC患者血清GP73的水平明显高于肝硬化患者,诊断肝癌的敏感度和特异度达69%和75%, ROC曲线下面积高于AFP(0.79 vs 0.61),诊断早期肝癌的敏感度(62%)也高于AFP(25%),且AFP阴性肝癌的阳性率也达到57%,提示GP73对肝癌有良好的诊断价值,尤其是早期肝癌和AFP阴性肝癌.但新近2个来自国内的研究显示, GP73似乎对肝癌的诊断价值并不理想. Tian等<sup>[12]</sup>检测了535例肝细胞癌及其他慢性肝病患者的血清GP73,发现均有明显升高,认为只能作为早期筛查肝癌的一个标志物. Liu等<sup>[13]</sup>检测了478正常对照和296肝病患者的血清GP73水平,发现肝病患者明显高于正常对照,并随肝病进展而不断升高,而对肝癌的诊断并无特别价值.因此, GP73对肝癌,包括AFP阴性肝癌的诊断价值有待进一步评估.

2.2 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)是一种参与细胞增殖和胚胎发育的细胞膜糖蛋白,在正常肝组织及良性肝脏病变中检测不到,而在HCC组织中高表达,在HCC患者血清中水平升高;诊断HCC的灵敏度和特异性均能与AFP媲美<sup>[14,15]</sup>,在诊断小肝癌方面优于AFP(56.3% vs 31.3%)<sup>[16]</sup>,且表达水平与血清AFP无相关性,与AFP联合应用可显著提高HCC的早期诊断率.报道显示, GPC3基因在69%-81%的AFP阴性HCC中呈现高表达<sup>[17]</sup>. Ding等<sup>[18]</sup>检测了41例AFP阴性的肝癌及癌旁组织的GPC3 mRNA,前者阳性率为73.17%,后者只有9.76%; >5 cm的肝癌阳性率为79.31%, <5 cm者为41.67%;免疫组织化学显示GPC3主要在肝癌细胞中表达,其他细胞(正常肝细胞、胆管细胞、血管内皮细胞、Ito细胞及成纤维细胞)均呈阴性.

2.3 血清结合珠蛋白 血清结合珠蛋白(haptoglobin, HP)是一种分子量约为90 kDa血浆糖蛋白,是一种急性期蛋白,当机体发生各种炎症时其血浆中含量显著升高, HCC患者体内血清HP含量也大量升高,对肝癌具有诊断价值. Ang等<sup>[19]</sup>发现血清HP水平在肝癌患者明显高于良性慢性肝病患者,其诊断HCC的灵敏度和特异度分别为79%和95%,且HP有不同的糖基化类型,有的

### ■ 研发前沿

近年来,高通量生物技术的迅速发展,为寻找新的肝细胞癌标志物开辟了新途径,是目前AFP阴性肝癌标志物的研究前沿.被认为有重要应用前景的肝癌新标志物,如高尔基体蛋白73(GP73)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)等,都是通过蛋白质组学技术发现的.

### ■相关报道

Jia等通过基因芯片技术,从肝细胞癌中同时筛选出5种肝癌过度表达的基因:GPC3、PEG10、MDK、SERPIN11、QP-C.实时PCR定量检测这5种基因的表达,发现AFP阴性肝癌的阳性率达67%-89%,这在AFP阴性肝癌的诊治方面可能有较好的应用前景.

类型为肝癌所特有.有研究表明,HP用于AFP阴性HCC的诊断有较大的价值,其ROC曲线下面积达0.763<sup>[20]</sup>.因此,HP在诊断AFP阴性HCC具有一定的潜在应用价值,但有待更多的临床研究证实.

**2.4 骨桥蛋白** 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种细胞外基质的分泌型糖蛋白,在早期细胞免疫应答、肉芽炎症、肿瘤发生和转移中发挥重要作用. El-Din Bessa等<sup>[21]</sup>发现血清OPN水平在肝癌患者明显高于良性慢性肝病患者,诊断肝癌的敏感度和特异度分别为88.3%和85.6%,诊断价值高于AFP(AUC = 0.918 vs 0.712),且表达水平与血清AFP无相关性. Shang等<sup>[22]</sup>证实OPN对于诊断AFP阴性肝癌也有良好的诊断价值,且在肝癌发生前一年可检测到升高.因此OPN可作为AFP阴性肝癌的诊断指标之一.

## 3 与AFP阴性肝癌相关的标志物

**3.1 组织转谷氨酰胺酶2** 组织转谷氨酰胺酶2(TGM2)是转谷氨酰胺酶(Tgase: EC2.3.2.13)家族中发现最早的一个成员,是一种钙依赖的酰基转移酶,催化酰基转移反应. TGM2普遍分布于人体各组织中,其表达水平和活性高低可影响到正常和肿瘤的细胞生长、分化和凋亡等生理病理过程. Sun等<sup>[23]</sup>通过定量蛋白组学技术发现, TGM2过表达于AFP缺陷的HCC细胞(SK-HEP-1、Bel-7402)和约半数的血清AFP阴性的HCC组织中(17/32),而痕量表达于AFP阳性HCC样本中(26/29),且在组织中TGM2表达水平与血清AFP水平呈负相关. TGM2存在于AFP阴性HCC细胞的培养上清中,通过siRNA沉默AFP阳性HCC细胞中的AFP基因可诱导TGM2的产生. ELISA检测结果显示, HCC血清中的TGM2水平明显高于正常血清. TGM2可能是AFP阴性HCC的一种新型组织和血清标志物,但有待更多的研究证实.

**3.2 血管内皮生长因子和血小板衍化内皮细胞生长因子** 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血小板衍化内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)是目前发现的作用最强的血管生成刺激因子.在许多实体肿瘤的生长过程中,肿瘤新生血管为肿瘤细胞生长存活提供营养成分和促肿瘤生长细胞因子,为肿瘤细胞侵袭及转移提供“物质基础”,而肿瘤细胞通过释放VEGF和PD-ECGF等细胞因子支持血管内皮生

长,两者相互促进. VEGF和PD-ECGF的表达升高在肝癌患者的早期复发和转移中有重要作用<sup>[24,25]</sup>. Hu等<sup>[26]</sup>采用肿瘤组织芯片(TMA)检测了162例接受手术切除治疗的AFP阴性HCC患者的VEGF和PD-ECGF,阳性率为60%左右,VEGF与PD-ECGF联合诊断AFP阴性HCC的敏感度可达90%以上,但特异度较差,约35%.血清中VEGF和PD-VEGF水平对AFP阴性肝癌是否有诊断价值尚不清楚.

**3.3 肝素结合细胞因子** 肝素结合细胞因子(MDK)是在维甲酸诱导细胞分化的胚胎癌早期细胞中发现的一种胞外分泌蛋白. MDK表达与AFP相似,在胚胎发育过程中呈现高表达,在成人组织中除了肾组织其他组织几乎检测不到.约有1/3的肝癌标本中有MDK表达<sup>[27]</sup>. MDK基因mRNA在92%AFP阴性HCC中呈现高表达,且表达水平与血清AFP含量和肿瘤大小无关<sup>[17]</sup>.因此MDK有望成为诊断AFP阴性HCC的候选标志物之一.

**3.4 Nope蛋白** Nope(Neighbor of Punc E11)是一种跨膜胚胎蛋白,属于免疫球蛋白超家族.他最初在结、直肠癌中发现,与punc和轴突引导受体有高度同源性,在胎儿肌肉、神经细胞及成人海马中有表达.另外,通过cDNA微阵列技术发现Nope还是小鼠胎肝干/祖细胞表面一个新标志物<sup>[28]</sup>. Marquardt等<sup>[29]</sup>通过定量RT-PCR、免疫印迹和免疫组织化学分析发现, Nope在10株小鼠和人肝癌细胞中有8株表达,在小鼠HCC模型中均有表达,而正常肝组织和肝癌前阶段均无表达;在人肝癌组织中, Nope的表明显高于相应的正常肝组织和肝硬化组织,且与AFP的表达无关,其对AFP阴性HCC的诊断价值值得进一步探讨.

**3.5  $\beta$ -连接蛋白**  $\beta$ -连接蛋白( $\beta$ -catenin)是一种分子量约为88 kDa的胞内糖蛋白,具有双重功能,一是与钙黏蛋白结合形成复合体参与细胞间连接,二是游离的 $\beta$ -catenin作为Wnt信号途径的重要环节,在胚胎发育和肿瘤发生中起重要作用.正常细胞内游离 $\beta$ -catenin含量甚微,常与上皮钙黏附素形成复合体表达于细胞膜下参与细胞间连接.当发生癌变时, $\beta$ -catenin的某些位点突变,胞内游离 $\beta$ -catenin不能被酶解而堆积并经核孔进入到细胞核中,与Lef/Tcf结合而启动与细胞增殖有关的基因转录,参与肿瘤的增殖;同时,其在细胞膜上的表达减弱或消失,使细胞黏附连接功能减弱或丧失,肿瘤细胞的侵袭力和远处

转移的能力因而大大增强. Görög等<sup>[30]</sup>采用免疫组化法对37例AFP阳性和阴性HCC样品进行分析,发现AFP阳性HCC中 $\beta$ -catenin核染色全为阴性,而16例AFP阴性HCC中有7例 $\beta$ -catenin核染色阳性;还有研究表明 $\beta$ -catenin的表达与AFP表达水平无关<sup>[31]</sup>.因此, $\beta$ -catenin可能是诊断AFP阴性HCC的一个候选指标.

**3.6 衰老标记蛋白30** 衰老标记蛋白30(SMP30)是一种钙结合蛋白质,分子量为33.4 kDa,其基因位于X染色体,由7个外显子和6个内含子组成,全长约17.5 kb. SMP30在细胞内作为钙信号转导蛋白,参与酶活性的调节,在抑制细胞增殖及调节脂类代谢等肝脏功能中发挥重要作用. Zhou等<sup>[32]</sup>发现在AFP阴性HCC患者血清中SMP30抗体阳性率(43.6%)高于AFP阳性HCC患者(26.2%),且与患者年龄、肿瘤大小、是否转移及乙肝病毒感染无关.由此可见,SMP30可能是AFP阴性HCC诊断的一种潜在标志物.

**3.7 核糖体磷蛋白P0(rpP0)** 核糖体磷蛋白P0(rpP0)是核糖体中核糖体磷蛋白家族中的一员,具有与核糖体中的rRNA结合、连接P1/P2蛋白相互作用和参与肽链延伸等生理功能, rpP0在94.7%(36/38)的结肠癌组织的表达强于癌旁正常组织. Lü等<sup>[33]</sup>研究发现rpP0蛋白在HCC肿瘤组织中过度表达,且AFP阴性HCC的表达率(90.0%)明显高于AFP阳性HCC(68.2%).由此可见, rpP0蛋白在诊断AFP阴性肝癌方面可能具有潜在应用价值.

**3.8 丝氨酸蛋白酶抑制剂1(SERPINI1)**,也称中枢性丝氨酸蛋白酶抑制剂,是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的一员. SERPINI1由神经元细胞分泌并具有抗心肌缺血的保护作用,可防止缺血性脑损伤<sup>[34]</sup>.有研究显示SERPINI1基因在大部分HCC标本中升高,其中在AFP阴性HCC、小肝癌和早期肝癌标本中,通过定量RT-PCR检测的阳性率分别为89%、100%和78%<sup>[17]</sup>.可见, SERPINI1在诊断早期和AFP阴性HCC可能有一定的价值.

**3.9 癌睾丸抗原** 癌睾丸抗原(cancer testis antigen, CTA)基因在正常睾丸组织的生殖细胞和多种癌细胞中特异表达,在其他正常组织中不表达或低水平表达.自1991年鉴定出第1个癌睾丸抗原基因后陆续发现众多的此类基因,因血-睾屏障的存在,血液及其他体液或组织中的CTA基因表达产物可能都与肿瘤有关,故CTA成为研究肿瘤诊断的重要靶标之一<sup>[35]</sup>. Wu等<sup>[36]</sup>采用RT-PCR检

测了2种CTA(SSX2和SSX5)的mRNA在肝癌组织中的表达,发现他们均有高表达率,但癌旁组织均不表达,且他们的表达与血清AFP水平及年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期均无明显的相关性,因此,CTA可能对AFP阴性HCC有潜在的诊断价值.

**3.10 父系表达基因10** 父系表达基因10(paternally expressed gene 10, PEG10)是2001年发现的一种新型HCC相关印迹基因,位于人类染色体7q21,在HCC组织和肝细胞再生的G<sub>2</sub>/M期中高表达,在良性肝病组织和正常人的外周血中均检测不到<sup>[37]</sup>.通过定量PCR检测发现PEG10基因在HCC组织中过表达,在AFP阴性HCC、小肝癌和早期肝癌(I期)肝癌患者的阳性率分别为67%、71%和78%<sup>[17]</sup>.因此,PEG10基因很可能成为一种早期诊断HCC的新分子标志物,在AFP阴性HCC早期诊断方面具有其价值.

**3.11 QP-C基因** QP-C基因位于人类8号染色体上,是编码线粒体呼吸链中辅酶Q-细胞色素C氧化还原酶的核基因,常高表达于嗅球、齿状回、小脑的颗粒细胞等脑组织. Jia等<sup>[17]</sup>发现QP-C基因在大部分早期和小肝癌中均呈高表达(89%和100%),在2/3的AFP阴性HCC其mRNA阳性表达,而在AFP含量高的HCC组织和进展期肝癌患者体内中表达逐渐下降.由此可见, QP-C基因在诊断早期AFP阴性HCC可能具有潜在应用价值,但需进一步证实.

## 4 呼出气体中的肝癌相关标志物

通过分析人体呼出的挥发性有机化合物,可以对一些疾病做出临床诊断<sup>[38]</sup>,有人尝试应用呼气试验诊断肝癌,发现有一定的临床价值. Xue等<sup>[39]</sup>对肝癌患者血液中的挥发性气体采用固相微萃取后进行气相色谱/质谱分析,在检测到的47种气体中有19种阳性率在肝癌与正常对照中有差异,其中己烷、1-辛烯-3-醇和辛烷对肝癌具有临床诊断价值,他们诊断肝癌的敏感度分别是94.7%、84.2%和84.2%,特异度均为100%.呼气实验对AFP阴性肝癌的诊断也有价值. Qin等<sup>[40]</sup>对HCC患者、肝硬化患者和健康志愿者的呼出气体进行分析,发现3-羟基-2-丁酮、苯乙烯、癸烷对HCC具有诊断价值,以三者建立判别方程诊断HCC的敏感度达到86.7%,特异度达到91.7%;这些呼出性气体的浓度与AFP表达水平不相关,16例AFP阴性HCC患者有14例阳性.由于呼气实验具有快速、简单、安全无创等优点,

## ■创新盘点

本文较全面地综述了对AFP阴性肝细胞癌具有诊断或潜在诊断价值的生物标志物,包括经典肝癌标志物和几种新肝癌标志物对AFP阴性肝癌的诊断价值,还介绍了新发现的可能对AFP阴性肝癌具有潜在诊断价值的生物标志物,对较为特别的呼出气中肝癌相关的标志物也有介绍.

### ■应用要点

已应用于临床的经典肝癌标志物的相关研究结果,可以直接应用于临床实践,辅助诊断AFP阴性肝癌;具有良好应用前景的肝癌新标志物,可以进一步进行较大样本的临床研究,评估他们对AFP阴性肝癌的诊断价值;对于新发现的AFP阴性肝癌相关的标志物,可密切关注其研究进展,必要时开展临床评价性研究。

用于肝癌的筛选和复查可能具有独特的优势。

## 5 结论

当血清AFP水平明显升高时,结合影像学检查,HCC的临床诊断已变得很简单,因此AFP阴性HCC成为目前肝癌诊断中的焦点问题。近年来在AFP阴性HCC诊断标志物的筛查方面进行了大量研究,虽然有不少发现,但真正具有临床应用价值者很少,多数只是显示有一定潜在应用价值,还需要大量的临床研究进行评估和甄别。采用蛋白组学等生物学新技术,有望为AFP阴性HCC找到一些新的、具有良好应用前景的诊断标志物<sup>[41,42]</sup>。应用微流体芯片技术,可使AFP-L3的检测更为准确而简便<sup>[43]</sup>。因此,通过新技术不断发现AFP阴性HCC相关的标志物,并对有潜在应用价值者进行多中心、大样本的临床评估,有望最终有效解决AFP阴性HCC的临床实验诊断问题。

## 6 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3: 353-367
- Gao J, Xu AF, Zheng HY, Chen G, Wang MC, Lou GQ. [Clinical application studies on AFP-L3 detected by micro-spin column method]. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2010; 24: 461-463
- Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2011; 46: 536-544
- Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kaneoka Y, Maeda A, Kanke F, Satomura S. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <math>\leq 20\text{ ng/mL}</math>. *Cancer Sci* 2011; 102: 1025-1031
- Bertino G, Ardiri AM, Calvagno GS, Bertino N, Boemi PM. Prognostic and diagnostic value of des- $\gamma$ -carboxy prothrombin in liver cancer. *Drug News Perspect* 2010; 23: 498-508
- Yoon YJ, Han KH, Kim do Y. Role of serum prothrombin induced by vitamin K absence or antagonist-II in the early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 861-866
- Sheen IS, Jeng KS, Tsai YC. Is the expression of gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA an indicator of biological behavior in recurrent hepatocellular carcinoma? *World J Gastroenterol* 2003; 9: 468-473
- Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, Li Y, Chen X. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAII) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003; 88: 1878-1882
- Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 418-424
- Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012
- Tian L, Wang Y, Xu D, Gui J, Jia X, Tong H, Wen X, Dong Z, Tian Y. Serological AFP/ golgi protein 73 could be a new diagnostic parameter of hepatic diseases. *Int J Cancer* 2010; Dec 7. [Epub ahead of print]
- Liu X, Wan X, Li Z, Lin C, Zhan Y, Lu X. Golgi protein 73(GP73), a useful serum marker in liver diseases. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 1311-1316
- Liu H, Li P, Zhai Y, Qu CF, Zhang LJ, Tan YF, Li N, Ding HG. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4410-4415
- Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisedopas N, Pothacharoen P, Kongtawelert P. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 129-137
- Zhang Q, Xiao Q, Lin Z, Ying X, Li Z, Lin JM. Development of a competitive radioimmunoassay for glypican-3 and the clinical application in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem* 2010; 43: 1003-1008
- Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1133-1139
- Ding GH, Wang HY, Chen H, Wu MC, Man XB, Cong WM, Yang JH, Cheng SQ, Li N, Shen L. Expression of the Glypican-3 Gene in alphafetoprotein-negative Human hepatocellular carcinoma. *Chin-Germ J Clin Oncol* 2005; 4: 262-266
- Ang IL, Poon TC, Lai PB, Chan AT, Ngai SM, Hui AY, Johnson PJ, Sung JJ. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res* 2006; 5: 2691-2700
- Shu H, Kang X, Guo K, Li S, Li M, Sun L, Gan L, Liu Y, Qin X. Diagnostic value of serum haptoglobin protein as hepatocellular carcinoma candidate marker complementary to  $\alpha$  fetoprotein. *Oncol Rep* 2010; 24: 1271-1276
- El-Din Bessa SS, Elwan NM, Suliman GA, El-Shourbagy SH. Clinical significance of plasma osteopontin level in Egyptian patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Arch Med Res* 2010; 41: 541-547
- Shang S, Plymoth A, Ge S, Feng Z, Rosen HR, Sangrajang S, Hainaut P, Marrero JA, Beretta L. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 2011 Sep 27. [Epub ahead of print]
- Sun Y, Mi W, Cai J, Ying W, Liu F, Lu H, Qiao Y, Jia W, Bi X, Lu N, Liu S, Qian X, Zhao X. Quantitative proteomic signature of liver cancer cells: tissue

- transglutaminase 2 could be a novel protein candidate of human hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2008; 7: 3847-3859
- 24 Cui J, Dong BW, Liang P, Yu XL, Yu DJ. Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1533-1536
- 25 Zhou J, Tang ZY, Fan J, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(1): 57-61
- 26 Hu J, Xu Y, Shen ZZ, Wang Z, Lu Q, Yang GH, Ding ZB, Fan J, Zhou J. High expressions of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor predict poor prognosis in alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1359-1367
- 27 Kato M, Shinozawa T, Kato S, Awaya A, Terada T. Increased midkine expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 848-852
- 28 Nierhoff D, Levoci L, Schulte S, Goeser T, Rogler LE, Shafritz DA. New cell surface markers for murine fetal hepatic stem cells identified through high density complementary DNA microarrays. *Hepatology* 2007; 46: 535-547
- 29 Marquardt JU, Quasdorff M, Varnholt H, Curth HM, Mesghenna S, Protzer U, Goeser T, Nierhoff D. Neighbor of Punc E11, a novel oncofetal marker for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 2353-2363
- 30 Görög D, Regöly-Mérei J, Paku S, Kopper L, Nagy P. Alpha-fetoprotein expression is a potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5015-5018
- 31 Guo C, Liu QG, Yang W, Zhang ZL, Yao YM. Relation among p130Cas, E-cadherin and beta-catenin expression, clinicopathologic significance and prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 490-496
- 32 Zhou SF, Mo FR, Bin YH, Hou GQ, Xie XX, Luo GR. Serum immunoreactivity of SMP30 and its tissues expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem* 2011; 44: 331-336
- 33 Lü ZL, Luo DZ, Wen JM. Expression and significance of tumor-related genes in HCC. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3850-3854
- 34 Miranda E, MacLeod I, Davies MJ, Pérez J, Römisch K, Crowther DC, Lomas DA. The intracellular accumulation of polymeric neuroserpin explains the severity of the dementia FENIB. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1527-1539
- 35 Smith HA, McNeel DG. The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumor therapy. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 150591
- 36 Wu LQ, Lu Y, Wang XF, Lv ZH, Zhang B, Yang JY. Expression of cancer-testis antigen (CTA) in tumor tissues and peripheral blood of Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 2006; 79: 744-748
- 37 Tsou AP, Chuang YC, Su JY, Yang CW, Liao YL, Liu WK, Chiu JH, Chou CK. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci* 2003; 10: 625-635
- 38 Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 553-566
- 39 Xue R, Dong L, Zhang S, Deng C, Liu T, Wang J, Shen X. Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 1181-1186
- 40 Qin T, Liu H, Song Q, Song G, Wang HZ, Pan YY, Xiong FX, Gu KS, Sun GP, Chen ZD. The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 2247-2253
- 41 叶韵斌, 陈慧菁, 周东, 郝明志, 刘枋, 余家密, 李星, 林海澜, 陈强. 蛋白芯片技术对甲胎蛋白阴性肝癌诊断的意义. *肿瘤研究与临床* 2009; 21: 17-19
- 42 Wu C, Wang Z, Liu L, Zhao P, Wang W, Yao D, Shi B, Lu J, Liao P, Yang Y, Zhu L. Surface enhanced laser desorption/ionization profiling: New diagnostic method of HBV-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 55-62
- 43 Sato S, Toyota J, Kagebayashi C, Kurosawa T, Watanabe M, Satomura S. [Evaluation of a new, microfluidic chip-based immunoassay for measurement of AFP-L3]. *Rinsho Byori* 2010; 58: 1155-1161

#### ■同行评价

本文可读性好, 对AFP阴性肝癌的临床实践和研究工作有一定指导价值。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

# microRNA与大肠癌关系的研究进展

王炎, 宋贯霞, 李琦

## ■背景资料

大肠癌的发病是一个多因素、多步骤的演进过程, 基因表达异常在其中起重要作用. 近年来研究证实miRNA广泛存在于真核生物体内, 与大肠癌相关基因表达调控密切相关.

王炎, 李琦, 上海中医药大学附属普陀医院 中西医结合肿瘤介入研究所 上海市 200062

宋贯霞, 上海中医药大学附属普陀医院超声科 上海市 200062

国家自然科学基金资助项目, No. 81072955

上海市自然科学基金资助项目, No. 09ZR1428500

上海市教委创新行动重点基金资助项目, No. 12ZZ118

上海市重点学科基金资助项目, No. S30302

作者贡献分布: 本文综述由王炎与宋贯霞完成; 审校由李琦完成.

通讯作者: 李琦, 主任医师, 200062, 上海市普陀区兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科. lzwf@hotmail.com

电话: 021-62572723-4307 传真: 021-62161216

收稿日期: 2011-09-15 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Advances in understanding the relationship between microRNAs and colorectal cancer

Yan Wang, Guan-Xia Song, Qi Li

Yan Wang, Qi Li, Department of Oncology, the Affiliated Putuo Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Guan-Xia Song, Department of Ultrasonography, the Affiliated Putuo Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072955; Shanghai Committee of Science and Technology, No. 09ZR1428500; the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission, No. 12ZZ118; Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. S30302

Correspondence to: Qi Li, Chief Physician, Department of Oncology, the Affiliated Putuo Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Shanghai 200062, China. lzwf@hotmail.com

Received: 2011-09-15 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

The development of colorectal cancer is a multifactorial, multi-step process in which abnormal gene expression may play an important role. In recent years, it has been reported that microRNAs (miRNAs), which widely exist in eukaryotes, are closely related to gene expression regulation in colorectal cancer. These findings have greatly expanded our understanding of the pathogenesis of colorectal cancer and provide new ideas and methods for the diagnosis and treatment of this malignancy.

Key Words: Colorectal cancer; MicroRNAs; Mechanism; Expression

nism; Expression

Wang Y, Song GX, Li Q. Advances in understanding the relationship between microRNAs and colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3426-3431

## 摘要

大肠癌的发病是一个多因素、多步骤的演进过程, 基因表达异常在其中起重要作用. 近年来研究证实miRNA(miRNA, 微小核糖核酸)广泛存在于真核生物体内, 与大肠癌相关基因表达调控密切相关. 这些发现极大地扩展了大肠癌的发病机制, 为大肠癌的诊断和分子靶向治疗提供了新的思路 and 手段.

