

# 弥漫性食管痉挛的诊治现状

朱春兰, 祝喜萍

朱春兰, 祝喜萍, 黑龙江省医院附属消化病医院消化二科 黑龙江省哈尔滨市 150001

朱春兰, 1983年哈尔滨医科大学本科毕业, 主任医师, 研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、内镜治疗胆道疾病及肝硬化门静脉高压合并症的基础与临床研究。

作者贡献分布: 朱春兰与祝喜萍对此文所做贡献均等; 此课题由朱春兰设计, 研究过程及论文写作由朱春兰, 祝喜萍完成。

通讯作者: 朱春兰, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区果戈里大街405号, 黑龙江省医院附属消化病医院。zhuchunlan5055@163.com

电话: 0451-88025055

收稿日期: 2008-04-09 修回日期: 2008-05-07

接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-08-18

## Current diagnosis and therapy for diffuse esophageal spasm

Chun-Lan Zhu, Xi-Ping Zhu

Chun-Lan Zhu, Xi-Ping Zhu, the Second Department of Gastroenterology Hospital Affiliated to Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Chun-Lan Zhu, Gastroenterology Hospital Affiliated to Heilongjiang Provincial Hospital, 405 Guogeli Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. zhuchunlan5055@163.com

Received: 2008-04-09 Revised: 2008-05-07

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-08-18

## Abstract

Diffuse esophageal spasm is a primary esophageal motility disorder characterized by incoordinate esophageal contraction. The etiology is still not clear. This study systemically elucidates the latest advancement in pathogenesis, diagnosis and therapy of diffuse esophageal spasm, and then gives an objective and analytic evaluation. In this article, we also provide new diagnostic and therapeutic strategies for patients with diffuse esophageal spasm.

Key Words: Diffuse esophageal spasm; Pathogenesis; Diagnosis; Therapy; Advancement

Zhu CL, Zhu XP. Current diagnosis and therapy for diffuse esophageal spasm. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2565-2569

## 摘要

弥漫性食管痉挛是以食管的一种不协调收缩

运动为动力学特征的原发性食管运动障碍性疾病。其发病原因尚不十分清楚。本文较系统的阐述了弥漫性食管痉挛的发病机制、诊断方法及治疗措施等最新进展, 并作出较客观的评析, 为弥漫性食管痉挛的诊断及治疗提供了新的思路。

关键词: 弥漫性食管痉挛; 发病机制; 诊断; 治疗; 进展

朱春兰, 祝喜萍. 弥漫性食管痉挛的诊治现状. *世界华人消化杂志* 2008; 16(23): 2565-2569

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2565.asp>

## 0 引言

弥漫性食管痉挛(diffuse esophageal spasm, DES)是以食管的一种不协调收缩运动为动力学特点的原发性食管运动障碍性疾病。以慢性间歇性胸痛和吞咽困难为临床特点。DES的病因目前尚不清楚, 而且临床症状缺乏特异性, 进行正确的诊断与治疗比较困难。近些年来国内外学者在DES的发病机制、诊断和治疗方面做了较深入的研究, 本文仅对此作一简要综述与评析。

## 1 DES发病机制的新认识

DES发病原因尚不清楚。目前认为可能与食管神经-肌肉变性、精神心理因素、感觉异常、食管黏膜刺激、炎症和衰老等因素有关。近年来国内外学者主要从以下三方面对DES发病机制进行了研究与探讨: (1)病理组织学和腔内影像学方面Pehlivanov *et al*<sup>[1]</sup>经腔内超声检查发现DES患者下食管固有肌层增厚, 但经研究尚不能证明肌间丛发生病理变化, 提示固有肌层的增厚并不是DES的原发病因。Dogan *et al*<sup>[2]</sup>采用高分辨率测压法、食管电阻抗仪和腔内超声影像等技术, 对健康志愿者和食管动力障碍者进行分析研究, 发现缺乏哺乳动物sprouty2基因可引起食管神经元增生和食管痉挛。(2)食管蠕动功能方面在过去10余年中一氧化氮(NO)可调节下食管括约肌(LES)和食管体的松弛这一假说已得到众多学者的接受<sup>[3]</sup>。Konturek *et al*<sup>[4]</sup>研究发现NO

## ■背景资料

弥漫性食管痉挛(DES)是食管的一种不协调收缩运动, 是食管源性胸痛的病因之一。其发病原因尚不十分清楚, 临床症状缺乏特异性, 诊断亦较困难。目前认为食管压力测定是诊断DES最好的方法。近年来国内外学者针对DES诊断做了一些研究, 但研究的出发点、角度及方法各异, 意见不一, 未能达到共识。本文综合了近年来在此方面研究的国内外文献, 对DES的发病机制、诊断方法及治疗措施等最新进展做了详细的介绍及较客观的评价, 为DES的诊断及治疗提供新的思路。

## ■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前此领域的研究热点、重点是: DES发病机制, 食管压力测定诊断标准的规范化, 有效治疗药物的选择以及有效手术术式的选择。

作为抑制性神经递质, 三硝酸甘油(GTN)作为NO的供体, 当给DES患者静脉滴入GTN 100-200 mg/(kg·h)时, 食管测压显示DES的部分正常蠕动得到恢复, 当应用NO合成酶抑制剂时, 对食管收缩的幅度、时间及传导均无影响. Murray *et al*<sup>[5]</sup>在一个健康志愿者临床试验中, 静脉给予重组血红素(NO清除剂)引起食管远端出现同步收缩, LES松弛率下降, 说明NO在调整食管蠕动和LES松弛方面具有重要的生理作用. (3)在DES疼痛的病因学方面为什么DES患者出现胸痛的原因仍不十分清楚. 推测疼痛可能由于不正常的同步收缩引起, 而且与收缩的幅度有关. 高幅收缩可使食管壁张力增加, 若食管壁被拉长可引起肌肉壁缺血而导致疼痛<sup>[1]</sup>. 食管测压对环形肌收缩敏感, 采用高频超声内镜发现在纵形肌收缩时也可引起疼痛不适<sup>[6]</sup>, 这就可部分解释用标准食管测压有时不能充分反映疼痛情况, 因食管纵形肌收缩不增加食管内压力.

## 2 DES的诊断方法

诊断DES较困难, 典型症状与可靠X线和测压检查, 对确诊DES很重要, 食管钡剂造影可作为诊断DES的首选检查, X线检查可见: 食管下段蠕动减弱; 下2/3食管出现不协调的强烈非推进性收缩(痉挛); 食管外形呈弯曲状、螺旋状和串珠状, 严重者可出现食管憩室; 食管下段出现无推进性第三收缩. 钡剂造影诊断DES阳性率不高, 易出现假阳性, 也常将DES误认为正常食管<sup>[7]</sup>. 目前诊断DES的金标准仍被认为是食管压力测定<sup>[8]</sup>, 尤其近年开展的自由活动的24 h测压法明显提高了DES的诊断率. 虽然食管测压法是诊断DES的金标准, 但其判定标准尚存在异议. 下面仅对食管标准测压法和自由活动24 h测压法进行介绍和评价.

**2.1 标准测压法** 目前普遍应用的是低顺应性气液灌注法. 笔者采用PC polygraph HR台式高分辨率多导胃肠动力检测系统, 标准灌注式4通道食管测压导管, 各相邻侧孔间距5 cm, 灌注式流速0.6 mL/min, 导管上端与外部的传感器连接并记录. 国内学者诊断DES标准<sup>[9-10]</sup>: (1)高幅, 非推进性收缩, 收缩波振幅大于24.0 kPa, 持续时间大于6 s, 为典型DES表现; (2)多发性, 反复性同步收缩, 其发生频率大于湿咽的30%; (3)食管上、下括约肌压力和功能正常; (4)食管体部的蠕动传导速度减慢, 小于0.8-1.5 cm/s. Sperandio *et al*<sup>[11]</sup>对DES( $n = 53$ )和正常对照组( $n = 53$ )进行

测压分析研究, 认为诊断DES应具备如下标准: (1)食管远端存在两次以上的同步收缩(湿咽10次); (2)存在间断的正常蠕动; 而食管远端其他测压特征对诊断并不重要, 包括重复收缩、收缩间期延长、逆行收缩、自发性收缩或LES不完全松弛. 研究发现正常对照组很少有同步收缩, 没有1例超过湿咽的10%; 伴有胸痛和吞咽困难的DES, 远端食管的蠕动波幅明显高于仅有胸痛或吞咽困难者, 同步收缩幅度在两个症状都存在者明显高于单症状者. Spechler *et al*<sup>[12]</sup>诊断标准: (1)同步收缩超过湿咽的10%; (2)平均收缩幅度大于30 mmHg, Richter<sup>[13]</sup>则认为DES同步收缩幅度常常不是很高. Storr *et al*<sup>[8]</sup>强调诊断DES典型测压表现应同时存在持续时间延长的同步收缩波, 多峰波和高幅波. 许多作者对测压表现痉挛运动的准确性持有异议, 不同的研究者使用不同的诊断标准, 因此可能有许多其他食管功能障碍疾病被诊为DES, 特别是DES与贲门失弛缓在临床表现和测压特征上很相似, 需要进行仔细鉴别, 前者比后者诊断要困难得多<sup>[14-15]</sup>, 贲门失弛缓食管完全失去正常蠕动或LES压力增高及吞咽时不完全松弛<sup>[14]</sup>, 假如所有的收缩均是同步收缩则诊为失弛缓<sup>[13]</sup>.

**2.2 自由活动的24 h测压法** 此法是用电子计算机控制的食管测压分析法, Janssens *et al*<sup>[16]</sup>1986年首先报告, 国内报道较少. Stein *et al*<sup>[17]</sup>介绍, 用7Fr导管含有2个电压力传感器置于食管LES上方5 cm和10 cm处, 压力传感器能精确地测试出24 h的53.3 kPa以下的压力变化, 压力传感器与携带式数据记录仪连接在一起, 有静态CMOS存储器. 患者可回家照常活动. 24 h后取下记录数据, 用计算机分析其立位、卧位和进食时的压力记录. 食管收缩的振幅、时限、传播速度和形式等均能被计算出来. 目前更为先进的是自由活动的24 h食管测压和24 h食管pH监测联合的一次完成方法<sup>[18]</sup>, 使DES诊断更加精确. Barham *et al*<sup>[7]</sup>对临床可疑患食管动力障碍者( $n = 390$ )分别进行标准测压和自由活动的24 h持续测压、pH监测进行对比研究. 结果: 标准测压法诊断DES55例, 再用24 h持续测压法复检, 仅两例能确诊为DES, 而持续测压法确诊DES的16例中, 用标准测压法只检出4例; 测压同时行24 h pH监测可鉴别患者的症状是酸反流还是食管动力异常引起的; 提出自由活动的24 h测压法诊断DES的特异性波形是: 在食管体(LES上10 cm以下)发生高幅收缩波(>200 mmHg)、收缩持续

时间大于15 s且呈多峰波,发现此种类型的收缩定能引起胸痛,而正常幅度和正常收缩持续时间的同步收缩不引起胸痛。Hayashi *et al*<sup>[19]</sup>采用24 h测压法及pH监测( $n = 116$ )诊断DES 45例,其中11例是与反流相关的DES(RDES),30例是自发性的DES(IDES),4例伴有GERD的DES(DES-GERD),测压发现DES同步收缩的百分率比正常对照组高,收缩波持续时间也比较长,但不像Barham报告那样明显延长。建议将DES分成两种类型,一种为RDES型,另一种为IDES型,因为RDES型的症状可通过H<sub>2</sub>受体拮抗剂或质子泵抑制剂得到控制,认为此种分类对DES的治疗有意义。

诊断评析:食管压力测定是诊断食管动力障碍疾病的标准技术,他直接通过测定食管括约肌和食管收缩功能来诊断食管功能性疾病。综合文献报道及结合笔者经验建议标准测压法的诊断标准应为:多发性,反复性同步收缩(超过湿咽的20%),平均收缩幅度大于30 mmHg,混有间断的正常蠕动波;诊断参考标准:可见自发性收缩波、重复收缩、多峰波。同时要注意除外下列可引起同步收缩的其他疾病:糖尿病,酒精中毒,淀粉样变性,硬皮病,不伴其他疾病的胃-食管反流及食管器质性梗阻(经钡剂或胃镜检查除外);若患者具有典型的临床症状而食管测压显示正常,可用激发试验(腾喜龙激发试验最为常用),或用自由活动的24 h测压法进一步确诊。自由活动的24 h测压法可使DES诊断更为精确,尤其同时进行24 h pH监测能区分反流因素引发的DES,是一种值得提倡的诊断DES的好方法。

### 3 DES的治疗

DES与其他已知的痉挛性食管动力障碍疾病(贲门失弛缓、高压食管)相同,其病理生理学仍然不十分清楚,由于缺乏病生知识,因而缺少理想的治疗方法。尽管如此,近年来许多学者开展了多方面的有关治疗DES的研究,进行不断的探索与尝试。下面仅从药物治疗、非手术治疗与手术治疗三方面做一介绍和评析。

**3.1 药物治疗** DES药物治疗通常与其他食管动力障碍疾病治疗相似,使用平滑肌松弛剂,钙拮抗剂,精神药物,最近有报告使用肉毒杆菌毒素(BTX)注射治疗。硝酸脂类药物可使血管和食管平滑肌松弛,特别是在急性胸痛发作时可明显缓解症状<sup>[20]</sup>,硝酸脂类药物的应用方法决定临床效果,用法应与治疗心血管疾病相似,每次用

药间隔12-16 h,以避免产生头痛、心动过速等副作用,而影响长期用药<sup>[7]</sup>。钙离子拮抗剂可降低LES压力和食管收缩幅度,但不能恢复食管运动紊乱的正常蠕动功能<sup>[21-22]</sup>。在对不同钙离子拮抗剂系统研究中发现,硝苯地平在控制食管平滑肌收缩方面比异博定,地尔硫卓有效,但地尔硫卓的耐受性好,当服用硝苯地平出现副作用时(如:血管扩张、头痛、颜面发红)可选用地尔硫卓<sup>[23]</sup>,有学者建议可选用高选择性胃肠钙离子拮抗剂<sup>[10]</sup>,如:得舒特,斯巴敏,舒丽体能等。DES患者多数存在躯体焦虑,抑郁心理恐惧以及特异性的内脏高敏感性。精神药物可以增加痛觉阈值,改善症状,但不能改变食管动力异常<sup>[13]</sup>。近年来国外学者依据DES的发病机制NO学说,使用NO类药物(昔多芬)治疗DES<sup>[24]</sup>,经高分辨率测压证实,25-50 mg昔多芬可减少食管痉挛动力压和速度,几乎完全抑制食管收缩,对固体和液体吞咽均有效,在用25-50 mg昔多芬(bid)维持治疗期间,无吞咽困难和胸痛发生,无副作用。认为昔多芬能改善食管功能和减轻食管痉挛引起的吞咽困难和胸痛,尤其适用于其他治疗方法失败例。但观察病例数较少,需做系列临床研究。Eherer *et al*<sup>[25]</sup>报告昔多芬可明显改善伴有高压食管动力障碍者食管测压表现( $n = 11$ ),但治疗期间有3例患者出现副作用(眩晕、头痛)。Massey *et al*<sup>[26]</sup>报告使用平滑肌松弛剂薄荷油治疗DES( $n = 8$ ),将5滴薄荷油滴入10 mL水中,在服用前后10 min测LES压力及食管体部收缩幅度。结果:LES压力在用药前后无差异;同步收缩完全消失;多峰波、自发性收缩及过度收缩的数量明显减少;收缩幅度及收缩持续时间均明显下降及缩短。

近年来有学者试图采用BTX注射方法治疗DES,BTX是一种非常有效的类杆菌毒素,他可选择性干扰胆碱能神经元抑制乙酰胆碱在突触前释放<sup>[27]</sup>,Pasricha *et al*<sup>[28]</sup>于1993年首先用于治疗贲门失弛缓有效率达90%。BTX治疗DES只见少数报道。Storr *et al*<sup>[29]</sup>用BTX治疗DES( $n = 9$ ),将100 iu BTX用生理盐水10 mL稀释,从LES开始沿食管壁行多点注射,注射间隔1-1.5 cm。结果:一次注射后症状立刻改善率78%(7/9),4 wk后89%(8/9)症状缓解;6 mo后8例仍治疗有效。认为在食管不同平面进行BTX注射对DES引起的症状是有效的,若症状再现,通过再次注射BTX仍有效。用BTX治疗DES是一种安全、有希望的治疗方法,但尚需大量的双盲对照研究作出评

### ■应用要点

本文的实际应用价值在于向大家介绍了DES发病机制、诊断及治疗方面新的研究进展,总结出食管压力测定诊断DES的标准及如何选择药物治疗,为临床工作提供指导。



## ■同行评价

本文对弥漫性食管痉挛的诊治现状较全面地进行了综述,并对现有诊断与治疗方法进行分析与评析,具有临床指导意义。

价<sup>[29-30]</sup>。

**3.2 非手术治疗** 非手术治疗主要指经内镜探条或气囊扩张术,是近年来应用较广泛的创伤小,效果好的治疗方法。探条扩张可缓解吞咽困难症状,探条扩张无效者选用气囊扩张<sup>[31]</sup>,气囊扩张疗效明显好于探条扩张,气囊扩张对40%的重度DES有效,对90% LES功能障碍者有效<sup>[7,13]</sup>。治疗时要注意避免发生食管穿孔,出血等并发症。

**3.3 手术治疗** DES治疗应首选保守治疗,手术治疗仅限于有严重症状,胸痛或吞咽困难经药物、非手术治疗无效时才考虑采用<sup>[32]</sup>,手术治疗方法多采用食管肌纵切术。Patti *et al*<sup>[33]</sup>报道手术治疗DES( $n = 34$ ),经胸腔镜肌切开后吞咽困难缓解率达80%,经腹腔镜肌切开后缓解率86%,胸痛缓解率分别为75%和80%,手术后反流和烧心的积分也明显改善。据文献报道外科治疗成功率达75%<sup>[34-25]</sup>。

治疗评析: DES是食管的一种不协调的收缩运动,其特征为食管中下段一时间出现非推进性的蠕动,临床主要表现为慢性间歇性胸痛和吞咽困难。由于DES病因及发病机制目前尚不清楚,因此缺乏有效的治疗药物。对确诊DES患者可首选硝酸脂类或钙离子拮抗剂治疗,此类药物由于易发生头痛,心动过速,血管扩张,颜面发红等副作用,长期应用受到限制。近年来高选择钙离子拮抗剂在临床得到应用,由于其安全性好、副作用小,可用于治疗DES等食管动力障碍性疾病。笔者用随机方法对比硝苯吡啶( $n = 10$ )与得舒特( $n = 10$ )治疗DES疗效,治疗1 mo后,硝苯吡啶组坚持服药仅剩6例,对两组症状缓解进行评分无明显差异<sup>[36]</sup>。但本组病例数尚少,有待进一步研究。当口服药治疗无效时可选择BTX局部注射治疗。对吞咽困难症状明显者药物治疗无效时,可应用探条或气囊扩张术。虽然文献报道外科手术后DES的各种症状都有可能改善,但仍应选择胸痛或吞咽困难经药物、内镜治疗无效时再考虑外科治疗。

总之,随着对消化道动力障碍疾病的深入研究,DES的病因及发病机制会逐渐清楚,DES的诊断会更加标准化、规范化;尤其自由活动的24 h测压法与pH监测的临床应用,对DES的分型及治疗具有重要指导意义,相信DES的诊治有望在此基础上会得到进一步提高。

## 4 参考文献

- Pehlivanov N, Liu J, Kassab GS, Beaumont C, Mittal RK. Relationship between esophageal muscle

thickness and intraluminal pressure in patients with esophageal spasm. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1016-G1023

- Dogan I, Mittal RK. Esophageal motor disorders: recent advances. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 417-422
- Grobel C, Borovicka J, Schwizer W, Fox M, Hebbard G. Diffuse esophageal spasm. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 450-457
- Konturek JW, Gillessen A, Domschke W. Diffuse esophageal spasm: a malfunction that involves nitric oxide? *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 1041-1045
- Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 1995; 109: 1241-1248
- Mittal RK. Motor and sensory function of the esophagus: revelations through ultrasound imaging. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S42-S48
- Barham CP, Gotley DC, Fowler A, Mills A, Alderson D. Diffuse oesophageal spasm: diagnosis by ambulatory 24 hour manometry. *Gut* 1997; 41: 151-155
- Storr M, Allescher HD, Classen M. Current concepts on pathophysiology, diagnosis and treatment of diffuse oesophageal spasm. *Drugs* 2001; 61: 579-591
- 夏玉亭. 食管内测压测酸技术及临床应用. *中华消化内镜杂志* 1997; 14: 262-264
- 夏上, 邓长生. 弥漫性食管痉挛. *医学新知杂志* 2007; 17: 68-70
- Sperandio M, Tutuian R, Gideon RM, Katz PO, Castell DO. Diffuse esophageal spasm: not diffuse but distal esophageal spasm (DES). *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1380-1384
- Spechler SJ, Castell DO. Classification of oesophageal motility abnormalities. *Gut* 2001; 49: 145-151
- Richter JE. Oesophageal motility disorders. *Lancet* 2001; 358: 823-828
- Khatami SS, Khandwala F, Shay SS, Vaezi MF. Does diffuse esophageal spasm progress to achalasia? A prospective cohort study. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1605-1610
- Patti MG, Way LW. Evaluation and treatment of primary esophageal motility disorders. *West J Med* 1997; 166: 263-269
- Janssens J, Vantrappen G, Ghillebert G. 24-hour recording of esophageal pressure and pH in patients with noncardiac chest pain. *Gastroenterology* 1986; 90: 1978-1984
- Stein HJ, DeMeester TR, Eypasch EP, Klingman RR. Ambulatory 24-hour esophageal manometry in the evaluation of esophageal motor disorders and noncardiac chest pain. *Surgery* 1991; 110: 753-761; discussion 761-763
- Lam HG, Dekker W, Kan G, Breedijk M, Smout AJ. Acute noncardiac chest pain in a coronary care unit. Evaluation by 24-hour pressure and pH recording of the esophagus. *Gastroenterology* 1992; 102: 453-460
- Hayashi H, Mine K, Hosoi M, Tsuchida O, Handa M, Kinukawa N, Andou K, Kubo C. Comparison of the esophageal manometric characteristics of idiopathic and reflux-associated esophageal spasm: evaluation by 24-hour ambulatory esophageal motility and pH monitoring. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2124-2131
- 王化虹. 弥漫性食管痉挛. *中国医刊* 2003; 38: 18-19
- Nasrallah SM. Nifedipine in the treatment of diffuse



- oesophageal spasm. *Lancet* 1982; 2: 1285
- 22 Konrad-Dalhoff I, Baunack AR, Romsch KD, Ahr G, Kraft H, Schmitz H, Weihrauch TR, Kuhlmann J. Effect of the calcium antagonists nifedipine, nitrendipine, nimodipine and nisoldipine on oesophageal motility in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 41: 313-316
- 23 Malagelada JR, Distrutti E. Management of gastrointestinal motility disorders. A practical guide to drug selection and appropriate ancillary measures. *Drugs* 1996; 52: 494-506
- 24 Fox M, Sweis R, Wong T, Anggiansah A. Sildenafil relieves symptoms and normalizes motility in patients with oesophageal spasm: a report of two cases. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 798-803
- 25 Eherer AJ, Schwetz I, Hammer HF, Petnehazy T, Scheidl SJ, Weber K, Krejs GJ. Effect of sildenafil on oesophageal motor function in healthy subjects and patients with oesophageal motor disorders. *Gut* 2002; 50: 758-764
- 26 Massey BT. Diffuse esophageal spasm: a case for carminatives? *J Clin Gastroenterol* 2001; 33: 8-10
- 27 Bhutani MS. Gastrointestinal uses of botulinum toxin. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 929-933
- 28 Pasricha PJ, Ravich WJ, Kalloo AN. Botulinum toxin for achalasia. *Lancet* 1993; 341: 244-245
- 29 Storr M, Allescher HD, Risch T, Born P, Weigert N, Classen M. Treatment of symptomatic diffuse esophageal spasm by endoscopic injections of botulinum toxin: a prospective study with long-term follow-up. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 754-759
- 30 Storr M, Linke R, Nicolaus M, Gake B, Schirra J. [Injection of botulinum toxin for diffuse esophageal spasm] *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130: 266-269
- 31 Ebert EC, Ouyang A, Wright SH, Cohen S, Lipshutz WH. Pneumatic dilatation in patients with symptomatic diffuse esophageal spasm and lower esophageal sphincter dysfunction. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 481-485
- 32 Leconte M, Douard R, Gaudric M, Dumontier I, Chaussade S, Dousset B. Functional results after extended myotomy for diffuse oesophageal spasm. *Br J Surg* 2007; 94: 1113-1118
- 33 Patti MG, Gorodner MV, Galvani C, Tedesco P, Fisichella PM, Ostroff JW, Bagatelos KC, Way LW. Spectrum of esophageal motility disorders: implications for diagnosis and treatment. *Arch Surg* 2005; 140: 442-448; discussion 448-449
- 34 Henderson RD, Ryder D, Marryatt G. Extended esophageal myotomy and short total fundoplication hernia repair in diffuse esophageal spasm: five-year review in 34 patients. *Ann Thorac Surg* 1987; 43: 25-31
- 35 Feussner H, Kauer W, Siewert JR. The surgical management of motility disorders. *Dysphagia* 1993; 8: 135-145
- 36 Eckardt VF, Aignherr C, Bernhard G. Predictors of outcome in patients with achalasia treated by pneumatic dilation. *Gastroenterology* 1992; 103: 1732-1738

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

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

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# 肝细胞癌变过程中相关生长因子的表达与动态变化

姚登福, 顾文静, 李月明

## ■背景资料

肝癌为我国常见恶性肿瘤, 肝细胞癌变机制复杂, 有多种生长因子参与。具有多功能的生长因子因作用细胞的类型、分化程度、外环境及是否有其他生长因子作用而异, 在胚胎发生发展、肝细胞生长和分化过程中起重要作用。

姚登福, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001

顾文静, 李月明, 南通大学附属医院肿瘤科 江苏省南通市 226001

姚登福, 1994年获日本国德岛大学博士学位, 教授, 主要从事恶性肿瘤早期诊断和分子机制研究。

通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心。yaodf@ahnmc.com

电话: 0513-85052523 传真: 0513-85052254

收稿日期: 2008-05-22 修回日期: 2008-07-23

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-08-18

## Expression and dynamic alteration of hepatoma-related growth factors during malignant transformation of hepatocytes

Deng-Fu Yao, Wen-Jing Gu, Yue-Ming Li

Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Wen-Jing Gu, Yue-Ming Li, Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 West Temple Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2008-05-22 Revised: 2008-07-23

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-08-18

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common hepatic malignancy worldwide. Its nature of rapid growth results in a grave prognosis. Its treatment is challenging because the mechanisms underlying tumor progression are still largely unknown. Recently, new molecular targets have been confirmed and various targeted agents are now being investigated for the treatment of HCC. The progression of HCC is closely associated with expression of hepatic growth factors that may be molecular targets for HCC treatment. This paper concludes the expression characters and dynamic changes of several hepatoma-related growth factors such as IGF-II, VEGF, TGF- $\beta$ 1 and HGF.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Insulin-like

growth factor-II; Vascular endothelial growth factor; Transforming growth factor- $\beta$ 1; Hepatocyte growth factor

Yao DF, Gu WJ, Li YM. Expression and dynamic alteration of hepatoma-related growth factors during malignant transformation of hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2570-2575

## 摘要

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一, 其特征是生长快、预后极差。肝癌的治疗正面临挑战, 其机制尚未明朗。近来已证实了肝癌的一些靶向分子, 正用于肝癌治疗的研究中。肝癌进展与肝中生长因子的过表达密切相关, 且这些生长因子可能是肝癌治疗的分子靶目标。本文总结了肝细胞癌变过程中几种相关生长因子(IGF-II、VEGF、TGF- $\beta$ 1和HGF)的动态表达与变化。

关键词: 肝癌; 胰岛素样生长因子-II; 血管内皮生长因子; 转化生长因子 $\beta$ 1; 肝细胞生长因子

姚登福, 顾文静, 李月明. 肝细胞癌变过程中相关生长因子的表达与动态变化. *世界华人消化杂志* 2008; 16(23): 2570-2575  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2570.asp>

## 0 引言

HCC是由病毒、化学致癌物等多病因作用, 癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些癌基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控而致癌变<sup>[1-2]</sup>, 经启动、促进、演变多阶段的发病过程<sup>[3-4]</sup>, 其中数百种基因调控和表达与肝癌发生、发展密切相关, 肝癌发生背景绝大多数与肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV; hepatitis C virus, HCV)的慢性持续性感染有关<sup>[5]</sup>, 并伴有肝硬化基础<sup>[6-8]</sup>。肝癌的非手术疗法有所进展, 但手术切除仍是最有效的治疗方法<sup>[9-10]</sup>。基因组学、蛋白组学技术已用于肝癌的早期发现、术后复发、转移监测, 正向高度灵敏、特异诊断方向发展<sup>[11]</sup>。肝癌进展与肝组织中多种生长因子的过表达密切相关, 其分子机制复杂<sup>[12]</sup>。本文述评了肝细胞癌变过程中几种相关生长因子(IGF-II、

## ■同行评议者

郝纯毅, 主任医师, 北京肿瘤医院肿瘤外科; 孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

VEGF、TGF- $\beta$ 1和HGF)的动态表达与变化,他们有可能成为肝癌治疗的靶目标,有助于探讨肝癌发病机制。

## 1 肝细胞癌变与核酸代谢

肝癌发生过程中, DNA合成及核酸代谢旺盛<sup>[13]</sup>。全基因组表达谱分析发现, 在肝癌形成过程中大鼠28 000个基因中, 与正常对照相比, 肝癌发生早期近3000个基因上调, 其中有1000多个基因上调幅度大于2倍, 近300个基因上调幅度大于8倍; 晚期HCC与早期HCC相比, 有近2500个基因上调, 其中涉及细胞周期、信号转导、肿瘤转移、凋亡抑制和抑癌基因等<sup>[14]</sup>。肝癌总基因组DNA甲基化水平、部分癌基因及癌相关基因如c-fos等呈低甲基化状态, DNA胞嘧啶残基的甲基化, 特别是CCGG序列内位C甲基化状态与基因的调控和表达有密切关系<sup>[15]</sup>。经肝癌模型研究发现在肝细胞发生癌变过程中, 从细胞变性、癌前病变和癌变各个阶段, 肝总RNA呈梯度进行性增加<sup>[16-17]</sup>。肝癌的发生为多基因病变, 肝IGF mRNA、TGF- $\beta$ 1和VEGF等的表达变化与总RNA相平行<sup>[18-20]</sup>。

人肝癌发生背景绝大多数与HBV、HCV的慢性持续性感染有关, 并伴有肝硬化基础。人肝癌的癌灶组织、癌周组织和远癌组织中, 总RNA浓度在各组间差异显著<sup>[21]</sup>。人肝癌发生经过不同程度肝炎、肝硬化到肝癌长达数十年的发病过程, 其中包括肝细胞坏死、结节样增生、假小叶形成、大量的纤维结缔组织代替正常肝细胞使肿瘤组织残存肝细胞减少, 同时伴肿瘤组织出血、坏死, 则表现为有形细胞成分减少, 组织总RNA减少, 其机制复杂<sup>[22]</sup>。

## 2 IGF- II

肝癌发生过程中存在IGF轴的特征性改变, 体内IGF- II是调节胚胎生长发育所必需的生长因子, 具有刺激DNA和蛋白质合成, 促进细胞有丝分裂的作用, 还有激活糖原合成酶活性调节糖原代谢的功能<sup>[23-24]</sup>。肝脏是合成和分泌IGF- II的主要器官, 肝细胞癌变过程中胚胎型IGF- II基因活化, 激活已关闭的启动子P<sub>3</sub>而产生胚胎表型逆转, 使IGF- II呈过度表达状态, 经IGF- I受体(IGF-IR)上酪氨酸激酶途径合成与活化, 肝癌模型已证实癌变过程中IGF- II呈动态表达变化。肝硬化再生结节和肝癌细胞分裂导致肝脏供血不足, 造成局部缺氧状态, 促使IGF- II合成增加, 刺激HCC新生血管的形成<sup>[25-26]</sup>。肝癌细胞置于缺氧

状态中培养, IGF- II和VEGF mRNA表达增加, 缺氧可能是诱导IGF- II表达的重要因素。肝脏发育过程中IGF- II基因以启动子、甲基化程度、印迹状态等进行动态调节<sup>[27]</sup>。肝硬化及肝良性肿瘤IGF- II mRNA为成年型, 肝癌发生时, 胚胎型IGF- II mRNA重新表达, IGF-IR表达上调。癌前结节及癌旁肝细胞出现IGF- II表达提示存在癌变倾向, 水平愈高预示肝细胞癌变倾向愈大, 可作为癌前病变信号<sup>[28-29]</sup>, 定期监测有利于病情观察与及时治疗。

肝组织IGF- II表达受4个启动子(P<sub>1-4</sub>)和6种结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein<sub>1-6</sub>, IGFBP<sub>1-6</sub>)的影响, 其中胎肝型P<sub>3</sub>启动子活化是导致IGF- II持续表达, 细胞增殖以致形成肝细胞癌的重要驱动因素, 且其过高表达与P<sub>3</sub>和P<sub>4</sub>启动子的再激活及P<sub>1</sub>启动子失活高度相关<sup>[30-31]</sup>。局部IGFBP产物的变化, 可增强IGFs在肝细胞癌变过程的促有丝分裂活性。肝癌组织IGF- II表达增加, IGFBP<sub>3</sub>表达下降。IGF- II是促癌基因, IGFBP<sub>3</sub>是促凋亡基因, 抑制肿瘤形成。IGF- II通过自分泌或旁分泌生长刺激机制, 促进癌前期肝细胞的异常增殖和分化。HCC发生初始阶段, IGF- II升高伴有肝脉管区卵圆细胞的出现, 在小肝癌中可见强阳性表达IGF- II, 其水平可升高40-100倍; IGF- II与HCC分化程度有关, 在低分化癌中见强阳性表达信号, 体内IGF- II水平增高, 与肝病患者病情严重程度有关<sup>[32-33]</sup>。然而IGF轴与肝癌发生关系密切, 其复杂的调控机制的阐明尚待研究。

## 3 TGF- $\beta$ 1

TGF是具有生物活性的多肽, 因其能够诱导一些成纤维细胞系的表现型发生可逆性转化, 所以具有调节细胞生长、分化及增殖的功能。TGF三种异构体(TGF- $\beta$ 1-3)分别由内皮细胞及结缔组织、上皮细胞及神经元细胞和间质性细胞中特定的基因编码和表达, 各分子间的生物学特性非常接近<sup>[34]</sup>。肝细胞增殖有赖于正相和负相调节因子间的动态平衡, 在肝细胞增殖调节方面, TGF- $\beta$ 1具有负相调节作用。TGF- $\beta$ 信号通路紊乱, 可使肝细胞逃避TGF- $\beta$ 1介导的生长抑制效应, 与HCC发生、发展密切相关<sup>[35]</sup>。TGF- $\beta$ 1不仅可在肝脏中产生, 也可在许多肝外组织如血小板中产生。肝组织中, TGF- $\beta$ 1只由非实质细胞(Kupffer细胞、贮脂细胞/肌成纤维细胞及内质细胞)产生。免疫组化研究显示正常肝细胞无

### ■研发前沿

肝癌的治疗正面临挑战, 其机制尚未明朗。现已证实, 肝癌的一些靶向分子正用于肝癌治疗的研究中, 肝癌进展与肝中生长因子的过表达密切相关, 且这些生长因子可能是肝癌治疗的分子靶目标。

### ■相关报道

肝癌进展与多种生长因子过表达密切相关, 其分子机制复杂。对IGF- II、VEGF、TGF- $\beta$ 1、HGF与肝癌关系的研究报道较多, 他们有可能成为肝癌治疗的靶目标, 并为探讨肝癌发病机制提供有利依据。



### ■创新盘点

肝癌是一个多病因、多基因参与、多阶段的发展过程。对与肝癌发生、发展密切相关的生长因子的研究,有助于探讨肝细胞癌变的分子机制,为肝癌的分子靶向治疗奠定基础。

TGF- $\beta$ 1染色,但在再生肝、肝硬化及肝癌细胞中均有不同程度的TGF- $\beta$ 1及TGF- $\beta$ 1 mRNA表达<sup>[36]</sup>。肝癌诱癌模型的动态观察证明, TGF- $\beta$ 1及TGF- $\beta$ 1 mRNA表达呈渐进性梯度增加<sup>[37-38]</sup>,在肝细胞癌变早期,其作用是通过负相调节机制,对肝细胞的癌变起抑制作用。

在肝癌的进展期, TGF- $\beta$ 1过表达则促进肿瘤的发展,免疫抑制效应可能是TGF- $\beta$ 促进进展期肿瘤生长,侵袭与转移。主要通过<sup>[39]</sup>:增加癌细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的相互作用,增加血管生成。TGF- $\beta$ 1是ECM产生和沉积的重要调节因子,他可通过调节ECM的黏附特性,并刺激ECM的生成;也可刺激成纤维细胞和其他细胞产生ECM蛋白和细胞黏附蛋白,包括胶原、纤维结合素和整合素。降低某些能降解ECM的酶的产生(包括胶原酶、肝素酶和基质纤溶酶),增加ECM降解酶的抑制蛋白的生成,包括纤溶酶原激活因子的抑制因子I和金属蛋白酶的抑制因子。增加ECM蛋白的生成,并能以细胞特定的方式增加或降解细胞黏附特性<sup>[40]</sup>。癌细胞的TGF- $\beta$ 1增加,通过增加蛋白水解活性及促进与细胞黏附分子的结合,从而促进肝癌的侵袭与转移<sup>[41]</sup>。由此可见,在肝癌发生过程中, TGF- $\beta$ 1表达增加在早期和进展期,其作用机制异同。

### 4 HGF

HGF基因定位于人7号染色体的长臂上(7-q21.1),长约70 kb,由18个外显子和17个内含子组成。HGF是最重要的肝再生介质之一,其受体c-Met为酪氨酸激酶型受体,在肝癌等多种恶性肿瘤中过表达或突变<sup>[42-43]</sup>。HGF与c-Met结合后,通过作用其下游信号传导通路,同细胞的生长、分化、血管生成等密切相关,对肝癌的产生与维持均起作用,所以HGF/c-Met结合的生物学过程是干预肝癌和其他过表达c-Met癌症的有效靶点<sup>[44]</sup>。HGF通过旁分泌方式作用于邻近细胞,与细胞表面的c-Met受体结合并激活该受体的酪氨酸激酶活性,从而促进包括肝细胞、上皮细胞、内皮细胞等多种细胞的生长、迁移和形态发生。HGF与肝癌细胞表面c-Met受体结合能引起基质金属蛋白酶表达增加,从而引起ECM的降解,促进肝细胞癌的转移和侵袭<sup>[45]</sup>。

胚胎和发育的胎肝组织表达HGF,正常肝处于静止状态,当存在大量肝组织坏死时,HGF重新表达并分泌。HGF是异二聚体,作为基底

膜细胞分泌的一种蛋白质, HGF能破坏细胞间连接,并刺激癌细胞向外浸润、扩散,同时诱导肿瘤新生血管生成。HCC患者血HGF水平与正常对照组间差异显著, HCC术后HGF的峰值与术后早期并发症呈明显正相关<sup>[46]</sup>。肝组织中的Kupffer细胞、贮脂细胞HGF表达明显增强,肝癌组织中呈阳性染色,慢性肝炎、肝硬化及正常肝组织中无阳性染色。在HCC的疑难病例诊断中,免疫组化可能是一项有效诊断方法。电镜下HGF定位于癌细胞的滑面内质网,其表达与癌细胞分化程度间无相关性。术后HGF水平高者,预后相对差<sup>[47]</sup>。慢性肝炎、肝硬化和HCC患者中HGF水平反映HCC发生状态,故HGF表达可作为HCC诊断的一个指标<sup>[48]</sup>。

### 5 VEGF

VEGF是一种多功能细胞因子,它具有促进内皮细胞分裂、增殖和血管构建,内皮细胞和单核细胞迁移,诱导蛋白水解酶、间质胶原酶和组织因子表达<sup>[49]</sup>。肝VEGF主要存在于肝细胞,内皮细胞有VEGF受体。慢性肝病出现肝细胞不典型增生、腺瘤样增生、再生结节、肝小多角细胞增生、小管样化生、卵圆细胞增生,均与肝细胞癌变的演化过程密切相关<sup>[50]</sup>。癌组织VEGF表达明显升高,启动了新生血管生长,血管形成是肝癌生长、侵袭和转移的基础,新生血管提供营养,排除代谢产物,也是肝癌细胞播散的途径<sup>[51]</sup>。VEGF除促进血管增殖外,还能增加血管通透性,其强度是组织胺的数百倍。肝癌早期VEGF过表达,引起血中VEGF增加。表现为HCC患者VEGF水平明显高于慢性肝炎和肝硬化患者,反映肝癌早期新生血管形成<sup>[52-53]</sup>。

正常肝组织VEGF呈低水平表达,以满足生长发育和血管生成需要。VEGF增加与肝癌预后呈负相关;无包膜或包膜不完整的肝癌可呈快速侵袭性生长,势必造成血液需求量增加,局部缺氧,从而刺激癌细胞大量分泌VEGF,促使新生血管大量生成以改善血液供应;HCC细胞中,VEGF无论是在mRNA水平还是在蛋白水平均有过量表达;肝癌组织中VEGF表达与癌体直径、分化程度间未见显著性差异<sup>[51]</sup>。免疫组化资料显示肝癌伴远处转移组VEGF阳性率为91%,可作为监测肿瘤转移的重要指标<sup>[54]</sup>。针对VEGF及其受体的抗血管治疗已有研究,可选择地结合亲肝素血管生长因子,抑制VEGF与受体结合,达到抑制VEGF诱导血管内皮细胞增殖的目的,将有助于肝癌的治疗<sup>[55]</sup>。

## 6 EGF

EGF是小分子促生长因子, 与转化生长因子 $\alpha$ 同归类于EGF家族, 其生物学作用是与EGFR结合后, 传导一系列细胞增殖分化调控信号<sup>[56]</sup>, 参与肝细胞增殖调节和肿瘤发生<sup>[57]</sup>. 肝组织中EGF最重要作用是促进上皮组织增殖和分化, 促进胚胎肝小叶、肝内、外胆管的形成、生长和发育<sup>[58]</sup>. 肝脏有很强的转运并代谢EGF的能力, 肝细胞通过特异性受体介导的胞吞作用摄入门脉血中的EGF, 摄入的EGF以降解或完全的形式分泌到胆汁中. 再生肝EGF受体分布与正常肝脏明显不同, 细胞核中EGF受体明显增加. 肝癌细胞中EGF过表达, 引起血及尿EGF含量明显升高, 并与HCC浸润程度、是否转移关系密切.

EGF与HCC关系表现为: EGF与细胞转化有关, 向体外培养的人成纤维细胞培养液中加入EGF持续刺激, 能使细胞由单层生长转化为多层重叠生长, 从而失去正常的生长特性. 肝脏是EGF作用的主要靶器官, 肝细胞和肝癌细胞膜上均有不同程度EGF受体表达<sup>[59]</sup>. EGF与其受体结合后促进细胞生长和分化, 正常人肝细胞不合成EGF, 但癌细胞能够产生EGF和与EGF相关的转移生长因子A等促生长因子, 这些因子与EGF受体结合后, 进一步促进肝癌细胞生长. 然而, 肝组织中EGF表达增多能促使细胞向恶性转化, 而正常肝细胞则不具备这种功能. 由此, 可认为EGF对肝癌发生和发展有重要的促进作用, 这种作用始于癌前病变<sup>[60-61]</sup>.

## 7 结论

HCC是我国常见的恶性肿瘤, 其死亡率居第2位, 肝细胞癌变的分子机制复杂, 有多种相关的生长因子参与<sup>[62-63]</sup>. 具有多功能的生长因子因作用细胞的类型、分化程度、外环境及是否有其他生长因子作用而异, 他在胚胎发生发展、肝细胞生长和分化过程中起重要作用<sup>[10]</sup>; HCC为典型多血管肿瘤, 新生血管形成同样是肝癌细胞增殖和转移的重要条件, 血管生长因子经与特异性受体结合, 直接刺激内皮细胞增殖, 并增加血管通透性, 不仅促进新生血管形成<sup>[64]</sup>, 且有利于脱落的肝癌细胞进入血管或向肝外转移. 对肝癌形成过程中多种生长因子的研究, 有助于肝癌发病机制的探讨, 同时还可对肝细胞癌变进行动态监测、恶性转化的信号通路过程进行干预和开展针对异常表达的分子目标进行治疗<sup>[65]</sup>.

## 8 参考文献

- 1 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
- 2 Lee JS, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 125-132
- 3 Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
- 4 Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2006; 208: 372-380
- 5 Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 2007; 96: 1127-1134
- 6 Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 133-142
- 7 Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning. *J Hepatol* 2006; 44: 798-805
- 8 Lee JS, Thorgeirsson SS. Comparative and integrative functional genomics of HCC. *Oncogene* 2006; 25: 3801-3809
- 9 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma surgery--review of the past and prospects for the 21st century. *J Surg Oncol* 2005; 91: 95-96
- 10 Höpfner M, Schuppan D, Scherübl H. Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1-14
- 11 Tang Y, Kitisin K, Jogunoori W, Li C, Deng CX, Mueller SC, Ransom HW, Rashid A, He AR, Mendelson JS, Jessup JM, Shetty K, Zasloff M, Mishra B, Reddy EP, Johnson L, Mishra L. Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF-beta and IL-6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2445-2450
- 12 Pang RW, Joh JW, Johnson PJ, Monden M, Pawlik TM, Poon RT. Biology of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 962-971
- 13 El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 134: 1752-1763
- 14 吴信华, 姚登福, 苏小琴, 黄华, 邱伟伟, 吴玮. 肝癌基因谱动态表达及HSPgp96异常的临床价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 76-80
- 15 Chan AO, Rashid A. CpG island methylation in precursors of gastrointestinal malignancies. *Curr Mol Med* 2006; 6: 401-408
- 16 Sakamoto M. Pathology of early hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007; 37 Suppl 2: S135-S138
- 17 邹黎, 姚登福, 孟宪镛. TGF- $\beta$ 1基因多态性、癌变机制及临床价值的研究进展. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 649-653
- 18 朱永昌, 董志珍, 姚登福, 吴信华, 邱伟伟, 吴玮, 苏小琴. IGF-II和IGF-II-mRNA异常表达对肝癌诊断的价值. *中国交通医学杂志* 2005; 19: 425-428
- 19 姚登福, 孟宪镛. 肝细胞癌变过程中血管内皮生长因子异常表达及其机制的研究进展. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 172-174
- 20 邱伟伟, 姚登福, 宗蕾, 吴玮, 吴信华. 肝细胞癌变过程

## ■应用要点

动态监测肝细胞恶性转化相关的异常表达的生长因子, 有助于探讨肝细胞的癌变机制, 对其信号通路进行干预, 有可能成为肝癌治疗的新方法.

## ■名词解释

生长因子: 为天然的蛋白, 能刺激细胞增殖, 调节细胞的活动与功能, 充当细胞间的信号分子, 与靶细胞表面的特异受体结合, 促进细胞分化和成熟。不同的生长因子, 其功能各异。

- 中胰岛素样生长因子 II 的动态表达与改变特征. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2918-2922
- 21 Nakamura K, Zen Y, Sato Y, Kozaka K, Matsui O, Harada K, Nakanuma Y. Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. *Hum Pathol* 2007; 38: 1532-1546
  - 22 Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2008; 28: 160-174
  - 23 Scharf JG, Bräulke T. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm Metab Res* 2003; 35: 685-693
  - 24 姚登福. 细胞因子在肝细胞癌变中的作用与机制. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 378-379
  - 25 Breuhahn K, Schirmacher P. Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1690-1698
  - 26 姚登福, 孟宪镛. 肝细胞癌变过程中IGF-II异常及其表达机制研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 72-75
  - 27 宗蕾, 姚登福, 邱历伟, 吴信华, 吴玮. 肝细胞癌变过程中IGF-II动态表达及临床病理学特征分析. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 497-501
  - 28 Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, You HL, Ho MS, Lai CS, Wang LY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Lin ZY, Yu ML, Dai CY. Serum insulin-like growth factor-II and alpha-fetoprotein as tumor markers of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2003; 24: 291-298
  - 29 董志珍, 姚登福, 吴信华, 施公胜, 邱历伟, 吴玮, 苏小琴. 肝细胞癌胰岛素样生长因子 II 的蛋白和mRNA异常表达及其早期诊断价值. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 866-868
  - 30 Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue T, Fujita J. Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 493-502
  - 31 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660
  - 32 邱历伟, 姚登福, 吴信华, 吴玮, 苏小琴, 邹黎. 肝癌组织IGF-II表达与HBV DNA复制及病理学特征的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1267-1271
  - 33 Nussbaum T, Samarin J, Schirmacher P, Breuhahn K. [Insulin-like growth factor (IGF)-signalling pathway components are potential therapeutic targets in the treatment of human hepatocellular carcinoma] *Verh Dtsch Ges Pathol* 2007; 91: 278-285
  - 34 Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358
  - 35 Yeh MM, Larson AM, Campbell JS, Fausto N, Rulyak SJ, Swanson PE. The expression of transforming growth factor-alpha in cirrhosis, dysplastic nodules, and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study of 70 cases. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 681-689
  - 36 邹黎, 姚登福, 邱伯军, 章建国, 吴信华, 邱历伟, 吴玮, 苏小琴. 肝癌组织TGF-β1异常表达与HBV复制的病理学关系分析. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 552-555
  - 37 El-Bassiouny AE, Zoheiry MM, Nosseir MM, El-Ahwany EG, Ibrahim RA, El-Bassiouni NE. Expression of cyclooxygenase-2 and transforming growth factor-beta1 in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *MedGenMed* 2007; 9: 45
  - 38 邵伯军, 姚登福, 邹黎, 吴信华, 邱历伟, 吴玮. 肝细胞癌变过程中TGF-β1及TNF-α的动态表达与改变. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 277-280
  - 39 Ikeguchi M, Iwamoto A, Taniguchi K, Katano K, Hirooka Y. The gene expression level of transforming growth factor-beta (TGF-beta) as a biological prognostic marker of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 415-421
  - 40 Fransvea E, Angelotti U, Antonaci S, Giannelli G. Blocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2008; 47: 1557-1566
  - 41 董志珍, 姚登福, 卜召祥, 邹黎, 姚敏, 邵伯军, 吴信华. 肝癌组织及外周血TGF-β1-mRNA检测. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 548-551
  - 42 Shen Z, Yang ZF, Gao Y, Li JC, Chen HX, Liu CC, Poon RT, Fan ST, Luk JM, Sze KH, Li TP, Gan RB, He ML, Kung HF, Lin MC. The kringle 1 domain of hepatocyte growth factor has antiangiogenic and antitumor cell effects on hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 404-414
  - 43 Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgerisson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 2006; 116: 1582-1595
  - 44 Heideman DA, Overmeer RM, van Beusechem VW, Lamers WH, Hakvoort TB, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Meijer CJ, Gerritsen WR. Inhibition of angiogenesis and HGF-cMET-elicited malignant processes in human hepatocellular carcinoma cells using adenoviral vector-mediated NK4 gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 954-962
  - 45 Vejchapipat P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Chittmitrappap S, Poovorawan Y. Association between serum hepatocyte growth factor and survival in untreated hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1182-1188
  - 46 Hu RH, Ho MC, Wu YM, Lee PH. Peritoneal fluid contains high concentration of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor after resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 862-865
  - 47 Chau GY, Lui WY, Chi CW, Chau YP, Li AF, Kao HL, Wu CW. Significance of serum hepatocyte growth factor levels in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatic resection. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 333-338
  - 48 Hsia CY, Huo TI, Chiang SY, Lu MF, Sun CL, Wu JC, Lee PC, Chi CW, Lui WY, Lee SD. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 208-212
  - 49 Amarapurkar AD, Amarapurkar DN, Vibhav S, Patel ND. Angiogenesis in chronic liver disease. *Ann Hepatol* 2007; 6: 170-173
  - 50 Brodsky SV, Mendelev N, Melamed M, Ramaswamy G. Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointest Liver*



- Dis* 2007; 16: 373-377
- 51 姚登福, 祝勇, 吴信华, 吴玮, 邱历伟. 人肝癌组织血管内皮生长因子及微血管密度分析的临床价值. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 92-94
- 52 Amaoka N, Osada S, Kanematsu M, Imai H, Tomita H, Tokuyama Y, Sakashita F, Nonaka K, Goshima S, Kondo H, Adachi Y. Clinicopathological features of hepatocellular carcinoma evaluated by vascular endothelial growth factor expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2202-2207
- 53 Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 220-226
- 54 Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Somura H, Yamada M, Oka M. Decreased ID2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1025-1031
- 55 Romanque P, Piguet AC, Dufour JF. Targeting vessels to treat hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 467-477
- 56 Gazzana G, Borlak J. Mapping of the serum proteome of hepatocellular carcinoma induced by targeted overexpression of epidermal growth factor to liver cells of transgenic mice. *J Proteome Res* 2008; 7: 928-937
- 57 Fukui K, Tamura S, Wada A, Kamada Y, Igura T, Kiso S, Hayashi N. Expression of Rab5a in hepatocellular carcinoma: Possible involvement in epidermal growth factor signaling. *Hepatol Res* 2007; 37: 957-965
- 58 Foster J, Black J, LeVea C, Khoury T, Kuvshinov B, Javle M, Gibbs JF. COX-2 expression in hepatocellular carcinoma is an initiation event; while EGF receptor expression with downstream pathway activation is a prognostic predictor of survival. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 752-758
- 59 Moon WS, Park HS, Yu KH, Park MY, Kim KR, Jang KY, Kim JS, Cho BH. Expression of betacellulin and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma: implications for angiogenesis. *Hum Pathol* 2006; 37: 1324-1332
- 60 Liu Y, Poon RT, Shao W, Sun X, Chen H, Kok TW, Fan ST. Blockage of epidermal growth factor receptor by quinazoline tyrosine kinase inhibitors suppresses growth of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2007; 248: 32-40
- 61 Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2391-2399
- 62 Kitisin K, Shetty K, Mishra L, Johnson LB. Hepatocellular stem cells. *Cancer Biomark* 2007; 3: 251-262
- 63 Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* 2007; 72 Suppl 1: 30-44
- 64 Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ, Folberg R. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1776-1781
- 65 Nussbaum T, Vreden S, Farsad M, Schirmacher P, Breuhahn K. [Insulin-like growth factor (IGF)-II in human hepatocarcinogenesis--a potential therapeutic target?] *Verh Dtsch Ges Pathol* 2005; 89: 254-260

## ■同行评价

本文思路清晰, 语句简练, 内容重要, 提供了一些有意义的信息, 有一定的新颖性。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## ●消息●

## 世界华人消化杂志栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# 光照应激对SD大鼠胃GnRH表达的影响

黄 祝, 恽时锋, 卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 蒋 超, 姚 兵

## ■背景资料

GnRH是一种由脑组织分泌以调控生殖系统功能的信号分子。有报道发现,在消化系统(如,颌下腺、胃和肠等)可检测到较强的GnRH和GnRH受体mRNA杂交信号,由此认为GnRH也是一种胃肠激素。他可由消化系统产生并作用于消化道黏膜上皮、腺上皮细胞,参与胃肠功能的调节。但在应激状态下,消化系统中的GnRH定位和表达是否有变化尚未见相关报道。

黄祝, 恽时锋, 卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 蒋超, 姚兵, 中国人民解放军南京军区南京总医院全军医学检验研究所 江苏省南京市 210002

黄祝, 硕士, 从事生殖免疫与分子生物学研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2006135

作者贡献分布: 此课题由黄祝与卢坤刚操作完成; 研究所用的大鼠及动物房由恽时锋提供; 数据分析由黄祝, 韩雪峰, 张艳梅及蒋超完成; 本论文写作由黄祝完成; 课题设计由姚兵及黄祝完成; 研究所用试剂及分析工具由姚兵提供。

通讯作者: 姚兵, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军南京军区南京总医院全军医学检验研究所。

yaobingliang@yahoo.com.cn

电话: 025-80860174

收稿日期: 2008-06-02 修回日期: 2008-07-16

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

## Effect of illumination stress on the expression of gonadotropin-releasing hormone in stomach of SD rats

Zhu Huang, Shi-Feng Yun, Kun-Gang Lu, Xue-Feng Han, Yan-Mei Zhang, Chao Jiang, Bing Yao

Zhu Huang, Shi-Feng Yun, Kun-Gang Lu, Xue-Feng Han, Yan-Mei Zhang, Chao Jiang, Bing Yao, Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Chinese PLA Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2006135

Correspondence to: Bing Yao, Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Chinese PLA Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. yaobingliang@yahoo.com.cn

Received: 2008-06-02 Revised: 2008-07-16

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To observe the expression changes of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the stomach of Sprague-Dawley (SD) rats exposed to light stress.

**METHODS:** SD rats were exposed to continuous light to establish illumination-stressed models. Then, gastric tissues were taken from the rats exposed to continuous light for 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 1 wk, 2 wk, 3 wk, 4 wk and their corresponding controls, respectively. The localization and expression of GnRH protein and GnRH mRNA were detected by immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction (PCR), re-

spectively.

**RESULTS:** Immunoreactivity was displayed mostly in the parietal cells of rat stomachs, and there were no differences in this localization between the illumination stress groups and their corresponding control groups. Compared with that in the control group, the mean gray scale of GnRH in the rats exposed to continuous illumination was increased from 2 wk to 4 wk (2 wk:  $105.7 \pm 7.9$  vs  $77.4 \pm 7.2$ ,  $P < 0.05$ ; 3 wk:  $97.4 \pm 7.7$  vs  $77.6 \pm 6.6$ ,  $P < 0.05$ ; 4 wk:  $93.2 \pm 2.1$  vs  $77.9 \pm 4.0$ ,  $P < 0.05$ ). The quantity of GnRH mRNA in the rats exposed to continuous illumination was also higher than that in the controls (2 wk:  $1.01 \pm 0.10$  vs  $0.80 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ; 3 wk:  $0.95 \pm 0.07$  vs  $0.81 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ; 4 wk:  $0.94 \pm 0.05$  vs  $0.82 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of GnRH in digestive tract can be effected by illumination stress. GnRH may regulate digestive function by autocrine and paracrine, suggesting that GnRH may be a kind of hormone not only responded to normal physiological function of digestive tract but also responded to stress activity.

**Key Words:** Illumination; Stress; Stomach; Gonadotropin-releasing hormone; Rat; Immunohistochemistry; Real-time PCR

Huang Z, Yun SF, Lu KG, Han XF, Zhang YM, Jiang C, Yao B. Effect of illumination stress on the expression of gonadotropin-releasing hormone in stomach of SD rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2576-2580

## 摘要

**目的:** 观察光照应激状态下SD大鼠胃内促性腺素释放素(GnRH)的表达变化。

**方法:** 建立SD大鼠光照应激模型, 24 h持续光照, 分别取光照1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 1 wk, 2 wk, 3 wk, 4 wk和相应对照组的胃组织, 采用免疫组化和Real-time PCR法检测GnRH在各时间段大鼠胃组织中的定位和蛋白及mRNA表达变化。

**结果:** GnRH阳性细胞广泛分布于大鼠胃壁上皮细胞, 免疫反应阳性细胞在实验组和对

## ■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

照组中定位没有差异. 实验组的GnRH平均灰度值高于其相应的对照组, 光照2-4 wk时, 实验组与对照组相比差异均显著(2 wk:  $105.7 \pm 7.9$  vs  $77.4 \pm 7.2$ ,  $P < 0.05$ ; 3 wk:  $97.4 \pm 7.7$  vs  $77.6 \pm 6.6$ ,  $P < 0.05$ ; 4 wk:  $93.2 \pm 2.1$  vs  $77.9 \pm 4.0$ ,  $P < 0.05$ ). 实验组大鼠胃的GnRH mRNA水平高于对照组, 与对照组相比, 持续光照2-4 wk时, 实验组大鼠胃的GnRH mRNA增加具有显著性差异(2 wk:  $1.01 \pm 0.10$  vs  $0.80 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ; 3 wk:  $0.95 \pm 0.07$  vs  $0.81 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ; 4 wk:  $0.94 \pm 0.05$  vs  $0.82 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 光照应激可以影响消化道中GnRH的表达, GnRH以自分泌和旁分泌的机制对消化系统产生调节作用. 提示GnRH除参与消化道正常生理功能外, 可能还是一种参与应激反应的激素.

**关键词:** 光照; 应激; 胃; 促性腺素释放素; 大鼠; 免疫组化; 实时荧光定量PCR

黄祝, 恽时锋, 卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 蒋超, 姚兵. 光照应激对SD大鼠胃GnRH表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2576-2580  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2576.asp>

## 0 引言

不同的应激条件(如光照、温度等)可以通过GnRH神经元的调节机制引起GnRH分泌的变化<sup>[1-3]</sup>, 并且长时间处于这些应激状态下, 会引起消化系统功能紊乱等症状<sup>[4]</sup>. 已有研究表明, 胃黏膜壁细胞、胃平滑肌细胞, 胃壁细胞上有GnRH免疫反应阳性上皮细胞, 并表达GnRH mRNA<sup>[5]</sup>. 但在应激状态下, 消化系统中的GnRH定位和表达是否有变化尚未有报道. 为此, 本实验通过建立持续光照应激大鼠模型, 利用免疫组化和Real-time PCR方法观察持续光照应激下大鼠胃GnRH定位和蛋白及mRNA表达变化, 分析GnRH是否参与消化系统对应激的反应.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级SD♂大鼠80只, 体质量190-210 g. 动物饲料和垫料(中国人民解放军南京军区南京总医院动物比较医学科购买). 兔抗大鼠GnRH抗体(武汉博士德公司), 羊抗兔IgG-HRP(北京博奥森公司), DAB显色液(福建迈新公司), TRIzol RNA提取液(invitrogen), Omniscript RT kit反转录试剂盒(Qingen), SYBR Green I(invitrogen), 胶回

收试剂盒(杭州博日生物科技公司), 100 bp DNA ladder(GenScript).

### 1.2 方法

**1.2.1 造模:** 随机选取40只SD大鼠持续光照(40 W日光灯), 可自由饮食. 光照应激时间分为1 d、2 d、3 d、4 d、1 wk、2 wk、3 wk和4 wk 8个时间段, 每个时间段有5只SD大鼠, 温度为 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . 同时设立相同数量的正常昼夜节律的SD大鼠(光照时间: 黑暗时间 = 12 h : 12 h)为对照组. 对照组室温、光的强度与实验组相同. 实验操作严格按照南京军区南京总院实验动物伦理委员会的要求进行.

**1.2.2 动物取材:** 光照应激组、对照组在相应时间段按10 mg/100 g体质量盐酸氯胺酮麻醉后, 心脏取血处死. 取胃组织放入预冷的0.01 mol/L PBS(pH7.4)中冲洗干净. 取部分组织投入Bouin's液中固定24 h, 用于免疫组化分析, 部分组织放入液氮内用于Real-time PCR分析.

**1.2.3 免疫组化:** 石蜡切片经脱蜡水化之后, 高温高压进行抗原修复, 然后浸入3%过氧化氢/甲醇温育30 min, 以除去内源性过氧化物酶. 浸蒸馏水5 min后入0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗5 min, 共3次. 加入兔抗大鼠GnRH抗体(1 : 200稀释), 4℃孵育过夜. 次日经0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗5 min, 共3次. 加入羊抗兔IgG-HRP(1 : 200稀释), 室温温育1 h, 0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗5 min, 共3次. 滴加DAB显色液显色2 min, 蒸馏水充分漂洗, 苏木素复染10 s, 常规脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察拍照. 用0.01 mol/L PBS(pH7.4)取代第一抗体做阴性对照. 用Image-Pro plus 6.0图像分析系统对光照不同时间段的GnRH的含量进行半定量分析. 测定阳性细胞的平均灰度, 每个光照时间段分别选4个标本, 计算其均值. 灰度值低, 说明透光度低, 即免疫染色阳性强度高. 计算出每个单位面积的GnRH免疫反应产物的相对含量.

**1.2.4 总RNA的提取和反转录:** 将胃从液氮中取出, 研磨成粉末, 按照TRIzol试剂盒抽提总mRNA, 使用Omniscript RT kit反转录试剂盒按照操作说明进行反转录反应, 总体积20  $\mu\text{L}$ , 反应体系如下: 总RNA50 ng-2  $\mu\text{g}$ 至nuclease-free的小管中, 加DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ 至12  $\mu\text{L}$ .  $65^\circ\text{C}$  5 min后, 置于冰上至少1 min. 在各小管中加入10 $\times$ 第一链合成缓冲液2  $\mu\text{L}$ , dNTP混合物(10 mmol/L)1  $\mu\text{L}$ , RNase抑制剂(10 kU/L)1  $\mu\text{L}$ , Omniscript Reverse Transcriptase(200 kU/L)1.0  $\mu\text{L}$ , 反转录引物(10

### ■研发前沿

GnRH已经在消化系统中发现, 认为他不仅是一种生殖激素还是一种消化激素. 因此寻求他在消化系统中的作用和作用机制成为目前的研究热点.

### ■相关报道

刘晓宁研究胃腔内GnRH类似物对大鼠消化道胃泌素免疫阳性细胞及血液、胃液中胃泌素含量的影响, 认为外分泌的GnRH对大鼠消化道中胃泌素的合成与分泌均起显著的促进作用. Svehkina *et al*发现长期处于光照状态, 不论年轻的还是老年大鼠, 他们的胰腺和淀粉酶活性都降低影响胃肠道的动力而导致消化功能发生紊乱.



### ■创新盘点

利用光照应激造成消化功能的紊乱,探讨在此状态下,胃内的GnRH定位和表达是否改变,以及通过什么途径发生改变,尚未相关报道。

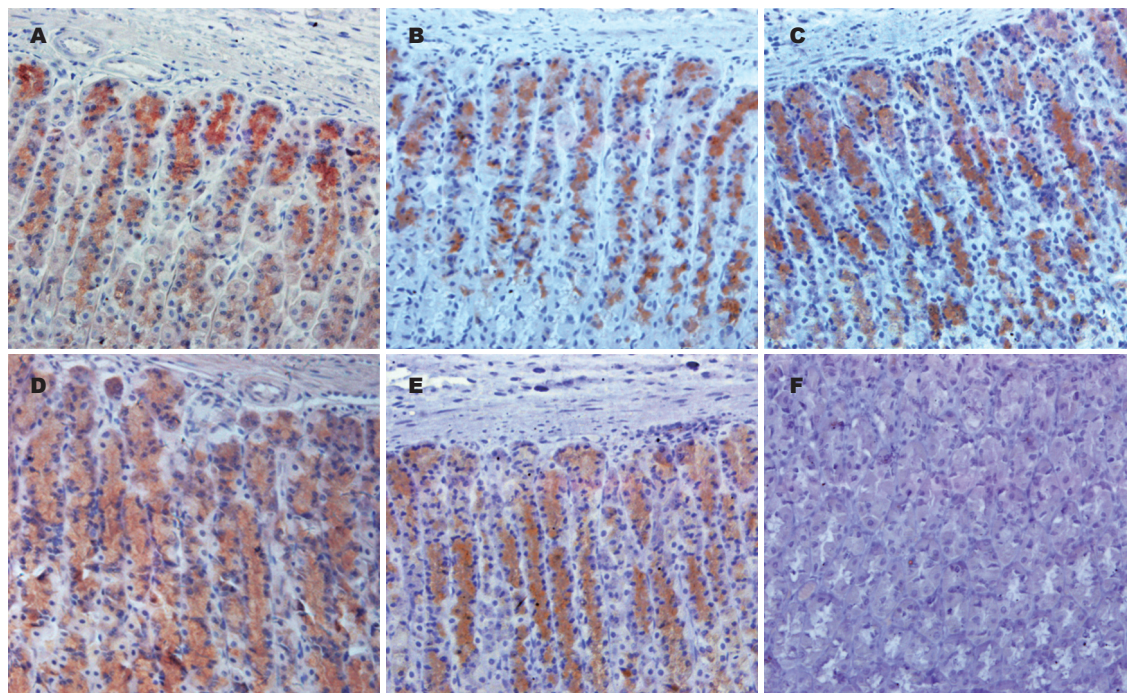


图1 不同应激时间的胃GnRH免疫组织化学染色结果( $\times 200$ )。A: 对照组; B: 光照1 d; C: 光照1 wk; D: 光照2 wk; E: 光照4 wk; F: 阴性对照。

表1 光照应激下大鼠胃GnRH平均灰度值的变化(mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ )

光照时间	实验组	对照组
1 d	75.3 $\pm$ 5.3	74.3 $\pm$ 6.8
2 d	75.7 $\pm$ 7.1	74.9 $\pm$ 6.5
3 d	77.3 $\pm$ 6.9	75.3 $\pm$ 5.3
4 d	80.6 $\pm$ 9.8	76.2 $\pm$ 8.8
1 wk	82.7 $\pm$ 7.5	76.5 $\pm$ 6.5
2 wk	105.7 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	77.4 $\pm$ 7.2
3 wk	97.4 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>	77.6 $\pm$ 6.6
4 wk	93.2 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	77.9 $\pm$ 4.0

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

$\mu\text{mol/L}$ )2  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  1 h后, 93 $^{\circ}\text{C}$  5 min中止反应。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2.5 引物设计: 在GenBank上查找大鼠GnRH和内参GAPDH的mRNA序列, 取其保守区, 使用primier 5.0设计引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成, GnRH: 上游引物5'-CTGGCCCCGTTACACCTCTTA-3', 下游引物5'-AGAAATGCGGAAGCC CACAC-3'; GAPDH: 上游引物5'-ATCACTGCCA CTCAGAAG-3', 下游引物5'-AAGTCACAGGAG ACAACC-3'。扩增片段分别为182 bp和317 bp。

1.2.6 标准曲线的制作: 将PCR产物割胶回收, 定量, 按以下浓度稀释:  $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$  copies/L, 进行荧光定量PCR, 制

作标准曲线。反应体系为: 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(10 mmol/L)0.5  $\mu\text{L}$ 、 $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L)2.5  $\mu\text{L}$ 、上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )1  $\mu\text{L}$ 、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )1  $\mu\text{L}$ 、SYBR Green I 1  $\mu\text{L}$ 、Taq DNA polymerase(5 kU/L)0.15  $\mu\text{L}$ 、cDNA 1  $\mu\text{L}$ 加无核酶水至25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  40 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  7 min。  
1.2.7 GnRH mRNA的荧光定量PCR检测: 取样本cDNA按照以上条件混合, 同上条件进行PCR扩增, 同时作标准曲线, 将目的基因的CT值(Threshold cycle)与标准曲线的CT值相比较作为目的基因mRNA的相对含量。每个样本重复3次, 以平均值表示最后结果。

**统计学处理** 全部数据用SPSS11.0统计软件计算, 所有数据用mean $\pm$ SD表示, 并进行独立样本 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

2.1 免疫组化 标本免疫组织化学染色特异性良好, 胃GnRH阳性细胞呈棕色, 背底不着色, 易于识别。GnRH阳性细胞在大鼠胃壁上皮细胞分布较广泛, 定位于胞膜和胞质中, 胞核呈阴性。阴性对照大鼠胃细胞均呈阴性反应(图1)。用Image-Pro Plus 6.0图像分析结果发现, 实验组的GnRH平均灰度值高于其相应的对照组, 持续光照2 wk后, GnRH的平均灰度值达到最高, 与相

### ■应用要点

本研究为GnRH在消化系统中的作用及其作用机制提供研究依据。

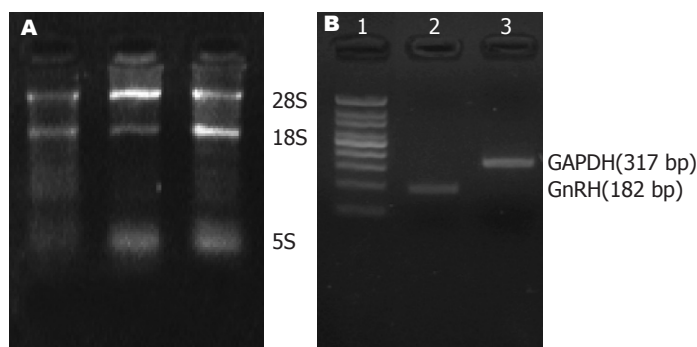


图 2 RNA和引物特异性电泳图. A: RNA电泳图; B: 引物特异性电泳图; 1: marker; 2: GnRH; 3: GAPDH.

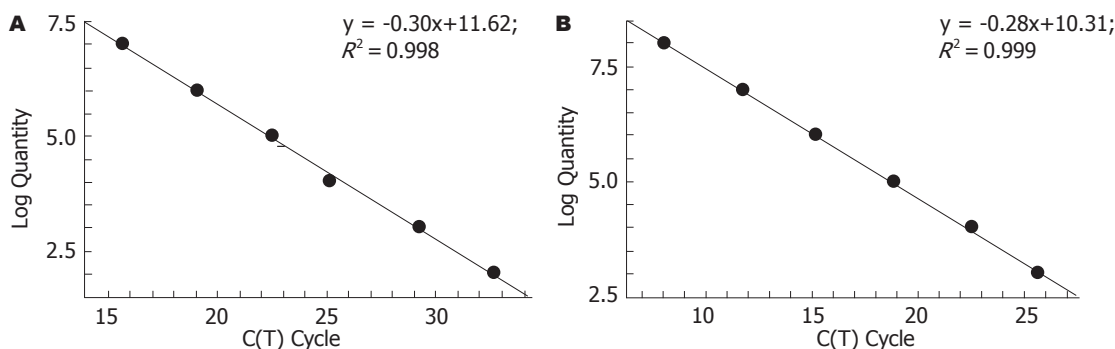


图 3 GAPDH、GnRH标准曲线的制作. A: GAPDH; B: GnRH.

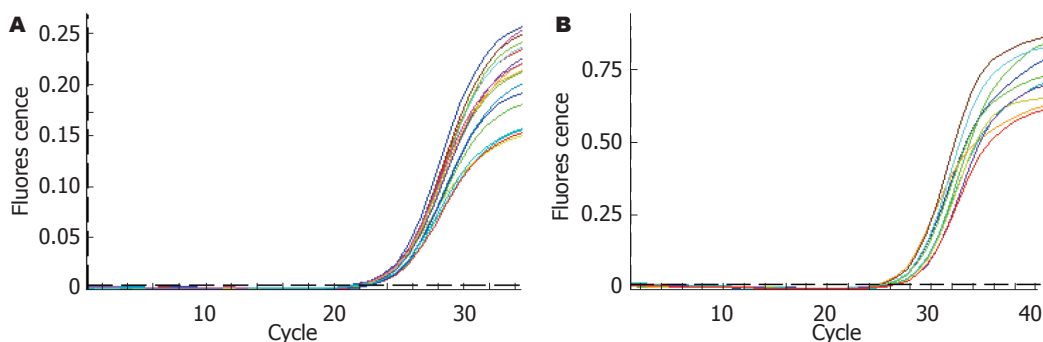


图 4 基因GAPDH, GnRH的实时荧光定量PCR扩增曲线. A: GAPDH; B: GnRH.

应对照组相比, 光照2-4 wk后, 实验组的GnRH平均灰度值显著性增高( $105.7 \pm 7.9$  vs  $77.4 \pm 7.2$ ,  $97.4 \pm 7.7$  vs  $77.6 \pm 6.6$ ,  $93.2 \pm 2.1$  vs  $77.9 \pm 4.0$ ,  $P < 0.05$ , 表1).

## 2.2 Real-time PCR结果

2.2.1 大鼠胃总RNA的提取: 20 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 可见28S、18S和5S三条rRNA条带, 提示RNA完整(图2A). 经紫外分光光度计检测,  $A_{260}/A_{280}$ 为1.8-2.0.

2.2.2 引物特异性鉴定: 以cDNA为模板扩增, 可见182 bp和317 bp(图2B), 未见非特异性条带出现, 说明引物特异性高.

2.2.3 标准曲线和荧光定量结果: 将割胶回收的PCR产物按一定浓度稀释后作为模板, 进行荧光定量PCR扩增, 所得的标准曲线线性关系良好,

两个基因标准曲线的 $R^2$ 值均超过0.99(图3). 将所有样本cDNA进行荧光定量PCR扩增, CT值均在准确的定量范围以内, 因此扩增结果可靠(图4).

根据标准曲线计算GnRH mRNA的相对含量, 并进行统计学分析. 结果发现: 实验组大鼠胃的GnRH mRNA比值高于对照组, 持续光照2 wk后, GnRH mRNA比值达到最高, 与对照组相比, 持续光照2-4 wk时, 差异具有显著性( $1.01 \pm 0.10$  vs  $0.80 \pm 0.01$ ,  $0.95 \pm 0.07$  vs  $0.81 \pm 0.01$ ,  $0.94 \pm 0.05$  vs  $0.82 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ , 表2).

## 3 讨论

促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH), 是一种由脑组织分泌以调控生殖系统功能的信号分子, 刺激垂体细胞分泌

## ■名词解释

1 促性腺激素释放激素(GnRH), 他的主要作用是刺激卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)的生成, 从而调控性腺内分泌子形成和激素功能. 在更进一步的研究中, 发现GnRH不但存在于下丘脑中, 而且存在于其他脑组织或非脑组织, 他不但在不同脊椎动物中结构可变, 而且每一种动物体内还会有二种或二种以上形式的GnRH, 他的功能也有多种.

2 应激: 指机体在受到各种内外环境因素刺激时所出现的非特异性全身反应. 而刺激因素被称为应激原.

### 同行评价

本研究实验设计合理, 技术路线正确, 方法先进, 图表清晰, 论文结构严谨, 层次分明, 结论明确, 具有一定的理论价值。

表 2 光照应激下大鼠胃GnRH mRNA相对含量的改变

光照时间	实验组(GnRH/GAPDH)	对照组(GnRH/GAPDH)
1 d	0.82 ± 0.01	0.81 ± 0.01
2 d	0.82 ± 0.02	0.80 ± 0.02
3 d	0.83 ± 0.02	0.80 ± 0.02
4 d	0.86 ± 0.35	0.80 ± 0.02
1 wk	0.90 ± 0.07	0.81 ± 0.01
2 wk	1.01 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.01
3 wk	0.95 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.01
4 wk	0.94 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.01

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 对照组。

黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)和卵泡刺激激素(follicle stimulating hormone, FSH)。姚兵 *et al*<sup>[6-7]</sup>通过原位杂交等方法, 在消化系统(如, 颌下腺、胃和肠等)可检测到较强的GnRH和GnRH受体mRNA杂交信号, 由此认为GnRH也是一种胃肠激素, 他可由消化系统产生并作用于消化道黏膜上皮、腺上皮细胞, 参与胃肠功能的调节。

光照周期对动物的内分泌系统影响较大。光信号通过视网膜下丘脑神经束经交感神经传到松果体, 在此光信号转换成褪黑素。褪黑素具有昼低夜高的分泌规律, 光周期是调节褪黑素昼夜节律的重要外环境因素。褪黑素可作用于下丘脑-垂体-性腺轴, 也能直接对性腺产生抑制性作用, 改变GnRH的脉冲频率<sup>[8-9]</sup>。光照周期越长, 褪黑素分泌越低, 对GnRH的抑制作用越弱, 从而引起GnRH分泌的变化。连续的光照对内分泌系统特别是垂体-性腺轴产生重要改变。褪黑素分泌减少与生殖能力增加的现象在生活于北半球的妇女中已经发现<sup>[10]</sup>。El Qandil *et al*<sup>[11]</sup>利用短日照研究生活在沙漠中飞鼠GnRH的表达水平时发现, 光照时间缩短, 可以抑制脑垂体正中核GnRH的释放。并且长期处于光照时间, 导致胃肠道内一些淀粉酶的活性减弱, 影响胃肠道的动力而导致消化功能发生紊乱<sup>[12]</sup>。

我们实验结果发现, 光照应激导致GnRH的蛋白和mRNA表达水平升高, 持续光照2 wk时, 胃的GnRH的表达水平达到最高, 并且mRNA水平也达到最高。持续光照3-4 wk时, GnRH的蛋白和mRNA表达水平有所降低, 说明机体可能通过“内稳态机制的调节”, 改变GnRH的脉冲频率。推测消化道通过自分泌(或/和旁分泌)的方式产

生GnRH, GnRH参与了胃肠道内淀粉酶等活性的改变影响胃肠道的动力, 从而参与了胃对光照应激的生理调节过程。因此, 我们认为GnRH除参与消化道正常生理功能外, 可能还是一种参与应激反应的激素。

### 参考文献

- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): hormonal aspects. *Gen Comp Endocrinol* 2005; 140: 116-125
- Lincoln GA. Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone releasing hormone in rams exposed to artificial photoperiods. *J Endocrinol* 1977; 73: 519-527
- Mintz EM, Lavenburg KR, Blank JL. Short photoperiod and testosterone-induced modification of GnRH release from the hypothalamus of *Peromyscus maniculatus*. *Brain Res* 2007; 1180: 20-28
- Vinogradova IA. [Effect of different light regimens on the development of metabolic syndrome of aging rats] *Adv Gerontol* 2007; 20: 70-75
- Chen L, He HX, Sun XD, Zhao J, Liu LH, Huang WQ, Zhang RQ. Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor and effect of gonadotropin-releasing hormone analogue on proliferation of cultured gastric smooth muscle cells of rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1780-1784
- Yao B, Huang W, Huang Y, Chui Y, Wang Y, Li H, Pu R, Wan L, Zhang R. A study on the localization and distribution of GnRH and its receptor in rat submaxillary glands by immunohistochemical, in situ hybridization and RT-PCR. *Life Sci* 2003; 72: 2895-2904
- Huang W, Yao B, Sun L, Pu R, Wang L, Zhang R. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor in rat digestive tract. *Life Sci* 2001; 68: 1727-1734
- Reiter RJ. Pineal gland interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metab* 1991; 2: 13-19
- Bayarri MJ, Rodríguez L, Zanuy S, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ, Kagawa H, Okuzawa K, Carrillo M. Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 2004; 136: 72-81
- Boczek-Leszczak E, Juszczak M. [The influence of melatonin on human reproduction] *Pol Merkuri Lekarski* 2007; 23: 128-130
- El Qandil S, Chakir J, El Moussaoui R, Oukouchoud R, Rami N, Benjelloun WA, Lakhdar-Ghazal N. Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull* 2005; 64: 371-380
- Svechikina EB, Tiutiunnik NN, Vinogradova IA. [Influence of light regimens, melatonin, and epitalon on amylase activity in the pancreas and small intestine in rats of different age] *Adv Gerontol* 2006; 19: 66-71

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



# 乙型肝炎病毒全S蛋白与纤维蛋白原 $\alpha$ 链的相互作用

周 飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 许鸿志, 潘金水, 蔡稼燕, 董 菁

周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 许鸿志, 潘金水, 蔡稼燕, 董菁, 厦门大学附属中山医院消化内科; 厦门大学消化疾病研究所; 厦门市消化疾病中心, 福建省厦门市 361004  
周飞, 福建医科大学硕士在读, 主要从事乙型肝炎病毒的基础研究。

厦门市首批重大疾病科研攻关项目, No. WKZ0501

厦门市卫生局医学科研立项项目, No. WSK0506

厦门大学引进人才科研启动基金, No. Z03109

福建省青年科技人才创新项目

福建省高校新世纪人才创新资助项目

**作者贡献分布:** 此课题由周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅及董菁设计; 研究过程由周飞, 卢雅丕, 陈美娅, 许鸿志, 潘金水及蔡稼燕操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由任建林, 潘金水及董菁提供; 数据分析由周飞, 许鸿志, 潘金水及董菁完成; 本论文写作由周飞与董菁完成。

**通讯作者:** 董菁, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科. dj@xmzsh.com

电话: 0592-2293171

收稿日期: 2008-05-27 修回日期: 2008-07-08

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Interaction between fibrinogen alpha chain and the whole S protein of hepatitis B virus

Fei Zhou, Jian-Lin Ren, Ya-Pi Lu, Mei-Ya Chen, Hong-Zhi Xu, Jin-Shui Pan, Jia-Yan Cai, Jing Dong

Fei Zhou, Jian-Lin Ren, Ya-Pi Lu, Mei-Ya Chen, Hong-Zhi Xu, Jin-Shui Pan, Jia-Yan Cai, Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University; Gastroenterology Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China

**Supported by:** the Xiamen Municipal Fund for Major Diseases, No. WKZ0501; the Xiamen Health Bureau Fund for Medical Research, No. WSK0506; the Xiamen University Scientific Research Launching Foundation for Introduced Talents, No. Z03109; the Youth Science and Technology Talent Innovation Program of Fujian Province; and the Innovation Fund for New Century Researchers in University of Fujian Province

**Correspondence to:** Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. dj@xmzsh.com

Received: 2008-05-27 Revised: 2008-07-08

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To screen the proteins interacting with the whole S protein of hepatitis B virus (HBV) from hepatocyte cDNA library by yeast two-hybrid system, and to validate interacting behavior between fibrinogen alpha chain and the whole S protein by reverse yeast two-hybrid.

**METHODS:** The whole S gene of HBV was cloned into yeast expression vector pDEST32 to construct a bait plasmid, which was verified by Western blot. The bait plasmid and prey plasmids inserted liver cDNA fragments were cotransformed into yeast cells MaV203 by Liac-mediated transformation. Diploid yeasts were plated on synthetic dropout nutrient medium to screen positive colonies. After extracting and sequencing of prey plasmids from positive colonies, the inserted sequences were bioinformatically analyzed. For reverse yeast two-hybrid, the bait plasmid expressing partial fibrinogen alpha chain and four prey plasmids expressing the whole S protein mutants were re-combined. The reconstituted bait plasmid was cotransformed into yeast cells MaV203 with the four prey plasmids, respectively. Diploid yeasts were plated on synthetic dropout nutrient medium and X-gal assay was performed to validate the interacting behavior.

**RESULTS:** By yeast two-hybrid technique, prey plasmids that were inserted partial gene coding 266-644 amino acid of fibrinogen alpha chain had a positive reaction with bait plasmid coding the whole S protein of HBV. By reverse yeast two-hybrid, fibrinogen alpha chain protein interacted with the four whole S protein mutants. The protein binding domain of the whole S protein might be the leading 268 amino acids.

**CONCLUSION:** Fibrinogen alpha chain protein may bind the whole S protein of HBV. The interacting domain is in the 266-644 amino acids of fibrinogen alpha chain and the frontal 268 amino acids of the whole S protein, respectively.

**Key Words:** Hepatitis B Virus; Whole S protein; Fibrinogen alpha chain; Yeast two-hybrid

Zhou F, Ren JL, Lu YP, Chen MY, Xu HZ, Pan JS, Cai JY, Dong J. Interaction between fibrinogen alpha chain and the whole S protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2581-2586

## 摘要

**目的:** 筛选人肝细胞cDNA文库中与乙型肝炎

## ■背景资料

病毒蛋白-宿主蛋白相互作用是目前的研究热点之一。本研究试图通过相对成熟的酵母双杂交技术, 对HBV全S蛋白的相互作用蛋白进行筛选和验证, 其目的是为了探讨在细胞内过量表达的囊膜蛋白干扰肝细胞功能、病毒蛋白的表达后加工等方面的可能性。

## ■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科; 陈红松, 副研究员, 北京大学人民医院肝病研究所

## ■研发前沿

目前针对HBV X蛋白(HBx)的结合蛋白有较多研究,国内成军教授的实验室针对前S区、中蛋白的候选结合蛋白进行了初步筛选,但由于缺少多种技术手段的验证,国内外没有针对HBV囊膜蛋白结合蛋白有所定论。

病毒(HBV)全S蛋白相互作用蛋白的基因,并反向验证HBV全S蛋白候选结合蛋白之间相互作用。

**方法:** 将全S基因定向克隆到酵母表达载体pDEST 32,构建正向筛选的诱饵质粒并Western blot法验证其在酵母中的表达。将诱饵质粒与人肝细胞cDNA文库质粒共同转化MaV203酵母细胞,在人肝细胞cDNA文库筛选候选结合蛋白,提取阳性菌落质粒测序,并分析其生物学性质。将筛选出的纤维蛋白原 $\alpha$ 链中下游序列及不同全S变异株基因,分别定向克隆到pDEST32及pDEST22载体中,利用Western blot法验证表达。将诱饵质粒与猎物质粒共同转化MaV203酵母细胞,以反向酵母双杂交方法验证初筛结果的可靠性及正确性。

**结果:** 正向的酵母双杂交实验,经初筛和再转染实验纤维蛋白原 $\alpha$ 链可与HBV全S蛋白发生相互作用。再以纤维蛋白原 $\alpha$ 链为靶基因设计诱饵质粒,以四种变异的HBV全S蛋白为靶基因设计猎物质粒,反向酵母双杂交法证实纤维蛋白原 $\alpha$ 链中下游可与不同全S变异体(总差异率2%)发生相互作用,纤维蛋白原 $\alpha$ 链与全S蛋白的结合域可能为病毒蛋白的前268aa。

**结论:** 纤维蛋白原 $\alpha$ 链中下游可与HBV全S蛋白产生特异性结合,其结合域可能与病毒蛋白的前268aa产生相互作用。

**关键词:** 乙型肝炎病毒;全S基因;纤维蛋白原 $\alpha$ 链;酵母细胞双杂交技术

周飞,任建林,卢雅丕,陈美娅,许鸿志,潘金水,蔡稼燕,董菁. 乙型肝炎病毒全S蛋白与纤维蛋白原 $\alpha$ 链的相互作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2581-2586  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2581.asp>

## ■相关报道

国内李丹 *et al* 利用酵母双杂交技术对HBV前S1多肽结合蛋白进行了筛选并验证;成军 *et al* 报道了以前前S、中蛋白、截短型中蛋白为靶蛋白的酵母双杂交实验,筛选出醛缩酶B等多个候选结合蛋白。本文在酵母双杂交基础上,进一步进行反向杂交实验,不仅验证初筛结果的可靠性,而且对可能的相互作用功能域进行初步探讨。

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种部分双链DNA嗜肝病毒,不仅引起急、慢性病毒性肝炎,而且与肝硬化(liver cirrhosis, LC)、肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)的发生发展密切相关<sup>[1-3]</sup>。以往研究认为HBV S区通过三个起始密码子(ATG)被人为的分为三个结构区,前-S1、前-S2和S区,编码三种长度的包膜蛋白,即大蛋白(LHBs)、中蛋白(MHBs)和主蛋白(SHBs)。最近董菁 *et al* 的研究认为中国HBV部分病毒株的S区存在前前-S区,即在前-S1之前存在一编码区域,这提示HBV包膜蛋白可能存在第四种形式,即全S蛋白,其编码范围为前前-S区

多肽和LHBs<sup>[4-5]</sup>。由于HBV是通过其表达的病毒蛋白与肝细胞蛋白相互作用导致疾病的进展<sup>[6-8]</sup>,因此,我们利用酵母双杂交技术寻找并证实可能与全S蛋白相互作用的人类肝细胞内蛋白,以探讨全S蛋白功能,进一步明确HBV可能存在的致病机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ProQuest<sup>TM</sup>酵母双杂交系统、人肝细胞cDNA文库(货号10422-020)、MaV203酵母高效感受态、酵母细胞质粒提取试剂盒等均购自Invitrogen公司。酵母YPAD培养基、不含氨基酸的酵母氮碱基等购自Oxoid公司,抗HIS、抗Pre S1、抗HBs鼠单克隆抗体购自Perfect公司。内切酶、DNA聚合酶购自TaKaRa公司。各种氨基酸及质粒提取试剂盒均购自北京博大泰克公司。其他试剂为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 正向诱饵质粒载体的构建以及其表达的验证:** 按Invitrogen公司操作指南,以多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法扩增HBV全S蛋白编码基因,将本研究室自HBV感染者血清中克隆的HBV全S基因(GenBank: EU075334)定向克隆入酵母表达载体pDEST32中, DNA测序验证后命名该重组诱饵质粒为pDEST32-w216, Western blot方法验证诱饵质粒在酵母细胞中的表达。

**1.2.2 正向筛选靶蛋白候选结合蛋白:** 按照Invitrogen公司酵母双杂交系统操作指南进行酵母双杂交筛选,将诱饵质粒pDEST32-w216与包含肝细胞cDNA文库经过醋酸锂法转入MaV203酵母细胞中,在SC-Leu-Trp、SC-Leu-Trp-His+3AT、SC-Leu-Trp-Ura等缺陷培养基以及X-gal分析等筛选出的阳性克隆,将初步筛选获得的阳性克隆中的猎物质粒与pDEST32-w216进行再转染试验验证,验证后将阳性克隆猎物质粒进行DNA测序,测序结果在美国国立卫生院(NIH)网站进行BLAST生物信息学分析。

**1.2.3 反向验证诱饵及猎物载体的构建:** (1)诱饵载体的构建: 以正向筛选出的纤维蛋白原 $\alpha$ 链诱饵质粒为模板(GenBank号NP\_068657),根据测序结果设计引物,上游引物5'-ATGGTCCGACTGGACGATTTTCGATGATGAAGATACC-3'(Sal I);下游引物5'-GTGCGGCCGCTAATGATGATGATGATGAGAAGTGTGGATACCTCTGAC-3'(Not I),下游引物带有HIS标



图1 pDEST32-w216转化MaV203酵母细胞后Western blot的结果. A: 单抗为抗PreS1; B: 抗HBs; +: pDEST32-w216转化MaV203酵母细胞; -: 阴性对照.

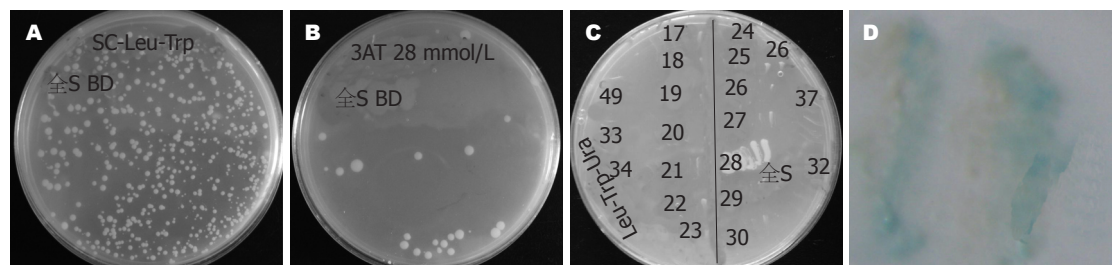


图2 酵母双杂交结果. A: SC-Leu/-Trp缺陷培养基; B: SC-Leu/-Trp/-His+28 mmol/L 3AT缺陷培养基; C: SC-Leu/-Trp/-Ura缺陷培养基; D: X-gal分析.

签. PCR条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 经35个循环, 最后72℃ 7 min. PCR产物为含Not I 和Sal I 酶切位点的纤维蛋白原 $\alpha$ 链蛋白基因, 双酶切后定向克隆到质粒pDEST32, DNA测序验证后命名为pDEST32-Fib. (2)猎物载体的构建: 以含有突变的全S序列质粒为模板, 其DNA序列可按下列GenBank号EU075334(S216, 即正向筛选时的靶基因序列)、EU082433(S245)、EU086837(S246)、EU086840(S249)寻找, 上游引物: 5'-ATGGTCTGA CTGGATGCAGTTAATCATTACTTC-3'(Sal I), 下游引物: 5'-GTGCGGCCGCTAGGTTCT AATGTATACCCAAAGAC-3'(Not I), PCR扩增-酶切后与pDEST22连接, DNA测序验证后分别命名为: pDEST22-w216、pDEST22-w245、pDEST22-w246和pDEST22-w249.