关键词: 大肠癌; microRNAs; 机制; 表达

王炎, 宋贯霞, 李琦. microRNA与大肠癌关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(33): 3426-3431

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3426.asp>

## 0 引言

miRNA是一类广泛存在于多种生物体内的长度约18-25个核苷酸的非编码小分子RNA, 具有调节基因表达的功能, 参与细胞增殖、分化、凋亡等多种重要细胞活动的调控. miRNA基因以多种形式存在于基因组中, 近来研究发现miRNA具有癌基因或抑癌基因样作用, 多种miRNA在大肠癌组织及大肠癌细胞系中异常表达, 本文就近年来有关miRNA与大肠癌关系作一综述.

## 1 miRNA的生物学特点

1.1 miRNA发现与命名 miRNA是一类由内源基因编码的长度约为18-25个核苷酸的非编码单链RNA分子, 由具有发夹结构的约70-90个碱基大小的单链RNA前体经过Dicer酶加工后生成. 成熟miRNA的5'端带有磷酸基团(-HPO<sub>4</sub>), 3'端带有羟基(-OH), 其本身不具有开放阅读框(ORF), 不编码任何蛋白质, 而是在蛋白质合成中调节其他基因. miRNA的研究始于1993年, Lee等<sup>[1]</sup>在秀丽新小杆线虫中发现了第1个miRNA, 并命名为

## ■同行评议者

杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院 消化内科

lin-4. 2000年Pasquinelli等<sup>[2,3]</sup>又在对线虫发育调控研究中发现了let-7, 从而揭开了miRNA的研究序幕. 随后多个研究小组在包括人类<sup>[4-6]</sup>、果蝇<sup>[7-9]</sup>、植物<sup>[10-12]</sup>等多种生物物种中鉴别出数百个miRNA, 至2007年5月提交并已证实的在动植物和病毒中有4 584个miRNA.

miRNA具有高度保守性、时序表达特异性和组织表达特异性, 广泛地存在于多种真核生物中, 从低等生物到人类都有其存在的痕迹<sup>[13,15]</sup>. miRNA简称为miR, 其命名根据被克隆的先后顺序加上阿拉伯数字组成, 如miR-21; 若高度同源的miRNA则在数字后面加上英文小写字母(a、b、c), 如miR-199a和miR-199b; 由不同染色体上的DNA序列转录加工而成的具有相同成熟序列的miRNA, 则在后面加上阿拉伯数字加以区别, 如miR-199a-1和miR-199a-2; 如果1个前体的2个臂分别加工产生miRNA, 则根据克隆实验, 在表达水平较低的miRNA后面加“\*”, 如miR-199a和miR-199a\*, 也可以将物种缩写置于miRNA之前, 如has-miR-195; 在确定命名规则之前发现的miRNA则保留原来的名字, 如let-7, lin-4.

**1.2 miRNA合成及作用机制** miRNA的合成是十分复杂的生理过程: 首先, 细胞核内的miRNA基因转录成pri-microRNA(pri-miRNA), 由细胞核内的酶Drosha RNase将其剪切成miRNA前体(pre-miRNA), 核内的转运蛋白将pre-miRNA转运到细胞质中. 然后细胞质中的另一种酶Dicer把miRNA前体剪切成双链miRNA. 成熟的miRNA与其互补链结合成双螺旋结构, 然后双螺旋打开, 其中1条会与RNA诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)形成非对称的RISC复合物(asymmetric RISC assembly), 该非对称RISC复合物能够与目标靶mRNA相结合.

目前普遍认为miRNA主要通过2种机制介导转录后基因调节: 一种是mRNA的降解, 而另一种是翻译抑制. 关于miRNA与靶基因的作用方式有3种: (1)当miRNA与靶基因的mRNA序列互补配程度高时, 通过RISC切割酶Argonaute(Ago-2)作用引起靶基因在互补区的特异性断裂, 从而导致基因沉默; (2)当miRNA与靶mRNA序列配程度低时, 抑制其翻译过程, 从而调控靶基因的表达. 以线虫lin-4为代表, 这种miRNA是目前发现最多的种类, 但其具体机制还不清楚; (3)同时具有以上2种作用方式, 代表为let-7.

## 2 大肠癌中差异表达miRNA

**2.1 大肠癌中高表达miRNA** miRNA是一类新发现的具有调节基因功能的小分子RNA, 癌组织与正常组织相比, 高表达的定义为原癌基因性miRNA. 目前已经发现多种miRNA在大肠癌组织中呈高表达, 如let-7b、miR-9、miR-17-3p、miR-21、miR-29b-2、miR-31、miR-132、miR-141、miR-142-3p、miR-182、miR-194、miR-194等<sup>[16-23]</sup>. miR-21是目前唯一的在几乎所有肿瘤中表达上调的miRNA, 其参与了肿瘤细胞的增殖、迁移、浸润以及肿瘤的血管生成等多个环节. Schetter等<sup>[24]</sup>通过检测197例结肠癌组织中miRNA的表达, 发现37种miRNA的表达存在差异, 其中miR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b及miR-203的表达升高, 而又以miR-21的升高最显著, 且其在结肠癌中的高表达与较差的分化、较差的化疗疗效及较低的生存率相关. Yamamichi等<sup>[25]</sup>采用原位杂交技术分析miR-21在结直肠癌发展的不同期别中的表达, 结果发现miR-21的表达从癌前病变到晚期癌逐渐增加. PDCD4是与结直肠癌发生、发展密切相关的miR-21靶基因之一, Chang等<sup>[26]</sup>提出, miR-21和PDCD4呈负相关, 提示miR-21通过降解mRNA在后转录水平调节PDCD4表达, 进而提示药物调节miR-21/PDCD4轴可能是结直肠癌新的治疗策略.

**2.2 大肠癌中低表达miRNA** 癌组织与正常组织相比, 低表达的定义为抑癌基因性miRNA. 目前已经发现多种miRNA在大肠癌组织中呈低表达, 如let-7a、miR-15b、miR-25、miR-30c、miR-92、miR-125、miR-127、miR-143、miR-145、miR-148、miR-191、miR-299、miR-451、miR-486-3p等<sup>[27-33]</sup>. Akao等<sup>[34]</sup>发现结肠癌细胞中miR-143和miR-145表达极度下调, 提示两者可能发挥抑癌作用. 该研究还显示, 人结肠癌细胞株DLD-1和SW480转染miR-143和miR-145后, 肿瘤细胞生长显著受抑. 且证实ERK5是miR-143的靶基因. Chen等<sup>[35]</sup>发现miR-143通过抑制癌基因KRAS蛋白表达而抑制人结肠癌细胞株LoVo生长. Shi等<sup>[36]</sup>发现miR-145靶向下调胰岛素受体底物-1(IRS-1)蛋白表达, 引起人结肠癌细胞生长停滞. Gregersen等<sup>[37]</sup>证实在结肠癌细胞中, YES和STAT1是miR-145的直接靶分子, miR-145的表达量与癌细胞的分化程度、远处转移或浸润生长密切相关.

### ■ 研发前沿

近年来研究证实miRNA与大肠癌相关基因表达调控密切相关, 这些发现极大地扩展了大肠癌的发病机制, 为大肠癌的诊断和分子靶向治疗提供了新的思路 and 手段.

### ■创新盘点

本文对多种miRNA在大肠癌组织及大肠癌细胞系中异常表达,及miRNA在大肠癌中的作用机制作一综述,为进一步阐明大肠癌发生、发展,包括肿瘤的药物治疗和分子靶向疗法提供新的着眼点。

## 3 miRNA在大肠癌发生中的作用

**3.1 miRNA参与大肠癌细胞增殖** Monzo等<sup>[38]</sup>发现, miR-17-5p及其靶分子E2F转录因子1(E2F transcription factor 1, E2F1)在人类结肠的早期胚胎发育和肿瘤的发生中存在着相似的表达模式,且肿瘤的恶性程度越高,其表达模式越接近胚胎中的表达,提示胚胎发育期结肠组织中miR-17-5p的高表达可通过下调E2F1的表达促进细胞的增殖;而结肠癌发生过程中miR-17-5p的表达重新被激活,并导致了细胞的恶性增殖。Akao等<sup>[39]</sup>用RT-PCR技术在结肠癌组织及细胞系DLD-1、SW480、COLO-201中均检测到miR-143、miR-145表达水平下降。进一步研究发现在增殖期的细胞中miR-143表达下降,而在凋亡的细胞中表达升高。将miR-143、miR-145的前体分别转染至细胞系DLD-1、SW480中,可检测miR-143、miR-145表达水平升高,还可观察到剂量依赖性细胞生长抑制作用,提示miR-143、miR-145有抑制癌细胞生长增殖作用。Tazawa等<sup>[40]</sup>对25例结肠癌组织进行检测,其中9例(36%)miR-34a表达较周围正常组织明显下降。把miR-34a导入大肠癌细胞系HCT116和PKO中,观察到细胞增殖受到完全抑制,并呈现出衰老样表现型。应用免疫印迹和基因表达微阵列技术进一步研究发现,miR-34a通过对E2F信号通路的负性调节以及p53信号通路的正性调节,发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用,miR-34a表达失调导致细胞增殖失控,与大肠癌的发生密切相关。

**3.2 miRNA参与大肠癌血管新生** 血管新生涉及一系列基因的激活、表达及其调控作用。近年来,随着人们对miRNA研究的兴起,人们发现miRNA在血管新生的调控中起着至关重要的作用。miR-27a是一种具有癌基因作用样的miRNA,目前发现的其下游靶基因主要有抑制素、ZBTB10 mRNA、Myt-1以及Wee-1等<sup>[41-45]</sup>。有些实验也证实ZBTB10 mRNA是miR-27a的靶目标。ZBTB10被认为是一种锌指蛋白,可以抑制特殊蛋白(specificity protein, Sp)转录因子和Sp依赖的基因的表达<sup>[46]</sup>,而Sp转录因子Sp1、Sp3和Sp4在结肠癌肿瘤细胞中高度表达,Sp可以调节VEGF、VEGFR1、VEGFR2等血管源性基因的表达以及抗凋亡基因存活素的表达<sup>[47]</sup>。Myt-1和Wee-1也是miR-27a的靶目标,他们可以抑制Cdc2的活性。通过下调miR-27a的水平,ZBTB10和Myt-1的表达增强,从而在G<sub>2</sub>/M检查点处抑制结肠肿瘤细胞的生长<sup>[45]</sup>。

**3.3 miRNA参与调控大肠癌细胞周期** 近来认为miRNAs控制超过30%的编码蛋白基因的表达<sup>[48]</sup>,许多miRNA的靶基因调节细胞周期<sup>[49-52]</sup>。Wang<sup>[53]</sup>等通过无偏的微点阵生物信息学方法分析敲除miR-21的结肠肿瘤细胞,认为细胞周期调节因子Cdc25A可能也是miR-21的靶目标。他们发现血清缺乏和DNA损伤会诱导miR-21的产生,而miR-21通过识别Cdc25A的3'-非翻译区域(3'-UTR)抑制Cdc25A的表达,进而负向调控细胞G<sub>1</sub>-S的转换,同时参与构成DNA损伤诱导的G<sub>2</sub>-M检查点。因此认为miR-21在机体应激后通过调节Cdc25A参与细胞周期的调节,从而成为潜在的癌基因。

**3.4 miRNA参与大肠癌侵袭转移** 大肠癌的复发转移涉及miRNA的调节作用,他们作为生物标志可准确地诊断大肠癌,并且能辅助预测大肠癌的复发转移。目前许多研究揭示miR-21在大肠癌中高表达,并参与肿瘤浸润转移<sup>[54-63]</sup>。报道指出,侵袭和迁移的肿瘤细胞miRNA的表达量整体降低,PTEN抑制细胞侵袭,阻止细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMP)的表达,而miR-21通过与靶PTEN基因的结合促进了细胞侵袭和迁移<sup>[64]</sup>。最近报道了另一条转移途径:在结肠癌中,miR-21通过下调Pdc4的表达而促进癌细胞内渗、侵袭和转移,抑制miR-21和miR-17-92的活性与降低肿瘤的生长、侵袭、转移相关<sup>[65]</sup>。miRNA在缓解和防止肿瘤复发中有着潜在的重要作用,他们可能成为肿瘤基因治疗的重要靶点。Zhang等<sup>[66]</sup>通过分析LoVo, SW480, HT29和Caco-2 4种大肠癌细胞株发现,11个miRNAs(hsa-let-7i、hsa-let-7g、hsa-miR-30a、hsa-let-7a、hsa-let-7e、hsa-miR-7、hsa-miR-584、hsa-miR-98、hsa-miR-149、hsa-miR-429、hsa-miR-10a)与大肠癌复发转移密切相关,其中hsa-let-7i在大肠癌复发转移中表达量最高。

## 4 结论

目前研究已证实miRNA在大肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭或肿瘤血管形成等过程中都发挥着重要的作用。国内外已有很多大肠癌中miRNA表达谱的研究<sup>[67]</sup>,有关miRNA与大肠癌关系的研究也在不断深入,但迄今为止许多与大肠癌相关的miRNA仍不为人知,有关其表达调节的研究也不全面,且对miRNA参与大肠癌的作用机制尚未完全明确。相信随着今后对有关研究的

深入和技术的不断进步, 可为进一步阐明大肠癌发生、发展, 包括肿瘤的药物治疗和分子靶向疗法提供新的着眼点。

## 5 参考文献

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerly J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-89
- Lionetti V, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Valente S, Frascari I, Olivi E, Aquaro GD, Bonavita F, Scarlata I, Maioli M, Vaccari V, Tassinari R, Bartoli A, Recchia FA, Pasquinelli G, Ventura C. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and repair without stem cell transplantation. *J Biol Chem* 2010; 285: 9949-9961
- Wan Y, Kertesz M, Spitale RC, Segal E, Chang HY. Understanding the transcriptome through RNA structure. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 641-655
- Kass DJ, Kaminski N. Evolving genomic approaches to idiopathic pulmonary fibrosis: moving beyond genes. *Clin Transl Sci* 2011; 4: 372-379
- Wittmann J, Jäck HM, Mashreghi MF. [MicroRNAs in B-cells and T-cells as regulators of inflammation]. *Z Rheumatol* 2011; 70: 507-510
- Tsutsumi A, Kawamata T, Izumi N, Seitz H, Tomari Y. Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18: 1153-1158
- Yoon WH, Meinhardt H, Montell DJ. miRNA-mediated feedback inhibition of JAK/STAT morphogen signalling establishes a cell fate threshold. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 1062-1069
- Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 2011; 475: 201-205
- Wang H, Zhang X, Liu J, Kiba T, Woo J, Ojo T, Hafner M, Tuschl T, Chua NH, Wang XJ. Deep sequencing of small RNAs specifically associated with *Arabidopsis* AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *Plant J* 2011; 67: 292-304
- Chen D, Pan X, Xiao P, Farwell MA, Zhang B. Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmacogenomics, toxicogenomics, and small RNA expression analysis. *J Cell Physiol* 2011; 226: 2469-2477
- de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, Geneviève D, Goldenberg A, Oufadem M, Manouvrier S, Munnich A, Vidigal JA, Vekemans M, Lyonnet S, Henrion-Caude A, Ventura A, Amiel J. Germline deletion of the miR-17-92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nat Genet* 2011; 43: 1026-1030
- Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 13450-13455
- Obernosterer G, Martinez J, Alenius M. Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc* 2007; 2: 1508-1514
- Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Chan WC, Lin WC. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; 129: 2600-2610
- Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, Ling S, Jiang L, Tian Y, Lin TY. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1674-1680
- Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 2264-2271
- Tanaka T, Arai M, Wu S, Kanda T, Miyauchi H, Imazeki F, Matsubara H, Yokosuka O. Epigenetic silencing of microRNA-373 plays an important role in regulating cell proliferation in colon cancer. *Oncol Rep* 2011; 26: 1329-1335
- Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M, Grünweller A, Hartmann RK, Aigner A. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Res* 2011; 71: 5214-5224
- Tang JT, Wang JL, Du W, Hong J, Zhao SL, Wang YC, Xiong H, Chen HM, Fang JY. MicroRNA 345, a methylation-sensitive microRNA is involved in cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1207-1215
- Zhu H, Dougherty U, Robinson V, Mustafi R, Pekow J, Kupfer S, Li YC, Hart J, Goss K, Fichera A, Joseph L, Bissonnette M. EGFR signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in Western diet-promoted murine colon cancer: role of G1 regulators. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 960-975
- Lan F, Yue X, Han L, Shi Z, Yang Y, Pu P, Yao Z, Kang C. Genome-wide identification of TCF7L2/TCF4 target miRNAs reveals a role for miR-21 in Wnt-driven epithelial cancer. *Int J Oncol* 2012; 40: 519-526
- King CE, Wang L, Winograd R, Madison BB, Mongroo PS, Johnstone CN, Rustgi AK. LIN28B fosters colon cancer migration, invasion and transformation through let-7-dependent and -independent mechanisms. *Oncogene* 2011; 30: 4185-4193
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
- Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shiogama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4009-4016
- Chang KH, Miller N, Kheirleisid EA, Ingoldsby H, Hennessy E, Curran CE, Curran S, Smith MJ, Regan M, McAnena OJ, Kerin MJ. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer. *Eur J Surg*

## ■同行评价

该论文阐述了近年来有关miRNA的定义、作用机制及与大肠癌的关系, 有助于人们对miRNA的理解, 并继续研究其与肿瘤的关系, 有一定研究价值。

- Oncol* 2011; 37: 597-603
- 27 Song Y, Xu Y, Wang Z, Chen Y, Yue Z, Gao P, Xing C, Xu H. MicroRNA-148b suppresses cell growth by targeting cholecystokinin-2 receptor in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2011; Oct 23. [Epub ahead of print]
  - 28 Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, Lopez I, Javier Sola J, Alonso MM, Fortes P, Garcia-Foncillas J. MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 1661-1671
  - 29 Mosakhani N, Sarhadi VK, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundström J, Ristamäki R, Osterlund P, Knuutila S. MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 1-9
  - 30 Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, Vallböhrer D, Bollschweiler E, Brabender J, Mönig SP, Hölscher AH, Dienes HP, Odenthal M. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Oncol* 2011; 39: 409-415
  - 31 Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Sheng H, Lai M. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1702-1710
  - 32 Nishida N, Yokobori T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Kuwano H, Mori M. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2011; 38: 1437-1443
  - 33 Li LN, Zhang HD, Zhi R, Yuan SJ. Down-regulation of some miRNAs by degrading their precursors contributes to anti-cancer effect of mistletoe lectin-I. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 349-364
  - 34 Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep* 2006; 16: 845-850
  - 35 Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28: 1385-1392
  - 36 Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, Linsley P, deAngelis T, Baserga R. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 32582-32590
  - 37 Gregersen LH, Jacobsen AB, Frankel LB, Wen J, Krogh A, Lund AH. MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells. *PLoS One* 2010; 5: e8836
  - 38 Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T, Martinez A, Balagué O, Garcia-Foncillas J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res* 2008; 18: 823-833
  - 39 Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNA-143 and -145 in colon cancer. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 311-320
  - 40 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15472-15477
  - 41 Li X, Luo F, Li Q, Xu M, Feng D, Zhang G, Wu W. Identification of new aberrantly expressed miRNAs in intestinal-type gastric cancer and its clinical significance. *Oncol Rep* 2011; 26: 1431-1439
  - 42 Rodrigues AC, Li X, Radecki L, Pan YZ, Winter JC, Huang M, Yu AM. MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines. *Biopharm Drug Dispos* 2011; 32: 355-367
  - 43 Li X, Mertens-Talcott SU, Zhang S, Kim K, Ball J, Safe S. MicroRNA-27a Indirectly Regulates Estrogen Receptor {alpha} Expression and Hormone Responsiveness in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 2010; 151: 2462-2473
  - 44 Wang Q, Li DC, Li ZF, Liu CX, Xiao YM, Zhang B, Li XD, Zhao J, Chen LP, Xing XM, Tang SF, Lin YC, Lai YD, Yang P, Zeng JL, Xiao Q, Zeng XW, Lin ZN, Zhuang ZX, Zhuang SM, Chen W. Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen. *Oncogene* 2011; 30: 3875-3886
  - 45 Chintharlapalli S, Papineni S, Abdelrahim M, Abudayyeh A, Jutooru I, Chadalapaka G, Wu F, Mertens-Talcott S, Vanderlaag K, Cho SD, Smith R, Safe S. Oncogenic microRNA-27a is a target for anticancer agent methyl 2-cyano-3,11-dioxo-18beta-olean-1,12-dien-30-oate in colon cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 125: 1965-1974
  - 46 Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 11001-11011
  - 47 Safe S, Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2438-2448
  - 48 Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120: 21-24
  - 49 Shi Q, Gibson GE. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem* 2011; 118: 440-448
  - 50 Gibcus JH, Kroesen BJ, Koster R, Halsema N, de Jong D, de Jong S, Poppema S, Kluiver J, Diepstra A, van den Berg A. MiR-17/106b seed family regulates p21 in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 2011; 225: 609-617
  - 51 Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol* 2011; 226: 2535-2542
  - 52 Hummel R, Wang T, Watson DI, Michael MZ, Van der Hoek M, Haier J, Hussey DJ. Chemotherapy-induced modification of microRNA expression in esophageal cancer. *Oncol Rep* 2011; 26: 1011-1017
  - 53 Wang P, Zou F, Zhang X, Li H, Dulak A, Tomko RJ, Lazo JS, Wang Z, Zhang L, Yu J. microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69: 8157-8165
  - 54 Liu HY, Chen J. Polymorphisms in miRNA binding site: new insight into small cell lung cancer susceptibility. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 1191-1192
  - 55 Ru Y, Dancik GM, Theodorescu D. Biomarkers for prognosis and treatment selection in advanced bladder cancer patients. *Curr Opin Urol* 2011; 21: 420-427
  - 56 de Krijger I, Mekenkamp LJ, Punt CJ, Nagtegaal ID. MicroRNAs in colorectal cancer metastasis. *J Pathol*

- 2011; 224: 438-447
- 57 Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, Wang XN, Huang J, Zhao JJ, Mao SS, Zhang GH, Xu XC, Zhang N. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer* 2011; 117: 2842-2852
- 58 Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, Kosuga T, Iitaka D, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105: 104-111
- 59 Hu Y, Correa AM, Hoque A, Guan B, Ye F, Huang J, Swisher SG, Wu TT, Ajani JA, Xu XC. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 132-143
- 60 Sun Q, Gu H, Zeng Y, Xia Y, Wang Y, Jing Y, Yang L, Wang B. Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. *Cancer Sci* 2010; 101: 2241-2247
- 61 Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010; 101: 2087-2092
- 62 Kenney PA, Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Neto BS, Gould JJ, Harty NJ, Mosquera JM, Zeheb R, Loda M, Darling DS, Libertino JA, Summerhayes IC. Novel ZEB1 expression in bladder tumorigenesis. *BJU Int* 2011; 107: 656-663
- 63 Li GC, Ye QH, Xue YH, Sun HJ, Zhou HJ, Ren N, Jia HL, Shi J, Wu JC, Dai C, Dong QZ, Qin LX. Human mesenchymal stem cells inhibit metastasis of a hepatocellular carcinoma model using the MHCC97-H cell line. *Cancer Sci* 2010; 101: 2546-2553
- 64 Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677
- 65 Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008; 27: 4373-4379
- 66 Zhang P, Ma Y, Wang F, Yang J, Liu Z, Peng J, Qin H. Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals the crucial role of hsa-let-7i and its target genes in colorectal cancer metastasis. *Mol Biol Rep* 2011; May 29. [Epub ahead of print]
- 67 Slattery ML, Wolff E, Hoffman MD, Pellatt DF, Milash B, Wolff RK. MicroRNAs and colon and rectal cancer: differential expression by tumor location and subtype. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 196-206

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min) ÷ E%(仪器效率) ÷ 60 = Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能V<sub>max</sub>, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn. var. glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

# 全基因组关联分析在消化系肿瘤中的研究进展

马进, 陈云昭, 李锋

## ■背景资料

近年, 各国科学家运用全基因组关联分析在人类肿瘤, 特别是在消化系肿瘤的研究中取得了一系列重要的研究成果。

马进, 陈云昭, 李锋, 新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室/石河子大学医学院病理教研室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

国际科技合作与交流专项基金资助项目, No. 2010DFB34100  
“十一五”国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2009BA182B03

国家自然科学基金资助项目, No. 81160301

作者贡献分布: 本文综述由马进完成; 陈云昭与李锋审校。

通讯作者: 李锋, 教授, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院病理教研室. lifeng7855@yahoo.com.cn  
电话: 0993-2057125

收稿日期: 2011-09-14 修回日期: 2011-10-20

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Progress in genome-wide association study of digestive tract cancers

Jin Ma, Yun-Zhao Chen, Feng Li

Jin Ma, Yun-Zhao Chen, Feng Li, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease; Department of Pathology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Feng Li, Professor, Department of Pathology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lifeng7855@yahoo.com.cn

Received: 2011-09-14 Revised: 2011-10-20

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

Genome-wide association analysis is a new strategy for discovering genetic characteristics affecting the development of complex diseases, which uses human genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) as markers. Using high-throughput techniques, genome-wide association analysis permits to genotype whole-genome SNPs and to explore their association with complex disease at one time. Over the past 5 years, genome-wide association studies have been proven to be a powerful approach for screening the susceptibility genes for complex disease. In recent years, a series of important achievements have been made in genome-wide association analysis of human cancers, especially digestive tract cancers. In this paper we will review the progress in genome-wide association study of digestive tract cancers.