1.2.4 反向验证诱饵及猎物载体靶基因的表达: 将重组质粒pDEST32-Fib、pDEST22-w216、pDEST22-w245、pDEST22-w246和pDEST22-w249等质粒分别转入MaV203酵母细胞, 转化诱饵载体酵母细胞在亮氨酸营养缺乏液体培养基培养过夜, 转化猎物载体酵母细胞在色氨酸营养缺乏液体培养基培养过夜, 离心收集酵母细胞, 酵母裂解液裂解后, 保留上清备用.

Western blot方法验证诱饵蛋白表达: 按照常规操作处理样品后, 分别经120 g/L SDS-PAGE胶电泳, 经5%脱脂牛奶封闭后, 与1:1000抗HIS标签的鼠mAb孵育2 h, 洗脱后再与1:1000羊抗鼠二抗室温孵育2 h, 增强化学发光法进行放射自显影. 猎物蛋白表达的验证: 同诱饵蛋白验证,

仅将一抗替换为1:1000抗preS1或抗HBs鼠mAb. 1.2.5 反向验证: 将构建好的重组诱饵及猎物质粒用醋酸锂法共转入高效MaV203酵母感受态细胞, 分别涂布在SC-Leu/-Trp, 及SC-Leu/-Trp/-His+28 mmol/L 3AT(抑制自激活)培养基上. 将生长在SC-Leu/-Trp/-His+3AT的阳性克隆划线到SC-Leu/-Trp/-Ura的培养基上, 最后将阳性菌落接种于YPAD培养基影印于硝酸纤维素膜用液氮裂解后置于含X-gal的Z-buffer反应体系上检查 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性, 变成蓝色的为阳性菌落. 试验时交叉以pDEST32与pDEST22-w216、pDEST22-w245、pDEST22-w246和pDEST22-w249共转染, 或pDEST32-Fib与pDEST22共转染为阴性对照.

## 2 结果

2.1 诱饵质粒构建的验证 HBV全S基因为本实验室克隆并测序, GenBank号为: EU075334, C2亚基因型. 利用定向克隆技术, 将全S基因克隆到pDEST32中, 经验证后将诱饵质粒命名为pDEST32-w216(图1).

2.2 全S基因酵母双杂交结果 按照Invitrogen公司酵母双杂交操作指南方法, 我们将pDEST32-w216与肝细胞文库(克隆在pDEST22中)共转染MaV203酵母细胞, 之后利用不同缺陷培养基来筛选阳性克隆, 最后筛选出的阳性克隆可以表达His<sup>+</sup>、Ura<sup>+</sup>、LacZ报告基因(图2), 将阳性克隆送检测序. 正向筛选获得阳性克隆进行DNA测序, 经过BLAST, 确认其中一个阳性克隆内猎物质粒插入的cDNA序列含有部分纤维蛋

### ■创新盘点

目前没有关于全S蛋白候选结合蛋白的筛选及验证报道. 本研究利用酵母双杂交系统操作性较好的特点, 首先自肝cDNA文库中筛选出全S蛋白可能的宿主结合蛋白-纤维蛋白原 $\alpha$ 链, 之后再以纤维蛋白原 $\alpha$ 链设计诱饵载体, 与全S蛋白的4种变异体进行反向酵母双杂交, 通过该手段验证初筛结果的可靠性, 并初步证实相互结合作用的普遍性.



### ■应用要点

本文通过酵母双杂交以及反向杂交实验,初步证实纤维蛋白原 $\alpha$ 链中下游部分可能与HBV全S蛋白的中上游部分发生结合作用,为进一步阐述HBV相关性肝纤维化提供了一条新的研究思路。

白原 $\alpha$ 链序列,即编码266-644aa部分的序列。

**2.3 反向验证的诱饵、猎物物质载体构建及靶基因表达验证** 为进一步验证正向筛选结果的可靠性以及明确HBV全S蛋白与候选相互作用蛋白开放读码框(open reading frame, ORF)的正确性,我们进行了反向酵母双杂交试验进行验证。利用定向克隆技术,将含HIS标签的纤维蛋白原 $\alpha$ 链基因克隆到pDEST32中,经验证后将诱饵质粒命名为pDEST32-Fib(图3A)。

为验证相互作用的代表性,我们选择了4个HBV全S基因为靶基因构建猎物质粒,靶基因GenBank号分别为w216(EU075334)、w245(EU082433)、w246(EU086837)、w249(EU086840),均为C2亚基因型。利用定向克隆技术,将全S基因克隆到pDEST22中,经验证后将诱饵质粒命名为pDEST22-w216、pDEST22-w245、pDEST22-w246、pDEST22-w249(图3B-C)。

试验所采用的不同的全S蛋白之间存在点替换突变, w216与w246、w249之间存在2.0%(9/445aa)的差异, 9个替换突变分别位于:前前-S区1个,前S1区下游2个,前S2上游3个,主蛋白区中游3个。w216与w245之间具有明显差异,由于w245基因发生编码移行突变, w245前268aa(前前-S区至主蛋白上游)与w216之间仅有1个替换突变, w245在第269aa之后编码部分多聚酶序列,但比较结果提示其蛋白具有一定结构相似性(图4)。

**2.4 不同全S基因反向酵母双杂交验证结果** 按照Invitrogen公司酵母双杂交操作指南,在交叉设计阴性对照基础上,我们分别将诱饵质粒pDEST32-Fib与pDEST22-w216、pDEST22-w245、pDEST22-w246、pDEST22-w249共转染MaV203酵母细胞,之后利用不同缺陷培养基来筛选阳性克隆,阳性克隆可以表达His<sup>+</sup>、Ura<sup>+</sup>、LacZ报告基因(图5-6)。

### 3 讨论

既往研究认为HBV S区通过三个起始密码子(ATG)被人为的分为三个结构区,前-S1,前-S2和S区,编码三种长度的包膜蛋白,即大蛋白(LHBs)、中蛋白(MHBs)和主蛋白(SHBs)。最近的研究<sup>[2]</sup>认为中国HBV部分病毒株的S区中存在一前前S区,即在前S1之前存在一编码区域,这提示HBV包膜蛋白可能存在第四种形式<sup>[9]</sup>。我们将前前S区至S终止密码子编码的蛋白命名为全

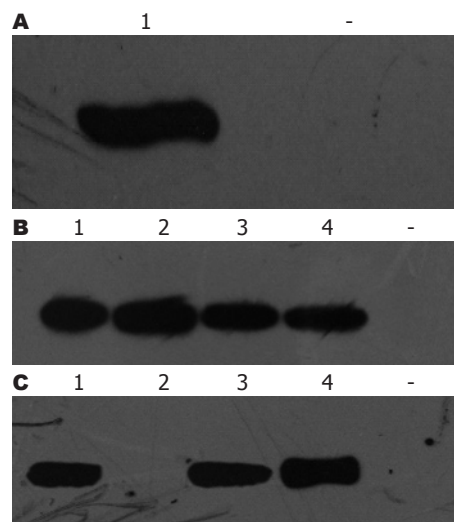


图3 反向杂交诱饵质粒和猎物质粒靶蛋白表达Western bolt的结果。A: 单抗为抗HIS; 1: pDEST32-Fib; B: 单抗为抗PreS1; C: 单抗为抗PreS1、抗HBs; 1: pDEST22-w216; 2: pDEST22-w245; 3: pDEST22-w246; 4: pDEST22-w249; -: 阴性对照蛋白。

S蛋白,以其为靶蛋白,利用酵母双杂交技术寻找并验证其与肝细胞相互作用的蛋白<sup>[10]</sup>。

酵母双杂交方法是目前较为可靠的蛋白-蛋白相互作用研究手段之一<sup>[11]</sup>,国内学者也将该手段应用于HBV囊膜蛋白的结合蛋白的研究之中<sup>[12-14]</sup>。我们采用的Invitrogen公司ProQuest™酵母双杂交系统,该系统特点是利用低复制载体控制猎物基因表达,同时联合3个报告基因系统以最大程度的减少酵母细胞双杂交试验系统的假阳性。按照该系统操作指南,候选结合蛋白的筛选需要经过3个步骤:初筛、再转染和反向杂交。为排除初筛获得的阳性克隆的操作误差,将阳性克隆中的猎物质粒提取后与诱饵质粒再次共转染,只有初筛和再转染均能在三缺陷培养基中生长的阳性克隆才进行DNA测序验证。虽然猎物质粒中插入的cDNA编码具有其原始序列的特异性,但在插入pDEST22后也可能在表达过程中出现移位,需要通过反向酵母双杂交试验验证。反向杂交同时也将展示初筛获得的候选结合蛋白与正向筛选时猎物蛋白的突变体之间的可能的相互作用,更加有利的证明相互作用<sup>[15]</sup>。通过正向筛选获得的阳性克隆猎物质粒含有纤维蛋白原 $\alpha$ 链的中下游部分,即266-644aa(全长644aa),通过反向酵母双杂交实验可以得出以下结论:以纤维蛋白原 $\alpha$ 链的266-644aa部分为诱饵质粒除了可以与表达原靶基因产物(EU075334)的猎物质粒发生良好的双杂交反应外,还可以与2种发生

1 50

S216 (1) MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHVGHILGNKSYSMMGGWS

S245 (1) MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHVGHILGNKSYSMMGGWS

51 100

S216 (51) SKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP

S245 (51) SKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP

101 135 150

S216 (101) NQVGAGAFPGFTPPHGGLLGWSPQAQGLITTPVAPPPASTNRQSGRQP

S245 (101) NQVGAGAFPGFTPPHGGLLGWSPQAQGLITTPVAPPPASTNRQSGRQP

151 200

S216 (151) TPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVP

S245 (151) TPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVP

201 250

S216 (201) TTASPISSIFSRTGDPAPNMENTTSGFLGPLLVLAGFLLTRILTIQPS

S245 (201) TTASPISSIFSRTGDPAPNMENTTSGFLGPLLVLAGFLLTRILTIQPS

251 268 300

S216 (251) LDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTS NHSP TSCPICPGYRWMCLRRFI

S245 (251) LDSWWTSLNFLGGAPTCPAKIR - - - - SPQPPITHQPLVLQFVLAIGCVC

301 350

S216 (301) IF L FILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPSTSTTGPKCTCTIPAQGT

S245 (297) GVLSSSSSCCYASSCWFFWTKVCPCFVLYFQEHQPPARGHARPARFL

351 400

S216 (351) SMFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFWSVLLVPFVQ

S245 (347) LKE- - - - -PLCFPLVAVQNLRTETA- -LVFP- -SHHP-GLSQD-----

401 445

S216 (401) WFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFFCLWVYI

S245 (380) -SYG-SGP- -QSV- - - - -SPGS- - - - -VY-

图4 w216与w245氨基酸序列比较.

## ■名词解释

1 全S蛋白: 包含前前S、前S1、前S2和主蛋白的HBV完整囊膜蛋白。

2 酵母双杂交反向杂交实验: 仍利用酵母双杂交系统, 将正向筛选猎物物质粒测序结果作为诱饵质粒靶基因, 以正向筛选诱饵质粒靶基因多种变异体为猎物物质粒靶基因, 进行的验证性酵母双杂交实验, 该实验是一种有效的蛋白-蛋白相互作用的验证方法。

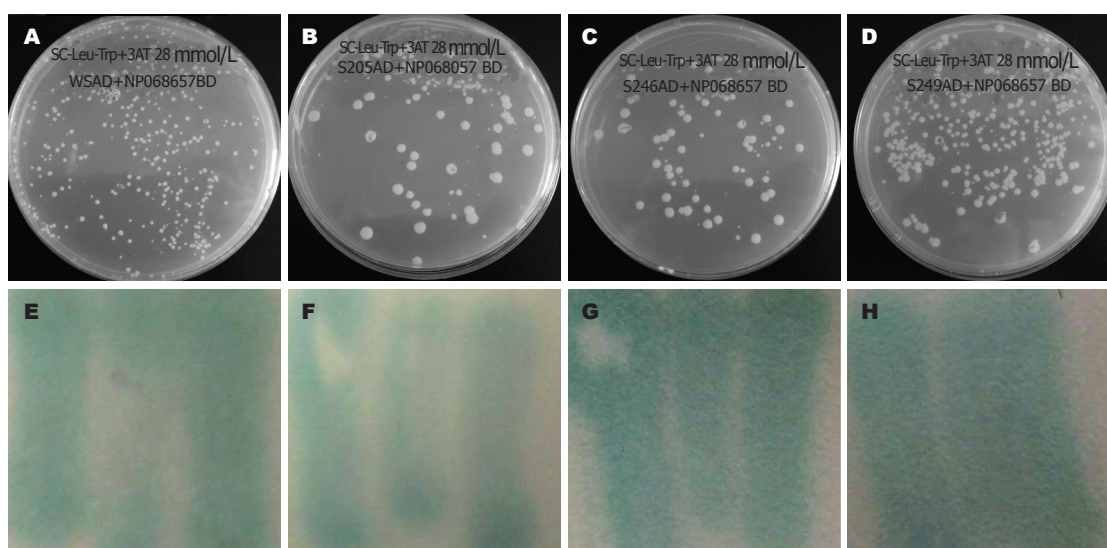


图5 pDEST32-Fib为诱饵质粒与不同HBV全S蛋白变异株的反向酵母双杂交. A-D: SC-Leu/-Trp/-His+3AT缺陷培养基; E-H: X-gal; A, E: pDEST22-w216双杂交; B, F: pDEST22-w245; C, G: pDEST22-w246; D, H: pDEST22-w249.

替换突变(2%, 9/445aa)的HBV全S蛋白变异株pDEST22-w246、pDEST22-w249产生良好的相互作用, 这提示纤维蛋白原 $\alpha$ 链与HBV全S蛋白的相互作用不因点替换突变所改变, 提示相互作用可能具有普遍性. 靶基因w245编码的前268aa与w216(EU075334)仅有一个替换突变发生(135aa), 269aa下游为移行突变, 编码部分多聚酶序列, 但多聚酶序列与全S蛋白具有一定结构类似性. pDEST32-Fib与pDEST22-w245实验的

阳性结果提示纤维蛋白原 $\alpha$ 链与HBV全S蛋白的具体结合域可能位于病毒蛋白的上游部分, 下游氨基酸序列的类似性可能对反向酵母双杂交的阳性结果产生影响.

纤维蛋白原由肝细胞分泌的糖蛋白, 为结构蛋白参与机体凝血过程, 分子由两对 $\alpha$ 链、 $\beta$ 链及 $\gamma$ 链组成, 每3条肽链( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )绞合成索状, 形成两条索状肽链, 在N末端有二硫键使态个分子得到稳定.  $\alpha$ 及 $\beta$ 肽链的N-端分别有一段16个

### ■同行评价

本研究创新性强,层次分明,思路清晰,结果可信,结论可靠,具有很好的学术价值。

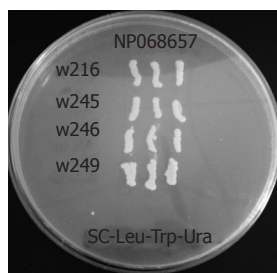


图6 含pDEST32-Fib分别与pDEST22-w216、pDEST22-w245、pDEST22-w246、pDEST22-w249在SC-Leu-Trp/-Uro缺陷培养基上生长。

及14个氨基酸的小肽,称为纤维肽A及B<sup>[16]</sup>。Al Ghumlas *et al*<sup>[17]</sup>研究发现经过 $\alpha$ -干扰素治疗后的慢性肝炎患者血清中的纤维蛋白原的表达较治疗前有所上升。Brennan *et al*<sup>[18]</sup>研究发现纤维蛋白原基因突变导致纤维蛋白原在肝细胞中的内质网聚积,导致肝细胞的坏死,最终导致肝硬化的发生。Liu *et al*<sup>[19]</sup>研究发现纤维蛋白原在肝细胞癌的表达下降。而Fan *et al*<sup>[20]</sup>研究发现在肝细胞癌组织中表达上升,尤其在转移灶组织高于其邻近的非癌组织。Yang *et al*<sup>[21]</sup>利用HBV的全X蛋白进行酵母双杂交文库的筛选,也筛选出了纤维蛋白原 $\beta$ 多肽,这说明HBV编码的病毒蛋白可能通过与纤维蛋白原家族相互作用,从而产生生物学作用。我们筛选出的为纤维蛋白原 $\alpha$ 链也可能在肝细胞内与全S蛋白结合,导致肝细胞内的纤维蛋白原的聚积,肝细胞的坏死,肝硬化的发生。

总之,本研究通过对酵母双杂交初筛、再转染以及反向杂交实验,初步证实了HBV全S蛋白的上游可能与纤维蛋白原 $\alpha$ 链中下游发生相互作用,这一发现为该病毒蛋白可能存在的生物学作用提供研究思路。为了进一步研究结果的可靠性,我们将应用免疫共沉淀或哺乳动物细胞双杂交方法予以验证<sup>[22-23]</sup>。

### 4 参考文献

- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- Park NH, Song IH, Chung YH. Chronic hepatitis B in hepatocarcinogenesis. *Postgrad Med J* 2006; 82: 507-515
- Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxi A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Villa E, Raimondo G. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* 2004; 126: 102-110
- 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-S区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1091-1096
- 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-S基因区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 785-789
- Lwa SH, Chen WN. Hepatitis B virus X protein

interacts with beta5 subunit of heterotrimeric guanine nucleotide binding protein. *Virology* 2005; 2: 76

- Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001; 75: 10348-10358
- Zhong S, Chan JY, Yeo W, Tam JS, Johnson PJ. Hepatitis B envelope protein mutants in human hepatocellular carcinoma tissues. *J Viral Hepat* 1999; 6: 195-202
- 周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 陈建民, 王琳, 董菁. 乙型肝炎病毒前-S真核载体的构建与表达. 肝脏 2008; 13: 47-48
- 周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 陈建民, 刘明, 张波, 董菁. 肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒全S蛋白筛选结合蛋白基因. 中华肝脏病杂志 2008; 16: 304-305
- Miller J, Stagljar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol* 2004; 261: 247-262
- 蔺淑梅, 张树林, 成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹. 肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-S蛋白结合蛋白基因筛选. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2907-2910
- 李丹, 王小众, 林纳, 陈丰霖. 乙型肝炎病毒前S1结合蛋白的筛选和鉴定. 中华传染病杂志 2007; 25: 20-24
- 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前S2蛋白结合蛋白基因的筛选. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 8-10
- White MA. The yeast two-hybrid system: forward and reverse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10001-10003
- 侯韬. 纤维蛋白原结构与功能研究进展. 国外医学·输血及血液学分册 2001; 24: 479-482
- Al Ghumlas AK, Abdel Gader AG, Al Faleh FZ. Natural anticoagulants and fibrinolytic activity following interferon therapy in chronic viral hepatitis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 263-267
- Brennan SO, Wyatt J, Medicina D, Callea F, George PM. Fibrinogen brescia: hepatic endoplasmic reticulum storage and hypofibrinogenemia because of a gamma284 Gly-->Arg mutation. *Am J Pathol* 2000; 157: 189-196
- Liu Y, Zhu X, Zhu J, Liao S, Tang Q, Liu K, Guan X, Zhang J, Feng Z. Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray. *Oncol Rep* 2007; 18: 943-951
- Fan BL, Zhu WL, Zou GL, Luo GS, Xu CL, Zhao WX. [Cloning and identification of fibrinogen gamma polypeptide (FGG) gene differentially expressed in human hepatocellular carcinoma] *Ai Zheng* 2004; 23: 249-253
- Yang Q, Cheng J, Dong J, Zhang J, Zhang SL. Molecular epidemiological study on pre-X region of hepatitis B virus and identification of hepatocyte proteins interacting with whole-X protein by yeast two-hybrid. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3473-3478
- Matsuzawa S, Reed JC. Yeast and mammalian two-hybrid systems for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 2007; 383: 215-225
- Tanowitz M, von Zastrow M. Identification of protein interactions by yeast two-hybrid screening and coimmunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2004; 259: 353-369

编辑 李军亮 电编 何基才



# 靶向CTGF锤头核酶对TGF- $\beta$ 1作用下人肝星状细胞合成I型胶原的作用

齐晓艳, 高润平, 王淑华, 张瑞娟, 包万国, 金清龙, 辛桂杰, 杨永广

齐晓艳, 高润平, 张瑞娟, 包万国, 金清龙, 辛桂杰, 吉林大学第一医院感染科 吉林省长春市 130021  
王淑华, 吉林大学第一医院激光科 吉林省长春市 130021  
杨永广, 哈佛医学院马塞诸塞总院 MA 02129 USA  
齐晓艳, 2008年吉林大学硕士毕业, 主要从事肝纤维化发生机制研究。

吉林省科技厅资助项目, No. 200505211, No. 20070729-9  
作者贡献分布: 实验研究和论文初稿齐晓艳完成; 实验设计、指导和论文定稿高润平完成; 实验设计与论文写作杨永广完成; 其他作者对实验工作给予大力协助。

通讯作者: 高润平, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院感染科, gao\_runping@yahoo.com  
电话: 0431-85612413

收稿日期: 2008-06-07 修回日期: 2008-07-26

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-08-18

## Inhibitory effect of hammerhead ribozyme targeting connective tissue growth factor on TGF- $\beta$ 1-induced collagen I synthesis in human hepatic stellate cells

Xiao-Yan Qi, Run-Ping Gao, Shu-Hua Wang, Rui-Juan Zhang, Wan-Guo Bao, Qing-Long Jin, Gui-Jie Xin, Yong-Guang Yang

Xiao-Yan Qi, Run-Ping Gao, Rui-Juan Zhang, Wan-Guo Bao, Qing-Long Jin, Gui-Jie Xin, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Shu-Hua Wang, Laser Department, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China  
Yong-Guang Yang, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, MA 02129, USA

Supported by: the Foundation of Science and Technology Bureau in Jilin Province, No. 200505211, No. 20070729-9

Correspondence to: Run-Ping Gao, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Avenue, Changchun 130021, Jilin Province, China. gao\_runping@yahoo.com

Received: 2008-06-07 Revised: 2008-07-26

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To observe the effect of hammerhead ribozyme targeting connective tissue growth factor (CTGF) on TGF- $\beta$ 1-induced collagen I synthesis and cell cycle progression in human hepatic stellate cells (HSCs).

**METHODS:** CTGF hammerhead ribozyme

cDNA plus two self-cleaving sequences were inserted into pTriEx2 to construct recombinant vector pTriCTGF-Rz. Both vectors were transfected into human hepatic stellate cell line (LX-2) individually, which was then stimulated by addition of TGF- $\beta$ 1 to the culture media. Semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction was used to determine the transcription of CTGF mRNA and collagen I mRNA in LX-2 cells. Collagen I secretion and cell cycle progression were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry, respectively.

**RESULTS:** TGF- $\beta$ 1 obviously increased the transcription of CTGF mRNA and collagen I mRNA and secretion of collagen I protein in pTriEx2-transfected LX-2 cells ( $t = 11.14, 14.36, 7.17$ ; all  $P < 0.01$ ). pTriCTGF-Rz-transfected LX-2 cells showed a decrease in the basic transcription of CTGF mRNA and collagen I mRNA as well as in the secretion of collagen I protein ( $t = 2.86, 3.06, 2.97$ ; all  $P < 0.05$ ). Furthermore, TGF- $\beta$ 1-induced increase of CTGF mRNA and collagen I mRNA transcription as well as collagen I secretion were partially inhibited in pTriCTGF-Rz-transfected LX-2 cells ( $t = 2.99, 3.09, 3.02$ ; all  $P < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 1 had no effect on LX-2 cell cycle progression.

**CONCLUSION:** CTGF is an essential downstream mediator for TGF- $\beta$ 1-induced collagen I production in human HSCs, but TGF- $\beta$ 1 has no effect on CTGF-mediated cycle progression of HSCs. CTGF may become a new target of gene therapy for liver fibrosis.

**Key Words:** Connective tissue growth factor; Transforming growth factor- $\beta$ 1; Human hepatic stellate cell; Hammerhead ribozyme; Gene therapy; Reverse-transcription polymerase chain reaction

Qi XY, Gao RP, Wang SH, Zhang RJ, Bao WG, Jin QL, Xin GJ, Yang YG. Inhibitory effect of hammerhead ribozyme targeting connective tissue growth factor on TGF- $\beta$ 1-induced collagen I synthesis in human hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2587-2591

## ■背景资料

肝纤维化是继发于多种慢性致病原因引起以肝内HSC激活和ECM过多产生为病理特征。近年来研究表明: 细胞因子TGF- $\beta$ 1与CTGF共同承担诱导多种脏器纤维化的发生。CTGF作为TGF- $\beta$ 1的下游介导者作用于大鼠HSC表面受体, 通过信号传导在转录、转录后水平诱导HSC合成I型胶原。因此, CTGF有可能成为肝纤维化基因治疗的一个新靶点。

## ■同行评议者

张绪清, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所; 阴赓宏, 研究员, 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

## ■研发前沿

大鼠体内、外的研究显示: 静止HSC激活是肝纤维化发生的关键环节, CTGF参与HSC激活, 并且在HSC介导肝纤维化的过程中发挥重要的作用. 近年来已有在啮齿类动物以HSC为靶细胞、CTGF为治疗靶点进行基因治疗的报道, 然而, 靶向CTGF的基因治疗抑制人类HSC介导肝纤维化的作用尚不完全清楚.

## 摘要

**目的:** 探讨靶向结缔组织生长因子(CTGF)的锤头核酶抑制TGF- $\beta$ 1作用下人肝星状细胞(HSC) I 型胶原(Col I)合成及其细胞周期进程的作用.

**方法:** 构建含有人CTGF锤头核酶cDNA序列的重组质粒pTriCTGF-Rz. 将空质粒pTriEx2和重组质粒pTriCTGF-Rz分别转染人肝星状细胞系(LX-2)细胞. 细胞分为4组: pTriEx2转染组, pTriEx2转染加TGF- $\beta$ 1组, pTriCTGF-Rz转染加TGF- $\beta$ 1组和pTriCTGF-Rz转染组. 采用半定量RT-PCR测定LX-2细胞CTGF mRNA和Col I mRNA转录水平, 采用ELISA和流式细胞仪分别用于LX-2细胞Col I分泌功能和LX-2细胞周期进程的检测.

**结果:** TGF- $\beta$ 1可明显提高LX-2细胞CTGF mRNA和Col I mRNA的转录水平及分泌Col I蛋白功能( $t = 11.14, 14.36, 7.17$ , 均 $P < 0.01$ ); pTriCTGF-Rz转染LX-2细胞既能降低基础CTGF mRNA和Col I mRNA水平及Col I蛋白水平( $t = 2.86, 3.06, 2.97$ , 均 $P < 0.05$ ), 又能部分拮抗TGF- $\beta$ 1诱导LX-2细胞CTGF mRNA和Col I mRNA转录和Col I蛋白分泌的增加( $t = 2.99, 3.09, 3.02$ , 均 $P < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 1对LX-2细胞周期进程无影响.

**结论:** CTGF是TGF- $\beta$ 1作用下人肝星状细胞合成Col I的下游介导者, TGF- $\beta$ 1对HSC周期进程无影响, 靶向CTGF有可能成为肝纤维化基因治疗的新靶点.

**关键词:** 结缔组织生长因子; TGF- $\beta$ 1; 人肝星状细胞; 锤头核酶; 基因治疗; 逆转录-聚合酶链反应

齐晓艳, 高润平, 王淑华, 张瑞娟, 包万国, 金青龙, 辛桂杰, 杨永广. 靶向CTGF锤头核酶对TGF- $\beta$ 1作用下人肝星状细胞合成 I 型胶原的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2587-2591 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2587.asp>

## 0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)被认为是多种原因引起肝纤维化发生、发展过程中起着关键作用的细胞. 一些细胞因子作用于HSC的表面受体、通过信号传导分子及转录因子在转录、转录后水平诱导HSC的基因表达、参与HSC介导肝纤维化的发生<sup>[1-4]</sup>. TGF- $\beta$ 1可刺激HSC合成包括 I 型胶原(Collagen I, Col I)在内的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 是非常重要的纤维源性细胞因子<sup>[2,4]</sup>. 结缔组织生

长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和TGF- $\beta$ 1共同承担诱导肝纤维化发生的功能. TGF- $\beta$ 1通过调控CTGF启动子活性诱导CTGF的产生. CTGF是TGF- $\beta$ 1诱导大鼠HSC、成骨细胞合成ECM的下游介导者<sup>[5-6]</sup>. 因此, CTGF可作为肝纤维化基因治疗的一个新靶点. 本研究将靶向人CTGF的锤头核酶cDNA序列插入pTriEx2质粒, 转染人肝星状细胞系(LX-2)细胞, 观察锤头核酶对TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞Col I合成及细胞周期进程的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM培养基(Gibco BRL公司), 胎牛血清(Hyclone公司), 人TGF- $\beta$ 1(Peprtech公司). 肝星状细胞系LX-2细胞由Friedman教授(美国)与徐列明教授(上海中医药大学肝病研究所)惠赠. pTriEx2质粒(Novagen公司), *Xho* I、*Nco* I (Toyobo公司), Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、TRIzol(Invitrogen公司), AMV、TagDNA聚合酶(Promega公司), 人Col I ELISA检测试剂盒(美国Unionhonest公司). CO<sub>2</sub>孵箱(德国 BB16/BB5060), PCR仪(德国Biometra, UNO II), 酶标仪(美国BLO-RAD), 流式细胞仪(美国BD Bioscience公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 锤头核酶的设计与重组质粒的构建:** 采用中科院上海生化所陈农安研究员核酶设计软件设计出针对人CTGF mRNA(NCBI, gi: 98986335)第896碱基切割位点CUA的锤头核酶cDNA序列, 正义链: 5'-CTTCTCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCCTG-3', 反义链: 5'-CAGGCTTCGTCCTCACGGACTCATCAGGAGAAG-3'; 在5'和3'端分别连接一自剪酶cDNA序列. 全部序列由上海生工生物工程技术有限公司合成, 并插入pBluescript II SK9(-)克隆载体上. 采用*Xho* I 和*Nco* I 分别对上述克隆载体及pTriEx2质粒进行双酶切, 通过胶回收、T4连接酶作用及测序, 成功构建含有针对CTGF mRNA的锤头核酶和两个自剪酶cDNA序列的pTriCTGF-Rz重组质粒.

**1.2.2 LX-2细胞培养及质粒转染:** LX-2细胞采用含100 mL/L胎牛血清(FBS)的DMEM(含青霉素和链霉素各100 kU/L), 于37°C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱培养. 生长良好的LX-2细胞用2.5 g/L胰酶消化, 无钙镁离子hank氏液洗涤, 25 mL/L FBS DMEM培养基悬浮, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^8$ /L, 分别置

## ■相关报道

2004年, Kozue Uchio采用CTGF反义寡核苷酸使小鼠肝内部分CTGF mRNA受到抑制, 初步显示其具有治疗实验性小鼠肝纤维化的作用. 2007年, George采用siRNA诱导大鼠肝纤维化肝组织CTGF基因沉默, 使CTGF和TGF- $\beta$ 1基因表达部分下调, HSC激活也受到抑制, 减轻了纤维化的程度.

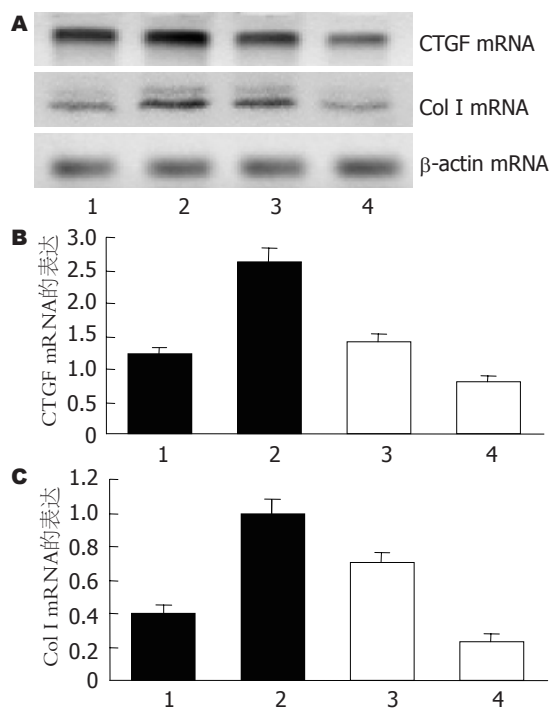


图1 pTriCTGF-Rz对TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞CTGF mRNA和 I 型胶原mRNA的作用。A: 半定量RT-PCR电泳图; B: CTGF mRNA与 $\beta$ -actin mRNA灰度比; C: I 型胶原mRNA与 $\beta$ -actin mRNA灰度比。1: 空质粒转染组; 2: 空质粒转染+TGF- $\beta$ 1组; 3: 重组质粒转染+TGF- $\beta$ 1组; 4: 重组质粒转染组。

于100 mm培养皿经造模型后用于CTGF mRNA和Col I mRNA检测及细胞周期进程检测或置于12孔培养板用于LX-2细胞Col I分泌测定。LX-2细胞首先于25 mL/L FBS DMEM培养基培养24 h, 改用1 mL/L FBS DMEM培养24 h, 然后用Lipofectamine™2000进行质粒转染, 细胞分为4组: (1)pTriEx2转染组, (2)pTriEx2转染加TGF- $\beta$ 1组, (3)pTriCTGF-Rz转染加TGF- $\beta$ 1组, (4)pTriCTGF-Rz转染组; 各组质粒转染4 h后, 换用1 mL/L FBS DMEM培养液, 于(2)、(4)组分别加入TGF- $\beta$ 1 20  $\mu$ g/L, 各组继续培养24 h, 用于各种检测。

1.2.3 CTGF mRNA与Col I mRNA转录水平测定: 收集上述LX-2模型细胞提取总RNA, 通过半定量PCR筛选出最佳模板RNA含量为0.8  $\mu$ g, 各组均取0.8  $\mu$ g RNA进行逆转录, 然后取5  $\mu$ L cDNA分别针对CTGF、I 型胶原和 $\beta$ -actin进行PCR扩增; 人CTGF上游引物: 5'-CCTGGTCCAGACCA CAGAGT-3'; 下游引物: 5'-ATGCTCTCATGCTG GTGCAG-3', 扩增产物239 bp。人I 型胶原上游引物: 5'-CCTCAAGGGCTCCAACGAG-3'; 下游引物: 5'-TCAATCACTGTCTTGCCCCA-3', 扩增产物117 bp。人 $\beta$ -actin上游引物: 5'-GTCCTCTCC

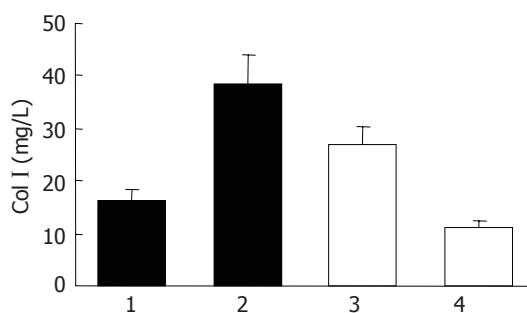


图2 pTriCTGF-Rz对TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞 I 型胶原分泌的作用。1: 空质粒转染组; 2: 空质粒加TGF- $\beta$ 1组; 3: 重组质粒加TGF- $\beta$ 1组; 4: 重组质粒组。

CAAGTCCACAC-3'; 下游引物: 5'-GGGAGACC AAAAGCCTTCAT-3', 扩增产物187 bp。PCR循环参数: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32个循环。PCR产物经10 g/L琼脂糖电泳, 使用Gelpro3.2软件与同组 $\beta$ -actin进行灰度分析。

1.2.4 LX-2细胞分泌Col I功能测定: 按上述方法制造LX-2细胞模型后, 收取培养上清, 通过ELISA测定LX-2分泌Col I的功能, 具体操作按ELISA试剂盒说明书进行。

1.2.5 LX-2细胞周期进程检测: 收集上述方法制造的LX-2模型细胞, 每组含 $1 \times 10^6$ 个细胞, 经洗涤、750 mL/L乙醇固定、PI染色, 采用流式细胞仪于激发波长488 nm条件下, 测定细胞内DNA含量, 通过流式细胞仪配套软件分析各组处于不同细胞增殖周期的百分比。

统计学处理 用SPSS11.0统计软件中的 $t$ 检验进行统计分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 pTriCTGF-Rz对TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞CTGF mRNA的作用 TGF- $\beta$ 1作用下pTriEx2空质粒转染LX-2细胞CTGF mRNA转录水平明显高于pTriEx2空质粒转染LX-2细胞( $t = 11.14$ ,  $P < 0.01$ ); pTriCTGF-Rz可抑制LX-2细胞CTGF mRNA基础转录水平和部分抑制TGF- $\beta$ 1诱导CTGF mRNA的转录水平( $t$ 值分别为2.86和2.99,  $P$ 值均 $< 0.05$ , 图1A-B)。

2.2 pTriCTGF-Rz对TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞Col I转录和分泌的作用 pTriEx2空质粒转染LX-2细胞具有基础水平Col I mRNA转录和Col I蛋白分泌功能, TGF- $\beta$ 1可明显提高pTriEx2转染LX-2细胞Col I mRNA转录水平和Col I蛋白分泌功能( $t$ 值分别为14.36和7.17,  $P$ 值均 $< 0.01$ ); pTriCTGF-Rz可降低LX-2细胞Col I mRNA和Col I蛋白的基础水平( $t$ 值分别为3.06和2.97,  $P$ 值均 $< 0.05$ )和部

### ■创新盘点

核酶既能发挥反义RNA阻断靶RNA的作用, 又能以酶的高效催化活性裂解破坏靶RNA, 而且核酶可重复利用。因此, 核酶治疗较反义寡核苷酸更为有效。本文旨在阐明靶向CTGF锤头核酶对人HSC系LX-2细胞合成 I 型胶原及细胞周期进程的影响, 为人类肝纤维化基因治疗提供理论依据。



### ■应用要点

肝纤维化基因治疗可明显抑制或逆转动物肝纤维化甚至肝硬化进程,有良好的应用前景。但基因治疗从动物模型到临床实验,需经过相当长的时间以证实其临床效果及可能出现的不良反应。本研究在人HSC系LX-2细胞水平上进行了靶向CTGF锤头核酶抑制肝纤维化的基因治疗,对人类肝纤维化的治疗具有实际推动作用。

表 1 pTriCTGF-Rz对TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞周期的影响

分组	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> M期
空质粒转染组	60.64	27.53	11.83
空质粒+TGF- $\beta$ 1组	58.32	28.72	12.96
重组质粒+TGF- $\beta$ 1	65.27	24.21	10.52
重组质粒转染组	80.45	10.83	8.27

分抑制TGF- $\beta$ 1刺激下LX-2细胞Col I mRNA转录和Col I蛋白分泌( $t$ 值分别为3.09和3.02,  $P$ 值均 $<0.05$ , 图1A, C, 图2)。

2.3 pTriCTGF-Rz与TGF- $\beta$ 1作用下LX-2细胞周期进程的关系 流式细胞仪检测结果显示: pTriEx2空质粒转染LX-2细胞加TGF- $\beta$ 1作用其G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期, S期及G<sub>2</sub>M期细胞百分比与空质粒转染组是一致的, 提示TGF- $\beta$ 1无促进LX-2细胞周期进程作用。pTriCTGF-Rz转染组LX-2细胞是否加TGF- $\beta$ 1均显示G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期细胞数增多, 反映DNA合成的S期细胞减少(表1)。

### 3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病导致严重后果的必然途径。近年来, 随着对肝纤维化发病机制的深入研究, 明确提出肝纤维化是可逆转的观点, 肝纤维化的有效治疗可使硬化肝脏重构、肝功能改善及门脉高压得以控制<sup>[1-2,4]</sup>。在肝纤维化的发生、发展过程中, HSC从含有维生素A脂滴的静止状态转化为另一种“激活”的肌成纤维样细胞。激活的HSC可表达 $\alpha$ -平滑肌动蛋白、具有高增殖活性及合成肝脏绝大部分ECM的特征<sup>[7]</sup>。因此, 激活的HSC是肝纤维化发生的关键细胞。本研究使用的人肝星状细胞系LX-2细胞具有在无血清条件下存活和高转染特性<sup>[8]</sup>。因此, LX-2细胞比较适合于研究靶向细胞因子的肝纤维化基因治疗。

人类CTGF基因定位于6号染色体长臂上(6q23.1), 含5个外显子和4个内含子。在人CTGF基因5'-端的启动子含有TGF- $\beta$ 反应元件是TGF- $\beta$ 在转录水平调节CTGF表达的重要部位。CTGF是一种促纤维化的细胞因子, 其过度表达参与多种器官组织的纤维化<sup>[9]</sup>。免疫组织化学研究显示, CTGF主要分布在慢性丙型肝炎肝组织纤维间隔、窦周间隙及肝硬化结节周围纤维条带的激活HSC<sup>[10]</sup>。丙型肝炎肝硬化患者肝脏CTGF mRNA较健康人升高6.5倍, 与TGF- $\beta$ 1 mRNA升高呈一致性<sup>[11]</sup>。慢性丙型肝炎和酒精性

肝病患者血清CTGF的升高可直接反应其肝纤维化的进展性<sup>[12]</sup>。这些研究结果说明CTGF与人类肝纤维化有关。

TGF- $\beta$ 家族含有3个密切相关的异构体(TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3)。TGF- $\beta$ 1是肝纤维化发生学重要的细胞因子<sup>[2,13]</sup>。CTGF和TGF- $\beta$ 1共同承担诱导肝纤维化发生的功能: 首先, TGF- $\beta$ 1通过调控CTGF启动子内TGF- $\beta$ 1反应元件和Smad结合元件诱导CTGF的产生<sup>[5,14]</sup>; CTGF是TGF- $\beta$ 1诱导大鼠HSC、胰星状细胞、成骨细胞合成ECM的下游介导者<sup>[5-6,15-16]</sup>; TGF- $\beta$ 1在组织纤维化呈现早期表达, 而CTGF持续表达则是纤维化病变缓慢进展的重要因素; CTGF通过增加TGF- $\beta$ 1纤维原性和抑制BMP-7抗纤维化作用进一步加强CTGF致纤维化作用<sup>[2]</sup>。由于CTGF主要限于结缔组织内间质细胞表达, 靶向CTGF的抗肝纤维化治疗不影响TGF- $\beta$ 抗炎和调节免疫功能<sup>[17]</sup>。因此, CTGF是一个较阻断TGF- $\beta$ 更有效和特异的靶点。

Kozue Uchio采用CTGF反义寡核苷酸使小鼠肝内部分CTGF mRNA受到抑制, 初步显示其具有治疗实验性小鼠肝纤维化的作用<sup>[18]</sup>。最近, 有人采用siRNA诱导大鼠肝纤维化肝组织CTGF的基因沉默, 部分地减少CTGF引起的HSC激活, 下调CTGF和TGF- $\beta$ 1基因表达, 由此发挥抗纤维化作用<sup>[19]</sup>。核酶既能发挥反义RNA阻断靶RNA的作用, 又能以酶的高效催化作用, 在RNA链GUX或CUX的3'端将其裂解破坏。核酶裂解靶RNA后自动解离, 参与新的靶RNA切割, 这样循环往复。因此, 核酶治疗较反义寡核苷酸更为有效。本研究采用核酶设计软件成功的设计并构建了含有针对人类CTGF mRNA 986位点锤头核酶cDNA和两个自剪酶序列的pTriCTGF-Rz重组质粒, 将其转染LX-2细胞, 结果显示: 靶向CTGF的锤头核酶能有效切割LX-2细胞CTGF mRNA, 进而抑制TGF- $\beta$ 1诱导LX-2细胞Col I mRNA转录和蛋白的分泌。本研究结果表明: CTGF是TGF- $\beta$ 1诱导人肝星状细胞合成Col I的下游介导者, 靶向CTGF的锤头核酶有可能成为肝纤维化基因治疗的新途径。

### 4 参考文献

- 1 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- 2 Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007; 6: 7
- 3 Mann DA, Mann J. Epigenetic regulation of hepatic

- stellate cell activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S108-S111
- 4 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- 5 Gao R, Ball DK, Perbal B, Brigstock DR. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 431-438
- 6 Arnott JA, Nuglozeh E, Rico MC, Arango-Hisijara I, Odgren PR, Safadi FF, Popoff SN. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a downstream mediator for TGF-beta1-induced extracellular matrix production in osteoblasts. *J Cell Physiol* 2007; 210: 843-852
- 7 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172
- 8 Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005; 54: 142-151
- 9 de Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors* 2008; 26: 80-91
- 10 Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzliff V, Bedossa P. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30: 968-976
- 11 Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Bachler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000; 20: 296-304
- 12 Gressner AM, Yagmur E, Lahme B, Gressner O, Stanzel S. Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem* 2006; 52: 1815-1817
- 13 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 14 Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* 2005; 70: 69-103
- 15 Yuhua Z, Wanhua R, Chenggang S, Jun S, Yanjun W, Chunqing Z. Disruption of connective tissue growth factor by short hairpin RNA inhibits collagen synthesis and extracellular matrix secretion in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008; 28: 632-639
- 16 Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology* 2005; 129: 1019-1030
- 17 Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA. Transforming growth factor-beta/connective tissue growth factor axis in the kidney. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 9-13
- 18 Uchio K, Graham M, Dean NM, Rosenbaum J, Desmouliere A. Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 60-66
- 19 George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knockdown of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther* 2007; 14: 790-803

## ■同行评价

本研究设计合理, 方法科学, 结论较为准确, 为肝纤维化的防治提供新的靶点提供实验依据, 学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

## ●消息●

## 世界华人消化杂志名词术语标准

**本刊讯** 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# 肝硬化肝性脑病大鼠脑水通道蛋白-4的表达与脑水肿的关系

刘洪波, 王静艳

## ■背景资料

肝性脑病又称肝昏迷, 是各种严重肝病并发的、以代谢紊乱为基础、中枢神经系统功能失调为表现的常见并发症, 其主要表现是意识障碍、行为异常和昏迷。肝性脑病的发病机制迄今未完全明了。本研究采用CCl<sub>4</sub>制备大鼠肝硬化动物模型, 探讨肝硬化大鼠在氨负荷前后脑组织含水量、BBB通透性和AQP4的变化情况, 从而探索肝硬化肝性脑病的发生机制。

刘洪波, 王静艳, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110001

刘洪波, 中国医科大学附属盛京医院硕士, 主要从事慢性肝病的研究。

作者贡献分布: 论文研究与撰写由刘洪波完成; 论文指导、审校由王静艳完成。

通讯作者: 王静艳, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院感染科. lucy6962@sina.com

收稿日期: 2008-05-16 修回日期: 2008-07-10

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Relationship between aquaporin-4 expression and brain edema in cirrhotic rats with hepatic encephalopathy

Hong-Bo Liu, Jing-Yan Wang

Hong-Bo Liu, Jing-Yan Wang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Jing-Yan Wang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. lucy6962@sina.com

Received: 2008-05-16 Revised: 2008-07-10

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the mechanism of brain edema in cirrhotic rats with hepatic encephalopathy, and to provide the theoretical basis for management of brain edema.

**METHODS:** Rats were divided into 4 groups randomly: normal group ( $n = 10$ ), normal ammonia burden group ( $n = 10$ ), cirrhosis group ( $n = 20$ ), cirrhosis ammonia burden group ( $n = 20$ ). After models were generated successfully, the arterial plasma ammonia was measured by dry biochemical method, and the evans blue (EB) content was examined by colorimetric method; the brain water content (BWC) was measured by means of dry-wet method and the aquaporin-4 (APQ-4) in the brain tissue was assessed by immunohistochemistry.

**RESULTS:** In comparison with that in the nor-

mal group and normal ammonia burden group, the arterial plasma ammonia was significantly increased in the cirrhosis group and cirrhosis ammonia burden group ( $420.18 \pm 75.91$ ,  $97.20 \pm 29.66 \mu\text{mol/L}$  vs  $42.62 \pm 10.11$ ,  $59.33 \pm 15.06 \mu\text{mol/L}$ ;  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The EB content ( $1.96 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$ ) and brain water content ( $75.14 \pm 5.68$ ) in the cirrhosis ammonia burden group were higher than those in the normal group, normal ammonia burden group, and cirrhosis group ( $1.96 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$  vs  $1.05 \pm 0.18$ ,  $1.19 \pm 0.38$ ,  $1.41 \pm 0.46 \mu\text{g/g}$ ;  $75.14 \pm 5.68$  vs  $62.14 \pm 2.29$ ,  $66.27 \pm 4.57$ ,  $65.58 \pm 4.14$ ; all  $P < 0.05$ ). The location of APQ-4 expression in cirrhotic rats was consistent with that in normal rats, but both the intensity and area of APQ-4 expression were increased as compared with those in normal controls ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** APQ-4 expression is up-regulated in cirrhotic rats with hepatic encephalopathy, suggesting that APQ-4 may play a role in the occurrence of hepatic encephalopathy.

**Key Words:** Aquaporin-4; Brain edema; Blood ammonia; Blood-brain barrier; Liver cirrhosis; Immunohistochemistry

Liu HB, Wang JY. Relationship between aquaporin-4 expression and brain edema in cirrhotic rats with hepatic encephalopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2592-2598

## 摘要

**目的:** 探讨肝硬化肝性脑病脑水肿的发生机制, 为治疗脑水肿新方法的发现提供理论依据。

**方法:** 实验大鼠随机分为正常组( $n = 10$ )、正常氨负荷组( $n = 10$ )、肝硬化组( $n = 20$ )和肝硬化氨负荷组( $n = 20$ )。后2组给予400 g/L CCl<sub>4</sub>橄榄油, 按0.2 mL/kg腹腔注射, 2次/wk, 共12 wk。前两组给与橄榄油, 注射剂量、部位、频次、时间同后两组。正常氨负荷组、肝硬化氨负荷组分别在最后1次给药2 d后, 给与乙酸胺盲肠注射。4组大鼠通过尾静脉注射伊文思蓝(EB)应用干式生化法测量动脉血氨, 比色法测

## ■同行评议者

陈国凤, 主任医师, 中国人民解放军第302医院感染科七科; 丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科



量EB含量,干-湿重法测量脑含水量,免疫组化法染色并通过图像分析系统分析脑组织中AQP4的表达。

**结果:**肝硬化组动脉血氨与正常组、正常氨负荷组比较有差异性( $97.20 \pm 29.66 \mu\text{mol/L}$  vs  $42.62 \pm 10.11$ ,  $59.33 \pm 15.06 \mu\text{mol/L}$ , 均  $P < 0.05$ ),肝硬化氨负荷组的动脉血氨( $420.18 \pm 75.91 \mu\text{mol/L}$ )与其他各组比较有明显的差异性( $P < 0.01$ )。肝硬化组EB和脑含水量与正常组、正常氨负荷组比较没有差异性,而肝硬化氨负荷组与其他各组比较有差异性( $1.96 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$  vs  $1.41 \pm 0.46$ ,  $1.19 \pm 0.38$ ,  $1.05 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$ ;  $75.14 \pm 5.68$  vs  $65.58 \pm 4.14$ ,  $62.14 \pm 2.29$ ,  $66.27 \pm 4.57$ , 均  $P < 0.05$ )。肝硬化大鼠AQP4表达部位与正常大鼠一致,但肝硬化大鼠给与氨负荷后,无论是平均吸光度还是显色阳性面积均较正常组增高( $P < 0.05$ )。

**结论:** AQP4可能在肝硬化肝性脑病大鼠脑水肿形成中起一定的作用。

**关键词:** 水通道蛋白4; 脑水肿; 血氨; 血脑屏障; 肝硬化; 免疫组化

刘洪波, 王静艳. 肝硬化肝性脑病大鼠脑水通道蛋白-4的表达与脑水肿的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2592-2598  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2592.asp>

## 0 引言

肝性脑病又称肝昏迷,是各种严重肝病并发的、以代谢紊乱为基础、中枢神经系统功能失调为表现的常见并发症,其主要表现是意识障碍、行为异常和昏迷。肝性脑病的发病机制迄今未完全明了。一般认为产生肝性脑病的病理生理基础是肝细胞功能衰竭和门腔静脉之间有手术造成的或自然形成的侧支分流,从而导致主要来自肠道的许多毒性代谢产物-氨、芳香族氨基酸和一些假性神经递质,未经肝脏解毒和清除,经侧支循环直接进入体循环,透过血脑屏障而至脑部,引起大脑功能紊乱。另外,肝性脑病时常常出现脑水肿<sup>[1]</sup>。最近有学者提出即使在肝硬化阶段也普遍存在脑水肿且发现脑水肿存在与肝性脑病密切相关<sup>[2-5]</sup>。Miese *et al*<sup>[6]</sup>对非酒精性肝硬化患者的研究中也观察到了类似结果。

本研究采用CCl<sub>4</sub>制备大鼠肝硬化动物模型,探讨肝硬化大鼠在氨负荷前后脑组织含水量、BBB通透性和AQP4的变化情况,从而探索肝硬化肝性脑病的发生机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠60只,体质量250-300 g,由中国医科大学动物中心提供。国药集团化学试剂有限公司生产的CCl<sub>4</sub>溶液,甲酰胺溶液;武汉博士德生物工程有限公司生产的AQP4试剂盒;瑞士Fluka公司生产的伊文思蓝(EB)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及造模:** SD大鼠60只随机分为4组:正常组( $n = 10$ )与剩余的50只大鼠一同饲养,不加外界干预因素;正常氨负荷对照组( $n = 10$ )与其他50只大鼠一同饲养,实验末给予氨负荷;肝硬化组( $n = 20$ )与其他40只大鼠一同饲养,制备肝硬化模型,不加外界干预因素;肝硬化氨负荷组( $n = 20$ )与其他40只大鼠一同饲养,制备肝硬化模型,实验末给予氨负荷。

肝硬化组和肝硬化氨负荷组大鼠共40只,给予400 g/L CCl<sub>4</sub>橄榄油ip,按0.2 mL/kg给药,2次/wk,给药时间为12 wk;另两组大鼠给予同等量的橄榄油ip,2次/wk,时间为12 wk。注射期间,观察大鼠的毛色、精神状态、体质量。肝硬化模型制备后,应用角膜反射及翻转反射的存在与否判断是否伴有HE的发生<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 氨负荷的方法及测定:** CCl<sub>4</sub> 12 wk最后一次给药后2 d,开腹后,经盲肠给予乙酸氨(500 mg/kg,用0.5 mL蒸馏水稀释);正常组及肝硬化组经盲肠给予蒸馏水0.5 mL,正常氨负荷组经盲肠给予乙酸氨,用量同肝硬化氨负荷组。制造模型结束后,沿中线剪开腹腔,暴露腹膜后的主动脉,于肾动脉下方约1 cm处进行腹主动脉穿刺,抽取2 mL动脉血肝素抗凝管密闭保存,2 h内用上海强生950干化学分析仪,干式生化法检测动脉血氨浓度。

**1.2.3 血脑屏障通透性的检测:** (1)建立标准曲线<sup>[8]</sup>:取伊文思蓝(EB)10 mg溶于100 mL生理盐水中,取出0.1 mL加入1.9 mL甲酰胺中,混匀作为第1管,从第1管中取0.1 mL加入1.9 mL甲酰胺中,混匀作为第2管,再从第2管中取1 mL加入1 mL甲酰胺中混匀作为第3管,以此类推共做6管,其浓度分别为5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313和0.0156 mg/L, 37℃避光水浴48 h,于紫外分光光度仪上(波长632 nm)进行比色,蒸馏水作空白对照,制作出标准曲线。(2)血脑屏障(BBB)通透性的检测:动物尾静脉注射2% EB(2 mg/kg)2 h后,迅速断头(为清除血液中染料,向左心室灌注生理盐水,直至右心室流出透明液体为止)。取脑称质量,加入3 mL甲酰胺,37℃避光水浴48 h。1500

## ■研究前沿

肝性脑病是急性或慢性肝衰竭的主要并发症,尽管经过几十年的临床和基础研究,肝性脑病发病的确切机制仍然不十分明确。

### ■相关报道

最近, Papadopoulos *et al*又在肺炎球菌脑膜炎模型中发现AQP4敲除的大鼠脑水肿及死亡率明显低于野生型大鼠, 说明不同原因所致的脑水肿, 其中AQP4所起的作用不尽相同。

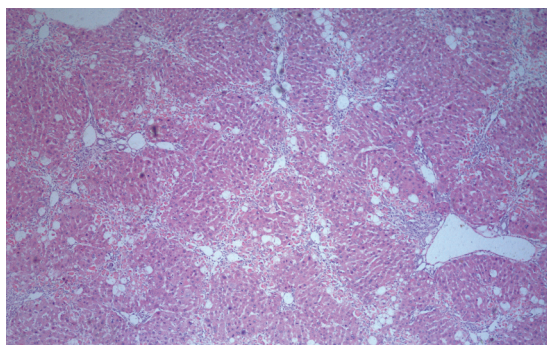


图1 肝硬化假小叶形成(H&E × 40).

r/min, 取上清于波长632 nm进行比色, 根据标准曲线计算出EB含量, 结果以EB含量/脑质量( $\mu\text{g/g}$ )表示。

1.2.4 脑含水量的测定: 应用干-湿重的方法测定脑含水量<sup>[9]</sup>. 将脑组织用电子分析天平称湿质量后, 置入100℃恒温箱中, 24 h后取出称干质量. 以(湿质量-干质量)/湿质量 $\times 100\%$ 来计算脑含水量, 以此代表脑水肿程度。

1.2.5 大脑组织免疫组化及图像分析: 处死后取大脑组织, 4%甲醛溶液固定, 脑组织切片厚度5-7  $\mu\text{m}$ , HE染色, 脑组织切片抗原修复后, 内源性过氧化物酶阻断, 链亲和素-酶复合物方法(SP法)免疫组织化学染色, 滴加第一抗体: APQ-4抗体(1:1500)后, 4℃孵育过夜, 24 h后, 再加入生物素标志第二抗体-链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)-酶底物显色剂(辣根过氧化物酶, DAB), 光镜下观察组织细胞呈棕色, 即终止反应并封片. 采用高清晰度彩色病理图文报告分析系统对免疫组化图像进行分析(光密度和显色阳性面积)。

**统计学处理** 采用统计学分析: 血氨, EB值, 脑含水量, AQP-4表达阳性面积和平均光密度值等数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 应用SPSS12软件进行方差分析, 方差不齐时用Tamhane's方法检测, 方差齐同时用Bonferroni方法检测.  $P$ 值小于0.05认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 模型建立情况及肝、脑组织病理改变 肝硬化组大鼠死亡5只(12 wk末在肝硬化组大鼠中随机处死2只, 以确定模型制备情况), 肝硬化氨负荷组大鼠死亡8只, 正常组及正常氨负荷组大鼠没有死亡. 活体观察: 肝硬化组及肝硬化氨负荷组大鼠毛色蓬乱、不光洁、进食减少; 其中仅肝硬化氨负荷组大鼠角膜反射与翻转反射消

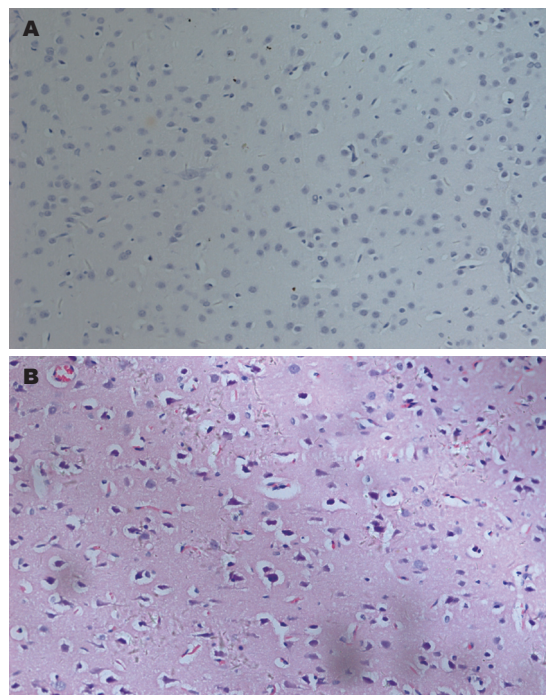
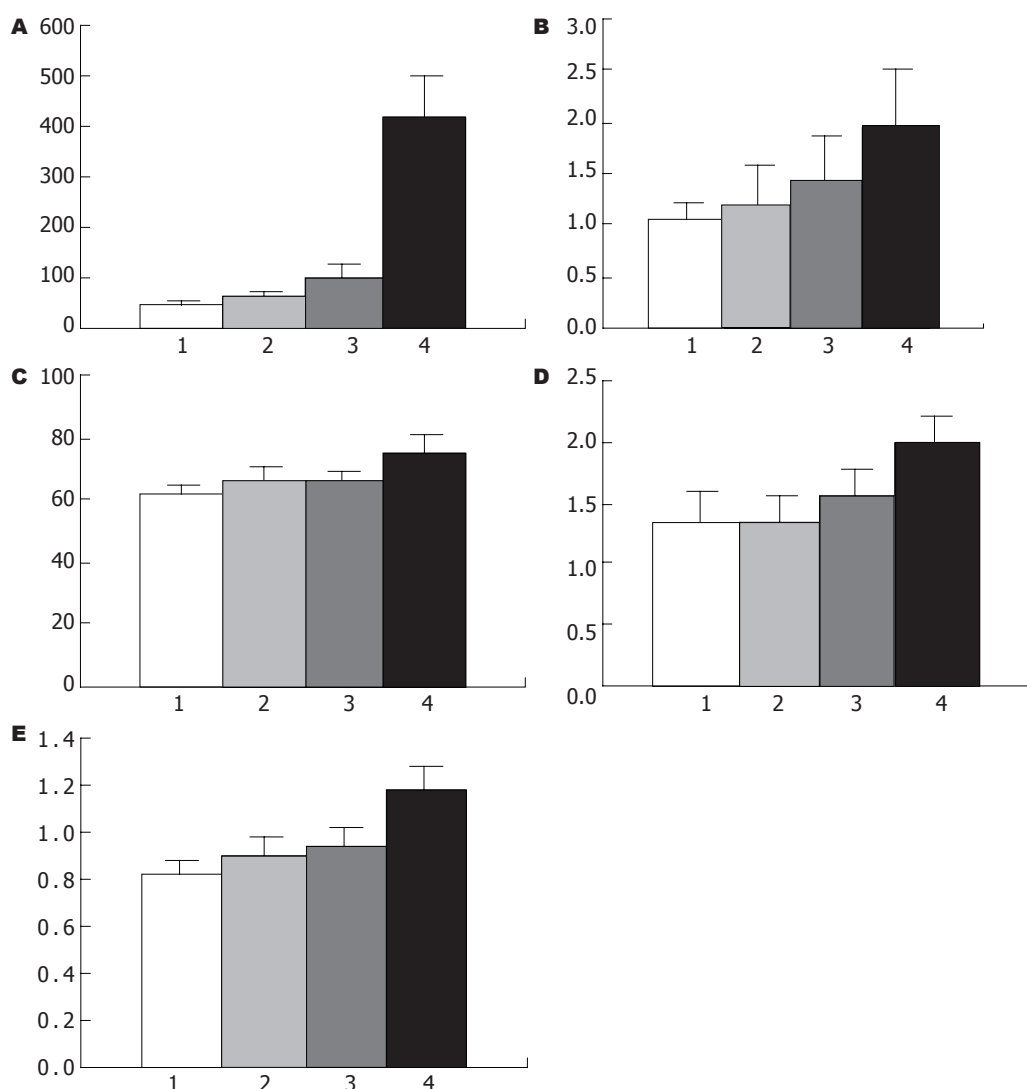


图2 大鼠脑组织病理观(H&E × 200). A: 正常组; B: 肝硬化氨负荷组。

失, 证明出现肝性脑病. 正常组及正常氨负荷组大鼠没有上述改变. 病理: 肝硬化组及肝硬化氨负荷组大鼠肝叶体积缩小, 部分可见尾叶代偿性增大, 肝包膜起伏不平, 肝实质呈大小不等的结节样外观, 质地硬. HE染色: 小叶结构破坏, 中央静脉结构不清, 门汇管区扩大, 肝细胞排列紊乱, 肝窦间隙消失, 小叶内可见肝细胞变性坏死并伴有淋巴细胞浸润. 纤维组织增生有假小叶形成, 见部分胆管扩张及淤胆改变(图1). 正常组及正常氨负荷组肝脏体积及肝叶形态比例正常, 颜色红润, 质地柔软, HE染色: 肝小叶分界清楚, 中央静脉与门汇管区结构关系正常, 辐射状排列的肝细胞索整齐, 肝窦间隙均一. 脑组织除肝硬化氨负荷组HE染色可见有细胞水肿, 部分血管外隙增大, 以大脑的皮层灰质区明显, 皮质下白质区及基底节区的改变不如上述区域, 其余组脑细胞间隙正常, 无细胞肿胀、细胞外隙和血管周围间隙改变(图2).

2.2 动脉血氨 肝硬化大鼠在未给与氨负荷前就已经存在明显的血氨升高( $97.20 \pm 29.66 \mu\text{mol/L}$ ), 与正常组( $42.62 \pm 10.11 \mu\text{mol/L}$ )大鼠及正常氨负荷组( $59.33 \pm 15.06 \mu\text{mol/L}$ )大鼠比较均有显著差异( $P < 0.05$ ); 给与氨负荷后( $420.18 \pm 75.91 \mu\text{mol/L}$ )差异更加显著( $P < 0.01$ ). 说明肝硬化大鼠体内存在氨代谢紊乱, 当给与氨负荷后, 这种紊乱表现更加显著(图3A).



## ■应用要点

通过肝硬化肝性脑病发生机制的研究, 可为肝性脑病的治疗新方法的发现提供理论依据。

图3 大鼠氨浓度、EB含量、脑含水量、APQ4光密度及阳性面积的比较. A: 动脉血氨浓度; B: EB含量; C: 脑含水量; D: APQ4光密度; E: APQ4阳性面积. 1: 正常组; 2: 正常氨负荷组; 3: 肝硬化组; 4: 肝硬化氨负荷组.A

**2.3 EB含量** 肝硬化组大鼠EB含量( $1.41 \pm 0.46 \mu\text{g/g}$ )、正常氨负荷组大鼠EB含量( $1.19 \pm 0.38 \mu\text{g/g}$ )与正常组大鼠EB含量( $1.05 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$ )比较没有显著差异( $P > 0.05$ ); 肝硬化氨负荷组大鼠EB含量( $1.96 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$ )与正常组大鼠EB含量比较有明显的差异性( $P < 0.05$ ). 结果表明肝硬化肝性脑病时存在血脑屏障通透性的增高(图3B).

**2.4 脑含水量** 正常氨负荷组大鼠脑含水量( $66.27 \pm 4.57$ )与正常组大鼠( $62.14 \pm 2.29$ )比较没有差异性( $P > 0.05$ ); 肝硬化组大鼠脑含水量( $65.58 \pm 4.14$ )与正常组大鼠比较没有显著差异性( $P > 0.05$ ); 肝硬化氨负荷组大鼠脑含水量( $75.14 \pm 5.68$ )与肝硬化组大鼠比较有显著差异性( $P < 0.05$ ). 结果表明肝硬化氨负荷组大鼠存在脑水肿, 高血氨可以引起肝硬化大鼠脑水肿的发生, 而肝硬化实验大鼠的脑水肿不明显(图3C).

**2.5 脑组织AQP-4免疫组化** 免疫组化显示: AQP-4表达主要于脑组织毛细血管周围, 高倍镜观察可见沿细胞膜呈棕色条带状染色, 细胞质无染色, 血管周围星形胶质细胞足突处染色尤其明显呈连续条带状, 管状和点圆状, 肝硬化大鼠AQP4表达部位与正常大鼠一致, 但肝硬化大鼠给与氨负荷后, 无论是平均光密度还是显色阳性面积均较正常组增高( $P < 0.05$ , 图3D-E, 图4).

### 3 讨论

肝性脑病是急性或慢性肝衰竭的主要并发症. 尽管经过几十年的临床和基础研究, 肝性脑病发病的确切机制仍然不十分明确. 尽管如此, 氨中毒学说仍被认为是肝性脑病最重要的发病机制. 本研究中分别给正常大鼠和肝硬化大鼠氨负荷观察血氨水平, 结果表明, 肝硬化组、肝硬



### ■同行评价

本文研究肝硬化大鼠脑水肿的因素及其机制,对进一步认识肝性脑病的病理生理有一定的意义,具有较好的学术价值。

化氮负荷组大鼠的血氨均明显高于正常组的血氨且肝硬化氮负荷组大鼠均出现肝性脑病,提示肝硬化大鼠在未给氮之前,就已经存在氮代谢紊乱。氮负荷后,这种紊乱更加加重,引起脑功能障碍,进一步证明了肝硬化时氮对中枢神经系统毒性作用的学说。这种毒性作用的机制可能是:(1)氮在星形胶质细胞内,通过谷氨酰胺合成酶合成谷氨酰胺。谷氨酰胺是一种很强的细胞内渗透剂,其增加导致星形细胞肿胀并最终导致脑水肿<sup>[10]</sup>。影像学也提示谷氨酰胺增高与脑水肿一致。(2)肝衰竭时,过高的血氨可能抑制丙酮酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶,干扰脑的能量代谢以致大脑不能维持正常的功能而出现神经精神症状<sup>[11]</sup>。(3)但也有学者提出是由于氮在星形胶质细胞内合成谷氨酰胺时消耗的底物没能及时补给所致<sup>[12]</sup>。这都说明氮中毒在肝性脑病发生中的重要性。

本研究发现氮诱导的肝硬化肝性脑病大鼠均存在脑水肿。脑水肿形成除与血氨升高有关外,最近研究与BBB通透性增强也是相关的<sup>[8]</sup>。Mínguez *et al*<sup>[13]</sup>也发现,血脑屏障通透性改变与肝性脑病时脑水肿的发生有关。BBB是由脑微血管内皮细胞及其形成的紧密连接、基膜和星形胶质细胞足板构成的复杂系统,一方面是分隔血液与大脑的屏障,阻止物质在两者间的通透,另一方面又是营养成分、代谢产物以及多种化学信号分子等的进出通路,从而构成一个扩散性屏障<sup>[14]</sup>。肝硬化时,正电子发射断层显像(positron emission tomography, PET)显示肝性脑病患者血氨水平增高,血脑屏障对氨的通透表面积增大及大脑氨的代谢增高<sup>[15]</sup>。本研究发现氮诱导的肝硬化肝性脑病大鼠存在BBB通透性增强。这可能是由于星形胶质细胞的水肿,引起BBB间紧密连接破坏所致。

本研究也发现肝硬化大鼠在给与氮负荷后,脑组织内AQP4表达增加明显且脑含水量亦是增加的。这进一步说明:肝硬化肝性脑病时,脑内水转运可能存在跨膜转运过程。目前研究证实AQP4主要分布在脑组织的星形胶质细胞膜上,尤以脑血管周围的星形胶质细胞膜、脑室脉络丛上皮细胞、室管膜细胞的膜上丰富<sup>[16-17]</sup>,还分布在渗透压感受的区域如视上核,下丘脑也有分布<sup>[18]</sup>。Nielsen *et al*<sup>[19]</sup>研究了大鼠出生后发育过程中AQP4表达水平及细胞分布。显示AQP4在出生后第1周含量低,在第2周明显增加,从生后7 d的2%增加到生后14 d的25%。因

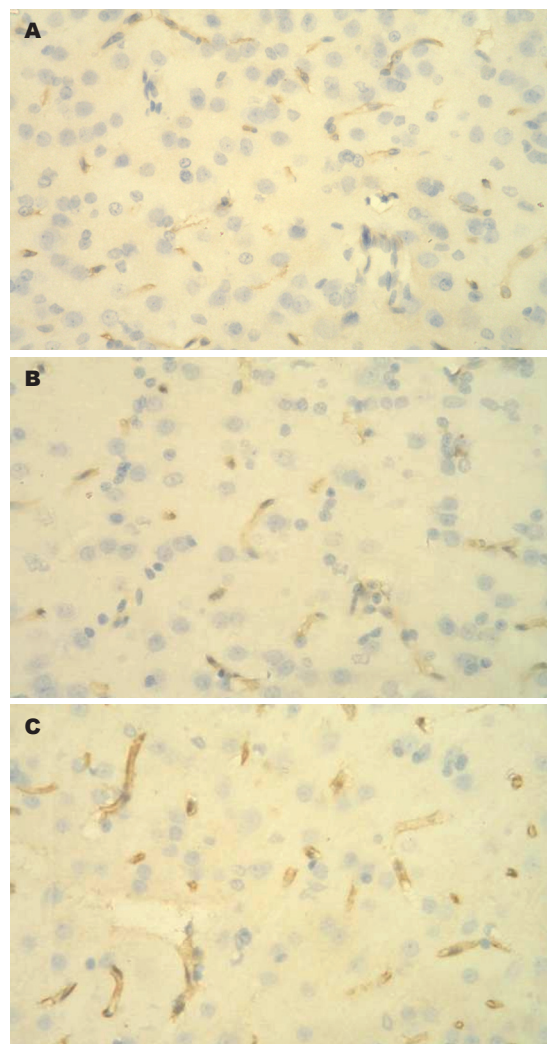


图4 大鼠脑组织AQP-4表达(SP×400)。A: 正常组; B: 肝硬化组; C: 肝硬化氮负荷组。

此认为从生后第2周, AQP4就开始发挥生理作用。AQP4在脑组织中分布广泛、含量丰富,提示AQP4具有功能的多样性。他可能参与中枢渗透压的感受、脑脊液的分泌和重吸收、脑内水平衡的维持、血浆渗透压调节、垂体加压素的分泌等。Vizuete *et al*认为AQP4 mRNA表达水平调节与血脑屏障破坏,胶质细胞肿胀有关。在BBB中,内皮细胞和胶质细胞都表达AQP4。AQP4表达水平改变使毛细血管内皮细胞及其周围的胶质细胞肿胀,持续的肿胀将导致BBB结构破坏、通透性增加。在脑缺血或创伤性损伤后AQP4表达增强与脑水肿的程度呈正比关系<sup>[16]</sup>。以上结果说明AQP4在脑水肿的发生和发展中发挥了重要作用,其表达水平的变化导致细胞膜通透性改变及水的重新分布,从而改变脑内水平衡状态。另外, Rama Rao *et al*<sup>[20]</sup>发现在用氮培养的星形细胞中, AQP4表达增加出现

在培养的10 h后, 星形细胞水肿的2 h前. 说明AQP4表达的增加与星形细胞水肿有着因果关系. 这可能是由于氨通过氧化应激<sup>[21]</sup>和改变线粒体通透性<sup>[22]</sup>使AQP4表达增加而导致的星形细胞水肿. 并且, 这一过程可分别被抗氧化剂<sup>[23]</sup>和线粒体通透性改变的抑制剂<sup>[24]</sup>阻断. 本实验发现肝硬化肝性脑病脑水肿时, AQP4表达是增高的. 推测AQP4可能通过一系列作用改变BBB的通透性, 改变脑内水平衡状态, 引起脑水肿发生. Papadopoulos *et al*<sup>[25]</sup>发现脑内恶性肿瘤周围AQP4表达上调与细胞外容积减小密切相关, 并因此限制了来源于肿瘤血管床的细胞外液向正常脑实质渗漏. 这提示AQP4表达上调是机体对脑水肿的适应性改变. 但是Manley *et al*<sup>[26]</sup>对剔除AQP4基因后大鼠水中毒和脑缺血模型进行观察, 发现AQP4基因敲除的大鼠存活率明显高于野生型大鼠, 而且脑含水量和星形胶质细胞周围毛细血管水肿减轻. 最近, Papadopoulos *et al*<sup>[27]</sup>又在肺炎球菌脑膜炎模型中发现AQP4敲除的大鼠脑水肿及死亡率明显低于野生型大鼠. 说明不同原因所致的脑水肿, 其中AQP4所起的作用不尽相同.

肝性脑病的发病机制是复杂的. 本研究提示高血氨可使肝硬化肝性脑病大鼠脑水肿加重, 肝硬化肝性脑病时BBB通透性增强. 肝硬化肝性脑病与脑水肿密切相关且这时AQP4表达是增加的. AQP4在肝硬化肝性脑病大鼠脑组织中表达增加, 其确切的作用还有待进一步研究. 通过肝硬化肝性脑病发生机制的研究, 可为肝性脑病的治疗新方法的发现提供理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 Detry O, De Roover A, Honore P, Meurisse M. Brain edema and intracranial hypertension in fulminant hepatic failure: pathophysiology and management. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7405-7412
- 2 Balata S, Olde Damink SW, Ferguson K, Marshall I, Hayes PC, Deutz NE, Williams R, Wardlaw J, Jalan R. Induced hyperammonemia alters neuropsychology, brain MR spectroscopy and magnetization transfer in cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37: 931-939
- 3 Córdoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sanpedro F, Castells L, Vargas V, Margarit C, Kulisevsky J, Esteban R, Guardia J. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35: 598-604
- 4 Rovira A, Córdoba J, Sanpedro F, Grivé E, Rovira-Gols A, Alonso J. Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology* 2002; 59: 335-341
- 5 Rovira A, Grivé E, Pedraza S, Rovira A, Alonso J. Magnetization transfer ratio values and proton MR spectroscopy of normal-appearing cerebral white matter in patients with liver cirrhosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 1137-1142
- 6 Miese F, Kircheis G, Wittsack HJ, Wenserski F, Hemker J, Mödder U, Häussinger D, Cohnen M. 1H-MR spectroscopy, magnetization transfer, and diffusion-weighted imaging in alcoholic and nonalcoholic patients with cirrhosis with hepatic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1019-1026
- 7 Bergqvist PB, Carpenedo R, Apelqvist G, Moroni F, Bengtsson F. Plasma and brain levels of oxindole in experimental chronic hepatic encephalopathy: effects of systemic ammonium acetate and L-tryptophan. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85: 138-143
- 8 吕飒, 宋红丽, 王静艳, 刘沛. 急性肝坏死小鼠血脑屏障通透性的改变. *世界华人消化志* 2004; 12: 1346-1348
- 9 Stover JF, Beyer TE, Unterberg AW. Riluzole reduces brain swelling and contusion volume in rats following controlled cortical impact injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 1171-1178
- 10 Wright G, Jalan R. Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 95-110
- 11 Ott P, Clemmesen O, Larsen FS. Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis. *Neurochem Int* 2005; 47: 13-18
- 12 Zwingmann C. The anaplerotic flux and ammonia detoxification in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 235-249
- 13 Mínguez B, Rovira A, Alonso J, Córdoba J. Decrease in the volume of white matter lesions with improvement of hepatic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28: 1499-1500
- 14 Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 1-13
- 15 Keiding S, Sørensen M, Bender D, Munk OL, Ott P, Vilstrup H. Brain metabolism of 13N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology* 2006; 43: 42-50
- 16 Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 367-378
- 17 Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11981-11986
- 18 Lee MD, King LS, Agre P. The aquaporin family of water channel proteins in clinical medicine. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76: 141-156
- 19 Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 1997; 273: C1549-C1561
- 20 Rama Rao KV, Norenberg MD. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 265-275
- 21 Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H, Asai K. Hyperosmolar mannitol

- simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 44525-44534
- 22 Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2001; 66: 981-991
- 23 Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy ChR, Norenberg MD. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci* 2006; 26: 4774-4784
- 24 Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J Neurosci Res* 2003; 74: 891-897
- 25 Papadopoulos MC, Saadoun S, Binder DK, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience* 2004; 129: 1011-1020
- 26 Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000; 6: 159-163
- 27 Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 2005; 280: 13906-13912

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志修回稿须知

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

#### 1 修回稿信件

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

#### 2 稿件修改

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

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期);起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑:张海宁 2008-08-18)



# FCU1重组腺病毒载体构建及对结肠癌细胞的杀伤作用

吴斌文, 李友佳, 张凯军, 李东风, 曾志刚, 张瑛华, 耿庆山

吴斌文, 李友佳, 张凯军, 李东风, 曾志刚, 张瑛华, 耿庆山, 广东省人民医院东病区消化内科 广东省老年医学研究所 广东省广州市 510080

吴斌文, 2003年华中科技大学同济医学院博士, 副主任医师. 主要从事消化系统肿瘤的临床和基础研究.

**作者贡献分布:** 此课题由耿庆山与吴斌文共同设计; 研究过程由吴斌文, 李友佳, 李东风, 张凯军及张瑛华操作完成; 数据分析由吴斌文完成; 本论文写作由吴斌文完成.

**通讯作者:** 吴斌文, 510080, 广东省广州市中山二路106号, 广东省人民医院东病区消化内科; 广东省老年医学研究所.

wubinwengd@yahoo.com.cn

电话: 020-83827812-70511

收稿日期: 2008-07-07 修回日期: 2008-08-05

接受日期: 2008-08-10 在线出版日期: 2008-08-18

## Construction of FCU1 recombinant adenovirus vector and its killing effect on colon cancer cells

Bin-Wen Wu, You-Jia Li, Kai-Jun Zhang, Dong-Feng Li, Zhi-Gang Zeng, Ying-Hua Zhang, Qing-Shan Geng

Bin-Wen Wu, You-Jia Li, Kai-Jun Zhang, Dong-Feng Li, Zhi-Gang Zeng, Ying-Hua Zhang, Qing-Shan Geng, Department of Gastroenterology, East Section, Guangdong Provincial People's Hospital; Guangdong Institute of Geriatrics, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Dr. Bin-Wen Wu, Department of Gastroenterology, East Section, Guangdong Provincial People's Hospital; Guangdong Institute of Geriatrics, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. wubinwengd@yahoo.com.cn

Received: 2008-07-07 Revised: 2008-08-05

Accepted: 2008-08-10 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To construct a recombinant adenovirus vector containing fusion suicide gene FCU1, and study the cytotoxic effect of prodrug 5-FC on colon cancer cells.

**METHODS:** Restriction fragment of FCU1 was inserted into pDC316 vector with *EcoR* I and *Sal* I. Recombinant plasmid pDC316-FCU1 was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. Thereafter, pDC316-FCU1 was co-transfected with adenovirus backbone pBHG into 293 cells to establish the recombinant adenovirus Ad5-FCU1 by homologous recombination. The cytotoxic effect of prodrug 5-FC on the infected HCT116 cells was determined with MTT assay.

**RESULTS:** Recombinant plasmid pDC316-FCU1 was constructed successfully. After pDC316-FCU1 together with adenovirus backbone pBHG was cotransfected into 293 cells, significant virus plaques were observed, which showed the successful homologous recombination and virus packaging in 293 cells. The titer of the purified Ad-FCU1 was  $2 \times 10^{12}$  PFU/L. Nontoxic prodrug 5-FC has significant cytotoxic effect on HCT116 cells infected with pAd5-FCU1. The survival of HCT116/FCU1 cells was minimal, while that of the control cells was close to 90%, when 5-FC was used at 100  $\mu$ mol/L.

**CONCLUSION:** Recombinant adenovirus Ad5-FCU1 containing fusion suicide gene FCU1 is established successfully, which has significant killing effect on colon cancer cells *in vitro*.

**Key Words:** Colon cancer; Fusion suicide gene; Gene therapy

Wu BW, Li YJ, Zhang KJ, Li DF, Zeng ZG, Zhang YH, Geng QS. Construction of FCU1 recombinant adenovirus vector and its killing effect on colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2599-2603

## 摘要

**目的:** 构建含融合自杀基因FCU1的重组腺病毒载体, 转染293细胞构建重组腺病毒, 并感染结肠癌细胞, 同时给以体药物5-FC, 观察其对结肠癌细胞的杀伤作用.

**方法:** 将FCU1基因采用*EcoR* I、*Sal* I双酶切克隆至穿梭质粒pDC316, 构建质粒pDC316-FCU1, 并酶切和测序鉴定. pDC316-FCU1与骨架质粒pBHG经脂质体共转染HEK 293细胞, 在HEK 293细胞中同源重组并包装重组腺病毒Ad5-FCU1. 将Ad5-FCU1感染结肠癌细胞HCT116, 同时给以体药物5-FC, MTT法检测5-FC对HCT116杀伤作用.

**结果:** 重组质粒pDC316-FCU1构建成功. pDC316-FCU1与骨架质粒pBHG共转染HEK 293细胞后, 出现明显的毒斑, 纯化后病毒滴度为 $2 \times 10^{12}$  PFU/L. 重组病毒Ad5-FCU1感染

## ■背景资料

为了进一步提高自杀基因的疗效, 许多研究者采用联合基因治疗或融合基因治疗的方法, 取得了令人鼓舞的效果. 本研究采用重组腺病毒载体介导融合自杀基因FCU1, 对结肠癌细胞HCT116具有较强的体外杀伤效应.

## ■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

## ■研发前沿

FCU1基因融合了酵母胞嘧啶脱氨酶基因(FCY1)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶基因(FUR1),前者可将无毒的5-FC转化为5-FU,后者可将5-FU进一步转化,直接抑制DNA的合成,提高了杀伤作用,同时避免了5-FU耐药。重组腺病毒载体AdMax包装系统较最普及的AdEasy系统有多种优势,他通过Cre/loxP获得重组病毒,这个过程发生在293细胞中,从而避免在细菌中重组,在真核细胞内重组病毒,保持了对腺病毒的生存压力,有助于重组腺病毒基因组的完整性。此外,操作简便、重组效率高、获得的病毒产率高。

## ■相关报道

融合自杀基因FCU1较单用FCY1,或将FCY1和FUR1分别构建于独立的载体上联合应用均具有100倍的杀瘤作用。FCU1/5-FC系统对肝癌细胞显示较好的杀伤作用。

HCT116细胞后,给以无毒前体药物5-FC显示极强的杀伤作用,当5-FC达100  $\mu\text{mol/L}$ 时,存活的HCT116/FCU1细胞极少,而对照组存活率接近90%。

**结论:**成功构建了含融合自杀基因FCU1的Ad5-FCU1重组腺病毒,FCU1/5-FC自杀基因系统对结肠癌细胞具有显著的体外杀伤作用。

**关键词:**结肠癌;融合自杀基因;基因治疗

吴斌文,李友佳,张凯军,李东风,曾志刚,张瑛华,耿庆山. FCU1重组腺病毒载体构建及对结肠癌细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2599-2603

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2599.asp>

## 0 引言

自杀基因疗法是肿瘤基因治疗方法之一。所谓自杀基因疗法就是将编码某一敏感因子的基因导入肿瘤细胞,使该细胞对某种原本无毒或低毒的药物产生特异敏感性,由此导致肿瘤细胞死亡。这一表达敏感基因称为自杀基因(suicide gene)或药物敏感基因(drug sensitive gene)。Huber和Russel称其为病毒介导酶解药物前体疗法(virus directed enzyme prodrug treatment, VDEPT)<sup>[1]</sup>。常用的自杀基因系统有HSV-tk/GCV系统和CD/5-FC系统等。

自杀基因CD/5-FC系统中,CD基因编码胞嘧啶脱氨酶,可将无毒性的5-氟胞嘧啶(5-FC)转化为高毒性的5-氟尿嘧啶(5-FU)。融合自杀基因FCU1融合了酵母胞嘧啶脱氨酶基因(FCY1)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶基因(FUR1),后者可进一步将5-FU转化为5-氟尿嘧啶三磷酸盐(FUTP)和5-氟脱氧尿嘧啶单磷酸盐(FdUMP),FUTP掺入RNA(F-RNA),抑制RNA的活性。FdUMP可抑制胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS),从而抑制DNA的合成。而且该酶具有抑制DPD活性的作用,减少5-FU的降解<sup>[2]</sup>。FCU1/5-FC系统较CD/5-FC系统具有更强的杀瘤作用,尤其对于具有5-FU抗药性的肿瘤细胞。

本研究构建含高效融合自杀基因FCU1的腺病毒载体,采用质粒共转染进行同源重组构建腺病毒载体,含FCU1重组腺病毒感染结肠癌细胞HCT116,观察前体药物5-FC对其杀伤作用,为进一步研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 质粒载体和细胞株:细胞株HCT116

购自中国医学科学院典型培养物上海细胞库。pCIneo-FCU1由法国斯特拉斯堡国家科学研究中心基因工程研究所Erbs教授惠赠。Admax腺病毒载体系统的穿梭质粒pDC316和骨架质粒pBHG为病毒基因工程国家重点实验室段招军博士提供。主要试剂:RPMI 1640购自Gibco公司;胎牛血清购自HyClone公司;胰蛋白酶购自Serva公司。限制性内切酶EcoR I、Sal I、T4 DNA连接酶、DNA marker购自TaKaRa公司;少量质粒DNA制备试剂盒Reverse Transcription System试剂盒购自Promega公司;DNA胶回收试剂盒购自上海Sangon公司;MTT、5-FC购自Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体pDC316-FCU1的构建:设计扩增FCU1全基因的引物如下:上游引物:5'-CTGCgaattcATGGTGACAGGGGGAATGG-3'(EcoR I),下游引物:5'-GCCAgtcgacTTAAACACAGTAGTATCTG-3'(Sal I)。上游引入EcoR I位点,下游引入Sal I位点,以携带FCU1基因的质粒pCI-FCU1为模板,用高保真Taq酶进行扩增,回收PCR产物,用EcoR I+Sal I双酶切,回收。EcoR I+Sal I双酶切重组腺病毒载体穿梭质粒pDC316,回收线性化的片段。将上述两片段进行连接、转化、筛选,得到重组质粒pDC316-FCU1。重组质粒经EcoR I+Sal I双酶切鉴定。

1.2.2 重组腺病毒的包装及扩增:将293细胞接种于六孔板中,每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞,置37℃含50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。待细胞生长至底面积的80%-90%时,取骨架质粒pBHG和穿梭质粒pDC316-FCU1,用Lipofectamine2000脂质体共转染HEK 293细胞。待细胞病变脱落后,收集细胞,经液氮反复冻融3次后,离心去除细胞碎片,0.2 nm滤膜过滤,-70℃保存备用。

1.2.3 重组腺病毒滴度的测定:采用TCID<sub>50</sub>法测定重组腺病毒滴度。方法如下:293细胞按 $1 \times 10^4$ /孔接种于96孔板中,接种24 h后将系列稀释的病毒液加入孔中,每个稀释度接种10孔,设置2孔为阴性对照。37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养10 d,观察每个稀释度细胞病变效应(CPE)出现的百分率,按照Admax操作手册中的公式:  $T = 10^{1+d(s-0.5)}$  计算病毒的滴度(d为稀释度的对数值, s为阳性比率之和),计算出重组腺病毒的滴度(将TCID<sub>50</sub>/mL转换成PFU/mL:  $T = a \times 10^b \text{TCID}_{50}/\text{mL} = a \times 10^{b-0.7} \text{PFU}/\text{mL}$ )。

1.2.4 重组腺病毒感染HCT116细胞及PCR鉴定:将HCT116以 $10^4$ 接种于24孔板,12 h后给予

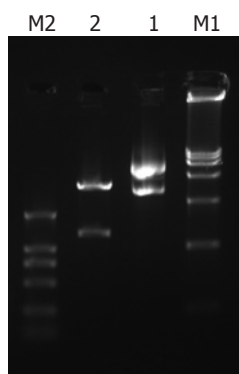


图 1 酶切产物电泳图谱. M1: DNA marker DL15000; 1: 重组质粒pDC316-FCU1; 2: *EcoR* I + *Sal* I 切pDC316-FCU1; M2: DNA marker DL2000.

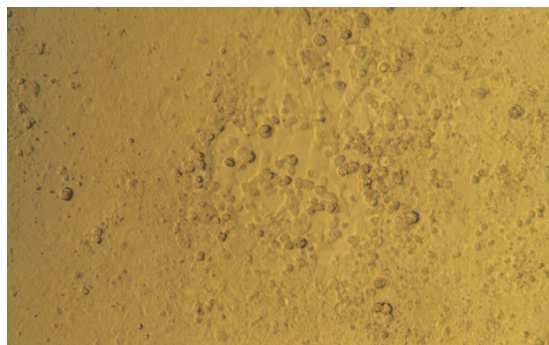


图 2 重组病毒Ad5-FCU1在293细胞上形成的噬斑.

50 MOI的AD-FCU1感染, 以RPMI 1640为对照, 1-2 h后吸去病毒液, 每孔加入2 mL培养液. 收集培养48 h的感染细胞, 抽提总DNA用于PCR检测. 上游引物: 5'-CTGCgaattcATGGTGACAGGGGAATGG-3', 下游引物: 5'-GCCAgtcgacTTAAACACAGTAGTATCTG-3'. 使用Promega公司的Reverse Transcription System试剂盒, 按说明书操作.

1.2.5 5-FC对转染HCT116/FCU1的杀伤作用: 将HCT116以 $2 \times 10^3$ 接种于96孔板, 24 h后给予50 MOI的AD-FCU1感染, 以RPMI 1640为对照, 1-2 h后吸去病毒液, 每孔加入新鲜培养液. 48 h后分别加入不同浓度的5-FC, 分别为0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$ , 每组6孔重复. 培养6 d后用MTT法测定吸光度, 即每孔加MTT(5 g/L)20  $\mu\text{L}$ , 于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h后, 加MTT溶解液二甲基亚砷DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 再于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, 选择490 nm波长, 酶标仪检测各孔吸光值. 以不加5-FC对照组吸光值为100%, 计算细胞存活率. 以存活率为纵坐标, 药物浓度的对数值为横坐标作图.

## 2 结果

2.1 重组质粒pDC316-FCU1的构建与鉴定 重组质粒pDC316-FCU1经*EcoR* I + *Sal* I 双酶切, 可得到一条1.3 kb左右大小的片段, 与预期相符, 酶

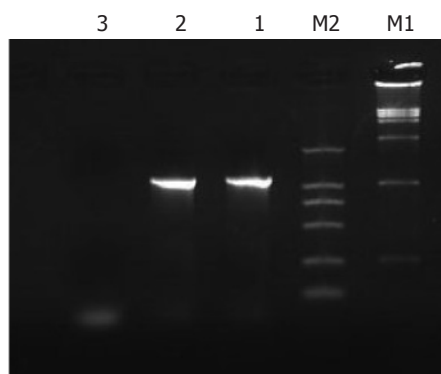


图 3 PCR产物电泳图谱. M1: DL15000 marker; M2: DL2000 marker; 1: 感染病毒HCT116; 2: pDC316-FCU1作为模板; 3: 阴性对照.

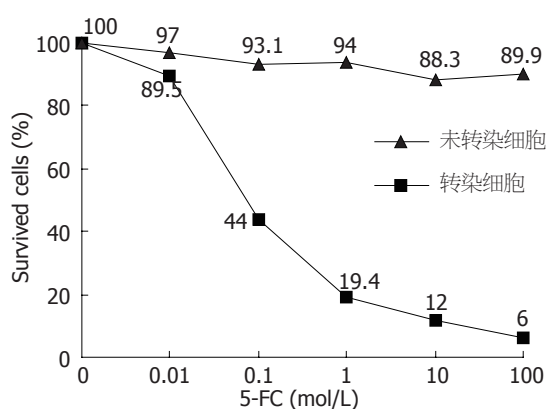


图 4 5-FC对HCT116/FCU1细胞的杀伤作用.

切鉴定表明, 质粒构建正确. 测序鉴定, 与已发表的FCU1的序列完全相符(图1).

2.2 重组腺病毒包装、扩增和滴度的测定 将质粒pDC316-FCU1与腺病毒骨架质粒pBHG共转染HEK 293细胞, 第8天, 细胞变大变圆, 呈葡萄状, 并开始出现明显噬斑等典型细胞病变(CPE)(图2). 第11天时, 细胞大部分病变并从底部脱落. 用TCID<sub>50</sub>法测定, 病毒滴度为 $2 \times 10^9$  PFU/mL.

2.3 重组腺病毒感染HCT116细胞及PCR鉴定 将HCT116以 $10^4$ 接种于24孔板, 12 h后给予50 MOI的AD-FCU1感染, 以RPMI 1640为对照, 1-2 h后吸去病毒液, 每孔加入2 mL培养液. 收集培养48 h的感染细胞, 抽提总DNA用于PCR检测(图3), 感染细胞能够特异地扩增出1300 bp左右大小的条带, 与质粒扩增结果一致, 而对照组则为阴性.