Key Words: Genome-wide association study; Es-

ophageal cancer; Gastric cancer; Colorectal cancer

Ma J, Chen YZ, Li F. Progress in genome-wide association study of digestive tract cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3432-3440

## 摘要

全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)是应用人类基因组中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)为标记进行分析, 以期发现影响复杂性疾病发生的遗传特征的一种新策略。因其可在全基因组范围内进行整体研究, 能够一次性对疾病与基因的关联进行轮廓性概览, 所以在过去的5年中, 全基因组关联研究方法已被证明是研究复杂疾病一种有效手段。近年, 各国科学家运用全基因组关联分析在人类肿瘤, 特别是在消化系肿瘤的研究中取得了一系列重要的研究成果, 本文将综述消化系肿瘤GWAS研究进展, 并展望GWAS所面临的挑战及可能的解决策略。

关键词: 全基因组关联分析; 食管癌; 胃癌; 结直肠癌

马进, 陈云昭, 李锋. 全基因组关联分析在消化系肿瘤中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(33): 3432-3440  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3432.asp>

## 0 引言

全基因组关联分析(Genome-wide association studies, GWAS)是一种对全基因组范围内的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)进行总体关联分析的方法, 即在全基因组范围内选择遗传变异进行基因分型, 比较病例和对照间每个变异频率的差异, 计算变异与疾病的关联强度, 选出最相关的变异进行验证并最终确认与疾病相关。2007年4月, 《Nature Genetics》上同时发表了2篇关于前列腺癌的GWAS结果<sup>[1,2]</sup>, 这是GWAS在肿瘤研究领域的首次报道。迄今为止, 已经开展了对常见恶性肿瘤的多项GWAS研究, 如前列腺癌<sup>[3-12]</sup>、乳腺癌<sup>[13-20]</sup>和肺癌<sup>[21-25]</sup>等。近年来, 消化系肿瘤的GWAS研究进展迅

## ■同行评议者

徐宁志, 研究员, 中国医学科学院肿瘤医院细胞生物与分子生物学实验室

表 1 全基因组关联发现的有意义的食管癌易感位点和(或)区域

染色体	候选基因	位点	OR值	参考文献
4q21-23	ADH1B	rs1229984	1.79	[26]
12q24	ALDH2	rs671, rs11066015	1.33-1.67	[26,27]
		rs2074356	1.56	[27]
		rs11066280	1.30	[27]
10q23	PLCE1	rs2274223	1.34-1.43	[27-29]
20p13	C20orf54	rs13042395	0.86	[28]
5q11	PDE4D	rs10052657	0.67	[27]
21q22	RUNX1	rs2014300	0.7	[27]
6p21	UNC5CL	rs10484761	1.33	[27]

## ■创新盘点

本文对消化系统肿瘤(胃癌、食管癌及结直肠癌)中GWAS研究进展和GWAS面临的挑战及可能的解决策略做一综述。

速, 并取得了重要的成果, 故本文将对消化系统肿瘤(胃癌、食管癌及结直肠癌)中GWAS研究进展和GWAS面临的挑战及可能的解决策略作一综述。

## 1 消化系统肿瘤的研究进展

1.1 食管癌 2009年, 日本学者<sup>[26]</sup>率先报道了日本人群中的食管癌的GWAS研究结果, 随后又有中国<sup>[27,28]</sup>及美国学者<sup>[29]</sup>陆续发表了中国人群中食管癌的GWAS研究成果。至今, 共报道了7个有意义的食管癌易感性位点, 分别位于ADH1B、ALDH2、C20orf54、PLCE1、RUNX1等基因(表1)。

ADH1B和ALDH2是最早报道的有意义的食管癌易感基因, 分别位于染色体4q21-23和12q24。Cui等<sup>[26]</sup>在日本人群中利用2阶段的GWAS研究, 在总数为1 070例日本食管癌病例和2 836例对照人群中, 经过反复的筛选, 最终发现了2个有意义的易感基因ADH1B(OR = 1.79)和ALDH2(OR = 1.67)。这2个基因均编码的是与酒精和烟草代谢相关蛋白, 而吸烟和饮酒是日本人群中最为主要的与生活习惯相关的食管癌的危险因素。研究者的统计分析表明, 同时具有遗传和生活习惯危险因素的个体, 比二者均无的个体患食管癌的风险高出190倍。2011-06, Wu等<sup>[27]</sup>在中国人群中的GWAS食管癌研究结果也发现这个位于12q24染色体的易感位点(OR = 1.33), 与Cui<sup>[26]</sup>报道的结果一致。

2010年8月, 来自中国<sup>[27,28]</sup>和美国的研究组<sup>[29]</sup>同时报道了中国人群食管癌的GWAS研究结果, 并发现了相同的食管癌易感基因—位于染色体10q23的PLCE1。Wang等<sup>[28]</sup>在中国人群中进行了2阶段GWAS研究(第1阶段: 1 077例食管癌和1 733例对照, 506 666个SNP; 第

2阶段: 7 976例食管癌和11 568例对照, 18个SNP), 结果发现了新的有意义的食管癌易感基因-PLCE1(rs2274223, OR = 1.43)。同年同期的Abnet等<sup>[29]</sup>和随后的Wu等<sup>[27]</sup>的中国人食管癌的GWAS研究, 也都报道和证实了该食管癌易感基因的存在(PLCE1, OR = 1.34)。PLCE1基因编码的是磷脂酶, 他水解磷脂酰肌醇4, 5-二磷脂盐而参与细胞内信号传导。而且, PLCE1可结合Ras家族的小G蛋白, 成为GTP酶类的效应器而调节细胞生长、分化、凋亡、血管发生。

值得关注的是, 在Wang等<sup>[28]</sup>报道中, 还发现了另一个有意义的食管癌易感基因: 位于染色体20p13的C20orf54(rs13042395)。C20orf54作为一个人类核黄素转移蛋白2(hRFT2), 编码一个开放读码框蛋白, 其在核黄素的肠吸收中发挥重要作用。很多文献报道过细胞内稳态中核黄素的作用, 且核黄素缺乏与患食管癌风险性的增加相关, 补充核黄素被证实能够降低患食管癌风险性。因此, hRFT2很可能通过影响核黄素吸收的作用, 而在食管鳞癌发生中发挥重要的作用。

Wu等<sup>[27]</sup>在中国人群食管癌的进行的GWAS研究, 结果发现了位于5个区域的7个食管癌的易感性位点(位于染色体5q11的rs10052657, 21q22的rs2014300, 6p21的rs10484761, 10q23的rs2274223和12q24的rs11066015, rs2074356, rs11066280), 证实了已往的研究结果, 即ALDH2(12q24), PLCE1(10q23)是食管癌的易感基因。此外还有5q11, 6p21和21q22为新发现的有意义的食管癌的易感性区域, 而其涉及的易感基因还有待进一步研究。

1.2 胃癌 胃癌的GWAS研究结果也是日本学者于2008年率先发表, 随后, 中国及美国学者也相继报道了中国人群中的研究结果<sup>[28-31]</sup>(表2)。

### ■应用要点

GWAS开创了研究肿瘤遗传易感基因的方法一个新时代,他是增强人们对肿瘤认识的强而有力的工具,并对肿瘤发生发展机制的研究提供了新思路 and 途径.

表 2 全基因组关联发现的有意义的胃癌易感位点和(或)区域

染色体	候选基因	位点	OR值	参考文献
8q24	PSCA	rs2976392	1.62	[30]
1q22	MUC1	rs4072037	0.72	[29,31]
10q23	PLCE1	rs2274223	1.31-1.55	[28,29,31]
20p13	C20orf54	rs13042395	0.91	[28]

表 3 全基因组关联发现的有意义的结直肠癌易感位点和(或)区域

染色体	候选基因	位点	OR值	参考文献
8q23	EIF3H	rs16892766	1.25	[36]
8q24	-	rs6983267	1.17-1.27	[32-34,36]
10q14	-	rs10795668	1.11	[36]
11q23	-	rs3802842	1.12	[37]
14q22	BMP4	rs4444235	1.11	[37]
15q13	GREM1/SCG5	rs4779584	1.23-1.26	[35,36]
16q22	CDH1	rs9929218	1.10	[38]
18q21	SMAD7	rs4939827	1.16-1.20	[34,36]
19q13	RHPN2	rs10411210	1.15	[38]
20q12	-	rs961253	1.12	[38]

2008年3月, Sakamoto等<sup>[30]</sup>报道了日本人群胃癌的GWAS研究结果: 位于8q24的前列腺干细胞抗原基因(PSCA)内区的rs2976392(OR = 1.62), 该位点与弥漫型胃癌的相关度远远高于其与肠型胃癌的相关度. 他们发现PSCA在分化的胃上皮细胞中有表达, 并在体外实验中证实有抑制细胞分化的活性, 且其常常在胃癌中表达沉默. 同样的危险等位基因在韩国人群的457例病例390例对照中也证实与弥漫型胃癌显著相关<sup>[30]</sup>(OR = 1.90).

Wang等<sup>[28]</sup>报道的中国人人群中胃-贲门腺癌的GWAS研究中发现2个有意义的易感基因: 位于染色体10q23的PLCE1(OR = 1.55), 20p13的C20orf54(OR = 0.91). 同期, Abnet等<sup>[29]</sup>也报道了位于染色体10q23的PLCE1为中国人人群中有意义的胃腺癌易感基因(OR = 1.31). 2011年, Zhang<sup>[31]</sup>采用独立的病例-对照研究, 在中国的人群中验证了这几个位点. 他们选取了1 681例胃癌和1 858例对照, 结果发现位于染色体1q22的MUC1(OR = 0.72)和10q23(OR = 1.42)的PLCE1与胃癌的发生有显著的相关性, 且PLCE1与胃癌相关性在女性(OR = 1.86)和胃腺癌(OR = 1.71)中更显著. 他们联合2个多态性评估了其联合作用, 发现随着危险等位基因数目增加, 胃癌的发生危险度明显增加; 且携带2个危险等位基因

的个体比未携带危险等位基因的个体患胃癌的风险高出3.28倍. 结果显示, 位于染色体1q22和10q23的易感基因可能被作为易感胃癌的候选标记物. 但他们并没有检测到位于染色体20p13的rs13042395与胃癌有显著相关性.

1.3 结直肠癌 2007年, 结直肠癌的GWAS研究即已开始, 至今, 已有来自英国和加拿大的研究组分别在英国和加拿大等人群中报道了10个有意义的结直肠癌的易感位点<sup>[32-38]</sup>(表3).

2007年7月, Tomliuson<sup>[32]</sup>和Zanke<sup>[33]</sup>同时报道了结直肠癌GWAS研究结果, 2个研究组同时发现了相同的结直肠癌易感位点: 位于染色体8q24的rs6983267(OR = 1.27). 此外, Broderick等<sup>[34]</sup>对英国家族性结直肠肿瘤(627例结直肠癌、313例腺瘤和965例对照)的GWAS研究发现, 除8q24外, 最显著有意义的位点是位于SMAD7(染色体18q21.1)第3内含子的rs4939827; 此后, 该课题组对GWAS数据进一步挖掘并经过多个研究的独立验证发现了另一个有意义的易感基因位于染色体15q13.3的GREM1/SCG5(rs4779584)<sup>[35]</sup>除了已经确定的3个易感区域(分别位于染色体8q24、18q21.1和15q13.3), 研究者通过更大样本多次验证, 最终确认了位于染色8q23上EIF3H基因的rs16892766和10q14的rs10795668是结直肠癌的易感位点<sup>[36]</sup>.

随后, Tenesa等<sup>[37]</sup>于2008年在苏格兰人群中进行了3个阶段的GWAS研究(第1阶段: 1 012例结直肠癌和1 012例对照, 555 510个SNP; 第2阶段: 2 057例结直肠癌和2 111例对照, 15 008个SNP; 第3阶段: 14 500例结直肠癌和13 294例对照, 5个SNP), 最终发现3个有意义的位点(rs7014346、rs4939827和rs3802842)仍然显著. 研究结果不仅验证了以往GWAS结果(位于染色体8q24的rs7014346和18q21的rs4939827), 还发现了1处新的易感位点位于染色体11q23.19的rs3802842, 该位点具有明显的人群差异, 其效应在日本人群明显低于欧洲人群.

为发现更多低共显性的易感位点, 上述2个GWAS研究组通过Meta分析的方式共享GWAS数据<sup>[38]</sup>, 研究者共获得13 315例研究对象的38 710个SNP信息, 经过8个研究组27 418例研究对象的验证, 最终发现了4个新的结直肠癌易感区域(分别位于染色体14q22.2、16q22.1、19q13.1和20p12.3), 体现了数据共享在肿瘤GWAS研究中的优势.

尽管染色体8q24、10q14、11q23区域缺乏我们已知的基因, 近期2个报道显示<sup>[39,40]</sup>, 位于染色体8q24的易感区域可能可增强Wnt通路的信号, 而这个通路是我们众所周知的致癌机制之一. 将近半数的结直肠癌的易感位点存在连锁不平衡现象, 或是存在与致癌机制中转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )信号通路的附近<sup>[41,42]</sup>, 结直肠癌的GWAS研究结果报道的与TGF- $\beta$ 通路相关的基因包括: SMAD7、RHPN2、BMP4和GREM1, 而TGF- $\beta$ 表达的增多会导致结直肠癌的进展和复发.

## 2 GWAS面临的挑战及可能的解决策略

虽然GWAS在肿瘤研究中取得了令人鼓舞的成绩, 发现了大量的易感基因/位点, 但目前GWAS发现的一些变异多位于基因组的非编码区, 所以需更深入的研究肿瘤易感基因的功能. 且目前GWAS确定的易感基因/位点仅能解释一部分肿瘤发生, 仍需采取有效的措施扩大GWAS范围, 提高GWAS发现易感位点的能力. 因此, GWAS结果只提示某些基因与肿瘤具有关联性, 为其机制的研究提供启示, 至于基因如何影响肿瘤的发生发展还将是一个更大的挑战. 我们应该在总结过去GWAS经验的基础上发现存在的问题, 并采取合理的措施应对这些挑战, 以进一步优化GWAS和后续研究, 更好地理解和应用

GWAS研究结果.

2.1 深入分析研究结果 通过统计分析遗传因素和肿瘤的关系, 确定与肿瘤关联的功能性位点存在一定难度. 很多研究发现, 通过GWAS发现的许多SNP位点的改变, 并不能影响蛋白质中氨基酸, 这为解释SNP位点与肿瘤发生之间的关系造成了一定的困难. 但由于肿瘤发生是多因素的作用结果, SNP位点可能通过影响RNA的转录或翻译效率等, 在基因表达上产生短暂的或依赖时空的多种影响, 刺激调节基因的转录表达或影响其RNA剪接方式. 所以我们需要更加深入的研究和确定易感基因的功能以及在肿瘤发生发展中的作用, 比如进行精细定位研究寻找相关变异、易感基因的功能和结构以及转录调节方面的相关研究. 因此, 我们在找寻某种肿瘤相关变异时, 应同时注意到编码区和调控区位点变异的重要性, 并进一步深入研究其功能影响<sup>[43-45]</sup>.

2.2 扩大遗传变异研究范围 目前报道的GWAS所采用的基因分型通量大多可同时检测55万个SNP位点(即550K)或低于这个水准, 为发现更多的遗传易感位点/区域, 新一轮的GWAS可能需要进一步提高标签位点的密度(达到100万个SNP)<sup>[46]</sup>. 此外, 基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV)的研究将是GWAS的一个新的研究点. CNV是人类基因组中存在的多种类型的染色体数目和结构变异, 指的是与参考序列相比基因组中 $\geq 1$  kb的DNA片段插入、缺失和/或扩增, 及其互相组合衍生的复杂染色体结构变异<sup>[47]</sup>. 与SNP相似, 部分CNV在不同人群中以不同频率分离并具有显著性差异, 并可能影响基因表达和表型改变, 因此CNV也是可能引起肿瘤发生的一种重要遗传变异<sup>[48]</sup>. 由于肿瘤相关遗传变异可能分布在不同染色体, 单纯以SNP为基础的关联分析可能无法有效地区分受累个体和健康对照, 而CNV可能通过数量作用和质量作用2种机制引起的基因剂量改变导致表型改变, 所以CNV全基因组关联分析可能更容易检测到致病遗传变异<sup>[49]</sup>. 因此在进行GWAS时, 联合使用SNP和CNV这2个具有互补性的遗传标志, 将为深入理解复杂疾病的分子机制和鉴定易感基因, 对研究肿瘤的遗传易感机制具有重要意义.

## 3 结论

GWAS开创了研究肿瘤遗传易感基因的方法一个新时代, 虽然该研究需耗费大量的精力和经

### ■名词解释

全基因组关联分析: 是一种对全基因组范围内的单核苷酸多态性进行总体关联分析的方法, 即在全基因组范围内选择遗传变异进行基因分型, 比较病例和对照间每个变异频率的差异, 计算变异与疾病的关联强度, 选出最相关的变异进行验证并最终确认与疾病相关.

### ■同行评价

“全基因组关联分析技术在消化系统肿瘤中的研究进展”一文对近年来全基因组关联分析在消化系统肿瘤中研究进展作了较好地叙述,可读性好。

费,但值得的是我们会得到一个全面的肿瘤相关基因组变异的组图,他是增强我们对肿瘤认识的强而有力的工具,并为我们对肿瘤发生发展机制的研究提供了新思路 and 途径。

### 4 参考文献

- Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, Rafnar T, Bergthorsson JT, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Jakobsdottir M, Xu J, Blondal T, Kostic J, Sun J, Ghosh S, Stacey SN, Mouy M, Saemundsdottir J, Backman VM, Kristjansson K, Tres A, Partin AW, Albers-Akkers MT, Godino-Ivan Marcos J, Walsh PC, Swinkels DW, Navarrete S, Isaacs SD, Aben KK, Graif T, Cashy J, Ruiz-Echarri M, Wiley KE, Suarez BK, Witjes JA, Frigge M, Ober C, Jonsson E, Einarsson GV, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Isaacs WB, Catalona WJ, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet* 2007; 39: 631-637
- Kiemeny LA. Words of wisdom. Re: genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Eur Urol* 2007; 52: 920-921
- Gudmundsson J, Sulem P, Rafnar T, Bergthorsson JT, Manolescu A, Gudbjartsson D, Agnarsson BA, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Blondal T, Jakobsdottir M, Stacey SN, Kostic J, Kristinsson KT, Birgisdottir B, Ghosh S, Magnusdottir DN, Thorlacius S, Thorleifsson G, Zheng SL, Sun J, Chang BL, Elmore JB, Breyer JP, McReynolds KM, Bradley KM, Yaspan BL, Wiklund F, Stattin P, Lindström S, Adami HO, McDonnell SK, Schaid DJ, Cunningham JM, Wang L, Cerhan JR, St Sauver JL, Isaacs SD, Wiley KE, Partin AW, Walsh PC, Polo S, Ruiz-Echarri M, Navarrete S, Fuertes F, Saez B, Godino J, Weijerman PC, Swinkels DW, Aben KK, Witjes JA, Suarez BK, Helfand BT, Frigge ML, Kristjansson K, Ober C, Jonsson E, Einarsson GV, Xu J, Gronberg H, Smith JR, Thibodeau SN, Isaacs WB, Catalona WJ, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer. *Nat Genet* 2008; 40: 281-283
- Eeles RA, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Giles GG, Guy M, Severi G, Muir K, Hopper JL, Henderson BE, Haiman CA, Schleutker J, Hamdy FC, Neal DE, Donovan JL, Stanford JL, Ostrander EA, Ingles SA, John EM, Thibodeau SN, Schaid D, Park JY, Spurdle A, Clements J, Dickinson JL, Maier C, Vogel W, Dörk T, Rebbeck TR, Cooney KA, Cannon-Albright L, Chappuis PO, Hutter P, Zeegers M, Kaneva R, Zhang HW, Lu YJ, Foulkes WD, English DR, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Morrison J, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Wilkinson RA, Saunders EJ, Page EC, Sawyer EJ, Edwards SM, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Van As N, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Cooper CS, Southey MC, Lophatananon A, Liu JF, Kolonel LN, Le Marchand L, Wahlfors T, Tammela TL, Auvinen A, Lewis SJ, Cox A, FitzGerald LM, Koopmeiners JS, Karyadi DM, Kwon EM, Stern MC, Corral R, Joshi AD, Shahabi A, McDonnell SK, Sellers TA, Pow-Sang J, Chambers S, Aitken J, Gardiner RA, Batra J, Kedda MA, Lose F, Polanowski A, Patterson B, Serth J, Meyer A, Luedeke M, Stefflova K, Ray AM, Lange EM, Farnham J, Khan H, Slavov S, Mitkova A, Cao G, Easton DF. Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat Genet* 2009; 41: 1116-1121
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, Benediktsdottir KR, Magnusdottir DN, Orlygsdottir G, Jakobsdottir M, Stacey SN, Sigurdsson A, Wahlfors T, Tammela T, Breyer JP, McReynolds KM, Bradley KM, Saez B, Godino J, Navarrete S, Fuertes F, Murillo L, Polo E, Aben KK, van Oort IM, Suarez BK, Helfand BT, Kan D, Zanon C, Frigge ML, Kristjansson K, Gulcher JR, Einarsson GV, Jonsson E, Catalona WJ, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Smith JR, Schleutker J, Barkardottir RB, Kong A, Thorsteinsdottir U, Rafnar T, Stefansson K. Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2009; 41: 1122-1126
- Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, Mulholland S, Leongamornlert DA, Edwards SM, Morrison J, Field HI, Southey MC, Severi G, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Muir KR, Smith C, Bagnato M, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Cox A, Lewis S, Brown PM, Jhavar SG, Tymrakiewicz M, Lophatananon A, Bryant SL, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Fisher C, Jamieson C, Cooper CS, English DR, Hopper JL, Neal DE, Easton DF. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 316-321
- Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Yu K, Chatterjee N, Welch R, Hutchinson A, Crenshaw A, Cancel-Tassin G, Staats BJ, Wang Z, Gonzalez-Bosquet J, Fang J, Deng X, Berndt SI, Calle EE, Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Giovannucci E, Willett WC, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Hoover R, Hayes RB, Hunter DJ, Chanock SJ. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 2008; 40: 310-315
- Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Cazier JB, Sainz J, Jakobsdottir M, Kostic J, Magnusdottir DN, Ghosh S, Agnarsson K, Birgisdottir B, Le Roux L, Olafsdottir A, Blondal T, Andresdottir M, Gretarsdottir OS, Bergthorsson JT, Gudbjartsson D, Gylfason A, Thorleifsson G, Manolescu A, Kristjansson K, Geirsson G, Isaksson H, Douglas J, Johansson JE, Bälter K, Wiklund F, Montie JE, Yu X, Suarez BK, Ober C, Cooney KA, Gronberg H, Catalona WJ, Einarsson GV, Barkardottir RB, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet* 2006; 38: 652-658
- Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A, Penney K, Steen RG, Ardlie K, John EM, Oakley-Girvan I, Whittemore AS, Cooney KA, Ingles SA, Altshuler D, Henderson

- BE, Reich D. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14068-14073
- 10 Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Guy M, Morrison J, Severi G, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Jhavar S, Saunders E, Hopper JL, Southey MC, Muir KR, English DR, Dearnaley DP, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Wilkinson RA, Sawyer E, Lophatananon A, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Cooper C, Donovan JL, Hamdy FC, Neal DE, Eeles RA, Easton DF. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2009; 41: 1058-1060
- 11 Yeager M, Chatterjee N, Ciampa J, Jacobs KB, Gonzalez-Bosquet J, Hayes RB, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Berndt S, Yu K, Hutchinson A, Wang Z, Amundadottir L, Feigelson HS, Thun MJ, Diver WR, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Haiman CA, Henderson B, Kolonel L, Le Marchand L, Siddiq A, Riboli E, Key TJ, Kaaks R, Isaacs W, Isaacs S, Wiley KE, Gronberg H, Wiklund F, Stattin P, Xu J, Zheng SL, Sun J, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Tucker M, Gerhard DS, Hoover RN, Fraumeni JF, Hunter DJ, Thomas G, Chanock SJ. Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 2009; 41: 1055-1057
- 12 Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, Rafnar T, Gudbjartsson D, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsson KR, Jakobsdottir M, Blondal T, Stacey SN, Helgason A, Gunnarsdottir S, Olafsdottir A, Kristinsson KT, Birgisdottir B, Ghosh S, Thorlacius S, Magnusdottir D, Stefansdottir G, Kristjansson K, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Morris AD, Kimber CH, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, So WY, Tong PC, Ng MC, Hansen T, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Tres A, Fuertes F, Ruiz-Echarri M, Asin L, Saez B, van Boven E, Klaver S, Swinkels DW, Aben KK, Graif T, Cashy J, Suarez BK, van Vierssen Trip O, Frigge ML, Ober C, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Palmer CN, Rotimi C, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Benediktsson R, Jonsson E, Einarsson GV, Mayordomo JI, Catalona WJ, Kiemeny LA, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39: 977-983
- 13 Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schürmann P, Dörk T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCreddie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder BA. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007; 447: 1087-1093
- 14 Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, Yeager M, Wacholder S, Cox DG, Hankinson SE, Hutchinson A, Wang Z, Yu K, Chatterjee N, Garcia-Closas M, Gonzalez-Bosquet J, Prokunina-Olsson L, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver R, Prentice R, Jackson R, Kooperberg C, Chlebowski R, Lissowska J, Peplonska B, Brinton LA, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Buring J, Lee IM, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Hoover RN, Chanock SJ, Hunter DJ. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet* 2009; 41: 579-584
- 15 Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Rafnar T, Gudmundsson J, Gudjonsson SA, Masson G, Jakobsdottir M, Thorlacius S, Helgason A, Aben KK, Strobbe LJ, Albers-Akkers MT, Swinkels DW, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Millastre E, Andres R, Godino J, Garcia-Prats MD, Polo E, Tres A, Mouy M, Saemundsdottir J, Backman VM, Gudmundsson L, Kristjansson K, Bergthorsson JT, Kostic J, Frigge ML, Geller F, Gudbjartsson D, Sigurdsson H, Jonsdottir T, Hrafnkelsson J, Johannsson J, Sveinsson T, Myrdal G, Grimsson HN, Jonsson T, von Holst S, Werelius B, Margolin S, Lindblom A, Mayordomo JI, Haiman CA, Kiemeny LA, Johannsson OT, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 865-869
- 16 Ahmed S, Thomas G, Ghoussaini M, Healey CS, Humphreys MK, Platte R, Morrison J, Maranian M, Pooley KA, Luben R, Eccles D, Evans DG, Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Peto J, Stratton MR, Rahman N, Jacobs K, Prentice R, Anderson GL, Rajkovic A, Curb JD, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver WR, Bojesen S, Nordestgaard BG, Flyger H, Dörk T, Schürmann P, Hillemanns P, Karstens JH, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Zalutsky IV, Bermisheva M, Fedorova S, Khusnutdinova E, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Devilee P, van Asperen CJ, Tollenaar RA, Seynaeve C, Garcia-Closas M, Lissowska J, Brinton L, Peplonska B, Nevanlinna H, Heikkinen T, Aittomäki K, Blomqvist C, Hopper JL, Southey MC, Smith L, Spurdle AB, Schmidt MK, Broeks A, van Hien RR, Cornelissen S, Milne RL, Ribas G, González-Neira A, Benitez J, Schmutzler RK, Burwinkel B, Bartram CR, Meindl A, Brauch H, Justenhoven C, Hamann U, Chang-Claude J, Hein R, Wang-Gohrke S, Lindblom A, Margolin S, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Olson JE, Wang X, Fredericksen Z, Giles GG, Severi G, Baglietto L, English DR, Hankinson SE, Cox DG,