2.4 5-FC对HCT116/FCU1细胞的杀伤作用 随着5-FC浓度的增加, HCT116/FCU1细胞的存活率明显下降, 当5-FC达100  $\mu\text{mol/L}$ 时, 存活的HCT116/FCU1细胞极少, 而对照组存活率接近90%(图4).

## ■创新盘点

本文首次报道应用融合自杀基因FCU1/5-FC系统杀伤结肠癌细胞的实验结果, 为进一步研究提供了实验依据.



### ■应用要点

自杀基因疗法是治疗肿瘤有着较为肯定疗效的方法,采用融合基因或联合基因治疗可大大提高其疗效,而且融合自杀基因FCU1克服了肿瘤细胞对5-FU耐药性,有望成为切实有效的临床治疗手段。

### 3 讨论

腺病毒载体法是基因治疗中最有前途的基因转移方法之一。其生物学特性得到广泛研究。腺病毒有一个中等大小的基因组(平均36 kb),适合于容纳于大片段基因,载体容易构建和操作。腺病毒宿主范围广,不仅能感染繁殖期的细胞,而且能感染非分裂期的细胞,故能达到很高的转染效率。在腺病毒生活周期中,其基因不整合到宿主细胞中,因而遗传毒性低。AdMax包装系统通过Cre/loxP获得重组病毒,这个过程发生在293细胞中,从而避免在细菌中重组。将克隆的外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的包装质粒共转染293细胞,利用Cre/loxP系统的作用实现重组,产生重组腺病毒。这个系统有多种优势,包括操作简便、重组效率高、获得的病毒产率高、目的基因的表达水平高等。本研究构建了含融合自杀基因FCU1的重组质粒pDC316-FCU1,采用AdMax系统成功包装和扩增了Ad5 FCU1重组腺病毒,经纯化病毒滴度为 $2 \times 10^9$  PFU/mL,并能有效感染结肠癌细胞HCT116。

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一,以40-50岁年龄组发病率最高。据世界流行病学调查,发现结肠癌在北美、西欧、澳大利亚、新西兰等地的发病率最高。近年各地资料显示随着人民生活水平的提高,饮食结构的改变,我国发病率呈逐年上升趋势。基因治疗是一种崭新的在分子水平治疗肿瘤的方法。自杀基因疗法是将自杀基因导入肿瘤细胞内,可将无毒的前体药物转化为杀瘤的药物,许多自杀基因系统,如HSV-tk/GCV<sup>[4-5]</sup>和CD/5-FC系统<sup>[6]</sup>等,均显示了良好的杀瘤效应。

为了进一步提高自杀基因的疗效,许多研究者采用联合基因治疗或融合基因治疗的方法,取得了令人鼓舞的效果<sup>[7-9]</sup>。FCY1基因编码酵母的胞嘧啶脱氨酶基因,可将5-FC转化为5-FU,研究表明,用重组腺病毒将FCY1基因导入胃、肠、肝肿瘤细胞可以增加这些细胞对5-FU的敏感性,并显示旁观者效应<sup>[10]</sup>。FUR1编码酵母尿嘧啶磷酸核糖转移酶,可将5-FU进一步转化为毒性代谢产物5-氟尿嘧啶三磷酸盐和5-氟脱氧尿嘧啶单磷酸盐,分别阻断细胞的RNA和DNA的合成,直接发挥杀瘤效应。有学者将FCY1和FUR1分别构建于独立的载体上联合应用于结肠癌、肺癌和脑肿瘤,杀瘤效果和旁观者效应较单用显著增强<sup>[2,11]</sup>。

Erbs *et al*<sup>[12]</sup>将FCY1和FUR1两种自杀基因的编码序列经过特定的酶切连接和定点缺失突变等过程融合,构建了新型高效融合自杀基因FCU1。研究表明,融合自杀基因FCU1较单用FCY1,或将FCY1和FUR1分别构建于独立的载体上联合应用均具有100倍的杀瘤作用。FCU1/5-FC系统对肝癌细胞显示较好的杀伤作用<sup>[13]</sup>。本研究将该融合自杀基因经腺病毒载体导入结肠癌细胞,给以无毒的前体药物5-FC,显示了极强的杀伤作用。

自杀基因疗法是治疗肿瘤有着较为肯定疗效的方法,采用融合基因或联合基因治疗可大大提高其疗效,随着载体技术和靶向性的提高,有望成为切实有效的临床治疗手段。

### 4 参考文献

- 1 Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8039-8043
- 2 Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Hamada H, Ohmoto T. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 77-89
- 3 Ng P, Parks RJ, Cummings DT, Eveleigh CM, Graham FL. An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 693-699
- 4 Määttä AM, Tenhunen A, Pasanen T, Meriläinen O, Pellinen R, Mäkinen K, Alhava E, Wahlfors J. Non-small cell lung cancer as a target disease for herpes simplex type 1 thymidine kinase-ganciclovir gene therapy. *Int J Oncol* 2004; 24: 943-949
- 5 Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 400-403
- 6 Rehemtulla A, Hamstra DA, Kievit E, Davis MA, Ng EY, Dornfeld K, Lawrence TS. Extracellular expression of cytosine deaminase results in increased 5-FU production for enhanced enzyme/prodrug therapy. *Anticancer Res* 2004; 24: 1393-1399
- 7 Ou-Yang F, Lan KL, Chen CT, Liu JC, Weng CL, Chou CK, Xie X, Hung JY, Wei Y, Hortobagyi GN, Hung MC. Endostatin-cytosine deaminase fusion protein suppresses tumor growth by targeting neovascular endothelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 378-384
- 8 Chung-Faye GA, Chen MJ, Green NK, Burton A, Anderson D, Mautner V, Searle PF, Kerr DJ. In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther* 2001; 8: 1547-1554
- 9 Boucher PD, Im MM, Freytag SO, Shewach DS. A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide

- gene therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 3230-3237
- 10 Kanai F, Kawakami T, Hamada H, Sadata A, Yoshida Y, Tanaka T, Ohashi M, Tateishi K, Shiratori Y, Omata M. Adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1998; 58: 1946-1951
- 11 Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of escherichia coli cytosine deaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 1015-1022
- 12 Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R, Mehtali M. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res* 2000; 60: 3813-3822
- 13 谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员. 双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1740-1742

#### ■同行评价

本文选题较新, 研究方法科学, 对采用融合基因治疗结肠癌的临床研究提供了较充分的实验依据, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

**本刊讯** 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

#### 1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化道肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

#### 2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2008-09-30.

#### 3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

# RASSF1A与CyclinD1在胃黏膜病变组织中表达及二者的关系

陈雅慧, 兰忠平, 惠起源, 李宝莉, 杨彦玲

## ■背景资料

胃癌是发病率较高的恶性肿瘤之一, 他的发生发展是一个多基因多因素共同作用的复杂过程. 本文通过探讨研究RASSF1A蛋白和CyclinD1蛋白在胃癌及癌前病变组织中的表达及二者的关系, 为研究胃癌发生发展机制提供一定科学依据.

陈雅慧, 惠起源, 李宝莉, 杨彦玲, 延安大学医学院病理教研室 陕西省延安市 716000

兰忠平, 延安大学附属医院外科 陕西省延安市 716000  
陈雅慧, 2007年延安大学医学院硕士, 讲师, 主要从事胃癌病理学研究.

延安大学校内科研资助项目, No. YDK2006-29

作者贡献分布: 此课题由陈雅慧, 兰忠平及惠起源设计; 研究过程由陈雅慧, 李宝莉及杨彦玲操作完成; 研究所用试剂及标本由兰忠平提供; 数据分析陈雅慧与惠起源完成; 本论文写作由陈雅慧与惠起源完成.

通讯作者: 陈雅慧, 716000, 陕西省延安市, 延安大学医学院病理教研室. lzp1973919@163.com

电话: 0911-2411254

收稿日期: 2008-06-06 修回日期: 2008-07-13

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Expression of RASSF1A and CyclinD1 in gastric mucosal lesions and their correlations

Ya-Hui Chen, Zhong-Ping Lan, Qi-Yuan Hui, Bao-Li Li, Yan-Ling Yang

Ya-Hui Chen, Qi-Yuan Hui, Bao-Li Li, Yan-Ling Yang, Department of Pathology, Medical College of Yanan University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Zhong-Ping Lan, Department of Surgery, the Affiliated Hospital of Yanan University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Yanbian University, No. YDK2006-29

Correspondence to: Ya-Hui Chen, Department of Pathology, Medical College of Yanan University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China. lzp1973919@163.com

Received: 2008-06-06 Revised: 2008-07-13

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of Ras association domain family 1A gene (RASSF1A) and CyclinD1 as well as their correlations in gastric mucosal lesions.

**METHODS:** We detected the expression of RASSF1A and CyclinD1 in tissue specimens of gastric cancer ( $n = 69$ ), chronic superficial gastritis ( $n = 45$ ), chronic atrophic gastritis ( $n = 45$ ), chronic gastritis accompanied with intestinal metaplasia ( $n = 45$ ) and chronic gastritis accompanied with atypical hyperplasia ( $n = 47$ ) using

SP immunohistochemistry.

**RESULTS:** The positive rate of RASSF1A expression was significantly lower in gastric carcinoma than that in chronic superficial gastritis ( $\chi^2 = 10.4$ ,  $P < 0.05$ ); In the mucosa of precancerous lesions, the expression of RASSF1A protein was decreased gradually ( $\chi^2 = 28.7$ ,  $P < 0.05$ ), and obviously correlated with the degrees of tumor differentiation ( $P < 0.05$ ). CyclinD1 protein was hardly expressed in chronic superficial gastritis, but its expression was significantly elevated in gastric cancer (84.1%). The expression of CyclinD1 was increased gradually in the mucosa of precancerous lesions ( $\chi^2 = 11.9$ ,  $P < 0.05$ ), and it was markedly higher in gastric carcinoma than that in the other lesions ( $\chi^2 = 22.0, 19.6, 29.4$ ; all  $P < 0.01$ ). There was a negative correlation between the expression of RASSF1A and CyclinD1 protein in gastric carcinoma ( $r_s = -0.323$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** RASSF1A expression is down-regulated while CyclinD1 expression is up-regulated in gastric mucosa during the evolution process of chronic superficial gastritis→chronic atrophic gastritis→intestinal metaplasia→gastric dysplasia→gastric carcinoma. Combined detection of the two markers may help to study the mechanism of gastric cancer pathogenesis and development.

**Key Words:** Ras association domain family 1A gene; CyclinD1; Gastric carcinoma; Immunohistochemistry

Chen YH, Lan ZP, Hui QY, Li BL, Yang YL. Expression of RASSF1A and CyclinD1 in gastric mucosal lesions and their correlations. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2604-2609

## ■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心; 戴冬秋, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

## 摘要

**目的:** 研究RASSF1A蛋白和CyclinD1在胃癌及癌前病变组织中的表达及二者的关系.

**方法:** 收集延安大学附属医院2005-01/2006-10行手术切除的69例胃癌患者临床病理



资料和切除标本的组织蜡块. 同时收集慢性浅表性胃炎45例、慢性萎缩性胃炎45例、慢性胃炎伴肠化生45例及慢性胃炎伴不典型增生57例胃黏膜组织蜡块. 采用免疫组化SP法检测胃癌及癌前病变胃黏膜组织中RASSF1A蛋白和CyclinD1的表达.

**结果:** 胃癌组织中RASSF1A表达的阳性率低于其在慢性浅表性胃炎胃黏膜组织中的阳性表达率( $\chi^2 = 10.4, P < 0.05$ ); RASSF1A蛋白在胃癌癌前病变黏膜中阳性率表达逐渐降低( $\chi^2 = 28.7, P < 0.05$ ), 并且与胃癌组织分化程度有关( $P < 0.05$ ). 胃癌组织中CyclinD1表达的阳性率为84.1%, 慢性浅表性胃炎黏膜组织中的几乎不表达; CyclinD1在胃癌癌前病变黏膜中阳性率表达逐渐升高( $\chi^2 = 11.9, P < 0.05$ ); 胃癌组与其他各组之间阳性率比较均存在显著性差异( $\chi^2 = 22.0, 19.6, 29.4, P < 0.01$ ); RASSF1A蛋白和CyclinD1蛋白在胃癌中阳性表达率二者呈负相关( $r_s = -0.323, P < 0.05$ ).

**结论:** 胃黏膜在从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌这一演化模式过程中, RASSF1A蛋白表达减弱, CyclinD1蛋白表达增强; 二者的联合检测, 对研究胃癌发生发展机制有一定科学意义.

**关键词:** Ras相关区域家族1A; 细胞周期素D1; 胃癌; 免疫组化

陈雅慧, 兰忠平, 惠起源, 李宝莉, 杨彦玲. RASSF1A与CyclinD1在胃黏膜病变组织中表达及二者的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2604-2609  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2604.asp>

## 0 引言

Ras相关区域家族1A(Ras association domain family 1A gene, RASSF1A)是新近发现的候选抑癌基因, 他的表达与肿瘤的发生、发展和预后有密切的关系; 同时, 其与细胞周期素D1蛋白的相关性也日益受到广大学者的关注; 为此, 我们检测胃癌及癌前病变胃黏膜组织中RASSF1A与CyclinD1的蛋白表达, 分析RASSF1A与CyclinD1在胃癌发生、发展中的作用及其两种基因的相关性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集延安大学附属医院2005-01/2006-10行手术切除的69例胃癌患者的临床病理资料和切除标本的组织蜡块, 所有病例系首次确诊未

进行放疗和化疗, 手术后均经病理证实. 其中高分化腺癌13例; 中分化腺癌25例; 低分化腺癌31例; 同时收集慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)45例、慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)45例、慢性胃炎伴肠化生(intestinal metaplasia, IM)45例及慢性胃炎伴不典型增生(gastric dysplasia, DYS)57例胃黏膜组织蜡块. RASSF1A鼠抗人mAb(ab23950)购自英国abcam公司, CyclinD1兔抗人抗体(RMA-0541)购自福州迈新生物技术开发公司, 免疫组化S-P试剂盒(SP-9002)购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 显微图像分析系统购于北京泰克仪器有限公司.

**1.2 方法** 免疫组化染色采用S-P法, 阴性对照用PBS液代替一抗作为空白对照, 阳性对照用预实验已知的阳性为对照片. RASSF1A阳性表达在细胞质出现棕黄色. CyclinD1阳性表达主要在细胞核, 少量组织有胞质同时非特异性着色. 表达强度判定标准如下: 每张切片随机取10个高倍视野, 每个视野计100个细胞中的阳性细胞数, 取均值, 以百分数表示阳性指数, 结果进行半定量分析. 对阳性评分(0%-10%为0分, 11%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, 76%-100%为4分); 同时对染色强度进行评分(不着色为0, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分). 结果取两者相加之和, 0-1分(-), 2-3分(±), 4-5分为(+), 6-7分为(++). 将(-)和(±)定为阴性, (+)和(++)定为阳性. 用显微图像分析系统测定每张阳性片的染色平均光密度来半定量表达, 即在每张切片随机选5个视野(400×), 测量每张切片抗原阳性表达产物的平均光密度值, 并分别取其平均值, 最后计算出来平均光密度反映该切片的表达强度.

**统计学处理** 百分率的检验采用 $\chi^2$ 检验及Fisher精确概率法, 各组染色光密度值采用 $t$ 检验, 相关性分析采用Spearman等级相关分析, 所有数据都使用统计学软件SPSS11.5进行处理,  $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 RASSF1A和CyclinD1在胃黏膜病变中的表达** RASSF1A蛋白在胃黏膜中主要表达于腺上皮细胞胞质着色中, 表现为棕黄色颗粒, 颗粒粗大不规则(图1). 在慢性浅表性胃炎中RASSF1A表达最强, 表达率为86.7%(39/45); RASSF1A在胃癌组织中阳性表达率为56.5%(39/69), 二者

### ■ 研发前沿

目前关于胃癌及癌前病变的发展变化备受关注, 也是胃癌研究领域的热点, 有关二者具体发展机制有待于进一步阐明.

## ■相关报道

国内外许多研究发现RASSF1A和CyclinD1的异常表达与胃癌的发生发展密切相关,此二者基因的检测有助于为胃癌及癌前病变的发生发展提供科学意义。

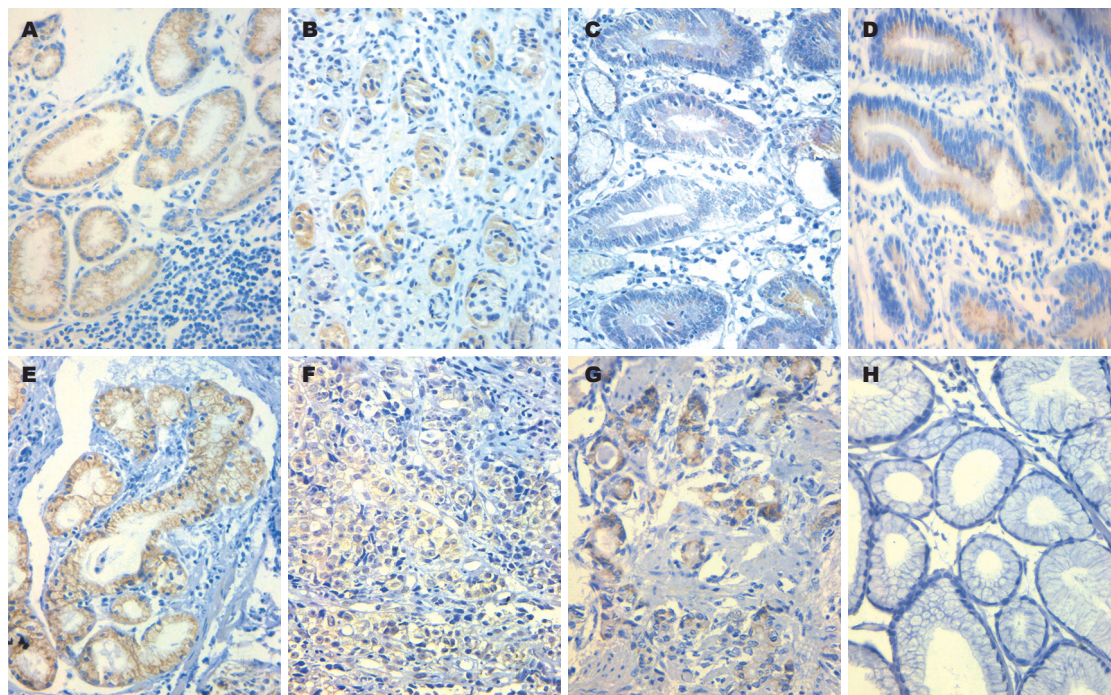


图1 RASSF1A在不同胃黏膜中阳性表达(S-P法×400)。A: 在CSG中的表达; B: 在CAG中表达; C: 在IM中的表达; D: 在DYS中的表达; E: 在高分化胃腺癌中表达; F: 在中分化胃腺癌中阳性表达; G: 在低分化胃腺癌中表达; H: 在CSG中胃黏膜阴性对照。

表1 RASSF1A和CyclinD1在胃黏膜病变中表达情况

分组	n	RASSF1A表达(n)		阳性率(%)	CyclinD1表达(n)		阳性率(%)
		阳性	阴性		阳性	阴性	
慢性浅表性胃炎	45	39	6	86.67 <sup>a</sup>	0	45	0.00
慢性萎缩性胃炎	45	36	9	80.00	3	42	6.67
肠上皮化生	45	33	12	73.33	6	39	13.33
不典型增生	57	39	18	68.42	15	42	26.31
胃癌	69	39	30	56.52	58	11	84.05 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 胃癌组; <sup>b</sup> $P<0.05$  vs 其他各组。

阳性率比较有显著性差异( $\chi^2 = 10.4$ ,  $P<0.05$ )。RASSF1A在其他胃黏膜病变中表达率见表1, 阳性表达率随着胃黏膜病变程度加重而逐渐降低, 各组阳性率经趋势检验有显著性意义( $\chi^2 = 28.7$ ,  $P<0.05$ ); 慢性萎缩性胃炎组、肠上皮化生组和不典型增生组分别与胃癌组织比较, 阳性率无显著性意义( $\chi^2 = 2.84$ ;  $1.45$ ;  $1.49$ ;  $P>0.05$ )。

CyclinD1阳性染色位于细胞核, 表现为棕黄色颗粒, 有时伴细胞质的非特异性染色。在胃黏膜从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠化生→非典型性增生→胃癌这一演化模式过程中, 细胞核的染色逐渐增加, 随着胃癌的恶性程度的增加, 癌细胞核的阳性染色也逐渐加深(图2); CyclinD1蛋白在各种黏膜中表达的阳性率如表1, 经趋势检验, 各组CyclinD1蛋白阳性表达率

有增高趋势( $\chi^2 = 11.9$ ,  $P<0.05$ )。CyclinD1在慢性浅表性胃炎和慢性萎缩性胃炎之间及慢性萎缩性胃炎与不典型增生之间的表达差异无显著性( $P>0.05$ ); 但胃癌与其他各组之间均存在显著性差异( $\chi^2 = 22.0$ ;  $19.6$ ;  $29.4$ ;  $P<0.05$ )。

2.2 RASSF1A和CyclinD1在各组胃黏膜病变中染色平均光密度 用显微图像分析系统测量RASSF1A蛋白和CyclinD1在各种黏膜中的表达强度进行定量分析, 用均数和标准误表示结果, 各组染色平均光密度统计结果见表2。在慢性浅表性胃黏膜RASSF1A蛋白表达的平均光密度是 $0.219 \pm 0.070$ ; 在胃癌组RASSF1A蛋白表达的平均光密度是 $0.102 \pm 0.030$ ; 二者经 $t$ 检验平均光密度有显著性意义( $F = 25.61$ ,  $P<0.05$ )。RASSF1A在不同胃黏膜病变中表达的平均光密度值, 从



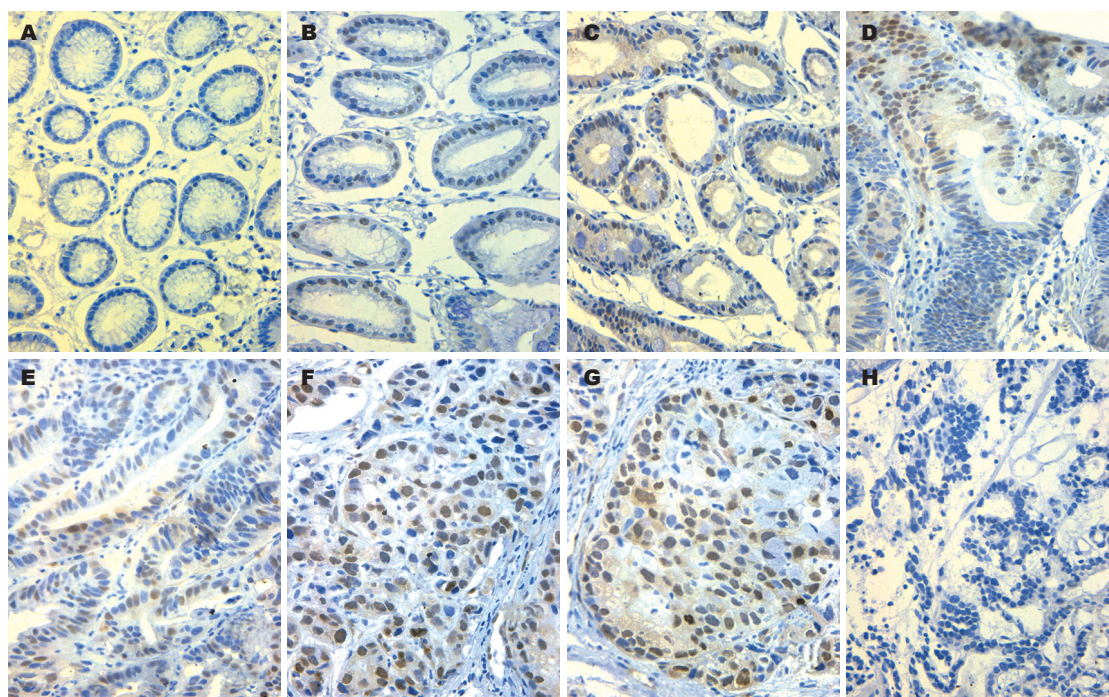


图2 CyclinD1不同胃黏膜中阳性表达(S-P法×400). A: 在CSG中的表达; B: 在CAG中表达; C: 在IM中的表达; D: 在DYS中的表达; E: 在高分化胃腺癌中表达; F: 在中分化胃腺癌中阳性表达; G: 在低分化胃腺癌中表达; H: 在高分化胃腺癌胃黏膜阴性对照.

#### ■创新盘点

本文比较系统阐释了RASSF1A蛋白和CyclinD1蛋白在胃癌及癌前病变组织中的表达,并分析了二者的相关性,为胃癌及癌前病变二者具体发展机制提供一定科学依据.

表2 RASSF1A和CyclinD1在胃黏膜病变中染色平均光密度比较(mean±SD)

分组	n	RASSF1A	CyclinD1
慢性浅表性胃炎	45	0.219±0.070 <sup>a</sup>	0
慢性萎缩性胃炎	45	0.114±0.038	0.139±0.016
肠上皮化生	45	0.110±0.016	0.229±0.023
不典型增生	57	0.108±0.016	0.303±0.025
胃癌	69	0.102±0.030	0.775±0.033 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 其他各组; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 胃癌组.

慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌是逐渐减弱的见表2, 各组之间平均光密度均值比较有显著性差异( $F=12.57$ ,  $P<0.05$ ). CyclinD1在胃黏膜病变中从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌表达的平均光密度是逐渐增强的见表2, 各组之间平均光密度均值比较有显著性差异( $F=10.24$ ,  $P<0.05$ ); 胃癌组与其他各组之间平均光密度均值比较有显著性意义( $F=13.24$ ,  $12.57$ ,  $5.56$ ,  $P<0.05$ ).

2.3 RASSF1A和CyclinD1在不同分化程度癌组织的表达 RASSF1A蛋白阳性表达与癌组织分化程度有关, 低分化组与高、中分化组相比较有显著性意义( $\chi^2=9.84$ ,  $8.74$ ,  $P<0.05$ ); CyclinD1蛋白的阳性表达与癌组织分化程度无关, 低分

化组与高、中分化组相比较无显著性意义( $P>0.05$ , 表3). 用显微图像分析系统测量RASSF1A蛋白和CyclinD1蛋白在不同分化程度胃癌组织中的表达强度进行定量分析, 用均数和标准误差表示结果, 各分化组染色平均光密度统计结果见表3. RASSF1A蛋白在高、中及低分化胃癌中平均光密度逐渐降低, 低分化组与高、中分化组相比较有显著性意义( $F=6.382$ ,  $4.868$ ,  $P<0.05$ ). CyclinD1蛋白表达在高、中及低分化胃癌中平均光密度逐渐升高, 低分化组与高、中分化组相比较无显著性意义( $F=0.039$ ,  $0.046$ ,  $P>0.05$ ).

2.4 RASSF1A与CyclinD1在胃癌表达的相互关系 RASSF1A蛋白与CyclinD1蛋白在胃癌组织中表达关系统计结果, 二者表达都为阳性26例, 都为阴性5例; 经Spearman相关性检验二者呈负相关( $r_s=-0.323$ ,  $P<0.05$ ).

### 3 讨论

RASSF1A是Dammann *et al*<sup>[1]</sup>2000年克隆出的候选抑癌基因, 在肺和乳腺的正常组织中均有表达, 但在肺癌和乳腺癌的细胞株和术后标本中有着很高的缺失率和甲基化. 其cDNA序列中含有6个外显子, 共1873 bp核苷酸, 编码由340个氨基酸组成, 分子质量为38.8 kDa的蛋白质. 目前认为, RASSF1A蛋白可能是一种参与细胞



## ■应用要点

RASSF1A和CyclinD1在胃癌及癌前病变的异常表达,可以较准确为胃癌发生发展机制提供生物学依据;并且为胃癌临床基因治疗提供新的治疗思路。

表 3 RASSF1A和CyclinD1在不同分化程度胃癌组织中的阳性表达 (n, %, mean ± SD)

分化程度	n	RASSF1A表达		CyclinD1表达	
		阳性率	平均光密度	阳性率	平均光密度
高分化	13	11/13(84.61) <sup>a</sup>	0.127 ± 0.042 <sup>a</sup>	9/13(69.23)	0.667 ± 0.024
中分化	25	18/25(72.00) <sup>c</sup>	0.109 ± 0.020 <sup>c</sup>	21/25(84.00)	0.706 ± 0.027
低分化	31	10/31(32.26)	0.094 ± 0.022	28/31(90.32)	0.825 ± 0.045

<sup>a</sup>P<0.05 vs 低分化组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 胃癌低分化组。

周期调控的重要抑制蛋白,其通过多种途径抑制细胞生长、促进细胞凋亡和衰老。RASSF1A蛋白表达缺失或降低可导致肿瘤的发生。目前其作用机制还不十分清楚。可能通过以下机制发挥作用: (1)RASSF1A作为Ras蛋白的效应器与凋亡前激酶MTS1结合促进细胞凋亡<sup>[2]</sup>; (2)RASSF1A可能通过与微管结合中心体和纺锤体的功能,进而调节微管的稳定性, RASSF1A还能与CDC20结合抑制后期促进联合体(APC)来调节有丝分裂的进展<sup>[3]</sup>; (3)RASSF1A可以抑制CyclinD1的积聚,使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>/S期<sup>[4]</sup>。

研究表明, RASSF1A蛋白在几乎所有正常组织呈高表达,而在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、食管癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、肾癌和头颈部肿瘤组织中呈低表达或缺失,且其蛋白表达的阳性率与这些肿瘤的恶性程度、淋巴转移及临床分期均呈负相关<sup>[2,5-8]</sup>。本实验发现RASSF1A蛋白在胃癌组织中表达阳性率56.8%,较其他胃黏膜组织表达低;同时胃黏膜从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌这一演化模式过程中, RASSF1A蛋白的表达逐渐降低; RASSF1A蛋白的阳性表达率与胃癌组织分化程度有统计学意义,此结果与国内外文献[6,9-10]报道相似,这说明在胃癌发生发展过程中有RASSF1A基因缺失或改变,应用免疫组化技术测定胃癌中RASSF1A蛋白的表达情况,可对判断肿瘤的恶性程度及淋巴转移具有重要的参考价值。

细胞周期素D1为细胞周期相关癌基因,可激活CDK4/6的蛋白激酶活性,促使细胞从G<sub>1</sub>期顺利进入S期,完成DNA复制。细胞周期素D1的过表达可使细胞持续增值,从而导致细胞失控性生长<sup>[11]</sup>。在乳腺癌、食道癌、肺癌,胃癌及肝癌等多种肿瘤组织中都存在CyclinD1基因扩增及蛋白过表达<sup>[12-13]</sup>。本实验结果显示CyclinD1在胃癌中阳性率为84.1%,显著高于其他胃黏膜病变组织(P<0.05),但与肿瘤分化

程度无关,这提示CyclinD1表达异常可能是胃癌发生发展过程中早期的分子事件。目前认为, CyclinD1基因扩增与CyclinD1蛋白表达间有分离现象<sup>[14]</sup>。仅仅CyclinD1的过表达还不足引起多数细胞发生转化,需要其他的肿瘤原癌基因或抑癌基因连续协同作用。可见CyclinD1并不是转化的唯一因子,但他是维持转化细胞所必需。

RASSF1A在体内和体外均抑制人类肿瘤细胞的生长,提示该基因为肿瘤抑制基因<sup>[15]</sup>,具有多种功能,涉及信号转导、生长调节通路和细胞增殖、完整及凋亡的调节。本研究发现RASSF1A蛋白和CyclinD1蛋白在胃癌中阳性表达率二者呈负相关,这提示RASSF1A表达的降低和CyclinD1表达的升高,这两基因表达的变化发生在胃癌的发生发展期。Shivakumar *et al*<sup>[4]</sup>将RASSF1A瞬时转染人不表达该基因的肺腺癌细胞株H1299后发现,细胞周期被阻断在G<sub>1</sub>/S期。认为RASSF1A从翻译水平上抑制了CyclinD1的聚集即阻断了CyclinD1介导的细胞增殖旁路,从而阻止了细胞从G<sub>1</sub>向S期转变,但CyclinD1或其下游的G<sub>1</sub>/S期跃迁因子(如细胞周期蛋白A或E7)的表达增多抑制RASSF1A诱导的细胞周期停滞。然而,胃癌的发生是多基因参与,多步骤发展的过程, CyclinD1的表达也是多因素影响的结果,而且在胃癌发生过程中CyclinD1基因变异;各种影响因素的总和,在整个肿瘤细胞生长增殖调控网络中, RASSF1A基因对CyclinD1表达的影响大小及其作用机制未完全阐明,还有待于通过其他更敏感的实验方法的证实。

## 4 参考文献

- 1 Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319x
- 2 Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F. Methylation

- associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001; 20: 1509-1518
- 3 Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW, Choi EJ, Kirschner MW, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 129-137
- 4 Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4309-4318
- 5 Lo PH, Xie D, Chan KC, Xu FP, Kuzmin I, Lerman MI, Law S, Chua D, Sham J, Lung ML. Reduced expression of RASSF1A in esophageal and nasopharyngeal carcinomas significantly correlates with tumor stage. *Cancer Lett* 2007; 257: 199-205
- 6 Byun DS, Lee MG, Chae KS, Ryu BG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7034-7038
- 7 Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, Weichselbaum R, Kuo MJ, Maher ER, Latif F. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1585-1592
- 8 Li Y, Wei Q, Cao F, Cao X. Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women. *Oncol Rep* 2008; 19: 1149-1153
- 9 叶梅, 夏冰, 郭秋莎. 胃癌组织RASSF1A甲基化对其 mRNA 及蛋白表达的影响. *中华内科杂志* 2006; 45: 1008-1012
- 10 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
- 11 Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, Takada N, Osugi H, Higashino M, Otani S, Fukushima S. Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 18-25
- 12 Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 1998; 51: 1-7
- 13 Mate JL, Ariza A, Aracil C, López D, Isamat M, Pérez-Piteira J, Navas-Palacios JJ. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 1996; 180: 395-399
- 14 Bartkova J, Lukas J, Müller H, Lützhøft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 57: 353-361
- 15 Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zbarovsky E, White M, Minna JD. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 691-699

## ■同行评价

本文选题有一定的使用价值, 研究方法内容较新颖, 但文章总体水平一般。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志英文摘要要求

**本刊讯** 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# N-乙酰半胱氨酸对C3A永生化肝细胞解毒代谢功能的影响

魏琳琳, 郑素军, 陈煜, 赵军, 丁美, 段钟平

## ■背景资料

慢性重型肝炎在我国发病率高, 病情危重, 病死率高。慢性重型肝炎的治疗一直缺乏有效药物, 加强这方面的开发与研究是研究热点之一。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)具有多种药理作用, 因具有肝细胞保护作用而越来越多用于治疗多种原因引起的肝细胞损害, 是国外用于治疗急性肝衰竭的有效药物, 但其应用于慢性重型肝炎的治疗尚需进一步研究。

魏琳琳, 郑素军, 陈煜, 赵军, 丁美, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069。  
国家科技攻关计划引导项目, No. 2003BA753C  
2007年高等学校博士学科点专项科研基金, No. 20070025009  
作者贡献分布: 本课题由段钟平、陈煜及郑素军设计; 研究过程由魏琳琳、赵军及丁美操作完成; 数据分析由魏琳琳完成; 本文写作由魏琳琳完成, 由郑素军、段钟平修改。  
通讯作者: 段钟平, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心。  
duan2517@sohu.com  
电话: 010-63291345  
收稿日期: 2008-03-17 修回日期: 2008-07-12  
接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Effects of N-acetylcysteine on the detoxification and biological metabolism of C3A immortalized cell line

Lin-Lin Wei, Su-Jun Zheng, Yu Chen, Jun Zhao, Mei Ding, Zhong-Ping Duan

Lin-Lin Wei, Su-Jun Zheng, Yu Chen, Jun Zhao, Mei Ding, Zhong-Ping Duan, Artificial Liver Center, You'an Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China

Supported by: the National Science and Technology Program for Tackling Key Problems, No. 2003BA753C; the University Doctoral Scientific Research Fund in 2007, No. 20070025009

Correspondence to: Dr. Zhong-Ping Duan, Artificial Liver Center, You'an Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, 8 Youanmenwai Xitoutiao, Fengtai District, Beijing 100069, China. duan2517@sohu.com

Received: 2008-03-17 Revised: 2008-07-12

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-18-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of N-acetylcysteine (NAC) on hepatocyte (using C3A immortalized cell line) detoxification and biological metabolism, and to compare the therapeutic effect between NAC and GSH (reduced glutathione).

**METHODS:** C3A cells were cultured with chronic severe hepatitis plasma (CSHP), while NAC and GSH were added to the medium with a dosage of 25 mmol/L, 5 mmol/L or 1 mmol/L, respectively. Meanwhile, C3A cells cultured with normal human plasma (NHP) or 100 mL/L FBS-MEM were as controls. The contents of GSH

and MDA in C3A cells and the metabolic rate of diazepam were detected 24, 48 and 72 h after administration, respectively.

**RESULTS:** Comparison between groups showed that the content of intra-cellular GSH and the metabolic rate of diazepam in C3A cells were significantly higher at 24, 48 and 72 h in the FBS-MEM group, the NHP group and the groups added NAC or GSH in CSHP than those in the CSHP group (GSH:  $F = 246.116, 235.489, 201.536$ , all  $P < 0.01$ ; diazepam:  $F = 306.812, 476.722, 502.061$ , all  $P < 0.01$ ), but the content of intra-cellular MDA in the CSHP group was markedly higher than those in the other groups ( $F = 332.48, 662.349, 492.983$ , all  $P < 0.01$ ). The content of intra-cellular GSH and the metabolic rate of diazepam in C3A cells in the CSHP + NAC groups were higher than those in the CSHP + GSH groups (comparison between the same dosage:  $P < 0.01$ ), but the content of intra-cellular MDA was in the opposite situation ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** NAC can obviously improve the detoxification and biological metabolism of C3A cells cultured in CSHP. NAC is superior to GSH at the same dosage.

**Key Words:** C3A cell line; N-acetylcysteine; Chronic severe hepatitis; Detoxification; Biological metabolism

Wei LL, Zheng SJ, Chen Y, Zhao J, Ding M, Duan ZP. Effects of N-acetylcysteine on the detoxification and biological metabolism of C3A immortalized cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2610-2614

## 摘要

**目的:** 研究N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对慢性重型肝炎肝衰竭时肝细胞解毒代谢功能的影响, 并比较NAC与还原型谷胱甘肽(GSH)的疗效。

**方法:** 体外慢性重型肝炎患者血浆(chronic severe hepatitis plasma, CSHP)培养C3A细胞, 并同时分别加入大、中、小三个剂量NAC及对应剂量的GSH, 以正常血浆(normal human

## ■同行评议者

李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科



plasma, NHP)及培养基(100 mL/L FBS-MEM)为对照, 分别于24、48、72 h 3个时间点检测细胞内GSH及脂质过氧化物(MDA)的含量, 并检测安定代谢量的变化。

**结果:** 24、48、72 h 3个时间点, 培养基组、正常血浆组、各剂量NAC治疗组和GSH治疗组C3A细胞中GSH含量与安定代谢量均分别高于慢性重型肝炎血浆组(GSH:  $F = 246.116, 235.489, 201.536$ , 均 $P < 0.01$ ; 安定代谢量:  $F = 306.812, 476.722, 502.061$ , 均 $P < 0.01$ ), 而慢性重型肝炎血浆组C3A细胞中MDA含量均分别高于上述各组( $F = 332.48, 662.349, 492.983$ , 均 $P < 0.01$ )。慢性重型肝炎血浆+NAC组与慢性重型肝炎血浆+GSH组比较, 前者细胞内的GSH含量和对安定的代谢量, 大、中、小剂量组均分别高于后者对应剂量组( $P < 0.01$ ), 而前者细胞内的MDA含量, 大、中、小剂量组均分别低于后者对应剂量组( $P < 0.01$ )。

**结论:** NAC可以显著改善慢性重型肝炎肝衰竭时肝细胞解毒代谢功能, GSH也有相似功效, 且相同摩尔剂量的NAC效果要优于GSH。

**关键词:** C3A细胞; N-乙酰半胱氨酸; 慢性重型肝炎; 解毒; 代谢

魏琳琳, 郑素军, 陈煜, 赵军, 丁美, 段钟平. N-乙酰半胱氨酸对C3A永生化肝细胞解毒代谢功能的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2610-2614

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2610.asp>

## 0 引言

我国慢性重型肝炎在重型肝炎中所占比例很大, 病情危重, 病死率高<sup>[1]</sup>。体外实验表明, 重型肝炎肝衰竭患者血浆培养的肝细胞膜严重受损, 肝细胞大量坏死, 残存细胞的增殖、蛋白合成、解毒代谢功能均下降<sup>[2-3]</sup>, 血浆中胆红素、胆汁酸、自由基、炎性细胞因子等毒性物质大量堆积, 进一步影响细胞的解毒代谢功能, 由此形成恶性循环。

慢性重型肝炎的治疗一直缺乏有效药物, 加强这方面的开发与研究是研究热点之一。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)的前体, 具有多种药理作用, 是国外用于治疗急性肝衰竭的有效药物, 但其应用于慢性重型肝炎的治疗尚需进一步研究。本研究利用体外培养C3A细胞, 观察NAC对慢性重型肝炎肝衰竭时肝细胞解毒代谢功能的影响, 并以具有类似作用的GSH作为对照, 以期

NAC应用于慢性重型肝炎临床的治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2006-04/2006-10首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心进行人工肝治疗的慢性重型肝炎患者血浆(CSHP)12份, 所选择的慢性重型肝炎患者均符合2000年全国传染病与寄生虫病学术会议修订的慢性重型肝炎诊断标准<sup>[4]</sup>, 另收集正常健康人血浆12份。C3A细胞来自于首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心细胞生物研究室。NAC及GSH原料由杭州民生药业公司提供。特优级胎牛血清(美国Hyclone公司); GIBCO低限量基础培养基MEM(美国Invitrogen公司); BCA蛋白定量试剂盒(普利莱基因技术有限公司); 四甲基偶氮唑盐MTT(北京欣经科生物技术有限公司); 二甲基亚砜DMSO(美国Sigma公司); GSH检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); MDA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); 安定代谢试剂盒(美国康奈尔大学TCC公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 按培养基及药物不同分为以下9组:

(1)培养基组: 加入100 mL/L FBS-MEM培养基。(2)正常血浆组: 加入正常人血浆培养。(3)慢性重型肝炎血浆组: 加入慢性重型肝炎血浆培养。(4)慢性重型肝炎血浆+小剂量NAC组: 加入慢性重型肝炎血浆及NAC, NAC终浓度为1 mmol/L(pH7.3)。(5)慢性重型肝炎血浆+中剂量NAC组: 加入慢性重型肝炎血浆及NAC, NAC终浓度为5 mmol/L(pH7.3)。(6)慢性重型肝炎血浆+大剂量NAC组: 加入慢性重型肝炎血浆及NAC, NAC终浓度为25 mmol/L(pH7.3)。(7)慢性重型肝炎血浆+小剂量GSH组: 加入慢性重型肝炎血浆及GSH, GSH终浓度为1 mmol/L(pH 7.3)。(8)慢性重型肝炎血浆+中剂量GSH组: 加入慢性重型肝炎血浆及GSH, GSH终浓度为5 mmol/L(pH7.3)。(9)慢性重型肝炎血浆+大剂量GSH组: 加入慢性重型肝炎血浆及GSH, GSH终浓度为25 mmol/L(pH7.3)。

**1.2.2 细胞内还原型谷胱甘肽检测:** C3A细胞以 $5 \times 10^5$ /孔的密度接种于12孔板中, 贴壁后于第2天分别更换9组培养基及药物, 入含50 mL/L CO<sub>2</sub>的加湿孵箱培养24、48、72 h, 分别1.25 g/L胰蛋白酶消化、收集细胞入1.5 mL EP管中, PBS洗3遍; 每管加入500  $\mu$ L的RIPA裂解液(含1:100的PMSF), 枪头反复吹打混匀, 冰浴30 min, 12000 r/min, 4℃离心20 min提取上清; BCA法测定蛋白

## ■研究前沿

慢性重型肝炎的治疗一直缺乏有效药物, NAC治疗对乙酰氨基酚致急性肝功能衰竭已获得美国FDA批准, 但其应用于慢性重型肝炎的治疗尚需进一步研究。本研究利用体外培养C3A细胞, 观察NAC对慢性重型肝炎肝衰竭时肝细胞解毒代谢功能的影响, 并以具有类似作用并在临床广泛应用的GSH作为对照, 以期NAC应用于慢性重型肝炎临床的治疗提供理论依据。

## ■相关报道

首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心曾采用C3A细胞为研究对象, 进行了慢性重型肝炎肝衰竭患者血浆在体外对其功能影响的研究。研究发现慢性重型肝炎患者的血浆抑制C3A细胞的解毒代谢功能。国内外曾研究发现, 各种毒性作用对HepG2细胞(C3A细胞由其分化获得)等具有肝细胞相似功能的细胞造成损伤后, NAC对他们的这些细胞具有显著的保护作用。

## ■创新盘点

C3A细胞株是从肝纤维母细胞瘤细胞转化获得,具有良好的肝细胞特异功能,与体内肝细胞极相似,所以有较好的体外实验重现性。本研究在体外用慢性重型肝炎患者血浆培养C3A细胞,模拟重型肝炎肝细胞所处内环境,观察了NAC对这种状态下细胞解毒代谢功能的影响。目前在体外用慢性重型肝炎患者血浆直接培养C3A细胞,并用NAC/GSH药物干预,国内外尚未见报道。

## ■应用要点

慢性重型肝炎危害极大,且慢性重型肝炎的治疗一直缺乏有效药物。美国肝病研究学会(AASLD)2005年提出的“急性肝衰竭处理意见”,中华医学会感染病分会肝衰竭与人工肝学组与中华医学会肝病分会重型肝病与人工肝学组联合提出的“肝衰竭指南”,均把NAC作为对乙酰氨基酚中毒的主要药物,提示该药具有独特而明确作用。本研究揭示NAC对慢性重型肝炎患者肝细胞保护作用的机制,并以具有类似作用并在临床广泛应用的GSH作为对照,为临床慢性重型肝炎治疗提供了实验依据,对临床实际应用具有重要理论意义。

表 1 各组3个时间点细胞内GSH值 (mean ± SD)

分组	1组	2组	3组	4组	5组	6组	7组	8组	9组
24 h	465.38 ± 23.23	443.77 ± 23.08	248.29 ± 26.44	460.11 ± 46.02	495.66 ± 16.84	592.94 ± 18.96	409.62 ± 13.15	444.72 ± 23.04	517.56 ± 24.82
	423.25 ± 18.83	416.26 ± 18.73	207.79 ± 20.71	457.87 ± 39.64	496.76 ± 38.09	578.06 ± 18.84	372.64 ± 20.43	403.28 ± 16.44	454.47 ± 23.70
48 h	359.77 ± 17.68	359.85 ± 19.16	171.56 ± 19.16	408.25 ± 43.28	436.07 ± 20.82	505.81 ± 15.61	322.98 ± 35.03	358.57 ± 25.46	399.40 ± 31.82
72 h									

浓度,按GSH试剂盒说明步骤用分光光度法测定各标本吸光度。

1.2.3 细胞内丙二醛的检测: C3A细胞以 $5 \times 10^5$ /孔的密度接种于12孔板中,贴壁后于第2天分别更换9组培养基及药物,处理同上,BCA法测定蛋白浓度,按MDA试剂盒说明步骤用分光光度法测定各标本吸光度。