- Kraft P, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Hoening MJ, van den Ouweland AM, Oldenburg RA, Schutte M, Hall P, Czene K, Liu J, Li Y, Cox A, Elliott G, Brock I, Reed MW, Shen CY, Yu JC, Hsu GC, Chen ST, Anton-Culver H, Ziogas A, Andrulis IL, Knight JA, Beesley J, Goode EL, Couch F, Chenevix-Trench G, Hoover RN, Ponder BA, Hunter DJ, Pharoah PD, Dunning AM, Chanock SJ, Easton DF. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* 2009; 41: 585-590
- 17 Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Thorlacius S, Gudjonsson SA, Jonsson GF, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Gudmundsson J, Aben KK, Strobbe LJ, Swinkels DW, van Engelenburg KC, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Millastre E, Andres R, Saez B, Lambea J, Godino J, Polo E, Tres A, Picelli S, Rantala J, Margolin S, Jonsson T, Sigurdsson H, Jonsdottir T, Hrafnkelsson J, Johannsson J, Sveinsson T, Myrdal G, Grimsson HN, Sveinsdottir SG, Alexiusdottir K, Saemundsdottir J, Sigurdsson A, Kostic J, Gudmundsson L, Kristjansson K, Masson G, Fackenthal JD, Adebamowo C, Ogundiran T, Olopade OI, Haiman CA, Lindblom A, Mayordomo JL, Kiemeny LA, Gulcher JR, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Johannsson OT, Kong A, Stefansson K. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 2008; 40: 703-706
- 18 Gold B, Kirchoff T, Stefanov S, Lautenberger J, Viale A, Garber J, Friedman E, Narod S, Olshen AB, Gregersen P, Kosarin K, Olsh A, Bergeron J, Ellis NA, Klein RJ, Clark AG, Norton L, Dean M, Boyd J, Offit K. Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 4340-4345
- 19 Zheng W, Long J, Gao YT, Li C, Zheng Y, Xiang YB, Wen W, Levy S, Deming SL, Haines JL, Gu K, Fair AM, Cai Q, Lu W, Shu XO. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. *Nat Genet* 2009; 41: 324-328
- 21 Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Qureshi M, Dong Q, Gu X, Chen WV, Spitz MR, Eisen T, Amos CI, Houlston RS. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet* 2008; 40: 1407-1409
- 22 McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Chabrier A, Byrnes G, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, McLaughlin J, Shepherd F, Montpetit A, Narod S, Krokan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Vatten L, Njølstad I, Axelsson T, Chen C, Goodman G, Barnett M, Loomis MM, Lubiński J, Matyjaski J, Lener M, Oszutowska D, Field J, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A, Vineis P, Clavel-Chapelon F, Palli D, Tumino R, Krogh V, Panico S, González CA, Ramón Quirós J, Martínez C, Navarro C, Ardanaz E, Larrañaga N, Kham KT, Key T, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Trichopoulou A, Linseisen J, Boeing H, Hallmans G, Overvad K, Tjønneland A, Kumle M, Riboli E, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M, Brennan P. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 2008; 40: 1404-1406
- 23 Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M, Mirabello L, Jacobs K, Wheeler W, Yeager M, Bergen AW, Li Q, Consonni D, Pesatori AC, Wacholder S, Thun M, Diver R, Oken M, Virtamo J, Albanes D, Wang Z, Burdette L, Doheny KF, Pugh EW, Laurie C, Brennan P, Hung R, Gaborieau V, McKay JD, Lathrop M, McLaughlin J, Wang Y, Tsao MS, Spitz MR, Wang Y, Krokan H, Vatten L, Skorpen F, Arnesen E, Benhamou S, Bouchard C, Metspalu A, Vooder T, Nelis M, Välk K, Field JK, Chen C, Goodman G, Sulem P, Thorleifsson G, Rafnar T, Eisen T, Sauter W, Rosenberger A, Bickeböller H, Risch A, Chang-Claude J, Wichmann HE, Stefansson K, Houlston R, Amos CI, Fraumeni JF, Savage SA, Bertazzi PA, Tucker MA, Chanock S, Caporaso NE. A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 679-691
- 24 Broderick P, Wang Y, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Spitz MR, Eisen T, Amos CI, Houlston RS. Deciphering the impact of common genetic variation on lung cancer risk: a genome-wide association study. *Cancer Res* 2009; 69: 6633-6641
- 25 Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Matakidou A, Wang Y, Mills G, Doheny K, Tsai YY, Chen WV, Shete S, Spitz MR, Houlston RS. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008; 40: 616-622
- 26 Cui R, Kamatani Y, Takahashi A, Usami M, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Functional variants in ADH1B and ALDH2 coupled with alcohol and smoking synergistically enhance esophageal cancer risk. *Gastroenterology* 2009; 137: 1768-1775
- 27 Wu C, Hu Z, He Z, Jia W, Wang F, Zhou Y, Liu Z, Zhan Q, Liu Y, Yu D, Zhai K, Chang J, Qiao Y, Jin G, Liu Z, Shen Y, Guo C, Fu J, Miao X, Tan W, Shen H, Ke Y, Zeng Y, Wu T, Lin D. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for esophageal squamous-cell carcinoma in Chinese populations. *Nat Genet* 2011; 43: 679-684
- 28 Wang LD, Zhou FY, Li XM, Sun LD, Song X, Jin Y, Li JM, Kong GQ, Qi H, Cui J, Zhang LQ, Yang JZ, Li JL, Li XC, Ren JL, Liu ZC, Gao WJ, Yuan L, Wei W, Zhang YR, Wang WP, Sheyhidin I, Li F, Chen BP, Ren SW, Liu B, Li D, Ku JW, Fan ZM, Zhou SL, Guo ZG, Zhao XK, Liu N, Ai YH, Shen FF, Cui WY, Song S, Guo T, Huang J, Yuan C, Huang J, Wu Y, Yue WB, Feng CW, Li HL, Wang Y, Tian JY, Lu Y, Yuan Y, Zhu WL, Liu M, Fu WJ, Yang X, Wang HJ, Han SL, Chen J, Han M, Wang HY, Zhang P, Li XM, Dong JC, Xing GL, Wang R, Guo M, Chang ZW, Liu HL, Guo L, Yuan ZQ, Liu H, Lu Q, Yang LQ, Zhu FG, Yang XF, Feng XS, Wang Z, Li Y, Gao SG, Qige Q, Bai LT, Yang WJ, Lei GY, Shen ZY, Chen LQ, Li EM, Xu LY, Wu ZY, Cao WK, Wang JP, Bao ZQ, Chen JL, Ding GC, Zhuang X, Zhou YF, Zheng HF, Zhang Z, Zuo XB, Dong ZM, Fan DM, He X, Wang J, Zhou Q, Zhang QX, Jiao XY, Lian SY, Ji AF, Lu XM, Wang JS, Chang FB, Lu CD, Chen ZG, Miao JJ, Fan ZL, Lin RB, Liu TJ, Wei JC, Kong QP, Lan Y, Fan YJ, Gao FS, Wang TY, Xie D, Chen SQ, Yang WC, Hong JY, Wang L, Qiu SL, Cai ZM, Zhang XJ. Genome-wide association study of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese subjects identifies susceptibility loci at PLCE1 and C20orf54. *Nat Genet* 2010; 42: 759-763
- 29 Abnet CC, Freedman ND, Hu N, Wang Z, Yu K,

- Shu XO, Yuan JM, Zheng W, Dawsey SM, Dong LM, Lee MP, Ding T, Qiao YL, Gao YT, Koh WP, Xiang YB, Tang ZZ, Fan JH, Wang C, Wheeler W, Gail MH, Yeager M, Yuenger J, Hutchinson A, Jacobs KB, Giffen CA, Burdett L, Fraumeni JF, Tucker MA, Chow WH, Goldstein AM, Chanock SJ, Taylor PR. A shared susceptibility locus in PLCE1 at 10q23 for gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet* 2010; 42: 764-767
- 30 Sakamoto H, Yoshimura K, Saeki N, Katai H, Shimoda T, Matsuno Y, Saito D, Sugimura H, Tanioka F, Kato S, Matsukura N, Matsuda N, Nakamura T, Hyodo I, Nishina T, Yasui W, Hirose H, Hayashi M, Toshiro E, Ohnami S, Sekine A, Sato Y, Totsuka H, Ando M, Takemura R, Takahashi Y, Ohdaira M, Aoki K, Honmyo I, Chiku S, Aoyagi K, Sasaki H, Ohnami S, Yanagihara K, Yoon KA, Kook MC, Lee YS, Park SR, Kim CG, Choi IJ, Yoshida T, Nakamura Y, Hirohashi S. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Genet* 2008; 40: 730-740
- 31 Zhang H, Jin G, Li H, Ren C, Ding Y, Zhang Q, Deng B, Wang J, Hu Z, Xu Y, Shen H. Genetic variants at 1q22 and 10q23 reproducibly associated with gastric cancer susceptibility in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2011; 32: 848-852
- 32 Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W, Barclay E, Lubbe S, Martin L, Sellick G, Jaeger E, Hubner R, Wild R, Rowan A, Fielding S, Howarth K, Silver A, Atkin W, Muir K, Logan R, Kerr D, Johnstone E, Sieber O, Gray R, Thomas H, Peto J, Cazier JB, Houlston RS. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 2007; 39: 984-988
- 33 Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J, Olschwang S, Chiang T, Crowdy E, Ferretti V, Laflamme P, Sundararajan S, Roumy S, Olivier JF, Robidoux F, Sladek R, Montpetit A, Campbell P, Bezieau S, O'Shea AM, Zogopoulos G, Cotterchio M, Newcomb P, McLaughlin J, Younghusband B, Green R, Green J, Porteous ME, Campbell H, Blanche H, Sahbatou M, Tubacher E, Bonaiti-Pellié C, Buecher B, Riboli E, Kury S, Chanock SJ, Potter J, Thomas G, Gallinger S, Hudson TJ, Dunlop MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 2007; 39: 989-994
- 34 Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, Webb E, Howarth K, Rowan A, Lubbe S, Spain S, Sullivan K, Fielding S, Jaeger E, Vijayakrishnan J, Kemp Z, Gorman M, Chandler I, Papaemmanuil E, Penegar S, Wood W, Sellick G, Qureshi M, Teixeira A, Domingo E, Barclay E, Martin L, Sieber O, Kerr D, Gray R, Peto J, Cazier JB, Tomlinson I, Houlston RS. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 2007; 39: 1315-1317
- 35 Jaeger E, Webb E, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Rowan A, Broderick P, Walther A, Spain S, Pittman A, Kemp Z, Sullivan K, Heinemann K, Lubbe S, Domingo E, Barclay E, Martin L, Gorman M, Chandler I, Vijayakrishnan J, Wood W, Papaemmanuil E, Penegar S, Qureshi M, Farrington S, Tenesa A, Cazier JB, Kerr D, Gray R, Peto J, Dunlop M, Campbell H, Thomas H, Houlston R, Tomlinson I. Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 2008; 40: 26-28
- 36 Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittman AM, Spain S, Lubbe S, Walther A, Sullivan K, Jaeger E, Fielding S, Rowan A, Vijayakrishnan J, Domingo E, Chandler I, Kemp Z, Qureshi M, Farrington SM, Tenesa A, Prendergast JG, Barnetson RA, Penegar S, Barclay E, Wood W, Martin L, Gorman M, Thomas H, Peto J, Bishop DT, Gray R, Maher ER, Lucassen A, Kerr D, Evans DG, Schafmayer C, Buch S, Völzke H, Hampe J, Schreiber S, John U, Koessler T, Pharoah P, van Wezel T, Moreau H, Wijnen JT, Hopper JL, Southey MC, Giles GG, Severi G, Castellví-Bel S, Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Castells A, Försti A, Hemminki K, Vodicka P, Naccarati A, Lipton L, Ho JW, Cheng KK, Sham PC, Luk J, Agúndez JA, Ladero JM, de la Hoya M, Caldés T, Niittymäki I, Tuupanen S, Karhu A, Aaltonen L, Cazier JB, Campbell H, Dunlop MG, Houlston RS. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet* 2008; 40: 623-630
- 37 Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N, Barnetson RA, Theodoratou E, Cetnarskyj R, Cartwright N, Semple C, Clark AJ, Reid FJ, Smith LA, Kavoussanakis K, Koessler T, Pharoah PD, Buch S, Schafmayer C, Tepel J, Schreiber S, Völzke H, Schmidt CO, Hampe J, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, Wilkening S, Canzian F, Capella G, Moreno V, Deary IJ, Starr JM, Tomlinson IP, Kemp Z, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Webb E, Broderick P, Vijayakrishnan J, Houlston RS, Rennert G, Ballinger D, Rozek L, Gruber SB, Matsuda K, Kidokoro T, Nakamura Y, Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Montpetit A, Hudson TJ, Gallinger S, Campbell H, Dunlop MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet* 2008; 40: 631-637
- 38 Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, Lubbe S, Chandler I, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Penegar S, Carvajal-Carmona L, Howarth K, Jaeger E, Spain SL, Walther A, Barclay E, Martin L, Gorman M, Domingo E, Teixeira AS, Kerr D, Cazier JB, Niittymäki I, Tuupanen S, Karhu A, Aaltonen LA, Tomlinson IP, Farrington SM, Tenesa A, Prendergast JG, Barnetson RA, Cetnarskyj R, Porteous ME, Pharoah PD, Koessler T, Hampe J, Buch S, Schafmayer C, Tepel J, Schreiber S, Völzke H, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, Zanke BW, Montpetit A, Hudson TJ, Gallinger S, Campbell H, Dunlop MG. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet* 2008; 40: 1426-1435
- 39 Pomerantz MM, Ahmadiyeh N, Jia L, Herman P, Verzi MP, Doddapaneni H, Beckwith CA, Chan JA, Hills A, Davis M, Yao K, Kehoe SM, Lenz HJ, Haiman CA, Yan C, Henderson BE, Frenkel B, Baretina J, Bass A, Tabernero J, Baselga J, Regan MM, Manak JR, Shivdasani R, Coetzee GA, Freedman ML. The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nat Genet* 2009; 41: 882-884
- 40 Tuupanen S, Turunen M, Lehtonen R, Hallikas O, Vanharanta S, Kivioja T, Björklund M, Wei G, Yan J, Niittymäki I, Mecklin JP, Järvinen H, Ristimäki

- A, Di-Bernardo M, East P, Carvajal-Carmona L, Houlston RS, Tomlinson I, Palin K, Ukkonen E, Karhu A, Taipale J, Aaltonen LA. The common colorectal cancer predisposition SNP rs6983267 at chromosome 8q24 confers potential to enhanced Wnt signaling. *Nat Genet* 2009; 41: 885-890
- 41 Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8621-8623
- 42 Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-821
- 43 涂欣, 石立松, 汪樊, 王擎. 全基因组关联分析的进展与反思. *生理科学进展* 2010; 41: 87-93
- 44 Hindorf LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 9362-9367
- 45 韩建文, 张学军. 全基因组关联研究现状. *遗传* 2011; 33: 25-35
- 46 沈洪兵, 靳光付. 肿瘤全基因组关联研究的现状与挑战. *中华预防医学杂志* 2009; 43: 632-639
- 47 Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-454
- 48 McCarroll SA. Extending genome-wide association studies to copy-number variation. *Hum Mol Genet* 2008; 17: R135-R142
- 49 Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 639-646

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$  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  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  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  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

## 肉桂油对胰岛素抵抗小鼠糖脂代谢的影响

陈璿瑛, 彭小平, 王琳, 魏筱华, 李文娟, 何明

陈璿瑛, 王琳, 魏筱华, 南昌大学第一附属医院药剂科 江西省南昌市 330006  
彭小平, 南昌大学第一附属医院心内科 江西省南昌市 330006  
李文娟, 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 江西省南昌市 330047  
何明, 南昌大学药学院 江西省南昌市 330006  
江西省卫生厅课题基金资助项目, No. 20093040  
作者贡献分布: 此课题由陈璿瑛、李文娟及何明设计; 研究过程由陈璿瑛、王琳及李文娟完成; 数据分析由陈璿瑛、彭小平及魏筱华完成; 文章写作由陈璿瑛、彭小平及王琳完成。  
通讯作者: 陈璿瑛, 硕士, 主管药师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院药剂科. pxp-cxy@126.com  
收稿日期: 2011-09-17 修回日期: 2011-10-25  
接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

### Effect of volatile oil from Cinnamomi Cortex on blood glucose and lipid metabolism in insulin-resistant mice

Xuan-Ying Chen, Xiao-Ping Peng, Lin Wang,  
Xiao-Hua Wei, Wen-Juan Li, Ming He

Xuan-Ying Chen, Lin Wang, Xiao-Hua Wei, Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Xiao-Ping Peng, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Wen-Juan Li, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi Province, China  
Ming He, College of Pharmaceutical Sciences, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Supported by: the Fund of Jiangxi Provincial Health Department, No. 20093040  
Correspondence to: Xuan-Ying Chen, Pharmacist, Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. pxp-cxy@126.com  
Received: 2011-09-17 Revised: 2011-10-25  
Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of volatile oil from Cinnamomi Cortex (VOCC) on blood glucose and lipid metabolism in insulin-resistant mice and to investigate the possible mechanisms involved.

**METHODS:** Insulin resistance was induced by feeding a high-fat diet. After insulin-resistant mice were treated orally with VOCC, oral glu-

cose tolerance test and insulin tolerance test were performed. The body weight, blood glucose, serum insulin, total cholesterol, triglyceride, leptin, resistin, and adiponectin were determined using biochemical methods.

**RESULTS:** VOCC administration decreased body weight gain ( $30.3 \pm 3.6$  vs  $34.6 \pm 3.1$ ,  $P < 0.05$ ), blood glucose ( $7.6 \pm 2.2$  vs  $9.2 \pm 1.3$ ,  $P < 0.05$ ), serum insulin ( $1.3 \pm 0.1$  vs  $1.7 \pm 0.2$ ,  $P < 0.05$ ), total cholesterol ( $70.1 \pm 10.9$  vs  $65.4 \pm 19.5$ ,  $P < 0.05$ ), triglyceride ( $93.2 \pm 13.8$  vs  $102.3 \pm 21.5$ ,  $P < 0.05$ ), leptin, and resistin levels. Treatment with VOCC also decreased insulin resistance by improving oral glucose tolerance and insulin tolerance.

**CONCLUSION:** VOCC improved blood glucose and lipid metabolism by reducing serum leptin and resistin in insulin-resistant mice, thereby enhancing insulin sensitivity.

**Key Words:** Volatile oil from Cinnamomi Cortex; Insulin resistance; Hypoglycemic and hypolipidemic effect; Leptin; Resistin

Chen XY, Peng XP, Wang L, Wei XH, Li WJ, He M. Effect of volatile oil from Cinnamomi Cortex on blood glucose and lipid metabolism in insulin-resistant mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3441-3445

### 摘要

**目的:** 研究肉桂油对胰岛素抵抗小鼠糖脂代谢的影响, 探讨其作用机制。

**方法:** 采用高脂饲料喂养建立小鼠胰岛素抵抗模型, 经肉桂油治疗后测定口服糖耐量及胰岛素耐受, 观察体质量、血糖、血清胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、瘦素、抵抗素、脂联素的变化。

**结果:** 肉桂油能降低胰岛素抵抗小鼠的体质量( $30.3 \pm 3.6$  vs  $34.6 \pm 3.1$ ,  $P < 0.05$ )、血糖( $7.6 \pm 2.2$  vs  $9.2 \pm 1.3$ ,  $P < 0.05$ )、血清胰岛素( $1.3 \pm 0.1$  vs  $1.7 \pm 0.2$ ,  $P < 0.05$ )、甘油三酯( $70.1 \pm 10.9$  vs  $65.4 \pm 19.5$ ,  $P < 0.05$ )、总胆固醇( $93.2 \pm 13.8$  vs  $102.3 \pm 21.5$ ,  $P < 0.05$ )、瘦素、抵抗素水平, 同时改善口服糖耐量, 降低胰岛素抵抗。

### 背景资料

肉桂在民间具有广泛的药用价值, 尽管有研究报道肉桂可改善胰岛素抵抗, 但其与代谢综合征相关的胰岛素抵抗, 脂质代谢紊乱的关系尚不明确。

### 同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

■ **研发前沿**  
中药治疗具有多靶点和多途径作用的特点,在代谢综合征的治疗中具有良好的开发前景。因此研究肉桂油治疗代谢综合征及其机制具有重要的价值。

**结论:** 肉桂油能有效改善胰岛素抵抗小鼠糖脂代谢,其作用与降低血清瘦素、抵抗素水平,增加胰岛素敏感性有关。

**关键词:** 肉桂油; 胰岛素抵抗; 降糖降脂作用; 瘦素; 抵抗素

陈璐瑛, 彭小平, 王琳, 魏筱华, 李文娟, 何明. 肉桂油对胰岛素抵抗小鼠糖脂代谢的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3441-3445

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3441.asp>

## 0 引言

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是以肥胖、胰岛素抵抗,伴有脂质代谢紊乱等为病理特点的一组疾病<sup>[1]</sup>。MS可增加糖尿病、心血管疾病的发生以及心血管疾病死亡的危险性,因此已经成为全球关注的公共卫生和临床难题<sup>[2]</sup>。其中,肥胖与胰岛素抵抗是MS中诱发2型糖尿病和心血管疾病的关键因素<sup>[3]</sup>。因此,开发具有降低胰岛素抵抗,控制糖脂代谢异常的药物对于减少MS相关疾病的发生具有重要临床意义和应用价值。中医药重视从整体上、多环节、多途径、多靶点地对MS进行调节,对高糖、高脂与代谢紊乱等多危险因素进行综合防治,与目前临床治疗MS的主要目标相吻合<sup>[4]</sup>。因此,中医药在MS的预防和治疗中显示出优越的开发前景。肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)为樟科植物肉桂的干燥树皮,在民间有广泛的药用价值<sup>[5,6]</sup>。Couturier等<sup>[7]</sup>通过高胰岛素-正葡萄糖钳夹试验研究发现,肉桂提取物显著增加胰岛素抵抗大鼠葡萄糖输注速率,增强胰岛素敏感性。最新临床研究表明,2型糖尿病患者连续食用肉桂40 d,停药20 d后仍可明显改善高血糖高血脂症状<sup>[8]</sup>。因肉桂本身为应用广泛的香辛料,价格低廉,将其开发为治疗代谢综合征的天然药物具有广阔的前景。本实验拟采用高脂饲料喂养C57BL/6小鼠,建立胰岛素抵抗模型,研究肉桂油(VOCC)对胰岛素抵抗小鼠糖脂代谢的影响,并通过脂肪细胞分泌相关因子的分析,探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂ SPF级C57BL/6小鼠,4 wk, 15 g ± 2 g,由江西中医学院实验动物部提供,许可证号: SCXK(赣)2006-0001。肉桂购自湖北省中药材公司(经南昌大学药学院何明教授鉴定为樟科植物肉桂*Cinnamomum cassia* Presl的干燥树皮);总胆固醇、甘油三酯试剂盒购自中生北控生物

科技有限公司;小鼠瘦素、抵抗素、脂联素、胰岛素ELISA试剂盒由R&D公司提供;盐酸二甲双胍由天津太平洋制药有限公司提供;胰岛素注射液(10 mL: 400 U,江苏万邦生化医药有限公司产品);葡萄糖(Amresco公司);快速血糖测试仪(强生中国医疗器材有限公司);高脂饲料(上海鑫邦科技有限公司);AVE-852半自动生化分析仪(长沙爱威科技实业有限公司);酶标仪(Thermo公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 肉桂油的提取:** 称取肉桂粗粉,过20目筛,萃取压力35 MPa,萃取温度31 ℃,解析压力5.5 MPa,解析温度38 ℃,超临界萃取4 h,挥发油提取率为3.0%。

**1.2.2 胰岛素抵抗糖尿病小鼠模型的建立:** 健康♂ C57BL/6小鼠,给予高脂饲料(50%脂肪,36%碳水化合物,14%蛋白质),自由饮水,持续喂养8 wk建立糖尿病小鼠模型<sup>[9]</sup>。8 wk后,禁食6 h,选取空腹血糖大于7.8 mmol/L小鼠作为胰岛素抵抗模型,模型成功率为80%左右。

**1.2.3 动物分组及给药:** 造模成功的C57BL/6糖尿病小鼠( $n = 30$ ),随机分为3组:模型对照组、阳性对照组和肉桂油组,10只/组。另设正常对照组C57BL/6小鼠( $n = 10$ ),与模型对照组小鼠具有相同周龄,给予普通标准小鼠饲料(12%脂肪,62%碳水化合物,26%蛋白质)喂养。除正常对照组外,其余各组继续喂以高脂饲料直至实验结束。阳性对照组灌胃给予盐酸二甲双胍肠溶片0.25 g/(kg·d),相当于临床用量10倍;肉桂油按生药30 g/kg灌胃给药,即相当于挥发油0.9 mL/kg;正常对照组和模型对照组灌胃给予等量生理盐水,0.1 mL/10g。连续给药3 wk,1次/d。

**1.2.4 口服糖耐量测试:** 给药1 wk后,小鼠禁食6 h,灌胃给予2 g/kg的葡萄糖,分别在0、30、60、90、120 min采集小鼠尾静脉血,通过快速血糖测试仪测定小鼠血糖。

**1.2.5 胰岛素耐量测试:** 给药2 wk后,小鼠禁食2 h,皮下注射胰岛素(0.28 U/kg),分别在0、30、60、90、120 min采集小鼠尾静脉血,通过快速血糖测试仪测定小鼠血糖。

**1.2.6 血清生化指标测定:** 给药3 wk后,测定小鼠体质量,禁食6 h,采集小鼠尾静脉血,通过快速血糖测试仪测定小鼠血糖。摘眼球取血,分离血清,-20 ℃冻存。检测血清总胆固醇、甘油三酯水平,采用半自动生化分析仪测定,结果以mg/dL表示。血清瘦素、脂联素、抵抗素、胰岛

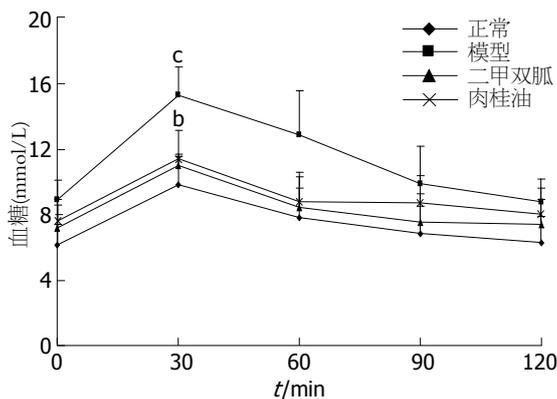


图 1 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠口服糖耐量的影响. <sup>a</sup>*P*<0.001 vs 正常对照组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型对照组.