1.2.4 安定代谢功能检测: C3A细胞以 $5 \times 10^4$ /孔的密度接种于24孔板中,贴壁后第2天分别更换9组培养基及药物,同时每孔加入安定纯品10  $\mu$ g(浓度0.5 g/L,共加入20  $\mu$ L溶液),入含50 mL/L CO<sub>2</sub>的加湿孵箱培养,分别在第24、48、72 h后收集各孔培养基,按试剂盒所列步骤ELISA法检测安定代谢量。

统计学处理 采用SPSS13.0统计学软件处理数据,9组之间及不同时间点采用随机区组设计的方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同组不同时间点C3A细胞细胞内还原型谷胱甘肽含量的对比 C3A细胞连续培养24、48、72 h后,测定细胞内GSH含量,结果各组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。两两比较,3个时间点均得出以下相同结果:即培养基组、正常血浆组、各剂量NAC治疗组和GSH治疗组C3A细胞中GSH含量均分别高于慢性重型肝炎血浆组( $F_{24h} = 246.116$ ,  $F_{48h} = 235.489$ ,  $F_{72h} = 201.536$ , 均 $P < 0.01$ )。慢性重型肝炎血浆+NAC组与慢性重型肝炎血浆+GSH组比较,前者细胞内的GSH含量,大、中、小给药剂量组均分别高于后者相对应剂量的大、中、小剂量组( $P < 0.01$ )。随着时间的延长,培养基组、正常血浆组、慢性重型肝炎血浆组、各剂量GSH治疗组细胞内的GSH量逐渐减低,有显著性差异( $F_1 = 195.434$ ,  $F_2 = 49.421$ ,  $F_3 = 333.518$ ,  $F_4 = 84.465$ ,  $F_5 = 113.572$ ,  $F_6 = 107.094$ , 均 $P < 0.01$ )。各剂量NAC治疗组24、48 h

GSH含量无差异( $P > 0.05$ ),在72 h GSH含量低于24、48 h( $P < 0.01$ ,表1)。

2.2 C3A细胞在不同组不同时间点细胞内丙二醛含量的对比 C3A细胞连续培养24、48、72 h后,测定细胞内MDA含量结果各组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。两两比较,3个时间点均得出以下相同结果:即慢性重型肝炎血浆组C3A细胞中MDA含量均分别高于培养基组、正常血浆组、各剂量NAC治疗组和GSH治疗组( $F_{24h} = 332.48$ ,  $F_{48h} = 662.349$ ,  $F_{72h} = 492.983$ , 均 $P < 0.01$ )。慢性重型肝炎血浆+NAC组与慢性重型肝炎血浆+GSH组比较,前者细胞内的MDA含量,大、中、小给药剂量组均分别低于后者相对应剂量的大、中、小剂量组( $F_{24h} = 332.48$ ,  $F_{48h} = 662.349$ ,  $F_{72h} = 492.983$ ,  $P < 0.01$ )。随着时间的延长,各组细胞内的MDA量逐渐增高,有显著性差异( $P < 0.01$ ,表2)。

2.3 C3A细胞在不同组不同时间点的安定代谢量的对比 C3A细胞连续培养24、48、72 h后,测定安定代谢量结果各组比较有显著性差异( $F = 306.812$ ,  $476.722$ ,  $502.061$ ; 均 $P < 0.01$ )。两两比较,3个时间点均得出以下相同结果:即培养基组、正常血浆组、各剂量NAC治疗组和GSH治疗组中C3A细胞安定代谢量均分别高于慢性重型肝炎血浆组( $F_{24h} = 306.812$ ,  $F_{48h} = 476.722$ ,  $F_{72h} = 502.061$ , 均 $P < 0.01$ )。慢性重型肝炎血浆+NAC组与慢性重型肝炎血浆+GSH组比较,前者C3A细胞对安定的代谢量,大、中、小剂量组均分别高于后者相对应剂量的大、中、小剂量组( $F_{24h} = 306.812$ ,  $F_{48h} = 476.722$ ,  $F_{72h} = 502.061$ , 均 $P < 0.01$ )。随着时间的延长,各组安定代谢量逐渐增高,有显著性差异( $P < 0.01$ ,表3)。

## 3 讨论

慢性重型肝炎肝衰竭时,血浆中胆红素、胆汁酸、炎性细胞因子、自由基等毒性物质含量显著增高。有实验显示细胞内的GSH可以直接和

表 2 各组3个时间点细胞内MDA值 (mean ± SD)

分组	1组	2组	3组	4组	5组	6组	7组	8组	9组
24 h	4.14 ± 0.24	4.23 ± 0.17	10.68 ± 0.33	5.66 ± 0.26	4.90 ± 0.61	3.72 ± 0.22	6.93 ± 0.70	5.83 ± 0.40	4.90 ± 0.38
48 h	5.10 ± 0.32	5.45 ± 0.26	11.80 ± 0.39	6.97 ± 0.48	5.84 ± 0.48	4.88 ± 0.29	7.69 ± 0.54	6.59 ± 0.49	5.88 ± 0.47
72 h	6.06 ± 0.19	6.38 ± 0.27	12.88 ± 0.37	7.88 ± 0.42	6.91 ± 0.56	5.54 ± 0.34	8.57 ± 0.30	7.37 ± 0.39	6.54 ± 0.29

表 3 各组3个时间点安定代谢量 (mean ± SD)

分组	1组	2组	3组	4组	5组	6组	7组	8组	9组
24 h	5.79 ± 0.16	5.62 ± 0.13	4.62 ± 0.26	6.74 ± 0.20	8.17 ± 0.20	8.24 ± 0.21	5.84 ± 0.23	6.53 ± 0.38	7.28 ± 0.49
48 h	6.67 ± 0.11	6.44 ± 0.16	5.59 ± 0.19	7.34 ± 0.15	8.85 ± 0.12	8.91 ± 0.11	6.59 ± 0.22	7.26 ± 0.33	8.06 ± 0.24
72 h	7.52 ± 0.14	7.35 ± 0.12	6.44 ± 0.20	8.39 ± 0.37	9.69 ± 0.15	9.69 ± 0.15	7.43 ± 0.25	8.18 ± 0.25	9.02 ± 0.21

培养基中的氧自由基反应,在胆汁酸浓度高的培养基中,肝细胞内GSH与氧自由基和亲电子体反应而耗竭<sup>[3]</sup>,同时过氧化产物MDA含量增高,使细胞的解毒储备功能下降。

GSH是体内重要的非酶性抗氧化损伤物质,在机体解毒反应中起到重要作用<sup>[5]</sup>,故治疗中补充GSH意义明确。而NAC其不仅可作为GSH的前体,即NAC脱乙酰基后成为GSH合成的前体半胱氨酸,促进GSH的合成,从而提高组织内GSH含量;而且NAC分子中含有活性巯基(-SH),可直接抗过氧化损伤<sup>[6-7]</sup>。以上双重机制使NAC具备更为强大的清除自由基抗氧化损伤作用,显著增加慢性重型肝炎血浆培养的C3A细胞的细胞内GSH含量,并显著降低细胞内MDA含量,且效果好于GSH。表明NAC提高了慢性重型肝炎肝衰竭时肝细胞的解毒储备功能,发挥了明确的抗过氧化损伤作用。

本研究显示,NAC显著改善了慢性重型肝炎血浆培养的C3A细胞对安定的代谢。安定主要通过两相反应来代谢,细胞色素P450酶(cytochrome p450, CYP)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)分别是第一相和第二相反应中起其主要作用的酶<sup>[8-9]</sup>。mGST与细胞色素P-450酶(CYP450)同位于内质网膜上,凡由P-450氧化酶催化的外源性化合物均在此进行代谢,直接在mGST作用下被解毒排出体外<sup>[10]</sup>。

肝衰竭时,CYP的功能、活性会遭受破坏,整个肝脏CYP的含量会显著下降<sup>[11]</sup>。CYP基因受很多内源性因子的影响<sup>[12]</sup>,IL-1、TNF-α、IFN-β等因子在体内可以抑制CYP的功能。IL-1可通过抑制肝细胞CYP的基因转录而下调其功能。高浓度的胆汁酸可能引起肝细胞滑面内质

网的变化而引起CYP功能的改变<sup>[3]</sup>。同时,GST基因的表达受细胞内氧化应激水平的调控,细胞内GSH的含量在调控机制上起很大作用。慢性重型肝炎肝衰竭时,大量氧自由基生成,细胞抵抗氧化应激的主要抗氧化剂GSH大量损耗,细胞内的氧化还原水平明显降低,严重影响了GST催化功能的发挥。由此,安定代谢的第一相、第二相反应均受到很大影响,从而导致安定代谢率的相对降低。

NAC作为抗氧化剂,能清除活性氧介质,有效抑制内毒素、TNF-α、IFN-γ和IL-1β所致细胞核因子NF-κB的活性,阻断NF-κB信号转导途径,从而下调IL-1、IL-6、IL-8、IL-18及TGF-α等因子的表达,抑制炎症反应<sup>[13-14]</sup>,从而恢复CYP的功能和活性。同时,NAC作为强效的自由基清除剂和还原型谷胱甘肽供给体,在慢性重型肝炎肝衰竭发生时,可以清除大量氧自由基,抵抗细胞氧化应激,调节细胞内的氧化还原水平,从而使GST催化功能得以有效发挥,在安定代谢的第一相、第二相反应中均起到重要作用,提高了细胞的安定代谢率。

我们的研究也显示,NAC在补充GSH、降低MDA、提高安定代谢量的效力和程度上均显著强于GSH。分析原因如下:(1)NAC的分子质量仅163.2 Dal,比GSH分子质量(307 Dal)小的多,因此作为小分子物质,更容易进入细胞,促进GSH的合成,提高组织内GSH含量。(2)NAC为脂溶性,容易进入细胞;GSH为水溶性,不易进入细胞。(3)NAC具有多种药理作用,对细胞功能的调节位点为多个。他最主要最显著的作用为清除自由基,抗氧化损伤。除此之外,NAC还可以减少炎性细胞因子、趋化因子和黏附分子产生,

## ■名词解释

1 细胞色素P450酶(Cytochrome p450, CYP): CYP家族的同工酶CYP1、2、3主要在肝细胞的内质网表达,主要与解毒和异生化合物代谢有关。其中细胞色素P450 3A4有较高的苯二氮卓类代谢活性。

2 谷胱甘肽巯基转移酶(GST): 广泛存在于生物体内,他催化还原型谷胱甘肽(GSH)与各种亲脂性和亲电子底物的第二相结合反应。GST同工酶是一个超基因家族,具有广泛的底物专一性,是体内重要的解毒酶系之一。



## ■同行评价

本研究设计合理, 结果可信, 内容与临床工作紧密结合, 具有一定的实用价值和创新性.

抑制炎症反应, 调节机体免疫状态, 调节细胞凋亡程序, 并防止核酸分子损伤.

总之, 慢性重型肝炎血浆使C3A细胞内GSH含量下降、MDA含量增加, 细胞的安定代谢量降低, 抑制C3A细胞的解毒代谢功能. 在慢性重型肝炎血浆中加入NAC/GSH均可以提高细胞内GSH含量, 降低细胞内MDA含量, 减轻细胞受自由基攻击的程度, 并能够提高慢性重型肝炎血浆培养C3A细胞的安定代谢量. 尤其是NAC改善了细胞和细胞生长微环境的综合状态, 在改善慢性重型肝炎肝衰竭时细胞解毒代谢功能方面, 效果优于GSH. 美国肝病研究学会(AASLD)2005年提出的“急性肝衰竭处理意见”, 中华医学会感染病分会肝衰竭与人工肝学组与中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组联合提出的“肝衰竭指南”, 均把NAC作为对乙酰氨基酚中毒的主要药物, 提示该药具有独特而明确作用<sup>[15-16]</sup>, 我们的研究也支持该药可用于慢性重型肝炎肝衰竭治疗.

## 4 参考文献

- 1 邹正升, 陈菊梅, 辛绍杰, 邢汉前, 沈宏辉, 李建宇, 刘艳萍, 李保森. 565例重型病毒性肝炎的临床特点分析. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 247-248
- 2 Filippi C, Keatch SA, Rangar D, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Improvement of C3A cell metabolism for usage in bioartificial liver support systems. *J Hepatol* 2004; 41: 599-605
- 3 Smirthwaite AD, Gaylor JD, Cousins RB, Grant MH. Cytotoxicity of bile in human Hep G2 cells and in primary cultures of rat hepatocytes. *Artif Organs* 1998; 22: 831-836
- 4 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 5 Rousar T, Cervinková Z, Muzáková V, Kucera O, Lotková H, Kriváková P. [Glutathione and glutathione assays] *Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl* 2005; 48: 15-20
- 6 Stauffer ES, Neil JL. Biomechanical analysis of structural stability of internal fixation in fractures of the thoracolumbar spine. *Clin Orthop Relat Res* 1975; (112): 159-164
- 7 Yedjou CG, Tchounwou PB. N-acetyl-L-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 2007; 4: 132-137
- 8 Estabrook RW. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 1461-1473
- 9 Ji Y, Toader V, Bennett BM. Regulation of microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities by S-nitrosylation. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 1397-1404
- 10 郑英, 楼宜嘉. 微粒体谷胱甘肽S-转移酶与药物代谢. 中国药理学杂志 2003; 38: 484-487
- 11 Aninat C, Seguin P, Descheemaeker PN, Morel F, Malledant Y, Guillouzo A. Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. *Crit Care Med* 2008; 36: 848-854
- 12 Wu R, Cui X, Dong W, Zhou M, Simms HH, Wang P. Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway: the central role of proinflammatory cytokines. *Int J Mol Med* 2006; 18: 339-346
- 13 Lim Y, Levy MA, Bray TM. Dietary supplementation of N-acetylcysteine enhances early inflammatory responses during cutaneous wound healing in protein malnourished mice. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 328-336
- 14 Fischer UM, Antonyan A, Bloch W, Mehlhorn U. Impact of antioxidative treatment on nuclear factor kappa-B regulation during myocardial ischemia-reperfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2006; 5: 531-535
- 15 Polson J, Lee WM. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 2005; 41: 1179-1197
- 16 中华医学会感染病学会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 643-646

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志投稿方式

**本刊讯** 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

## 茵虎利胆合剂配合鼻胆管引流治疗阻塞性黄疸30例

谢沛霖, 吴志红, 田飞, 周大平, 龚昭, 周程

谢沛霖, 武汉市中西医结合医院中医部 湖北省武汉市 430022

吴志红, 田飞, 湖北中医学院 湖北省武汉市 430061

周大平, 武汉市第十三医院普外科 湖北省武汉市 430100

龚昭, 周程, 武汉市中西医结合医院肝胆腔镜外科 湖北省武汉市 430022

谢沛霖, 主任医师, 教授, 国家中医药管理局“优秀中医临床人才”, 武汉市“知名中医”, 主要从事消化系统疾病中西医结合临床及研究。

湖北省卫生厅2005年度中医药中西医结合科研基金资助项目, No. 2005-455-24

作者贡献分布: 谢沛霖与龚昭对此文所作贡献均等; 此课题由谢沛霖与龚昭设计; 研究过程由谢沛霖, 龚昭, 吴志红, 周程, 田飞及周大平操作完成; 数据分析由周程, 吴志红及周大平完成; 本文写作由谢沛霖, 吴志红, 周大平及周程完成。

通讯作者: 龚昭, 430022, 湖北省武汉市中山大道205号, 武汉市中西医结合医院肝胆腔镜外科。gzwolf@sina.com  
电话: 027-85332316

收稿日期: 2008-03-18 修回日期: 2008-06-12

接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-08-18

### Yinhu cholagogue mixture combined with endoscopic naso-biliary drainage in treatment of patients with obstructive jaundice: an analysis of 30 cases

Pei-Lin Xie, Zhi-Hong Wu, Fei Tian, Da-Ping Zhou, Zhao Gong, Cheng Zhou

Pei-Lin Xie, Department of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Integrated Chinese and Western Medicine Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Zhi-Hong Wu, Fei Tian, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Da-Ping Zhou, Department of General Surgery, Wuhan 13th Hospital, Wuhan 430100, Hubei Province, China

Gong Zhao, Cheng Zhou, Department of Hepatobiliary Endoscopic Surgery, Wuhan Integrated Chinese and Western Medicine Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: the Integrated Chinese and Western Medicine Research Foundation of Hubei Provincial Health Department in 2005, No. 2005-455-24

Correspondence to: Zhao Gong, Department of Hepatobiliary Endoscopic Surgery, Wuhan Integrated Chinese and Western Medicine Hospital, 205 Zhongshan Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. gzwolf@sina.com

Received: 2008-03-18 Revised: 2008-06-12

Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-08-18

### Abstract

**AIM:** To observe the clinical efficacy and mechanism of Yinhu cholagogue mixture (YCM)

combined with endoscopic naso-biliary drainage (ENBD) in the treatment of patients with obstructive jaundice (OJ).

**METHODS:** A total of 90 OJ patients were randomly divided into surgery control group ( $n = 30$ ), endoscopy control group ( $n = 30$ ) and YCM group ( $n = 30$ ), treated with traditional open surgery, ENBD alone and YCM plus ENBD, respectively. We observed the T-tube and naso-biliary drainage situation, while monitored the serum TBIL, DBIL, AKP, GPT, GOT, LPS and IL-6 levels before and after operation.

**RESULTS:** On the 14th day after surgery, LPS, IL-6 levels and the liver function markers such as TBIL, DBIL, AKP, GPT and GOT in all the patients decreased obviously, and these indexes were markedly lower in YCM group than those in the surgery control group and endoscopy control group ( $0.07 \pm 0.01$  vs  $0.12 \pm 0.03$ ,  $0.13 \pm 0.03$ ;  $166.5 \pm 31.62$  vs  $230.2 \pm 41.08$ ,  $225.6 \pm 42.69$ ;  $24.3 \pm 7.91$  vs  $43.3 \pm 9.49$ ,  $46.7 \pm 11.07$ ;  $12.6 \pm 4.74$  vs  $32.2 \pm 6.33$ ,  $46.7 \pm 11.07$ ;  $67.5 \pm 25.30$  vs  $102.5 \pm 36.37$ ,  $114.9 \pm 39.53$ ;  $36.8 \pm 14.23$  vs  $79.0 \pm 35.88$ ,  $82.3 \pm 34.79$ ;  $46.2 \pm 11.07$  vs  $84.5 \pm 34.79$ ,  $80.3 \pm 31.62$ , respectively;  $P < 0.05$  or  $0.01$ ); there were no marked differences between the two control groups. On the 5th day after operation, combined therapy was superior to the other two treatments in bile drainage ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ), but there was no significant difference between the two control groups.

**CONCLUSION:** YCM in combination with ENBD can effectively restore liver function, promote bile excretion and lower LPS and IL-6 levels in OJ patients.

**Key Words:** Endoscopic nasobiliary drainage; Obstructive jaundice; Yinhu cholagogue mixture; Combined treatment

Xie PL, Wu ZH, Tian F, Zhou DP, Zhao G, Zhou C. Yinhu cholagogue mixture combined with endoscopic nasobiliary drainage in treatment of patients with obstructive jaundice: an analysis of 30 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2615-2620

### ■背景资料

阻塞性黄疸是由于肝内毛细胆管、小胆管、肝胆管或胆总管的机械性狭窄或闭塞,导致胆汁不能通过胆管排入十二指肠反而流入血的一组常见疾病。本文所探讨的阻塞性黄疸一般是指那些存在机械梗阻的原因使胆汁流出受阻而又需要外科治疗的肝内外胆管阻塞所致的黄疸,即通常所称之的“外科黄”。其致病原因大致上包括结石、肿瘤、炎症、寄生虫与先天性畸形等。

### ■同行评议者

曹志成, 院士, 香港伊丽莎白医院临床肿瘤部、肿瘤科研部

## ■相关报道

有实验证明茵陈蒿及金钟茵陈均能降低CCl<sub>4</sub>、小鼠血清GPT,减轻肝细胞变性、坏死,降低正常小鼠TC,且毒副作用极小。

## 摘要

**目的:** 观察茵虎利胆合剂配合鼻胆管引流术(ENBD)治疗阻塞性黄疸的临床效果,并探讨其作用机制。

**方法:** 将90例阻塞性黄疸患者随机分成手术对照组、内镜对照组以及茵虎实验组各30例。手术组行传统开放手术治疗;内镜组行ENBD治疗,实验组给予ENBD+茵虎利胆合剂治疗。观察各组患者T管、鼻胆管引流情况,同时监测90例患者术前、术后7、14 d的血清TBIL、DBIL、AKP、GPT、GOT、LPS的变化和手术前后IL-6水平变化。

**结果:** 术后第14天各组患者血清LPS、IL-6、TBIL、DBIL、AKP、GPT、GOT较术前均显著下降( $P<0.05$ 或 $0.01$ ),且茵虎实验组明显低于手术及内镜对照组( $0.07\pm0.01$  vs  $0.12\pm0.03$ ,  $0.13\pm0.03$ ;  $166.5\pm31.62$  vs  $230.2\pm41.08$ ,  $225.6\pm42.69$ ;  $24.3\pm7.91$  vs  $43.3\pm9.49$ ,  $46.7\pm11.07$ ;  $12.6\pm4.74$  vs  $32.2\pm6.33$ ,  $46.7\pm11.07$ ;  $67.5\pm25.30$  vs  $102.5\pm36.37$ ,  $114.9\pm39.53$ ;  $36.8\pm14.23$  vs  $79.0\pm35.88$ ,  $82.3\pm34.79$ ;  $46.2\pm11.07$  vs  $84.5\pm34.79$ ,  $80.3\pm31.62$ ,  $P<0.05$ 或 $0.01$ ),手术对照组及内镜对照组间无显著性差异;术后5 d始茵虎实验组胆汁引流水水平明显高于手术及内镜对照组( $P<0.05$ 或 $0.01$ ),而手术与内镜对照组间无显著性差异。

**结论:** 茵虎利胆合剂配合鼻胆管引流可以有效地治疗阻塞性黄疸,促进胆汁排泄,降低LPS和IL-6。

**关键词:** 鼻胆管引流; 阻塞性黄疸; 茵虎利胆合剂; 联合治疗

谢沛霖, 吴志红, 田飞, 周大平, 龚昭, 周程. 茵虎利胆合剂配合鼻胆管引流治疗阻塞性黄疸30例. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2615-2620  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2615.asp>

## 0 引言

阻塞性黄疸(obstructive jaundice, OJ, 以下简称阻黄)是由于肝内毛细胆管、小胆管、肝胆管或胆总管的机械性狭窄或闭塞,导致胆汁不能通过胆管排入十二指肠反而流入血的一组常见疾病<sup>[1]</sup>。现多采用鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)及手术治疗,然而临床上阻黄的患者大多病程长、病情重、一般状况差,加之胆红素大量入血,不能及时排除,蓄积于体

内纤维结缔组织及肝、肾、脑等重要器官,单纯手术治疗疗效欠佳。我院2005-10/2006-06,采用ENBD+茵虎利胆合剂治疗阻黄,取得较好的疗效,现报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2005-10/2006-06在武汉市中西医结合医院肝胆腔镜外科诊断为阻黄的患者90例,其中男性46例,女性44例,平均58.4岁,胆管结石66例,壶腹肿瘤6例,Oddis括约肌炎性狭窄3例,胰头肿瘤8例,胆总管下段肿瘤7例,均排除内科黄疸性疾病。B超示胆总管扩张,平均1.2 cm。采用区组随机化的原则进行分组,并借助SPSS统计分析系统产生随机化方案,将90例受试者随机分成三组: A组(手术组)30例,行传统开放手术治疗; B组(内镜组)30例,行ENBD治疗; C组(实验组)30例,行ENBD+茵虎利胆合剂治疗。甘利欣针剂: 规格10 mL: 50 mg, 江苏正大天晴制药股份有限公司, 批号: DG1754; 茵虎利胆合剂由武汉市第一医院中药房提供; IL-6检测采用武汉博士德公司提供放免药盒测定; LPS检测采用武汉博士德公司提供的鳌试剂合检测。

### 1.2 方法

**1.2.1 西医诊断标准:** 目黄、身黄、尿黄, 或不伴腹痛症状; 实验室检查血清总胆红素TBIL $>17.1\ \mu\text{mol/L}$ , 血清直接胆红素DBIL $>6.8\ \mu\text{mol/L}$ ; 影像学检查(B超、CT、ERCP或MRCP)提示肝内外胆管扩张; 排除内科黄疸(病毒性肝炎和代谢性疾病等原因)<sup>[2]</sup>。中医诊断符合国家中医药管理局发布的《中医病证诊断疗效标准》关于黄疸诊断依据及黄疸湿证证候群<sup>[3]</sup>。排出标准: 内科黄疸性疾病; 病情极危重者; 合并消化道出血、禁食者。

**1.2.2 手术方法:** (1)手术组致病情况: 30例患者中胆总管结石22例、胰头肿瘤3例、胆总管肿瘤3例、壶腹肿瘤2例。手术方式: 胆总管结石者均行胆总管探查手术; 肿瘤性病变者中4例行胰十二指肠切除手术(Whipple手术), 余4例因缺乏手术条件行胆肠吻合手术。术后治疗: 术后给予甘利欣针150 mg+生理盐水250 mL静脉滴注1次/d $\times 14$  d。(2)内镜组致病情况: 30例患者中胆总管结石21例、胰头肿瘤2例、Oddis括约肌炎性狭窄1例、胆总管肿瘤3例、壶腹肿瘤3例。手术方式: 胆总管结石者均行内镜下网篮取石术+内镜下胆管括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)+内镜下ENBD; 肿瘤性病变者均行ENBD



表 1 三组患者T管、鼻胆管引流情况观察表 ( $n = 30$ , mean  $\pm$  SD, mL/d)

分组	术后5 d	术后7 d	术后10 d	术后14 d
A组	356.0 $\pm$ 54.61	410.0 $\pm$ 60.17	455.1 $\pm$ 58.50 <sup>ce</sup>	512.6 $\pm$ 67.89 <sup>cf</sup>
B组	346.8 $\pm$ 52.51	398.6 $\pm$ 60.08	453.5 $\pm$ 55.34	521.6 $\pm$ 58.50 <sup>cf</sup>
C组	446.2 $\pm$ 55.03 <sup>ab</sup>	512.7 $\pm$ 58.50 <sup>ab</sup>	565.5 $\pm$ 56.92 <sup>ab</sup>	632.3 $\pm$ 85.38 <sup>ace</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同期B组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 同期A组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 同组术后5 d; <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 同组术后7 d; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs 同组术后14 d.

术. 术后治疗: 术后给予甘利欣针150 mg+生理盐水250 mL静脉滴注1次/d  $\times$  14 d. (3)实验组致病情况: 30例患者中胆总管结石23例、胰头肿瘤3例、Oddis括约肌炎性狭窄2例、胆总管肿瘤1例、壶腹肿瘤1例. 手术方式: 胆总管结石者均行内镜下网篮取石术+EST+ENBD; 肿瘤性病变者均行ENBD术. 术后治疗: 术后第1天即给予茵虎利胆合剂, 100 mL/次, po或鼻饲, 2次/d  $\times$  14 d.

1.2.3 观察指标: 手术组、内镜组与实验组, 分别于术前1 d、术后7 d以及术后14 d晨空腹采外周静脉血5 mL, 测定血清AKP、GPT、GOT、TBIL、DBIL水平; 所有治疗组均于术前1 d以及术后14 d晨空腹采外周静脉血5 mL, 测定内毒素(LPS)、白细胞介素6(IL-6)水平; 所有治疗组均于术后5 d、术后7 d、术后10 d以及术后14 d观察并记录24 h T管或鼻胆管引流量.

1.2.4 疗效判定: 痊愈: 症状消失, 皮肤、巩膜黄染及体征消失, 肝功能恢复正常, 血清胆红素降至17  $\mu$ mol/L(10.0 mg/L)以下; 显效: 症状明显改善, 皮肤、巩膜黄染及体征大有好转, 血清胆红素降至25.5  $\mu$ mol/L(10.0-15.0 mg/L); 有效: 症状有所改善, 皮肤、巩膜黄染及体征好转, 血清胆红素降至25.6-34  $\mu$ mol/L(15.1-20.0 mg/L); 无效: 症状无改善, 体征、血清胆红素无变化, 甚或加重.

**统计学处理** 计数资料采用mean  $\pm$  SD表示, 各组数据采用SPSS13.0软件包进行分析检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

## 2 结果

2.1 三组患者T管、鼻胆管引流情况比较 术后5、7、10及14 d, C组与A组比较其胆汁引流显著增加( $P < 0.01$ ); C组与B组比较亦显著升高( $P < 0.05$ , 表1).

2.2 三组患者AKP、GPT、GOT、TBIL、DBIL、LPS、IL-6水平手术前后变化比较 术前三组患者血清各指标水平无明显差异; 术后14 d, C组与A组相比较GOT水平明显下降( $P < 0.05$ );

与B组比较亦有下降但无显著性差异( $P > 0.05$ ); 余等指标在术后14 d, C组与A、B组相比较均明显下降( $P < 0.05$ , 表2).

2.3 三组患者血清内毒素及白细胞介素6水平手术前后变化比较 术前三组患者血清各指标水平均无明显差异; 术后14 d, C组与A、B组比较两指标均明显偏低( $P < 0.01$ , 表3).

## 3 讨论

本文所探讨的阻塞性黄疸一般是指那些存在机械梗阻的原因使胆汁流出受阻而又需要外科治疗的肝内外胆管阻塞所致的黄疸<sup>[2]</sup>, 即通常所称之“外科黄”. 其致病原因大致上包括结石、肿瘤、炎症、寄生虫与先天性畸形等.

临床及实验研究表明, 在阻塞性黄疸发生过程中, 肝脏发生了微循环改变<sup>[4]</sup>、门静脉压力增高<sup>[5-6]</sup>等血流动力学障碍. 主要表现为门静脉血流量以及肝脏有效循环血量的减少<sup>[7-12]</sup>. 因此增加肝脏的循环血量则有助于肝功能的恢复<sup>[13-14]</sup>. 胆道引流对阻塞性黄疸的减黄作用十分明显, 且能使门静脉血流量增加, 门静脉压力下降<sup>[15]</sup>. 所以现在治疗以鼻胆管引流术或者单纯的外科开腹手术为主. 然而, 由于临床上阻黄的患者大多病程长、病情重、机体一般状况差, 加之胆红素大量入血, 不能及时排除, 胆色素与弹力纤维具有亲合性, 大量蓄积于体内纤维结缔组织及肝、肾、脑等器官, 严重影响了重要器官的功能. 对此现代医学目前尚无一套完整的针对阻塞性黄疸, 应用ERCP、EST、ENBD术前、术后等围手术期, 有效地退黄、护肝、解毒, 且时程短、恢复快、痛苦小的诊疗方案. 如何将先进的西方外科内镜技术与祖国传统医学相结合, 在ENBD解除了胆道梗阻问题的基础上, 再利用复方中药制剂保护肝细胞、促进胆汁排泄, 从而达到护肝、退黄、解毒之目的, 是极具意义的新课题.

我国医学大致上将阻黄统属于“黄疸”病

### ■应用要点

茵虎利胆合剂配合鼻胆管引流可以有效地治疗阻塞性黄疸, 促进胆汁排泄, 降低LPS和IL-6.

### ■同行评价

本研究设计周到, 结果清晰, 为临床应用提供依据, 但新颖性一般。

表 2 90例患者术前、术后7 d、术后14 d血清各项指标比较 (mean ± SD)

分组	术前	术后7 d	术后14 d
TBIL(μmol/L)			
A组	278.30 ± 90.12	104.20 ± 39.53 <sup>f</sup>	43.30 ± 9.49 <sup>fg</sup>
B组	284.50 ± 82.22	102.20 ± 28.46 <sup>f</sup>	46.70 ± 11.07 <sup>fh</sup>
C组	294.50 ± 90.10	67.40 ± 23.72 <sup>f</sup>	24.30 ± 7.91 <sup>acfh</sup>
DBIL(μmol/L)			
A组	216.30 ± 64.83	82.50 ± 26.88 <sup>f</sup>	32.20 ± 6.33 <sup>fh</sup>
B组	228.40 ± 69.57	80.30 ± 28.46 <sup>f</sup>	46.70 ± 11.07 <sup>fh</sup>
C组	242.10 ± 64.83	48.80 ± 22.14 <sup>f</sup>	12.60 ± 4.74 <sup>dfg</sup>
AKP(μ/L)			
A组	365.40 ± 142.30	224.60 ± 102.77	102.50 ± 36.37 <sup>fg</sup>
B组	381.30 ± 145.47	236.70 ± 99.61	114.90 ± 39.53 <sup>fg</sup>
C组	372.60 ± 158.11	174.30 ± 79.06 <sup>e</sup>	67.50 ± 25.30 <sup>cfg</sup>
GPT(μ/L)			
A组	244.50 ± 117.09	143.40 ± 79.06	79.00 ± 35.88 <sup>e</sup>
B组	216.60 ± 93.33	136.40 ± 71.15	82.30 ± 34.79 <sup>e</sup>
C组	207.30 ± 98.03	174.30 ± 79.06	36.80 ± 14.23 <sup>acfg</sup>
GOT(μ/L)			
A组	327.30 ± 158.11	162.40 ± 94.87	84.50 ± 34.79 <sup>e</sup>
B组	287.20 ± 126.49	146.10 ± 86.65	80.30 ± 31.62 <sup>f</sup>
C组	294.80 ± 143.88	108.90 ± 52.18 <sup>e</sup>	46.20 ± 11.07 <sup>afg</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 同期A组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs 同期B组; <sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*P*<0.01 vs 同组术前; <sup>g</sup>*P*<0.05, <sup>h</sup>*P*<0.01 vs 同组术后7 d.

表 3 90例胆黄患者手术前后LPS及IL-6水平变化 (mean ± SD)

分组	术前	术后14 d
LPS(EU/mL)		
A组	0.22 ± 0.04	0.12 ± 0.03 <sup>f</sup>
B组	0.23 ± 0.03	0.13 ± 0.03 <sup>f</sup>
C组	0.24 ± 0.04	0.07 ± 0.01 <sup>bdf</sup>
IL-6(ng/L)		
A组	318.4 ± 58.50	230.2 ± 41.08 <sup>e</sup>
B组	316.2 ± 63.25	225.6 ± 42.69 <sup>e</sup>
C组	296.3 ± 75.90	166.5 ± 31.62 <sup>acdf</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 同期A组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs 同期B组; <sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*P*<0.01 vs 同组术前.

的范畴, 认为其基本病机是湿浊阻滞, 胆汁不循常道外溢而发黄<sup>[16]</sup>. 其病因大致有感受时邪疫毒, 饮食所伤, 脾胃虚弱等. 在治疗原则上, 中医认为黄疸早期主要是湿热、疫毒为患, 故治疗上当以祛邪为法, 通过清热、利湿、解毒, 给邪以出路, 即所谓“治湿不利小便, 非其治也”, “诸病黄家, 但利其小便”<sup>[16]</sup>. 因其是“阻黄”, 在治疗时还需兼顾其瘀、毒、痰的特点, 治以

祛瘀、解毒、化痰为法, 正如关幼波所言: “治黄必治血, 血行黄易却”, “治黄需解毒, 毒解黄易除”, “治黄要治痰, 痰化黄易散”<sup>[17]</sup>.

本研究之茵虎利胆合剂源出于《伤寒论》中的茵陈蒿汤, 仲景曰<sup>[16]</sup>: “伤寒七八日, 身黄如橘子色, 小便不利, 腹微满者, 茵陈蒿汤主之”. 今有药理研究表明<sup>[18]</sup>, 茵陈蒿汤有抑制肝细胞凋亡及护肝利胆作用, 且对血小板聚集有抑制作用. 今茵虎利胆合剂方由茵陈、虎杖、大黄、生姜等四味中药组成, 方中茵陈<sup>[19]</sup>性味苦、微寒, 入脾胃、肝胆经. 本品苦能燥湿, 寒能清热, 故有清热利湿之功效. 历代文献记载他“主通身发黄、小便不利”, 为治黄疸要药. 因其具有苦泄下降, 清热利湿, 利胆退黄之功能, 为方中之君药. 有实验证明<sup>[20]</sup>茵陈蒿及金钟茵陈均能降低CCl<sub>4</sub>、小鼠血清GPT, 减轻肝细胞变性、坏死, 降低正常小鼠TC, 且毒副作用极小. 虎杖<sup>[19]</sup>性味微苦寒, 入肝、肺、胆经, 能清热、凉血、解毒, 活血通经, 又能清热利湿, 利胆退黄排石. 大黄<sup>[19]</sup>, 味苦寒, 归胃、肝、大肠经. 主下瘀血、血闭寒热、破症、积聚、留饮宿食, 荡涤肠胃, 推陈致新, 通利水谷, 调中化食, 安合五脏.

因其性苦寒, 降泄瘀热, 入血中破一切瘀血. 兼其气香故又入气, 少用之亦能调气, 治气郁作痛. 其力沉而不厚, 下一切疼痛积聚. 上述二药为方中之臣药. 生姜能和胃降逆<sup>[19]</sup>, 利水散结. 《神农本草经》, 《别录》有记其功用, 其说“主伤寒头痛鼻塞, 咳逆上气, 止呕吐”, 为方中之佐使. 全方共奏清热利湿、利胆退黄、散结导滞、化瘀祛痰通腑之功, 经临床长期观察对加快胆汁分泌、护肝降酶有确切疗效.

本研究选择临床常用肝功能指标作为评价指标: 血清总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)对90例不同病因阻塞性黄疸患者的肝功能进行评测. 研究表明: 所有阻黄病例血清中各项指标明显高于正常水平, 术后第14天(包括手术及内镜治疗), TBIL、DBIL、AKP、GPT、GOT较术前均显著下降( $P<0.01$ ), 且茵虎利胆合剂配合内镜治疗组明显低于手术及内镜对照组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 手术及内镜对照组间无显著性差异( $P>0.05$ ).

我们还动态观察并记录了阻黄患者术后14 d经鼻胆管或T管的胆汁日引流量, 结果证明随着胆道梗阻因素的去除, 三组患者术后胆汁引流量逐渐增加且术后14 d胆汁引流量明显高于术后5 d( $P<0.05$ ), 术后5 d始茵虎利胆合剂配合内镜治疗组日胆汁引流量明显高于手术及内镜对照组( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 而手术及内镜对照组间无显著性差异( $P>0.05$ ).

阻塞性黄疸时存在的内毒素血症(endotoxemia, ETM)是阻塞性黄疸患者出现高并发症及高死亡率的重要原因. 阻塞性黄疸时并发ETM有较高的发生率(24%-81%)<sup>[21-22]</sup>. 关于梗阻性黄疸ETM与全身免疫功能的研究<sup>[23]</sup>, 研究者认为内毒素是引起梗阻性黄疸免疫功能受抑的主要原因. 而且国内亦有研究表明阻塞性黄疸时内毒素血症与免疫功能状态密切相关<sup>[24]</sup>.

所以本研究选择了LPS以及IL-6作为观察指标. IL-6是一种具有多重生物功能的细胞因子, 也是急性期反应的重要调节因子, 他对估计创伤、炎症或内毒素介导的宿主反应有重要的评估作用. 近年来的文献较多地证实了受内毒素刺激后的Kupffer细胞及巨噬细胞在吞噬、化学趋化、细胞毒及代谢等功能方面均明显增强, 并可释放大量的介质参与肝细胞损伤, 如已知的IL-1、IL-2、IL-6、IL-12及TNF等等, 其中IL-6在肝损害中起到的作用越来越受到关注.

本研究实验结果表明: 术后14 d患者血清LPS及IL-6水平较术前明显下降( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 且茵虎利胆合剂配合内镜治疗组LPS( $0.07\pm0.01$  EU/mL)、IL-6( $166.5\pm31.62$   $\mu$ g/L)水平明显低于手术组LPS( $0.12\pm0.03$  EU/mL)、IL-6( $230.2\pm41.08$   $\mu$ g/L)及内镜组LPS( $0.13\pm0.03$  EU/mL)、IL-6( $225.6\pm42.69$   $\mu$ g/L)的对照组水平( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ). 茵虎利胆合剂配合ENBD在降低患者血清内毒素及IL-6水平上疗效优势明显.

然而由于临床上阻塞性黄疸的患者大多病程长、病情重、病因复杂、病种多, 故临床证候特征不单表现为中医之肝胆湿热证候群, 茵虎利胆合剂主要针对肝胆湿热型之阻黄, 而对如瘀血停滞之阻黄、寒湿阻遏之阻黄、脾虚血亏、本虚标实之阻黄等等, 还需要在临床实际中辨证施治, 或灵活加减, 不可一味应用茵虎利胆合剂, 从而丢掉祖国医学辨证施治、随证变法之灵魂! 即使是肝胆湿热之阻黄, 在应用茵虎利胆合剂配合鼻胆管引流术(ENBD)时, 亦需要注意利湿而不伤阴, 清热而不伤阳, 做到“中病即止”, “不可过于寒凉”.

#### 4 参考文献

- Baron RL, Stanley RJ, Lee JK, Koehler RE, Melson GL, Balfe DM, Weyman PJ. A prospective comparison of the evaluation of biliary obstruction using computed tomography and ultrasonography. *Radiology* 1982; 145: 91-98
- 黄洁夫. 腹部外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 177, 179
- 国家中医药管理局发布. 中医病证诊断疗效标准. 第1版. 南京: 南京大学出版社, 1994: 10
- Ito Y, Machen NW, Urbaschek R, McCuskey RS. Biliary obstruction exacerbates the hepatic microvascular inflammatory response to endotoxin. *Shock* 2000; 14: 599-604
- 马庆久, 褚延魁, 吴金生, 李端阳. 内皮素和降钙素基因相关肽与梗阻性黄疸大鼠门脉压力的关系. 第四军医大学学报 2000; 21: 841-843
- 郭善敏, 赵竞生, 熊成龙, 严际慎. 一氧化氮在梗阻性黄疸大鼠门静脉高压中的作用. 华中医学杂志 2000; 24: 27-28
- 石景森, 卢云, 艾红, 韩王月, 于跃利, 李国才. 梗阻性黄疸对肝脏血流动力学的影响. 世界华人消化杂志 1998; 6: 974-975
- 刘宪生, 钱家勤. 梗阻性黄疸兔血浆内毒素和内皮素1含量与血流动力学改变的关系. 中华实验外科杂志 1999; 16: 157-158
- 马桂英, 鲁豫, 藏义明. 应用二维彩色多普勒超声观测胆道梗阻与门脉血流动力学的变化. 临床医学影像杂志 1998; 9: 43-44
- 李红军, 王志如. 实验性梗阻性黄疸血浆内皮素1含量与肝血流动力学改变的关系. 山西医科大学学报 2000; 31: 201-202
- Mwanza T, Miyamoto T, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Ultrasonographic evaluation of portal vein hemodynamics in experimentally bile duct



- ligated dogs. *Jpn J Vet Res* 1998; 45: 199-206
- 12 Kulibaba DM, Tsvetkov EG, Mamedova MV, Novozhilov VN. [Splanchnic hemodynamics in acute cholecystitis and mechanical jaundice] *Vestn Khir Im I I Grek* 2000; 159: 25-27
- 13 Kigawa G, Nakano H, Kumada K, Kitamura N, Takeuchi S, Hatakeyama T, Yamaguchi M, Nagasaki H, Boudjema K, Jaeck D. Improvement of portal flow and hepatic microcirculatory tissue flow with N-acetylcysteine in dogs with obstructive jaundice produced by bile duct ligation. *Eur J Surg* 2000; 166: 77-84
- 14 Machiki Y, Nimura U, Kanda H, Uematsu T, Kitagawa YU, Kamiya S, Watanabe T. Effects of prostaglandin E1 on hepatic blood flow in conscious dogs with chronic biliary obstruction. *Eur Surg Res* 1998; 30: 115-124
- 15 石力, 田伏洲, 蔡志红, 赵碧. 胆道引流对梗阻性黄疸患者肝脏血流动力学的影响. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 845-846
- 16 王永炎. *中医内科学*. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 209, 211, 214
- 17 北京中医医院. *关幼波临床经验选*. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 24-27
- 18 潘竟铨, 刘惠纯. 茵陈蒿汤和茵陈药理研究近况及展望. *中成药* 1997; 19: 46
- 19 雷载权. *中药学*. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 31, 146-148
- 20 刘焱文, 陈树和. 金钟茵陈与茵陈蒿的药理作用比较. *中药材* 1994; 17: 38-40
- 21 Pain JA, Bailey ME. Measurement of operative plasma endotoxin levels in jaundiced and non-jaundiced patients. *Eur Surg Res* 1987; 19: 207-216
- 22 Ingoldby CJ, McPherson GA, Blumgart LH. Endotoxemia in human obstructive jaundice. Effect of polymyxin B. *Am J Surg* 1984; 147: 766-771
- 23 Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 478-485
- 24 张军, 刘玉河, 姜希宏, 徐克森. 梗阻性黄疸内毒素血症与细胞免疫功能的关系. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 305-306

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志计量单位标准

**本刊讯** 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d.  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$ . 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 $\text{CO}_2$ 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5%  $\text{CO}_2$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ ; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# 隔离灌注治疗肝癌药物选择现状与展望

叶 华, 陆才德, 郑四鸣

叶华, 陆才德, 郑四鸣, 宁波大学医学院附属李惠利医院肝胆胰外科 浙江省宁波市 315040

作者贡献分布: 叶华全部文献查阅及书写, 陆才德审核, 郑四鸣部分文献的查阅和文字核对.

通讯作者: 陆才德, 315040, 浙江省宁波市, 宁波大学医学院附属李惠利医院肝胆胰外科. lucaide@nbu.edu.cn

电话: 0574-87018598

收稿日期: 2008-06-12 修回日期: 2008-07-18

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

## Drug selection in isolated hepatic perfusion for nonresectable liver tumors: recent trends and perspectives

Hua Ye, Cai-De Lu, Si-Ming Zheng

Hua Ye, Cai-De Lu, Si-Ming Zheng, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Li Hui-Li Hospital Affiliated to Ningbo University Medical School, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Dr. Cai-De Lu, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Li Hui-Li Hospital Affiliated Ningbo University Medical School, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China. lucaide@nbu.edu.cn

Received: 2008-06-12 Revised: 2008-07-18

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

## Abstract

Isolated hepatic perfusion (IHP) involves a method of complete vascular isolation of the liver to take the advantage of directed intensive chemotherapy that has minimal systemic toxicity. Recent clinical studies mainly employed melphalan with or without tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), or with hyperthermia in IHP. The results of these studies showed that higher response rates and survival rates could be achieved by IHP than by traditional therapeutics for non-resectable liver tumors. In this article, we discussed the current status, recent developments and future perspectives of drug selection in IHP.

**Key Words:** Isolated hepatic perfusion; Liver tumor; 5-Fluorouracil; Melphalan; Tumor necrosis factor alpha

Ye H, Lu CD, Zheng SM. Drug selection in isolated hepatic perfusion for nonresectable liver tumors: recent trends and perspectives. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2621-2625

## 摘要

肝脏隔离灌注(isolated hepatic perfusion, IHP)是将肝脏血液循环和体循环完全隔离,用全身无法耐受的药物剂量对肝脏肿瘤进行灌注化疗的方法.近年临床研究肝脏隔离灌注化疗药物主要使用马法兰或马法兰联合肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及联合高温等,初步结果显示IHP较之传统疗法对不能切除的肝癌疗效有所提高.本文就目前肝脏隔离灌注中药物选择的现状及今后发展等进行综述.

**关键词:** 肝脏隔离灌注; 肝脏肿瘤; 5-氟尿嘧啶; 马法兰; 肿瘤坏死因子

叶华, 陆才德, 郑四鸣. 隔离灌注治疗肝癌药物选择现状与展望. *世界华人消化杂志* 2008; 16(23): 2621-2625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2621.asp>

## 0 引言

肝脏隔离灌注化疗(isolated hepatic perfusion, IHP)原理是将肝脏血液循环与体循环完全隔离而对肝脏肿瘤进行灌注化疗的新方法,主要应用于不能切除的原发性肝癌和各种类型的肝脏转移癌.该方法的最大特点就是可以大幅度提高药物的剂量,而通常情况下全身应用同等剂量或小于该剂量的药物可引起严重或致死的并发症. IHP向靶器官输送大剂量的细胞毒药物,尽管肿瘤与药物接触时间短,但是大剂量的细胞毒药物足以对肿瘤细胞造成有效杀伤,而对正常肝脏组织的损伤较少.近年随着肝脏隔离灌注治疗肝癌的动物和临床研究的进展,有较多的化疗药物应用于IHP,本文结合文献复习,综述国内外IHP中化疗药物选择应用的研究进展.

## 1 IHP研究中常用药物的选择

1.1 氟尿嘧啶类药物 5-FU是临床上肝癌最常用的化疗药物,属于细胞周期特异性抗代谢药,疗效呈给药时限依赖性.国外早在上世纪80年代和90年代初就已有5-FU应用于IHP动物和临床研

## ■背景资料

肝脏隔离灌注化疗(IHP)基本原理是通过手术将肝脏血流和体循环隔离一定的时间,在肝循环中持续灌注较常规剂量数倍甚至致死剂量的化疗药物,提高肿瘤负荷区药物浓度以达到治疗目的,同时避免药物进入体循环,不增加或减少化疗药物对全身和其他器官的毒副作用.

## ■同行评议者

于聪慧,教授,北京军区总医院肝胆外科;王蒙,副教授,中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

## ■应用要点

手术切除主要病灶加术中辅助隔离灌注化疗提高肿瘤负荷区药物浓度,减轻化疗药物对全身和其他器官的毒副作用,以及通过术后肝动脉灌注化疗预防术后复发,从而探索肝癌综合治疗的新方法。

究报道<sup>[1-2]</sup>, Aigner *et al*<sup>[1]</sup>对32位肝癌患者采用平均剂量为1000 mg的5-FU,在40℃温度下通过IHP治疗1 h,结果显示单独应用5-FU行IHP患者组的中位生存时间为8 mo,而5-FU/5-FU, 丝裂霉素行IHP+HAI(hepatic artery infusion, 肝动脉灌注化疗)患者组的中位生存时间为12 mo. 国内IHP的研究起步较晚,这方面的研究资料相对较少,邢雪 *et al*<sup>[3]</sup>对大鼠行IHP研究发现,大鼠IHP 5-FU的最大耐受剂量(MTD)为250 mg/kg,当5-FU剂量达到250 mg/kg以上时就出现肝细胞坏死征象,当5-FU剂量为500 mg/kg或以上时肝功能严重损害,肝实质发生片状梗死. de Brauw *et al*<sup>[2]</sup>的动物实验表明在相同5-FU剂量下, IHP比HAI的外周血中5-FU的浓度要低,肝组织中的5-FU浓度要高,但是肝脏肿瘤内的5-FU浓度并无显著差别. 肿瘤内的药物浓度高低直接决定肿瘤反应的强弱,该实验表明相同5-FU浓度下的IHP较之HAI在提高肿瘤内药物浓度方面没有优势. 以上研究结果表明由于受量-效曲线的限制, 5-FU并不适合应用于IHP.

1.2 烷化剂类药物 马法兰(melphalan)是一种烷化剂,属于细胞周期非特性药物. 马法兰的量-效曲线较陡,对结直肠癌治疗较有效,而且只要需要相对较短的暴露时间就有较好的抗肿瘤效应. 目前认为马法兰较适合应用于IHP治疗结直肠癌肝转移<sup>[4-5]</sup>. 传统静脉应用5-FU/亚叶酸碱基治疗结直肠癌肝转移总的肿瘤反应率只有20%,总体中位生存时间大约在12 mo<sup>[6]</sup>. Alexander *et al*<sup>[7-9]</sup>报道单独用马法兰(1.5-2.5 mg/kg)或马法兰(1.5 mg/kg)联合肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )行IHP,或者采用马法兰行IHP后,再行FUDR(Floxuridine, 氟脲嘧啶脱氧核苷)/亚叶酸的HAI治疗,肿瘤反应率可提高至74%,中位生存时间达27 mo;治疗黑色素瘤肝转移的反应率达62%,中位生存时间达12 mo. van Iersel *et al*<sup>[10]</sup>近来对200 mg剂量的马法兰用于IHP来治疗154例大肠癌肝转移的预后分析中显示总体中位生存时间为24.8 mo,并且显示一些辅助的化疗治疗能改善生存时间. Mocellin *et al*<sup>[11]</sup>对20名肝功能还尚正常,正常肝组织被肿瘤平均侵袭了50%,手术无法切除,且至少曾用一种其他办法治疗过而失败的转移性肝癌患者行单用马法兰(1.5 mg/kg)IHP治疗,结果显示3名患者(15%)死于严重肝衰,6名患者有一过性的明显肝毒性,总体肿瘤反应率为70%. 上述结果表明大剂量马法兰行IHP来治疗其他

方法治疗失败的肝癌有一定疗效,但是大剂量马法兰对肝脏的毒性也是很明显的. 研究如何减少正常肝脏组织对药物的摄取,增加肿瘤区药物的浓度,可能是减少肝毒性的办法.

1.3 其他药物 丝裂霉素和顺铂早已被应用于IHP的研究,大剂量的丝裂霉素能导致严重的肝内静脉阻塞等并发症,有顺铂的药物动力学研究试验报道顺铂的短效高浓度注射没有持续的低浓度注射的抗癌效果好;且以上两种化疗药在IHP中疗效都不是很显著,故并不太适合用于IHP<sup>[12-14]</sup>.

## 2 提高马法兰(melphalan)药物效应的方法

2.1 TNF- $\alpha$  马法兰联合TNF- $\alpha$ 应用于IHP已有不少报道<sup>[7-9]</sup>. 对TNF- $\alpha$ 诱导抗肿瘤的机制目前一些学者认为可能是由于肿瘤血管内皮细胞比正常血管内皮细胞上的TNFR-1表达量多, TNF- $\alpha$ 通过与TNFR-1结合后就依附在血管内皮上,促进了血管内皮细胞的凋亡导致血管的通透性增加. 由于肿瘤血管内皮细胞上TNFR-1表达浓度远大于正常血管内皮细胞上的TNFR-1,所以TNF- $\alpha$ 对正常血管内皮细胞影响很小. 肿瘤血管的通透性增加,随之和TNF- $\alpha$ 联合应用的化疗药物进入肿瘤,发挥了抗癌作用<sup>[15]</sup>. van Etten *et al*<sup>[16]</sup>在大鼠身上进行了TNF- $\alpha$ 和马法兰在IHP中是否有协同效应的动物实验,实验结果显示在软组织肉瘤组别的大鼠中, TNF- $\alpha$ 对马法兰有增强肿瘤反应作用,但是对结直肠癌肝转移组别的大鼠, TNF- $\alpha$ 对马法兰的协同作用却较少. 过去的动物实验研究<sup>[17]</sup>和临床研究<sup>[18]</sup>都表明,在肢体隔离灌注(isolated limb perfusion, ILP)中TNF- $\alpha$ 能增强马法兰治疗软组织肉瘤和转移性的恶性黑色素瘤的疗效,使得TNF- $\alpha$ 联合马法兰行ILP治疗软组织肉瘤和转移性的恶性黑色素瘤已经被接受. 近年美国有肿瘤外科医生对133名局限于肢体的高度恶性黑色素瘤患者行ILP治疗的临床随机对照研究试验并随访3 mo,结果显示TNF- $\alpha$ 和马法兰联用的疗效并不比单独用马法兰疗效较好,反而带来更多的并发症,但是由于随访时间有限并不能完全表明马法兰和TNF- $\alpha$ 没有协同作用<sup>[19]</sup>. 今后在IHP中TNF- $\alpha$ 对马法兰治疗肿瘤是否有协同作用有待进一步研究发展.

2.2 高温 高温能增强马法兰的抗肿瘤疗效认为可能是高温增加肿瘤局部血流量,细胞膜的通透性和药物吸收量增加,还有可能是高温使



DNA修复效率减低<sup>[20]</sup>. 也有研究认为高温灌注肝脏能诱导免疫细胞对肝脏肿瘤细胞的免疫反应<sup>[21]</sup>. 高温联合马法兰应用于IHP治疗肝癌已被用于临床研究, 温度一般是39-40℃, 但是动物实验表明使马法兰发挥最佳抗癌疗效的温度是41.5℃<sup>[7,9,22]</sup>. Pilati *et al*<sup>[23]</sup>已在动物实验中证实马法兰在42℃和40℃温度之间进行IHP对肝脏的毒副作用无显著差异, 以上的研究结果为今后进一步的动物和临床试验来确定在体内能使马法兰发挥最大的疗效以及肝脏所能耐受的最高限度的灌注温度而提供了实验依据.

**2.3 其他因素** 有IHP的动物实验研究显示组胺也能增强马法兰的抗癌疗效<sup>[24]</sup>. 目前有肢体隔离灌注(ILP)的动物实验研究报道IL-2增强马法兰的治疗肿瘤效果不比TNF- $\alpha$ 差, 而且对肝脏和全身的副作用要比TNF- $\alpha$ 引起的轻很多, 所以IL-2是替代TNF- $\alpha$ , 联合马法兰进行IHP研究的潜在良好生物制剂<sup>[25]</sup>.

### 3 可能应用于IHP的一些新药物

前面提到的化疗药物(如5-FU<sup>[1-3]</sup>, 裂霉素<sup>[12]</sup>, 顺铂<sup>[13]</sup>, 马法兰<sup>[7-11]</sup>等)已经被用于IHP的临床研究, 过去10余年研究最多的是马法兰, 尽管有不少让人鼓舞的研究结果, 但是马法兰仍然存在很多不足如疗效有限, 肝脏毒性大等. 因此, 应该筛选出一些抗癌效率更高, 安全性更好的新药物或者一些其他生物制剂来用于IHP的研究. 用于IHP理想药物需要满足作用瞬间短效, 不可逆的杀死肿瘤细胞. 下面介绍一些可能用于IHP试验研究的药物和生物制剂.

**3.1 草酸铂(L-OHP, oxaliplatin, 奥沙利铂)** 草酸铂是第三代铂类化合物其抗癌作用及毒副作用较顺铂有着一定的优势, 与DNA结合速率比顺铂快10倍以上, 而且结合更牢固, 有更强的细胞毒性, 具有肿瘤细胞吸收快, 体内生物转换迅速而不需要酶分解催化<sup>[26]</sup>. 草酸铂与其他铂类有相似之处, 即均以DNA为靶作用部位, 铂原子与DNA链形成交联, 阻断DNA的复制与转录, 而且大部分交联在1 h之内完成<sup>[27]</sup>. 草酸铂全身用药剂量限制的常见原因是骨髓抑制, 对寒冷敏感的肢(趾)端感觉异常, 以及外周神经毒性等毒副作用, 但是肝脏毒性很少提到, 并且近来Synold *et al*<sup>[28]</sup>研究发现大剂量草酸铂全身静脉化疗对患者肝脏毒性影响甚小, 这些提示草酸铂可能适合应用于IHP治疗肝脏转移癌的新药.

**3.2 三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 亚砷酸)** 三氧化二砷是中国传统中药砒霜的主要成分, 我国学者应用

三氧化二砷治疗急性早幼粒性白细胞取得了显著的临床效果. 目前三氧化二砷已经应用于消化系统实体癌的研究, 其中对肝癌作用的研究最广泛. 刘连新 *et al*<sup>[29]</sup>研究显示, 三氧化二砷可明显抑制肝癌细胞的生长, 其机制主要是诱导肝癌细胞凋亡, 而凋亡的可能机制是通过半胱氨酸蛋白酶-3起作用, 作用位点是在酶的前体水平, 其临床应用显示三氧化二砷是一种相对低毒安全的药物, 而且连续区域化疗对不能手术的原发性肝癌有很好的治疗效果. 近来有体外实验表明三氧化二砷具有体外逆转人肝癌细胞多药耐药性的作用, 这个可能与下调MDR1表达、增强细胞内药物积累有关<sup>[30]</sup>. 有动物实验表明大剂量三氧化二砷对肝癌细胞有抑制细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡以及抗肿瘤新生血管的作用<sup>[31]</sup>. Lew *et al*<sup>[32]</sup>用三氧化二砷(10 mg/kg, 0.5 g/L)从血液灌注由甲基胆蒽诱导生成纤维肉瘤的大鼠, 结果肿瘤组织血管优先关闭, 致肿瘤中心组织大量坏死, 对皮肤、肌肉、肾脏无明显影响. 目前临床上用三氧化二砷治疗肝癌给药的途径主要有全身静脉给药, 肝动脉化疗栓塞术(transcatheterarterialchemoembolization, TACE), 连续区域肝动脉灌注化疗等, 朱安龙 *et al*<sup>[33]</sup>对17例不适合手术治疗的肝癌患者, 经微泵给予三氧化二砷连续区域化疗(20 mg/d, 连续5 d). 结果发现给予4个疗程后, 6例肿瘤体积缩小50%以上, 无新发病灶出现; 8例缩小10%-49%, 1例无变化, 2例肿瘤体积增大25%以上. 15例食欲改善, 10例体重增加. 7例AFP下降或降至正常. 14例肝区疼痛或不适减轻或消失. 说明应用三氧化二砷连续区域化疗具有一定治疗价值, 具有毒副作用低, 疗效确切的优点. 吴楠 *et al*<sup>[34]</sup>对三氧化二砷静脉滴注对人体毒副作用进行了系统的观察, 发现主要的副作用为轻度头痛, 头晕及手足麻木, 感觉减退, 肌无力等中枢及周围神经系统症状; 肝功能有改变, 慢性肝炎、肝硬化者有砷蓄积; 有食欲减退、轻度腹泻、心悸、胸闷、心动过速等症状; 其他还有水钠潴留, 皮肤黏膜等改变不良现象; 治疗停药后三氧化二砷在毛发中有一定的蓄积性. 但是治疗剂量的静脉滴注多为轻度的一过性改变, 未见急性中毒现象. 综合以上研究显示三氧化二砷可以考虑应用于IHP的实验研究.

**3.3 肿瘤靶向治疗药物** 近年来随着分子生物学的发展和相关技术的应用, 肿瘤基因标志物不断被发现, 为更加特异的分子靶向治疗提供了基础, 从而设计筛选出不少新的以导致肿瘤发

#### ■同行评价

本文内容有一定的可读性, 同时是目前肝脏肿瘤有效治疗方法较少的情况下, 较新颖的一种探索方法, 有一定的科学性、创新性和可读性.

生的基因产物作为靶分子的治疗用药物。以表皮细胞生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)为靶点的单克隆抗癌药艾比特思(Cetuximab, C-225, Erbitux)和以血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)为靶点的单克隆抗癌药贝伐单抗(Bevacizumab, Avastin)被证明用来治疗肝癌和结直肠癌肝转移瘤是有效的<sup>[35-36]</sup>, 此类单克隆抗癌药的特异性高有望今后应用IHP的研究来提高治疗肝癌的效率。近年来探索的肿瘤基因-病毒治疗利用肿瘤增殖病毒在肿瘤细胞特异性增殖从而靶向肿瘤, 高效表达抗肿瘤基因其疗效好于单一的肿瘤增殖病毒治疗或传统的肿瘤基因治疗, 刘新恒 *et al* 倡导的“癌症的靶向双基因-病毒治疗”策略, 用ZD55-TRAIL和ZD55-K5相结合, 观察其抗癌作用, 结果显示: 他能消灭所有小鼠的移植性肿瘤<sup>[37-38]</sup>。目前已有报道<sup>[39]</sup>靶向肿瘤基因-病毒治疗肝脏肿瘤的模式已经在IHP中建立, 这为下步的靶向肿瘤基因-病毒治疗肝癌在IHP的应用提供了实验基础。

#### 4 结论

隔离灌注治疗肝癌在过去的研究中尽管取得不少的成果, 但是在总体上还是处于临床前期试验研究阶段, 有许多的课题有待解决。如由于受灌注时间、量和次数限制, 需要今后的研究中发现不仅要求对肝脏毒性小或无以及良好的量-效曲线, 更要求能在短在时间内直接杀死肿瘤细胞, 且具有单次灌注后较持久的后续抗癌效应, 最好还能调变多药耐药基因的药物。相信今后发现一种理想的新药和IHP的微创重复使用是决定IHP能否在临床中广泛使用关键所在。

#### 5 参考文献

- Aigner KR, Walther H, Tonn JC, Link KH, Schoch P, Schwemmle K. [Isolated liver perfusion in advanced metastases of colorectal cancers] *Onkologie* 1984; 7: 13-21
- de Brauw LM, Marinelli A, van de Velde CJ, Hermans J, Tjaden UR, Erkelens C, de Bruijn EA. Pharmacological evaluation of experimental isolated liver perfusion and hepatic artery infusion with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1991; 51: 1694-1700
- 邢雪, 夏穗生. 大鼠肝脏隔离灌注大剂量5-氟尿嘧啶的病理学研究. *同济医科大学学报* 1997; 26: 365
- Rothbarth J, Vahrmeijer AL, Mulder GJ. Modulation of cytostatic efficacy of melphalan by glutathione: mechanisms and efficacy. *Chem Biol Interact* 2002; 140: 93-107
- Rothbarth J, Woutersen RA, Sparidans RW, van de Velde CJ, Mulder GJ. Melphalan antitumor efficacy and hepatotoxicity: the effect of variable infusion duration in the hepatic artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 1098-1103
- Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group In Cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 301-308
- Alexander HR Jr, Bartlett DL, Libutti SK, Fraker DL, Moser T, Rosenberg SA. Isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for unresectable cancers confined to the liver. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1479-1489
- Bartlett DL, Libutti SK, Figg WD, Fraker DL, Alexander HR. Isolated hepatic perfusion for unresectable hepatic metastases from colorectal cancer. *Surgery* 2001; 129: 176-187
- Alexander HR, Libutti SK, Bartlett DL, Puhlmann M, Fraker DL, Bachenheimer LC. A phase I-II study of isolated hepatic perfusion using melphalan with or without tumor necrosis factor for patients with ocular melanoma metastatic to liver. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3062-3070
- van Iersel LB, Gelderblom H, Vahrmeijer AL, van Persijn van Meerten EL, Tijn FG, Putter H, Hartgrink HH, Kuppen PJ, Nortier JW, Tollenaar RA, van de Velde CJ. Isolated hepatic melphalan perfusion of colorectal liver metastases: outcome and prognostic factors in 154 patients. *Ann Oncol* 2008; 19: 1127-1134
- Mocellin S, Pilati P, Da Pian P, Forlin M, Corazzina S, Rossi CR, Innocente F, Ori C, Casara D, Ujka F, Nitti D, Lise M. Correlation between melphalan pharmacokinetics and hepatic toxicity following hyperthermic isolated liver perfusion for unresectable metastatic disease. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 802-809
- Oldhafer KJ, Frerker MK, Lang H, Fauler J, Flemming P, Schmoll E, Nadalin S, Moreno L, Pichlmayr R. High-dose mitomycin C in isolated hyperthermic liver perfusion for unresectable liver metastases. *J Invest Surg* 1998; 11: 393-400
- Hafström LR, Holmberg SB, Naredi PL, Lindnér PG, Bengtsson A, Tidebrant G, Scherstén TS. Isolated hyperthermic liver perfusion with chemotherapy for liver malignancy. *Surg Oncol* 1994; 3: 103-108
- Ikeda K, Terashima M, Kawamura H, Takiyama I, Koeda K, Takagane A, Sato N, Ishida K, Iwaya T, Maesawa C, Yoshinari H, Saito K. Pharmacokinetics of cisplatin in combined cisplatin and 5-fluorouracil therapy: a comparative study of three different schedules of cisplatin administration. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 168-175
- van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 2006; 11: 397-408
- van Etten B, de Vries MR, van IJken MG, Lans TE, Guetens G, Ambagtsheer G, van Tiel ST, de Boeck G, de Bruijn EA, Eggermont AM, ten Hagen TL. Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion. *Br J Cancer* 2003; 88: 314-319
- Manusama ER, Nooijen PT, Stavast J, Durante NM, Marquet RL, Eggermont AM. Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. *Br J Surg* 1996; 83: 551-555
- Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Lienard D, Kroon BB, van Geel AN, Hoekstra HJ, Lejeune

- FJ. Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon- $\gamma$  and melphalan for nonresectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2653-2665
- 19 Cornett WR, McCall LM, Petersen RP, Ross MI, Briele HA, Noyes RD, Sussman JJ, Kraybill WG, Kane JM 3rd, Alexander HR, Lee JE, Mansfield PF, Pingpank JF, Winchester DJ, White RL Jr, Chadaram V, Herndon JE 2nd, Fraker DL, Tyler DS. Randomized multicenter trial of hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan alone compared with melphalan plus tumor necrosis factor: American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0020. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4196-4201
- 20 Mohamed F, Marchettini P, Stuart OA, Urano M, Sugarbaker PH. Thermal enhancement of new chemotherapeutic agents at moderate hyperthermia. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 463-468
- 21 Kida Y, Tsuji-Kawahara S, Ostapenko V, Kinoshita S, Kajiwarra E, Kawabata H, Yuasa T, Nishide I, Yukawa S, Ichinose M, Miyazawa M. Increased liver temperature efficiently augments human cellular immune response: T-cell activation and possible monocyte translocation. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1459-1469
- 22 Mohamed F, Stuart OA, Glehen O, Urano M, Sugarbaker PH. Optimizing the factors which modify thermal enhancement of melphalan in a spontaneous murine tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 719-724
- 23 Pilati P, Mocellin S, Rossi CR, Ori C, Innocente F, Scalera R, Ceccherini M, Da Pian PP, Nitti D, Lise M. True versus mild hyperthermia during isolated hepatic perfusion: effects on melphalan pharmacokinetics and liver function. *World J Surg* 2004; 28: 775-781
- 24 Brunstein F, Eggermont AM, de Wiel-Ambagtsheer G, van Tiel ST, Rens J, ten Hagen TL. Synergistic antitumor effects of histamine plus melphalan in isolated hepatic perfusion for liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 795-801
- 25 Hoving S, Brunstein F, van de Wiel-Ambagtsheer G, van Tiel ST, de Boeck G, de Bruijn EA, Eggermont AM, ten Hagen TL. Synergistic antitumor response of interleukin 2 with melphalan in isolated limb perfusion in soft tissue sarcoma-bearing rats. *Cancer Res* 2005; 65: 4300-4308
- 26 Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1205-1218
- 27 Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998; 25: 4-12
- 28 Synold TW, Takimoto CH, Doroshow JH, Gandara D, Mani S, Remick SC, Mulkerin DL, Hamilton A, Sharma S, Ramanathan RK, Lenz HJ, Graham M, Longmate J, Kaufman BM, Ivy P. Dose-escalating and pharmacologic study of oxaliplatin in adult cancer patients with impaired hepatic function: a National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group study. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3660-3666
- 29 刘连新, 朱安龙, 陈炜, 郭化鑫, 王秀琴, 刘芝华, 张亭栋, 姜洪池, 吴旻. 三氧化二砷对原发性肝癌的作用及其机理研究. *中华外科杂志* 2005; 43: 33-36
- 30 李贺, 熊茂明, 孟翔凌, 耿小平. 三氧化二砷逆转肝癌细胞株HepG2/ADM多药耐药的作用. *世界消化华人杂志* 2006; 14: 2691-2694
- 31 Liu B, Pan S, Dong X, Qiao H, Jiang H, Krissansen GW, Sun X. Opposing effects of arsenic trioxide on hepatocellular carcinomas in mice. *Cancer Sci* 2006; 97: 675-681
- 32 Lew YS, Brown SL, Griffin RJ, Song CW, Kim JH. Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid murine tumors by vascular shutdown. *Cancer Res* 1999; 59: 6033-6037
- 33 朱安龙, 刘连新, 朴大勋, 姜洪池. 应用三氧化二砷连续区域化疗治疗肝癌. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 147-149
- 34 吴楠, 胡龙虎, 周晋, 范圣瑾, 王艳, 韩雪英. 三氧化二砷注射液对人体的不良反应分级及其防治对策. *中华内科杂志* 2006; 45: 310-313
- 35 Asnacios A, Fartoux L, Romano O, Tesmoingt C, Louafi S S, Mansoubakht T, Artru P, Poynard T, Rosmorduc O, Hebbard M, Taieb J. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter phase 2 study. *Cancer* 2008; 112: 2733-2739
- 36 Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB 3rd. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1539-1544
- 37 刘新垣, 顾锦法. 癌症的靶向基因-病毒治疗新进展及抗癌策略. *癌症* 2006; 25: 1320-1322
- 38 Liu XY, Qiu SB, Zou WG, Pei ZF, Gu JF, Luo CX, Ruan HM, Chen Y, Qi YP, Qian C. Effective gene-virotherapy for complete eradication of tumor mediated by the combination of hTRAIL (TNFSF10) and plasminogen k5. *Mol Ther* 2005; 11: 531-541
- 39 Fujita S, Eguchi A, Okabe J, Harada A, Sasaki K, Ogiwara N, Inoue Y, Ito T, Matsuda H, Kataoka K, Kato A, Hasegawa M, Nakanishi M. Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1728-1734

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



# 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体与肝细胞凋亡的相关性

曹丽丽, 李幼平

## ■背景资料

TRAIL是肿瘤坏死因子家族新成员, 参与多种肝脏病理过程. 本文就TRAIL/死亡受体途径的特性、致凋亡的机制及其在多种疾病中肝细胞凋亡中的作用作一综述, 希望对明确发病机理及针对关键环节予以干预有所帮助.

曹丽丽, 四川大学华西第二医院 四川省成都市 610040  
李幼平, 四川大学华西医院移植免疫与移植工程学实验室  
四川省成都市 610040  
作者贡献分布: 本文由曹丽丽设计及执笔, 李幼平指导下完成.  
通讯作者: 曹丽丽, 610040, 四川省成都市, 四川大学华西第二医院. lurex50@hotmail.com  
电话: 028-80308050  
收稿日期: 2008-04-17 修回日期: 2008-07-24  
接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-08-18

## Relationship between tumor necrosis factor related apoptosis induced ligand and hepatocyte apoptosis

Li-Li Cao, You-Ping Li

Li-Li Cao, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610040, Sichuan Province, China  
You-Ping Li, Lab of Transplant Engineering and Immunology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610040, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Li-Li Cao, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610040, Sichuan Province, China. lurex50@hotmail.com  
Received: 2008-04-17 Revised: 2008-07-24  
Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-08-18

## Abstract

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (Apo2L/TRAIL) is a member of the tumor necrosis factor gene superfamily that induces apoptosis through engagement of death receptors (DRs). Recent studies have clarified that TRAIL/DR pathway was involved in severe liver diseases. In this review, we focus on the apoptosis signaling pathways stimulated by Apo2L/TRAIL and summarise its relationship with apoptosis of hepatocytes.

Key Words: Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand; Apoptosis; Hepatocyte

Cao LL, Li YP. Relationship between tumor necrosis factor related apoptosis induced ligand and hepatocyte apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2626-2630

## 摘要

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体是TNF家

族成员之一, 通过其死亡受体诱导凋亡. 研究显示TRAIL/死亡受体途径参与多种肝脏病理过程, 本文就TRAIL/死亡受体途径的特性、致凋亡的机制及与肝细胞凋亡关系的最新进展作一综述.

关键词: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 凋亡; 肝细胞

曹丽丽, 李幼平. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体与肝细胞凋亡的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2626-2630  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2626.asp>

## 0 引言

肝细胞凋亡是多种肝脏疾病的共同病理表现, 明确肝细胞凋亡的机制及其在疾病发生发展中的作用, 有助于进一步寻求潜在的治疗方法, 具有重要意义. 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis induced ligand, TRAIL)是近年来发现的肿瘤坏死因子家族新成员, 能快速诱导不同种类的转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞凋亡. 并且在多种肝脏疾病中参与诱导肝细胞凋亡. 本文就TRAIL/死亡受体途径与肝脏损伤的相关性作一综述.

## 1 TRAIL/死亡受体途径

TRAIL又称凋亡素2配体(apo2 ligand, Apo2L), 属II型跨膜蛋白. 最早由Wiley *et al*<sup>[1]</sup>在1995年从表达序列标签库(expressed sequenced tag, EST)中发现、克隆并命名. 其氨基酸序列具有TNF超家族的结构特征. TRAIL最重要的生物学特点是选择性细胞毒作用<sup>[2]</sup>, 即能够诱导肿瘤细胞、病毒感染细胞或转化细胞发生凋亡, 但对绝大多数正常细胞无此作用. TRAIL表达广泛, 如人外周血淋巴细胞、单核细胞、肺、脾脏、前列腺、卵巢、小肠、结肠和胎盘等有表达, 但脑、肝和睾丸无表达. TRAIL对正常生理状态下的机体组织没有毒性, 病理状态下被激活参与机体的免疫反应, 被认为是机体的一个典型的免疫监视分子.

## ■同行评议者

邱双健, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝病研究所、肝肿瘤外科

TRAIL另一个重要特征是诱导凋亡具有种属特异性<sup>[3]</sup>, 重组人TRAIL蛋白能够诱导人类肝细胞大量凋亡, 而对小鼠和非人类灵长目正常组织及器官无明显毒性作用。

TRAIL通过特异性地与靶细胞表面的受体结合发挥作用。TRAIL组织学分布的广泛性和选择性细胞毒作用, 暗示其诱导细胞凋亡是通过严格的受体表达来调控<sup>[4-5]</sup>。目前已发现TRAIL的受体有5种: 二种死亡受体DR4和DR5、二种诱骗受体DcR1、DcR2及可溶性受体骨保护素(osteoprotegerin, OPG)<sup>[6]</sup>。DR4和DR5含有细胞质死亡区域(death domain, DD)通过caspase依赖的信号途径凋亡。DcR1和DcR2胞内缺乏功能性死亡域, 与TRAIL结合后不介导凋亡, 故又称为诱骗受体, 其过度表达能够阻止TRAIL诱导细胞凋亡。以上4个受体的胞外区域有高度同源性。第5种受体是OPG, 作为诱骗受体也能够阻止TRAIL诱导的凋亡。受体的正常表达与否, 是TRAIL诱导凋亡的关键调节因素。死亡受体DR4、DR5通过其胞外区与TRAIL结合并活化后, 其胞内的死亡结构域相互聚集, 并进一步募集接头蛋白。接头蛋白接收到死亡受体传递的凋亡信号后, 引起胞内caspase的前体(即procaspase)在其末端的局部募集和串联结合, 从而形成“TRAIL-DR4、DR5-接头蛋白-Procaspase分子”大分子复合体, 即凋亡酶体(apotosome)。而后分子中的procaspase通过自身水解而成为有活性的caspase, 并进一步激活caspase级联反应, 启动凋亡。

## 2 TRAIL/死亡受体途径与肝细胞凋亡

细胞凋亡以DNA发生特异性降解, 形态上出现核固缩、胞膜发泡和凋亡小体为特征。以往研究显示TRAIL/死亡受体途径参与多种肝脏损伤过程, 下面着重介绍TRAIL在各种肝脏病理损伤中的作用。

**2.1 TRAIL与病毒性肝炎** TRAIL及其死亡受体可以特异地杀伤病毒感染的肝细胞, 而体内未感染病毒的肝细胞仍对TRAIL诱导的凋亡耐受。Mundt *et al*<sup>[7-8]</sup>利用病毒性肝炎的小鼠模型和肝炎患者的病理标本发现, 慢性丙肝患者的肝脏上TRAIL表达增高, 而急性肝炎病毒感染使肝细胞DR5表达上调。病毒感染后的肝脏中TRAIL的高表达不依赖于淋巴细胞或NK细胞, 提示TRAIL可能是机体通过肝细胞旁分泌的方式对抗病毒感染。Harry *et al*<sup>[9]</sup>研究提示, 人肝

细胞感染HBV后, 细胞内HBV复制水平增加, TRAIL诱导凋亡作用随之增强, 这种作用部分依赖于死亡受体表达的上调。另有研究者<sup>[10-11]</sup>发现HBV转基因鼠的肝炎和肝细胞死亡可以被一种可溶性的TRAIL受体通过拮抗TRAIL的功能而抑制。sDR5能够通过阻断TRAIL诱导的HBV感染的肝细胞的凋亡从而缓解肝脏损伤<sup>[12]</sup>。肝炎病毒感染后组织TRAIL及其受体表达增高、可溶性TRAIL受体对肝脏损伤的拮抗作用从两方面说明了TRAIL/死亡受体途径在病毒性肝炎造成的肝细胞凋亡中发挥重要作用。Bax蛋白和HBX蛋白在TRAIL诱导的凋亡中有重要作用。在肝癌细胞转染HBV或HBX能明显提高细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性, 这与Bax蛋白的表达的明显上调相关。应用RNA干扰技术敲除Bax, 可以阻断HBV诱导的肝炎和肝细胞凋亡<sup>[10]</sup>。HBX能够以剂量依赖的形式增加HepG2细胞的TRAIL的表达和mRNA转录。HBX转染的HepG2细胞通过TRAIL介导的形式杀伤原代人肝细胞。

总之, HBV感染机体后, 激活机体的免疫监视功能, 众多免疫分子参与清除HBV感染细胞。TRAIL对于HBV感染来说是一把双刃剑。一方面HBV激活TRAIL的表达, TRAIL作为机体的一个有效的免疫监视分子, 及时清除突变细胞和转化细胞; 另一方面, TRAIL在杀伤靶细胞的同时也有可能进一步加剧肝脏的损伤<sup>[12]</sup>。

**2.2 TRAIL与酒精性肝病** 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是因长期过量饮酒引起的中毒性肝脏疾病。给大鼠长期喂饲酒精, 肝细胞凋亡比例会明显增加, 且主要集中在肝小叶中央静脉末端的周围, 这些病变在终止酒精给予后可逆。临床各期的酒精性肝病患者活检标本均发现细胞凋亡<sup>[13]</sup>。既往研究显示, ALD引起的肝细胞凋亡与可溶性TNF- $\alpha$ 及细胞毒性T细胞的膜性TNF- $\beta$ 有关, 他通过与TNF受体1、2结合后诱导细胞凋亡。另外, 酒精性肝炎患者的肝脏Fas受体表达阳性, 且肝细胞FasL表达增强<sup>[14]</sup>。而细胞毒性T淋巴细胞也可以通过Fas受体-配体相互作用, 促进肝细胞凋亡<sup>[15]</sup>。近期研究显示, TRAIL/死亡受体途径也参与了ALD引起的肝脏病理损伤。Mundt研究提示<sup>[7]</sup>, 酒精摄入后鼠肝TRAIL表达上调且出现脂肪变性, 这个过程可以被TRAIL的拮抗剂所阻断。TRAIL引起的凋亡和脂肪变性可能是病毒感染和酒精摄入后单独调节的结果。TRAIL是酒精摄入后肝脏脂肪变性和

### ■研发前沿

近年研究者发现TRAIL及相关配体在肝脏肿瘤、病毒性肝炎、酒精性肝炎等多种肝脏病理组织中表达升高。该途径还参与缺血再灌注损伤及肝移植排斥反应。但是该途径在这些疾病中的确切作用机制及其与其他途径之间的联系有待进一步研究。

## ■创新盘点

首次对TRAIL/死亡受体途径参与多种肝脏疾病加以综述。

凋亡的新的调节因子。

**2.3 TRAIL与胆源性肝损伤** 胆道梗阻引起肝细胞分泌及排泄胆汁发生障碍,肝细胞内外胆汁浓度升高。体外实验表现,胆红素与胆汁酸可使鼠肝细胞发生凋亡且呈浓度依赖与时间依赖效应<sup>[16]</sup>。尽管已明确Fas/FasL在胆酸的细胞毒性作用中起重要作用,研究显示其他死亡受体途径也参与其中。Hajime *et al*<sup>[16]</sup>应用Fas缺失的细胞HuH-7发现胆酸诱导的细胞凋亡呈时间和浓度依赖。通过转染显性负相FADD可以缓解细胞凋亡和线粒体细胞色素C的释放。RT-PCR证实,胆酸刺激使肝细胞表达TNFR1、DR5和TRAIL,但不表达TNF- $\alpha$ 。胆酸刺激引起DR5在细胞内聚集。通过上调DR5表达致敏肝细胞发生TRAIL诱导的凋亡。DR5 mRNA和蛋白表达上调10倍,而DR4没有变化。此过程主要通过细胞内JNK信号途径<sup>[17]</sup>调节,JNK抑制剂SP600125可以阻断胆酸诱导的DR5 mRNA和蛋白的上调表达。

**2.4 TRAIL与肝脏肿瘤** TRAIL/死亡受体途径是目前肿瘤学领域的研究热点。一方面,TRAIL介导的凋亡直接通过激活级联反应,与基因无关;另一方面,FasL与TNF的临床应用因其严重毒副作用而受到限制,而TRAIL具有选择性细胞毒作用,对大多正常细胞无损伤,利用TRAIL诱导恶变细胞凋亡治疗肿瘤的报道越来越多。何松青 *et al*<sup>[18]</sup>采用原位杂交法检测了60例肝癌组织和2种肝癌细胞株的TRAIL表达,发现肝癌组织中死亡受体的表达量显著强于正常肝组织,两种肝癌细胞株中检测到DR5、DR4、DcR2的表达,但DcR1表达缺失。Walczak *et al*<sup>[19]</sup>发现将TRAIL注入肿瘤小鼠体内可抑制肿瘤生长,而无任何明显毒副作用。Ashkenazi *et al*<sup>[20]</sup>将TRAIL注入猴体内亦发现同样的现象,且发现TRAIL与化疗药物有协同抗肿瘤作用。体外实验同样显示,许多化疗药物可增强TRAIL抗肿瘤的作用,对TRAIL不敏感的肿瘤细胞株在化疗药物作用下可变得对TRAIL敏感<sup>[21-22]</sup>。TRAIL选择性杀伤靶细胞的特性使其在肿瘤治疗方面有着诱人的前景。

**2.5 TRAIL与肝脏缺血再灌注损伤** 肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI)见于多种临床病理和手术过程,是多细胞参与、多介质共同作用的、复杂的病理过程。Borghi *et al*<sup>[23]</sup>观察了16例临床原位肝移植术后细胞凋亡情况,整个切片肝细胞凋亡指数为18.7%,肝

被膜下区为30.4%,小叶中央区为14.5%,门静脉周围区10.3%。缺血再灌注损伤是肝细胞凋亡的原因<sup>[24]</sup>。Feldman报道,在人同种异体肝移植短暂缺血再灌注后的凋亡定量分析中,有约20%的肝细胞发生凋亡,提示凋亡是早期移植物损伤的表现,细胞凋亡与肝缺血再灌注损伤密切相关。Cao *et al*<sup>[25]</sup>利用正常人肝细胞株HL-7702建立体外缺氧/再给氧的细胞模型,单纯模拟缺血再灌注损伤过程。研究发现,缺氧处理后再给氧各时间点(0-20 h)DR5 mRNA和蛋白表达明显上调,再给氧2 h达峰值。缺氧明显提高外源性TRAIL活性蛋白对肝细胞的毒性。缺氧后给予TRAIL,肝细胞凋亡率较未缺氧组明显增加。实验结果提示HIRI通过TRAIL/死亡受体途径引起肝细胞凋亡。此方面的研究目前甚少,有待进一步深入。

**2.6 TRAIL与肝移植排斥反应** TRAIL作为机体免疫调节和免疫监视分子之一,与移植排斥反应密切相关。一方面,TRAIL参与CD4<sup>+</sup>T细胞、NK细胞、巨噬细胞和树状细胞等多种免疫细胞的毒性作用,促进排斥反应引起的组织损伤。Song *et al*<sup>[26]</sup>通过免疫组织化学染色和ELISA检测肾移植手术后发生排斥反应的患者的组织和血清中TRAIL、DR4和DR5的表达情况。研究结果提示TRAIL、DR4和DR5在病理组织中的表达以及血清中sTRAIL水平明显增高。由于膜性和分泌性TRAIL都可以诱导表达DR4/DR5的细胞发生凋亡,TRAIL/死亡受体可能参与移植物排斥反应。肝脏移植术后排斥反应也有相似表现<sup>[27-28]</sup>。Strehlau *et al*<sup>[28]</sup>检测了39名肾移植排斥的病理标本和14名肝移植排斥的57份肝活检标本中TRAIL的表达情况,结果显示TRAIL在98%的肾移植急性排斥标本和99%的肝移植急性排斥的标本中都有表达。9名伴有再发性、灶性硬化的肾移植急性排斥患者都有TRAIL mRNA的表达。Tashiro *et al*<sup>[27]</sup>发现活体肝移植中移植物损伤与TNFR1和DR5有关,而与Fas无关。移植肝组织中TNFR1和DR5基因和蛋白水平表达升高,但Fas表达没有改变。与FasL不同,TRAIL基因表达的增高不仅局限于急性排斥,在脓毒血症、其他原因引起的移植物损伤以及移植物慢性失功也发现TRAIL的升高。另一方面,TRAIL可以诱导活化T细胞、巨噬细胞、NK细胞等多种免疫细胞发生凋亡<sup>[29-31]</sup>。通过清除上述免疫细胞,可以诱导免疫耐受,减轻移植物排斥反应。因此TRAIL/死亡受体途径在移植物排斥反应中发挥双刃剑作用,诱导移植物细



胞凋亡加重排斥反应, 诱导宿主活化T细胞凋亡则促进免疫耐受。

### 3 结论

细胞凋亡涉及许多不同的介导因子, 如Fas、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 1和Bcl-2家族, 他们在许多不同的肝损伤中均可发挥作用”, 而TRAIL/死亡受体途径参与多种肝脏病理损伤。深入研究TRAIL/死亡受体途径在肝损伤中的作用机制具有重大的理论和实际意义。

### 4 参考文献

- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673-682
- Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 559-563
- Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6: 564-567
- Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 225-234
- Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 1997; 7: R750-R753
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997; 277: 818-821
- Mundt B, Wirth T, Zender L, Waltemathe M, Trautwein C, Manns MP, Kühnel F, Kubicka S. Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake. *Gut* 2005; 54: 1590-1596
- Mundt B, Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003; 17: 94-96
- Janssen HL, Higuchi H, Abdulkarim A, Gores GJ. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression. *J Hepatol* 2003; 39: 414-420
- Liang X, Liu Y, Zhang Q, Gao L, Han L, Ma C, Zhang L, Chen YH, Sun W. Hepatitis B virus sensitizes hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis through Bax. *J Immunol* 2007; 178: 503-510
- Liu YG, Liu SX, Liang XH, Zhang Q, Gao LF, Han LH, Cao YL, Hou N, Du J, Sun WS. Blockade of TRAIL pathway ameliorates HBV-induced hepatocyte apoptosis in an acute hepatitis model. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 329-334
- Yang Y, Zheng L, Lv G, Jin X, Sheng J. Hepatocytes treated with HBV X protein as cytotoxic effectors kill primary hepatocytes by TNF-alpha-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *Intervirology* 2007; 50: 323-327
- Nanji AA. Apoptosis and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 187-190
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364: 806-809
- Ando K, Guidotti LG, Wirth S, Ishikawa T, Missale G, Moriyama T, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang SN, Chisari FV. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 1994; 152: 3245-3253
- Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 38610-38618
- Higuchi H, Grambihler A, Canbay A, Bronk SF, Gores GJ. Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1. *J Biol Chem* 2004; 279: 51-60
- He SQ, Chen XP, Zhao YZ, Zhang WG, Wang HP, Yang CH, Wang SF. Expression Profiles of TRAIL Receptors and Their Clinical Significance in Human Hepatocellular Carcinoma. *Chinese-German J Clin Oncol* 2003; 2: 25-29
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 157-163
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtry AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104: 155-162
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 2002; 7: 449-459
- Naka T, Sugamura K, Hylander BL, Widmer MB, Rustum YM, Repasky EA. Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice. *Cancer Res* 2002; 62: 5800-5806
- Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 407-415
- Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003; 16: 149-159
- Cao L, Li Y, Cheng F, Li S, Long D. Hypoxia/reoxygenation up-regulated the expression of death receptor 5 and enhanced apoptosis in human hepatocyte line. *Transplant Proc* 2006; 38: 2207-2209
- Song CJ, Liu XS, Zhu Y, Chen LH, Jia W, Li YN, Cao YX, Xie X, Zhuang R, Zhu CS, Jin BQ. Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in kidney and serum from patients receiving renal transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 1340-1343
- Tashiro H, Itamoto T, Ohdan H, Arihiro K, Tateaki Y, Nakahara H, Ochi M, Hino H, Mizunuma K, Hara

### ■应用要点

明确TRAIL在各种肝脏疾病中诱导肝细胞凋亡的机制, 有助于进一步寻求潜在的治疗方法, 具有重要意义。

## ■同行评价

本文就TRAIL/死亡受体途径的特性、致凋亡的机制及与不同病理状态下肝细胞凋亡的关系的最新进展做了比较全面、系统的综述,行为条理清晰,层次清楚,具有一定的指导意义。

- H, Tokita D, Onoe T, Ishiyama K, Mitsuta H, Sugino K, Asahara T. Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 1 and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-(TRAIL) receptor-2/DR-5, but not Fas, in graft injury in live-donor liver transplantation. *Transpl Int* 2004; 17: 626-633
- 28 Strehlau J, Nashan B, v Schnakenburg C, Demirci, Stras-burg A, Offner G, Ehrich JHH. Increased intra-graft TRAIL/Apo-2L gene expression in renal and liver transplantation. American Society of Transplantation online, 1999-04-10, cited: 2008-04-17; 1(1): 24 screens. Available from: URL: <http://www.a-s-t.org/library/abstracts99/299.htm>
- 29 Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, Hunt JS. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 1999; 162: 6053-6059
- 30 Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K, Yagita H. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999; 163: 1906-1913
- 31 Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 1999; 189: 1343-1354

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## ● 消息 ●

## 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知

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

### 1 征稿内容

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

### 2 征稿要求

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

### 3 联系方式

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

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

# 乳酸杆菌对肠上皮黏附机制研究进展

沈通一, 秦环龙

沈通一, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233

国家自然科学基金资助项目, No. 30672044

通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn

电话: 021-64361349 传真: 021-64368920

收稿日期: 2008-05-08 修回日期: 2008-07-17

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

## Research progress in mechanisms of *Lactobacillus* adhering to intestinal epithelia

Tong-Yi Shen, Huan-Long Qin

Tong-Yi Shen, Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672044

Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn

Received: 2008-05-08 Revised: 2008-07-17

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

## Abstract

*Lactobacillus*, as the predominant microorganism in gut, is of vital importance in maintaining the stability of microbiological environment in intestine. The adhering of *Lactobacillus* to intestinal epithelia is the premise and basis of these actions. In this article, we review the progress in the study of the active ingredients, the biological features, the adhering mechanisms of *Lactobacillus* and their influencing factor.

**Key Words:** *Lactobacillus*; Adherence factor; Surface-layer protein

Shen TY, Qin HL. Research progress in mechanisms of *Lactobacillus* adhering to intestinal epithelia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2631-2636

## 摘要

乳酸菌作为胃肠道的优势菌群, 对于维护胃肠道微生态环境稳定有重要意义, 而与宿主胃肠道上皮表面的黏附和定植是发挥这些作用的

前提和基础. 本文就乳酸杆菌黏附活性成分及其生物学特性, 与肠上皮细胞的黏附机制及其影响因素的研究现状作一综述.

**关键词:** 乳酸杆菌; 黏附因子; 表层蛋白

沈通一, 秦环龙. 乳酸杆菌对肠上皮黏附机制研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2631-2636

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2631.asp>

## 0 引言

人类的胃肠道含有1000多种约 $10^{13}$ - $10^{14}$ 个微生物, 其基因组总含量至少是人类基因组的一千倍<sup>[1]</sup>. 乳酸菌作为这其中优势菌群, 同宿主胃肠道上皮表面的黏附和定植可以起到竞争性地排除病原体和调节宿主细胞反应的效果, 对于维护胃肠道正常的生态环境稳定起到了重要作用. 与目前已知的病原菌黏附机制相比, 乳酸菌黏附因子作用机制的研究还在起步阶段. 目前这方面的研究正日益受到重视. 本综述着重分析乳酸菌黏附因子对人类胃肠道的黏附作用机制.