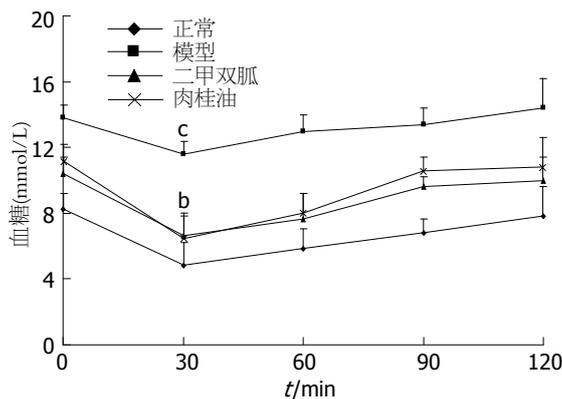


图 2 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响. <sup>a</sup>*P*<0.001 vs 正常对照组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型对照组.

**■ 相关报道**  
 Couturier等通过高胰岛素-正葡萄糖钳夹试验研究发现, 肉桂提取物显著增加胰岛素抵抗大鼠葡萄糖输注速率, 增强胰岛素敏感性, 但深入机制尚未阐明.

表 1 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠体质量、血糖、血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯水平的影响 (mean ± SD)

分组	正常对照组	模型对照组	二甲双胍	肉桂油
体质量(g)	27.3 ± 2.1 <sup>b</sup>	34.6 ± 3.1	33.2 ± 2.9 <sup>a</sup>	30.3 ± 3.6 <sup>a</sup>
血糖(mmol/L)	6.2 ± 1.2 <sup>b</sup>	9.20 ± 1.3	7.20 ± 1.8 <sup>a</sup>	7.6 ± 2.2 <sup>a</sup>
血清胰岛素(ng/mL)	1.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.2	1.20 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
血清总胆固醇(mg/dL)	88.2 ± 18.3 <sup>a</sup>	102.3 ± 21.5	90.6 ± 29.8 <sup>a</sup>	93.2 ± 13.8 <sup>a</sup>
血清甘油三酯(mg/dL)	77.8 ± 13.5 <sup>a</sup>	65.40 ± 19.5	63.5 ± 12.7 <sup>a</sup>	70.1 ± 10.9 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型对照组.

素测定按照ELISA试剂盒操作, 结果以ng/mL表示.

**统计学处理** 数据以(mean ± SD)表示, 实验数据以组间*t*检验处理, *P*<0.05具有统计学意义. 数据统计由SPSS13.0软件包完成.

## 2 结果

**2.1 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠口服糖耐量的影响** 口服糖耐量测试结果显示, 给予葡萄糖0.5 h后, 模型组血糖显著高于正常对照组 (*P*<0.001), 而肉桂油及二甲双胍均可快速降低最大血糖浓度 (*P*<0.01, 图1), 表明肉桂油可增加组织对葡萄糖的利用.

**2.2 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠胰岛素耐量的影响** 采用胰岛素耐量试验评估外周胰岛素抵抗, 通过外周组织对葡萄糖代谢来反映胰岛素的敏感性. 结果显示, 给予胰岛素30 min后, 模型组血糖下降程度明显低于空白对照组 (*P*<0.001), 表明模型组小鼠外周组织胰岛素抵抗明显. 肉桂油组和二甲双胍组小鼠, 给予胰岛素后, 可显著降低血糖, 其作用有显著性差异 (*P*<0.01), 表明肉桂油可增加外周组织对胰岛素的敏感性(图2).

**2.3 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠体质量、血糖、血清胰岛素和血脂水平的影响** 给药3 wk后, 与正常对照组相比, 模型组小鼠体质量、血糖、血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯水平显著升高 (*P*<0.05), 表现为肥胖、高血糖、高血脂、高胰岛素血脂的特点, 表明胰岛素抵抗糖尿病小鼠造模成功. 给予肉桂油后, 小鼠体质量、血糖水平、胰岛素水平、总胆固醇和甘油三酯水平均明显低于模型组 (*P*<0.05), 表明肉桂油可改善糖尿病小鼠肥胖、高血糖、高血脂、高胰岛素血症状态, 其作用于二甲双胍相当(表1).

**2.4 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠血清脂酶的影响** 模型对照组小鼠血清瘦素, 抵抗素水平显著高于空白对照组 (*P*<0.05), 表明采用高脂饲料喂养可造成小鼠脂肪素水平紊乱. 给予肉桂及二甲双胍后, 小鼠瘦素和抵抗素水平显著低于模型对照组 (*P*<0.05). 此外, 各组小鼠血清脂联素水平无显著性差异(图3).

## 3 讨论

在MS的发病过程中, 甘油三酯合成的减少和脂肪组织脂解作用的增加导致血浆游离脂肪酸的增加, 最终导致脂质在内脏和骨骼肌中的沉积.

**■ 创新盘点**  
 本研究首次报道了肉桂油可以同时改善糖脂代谢紊乱, 发现肉桂油降低胰岛素抵抗, 改善脂质代谢紊乱的作用机制与降低血清抵抗素、瘦素水平的有关.

### ■应用要点

根据本研究结论,肉桂油可改善糖脂代谢,调节重要脂肪细胞因子水平,因此具有开发为预防和治疗代谢综合征的药物的可能。

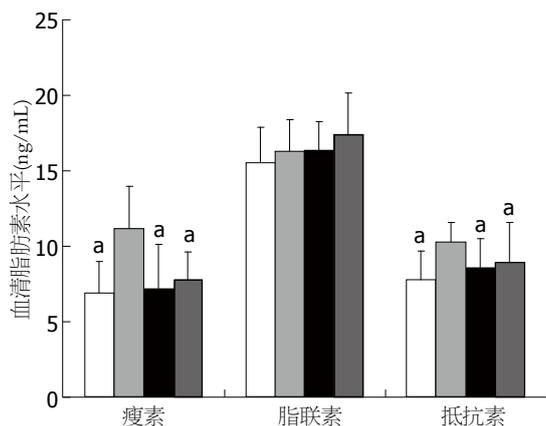


图3 肉桂油对胰岛素抵抗糖尿病小鼠血清瘦素、脂联素、抵抗素水平的影响。 $P < 0.05$  vs 模型对照组。

脂质代谢障碍通过活化PKCs/JNK(Protein kinase C/Jun amino-terminal kinase)和诱导氧化应激等方式促进全身的胰岛素抵抗。游离脂肪酸还通过直接作用于胰岛 $\beta$ 细胞而产生高胰岛素血症。因为胰岛素能刺激甘油三酯的合成和储存并抑制脂解作用,所以脂肪细胞中的胰岛素功能受损反过来促进脂肪组织的脂质代谢障碍。因此,胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱构成了MS的重要病理生理学机制<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示, C57BL/6小鼠采用高脂饲料喂养, 体质量显著增加, 并表现为胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱、高瘦素血症及高抵抗素血症等MS症状。而肉桂油能有效控制胰岛素抵抗小鼠的体质量, 降低血糖, 改善血清总胆固醇和甘油三酯水平。同时口服糖耐量及胰岛素耐量测试均表明, 肉桂油具有增加胰岛素的敏感性, 增加外周组织对葡萄糖的利用。此外, 血清瘦素及抵抗素水平亦得到改善。说明肉桂提取物具有改善MS相关症状的药理作用。

胰岛素抵抗是代谢综合征重要的病理基础, 表现为胰岛素在肌肉、脂肪、肝脏等外周组织中敏感性降低<sup>[11]</sup>。其中脂肪组织分泌的众多细胞因子如脂联素、抵抗素、瘦素等通过自分泌、旁分泌等途径影响胰岛素在外周组织的作用。当脂质代谢紊乱, 脂质沉积, 由此引发的脂肪细胞代谢紊乱会造成这些因子的分泌出现失调, 进而影响血糖的正常代谢, 是发生胰岛素抵抗的重要原因之一<sup>[12]</sup>。瘦素是人类肥胖(ob)基因编码的多肽激素, 主要由白色脂肪组织合成分泌, 其主要功能是抑制摄食, 增加能量消耗, 减少脂肪堆积<sup>[13]</sup>。当出现瘦素抵抗时, 瘦素对胰岛素的抑制作用减弱, 正常的脂肪胰岛素反馈机制破

坏, 胰岛素大量分泌, 引起高胰岛素血症, 并降低胰岛素受体数量, 导致IR的发生<sup>[14]</sup>。抵抗素主要表达于白色脂肪组织, 具有抵抗胰岛素的作用, 可作用于脂肪、骨骼肌和肝细胞, 减弱这些细胞对胰岛素的敏感性<sup>[15]</sup>。因此, 瘦素和抵抗素在胰岛素抵抗中扮演重要的角色, 是降低胰岛素抵抗的重要靶点。肉桂油具有调节脂肪细胞因子的分泌水平, 从而降低了胰岛素抵抗, 进而降低血糖, 改善脂质代谢。

同时, 血清甘油三酯, 总胆固醇的含量的降低, 以及肥胖小鼠体质量的减轻, 进一步促进了脂质沉积减少, 该作用共同调节脂肪组织对脂肪细胞因子的分泌。以上作用提示, 肉桂油通过改善胰岛素抵抗, 改善脂质代谢紊乱, 调节瘦素、抵抗素的分泌, 对MS相关的多方面危险因素进行防治。

此外, 各组血清脂联素水平无显著变化, 说明采用高脂饲料喂养C57BL/6小鼠不能造成脂联素代谢紊乱。脂联素主要通过增加胰岛素促进的骨骼及胰岛素受体酪氨酸磷酸化改善全身胰岛素抵抗, 尽管脂联素是胰岛素抵抗的重要指标, 但其血清水平由遗传、环境等多种因素控制<sup>[11]</sup>, 因此在本研究中未发现胰岛素抵抗小鼠脂联素水平的变化。

总之, 肉桂油能增强外周组织对胰岛素的敏感性, 增加葡萄糖的利用, 降低胰岛素抵抗小鼠高血糖, 高血脂症状, 改善口服糖耐量, 同时降低重要脂肪细胞因子瘦素和抵抗素的水平, 从而最终改善胰岛素抵抗小鼠的糖脂代谢紊乱。

## 4 参考文献

- Poanta LI, Albu A, Fodor D. Association between fatty liver disease and carotid atherosclerosis in patients with uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Med Ultrason* 2011; 13: 215-219
- Mancia G, Bombelli M, Facchetti R, Casati A, Ronchi I, Quarti-Trevano F, Arenare F, Grassi G, Sega R. Impact of different definitions of the metabolic syndrome on the prevalence of organ damage, cardiometabolic risk and cardiovascular events. *J Hypertens* 2010; 28: 999-1006
- Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E333-E342
- Yin J, Zhang H, Ye J. Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008; 8: 99-111
- 庞运同, 董元玉. 肉桂及其伪品的鉴别. *中国医院药学杂志* 2004, 24: 788-789
- 马耀辉, 邓洁华, 王刚生, 张晓光, 王爱学, 四荣联. 肉桂油对小鼠胃白念珠菌感染的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1545-1547

- 7 Couturier K, Batandier C, Awada M, Hininger-Favier I, Canini F, Anderson RA, Leverve X, Rousset AM. Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501: 158-161
- 8 Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 3215-3218
- 9 de Wilde J, Smit E, Mohren R, Boekschoten MV, de Groot P, van den Berg SA, Bijland S, Voshol PJ, van Dijk KW, de Wit NW, Bunschoten A, Schaart G, Hulshof MF, Mariman EC. An 8-week high-fat diet induces obesity and insulin resistance with small changes in the muscle transcriptome of C57BL/6J mice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009; 2: 280-291
- 10 Assumpcao CR, Brunini TM, Pereira NR, Godoy-Matos AF, Siqueira MA, Mann GE, and Mendes-Ribeiro AC. Insulin resistance in obesity and metabolic syndrome: is there a connection with platelet l-arginine transport? *Blood Cells Mol Dis* 2010; 45: 338-342
- 11 Zhang W, Liu CQ, Wang PW, Sun SY, Su WJ, Zhang HJ, Li XJ, Yang SY. Puerarin improves insulin resistance and modulates adipokine expression in rats fed a high-fat diet. *Eur J Pharmacol* 2010; 649: 398-402
- 12 王静, 周瑞秀, 韩玉婷. 脂肪细胞因子与胰岛素抵抗. *医学综述* 2008; 14: 1142-1144
- 13 Sarigianni M, Bekiari E, Tsapas A, Kaloyianni M, Koliakos G, Paletas K. Effect of leptin and insulin resistance on properties of human monocytes in lean and obese healthy participants. *Angiology* 2010; 61: 768-774
- 14 Tajtakova M, Petrasova D, Pidanicova A, Gallovicova A, Blanarova C, Petrovicova J. Serum levels of leptin, adiponectin, retinol binding protein 4 and leptin/adiponectin molar ratio as another possible marker of insulin resistance in obese. *Bratisl Lek Listy* 2010; 111: 212-215
- 15 Park HK, Qatanani M, Briggs ER, Ahima RS, Lazar MA. Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. *Diabetes* 2011; 60: 775-783

■同行评价  
代谢综合征的发病率逐年增加,并随着年龄增长发病率也逐渐升高,文章研究肉桂油对胰岛素抵抗小鼠的糖脂代谢影响,有着很好的现实意义。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示,2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任:李军亮 2010-11-28)

# 中国幽门螺杆菌高细胞毒株和弱细胞毒株*vacA*基因全长序列特征与VacA活性的关系

杨泽民

## ■背景资料

*H. pylori*与胃炎、消化性溃疡和胃癌密切相关。*vacA*基因编码产物是*H. pylori*的一个重要毒力因子。临床发现所有*H. pylori*菌株都具有*vacA*基因,但是不同的菌株在表达VacA的活性上存在明显的差异,究其原因还不清楚。

杨泽民, 广东药学院基础学院 广东省广州市 510006  
国家自然科学基金资助项目, No. 81102703  
作者贡献分布: 本文的试验设计、数据分析和论文写作都由杨泽民一人完成。  
通讯作者: 杨泽民, 实验师, 510006, 广东省广州市, 广东药学院基础学院. yzm3102001@yahoo.com.cn  
电话: 020-39352192  
收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-10-20  
接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Relationship between full-length sequence characteristics of the *vacA* gene from high-cytotoxic and low-cytotoxic *Helicobacter pylori* in China and VacA activities

Ze-Min Yang

Ze-Min Yang, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81102703  
Correspondence to: Ze-Min Yang, Technician, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China. yzm3102001@yahoo.com.cn  
Received: 2011-09-06 Revised: 2011-10-20  
Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effect of *vacA* gene sequence variation on VacA activity by analyzing the full-length sequence of the *vacA* gene of high- and low-cytotoxic *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) strains isolated from China.

**METHODS:** The full-length sequences of the *vacA* gene of four high- and four low-cytotoxic *H. pylori* strains were retrieved from GenBank database and analyzed using three bioinformatic programs (DNAMAN, Lasergene 7.0 and MEGA 5.0).

**RESULTS:** There existed significant sequence variations in the *vacA* gene among high- and low-cytotoxic *H. pylori* strains isolated from

China and a high-cytotoxic *H. pylori* 60190 strain isolated from west country. These variations were mainly concentrated on the p55 domain of the *vacA* gene, resulting in transitions between hydrophobic and polar amino acids. Several insertion variations were detected in low-cytotoxic *H. pylori* strains compared to the *H. pylori* 60190 strain. High- and low-cytotoxic strains as well as strains isolated from China and west country were clustered as different *H. pylori* lineages.

**CONCLUSION:** Sequence and insert variation in the *vacA* gene might be an important reason resulting in VacA activity difference among *H. pylori* strains.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; *vacA* gene; DNA sequence; Amino acid sequence; Phylogenetic tree

Yang ZM. Relationship between full-length sequence characteristics of the *vacA* gene from high-cytotoxic and low-cytotoxic *Helicobacter pylori* in China and VacA activities. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3446-3451

## 摘要

**目的:** 探讨中国幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)强细胞毒株和弱细胞毒株*vacA*基因序列差异对其VacA活性的影响。

**方法:** 从GenBank数据库下载4个强细胞毒株和4个弱细胞毒株*vacA*基因全长DNA和氨基酸序列, 利用DNAMAN、lasergene 7.0、MEGA 5.0 3个生物信息学软件对其进行分析。

**结果:** (1)中国*H. pylori*强细胞毒株、弱细胞毒株和西方强细胞毒株60190株3者之间在*vacA*基因序列上都存在明显的差异, 这些差异主要集中在*vacA*基因p55结构域, 表现为疏水性氨基酸与极性氨基酸之间的转换; (2)弱细胞毒株还存在多个插入变异位点; (3)强细胞毒株和弱细胞毒株, 中国和西方分离株在系统发育树中分别聚类为不同的谱系。

**结论:** *vacA*基因序列差异和插入突变可能是

## ■同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

导致中国不同*H. pylori* VacA活性差异的重要原因.

**关键词:** 幽门螺杆菌; *vacA*基因; DNA序列; 氨基酸序列; 系统发育树

杨泽民. 中国幽门螺杆菌强细胞毒株和弱细胞毒株*vacA*基因全长序列特征与VacA活性的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3446-3451  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3446.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种人类常见致病菌, 全世界有50%的人终身感染这种细菌. 自从1982年Marshall和Warren发现*H. pylori*是导致消化性溃疡病的主要致病菌以来, 越来越多的证据表明*H. pylori*与胃炎、胃溃疡、胃癌、胃黏膜相关的淋巴样组织淋巴瘤(MALT)和胃腺癌密切相关<sup>[1,2]</sup>. *vacA*基因编码的空泡毒素A(Vacuolating Cytotoxin, VacA)是*H. pylori*产生的重要毒力因子, 可导致上皮细胞的空泡变性<sup>[3]</sup>. VacA是以140 kDa毒素前体的形式被翻译, 在分泌过程中经过N-和C-端的水解产生N-端信号肽(Signal Peptide, SP)(氨基酸残基-33-0)、88 kDa的成熟毒素p88(氨基酸残基1-821)、未知功能的分泌 $\alpha$ 肽(Secreted Alpha Peptide, SAP)(氨基酸残基822-954)和C-端 $\beta$ -桶型结构域(Beta-Barrel Domain, BBD)(氨基酸残基955-1254). p88含有p33和p55两个结构域, 其中p33(氨基酸残基1-311)与孔的形成有关, 而p55(氨基酸残基312-821)含有一个或多个细胞结合区域. p33和p55结构域共同介导VacA与靶细胞表面的相互作用, 都是VacA发挥毒力作用所必需的<sup>[4]</sup>. 临床发现所有*H. pylori*菌株都具有*vacA*基因, 但是不同的菌株在表达空泡毒性的活性上存在明显的差异<sup>[5,6]</sup>. 研究发现VacA毒性差异与*vacA*基因型或序列多态性密切相关, 并且这种序列差异性还表现出明显的地理差异性<sup>[7,8]</sup>. 根据*vacA*基因s区(信号序列区)和m区(p55结构域的中间序列区)是否存在标签序列以及两者之间的序列差异, *vacA*等位基因能够被分成s1/s2、i1/i2、m1/m2不同的家族<sup>[8-10]</sup>. 通常含有s1、i1和m1的*vacA*等位基因的菌株更易导致溃疡性疾病或胃癌的发生<sup>[8,10]</sup>.

中国是一个*H. pylori*感染率高的国家, 也是胃癌的高发区. 目前我国学者对不同省市*H. pylori*的*vacA*基因型以及与胃肠疾病的相关性进

行了广泛的研究, 其中也有对*vacA*基因s区或m区部分序列的对比分析<sup>[11-13]</sup>, 但是对*vacA*基因全长进行深入分析的报道还很少, 尤其是对具有不同细胞毒性活性的*H. pylori*株的*vacA*基因全长的对比分析还未见报道. 本研究通过对中国*H. pylori*强细胞毒株和弱细胞毒株与西方强细胞毒株60190株*vacA*基因DNA和氨基酸序列进行了深入的对比分析, 探讨中国*H. pylori*强细胞毒株和弱细胞毒株*vacA*基因序列的特点及其与西方强细胞毒株的差异, 揭示导致中国*H. pylori*不同细胞毒株VacA活性差异的原因. 并且利用*vacA*基因序列构建了中国与西方*H. pylori*分离株的系统发育树.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本研究数据来源于GenBank数据库, 其相关信息见表1.

1.2 方法 将高细胞毒性的菌株5060d, 5038c, 4611a和3554a分为一组, 将弱细胞毒性的菌株5147c, 5114a和3295b和无细胞毒性的菌株1811a分为另一组. 以西方强细胞毒株60190株*vacA*基因作为对照, 利用DNAMAN软件对中国*H. pylori*弱细胞毒株和强细胞毒株的*vacA*基因DNA和氨基酸序列进行相似性分析; 利用lasergene 7.0软件的EditSeq功能模块分别对他们的DNA和氨基酸序列进行碱基和氨基酸统计; 利用MEGA 5.0软件采用邻接法(NJ)分别对中国和西方*H. pylori*分离株*vacA*基因DNA和氨基酸序列构建系统发育树, 采用Bootstrap的方法重复1 000次进行检验.

## 2 结果

2.1 *vacA*基因DNA和氨基酸序列相似性分析 中国*H. pylori*强细胞毒株和弱细胞毒株与60190株*vacA*基因DNA和氨基酸序列相似性分析结果如表2. 本研究中*H. pylori*的*vacA*基因DNA和氨基酸序列相似趋势一致, 并且DNA序列相似性略高于氨基酸序列相似性. 就菌株而言, 组内相似性明显高于组间, 组间相似性以强细胞毒株与60190株为最高. 中国*H. pylori*分离株与60190株*vacA*基因DNA序列平均相似性为87.24%, 氨基酸序列平均相似性为85.27%.

*vacA*基因碱基和氨基酸统计分析显示, 本研究中不同*H. pylori*分离株之间碱基数量虽有差异, 但其百分含量没有明显差异(结果未显示). 相对于60190株, 中国*H. pylori*分离株*vacA*基因在氨基酸数量和不同类型氨基酸含量都存在明

**■ 研发前沿**  
基因多态性是导致基因功能变化的遗传基础. VacA氨基酸序列变异会改变其空间结构, 进而影响VacA的毒性, 因此, 通过不同VacA活性的*H. pylori*菌株的*vacA*基因序列分析, 可以揭示导致不同*H. pylori*菌株VacA活性差异的深层原因.

## ■ 相关报道

Yoshiyuki等通过对日本*H. pylori*有细胞毒株和无细胞毒株*vacA*基因全长的分析发现, 50%无细胞毒株存在内部复制、大片段删除、1 bp插入等导致*VacA*翻译提前终止的突变, 然而有细胞毒株不存在这些突变。

表 1 幽门螺杆菌菌株*vacA*基因型及其DNA和氨基酸序列来源

菌株名称	细胞毒性	菌株来源	基因型	GenBank登记号	文献来源
J128(95-54)	无	意大利	s1/m2	U95971; AAC25911	[14]
Tx30a	无	美国	s2/m2	U29401; AAA86834	[8]
CHN1811a	无	中国	s1/m2	AF050326; AAF26508	[15, 16]
CHN5147c	弱	中国	s1/m2	AF050320; AAF26502	[15, 16]
CHN5114a	弱	中国	s1/m2	AF050327; AAF26509	[15, 16]
CHN3295b	弱	中国	s1/m2	AF050319; AAF26501	[15, 16]
CHN5060d	高	中国	s1/m1	AF050328; AAF26510	[15, 16]
CHN5038c	高	中国	s1/m1	AF361702; AAL83505	[16, 17]
CHN4611a	高	中国	s1/m1	AF361701; AAL83504	[16, 17]
CHN3554a	高	中国	s1/m1	AF361700; AAL83503	[16, 17]
60190	高	英国	s1/m1	U05676; AAA17657	[18]
NCTC 11637	高	澳大利亚	s1/m1	AF049653; AAD04290	[7]
185-44	高	德国	s1/m1	Z26883; CAA81528	[19]

表 2 中国幽门螺杆菌高、弱细胞毒株和60190株*vacA*基因DNA和氨基酸序列相似性比对 (%)

	高细胞毒株		弱细胞毒株		60190株	
	氨基酸序列相	DNA序列相	氨基酸序列相	DNA序列相	氨基酸序列相	DNA序列相
	似性平均值	似性平均值	似性平均值	似性平均值	似性平均值	似性平均值
高细胞毒株	95.16	94.45		88.37		89.01
弱细胞毒株	84.98		96.01	95.93		85.47
60190株	88.45		82.09		100	100

表 3 中国幽门螺杆菌高、弱细胞毒株和60190株*vacA*基因各类氨基酸数量及其占总氨基酸的比例

	TA	SBA	SAA	HA	PMA
60190株	1287	113	97	439	453
		0.0878	0.0754	0.3411	0.3520
高细胞毒株	1294	118	99	451	441
		0.0910 <sup>a</sup>	0.0761	0.3489 <sup>b</sup>	0.3411 <sup>a</sup>
弱细胞毒株	1326	122	104	459	445
		0.0922 <sup>a</sup>	0.0783 <sup>b</sup>	0.3461 <sup>b</sup>	0.3359 <sup>b</sup>

TA: 氨基酸总数; SBA: 强碱性氨基酸数量及所占比例(K, R); SAA: 强酸性氨基酸数量及所占比例(D, E); HA: 疏水性氨基酸数量及所占比例(A, I, L, F, W, V); PMA: 极性中性氨基酸数量及所占比例(N, C, Q, S, T, Y). <sup>a</sup>*P*<0.01, <sup>b</sup>*P*<0.001.

显的差异, 这种差异性表现为酸性、碱性和疏水性氨基酸含量明显增加, 极性中性氨基酸含量明显降低, 其中弱细胞毒株与60190株的差异性更大(表3).

2.2 *vacA*基因不同结构域氨基酸序列分析与60190株相比, 中国*H. pylori*分离株*vacA*基因氨基酸变异位点有76个(不包括1个插入位点), 变异率为5.91%. 这些差异位点分布在*vacA*基因不同结构域中, 其中以p55区最多, 变异率最大, 氨基酸变异大部分表现为疏水性氨基酸与极性氨基酸(包括酸、碱和中性氨基酸)之间的转换. 并

且弱细胞毒株与60190株的差异性较强细胞毒株的更大. 强细胞毒株与弱细胞毒株之间变异位点有161个(不包括7个插入/缺失位点), 变异率为12.51%, 仅次于弱细胞毒株与60190株之间的变异率(15.07%, 表4). 此外, 弱细胞毒株在*vacA*基因m区插入了21个氨基酸, 序列完全相同, 但与西方无毒株Tx30a的插入序列有3个氨基酸残基的差异.

2.3 *vacA*基因DNA和氨基酸序列系统发育树构建*vacA*基因DNA和氨基酸序列系统发育树具有非常高的相似性, 其中强细胞毒株和弱细胞毒株

表 4 中国幽门螺杆菌高、弱细胞毒株和60190株*vacA*基因不同结构域氨基酸序列对比分析

比较类型 结构域	SP		p33		p55		SAP		BBD	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
中国分离株对60190株	1	0	10	7	43+1 <sup>m</sup>	25+7 <sup>n</sup>	6+1 <sup>m</sup>	5+1 <sup>n</sup>	16	12
弱细胞毒株对60190株	1	0	16	9+1 <sup>n</sup>	147+7 <sup>m</sup>	90+8 <sup>n</sup>	9+1 <sup>m</sup>	6+2 <sup>n</sup>	21	14+2 <sup>n</sup>
高细胞毒株对60190株	3	1	12	8+1 <sup>n</sup>	67+1 <sup>m</sup>	42+2 <sup>n</sup>	8+1 <sup>m</sup>	6+1 <sup>n</sup>	18	12
高细胞毒株对弱细胞毒株	2	1	7	4+1 <sup>n</sup>	139+7 <sup>m</sup>	83+10 <sup>n</sup>	7	1+3 <sup>n</sup>	6	2+2 <sup>n</sup>

T: 变异位点总数; A: 存在氨基酸残基极性差异的变异位点数; <sup>n</sup>组内存在氨基酸极性差异的变异位点数; <sup>m</sup>插入/缺失位点数.

■ 创新盘点

本研究发现中国 *H. pylori* 高细胞毒株、弱细胞毒株和西方高细胞毒株60190株的*vacA*基因序列存在明显的差异: (1) 序列差异主要表现为p55区的疏水性氨基酸与极性氨基酸之间的转换; (2) 弱细胞毒株存在多个插入变异位点; (3) 三者/system发育树中分别聚类为不同的谱系.

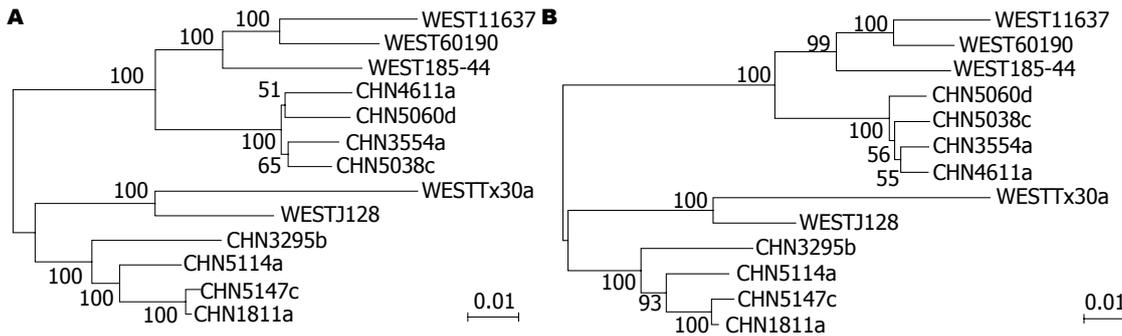


图 1 基于*vacA*基因DNA和氨基酸序列构建的系统发育树. A: DNA序列分析结果; B: 氨基酸序列分析结果. WEST: 西方*H. pylori*分离株, CHN: 中国*H. pylori*分离株.

各自聚为一类, 在强细胞毒株和弱细胞毒株内部中国分离株和西方分离株又各自聚为一个亚类, 并且每一类或亚类都具有很高的支持率(图1).

3 讨论

*vacA*基因编码产物是*H. pylori*的一个重要毒力因子. 虽然所有的*H. pylori*都存在*vacA*基因, 但是临床分离的*H. pylori*菌株仅有50%或者更低的能产生这种毒素. 究其原因, 可能与*vacA*基因序列变异或多态性密切相关. Atherton等<sup>[8]</sup>通过对强细胞毒株60190与无细胞毒株Tx30a遗传差异性分析, 发现两者存在*vacA*基因型差异, 他们认为特定的*vacA*基因型与其细胞毒性的活性和感染的临床结果密切相关. 目前发现*vacA*基因主要存在s1/s2, i1/i2和m1/m2 3个等位基因, 这3个等位基因可以组合形成不同的*vacA*基因型. 此外, *vacA*基因型的分布有明显的地理差异, 中国各省市*vacA*基因型虽然存在一定的差异, s1/m2和s1/m1都存在, 但以s1/m2为主<sup>[11-13, 15]</sup>. 本研究中, 强细胞毒株都为s1/m1型, 弱细胞毒株均为s1/m2型(除Tx30a外). 这一定程度上为“含有s1, i1和m1 *vacA*等位基因的菌株更易导致溃疡性疾病或胃癌的发生”的结果提供了依据.

VacA作为一种蛋白毒素, 特定的空间结构

是其发挥功能的必要条件. 然而蛋白空间结构是由蛋白质的一级结构决定, 因此通过对*vacA*基因DNA和氨基酸序列的分析, 有助于我们揭示导致不同*H. pylori*菌株存在VacA活性差异的原因. 通过序列相似性分析, 我们发现*vacA*基因DNA和氨基酸序列相似性顺序为: 中国*H. pylori*弱细胞毒株组内>强细胞毒株组内>强细胞毒株-60190株>强细胞毒株-弱细胞毒株>弱细胞毒株-60190株. 这一结果说明中国*H. pylori*分离株*vacA*基因DNA和氨基酸序列在强细胞毒株和弱细胞毒株组内都非常保守, 强细胞毒株、弱细胞毒株和西方强细胞毒株60190株三者之间相似性明显降低, 存在明显的差异, 并且这种差异性表现为功能上的差异性小于地理上的差异性, 以功能保守为首要的. Gangwer等<sup>[4]</sup>通过对来自不同国家分离的*H. pylori vacA*基因进行聚类分析发现m1和m2型菌株各自聚为一类, 其中m1型又分为亚洲分离株和非亚洲分离株两个亚型, m2型菌株虽然亚洲和非亚洲分离株没有完全分开, 但是两者也存在一定程度的分离. 纪徐淮等<sup>[15]</sup>研究发现不同来源的*H. pylori*菌株能够分为m1型和m2型两个聚类群, 每一个聚类群又可再分为中国株和西方株两个地理分类亚群. 本研究对中国和西方*H. pylori*分离株的*vacA*基因

### ■应用要点

*vacA* 基因序列的差异, 为揭示不同 *H. pylori* 菌株 VacA 活性存在差异提供了理论依据。此外, 通过对 *vacA* 基因序列的分析还有利于认识不同 *vacA* 基因型与 *H. pylori* 感染临床结果之间的关系。

DNA 序列和氨基酸序列进行聚类分析, 也发现 m1 型强细胞毒株和 m2 型弱细胞毒株各自聚为一类, 在每一大类内部中国分离株和西方分离株又各自聚类为一个亚类。这进一步说明中国 *H. pylori* 强细胞毒株和弱细胞毒株在 *vacA* 基因序列上存在明显的差异, 并且同为强细胞毒株的中国和西方 *H. pylori* 分离株之间也表现为明显的地理差异。

组成人类蛋白质的常见氨基酸有 20 种, 共分为疏水性氨基酸、极性中性氨基酸、酸性氨基酸和碱性氨基酸 4 种, 其中包括酸性、碱性和中性的极性氨基酸常处于蛋白质的外侧, 疏水性氨基酸常处于蛋白质的内侧, 因此蛋白质氨基酸残基极性的改变会直接影响蛋白质空间结构, 进而影响蛋白质的功能发挥。通过对 *vacA* 基因氨基酸序列的深入分析, 我们发现中国 *H. pylori* 分离株与 60190 株相比, *vacA* 基因在氨基酸数量和不同类型氨基酸含量都存在明显的差异, 这种差异性表现为酸性、碱性和疏水性氨基酸含量明显增加, 极性中性氨基酸含量明显降低。其中弱细胞毒株与 60190 株的差异性更大。通过 VacA 不同结构域的进一步分析, 我们发现这些氨基酸残基的差异位点分布在 *vacA* 基因不同结构域中, 其中以 p55 区最多, 变异率最大, 氨基酸变异同样表现为疏水性氨基酸与极性氨基酸(包括酸、碱和中性氨基酸)之间的转换, 并且弱细胞毒株与 60190 株的差异性表现更为明显。这些结果说明组成 *vacA* 基因氨基酸残基的极性变异可能是导致 VacA 结构改变, 进而影响其毒性改变的重要原因。同时 *vacA* 基因 p55 结构域含有多个细胞结合区域, 他在介导 VacA 和靶细胞的相互作用方面具有重要作用, 因此, p55 区氨基酸残基的大范围变异可能会直接影响 VacA 与靶细胞的结合, 进而影响 VacA 活性的发挥。此外, 与 60190 株相比, 我们还发现弱细胞毒株在 p55 结构域中存在多个插入位点, 然而强细胞毒株只存在 1 个中国 *H. pylori* 分离株共有的插入位点。这一结果说明中国 *H. pylori* 弱细胞毒株 *vacA* 基因插入变异可能是导致其活性降低的另一原因。

另外, Ito 等<sup>[7]</sup>通过对日本 *H. pylori* 有细胞毒株和无细胞毒株 *vacA* 基因全长的分析发现, 50% 无细胞毒株存在内部复制、大片段删除、1 bp 插入等导致 VacA 翻译提前终止的突变, 然而有细胞毒株不存在这些突变。在我们的分析中, 弱细胞毒株 *vacA* 基因没有发现这些突变, 这可能是我们的样品量较少, 存在这些突变的中国

*H. pylori* 菌株没有被采集到用于测序分析。同时也可能是导致 VacA 活性差异的原因也像 *vacA* 基因型分布一样存在地理差异性。

总之, 通过对 *vacA* 基因序列的深入分析, 我们发现中国 *H. pylori* 强细胞毒株、弱细胞毒株和西方强细胞毒株三者之间在 *vacA* 基因 DNA 和氨基酸序列上都存在明显的差异, 这些差异性主要集中在 *vacA* 基因 p55 结构域, 表现为疏水性氨基酸与极性氨基酸(包括酸、碱和中性氨基酸)之间的转换。而且, 弱细胞毒株还存在多个插入变异位点。所有这些差异可能是导致不同 *H. pylori* VacA 活性差异的重要原因。此外, 中国和西方 *H. pylori* 分离株系统发育树分析显示, 强细胞毒株和弱细胞毒株、中国和西方分离株分别聚类为不同谱系。

## 4 参考文献

- Pinto-Santini D, Salama NR. The biology of Helicobacter pylori infection, a major risk factor for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1853-1858
- Santacroce L, Cagiano R, Del Prete R, Bottalico L, Sabatini R, Carlaio RG, Prejbeanu R, Vermesan H, Dragulescu SI, Vermesan D, Motoc A, Losacco T. Helicobacter pylori infection and gastric MALTomas: an up-to-date and therapy highlight. *Clin Ter* 2008; 159: 457-462
- Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-10575
- Gangwer KA, Shaffer CL, Suerbaum S, Lacy DB, Cover TL, Bordenstein SR. Molecular evolution of the Helicobacter pylori vacuolating toxin gene *vacA*. *J Bacteriol* 2010; 192: 6126-6135
- Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burrioni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z. Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; 179: 1653-1658
- Cover TL, Blanke SR. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 320-332
- Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kohli Y, Kuriyama M. Full-length sequence analysis of the *vacA* gene from cytotoxic and noncytotoxic Helicobacter pylori. *J Infect Dis* 1998; 178: 1391-1398
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777
- Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Peek RM, Thompson SA, Hawkey CJ, Blaser MJ. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of Helicobacter pylori comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol* 1999; 39: 211-218
- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC.

- A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 926-936
- 11 王晶桐, 刘玉兰. 87株幽门螺杆菌VacA等位基因的分析. *中国消化内镜* 2008; 2: 37-42
- 12 陈学军, 严杰, 毛亚飞, 李立伟. 浙江地区幽门螺杆菌临床菌株vacA优势基因型及其核苷酸序列分析. *浙江大学学报(医学版)* 2003; 32: 24-28
- 13 刘改芳, 韩晓辉, 张彦普, 吴婧, 张玉贞, 赵丽伟, 徐华洲, 姚希肾. 幽门螺杆菌cagA及vacA亚型与胃肠疾病的关系. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 203-205
- 14 Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burrioni D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL, Reytrat JM. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10212-10217
- 15 纪徐淮, Daniela Burrioni, 许国铭, Cristina Pagliaccia, Jean-Marc Reytrat, 屠振兴, 丁华, 杜奕奇, Rino Rappuoli, John L. Telford. 中国幽门螺杆菌vacA基因的等位变异. *中华消化杂志* 2000; 20: 151-154
- 16 李淑德, 许国铭, 纪徐淮, 李兆申. 中国幽门螺杆菌胃上皮细胞白细胞介素的转录能力. *中华内科杂志* 2001; 40: 510-513
- 17 Ji X, Frati F, Barone S, Pagliaccia C, Burrioni D, Xu G, Rappuoli R, Reytrat JM, Telford JL. Evolution of functional polymorphism in the gene coding for the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 206: 253-258
- 18 Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269: 10566-10573
- 19 Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 1994; 12: 307-319

■同行评价  
本研究具有一定的创新性, 角度新颖, 充分利用了国际生命信息资源和研究手段, 科学性较好。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

#### 1 修回稿信件

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

#### 2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

#### 3 版权

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

## 重症急性胰腺炎继发感染易感因素临床分析42例

曲鹏飞, 崔乃强, 王红

### ■背景资料

重症急性胰腺炎因其高并发症、高病死率和病情的多变性,一直是临床医师最为关注并付出大量精力进行探索和研究的疾病之一。后期病死率高达20%-30%,其主要死亡原因是胰腺继发细菌感染,如何有效控制感染发生一直备受关注。

曲鹏飞, 王红, 天津中医药大学第二附属医院普通外科 天津市 300150

崔乃强, 天津市中西医结合急腹症研究所 天津市 300100

国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2006BAI04A15

作者贡献分布: 此研究由曲鹏飞与崔乃强设计; 研究过程由曲鹏飞与王红完成; 数据分析由曲鹏飞完成; 本论文写作由曲鹏飞、崔乃强及王红完成。

通讯作者: 崔乃强, 主任医师, 300100, 天津市, 天津市中西医结合急腹症研究所. jieyong5hao@126.com

电话: 022-60335404

收稿日期: 2011-09-22 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

### Predisposing factors to infection secondary to severe acute pancreatitis: an analysis of 42 cases

Peng-Fei Qu, Nai-Qiang Cui, Hong Wang

Peng-Fei Qu, Hong Wang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China

Nai-Qiang Cui, Tianjin Institute of Acute Abdominal Diseases by Integrated Medicine, Tianjin 300150, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program of China, No. 2006BAI04A15

Correspondence to: Nai-Qiang Cui, Chief Physician, Tianjin Institute of Acute Abdominal Diseases by Integrated Medicine, Tianjin 300100, China. jieyong5hao@126.com

Received: 2011-09-22 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

### Abstract

**AIM:** To conduct a systematic evaluation of predisposing factors to infection secondary to severe acute pancreatitis (SAP).

**METHODS:** The clinical data for 42 patients with infection secondary to SAP who were treated from January 2000 to January 2008 at Tianjin Nankai Hospital were retrospectively analyzed. Univariate and multivariate models were used to find predisposing factors to infection secondary to SAP.

**RESULTS:** The interval between onset and admission (effective treatment time), APACHE-II score, CT score, PO<sub>2</sub>, intestinal function recovery time, and BE were significantly associated with the development of secondary infection in pa-

tients with SAP (OR = 2.846, 7.286, 34.833, 0.350, 24.273, 0.194, all *P* < 0.05).

**CONCLUSION:** The time from onset to admission, APACHE-II score, CT score, PO<sub>2</sub>, intestinal function recovery time, and BE are predisposing factors to infection secondary to SAP.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Secondary infection; Predisposing factor

Qu PF, Cui NQ, Wang H. Predisposing factors to infection secondary to severe acute pancreatitis: an analysis of 42 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3452-3457

### 摘要

**目的:** 总结中西医结合治疗重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)继发感染易感因素。

**方法:** 采集2000-01/2008-01天津市南开医院符合SAP标准的患者217例, 统计分析符合重症急性胰腺炎继发感染的42例患者的临床资料, 对临床和实验室检查20项指标进行单因素、多因素分析。

**结果:** 易感因素临床分析发现SAP患者发病至入院时间(有效治疗给予时间)、APACHE-II评分、CT评分、PO<sub>2</sub>、肠功能恢复时间、BE六项指标继发感染与未感染差异显著(OR = 2.846, 7.286, 34.833, 0.350, 24.273, 0.194, 均*P* < 0.05)。

**结论:** 发病至入院时间(有效治疗给予时间)、APACHE-II评分、CT评分、PO<sub>2</sub>、肠功能恢复时间、BE是SAP继发感染的易感因素。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 继发感染; 易感因素

曲鹏飞, 崔乃强, 王红. 重症急性胰腺炎继发感染易感因素临床分析42例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(33): 3452-3457  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3452.asp>

### 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)

### ■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

因其高并发症、高病死率和病情的多变性, 长期以来一直是临床医师最为关注并付出大量精力进行探索和研究的疾病之一. 近年来尽管在发病机制研究、诊断、病情评估、重要脏器功能维护和手术方式、手术时机选择等方面有了长足进步, 但其病死率仍然居高不下. 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是21世纪胰腺外科面临的一大难题, 轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)病死率约为0%, SAP发病率为3/10 000<sup>[1,2]</sup>, SAP临床病理变化复杂, 起病急, 进展快, 早期即可发生全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 随着诊疗手段的提高, 早期死亡率已明显降低, 而后期病死率高达20%-30%, 其主要死亡原因是胰腺继发细菌感染<sup>[3]</sup>, 其中80%与继发感染有关<sup>[4]</sup>. 如何降低SAP感染并发症的发生及如何有效控制感染发生一直备受关注, 继发感染的早期预测对指导治疗极其重要, 然而临床上对继发感染相关因素在感染发生的判断中一直没有一个明确的标准, 作者通过回顾性分析天津市南开医院2000-01/2008-01收治的217例SAP患者的临床资料, 归纳、分析、总结继发感染的易感因素, 为继发感染的临床预测提供依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2008-01天津市南开医院共收治符合诊断标准的SAP患者217例, 男117例, 女100例, 年龄25-89岁, 平均年龄(54.89±14.71)岁, 其中继发感染患者42例. 诊断标准参照2000年中华医学会外科学分会胰腺外科学组《重症急性胰腺炎诊治原则草案》<sup>[5]</sup>, 及2006年中华医学会外科学分会胰腺外科学组《重症急性胰腺炎诊治指南》SAP的诊断标准及继发感染诊断标准<sup>[6]</sup>.

1.2 方法 对每一份病历进行详细分析总结, 参考Ranson指标、APACHE-II评分系统等选取指标, 作为预处理的易感因素, 观察各参数与胰腺继发感染的OR值、95%CI、P值. 纳入指标如下: (1)年龄≥55岁; (2)发病至入院时间(有效治疗给予时间)≥7 d; (3)性别; (4)心率≥130次/L; (5)红细胞压积HCT<30.0%或HCT≥46.0%; (6)APACHE-II评分≥10分; (7)CT评分≥5分; (8)白蛋白ALB<30 g/L; (9)总胆红素T-BIL≥34 μmol/L; (10)T≥38.5 °C; (11)白细胞WBC≥19.0×10<sup>9</sup>/L;

(12)氧分压PO<sub>2</sub><60 mmHg; (13)肌酐 CR<54 μmol/L或GR≥129 μmol/L; (14)肠功能恢复时间≥5 d; (15)血糖GLU≥11.1 mmol/L; (16)血淀粉酶AMY≥220 U/L; (17)酸碱度pH值≥7.45或PH值<7.35; (18)剩余碱BE<-4 mmol/L; (19)C-反应蛋白CRP≥8.2 mg/L; (20)血钙Ca<2.0 mmol/L.

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 采用四表格 $\chi^2$ 检验及前向逐步Logistic回归分析, 求得各指标与胰腺继发感染相关的OR值、95%CI、P值, 建立SAP继发细菌感染的Logistic回归方程.

## 2 结果

2.1 中西医结合治疗SAP病死率及感染率 继发感染率19.35%, 217例患者死亡26例, 死于继发感染后的10例, 总病死率11.98%, 感染导致的病死率38.46%.

2.2 SAP继发感染的易感因素 纳入分析的20项与继发感染有关的指标通过四表格 $\chi^2$ 检验及前向逐步Logistic回归分析, 所选定的20项指标处理结果(表1). 其中6项指标中的继发感染与未感染差异显著( $P<0.05$ ). 即: 发病至入院时间(有效治疗给予时间)、APACHE-II评分、Balthazar CT重症度指数、PO<sub>2</sub>、肠功能恢复时间、BE, 是重症胰腺炎继发感染的易感因素.

2.3 Logistic回归方程的建立 对纳入的6因素进行非限定量多元条件Logistic回归分析, 整理后结果见表2. 共有4个变量进入回归方程, 即: Balthazar CT重症度指数、肠功能恢复时间、BE、发病至入院时间, 他们相应的偏回归系数(B)分别为0.713、0.420、-0.167、0.002, 标准化参数估计值Exp(B)分别为2.041、1.521、0.846、1.002, 常数为-8.037.

BE的偏回归系数为负值, 表明BE越低感染的危险性越大; 而Balthazar CT重症度指数、肠功能恢复时间、发病至入院时间3项指标的偏回归系数为正值, 表明Balthazar CT重症度指数、肠功能恢复时间、发病至入院时间数值越高则感染的危险性大, Balthazar CT重症度指数标准化参数估计值为2.041大于其他标准化参数估计值, 故Balthazar CT重症度指数的相对贡献要较BE、肠功能恢复时间、发病至入院时间的贡献大. 方程中设Balthazar CT重症度指数为 $X_1$ , 单位为分; 肠功能恢复时间为 $X_2$ , <5 d为0, ≥5 d为1; 设BE为 $X_3$ , 单位为mmol/L; 发病至入院时间为 $X_4$ , 单

**■ 研发前沿**  
胰腺感染是重症急性胰腺炎后期死亡的主要原因, 目前对后期继发感染的预测标准很少, 为了判定患者继发细菌感染的可能是否存在, 需要更加准确、简便、可靠、可行的预测坏死胰腺继发感染的临床预测体系, 来预测SAP继发感染.

## ■相关报道

有研究报道APACHE评分能很好地预测SAP坏死、感染坏死,在多变量分析中被发现与继发感染有关,Balthazar CT评分、PO<sub>2</sub>、HCT、BE血钙等亦表明与继发感染相关。

表1 各因素的OR值、95%CI、P值

因素	感染(n)	无感染(n)	OR值	95%CI	P值
年龄	21	89	0.961	0.394-2.432	0.930
发病至入院时间	16	46	2.846	1.138-7.117	0.022 <sup>a</sup>
性别	15	89	0.813	0.333-1.987	0.649
心率	13	34	1.755	0.638-4.830	0.272
HCT	13	64	0.710	0.266-1.848	0.471
APACHE-II评分	36	95	7.286	2.043-25.987	0.000 <sup>a</sup>
Balthazar CT	39	45	34.833	7.630-159.033	0.000 <sup>a</sup>
ALB	14	56	1.113	0.431-2.874	0.825
T-BIL	13	35	1.674	0.601-4.510	0.328
T	4	20	0.736	0.152-3.561	0.702
WBC	11	39	1.182	0.419-3.337	0.752
PO <sub>2</sub>	25	140	0.350	0.136-0.903	0.026 <sup>a</sup>
CR	14	71	1.390	0.544-3.549	0.490
肠功能恢复时间	32	20	24.273	7.949-74.115	0.000 <sup>a</sup>
GLU	14	63	0.929	0.362-2.384	0.878
血AMY	32	109	1.839	0.671-5.040	0.232
PH值	13	81	0.396	0.150-1.037	0.054
BE	30	56	0.194	0.730-5.140	0.000 <sup>a</sup>
CRP	23	118	0.582	0.236-1.438	0.238
血Ca	27	97	0.733	0.294-1.832	0.506

<sup>a</sup>P<0.05.

表2 多元条件Logistic回归分析结果

Variable	B	Sig of the change	Exp(B)
Balthazar CT(X <sub>1</sub> )	0.713	0.000	2.041
肠功能恢复时间(X <sub>2</sub> )	0.420	0.000	1.521
BE(X <sub>3</sub> )	-0.167	0.009	0.846
发病至入院时间(X <sub>4</sub> )	0.002	0.047	1.002
常数(constant)		-8.037	

表3 SAP肺、肠功能损伤与感染

脏器	判断指标	感染	未感染	P值
肺	PO <sub>2</sub> <70 mmHg	25	68	0.012
	PO <sub>2</sub> ≥70 mmHg	17	149	
肠	腹胀、不能进食≥5 d	32	19	0.000
	腹胀、不能进食<5d	10	152	

位为d. 根据上述统计结果得出回归方程:  $Y = \text{logit}(\text{odds}) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + \epsilon$ ;  $Y = 0.713X_1 + 0.420X_2 - 0.167X_3 + 0.002X_4 - 8.037$ .

2.4 SAP肺、肠功能损伤与感染 依据MODS肺功能不全和胃肠功能不全诊断标准,判断肺、肠损伤与SAP继发感染的关系,分析资料发现PO<sub>2</sub>≥70 mmHg时SAP继发感染17例,未感染149例;PO<sub>2</sub><70 mmHg时SAP继发感染25例,未感染68例,经四格表 $\chi^2$ 检验 $P = 0.012 < 0.05$ ,有统计学意义.腹胀,不能耐受进食5 d以上发生SAP继发感染32例,未感染19例,5 d以内的感染10例,未感染152例,经四表格 $\chi^2$ 检验 $P = 0.000 < 0.01$ ,差异显著(表3).说明肺功能损伤,PO<sub>2</sub><70 mmHg,胃肠功能损伤,腹胀、不能耐受进食5 d以上时SAP继发感染容易发生.

## 3 讨论

经中西医结合治疗,继发感染率19.35%,明显低于国外报道30%,217例患者死亡26例,死于继发感染后的10例,总病死率11.98%,明显低于同期国外报道的40%<sup>[7]</sup>,感染导致的病死率38.46%,明显低于国外报道的80%.感染是重症急性胰腺炎常见的并发症,是引起死亡的重要危险因素,坏死胰腺继发感染使SAP预后更差,并使死亡率增加3倍<sup>[8]</sup>.胰腺坏死中无菌性坏死死亡率为0%-10%,而感染后病死率则增大到30%<sup>[9-11]</sup>.感染的发生与胰腺及胰周组织的坏死关系密切,坏死的范围越大感染发生的机会越多<sup>[12,13]</sup>.胰腺坏死超过30%,感染发生率为30%-40%<sup>[14,15]</sup>.Beger等<sup>[12]</sup>报道胰腺组织坏死量超过50%,其感染率达100%,这是因为坏死组织是细菌生长理想的培养基.另外,坏死组织周围血管内血栓的形

成和低灌注使抗菌素不能到达坏死的胰腺及其周围组织<sup>[16]</sup>, 使这一区域成为细菌繁殖的有利场所。

SAP感染坏死的发展在预测和治疗过程中是至关重要的, 因此判断患者发展成为继发胰腺感染的早期临床诊断极其重要, 一系列生化指标和几个多因子评分系统在判断胰腺炎患者是否属于重症胰腺炎方面已被采用, 但是这些标志物在确定患者是否是胰腺坏死继发感染方面的作用仍不确定<sup>[17]</sup>。研究发现<sup>[18]</sup>在SAP继发细菌感染方面最合适CRP的阈值为300 mg/L(敏感性83%, 特异性78%, 准确度84%, AUC = 0.86)。Riché等<sup>[19]</sup>研究发现IL-6在胰腺坏死(感染和无菌)都增高, 但在坏死感染的SAP发病头3 d中升高更明显( $P < 0.04$ ), 另外曲线下面积IL-6高于急性生理评分II(SAPS II), Ranson评分, 和CTSI评分, 分别为0.77、0.75、0.65、0.67。Rau等<sup>[20]</sup>发现IL-8在SAP发病第1天集中值在坏死感染病人明显高于无菌坏死, 最好阈值为112 pg/mL(敏感性72%; 特异性75%; 准确度74%, AUC = 0.70)。最近研究<sup>[21,22]</sup>表明, IL-6 < 400 pg/L结合PCT < 2 ng/L能最好预示胰腺继发感染发生率可能性不大和预防性使用抗生素无用, 监测血清PCT是一个非侵袭性的、准确的预测感染性坏死的新标志物。术前细针穿刺诊断感染坏死和无菌坏死的准确性为84% (敏感性90%; 特异性79%)而PCT为87% (敏感性80%; 特异性93%)。PCT在坏死感染( $8.5 \text{ ng/mL} \pm 4.8 \text{ ng/mL}$ )显著高于发病第1周无菌坏死( $< 1.2 \text{ ng/mL}$ ), 综合上述研究发现APACH II评分、CRP、IL-6、IL-8、PCT等指标可能对预测SAP继发胰腺感染有价值。

目前研究表明感染并发症是重症急性胰腺炎死亡的主要原因, 占重症胰腺炎死亡人数的80%以上<sup>[14]</sup>。胰腺感染是疾病后期死亡的主要原因, 因此了解影响感染的因素对提高生存率尤为重要。目前对重症胰腺炎后期继发感染的预测标准很少, 为了判定患者继发细菌感染的可能是否存在, 我们需要更加准确、简便、可行的预测坏死胰腺继发感染的临床预测体系, 综合临床研究显示我们仍然没有一个理想模型预测SAP患者胰腺坏死继发感染, 因此需要一个更加可靠的临床预测体系来预测SAP继发感染。我们对217例资料完整的重症胰腺炎患者进行分析, 结果表明发病至入院时间(有效治疗给予时间)、APACHE-II评分、Balthazar CT重症度指数、PO<sub>2</sub>、肠功能恢复时间、BE是重

症胰腺炎继发感染的易感因素, 通过对非限定参数指标进行多元条件Logistic回归分析发现Balthazar CT重症度指数、肠功能恢复时间、BE、发病至入院时间, 他们相应的偏回归系数(B)分别为0.713、0.420、-0.167、0.002, 标准化参数估计值Exp(B)分别为2.041、1.521、0.846、1.002, 常数为-8.037。建立回归方程为:  $Y = 0.713X_1 + 0.420X_2 - 0.167X_3 + 0.002X_4 - 8.037$ 。说明该4项指标对感染发生的意义最大, 需要给予高度重视。

在预测SAP后期继发细菌感染方面, Halonen等<sup>[23]</sup>研究表明在预测SAP继发感染的预测中目前所用的评分系统或临床检测指标不是十分一致, APACHE评分能很好地预测SAP坏死、感染坏死, 在多变量分析中被发现与继发感染有关。通过分析我们的结果与之相符。

PO<sub>2</sub>是SAP的早期预测指标, 低氧血症本身会促使大量钙离子流入细胞内, 钙离子内流一方面激活磷脂细胞系统, 导致溶酶体膜破坏和酶的释放, 另一方面促发大量毒性炎症介质的释放, 进一步促使胰腺、肺、肾、脑、心等组织细胞膜磷脂结构分解, 加重脏器的损害, 可能是一种早期的MODS信号, 应及时识别和纠正。我们研究发现肺功能损伤, PO<sub>2</sub> < 70 mmHg时SAP继发感染更容易发生。Polyzogopoulou等<sup>[24]</sup>研究发现, 基线动脉氧分压 < 60 mmHg是急性胰腺炎患者发生严重肺部并发症, 如急性呼吸窘迫综合征的独立危险因素, 也是急性胰腺炎患者死亡的独立危险因素。雷俊宝等<sup>[25]</sup>研究表明SAP患者早期即可出现显著的PO<sub>2</sub>下降和CRP升高, 且PO<sub>2</sub>、CRP的动态变化与疾病的严重程度密切相关。血CRP > 120 mg/L同时PO<sub>2</sub> < 60 mmHg, 常提示SAP有并发症, 预后差, 是提示胰腺病变严重程度及可能发生重要器官功能损害的高危因素, 可作为重症急性胰腺炎的早期预测指标。徐晓等<sup>[26]</sup>研究发现水肿型和坏死型胰腺炎比较BE分别是 $1.87 \pm 4.85$ 和 $-2.35 \pm 5.89$ , 两组间比较 $P < 0.05$ , 差异显著。坏死型组PCO<sub>2</sub>、PO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、BE均明显低于水肿型组, PH、阴离子隙(AG)两组无显著差异, 坏死型组酸碱紊乱较严重。提示急性胰腺炎发病后48 h内行动脉血气分析并对其进行连续监测, 对判断病情严重度及预后具有重要意义。

CT评分指标于1990年由Balthazar和Ranson提出<sup>[27]</sup>, 能准确地描述胰腺坏死的存在和范围, 与胰腺炎严重程度、死亡率、住院天数和坏死

**■ 创新盘点**  
本文就多个指标进行非限定量多元条件Logistic回归分析, 为临床SAP继发感染建立回归方程。

### 同行评价

本文分析较为科学、合理、透彻,对急性胰腺炎继发感染的认识具有理论意义和临床应用价值。

组织切除术存在明显相关性<sup>[28,29]</sup>。CT扫描和动态增强扫描对照,是诊断SAP的“金标准”<sup>[30]</sup>,他可以对疾病做出正确的诊断,判断炎症反应分期及发现并发症,特别是能发现胰腺实质和胰腺周围坏死的定性和定量分析,CT对比增强扫描不仅能区分水肿和出血性胰腺炎,为临床提供合理的治疗方案,甚至还可以发现病因、判断预后。作为一种非侵入性的检查方法,是目前公认的最有价值的影像学检查手段。CT如显示胰周有积气,胰腺大片坏死,患者高热不退则高度怀疑胰腺感染<sup>[1]</sup>。研究发现<sup>[31]</sup>进行一次及多次CT扫描与增强扫描对比,诊断及严重度区分准确率达82%。CT评分7-10分的患者并发症发生率与病死率明显高于评分<7分者。出现器官衰竭和发生胰腺坏死者见于D、E两级。

胰腺坏死,腹腔内大量液体渗出以及休克,致肠蠕动功能丧失,肠道黏膜上皮因缺血大量坏死脱落,肠黏膜结构破坏,造成肠道正常屏障功能破坏,导致肠道微循环改变,肠功能衰竭,加速肠菌易位,造成继发感染<sup>[32]</sup>。SAP的胃肠麻痹发生可导致肠道内压力增高和细菌毒素的过度产生,进一步引起肠道内细菌和毒素的移位,从而使SAP严重化,可致再次出现MODS。急性胰腺炎的肠运动状态是决定病程和预后的重要因素之一<sup>[33]</sup>。我们研究发现SAP伴有肠麻痹患者,肠功能 $\geq 5$  d恢复者的继发感染率明显高于<5 d内恢复者。 $P = 0.000, P < 0.01$ ,差异显著。同是我们通过分析发现SAP患者发病至入院治疗时间,即有效治疗给予距发病时的时间越长,后期继发细菌感染的几率越大,两者比较 $P = 0.022, P < 0.05$ ,差异具有显著性。

重症急性胰腺炎继发细菌感染与患者的预后有很大的相关性,继发感染以后病死率明显高于无感染患者,临床上对继发感染的预测相当重要。目前对重症胰腺炎后期继发感染的预测标准很少,为了判定患者继发细菌感染的可能是否存在,我们需要确定更加准确,简便,可行的预测坏死胰腺继发感染的临床预测体系。因此本文对217例资料完整的重症胰腺炎患者进行研究,分析继发感染的易感因素,结果表明发病至入院时间(有效治疗给予时间)、APACHE-II评分、Balthazar CT重症度指数、 $PO_2$ 、肠功能恢复时间、BE是重症胰腺炎继发感染的易感因素,通过对非限定参数指标进行多元条件Logistic回归分析发现Balthazar CT重症度指数、肠功能恢复时间、BE、发病

至入院时间,他们相应的偏回归系数(B)分别为0.713、0.420、-0.167、0.002,标准化参数估计值 $\text{Exp}(B)$ 分别为2.041、1.521、0.846、1.002,常数为-8.037。建立回归方程为: $Y = 0.713X_1 + 0.420X_2 - 0.167X_3 + 0.002X_4 - 8.037$ 。说明该4项指标对感染发生的意义最大,需要给予高度重视。

### 4 参考文献

- 1 Yousaf M, McCallion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 407-420
- 2 Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
- 3 Abu-Zidan FM, Bonham MJ, Windsor JA. Severity of acute pancreatitis: a multivariate analysis of oxidative stress markers and modified Glasgow criteria. *Br J Surg* 2000; 87: 1019-1023
- 4 Wyncoll DL. The management of severe acute necrotising pancreatitis: an evidence-based review of the literature. *Intensive Care Med* 1999; 25: 146-156
- 5 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治原则草案. *中华外科杂志* 2001; 39: 963-964
- 6 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治指南. 第十一届全国胰腺外科学术研讨会论文汇编 2006: 27-30
- 7 Triester SL, Kowdley KV. Prognostic factors in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 167-176
- 8 Bassi C. Infections in pancreatic inflammatory disease: clinical trials for antibiotic prophylaxis. *Pancreatol* 2001; 1: 210-212
- 9 Baron TH, Morgan DE. Acute necrotizing pancreatitis. *N Engl J Med* 1999; 340: 1412-1417
- 10 Rau B, Pralle U, Uhl W, Schoenberg MH, Beger HG. Management of sterile necrosis in instances of severe acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 279-288
- 11 Le Mée J, Paye F, Sauvanet A, O'Toole D, Hammel P, Marty J, Ruszniewski P, Belghiti J. Incidence and reversibility of organ failure in the course of sterile or infected necrotizing pancreatitis. *Arch Surg* 2001; 136: 1386-1390
- 12 Beger HG, Büchler M, Bittner R, Block S, Nevalainen T, Roscher R. Necrosectomy and postoperative local lavage in necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 1988; 75: 207-212
- 13 Ho HS, Frey CF. Gastrointestinal and pancreatic complications associated with severe pancreatitis. *Arch Surg* 1995; 130: 817-822; discussion 822-823
- 14 Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21: 130-135
- 15 Rau B, Uhl W, Buchler MW, Beger HG. Surgical treatment of infected necrosis. *World J Surg* 1997; 21: 155-161
- 16 Ho HS, Frey CF. The role of antibiotic prophylaxis in severe acute pancreatitis. *Arch Surg* 1997; 132: 487-492; discussion 492-493
- 17 Dambrauskas Z, Pundzius J, Barauskas G. Predicting development of infected necrosis in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42: 441-449

- 18 Armengol-Carrasco M, Oller B, Escudero LE, Roca J, Gener J, Rodríguez N, del Moral P, Moreno P. Specific prognostic factors for secondary pancreatic infection in severe acute pancreatitis. *Dig Surg* 1999; 16: 125-129
- 19 Riché FC, Cholley BP, Laisné MJ, Vicaut E, Panis YH, Lajeunie EJ, Boudiaf M, Valleur PD. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 257-262
- 20 Rau B, Pralle U, Mayer JM, Beger HG. Role of ultrasonographically guided fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of infected pancreatic necrosis. *Br J Surg* 1998; 85: 179-184
- 21 Mándi Y, Farkas G, Takács T, Boda K, Lonovics J. Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6, and sICAM-1 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000; 28: 41-49
- 22 Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grünert A, Beger HG. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* 1997; 41: 832-840
- 23 Halonen KI, Leppäniemi AK, Lundin JE, Puolakainen PA, Kempainen EA, Haapiainen RK. Predicting fatal outcome in the early phase of severe acute pancreatitis by using novel prognostic models. *Pancreatol* 2003; 3: 309-315
- 24 Polyzogopoulou E, Bikas C, Danikas D, Koutras A, Kalfarentzos F, Gogos CA. Baseline hypoxemia as a prognostic marker for pulmonary complications and outcome in patients with acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 150-154
- 25 雷俊宝, 房太勇. 联合检测C反应蛋白和动脉血氧分压对重症急性胰腺炎早期预测的临床意义. *临床医学杂志* 2006; 26: 83-84
- 26 徐晓, 许永华, 赵良. 急性胰腺炎血气及酸碱失衡分析. *浙江中西医结合杂志* 2004; 14: 494
- 27 Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990; 174: 331-336
- 28 Lankisch PG, Struckmann K, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Do we need a computed tomography examination in all patients with acute pancreatitis within 72 h after admission to hospital for the detection of pancreatic necrosis? *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 432-436
- 29 Chatzicostas C, Roussomoustakaki M, Vardas E, Romanos J, Kouroumalis EA. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE II and III scoring systems in predicting acute pancreatitis outcome. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 253-260
- 30 郭希菊. 重症急性胰腺炎的诊治进展. *临床消化杂志* 2005; 17: 96-98
- 31 王约青, 周鸣清, 赵坚, 沈承澜. APACHE-II, Ranson, Balthazar评估系统对重症急性胰腺炎诊断及预后评估的参考价值. *临床外科杂志* 2007; 15: 109-111
- 32 阮洁明, 沈跃建, 莫耘松, 白玉芬. 大承气汤加味灌肠治疗急性胰腺炎肠麻痹36例. *中国中医急症* 2006; 15: 1289
- 33 周钧, 钟德许, 欧阳迪平, 周四保, 陈迈群, 彭进. 乌司他丁、大黄对急性胰腺炎大鼠联合治疗效果分析. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 284-285

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 2009-03-26)

# 小剂量三环类抗抑郁药治疗肠易激综合征疗效及安全性的荟萃分析

王西艳, 冯玉光, 张红梅, 鞠丽英, 白红霞, 高桂鹏, 张金花

## ■背景资料

近年来的研究发现肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是多因素共同作用的结果, 主要涉及胃肠动力异常、内脏感觉过度敏感、中枢及周围神经系统高敏感、肠道炎症与免疫功能改变、社会心理因素等。

王西艳, 冯玉光, 张红梅, 鞠丽英, 白红霞, 高桂鹏, 张金花, 潍坊医学院山东省潍坊市 261042

作者贡献分布: 本课题由冯玉光与王西艳设计; 数据分析由王西艳、冯玉光及张红梅完成; 研究过程由王西艳、冯玉光、张红梅、鞠丽英、白红霞、高桂鹏及张金花共同完成; 本论文写作由王西艳与冯玉光完成。

通讯作者: 冯玉光, 博士, 副教授, 261042, 山东省潍坊市虞河路465号, 潍坊医学院附属医院消化内科。f-yg2008@163.com  
电话: 0536-8068912

收稿日期: 2011-09-30 修回日期: 2011-11-01

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

## Efficacy and safety of low-dose tricyclic antidepressants in patients with irritable bowel syndrome: a meta-analysis

Xi-Yan Wang, Yu-Guang Feng, Hong-Mei Zhang, Li-Ying Ju, Hong-Xia Bai, Gui-Peng Gao, Jin-Hua Zhang

Xi-Yan Wang, Yu-Guang Feng, Hong-Mei Zhang, Li-Ying Ju, Hong-Xia Bai, Gui-Peng Gao, Jin-Hua Zhang, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Correspondence to: Yu-Guang Feng, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China. f-yg2008@163.com

Received: 2011-09-30 Revised: 2011-11-01

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

## Abstract

**AIM:** To systematically assess the efficacy and safety of low-dose tricyclic antidepressants (TCAs) for irritable bowel syndrome (IBS).

**METHODS:** PubMed, The Cochrane Central Register of Controlled Trials and Chinese Biomedical Literature Database, and CNKI were searched for double-blind, placebo-controlled trials investigating the efficacy of TCAs in the management of IBS. The Revman4.2 software provided by the Cochrane Collaboration was used for assessment.

**RESULTS:** Eight placebo-controlled, double-blind, randomized trials including 334 patients were involved in this analysis. TCAs used in these studies included amitriptyline, imipra-

mine, desipramine, doxepin and trimipramine. Compared to placebo (40.76%), TCAs (72.43%) were associated with a higher rate of global symptom relief [40.76% vs 72.43%;  $RR = 1.79$ , 95%CI = (1.48, 2.17),  $P < 0.05$ ]. There was a greater improvement in abdominal pain score [SMD = -1.68, 95%CI = (-3.13, -0.23),  $P < 0.05$ ] with TCAs than placebo. There was no significant difference in the incidence of serious adverse events between the TCA and placebo groups [ $RR = 1.34$ , 95%CI = (0.91, 1.96),  $P > 0.05$ ].

**CONCLUSION:** Low-dose TCAs may be effective and safe in relief of the symptoms of IBS patients, especially in the improvement of abdominal pain score.

**Key Words:** Tricyclic antidepressants; Irritable bowel syndrome; Systematic review; Meta-analysis

Wang XY, Feng YG, Zhang HM, Ju LY, Bai HX, Gao GP, Zhang JH. Efficacy and safety of low-dose tricyclic antidepressants in patients with irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3458-3463

## 摘要

**目的:** 系统评价三环类抗抑郁药治疗肠易激综合征的疗效和安全性。

**方法:** 计算机检索PubMed数据库、Cochrane图书馆临床对照试验数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库, 查找三环类抗抑郁药治疗肠易激综合征的双盲安慰剂随机对照试验, 应用Cochrane协作网提供的Revman4.2软件进行分析评价。

**结果:** 共纳入8项试验, 334例患者。治疗使用的药物包括阿米替林、米帕明、地昔帕明、多虑平、三甲丙咪嗪。高质量的随机对照试验表明, 三环类抗抑郁药改善肠易激综合征总体症状缓解率(72.43%)明显高于安慰剂(40.76%) [ $RR = 1.79$ , 95%CI = (1.48, 2.17),  $P < 0.05$ ], 改善腹痛评分疗效优于安慰剂 [SMD = -1.68, 95%CI = (-3.13, -0.23),  $P < 0.05$ ], 不良反

## ■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

应的发生率与安慰剂组相比无明显统计学差异[RR = 1.34, 95%CI = (0.91, 1.96),  $P > 0.05$ ].

**结论:** 小剂量三环类抗抑郁药对减轻肠易激综合征患者的各种症状、特别是缓解腹痛方面是有效和安全的。

**关键词:** 三环类抗抑郁药; 肠易激综合征; 系统评价; 荟萃分析

王西艳, 冯玉光, 张红梅, 鞠丽英, 白红霞, 高桂鹏, 张金花. 小剂量三环类抗抑郁药治疗肠易激综合征疗效及安全性的荟萃分析. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3458-3463  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3458.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的胃肠道功能紊乱性疾病, 临床表现为腹痛、腹胀、排便习惯改变和大便性状异常等症, 但病理上缺乏可以解释的器质和结构改变<sup>[1]</sup>. 许多IBS患者同时伴有焦虑抑郁症状, 我国的一项大型流行病学调查表明, IBS人群抑郁、焦虑症状患病率为24.8%, 其中69.6%的患者症状较重, 达到了抑郁和(或)焦虑障碍的诊断标准<sup>[2]</sup>. 目前临床上治疗IBS的方法很多, 但均不甚理想. 近年来, 临床和基础研究发现, 抗抑郁药可通过改变IBS患者内脏痛觉传入神经及胃肠道运输制等多种机制改善患者的肠道及精神心理症状, 提高患者的生存质量. 其中三环类抗抑郁药(tricyclic antidepressants, TCAs)较早应用于临床治疗IBS, 取得较好疗效, 现对其疗效及安全性进行系统评价.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 检索PubMed数据库(1966/2011-02)、Cochrane 图书馆临床对照试验数据库(The Cochrane Central Register of Controlled Trials)(2011年)、中国生物医学文献数据库(1978/2011-02)、中国期刊全文数据库(1979/2011-02); 检索词: 三环类抗抑郁药、阿米替林、阿莫沙平、氯丙咪嗪、地昔帕明、多虑平、丙咪嗪、去甲替林、或曲米帕明, 肠易激综合征, 随机对照. 由2名研究者分别对检索到的文献进行筛选, 确定符合纳入标准的文献, 并对纳入研究的实验进行质量评价和资料提取, 遇意见不一致, 则通过讨论解决或由第3位研究人员协助解决分歧. 质量评价采用Jadad评分法<sup>[3]</sup>评分: (1)作者叙述为随机法; (2)随机方法正确或

(和)采用分配隐藏; (3)双盲; (4)描述盲法, 指出对照和研究干预的不可辨别性; (5)全程随访并指出失访及退出人数及理由. 每点1分, 总分 $\geq 3$ 分为高质量研究,  $\leq 2$ 分为低质量研究.

**1.2 方法** 临床试验纳入标准: (1)研究设计: 双盲安慰剂随机对照试验; (2)研究对象: 成人IBS患者以Manning或罗马标准为诊断标准; (3)研究内容: 三环类抗抑郁药对IBS的疗效; (4)疗效评价: 以各研究定义的疗效判断为准, 并对症状改善加以分析. 排除标准: (1)未设对照或以健康人作为对照组; (2)研究对象年龄 $< 18$ 岁; (3)IBS诊断标准不明; (4)摘要等非全文文献; (5)质量评分低于2分的低质量文献.

**统计学处理** 应用Cochrane协作网提供的Revman4.2进行数据分析. 对试验结果采用 $\chi^2$ 检验进行异质性分析, 若有异质性( $P < 0.05$ ), 选用随机效应模型计算; 反之, 用固定效应模型. 总体疗效以各研究定义的疗效判断为准. 对于二分变量使用相对危险度(relative risk, RR), 对连续性变量使用标准化均差(standardized mean difference, SMD), 两者均采用95%的可信区间(confidence interval, CI). 若各临床试验提供的数据无法进行荟萃分析, 则只进行描述性的定性系统评价. 若荟萃分析结果显示疗效差异有统计学意义, 则进行敏感性分析判断结果的稳定性; 漏斗图分析发表偏倚.

## 2 结果

**2.1 纳入试验状况** 根据纳入标准共131篇文献入选. 通过阅读标题、摘要、查阅全文, 并排除Jadad评分 $\leq 2$ 分的低质量随机对照试验, 最后共有8个临床试验<sup>[4-11]</sup>纳入本次分析, 包括334例患者. 其中Morgan等<sup>[7]</sup>的试验对象为女性患者, 其余实验同时研究男女患者. 2篇研究<sup>[8,9,11]</sup>腹泻为主型IBS, 2篇<sup>[4,6]</sup>未提及分型, 其余4篇包含各型IBS患者. 试验使用的三环类抗抑郁药包括阿米替林4篇、地昔帕明1篇、丙咪嗪2篇、三甲丙咪嗪1篇. 其中Talley等<sup>[8]</sup>应用丙咪嗪、西酞普兰与安慰剂对照, 其余为安慰剂对照. 各临床试验特征描述见表1.

**2.2 纳入试验的方法学质量评估** 采用Jadad评分法评分, 方法学质量评估结果见表1. 纳入研究的试验评分都在3分或3分以上, 均属高质量研究. 试验均采用盲法, 除1篇<sup>[11]</sup>采用单盲对照外, 其余均为双盲对照, 其中3篇<sup>[8-10]</sup>采用电脑随机数表分组, 并介绍了分配隐藏; 试验中有5篇<sup>[5,7,10]</sup>记

### ■ 研发前沿

多项报道表明, 抗抑郁药可以改善IBS患者症状及生活质量且安全性好, 但是亦有结果相反的报道. 本研究对小剂量三环类抗抑郁药治疗IBS的安慰剂随机对照试验进行荟萃分析, 证明小剂量三环类抗抑郁药方案的有效性及其安全性, 为临床应用提供参考.

### ■ 相关报道

Abdul-baki等人的研究显示抗抑郁药对IBS的疗效不依赖剂量, 低剂量抗抑郁药对痛觉和神经的调节作用要强于其抗抑郁作用.

### ■创新盘点

传统认为三环类抗抑郁药不良反应影响其临床应用,本研究证明小剂量三环类抗抑郁药治疗IBS是安全有效的。

表 1 纳入研究的试验特征及质量评估

作者	年份	平均年龄	女/男	IBS类型	TCA类型	剂量	疗程(wk)	质量学评分
Myren等 <sup>[4]</sup>	1982	39.2	61(33/28)	ND	三甲丙咪嗪	50 mg/d (4 wk)	4	5
Green-baum等 <sup>[5]</sup>	1987	45.2	28(17/11)	D-IBS, C-IBS	地昔帕明	50 mg/d (第1周), 100 mg/d (第2周), 150 mg/d (第3-6周)	6	4
Rajagopalan等 <sup>[6]</sup>	1998	34.8	22(11/11)	ND	阿米替林	25 mg/d (第1周), 50 mg/d (第2周), 75 mg/d (第3-12周)	12	4
Morgan等 <sup>[7]</sup>	2005	39	19(19/0)	D-IBS, C-IBS, Alt-IBS	阿米替林	25 mg/d (第1周), 50 mg/d (第2-4周)	4	4
Talley等 <sup>[8]</sup>	2008	N	34(21/13)	D-IBS, C-IBS, Alt-IBS	丙咪嗪	25 mg/d (第1周), 50 mg/d (第2-12周)	12	4
Vahedi等 <sup>[9]</sup>	2008	36	50(21/29)	D-IBS	阿米替林	10 mg/d (8 wk)	8	5
Abdul-baki等 <sup>[10]</sup>	2009	43.8	56(-/-)	D-IBS, C-IBS, Alt-IBS	丙咪嗪	25 mg/d (第1-12周), 必要者25 mg/d (第1周)	12	4
蒋小猛等 <sup>[11]</sup>	2009	41	64(22/42)	D-IBS	阿米替林	12.5 mg/d(6 wk)	6	3

D-IBS: 腹泻型肠易激综合征; C-IBS: 便秘型肠易激综合征; Alt-IBS: 交替型肠易激综合征; N: 年龄不清楚; ND: IBS类型未区分。

表 2 症状改善及安全性评价

作者	年份	总体缓解率观察指标	总体缓解率		腹痛疗效		不良反应	
			TCA	PL	TCA	PL	TCA	PL
Myren等 <sup>[4]</sup>	1982	患者主观感觉健康	25/30	21/31				
Green-baum等 <sup>[5]</sup>	1987	总体症状改善	15/28	5/28	-58.96 ± 19.37	-13.93 ± 17.76		
Rajagopalan等 <sup>[6]</sup>	1998	总体症状改善	7/11	3/11				
Morgan等 <sup>[7]</sup>	2005	IBS症状改善	13/19	5/19				
Talley等 <sup>[8]</sup>	2008	IBS症状缓解	9/9	9/13	-45.3 ± 26.3	-7.4 ± 46.9		
Vahedi等 <sup>[9]</sup>	2008	试验结束时症状完全消失或至少有2项症状消失	17/25	7/25			16/25	10/25
Abdul-baki等 <sup>[10]</sup>	2009	主观总体症状缓解, 生活质量	25/31	12/25			14/59	6/48
蒋小猛等 <sup>[11]</sup>	2009	治疗症状改善	23/32	13/32			11/32	13/32

录了退出及理由, 1篇<sup>[6]</sup>只记录了退出人数, 2篇<sup>[4,11]</sup>试验中所有患者全部完成了试验。

### 2.3 疗效评价

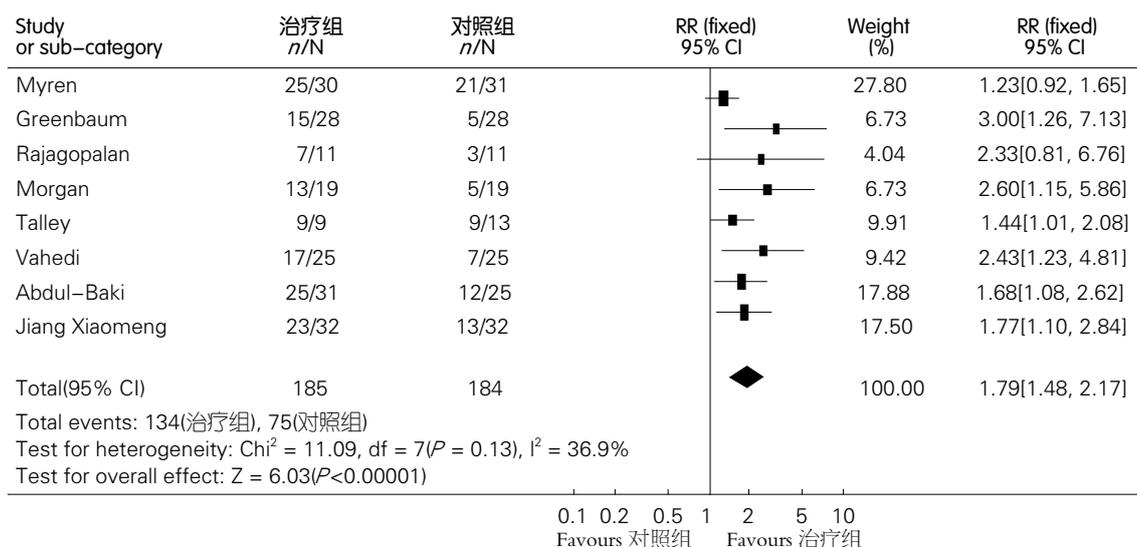
2.3.1 总体症状缓解率: 以各研究定义的疗效判断为标准(表2), 对试验结果进行异质性分析, 结果无异质性( $P>0.05$ ), 选用固定效应模型计算。TCAs总体症状缓解率为72.43% ( $n = 185$ ), 明显高于安慰剂组40.76% ( $n = 184$ ), 且两组间差异有统计学意义 [ $RR = 1.79, 95\%CI = (1.48, 2.17), P<0.05$ ], 说明TCAs治疗IBS疗效优于安慰剂(图1)。由于纳入试验过少, 无法进行亚组分析。漏斗

图示不对称, 表示存在发表偏倚(图2)。

2.3.2 症状疗效评价: (1)腹痛: 纳入的Greenbaum<sup>[5]</sup>和Talley<sup>[8]</sup>2项试验研究了腹痛评分(疼痛程度与每周疼痛时间乘积)变化, 对试验结果进行异质性分析, 结果存在异质性( $P<0.05$ ), 选用随机效应模型计算。TCAs对腹痛评分的改善优于安慰剂, 且差异有统计学意义 [ $SMD = -1.68, 95\%CI = (-3.13, -0.23), P<0.05$ ] (表2, 图3)。其中Greenbaum等<sup>[5]</sup>进行亚组分析示: 地昔帕明在改善腹泻为主型IBS的疼痛评分较安慰剂组有统计学差异 ( $P<0.025$ ); (2)排便不尽感、水样

### ■应用要点

在治疗过程中从小剂量开始应用三环类抗抑郁药, 监测不良反应, 并根据个体差异对药物进行调整可以达到较好疗效。



■同行评价  
作者通过荟萃分析, 系统评价三环类抗抑郁药治疗IBS的疗效和安全性, 方法适当, 结论可靠。

图1 三环类抗抑郁药治疗IBS总体症状缓解率的Meta分析。

便、腹泻: Vahedi等<sup>[9]</sup>的试验显示, 阿米替林组和安慰剂组在排便不尽感症状缓解率分别为36%( $n = 25$ )、4%( $n = 25$ ), 水样便症状缓解率分别为: 44%( $n = 25$ )、12%( $n = 25$ ), 阿米替林组疗效优于安慰剂组( $P < 0.05$ )。Greenbaum等<sup>[5]</sup>的试验对腹泻为主型患者进行亚组分析显示, 地昔帕明缓解腹泻症状的疗效优于安慰剂( $P < 0.025$ 和 $P < 0.005$ ); (3)症状平均分: Vahedi等<sup>[9]</sup>的试验中, 症状平均分较治疗前下降, 阿米替林组由2.5降至0.5, 安慰剂组由2.4降至1.6; 蒋小猛等<sup>[11]</sup>的试验中, 阿米替林组分值2.9降至0.8, 安慰剂组分值2.6降至1.7。2项试验均显示阿米替林组疗效优于安慰剂, 且差异均有统计意义( $P < 0.05$ )。Rajagopalan等<sup>[6]</sup>的试验显示, 治疗组每周自觉症状缓解时间较安慰剂组更多, 阿米替林的疗效优于安慰剂, 且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); (4)焦虑抑郁状态: Greenbaum等<sup>[5]</sup>试验显示, 地昔帕明、阿托品、安慰剂3组中, 各组的腹泻为主型IBS患者均较便秘为主型IBS患者抑郁评分有明显降低, 且2组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Abdul-baki等<sup>[10]</sup>试验显示, 丙咪嗪组患者的健康调查简表(SF-36)评分在治疗后明显提高( $P < 0.01$ )。Talley等<sup>[8]</sup>试验显示, 丙咪嗪对IBS患者HADS抑郁评分、SF-36精神评分的改善优于安慰剂, 但两组差异无统计学意义( $P = 0.08$ 和 $P = 0.07$ )。

2.3.3 不良反应: TCAs的不良反应主要是抗胆碱能副作用, 包括嗜睡、心悸、便秘、头昏、排尿困难。除3项研究<sup>[4,9,10]</sup>未报道不良反应外, 5项研究<sup>[5,8-11]</sup>均报道有不良反应, 对于可提取数据的试验<sup>[9-11]</sup>进行异质性分析, 结果无异质

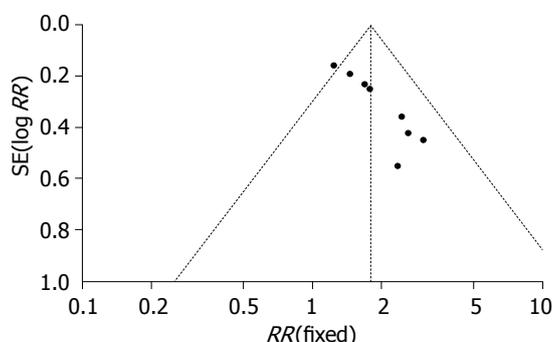


图2 三环类抗抑郁药治疗IBS总体症状缓解率的敏感性分析。

性( $P > 0.05$ ), 选用固定效应模型计算。结果发现TCAs组不良反应发生率为35.34%( $n = 116$ ), 略高于安慰剂组27.62%( $n = 153$ ), 但两组间差异无统计学意义[ $RR = 1.34$ ,  $95\%CI = (0.91, 1.96)$ ,  $P > 0.05$ ], 说明TCAs治疗肠易激综合征安全性好(表2, 图4)。漏斗图分析显示对称, 表示无发表偏倚。

### 3 讨论

本次研究共纳入8项试验, 均采用安慰剂对照、使用盲法、有失访及退出记录, 方法学质量评分大于或等于3分, 均为高质量研究。检索材料时发现, 国内观察TCAs治疗IBS疗效的临床试验虽然较多, 但大多没有采用盲法或没有随机分组, 造成质量评分低而被排除。最终8项试验共334例患者纳入本次分析。

本次纳入的试验均应用较小剂量的TCAs, 低于其常规抗抑郁的剂量。荟萃分析显示小剂量TCAs在改善IBS总体症状评分、缓解腹痛症

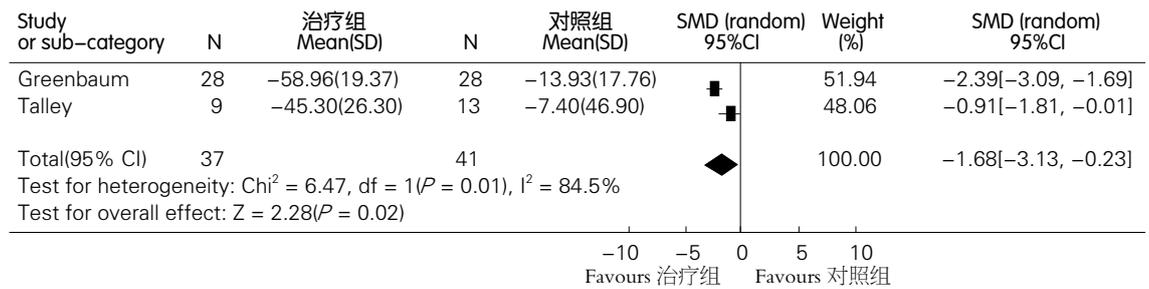


图3 三环类抗抑郁药治疗IBS腹痛评分的Meta分析。

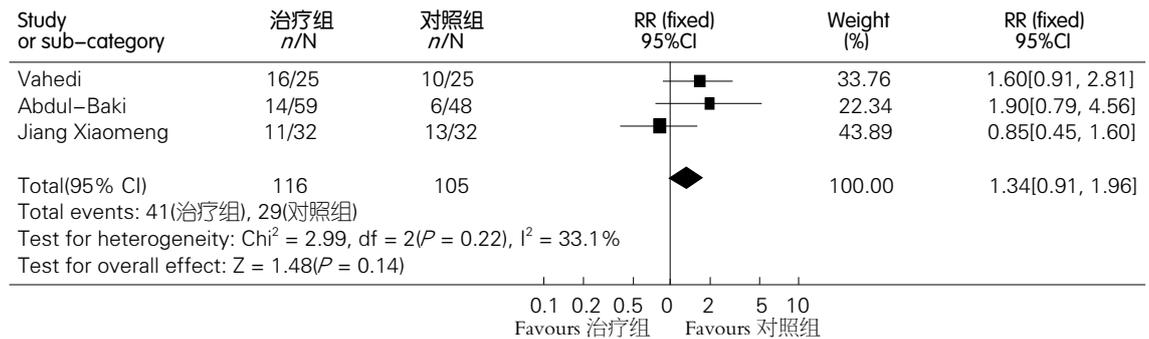


图4 三环类抗抑郁药治疗IBS不良反应的Meta分析。

状等方面均优于安慰剂,且安全性较好。Greenbaum等<sup>[5]</sup>对腹泻为主型患者进行亚组分析发现,TCAs对腹泻为主型IBS在腹痛、腹泻症状的疗效优于其他类型。Abdul-baki等<sup>[10]</sup>应用不同剂量丙咪嗪治疗IBS患者的研究显示,患者症状缓解与增加剂量无关。Halpert等<sup>[12]</sup>亦证明抗抑郁药对IBS的疗效不依赖剂量,低剂量抗抑郁药对痛觉和神经的调节作用要强于其抗抑郁作用。对无法进行荟萃分析的数据进行定性系统评价发现:小剂量TCAs可以改善患者的抑郁评分及生活质量评分。IBS患者生活质量降低与多种心理社会参数异常呈明显的负相关<sup>[13]</sup>。IBS患者常伴随的焦虑抑郁症状可与消化道症状相互加剧。精神心理因素与肠道生理功能之间主要通过脑-肠轴相互影响<sup>[14]</sup>。抗抑郁药具有镇静、抗抑郁和安眠作用,可有助于减轻IBS患者的精神心理学症状。TCAs的不良反应与剂量相关,剂量越大,不良反应越多。本研究纳入的文献均应用低于常规抗抑郁的剂量,荟萃分析显示试验组与安慰剂组的不良反应发生率无统计学差异,说明小剂量TCAs治疗IBS是安全有效的。

IBS是多因素共同作用的结果,其病理生理变化呈现多样性,但其特征是对多种生理性或非生理性刺激的反应性增高。主要涉及胃肠动力异常、内脏感觉过度敏感、中枢及周围神经系统高敏感、肠道炎症与免疫功能改变、社会

心理因素等<sup>[15]</sup>。目前研究结果认为,内脏敏感性增强和脑肠轴中枢痛觉感受调节失调在IBS的病理生理中起着主要作用。IBS患者结肠和直肠对于气体扩张和电刺激的痛觉阈值较低<sup>[16]</sup>,磁共振机能成像显示IBS患者大脑扣带前部皮质回及岛脑区较正常人变薄<sup>[17]</sup>,在磁共振机能成像下IBS患者直肠扩张疼痛时,大脑扣带前部皮质回异常活动。三环类抗抑郁药阿米替林可通过中枢性调控作用减少这些异常激活,从而降低IBS患者的痛觉感受<sup>[7]</sup>。TCAs的作用机制被认为是通过调整脑肠轴失衡,从而部分提高患者的痛觉阈值<sup>[14]</sup>。也有研究证实<sup>[18]</sup>TCAs仅对腹泻为主的IBS患者有疗效,主要是抗胆碱能作用的结果。抗胆碱能作用可减少患者胃肠运动,从而减少腹泻次数、腹痛频率、改善肠痉挛等不适症状。

本荟萃分析初步显示小剂量TCAs可改善IBS患者的总体症状评分、缓解患者的腹痛、腹泻及焦虑抑郁等症状,明显改善患者的生活质量。且由于低于常规抗抑郁剂量,不良反应发生率较低,安全性较好。但由于TCAs的抗胆碱能和抗组织胺副作用以及患者对抗抑郁药的心理接受程度等原因导致临床上应用TCAs治疗IBS的随机对照试验开展较少,高安慰剂反应也会影响试验结果<sup>[19]</sup>。因此本次分析纳入的符合条件的高质量文献较少,敏感性分析也显示存在发表偏倚,所以期待进行更大规模的随机对照

临床试验, 以进一步验证TCAs对IBS的疗效及安全性.

#### 4 参考文献

- 1 王伟岸, 潘国宗, 钱家鸣. 肠易激综合征的认知治疗. 胃肠病学和肝病杂志 2000; 9: 85-87
- 2 付朝伟, 徐飏, 陈维清, 栾荣生, 詹思廷. 中国大城市肠易激综合征和功能性消化不良患者抑郁、焦虑现况研究. 中华消化杂志 2006; 26: 151-153
- 3 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12
- 4 Myren J, Groth H, Larssen SE, Larsen S. The effect of trimipramine in patients with the irritable bowel syndrome. A double-blind study. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17: 871-875
- 5 Greenbaum DS, Mayle JE, Vanegeren LE, Jerome JA, Mayor JW, Greenbaum RB, Matson RW, Stein GE, Dean HA, Halvorsen NA. Effects of desipramine on irritable bowel syndrome compared with atropine and placebo. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 257-266
- 6 Rajagopalan M, Kurian G, John J. Symptom relief with amitriptyline in the irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 738-741
- 7 Morgan V, Pickens D, Gautam S, Kessler R, Mertz H. Amitriptyline reduces rectal pain related activation of the anterior cingulate cortex in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2005; 54: 601-607
- 8 Talley NJ, Kellow JE, Boyce P, Tennant C, Huskic S, Jones M. Antidepressant therapy (imipramine and citalopram) for irritable bowel syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 108-115
- 9 Vahedi H, Merat S, Momtahan S, Kazzazi AS, Ghafari N, Olfati G, Malekzadeh R. Clinical trial: the effect of amitriptyline in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 678-684
- 10 Abdul-Baki H, El Hajj II, Elzahabi L, Azar C, Aoun E, Skoury A, Chaar H, Sharara AI. A randomized controlled trial of imipramine in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3636-3642
- 11 蒋小猛, 于亚杰, 孔梅, 王晓燕, 王银环. 小剂量阿米替林治疗腹泻型肠易激综合征临床疗效观察. 河北医药 2009; 31: 2535-2537
- 12 Halpert A, Dalton CB, Diamant NE, Toner BB, Hu Y, Morris CB, Bangdiwala SI, Whitehead WE, Drossman DA. Clinical response to tricyclic antidepressants in functional bowel disorders is not related to dosage. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 664-671
- 13 王伟岸, 何剑琴, 胡品津, 曾志荣, 陈为. 心理社会因素对肠易激综合征患者生活质量的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1626-1630
- 14 王敬东. 脑-肠互动在肠易激综合征发病中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3299-3301
- 15 邹多武. 肠易激综合征的病理生理. 现代消化及介入诊疗 2007; 12: 93-95
- 16 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: 2484-2490
- 17 Davis KD, Pope G, Chen J, Kwan CL, Crawley AP, Diamant NE. Cortical thinning in IBS: implications for homeostatic, attention, and pain processing. *Neurology* 2008; 70: 153-154
- 18 Friedrich M, Grady SE, Wall GC. Effects of antidepressants in patients with irritable bowel syndrome and comorbid depression. *Clin Ther* 2010; 32: 1221-1233
- 19 Lieberman MD, Jarcho JM, Berman S, Naliboff BD, Suyenobu BY, Mandelkern M, Mayer EA. The neural correlates of placebo effects: a disruption account. *Neuroimage* 2004; 22: 447-455

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)