## 1 乳酸菌黏附活性成分及其生物学特性

乳酸杆菌和宿主肠上皮细胞的黏附与乳酸菌体表面成分作用有关, 如脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)、细胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)和细胞表面蛋白等, 其中细胞表面蛋白起着关键性的作用<sup>[2]</sup>. 目前研究证实乳酸菌包括*Lactobacillus brevis*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*和*L. helveticus*等其细胞表面蛋白均有黏附能力, 因其大多分布于细菌表层, 故又被统称为表层蛋白(surface layer protein, SLP).

1.1 乳酸菌的表层(S-layer)主要成分 S-layer是大多数微生物细胞壁的最外层结构, 由分子质量40-200 kDa的蛋白或糖蛋白亚单位晶体状排列而成. S-layer厚约5-15 nm, 其疏水外表面由一定大小和不同形态的孔隙组成多孔状结构, 这些孔隙构成70%的晶格状表面<sup>[3]</sup>. 目前对S-layer的生物功能认识有限, 主要包括组成保护性包膜、细胞形态决定簇、分子和离子通道、细胞外酶的黏

## ■背景资料

乳酸杆菌作为胃肠道的优势菌群, 对于维护胃肠道生态环境稳定有重要意义, 而与宿主胃肠道上皮表面的黏附和定植是发挥这些作用的前提和基础. 肠道内的乳酸杆菌数量与种类繁多, 导致黏附机制复杂差异大. 目前, 尚未见关于此方面的确切的归纳和定论.

## ■同行评议者

宁琴, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科; 王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科



## ■ 研发前沿

近来对乳酸杆菌与肠上皮细胞黏附的研究中,除细菌表面活性成分对上皮细胞作用的观点外,许多研究针对乳酸菌表层蛋白结构域的描述、相关酶的修饰作用及其影响因素做了深入的分析,成为研究的热点。

附部位、以及参与细胞黏附和表面识别的结构<sup>[4]</sup>。

SLP的分子质量从25-71 kDa,最大可达200 kDa,占细菌总蛋白的10%-15%,含有大量的疏水氨基酸,占31.9%-38.7%。SLP阳性氨基酸数量较阴性高12.5%,导致了高等电点(PI),其PI值为9.35-10.4,并成为乳酸杆菌SLP特征性的标志<sup>[5-6]</sup>。

1.2 黏附作用 乳酸菌可识别宿主表面特异受体,而宿主表面的蛋白、糖蛋白和糖脂可能就是受体,也可选择性地吸附特定种类的细菌。其黏附过程包括二步:第一步是非特异性的,由菌体结构的特异性所决定;第二步是在非特异性结合的基础上,菌体的特异性配体进一步与宿主细胞相应的受体之间特异性的结合,这主要通过表层蛋白来发挥作用<sup>[7]</sup>。Bemet *et al*用*L. acidophilus* LA1株和肠致病性大肠杆菌一起与Caco-2共同培养,发现肠致病菌的黏附能力受抑制,这可能是乳杆菌与致病菌之间存在的非特异性的对肠上皮细胞顶端受体竞争黏附所引起的<sup>[8-9]</sup>。并认为其黏附成分可能是细菌表面的不稳定蛋白质,据此研制了含冻干培养上清成分的活菌制剂,临床效果较单纯活菌为优,但这种分泌型黏附分子的本质尚未阐明。而包括*L. crispatus*和*L. acidophilus*在内的一些乳酸菌在祛除或破坏SLP后其和宿主上皮的黏附能力也降低了<sup>[10]</sup>。近来发现单用*L. helveticus*的SLP提取物也可以达到抑制肠致病性大肠杆菌对宿主上皮细胞的黏附的效果<sup>[11]</sup>。许多研究发现在创伤、病毒或细菌感染引起肠上皮破坏的情况下,黏膜的破坏使细胞外基质(ECM)暴露在外允许有害微生物定植和感染。乳酸菌通过黏附于这些基质,就能与病原体竞争相同的受体占据肠道内潜在的连接位点。在使用家禽的体外CbsA黏附实验中,鸡粪来源的*L. Crispatus*可以黏附于鸡肠道组织的胶原或层连纤维<sup>[12]</sup>。有研究通过使用异源性的*Escherichia coli*的CbsB蛋白,来替代*L. Crispatus*的CbsB基因编码S-layer蛋白作胶原黏附功能实验,结果该异源性CbsB蛋白不能和胶原黏附,故研究者认为*L. brevis*和*L. Crispatus*的S-layer表层结构在与肠上皮的黏附过程的作用也很关键<sup>[13]</sup>。近来已有多项研究显示*L. brevis* ATCC 8287 SLP的SLPA拥有与人肠上皮细胞、膀胱内皮细胞和纤连蛋白黏附的能力,认为乳酸菌SLP可调节不同的宿主表面的黏附<sup>[4]</sup>。

1.3 其他活性分子的黏附作用 除了表层蛋白外,其他相关表面成分也起到一定的作用。多种革兰氏阳性菌包括葡萄球菌、链球菌及乳杆菌等,

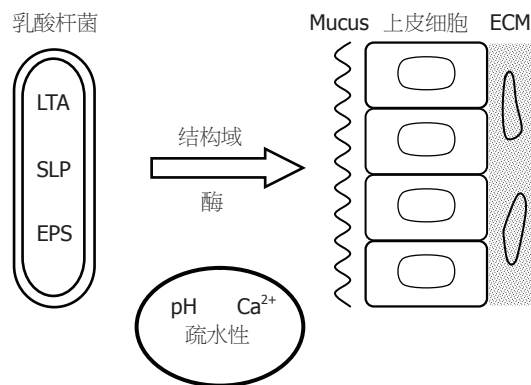


图1 乳酸杆菌同肠上皮细胞黏附图。

不仅细胞壁中含有充足的LTA,而且在其生长发育过程中,不断地向周围环境中释放LTA<sup>[14]</sup>。有报道认为后者可调节*L. johnsonii* NCC 533黏附于Caco-2细胞<sup>[15]</sup>。研究显示dlt操纵子编码蛋白可以将d-丙氨酸酯嵌入乳酸菌细胞壁相关LTA,而d-丙氨酸酯在耐酸、抵抗微生物肽、生物膜形成、抗病原菌的毒性方面起着重要的作用,通过对dlt操纵子的插入灭活导致LTA的d-丙氨酸酯不足,这可以使*L. reuteri* 100-23在小鼠肠道的定植明显减少,并在和肠道菌株的竞争实验中几乎从栖息地消失<sup>[16]</sup>。

此外,乳酸菌分泌的EPS可以提高菌株对肠道表面的非特异性黏附能力。研究显示乳酸菌合成的细胞外多糖与细菌聚集也有密切相关,细菌聚集是生物膜形成的一个整合的过程,后者对形成黏附起到了推动作用<sup>[17]</sup>。研究发现EPS可以调节*L. plantarum* LP6的黏附作用,因EPS的表面分布决定LP6的疏水特性,细菌和黏液的疏水性接触可以影响乳酸菌的初步黏附<sup>[18]</sup>。

## 2 乳酸菌表层蛋白与肠上皮细胞的黏附机制

乳酸菌黏附于肠上皮细胞,主要通过SLP上的结构域和相关调节酶的作用,而在实施上并受环境的影响(图1)。

2.1 黏附结构域 蛋白质的结构域是蛋白质中具有特异结构和独立功能的区域,与蛋白质本身的数量相比结构域的数量是有限的,每个结构域所包含的成员数也是有限的。结构域作为一个重要的进化单元,可以在基因组中重复出现,表明某个结构域在基因组中的重复和重排可能是影响该基因编码的蛋白质功能的一个重要因素。结构域的核苷酸序列比较保守,可以经若干代的进化比较完整地保留下来,也证明了结构域对于蛋白质的功能无可替代的重要性<sup>[19-20]</sup>。

黏附蛋白通常具有革兰氏阳性菌跨膜蛋白的一些典型特征<sup>[21]</sup>, 其中间肽段往往含有2个或2个以上拷贝的重复氨基酸序列, 黏附结构域常位于这些重复序列中, 通过某些特殊的序列连接于细胞壁。目前有研究将*L. brevis* ATCC 8287<sup>[22]</sup>的SLP黏附结构域做了鉴定, 在*E. coli*的体外鞭毛显示实验中发现*L. brevis*的受体连接区域位于SLP的N端区域, 包括96-176个氨基酸组成, 主要调节与人肠上皮细胞黏附, 而且在该蛋白的N端还发现同纤连蛋白(fibronectin)连接区域, 由96-245个氨基酸组成。Avall-Jääskeläinen *et al*<sup>[21]</sup>将*L. brevis* ATCC 8287 SLPA中的受体-连接区域(SLPA receptor-binding region)编码基因引入表达质粒, 然后导入乳酸球菌(*Lactococcus lactis*), 并且表达于乳球菌表面, 结果使得原本无黏附能力的乳酸球菌获得了黏附肠道407上皮细胞系(intestine 407 cells line)及黏附纤连蛋白的能力。进一步研究表明, 该黏附能力是由slpA基因编码的N末端的247个氨基酸(包含30个氨基酸残基的信号肽)所介导的。但尽管SLPA的黏附-连接区域能够使*L. lactis*获得黏附407细胞的能力, 其黏附能力仍较野生型*L. brevis*低。可能的解释为野生型*L. brevis*的S-layer含有50万个SLPA亚基, 而*Lactococcus lactis*所表达的LPA受体-连接区域只相当于野生型*L. brevis* S-layer中很少的一部分SLPA蛋白亚基, 所以质粒转染后的乳酸球菌黏附能力较野生型*L. brevis*低。

近来研究发现包括*L. reuteri* 1063<sup>[22]</sup>、*L. acidophilus* NCFM<sup>[23]</sup>的细胞外黏附蛋白、*L. plantarum* WCFS1<sup>[24]</sup>的凝集素样甘露醇特异黏附素(Msa)等拥有类似的黏液连接结构域(Mub结构域), 该结构域在Pfam资料库描述为Muc连接蛋白(Mucbp), 由50个氨基酸残基组成, 常存在于与肽聚糖连接的蛋白, 可以和真核生物细胞膜表面富含亮氨酸的短链模体相结合起黏附作用。研究发现部分Mub结构域内或侧方常含有一些富含脯氨酸(P)的区域, 并通过这个区域同蛋白其他部分区分开来, 这些区域中脯氨酸往往被两个非脯氨酸残基隔开, 所以命名为PxxP区域。而富含脯氨酸的肽段能形成带状或绞链状的二级结构, 可以使蛋白黏附时具有更大的活动性。在真核生物可以形成富含脯氨酸的模体, 插入上皮细胞SH3结构域的疏水区域, 这可能是黏附机制之一<sup>[25]</sup>。另有研究显示, Msa含有的Mub结构域能与肠道上皮细胞表面覆盖的粘液素(Mucin)中的甘露糖成分发生黏附, 如果加入

某些糖蛋白(glycoproteins fetuin)可以竞争抑制Mub的黏附作用, 说明黏液中的糖链可能是Mub结构域的配体<sup>[22]</sup>。

不同种类乳酸杆菌黏附结构域具有同源性, 可通过相关数据库归类分析。而同一黏附素可以有不同黏附结构域的存在, 也可以出现一系列相同的连接域。Boekhorst *et al*<sup>[25]</sup>根据存在于*L. reuteri* 1063和*L. plantarum* WCFS1的Mub和Msa的结构域序列, 用隐马尔科夫模型(hidden markov models, 简称HMM)从Pfam、SMART和Superfam等数据库中检测搜索潜在的黏液连接蛋白, 通过序列比对的结果在10个乳酸菌种类中共鉴定出有30种蛋白含有3个或更多的Mub结构域。通过Pfam数据库比较Mucbp结构域, 发现确认的结构域大小不一, 其变化范围从100个到200多个氨基酸不等, 出现在胃肠道大多数的乳酸菌内。

2.2 通过酶调节的黏附 细菌表面粘附蛋白中部分是引物酶依赖的, 在革兰氏阳性菌, 这些表面蛋白c端LPxTG模体可以被引物酶(sortase, SrtA)所识别, 后者可以切断T和G残基, 使苏氨酸羧基群共价连接到细胞壁肽聚糖骨架的五甘氨酸, 和包膜合为一体并在微生物表面显示出来。除SrtA, 引物酶家族还包括识别NPQTN模体的SrtB和识别QVPTGV模体的SrtC等, 因此又将这些SLP称为引物酶依赖的SLP<sup>[26]</sup>。虽然细菌基因组编码许多引物酶依赖SLP, 但绝大多数没有确定的功能。有研究对四种该类蛋白做了功能分类, 前三种乳酸菌引物酶依赖的SLP(*L. reuteri* 1063 Mub、*L. plantarum* WCFS1 Msa和*L. acidophilus* NCFM Mub)属于黏液黏附蛋白, 第四种蛋白是*L. salivarius* UCC118的LspA, 他是一种300 kDa的大分子蛋白, 除LPxTG模体以及46个氨基酸残基组成的YSIRK型信号肽(YSIRK-type signal peptide), 其编码基因Lsp在序列上与乳酸菌*Lactobacillus johnsonii* NC533(简称La1)编码SLP(LJ0621)的基因有80%的同源性<sup>[27]</sup>。为了调查引物酶对lsp黏附是否起作用, van Pijkeren *et al*<sup>[28]</sup>建立一个缺少引物酶基因(LSL-1606)的突变株, 发现其同肠上皮HT-29和Caco-2细胞黏附能力明显降低, 仅达到野生型菌株的61%和68%, Caco-2细胞影响较少可能同该细胞表面存在大量非引物酶依赖黏附蛋白的受体有关。而同LspA基因突变株对比, 后者黏附能力仅高于缺乏引物酶UCC118约15%, 这也说明了LspA在黏附过程中的重要作用。

## ■创新盘点

目前对乳酸杆菌黏附机制的研究主要局限在其中的某一方面, 而对其进行全面分析概括较少。本文从乳酸菌的外部结构特征和活性成分分析入手由粗到细逐层深入, 并通过绘制示意图使具体机制更为明了。



## ■应用要点

本文全面综述了乳酸杆菌对肠上皮细胞的黏附机制的研究进展,对进一步深入研究提供有用的参考资料。

目前研究显示引物酶依赖的SLP能与黏液相连。然而这并不意味着所有该类蛋白的作用和引物酶调节黏附有关,有些可能和黏液成分的亲和力相关,所以需要探明乳酸菌中各种该类蛋白的功能。近来,通过多种生物信息方法包括种系序列谱和结构域分析来预测*L. plantarum* WCFS1细胞外蛋白,在该研究中12种蛋白被证实含有黏附因子,其中10种含有LPxTG的引物酶,包括前面提到的Msa蛋白,其黏附作用已在试验中证实<sup>[29]</sup>。目前已有学者经计算机模拟这些特殊菌株中引物酶依赖的黏附素,并尝试推测其在生态学上的作用,而未来的体内和体外的鉴定实验必然会验证这些假设<sup>[30]</sup>。

另外,有研究显示乳酸菌可以产生EPS合成酶参与调节聚集和粘附以及生物膜的形成。*L. reuteri* TMW1.106表达糖基转移酶(gtfA)和菊粉蔗糖酶(inu),合成大量高分子量的葡聚糖和寡葡萄糖及少量的果聚糖。插入灭活破坏inu基因同时影响了*L. reuteri* TMW1.106和野生型竞争黏附小鼠肠上皮,而破坏gtfA则对粘附没有影响。根据同源性分析显示,inu在*L. reuteri* TMW1.106的功能除葡聚糖连接蛋白还是葡聚糖的受体,inu的破坏影响同生物膜葡聚糖基质相连。相对而言,gtfA只和葡聚糖合成相关但和连接无关<sup>[31]</sup>。

**2.3 特殊的乳酸菌蛋白调节的黏附** 研究发现La1上有两类特殊的乳酸菌黏附素。第一类是存在于胞质的鸟苷酸结合蛋白EF-Tu(elongation factor Tu),在蛋白质翻译过程中对肽链的延长有重要作用。然而研究者发现La1的EF-Tu定位在菌体的表面,而且在这种蛋白上没有发现可以解释的结构域或模体,说明EF-Tu与一般SLP的结构有所不同。Granato *et al*<sup>[32]</sup>将La1用LiCl分离到一种50 kDa的表面蛋白,能够介导La1对Caco-2细胞及黏液素的黏附,通过测序和比对结果表明,他与*L. plantarum* WCFS-1的EF-Tu在氨基酸序列上有83%的同源性。重组EF-Tu能竞争抑制La1对Caco-2细胞的黏附,但抑制率仅40%,不能达到100%,说明EF-Tu可能只是La1的SLP的一种。此外,重组EF-Tu对两种不同的黏液素(胃腔和肠腔的)的黏附能力相似,而上述两种黏液素在结构上存在某些相同寡糖决定簇,他们可能为EF-Tu的黏附配体。

另一类是GroEL热休克家族蛋白(又称分子伴侣,属于Hsp60家族),主要功能是帮助新合成的蛋白质正确折叠和装配,以保证蛋白质有效地发挥功能。以往认为该类蛋白不存在分泌信

号序列及其他模体结构证明其外分泌性,没有黏附功能。但Bergonzelli *et al*<sup>[33]</sup>用ELISA反应证实GroEL蛋白不仅存在于La1胞质而且位于细菌表面,且培养8 h后,培养基内的GroEL蛋白浓度大幅度升高,根据重组GroEL蛋白同La1黏附实验表明GroEL可能竞争抑制La1对于HT-29细胞的黏附。

## 3 影响乳酸菌黏附和定植的因素

**3.1 钙离子** 以往研究认为乳酸菌的黏附是需要Ca<sup>2+</sup>的非特异系统, Ca<sup>2+</sup>信号活化途径可促进乳酸菌与肠细胞的特异受体结合。研究发现,使用放射标记的多种乳酸菌,与缺乏钙离子比较,在加入钙离子后,*L. reuteri* DSM 12246, *L. plantarum* Q47, *L. rhamnosus* GG和*L. johnsonii* NCC 533等同IPEC-J2的黏附明显增加,而Zn及Mg的作用不明显。而且在钙离子存在的情况下,黏附力差的菌株其黏附功能增加更明显<sup>[34]</sup>。

**3.2 表面疏水性** Vadillo-Rodríguez *et al*<sup>[35]</sup>研究发现由*L. acidophilus* ATCC 4356的S-layer表达的疏水性与表面黏附能力相关,后者和环境的离子强度改变相关,不过不是所有的乳酸菌S-layer拥有这样的机制。

**3.3 pH值** 而前述黏附试验中发现,无论是La1还是重组EF-Tu蛋白或重组GroEL蛋白,对黏液及Caco-2细胞的黏附都有pH依赖性,pH5.0时的黏附能力要比pH7的时候强<sup>[32-33]</sup>。与此相似,研究显示Mub结构域的黏附也是pH依赖性的<sup>[22]</sup>。

总之,乳酸菌同肠上皮细胞的黏附机制涉及细菌本身结构和周围环境等多层次因素,但是要更好地查明这些复杂的细菌宿主相互作用的分子机制还存在着很多困难。随着人类疾病与功能基因的发现与识别、基因与蛋白质的表达和功能研究方面的深入,相信不久将阐明乳酸菌的黏附机制。

## 4 参考文献

- 1 Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JL, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-1359
- 2 Jakava-Viljanen M, Palva A. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Vet Microbiol* 2007; 124: 264-273
- 3 Sára M, Sleytr UB. S-Layer proteins. *J Bacteriol* 2000; 182: 859-868
- 4 Avall-Jääskeläinen S, Palva A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev*



- 2005; 29: 511-529
- 5 Sleytr UB, Sára M. Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 1997; 15: 20-26
- 6 Bröckl G, Behr M, Fabry S, Hensel R, Kaudewitz H, Biendl E, König H. Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermobacter fervidus* and *Methanothermobacter sociabilis*. *Eur J Biochem* 1991; 199: 147-152
- 7 Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet Microbiol* 2003; 97: 55-61
- 8 Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-489
- 9 Bernet-Camard MF, Liévin V, Brassart D, Neeser JR, Servin AL, Hudault S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2747-2753
- 10 Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 981-987
- 11 Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol* 2007; 9: 356-367
- 12 Antikainen J, Anton L, Sillanpää J, Korhonen TK. Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol* 2002; 46: 381-394
- 13 Sillanpää J, Martínez B, Antikainen J, Toba T, Kalkkinen N, Tankka S, Lounatmaa K, Keränen J, Höök M, Westerlund-Wikström B, Pouwels PH, Korhonen TK. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J Bacteriol* 2000; 182: 6440-6450
- 14 Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 686-723
- 15 Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A, Brassart D. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1071-1077
- 16 Walter J, Loach DM, Alqumber M, Rockel C, Hermann C, Pfitzenmaier M, Tannock GW. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ Microbiol* 2007; 9: 1750-1760
- 17 Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 2005; 88: 843-856
- 18 Sun J, Le GW, Shi YH, Su GW. Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44: 79-85
- 19 Schatz G, Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 1996; 271: 1519-1526
- 20 Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Palva A, Korhonen TK. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* 2002; 184: 3360-3367
- 21 Avall-Jääskeläinen S, Lindholm A, Palva A. Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 2230-2236
- 22 Roos S, Jonsson H. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 2002; 148: 433-442
- 23 Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8344-8351
- 24 Pretzer G, Snel J, Molenaar D, Wiersma A, Bron PA, Lambert J, de Vos WM, van der Meer R, Smits MA, Kleerebezem M. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 2005; 187: 6128-6136
- 25 Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M, Siezen RJ. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* 2006; 152: 273-280
- 26 Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 192-221
- 27 Claesson MJ, Li Y, Leahy S, Canchaya C, van Pijkeren JP, Cerdeño-Tárraga AM, Parkhill J, Flynn S, O'Sullivan GC, Collins JK, Higgins D, Shanahan F, Fitzgerald GF, van Sinderen D, O'Toole PW. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 6718-6723
- 28 van Pijkeren JP, Canchaya C, Ryan KA, Li Y, Claesson MJ, Sheil B, Steidler L, O'Mahony L, Fitzgerald GF, van Sinderen D, O'Toole PW. Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4143-4153
- 29 Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M, Siezen RJ. The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment. *Microbiology* 2006; 152: 3175-3183
- 30 Vélez MP, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 276: 140-148
- 31 Walter J, Schwab C, Loach DM, Gänzle MG, Tannock GW. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* 2008; 154: 72-80
- 32 Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin

## 同行评价

本文综述了乳酸杆菌同肠上皮细胞的黏附机制及其影响因素的研究现状,具有一定的学术价值。

- L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 2004; 72: 2160-2169
- 33 Bergonzelli GE, Granato D, Pridmore RD, Marvin-Guy LF, Donnicola D, Corthésy-Theulaz IE. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2006; 74: 425-434
- 34 Larsen N, Nissen P, Willats WG. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *Int J Food Microbiol* 2007; 114: 113-119
- 35 Vadillo-Rodríguez V, Busscher HJ, van der Mei HC, de Vries J, Norde W. Role of *Lactobacillus* cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 41: 33-41

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <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, 并考入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# 维生素D与炎症性肠病的研究进展

麻继臣, 张晓岚, 郝礼森, 刘娜

麻继臣, 张晓岚, 郝礼森, 刘娜, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000

麻继臣, 中国人民解放军白求恩国际和平医院 河北省石家庄市 050082

作者贡献分布: 资料分析和论文撰写由麻继臣完成; 文献检索由郝礼森与刘娜完成; 选题和审校由张晓岚完成。

通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化科, xiaolanzh@126.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2008-06-11 修回日期: 2008-07-17

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

## Advances in vitamin D and inflammatory bowel disease

Ji-Chen Ma, Xiao-Lan Zhang, Li-Sen Hao, Na Liu

Ji-Chen Ma, Xiao-Lan Zhang, Li-Sen Hao, Na Liu, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Ji-Chen Ma, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2008-06-11 Revised: 2008-07-17

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

## Abstract

In respect of the comprehensive effect in immunologic regulation (on innate immunity and adaptive immunity) and antibacterial activity, vitamin D is in a high profile position in recent years. Despite the uncertain mechanism, it is a common sense that commensal enteric microbiota initiate and perpetuate immune-mediated bowel inflammation. This suggests that there may be a link between vitamin D's function and pathogenesis of inflammatory bowel disease, and vitamin D-associated agents may be prospective for treatment of inflammatory bowel disease.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Vitamin D; Vitamin D receptor; Innate immunity; Adaptive immunity

Ma JC, Zhang XL, Hao LS, Liu N. Advances in vitamin D and inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(23): 2637-2643

## 摘要

由于广泛的免疫调节及抗微生物作用, 维生素D与自身免疫疾病的关系受到越来越多的关注。而对于炎症性肠病, 尽管根本机制不明, 但关于其发病已形成基本共识, 即在一定环境因素下, 由共生菌及其所产生致炎因子作用于免疫缺陷的个体, 产生持续的免疫反应。由于维生素D对固有免疫、适应性免疫的调节作用及其作用方式, 以及其可调控上皮细胞抑菌肽的产生, 参与肠道微生态的平衡, 有理由认为活性维生素D的产生和作用的不足可能参与了炎症性肠病的发病, 同时维生素D可能是很有前景的预防和治疗炎症性肠病的药物。

**关键词:** 炎症性肠病; 维生素D; 维生素D受体; 固有免疫; 适应性免疫

麻继臣, 张晓岚, 郝礼森, 刘娜. 维生素D与炎症性肠病的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2637-2643

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2637.asp>

## 0 引言

维生素D以调节钙磷代谢而广为人知, 近年发现他有重要的抗细菌感染和免疫调节作用, 维生素D及其受体(vitamin D receptor, VDR)的变异, 是佝偻病反复感染的原因, 也可能是多种自身免疫性疾病的发病基础。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是由于机体对肠道菌群缺乏正常防御, 并由细菌成分与免疫系统相互作用造成的慢性炎症。维生素D或其受体功能不足可能参与IBD的形成, 因此, 补充维生素D对IBD的治疗可能有效, 关于维生素D的免疫调节机制及其在IBD发病机制中的作用, 我们就近年的研究进展综述如下。

## 1 维生素D的来源及代谢

维生素D是动物所必需的营养成分, 天然维生素D包括维生素D2(麦角钙化醇)和维生素D3(胆钙化醇)。维生素D2主要来自植物; 维生素D3主要来源于鱼肝油、蛋黄、动物肝脏、黄油及牛奶等动物性食物。一般认为动物表皮中的7-脱氢胆

## ■背景资料

哺乳动物的肠道是一个多种菌共生的环境, 炎症性肠病发病机制复杂, 涉及遗传、环境、免疫等多个环节, 是欧美国家的一个多发病。近年我国炎症性肠病发病有快速增高趋势, 然而由于其根本机制不明, 临床治疗手段局限。近年对维生素D的研究显示, 维生素D可调整固有免疫、适应性免疫的平衡, 调控抑菌肽的产生, 涉及炎症性肠病发病机制的多个环节, 有必要对其进行进一步研究。

## ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 万军, 主任医师, 解放军总医院南楼老年消化科



## ■ 研发前沿

关于炎症性肠病的发病机制,人们对适应性免疫关注的较多。近两年的研究显示,对于肠道这样一个特殊的带菌环境,固有免疫发挥了至少和适应性免疫同等重要的作用。

固醇经紫外线照射也可自身合成维生素D<sub>3</sub>。近年的研究发现单核细胞、上皮细胞也可在特定条件下合成维生素D<sub>3</sub>。维生素D的活性形式是1, 25二羟维生素D<sub>3</sub>(1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)。食物中的维生素D<sub>2</sub>、维生素D<sub>3</sub>在肠道被吸收后以及皮肤中的7-脱氢胆固醇在紫外线照射下生成的维生素D<sub>3</sub>均进入血液,维生素D<sub>3</sub>通过血浆中的维生素D结合蛋白(VBP)被运送至肝脏,在肝细胞内被25-羟化酶(25-OHase)作用后形成25-羟基维生素D<sub>3</sub>(25-OHD<sub>3</sub>),后者与α<sub>2</sub>球蛋白结合并转移至肾脏后被1-羟化酶(1-OHase)在1α位上再次羟基化,生成具有生物活性的1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。

## 2 维生素D受体

维生素D通过与VDR结合发挥作用。VDR是核内生物大分子,为类固醇激素/甲状腺激素受体超家族的成员。人VDR基因位于染色体12q13-14,长约75 kb,由9个外显子、8个内含子组成。VDR分为2大类:核受体(nVDR)和膜受体(mVDR)。前者主要参与钙磷平衡的维持;nVDR则通过影响基因表达,控制相应蛋白质的合成。VDR蛋白质从N端到C段可分为6个功能区(A-E)。其中C区为DNA结合区(DNA-binding domain, DBD),由VDR外显子II、III编码,此区为核受体家族的特异性蛋白质,高度保守,人、大鼠的同源性为98.5%,可识别靶基因上的维生素D反应元件。E区为配体结合区(ligand-binding domain, LBD),由VDR基因外显子V-IX编码。该区是与1, 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>结合的主要部位,与1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>有较高的亲和力。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>与nVDR结合激活nVDR,之后nVDR与视黄醛X受体α(retinoid X receptor α, RXRα)结合形成VDR/RXRα异二聚体,该复合物能够与定位于人和鼠的RelB基因的启动子区域的VDREs特异性地结合,随后引起启动子发生构象改变,从而影响基因表达,调节免疫,促进细胞的增殖与分化。维生素D的免疫调节作用是通过nVDR实现的。现已证实VDR有广泛的组织学基础,不仅存在于经典的靶组织如小肠、肾脏、骨骼、甲状旁腺中,还存在于视网膜、胰腺、垂体、肌肉、睾丸、乳腺、子宫、胎盘、卵巢、脾脏、骨骼、大肠及皮肤等组织中,人的单核细胞、激活的T细胞、B细胞和多种肿瘤细胞也含有VDR。VDR除对钙、磷代谢具有调节作用外,还具有多种重要的生物作用,如影响中枢神经功能等。

## 3 维生素D与固有免疫

国外早就发现口服维生素D可治疗结核红斑<sup>[1]</sup>,佝偻病等维生素D缺乏的患者易反复感染是一种普遍的临床现象,提示维生素D可能与感染有关。近两年关于维生素D及其VDR在皮肤黏膜固有免疫调节中的作用有了很大进展, Martineau *et al*<sup>[2]</sup>采用随机、双盲、对照试验评价了维生素D的抗结核作用,对伦敦192名接触结核患者的健康人分别每日单次给予1MIU维生素D或安慰剂,发现相较于安慰剂组,所有接受维生素D治疗的接触者,血液都具有明显的抗结核菌增殖的作用<sup>[2]</sup>。目前认为固有免疫在机体抗菌反应中起决定作用。维生素D通过固有免疫发挥作用的模式<sup>[3-8]</sup>是:单核、巨噬细胞或树突状细胞(dendritic cell, DC)膜表面模式识别受体,主要是Toll-like受体(Toll-like receptors, TLRs),识别多种细菌衍生的配体,即细菌共同表达的特定保守成分,或称病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),如细菌内毒素/脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、脂阿拉伯甘露聚糖、肽聚糖、脂磷壁酸,包括细菌脂蛋白,而后通过一系列细胞内信号转导途径,使单核、巨噬细胞VDR和维生素D1羟化酶表达增加,并使25羟维生素D(25OHD)转化为活性形式的1, 25(OH)<sub>2</sub>D,与细胞内VDR结合,转移入核,与靶基因启动子区域的VDREs特异性地结合,进而诱导表达抗菌肽,内源性抗菌肽被认为是机体在进化过程中为适应环境、求得生存而最早产生的免疫活性分子,从昆虫、低等脊椎动物、哺乳动物直至人类均广泛存在,具有广谱抗微生物活性,如抗病毒、细菌、真菌、螺旋体等作用,有的还具有细胞毒性包括选择性肿瘤细胞毒性。人在带菌环境中不发病,抗菌肽在其中发挥了重要作用,是机体免受肠道菌群感染的物质基础,抗菌肽的表达触发了细胞内直接的抗菌活性<sup>[9-10]</sup>。

## 4 维生素D与适应性免疫

DC是维生素D调节适应性免疫应答反应重要的靶细胞,是目前所知最强的抗原提呈细胞,他不同于其他细胞的最显著的特点是能够刺激初始T细胞增殖,因此,DC是机体适应性免疫应答的始动者。目前已经积累的资料证实DC的异常与系统性红斑狼疮、银屑病、肌炎及甲状腺炎等多种自身免疫性疾病密切相关。DC在不同发育阶段具有不同功能,未成熟DC具有摄取和加工

处理抗原的功能, 但刺激初始T细胞的能力很弱. 成熟DC可表达第一和第二信号, 直接激活T细胞, 间接激活B细胞. 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>及其1羟化类似物对DC的作用<sup>[11-17]</sup>有: (1)具有诱导骨髓细胞分化为巨噬细胞系的潜能<sup>[18]</sup>, 从而减少DC的数目, 降低由其诱发的适应性免疫应答而引起的炎症反应; (2)增加巨噬细胞的数目, 增强局部固有免疫抗菌反应; (3)抑制DC的成熟, 只有成熟的DC才具有激活初始T细胞的功能, 因此, DC数目的减少最终引起T细胞介导的免疫应答下调. 此外维生素D改善免疫细胞能量代谢, 维持其微环境中钙、锌、硒等重要离子的稳定<sup>[19-20]</sup>, 调节局部细胞因子的构成, 维生素D诱导DC表达和分泌IL-10<sup>[21]</sup>, 维生素D缺乏会使局部IL-2、IFN、IL-1β、TNF-α及IL-12表达上调<sup>[22-23]</sup>, IL-10诱导CD4<sup>+</sup> T细胞分化为Th2细胞. IL-2、IL-12、IFN则诱导CD4<sup>+</sup> T细胞分化为Th1细胞, 维生素D抑制细胞免疫<sup>[24-27]</sup>. 维生素D缺乏使免疫耐受遭到破坏, 引起自身反应的细胞毒性T细胞激活<sup>[28-30]</sup>.

## 5 维生素D发挥作用的方式

维生素D功能的实现可能是通过以下两条途径: (1)VDR表达的量及是否变异: 近年研究发现VDR存在基因变异<sup>[31]</sup>, VDR变异必然导致其与维生素D结合及功能发挥的异常, 已证实VDR特定位点的多态性与多种自身免疫病相关<sup>[32-33]</sup>. (2)调节内生活性维生素D-1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>的产量: 维生素D发挥功能, 需达到一定浓度, 人1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>正常循环浓度为26-70 ng/L<sup>[34]</sup>, 而其作用浓度往往是正常循环浓度的数倍, 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>在局部如何达到高浓度, 是其发挥作用的另一关键因素. 1α羟化酶是重要的维生素D羟化酶, 可使25OHD做为酶底物产生活性1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 达到作用部位高浓度, 通过一种内分泌、自分泌、旁分泌的方式发挥作用<sup>[10,35]</sup>. 比如人巨噬细胞发挥抗结核分支杆菌的作用浓度接近4 μg/mL, 当结核分支杆菌PAMPs和巨噬细胞表面TLR2/1二聚物结合, 则募集MyD88接头蛋白, 经一系列的细胞内信号转导途径, 触发1α羟化酶编码的CYP27B1和VDR表达上调, 同时巨噬细胞内吞细胞外液中的25OHD, 使细胞内25OHD升高, 在1α羟化酶作用下, 产生活性1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>和VDR可在细胞内自由作用. 结合配体的VDR最终与细胞核特定部位结合, 与NF-κB相互作用, 最终结果是清除抗原和启动T或B细胞介导的适应性免疫反应. 实验表明, 1α羟化酶

基因敲除的1-α(OH)<sub>2</sub>ase KO鼠、CD4和CD8淋巴细胞阳性率显著低于野生型小鼠. 与野生型小鼠相比, 其腹腔巨噬细胞吞噬功能和脾脏淋巴细胞增殖能力也显著下降, 说明局部形成活性维生素D是其发挥作用的重要条件<sup>[36]</sup>. CYP27B1存在于巨噬细胞和树突状细胞, 特异性抑制CYP27B1或加入VDR对抗物, TLR2/1L对抑菌肽mRNA的抑制超过80%, 而且抗菌活性大约降低了70%<sup>[10]</sup>. 实验证实影响羟化酶上游蛋白可改变维生素D作用<sup>[37]</sup>. 提示我们可通过调控维生素D羟化酶, 或改变其与VDR的结合来调控局部抗菌强度.

## 6 维生素D对IBD的影响

关于IBD的发病机制已形成共识, 即遗传易感性为基础<sup>[38-39]</sup>、环境因素参与, 黏膜免疫系统对肠腔内抗原物质的异常免疫应答造成肠道损伤. 而且其抗原很可能就是共生菌. 简而言之就是由细菌成分引发机体自身免疫, 感染和免疫是IBD发病的关键. 而正常情况下, 肠道上皮细胞和细胞之间的连接组成一道完整的黏膜屏障, 阻止微生物及毒性大分子通过, 肠上皮细胞及潘氏细胞可表达抗菌肽, 分布于肠黏膜表层, 调整黏膜表层菌群, 保持微生态平衡, 如果黏膜屏障受损, 菌群失常, 则可能使细菌黏附于上皮细胞顶层, 进而定植于黏膜表层, 或通过上皮层, 发生细菌移位, 如再不能被巨噬细胞等吞噬, 则诱发机体免疫反应, 形成慢性炎症.

维生素D对感染、免疫的广泛作用, 说明其具备影响IBD发病的理论基础. 维生素D与感染的关系是近年临床感染基础研究的一个热点, 维生素D具有明确的抗感染作用<sup>[2,40-43]</sup>, 可调控抑菌肽的表达, 维生素D缺乏可使呼吸道、鼻腔、消化道等黏膜组成的部位感染风险明显增高. 除已深入研究的抗结核作用外, 近年发现维生素D在成人肺炎、新生儿感染的发病中具有重要作用, 目前认为人体存在一条依赖维生素D的抗感染途径. 维生素D与免疫系统的关系如前所述, 可通过对种免疫细胞和细胞因子调控固有免疫和适应性免疫应答反应. 维生素D对免疫系统的作用在多种自身免疫病得到证实, 因广泛的免疫调节作用及其在结核病中显现的明确抗菌作用而受到关注. 临床大量证据表明补充维生素D可抑制多种自身免疫病, 如脑脊髓膜炎、甲状腺炎、1型糖尿病、系统性红斑狼疮以及胶原导致的关节炎和莱姆关节炎<sup>[44-50]</sup>.

## ■相关报道

Froicu用VDR KO小鼠进行的实验揭示了在DSS诱导小鼠实验性结肠炎模型中, 维生素D直接影响模型能否建立成功以及病变严重程度; 而Simmons *et al*进行的基因多态性分析, 提供了有力的遗传学证据.



## ■创新盘点

主要从3个方面揭示维生素D对IBD发病的影响: (1) 调控抑菌肽产生从而调节黏膜表面菌群失常; (2) 调节固有免疫及适应性免疫应答; (3) 维持黏膜屏障完整。

遗传学证据及动物实验表明维生素D和IBD之间有紧密联系。人类基因组图谱筛选显示VDR基因与IBD相关, VDR基因可能是IBD候选易感基因。Simmons *et al*<sup>[51]</sup>对VDR单核苷酸多态性进行了连锁分析, 发现用*Taq I*内切酶酶切CD患者VDR基因, 在352密码子8外显子部位, 相对于正常人, CD患者“tt”基因型的频率显著增高, 证实CD易感性和VDR候选区域存在基因联系。同时动物实验支持维生素D对IBD发病起关键作用。Cantorna<sup>[52]</sup>研究发现维生素D和VDR的作用决定小鼠是否能形成实验性IBD, 去除维生素D或阻断VDR可使T细胞自发激活, 加入维生素D则T细胞的异常反应被修复, 自身免疫得以避免, 认为其机制是维生素D直接或间接的调节T细胞发育和功能。Cantorna *et al*<sup>[53]</sup>对IL-10 KO小鼠研究发现, 当维生素D缺乏时, 小鼠很快自发出现便血、消耗等结肠炎症状, 伴随很高的死亡率。给予足量的vitamin D或1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>不会缓解症状, 显示维生素D与IBD的发病相关。Froicu *et al*<sup>[9,23,54]</sup>的系列实验更有说服力, 由于目前维生素D所有已知功能均通过VDR发挥作用, 敲除VDR则可阻断维生素D的作用, 他们建立了VDR KO小鼠模型, 研究发现1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>抑制包括IBD在内的自身免疫疾病动物模型建立, VDR KO可导致严重的IBD, VDR/IL-10双基因敲除小鼠在第8周100%死亡, VDR KO小鼠对右旋糖酐硫酸酯钠(DSS)极其敏感, 病变严重程度增加, 去除DSS VDR KO小鼠结肠炎症状不能缓解, 野生型小鼠在去除DSS 5 d后恢复。0.5%的DSS就引起VDR KO小鼠出血、溃疡和体重减轻, 在对野生型小鼠仅产生轻微症状的DSS剂量可使VDR KO小鼠死亡率增加。伴随结肠的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-10, 单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)高表达。给予1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>可减低DSS诱导的野生型小鼠肠道炎症程度和范围。进一步研究发现DSS小鼠的早期死亡原因是由于肠穿孔和内毒素血症, 而且VDR KO小鼠对外生性注射LPS高敏感, DSS处理的VDR KO濒死小鼠的腹膜渗液细菌培养阳性。表明VDR KO小鼠免疫功能异常, 抗菌功能低下, 认为VDR在调节胃肠道炎症, 控制结肠先天免疫和对化学损伤方面起关键作用。

维生素D如何影响IBD的发病呢? 正常人肠道菌株数目约为10万亿到100万亿之间<sup>[55-56]</sup>, 是

人体细胞总数的10倍, 肠黏膜肠道菌群直接接触, 而不被感染一直都是胃肠学家感兴趣的课题, 也是IBD发病的关键<sup>[57]</sup>。正常情况下, 致病菌和益生菌, 以及其代谢产物之间保持平衡, 如果致病菌及其代谢产物增多, 作用于肠道内皮细胞则会引发肠道炎症。抑菌肽在维持肠道菌群平衡中, 保护肠道免受感染中发挥着关键的作用, 抑菌肽可通过与黏膜表面细菌相互作用, 使内皮细胞等免受细菌侵害, 由于VDR激活是内皮细胞表达抑菌肽的先决条件, 因而维生素D在维持肠道菌群平衡中具有重要作用; 细菌及其产生的抗原物质发挥作用必须首先与内皮细胞发生黏附。Martinesi *et al*<sup>[58]</sup>以IBD患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)为对象, 通过检测凋亡及ICAM-1, 进一步研究了维生素D及其衍生物对黏附功能的影响。发现在PBMC培养液中加入LPS或TNF- $\alpha$ 后细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)水平显著升高, 加入1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>后ICAM-1水平显著下降。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>具有与TNF- $\alpha$ 单抗相似的作用, 可使聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶[Poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]和Caspase-3激活, 抑制CD患者PBMC增殖, 诱导PBMC凋亡, 使ICAM-1降低; 致病菌及其抗原成分仅仅与内皮细胞黏附并不能致病, 他必需侵入黏膜屏障, 发生细菌易位。肠黏膜屏障完整性决定细菌是否能够入侵及移位, 细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)是细胞间的重要连接方式, 对维持黏膜屏障的完整起决定作用, 其功能是只允许小分子离子通过, 微生物及大分子不能通过。IBD上皮细胞通透性增高, 允许细菌进入上皮下层, 从而导致IBD的发生, 维生素D可维持表皮屏障的完整<sup>[59-60]</sup>, 近年对他是否对黏膜屏障有类似作用开始受到关注<sup>[61-66]</sup>。跨膜蛋白、胞质附着蛋白及细胞骨架蛋白共同组成了TJ, 连接黏附分子(junction adhesion molecule, JAM)是重要的跨膜蛋白。Murphy *et al*<sup>[62]</sup>用Caco-2单层细胞模型发现维生素D可影响JAM的表达, 修复肠黏膜通透性<sup>[67]</sup>。细胞间的紧密连接和其微环境中的钙关系密切, 细胞外钙减少可激活细胞内肌球蛋白激酶活性, 周围连接肌动蛋白和肌球蛋白的纤维向心性收缩, 使紧密连接破坏, 其作用依赖于Ca<sup>2+</sup>, E-钙粘素结合, 介导紧密连接的开启和闭合, 其作用同样依赖于Ca<sup>2+</sup>, Fujita *et al*应用RNA干扰及过表达策略<sup>[65]</sup>, 通过活体



及离体实验证实<sup>1</sup>, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>使肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白Claudin-2和Claudin-12表达上调, 认为上皮细胞存在维生素D依赖性的钙通道, 对维持肠上皮屏障的功能具有重要作用. Kong *et al*<sup>[68]</sup>也就VDR维持肠黏膜屏障完整性的作用及机制进行了研究, 发现VDR KO小鼠结肠黏膜显示严重的溃疡, 伤口愈合不良, 肠黏膜单层细胞电阻显著降低, 细胞培养显示1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>可刺激上皮细胞迁移, 提高连接蛋白的表达和单层细胞电阻, 显著提高由Caco-2单层细胞建立的紧密连接, 维持结构完整性, 加入VDR的小干扰RNA则降低Caco-2单层细胞的连接蛋白水平和单层细胞电阻, 提示VDR通过在黏膜屏障平衡中扮演关键角色, VD缺乏可能危害黏膜屏障, 导致黏膜损伤及产生IBD的风险加大. 一旦抗原成分侵入机体, 维生素D通过抑制细胞免疫<sup>[27]</sup>, 及自身反应的细胞毒性T细胞激活来调整免疫反应<sup>[29]</sup>. 由此可见维生素D可调节黏膜表面菌群, 抑制肠腔细菌黏附, 调整紧密连接蛋白, 维持黏膜屏障完整, 抑制致病菌入侵及移位, 调整免疫反应等结肠炎发病的各个环节均发挥重要作用.

另外, Zhu *et al*<sup>[69]</sup>在对维生素D的研究中发现, 钙可能与维生素D具有协同作用. 食物中去除钙, 可加重IL-10 KO小鼠IBD的严重程度; 给予钙或1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>使IBD一定程度缓解; 当同时给予钙和1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>则IBD程度及其轻微. 并认为钙或1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>可减少刀豆蛋白-A刺激的脾细胞分泌TNF- $\alpha$ 、抑制TNF- $\alpha$ 相关基因表达, 对免疫干细胞分化具有作用.

## 7 结论

同卵双胞胎IBD同时发病的机率最高为50%, 给遗传学带来了困惑, 同时也为控制IBD的发病带来了希望, 预防细菌侵入及其保守成分造成的免疫损伤, 防止疾病的反复发作, 是控制IBD的关键. 但由于IBD病因及发病机制不明确, 临床治疗进展缓慢. 维生素D在抗结核研究方面的效果鼓舞人心, 且其作用机制契合我们对IBD有限的了解, 同时由于肠道黏膜不能接触到紫外线, 局部维生素D羟化酶可能发挥更大的作用, 况且国外的统计数据表明大约32%-77% IBD患者有骨密度减低, 而且维生素D可通过抑制细胞增殖周期及血管生成具有抗癌作用<sup>[70]</sup>, VDR的基因多态性可能参与了结肠癌的发病<sup>[71]</sup>, 维生素D可能对降低IBD患者癌症的风险具有作用. 可以预见维生素D对于IBD有很大应用前景, 并可能是

一种的辅助治疗预防复发的有效有效措施, 我们期待着更多关于维生素D对IBD的治疗循证医学的证据, 特别是中心协作进行随机、双盲、对照的前瞻性研究.

## 8 参考文献

- 1 Dowling GB. The present status of vitamin D<sub>2</sub> in the treatment of lupus vulgaris. *Dermatologica* 1957; 115: 491-495
- 2 Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, Packe GE, Davidson RN, Eldridge SM, Maunsell ZJ, Rainbow SJ, Berry JL, Griffiths CJ. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 208-213
- 3 White JH. Vitamin D signaling, infectious diseases and regulation of innate immunity. *Infect Immun* 2008 May 27. [Epub ahead of print]
- 4 Do JE, Kwon SY, Park S, Lee ES. Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 840-848
- 5 Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. TLR ligands that stimulate the metabolism of vitamin D<sub>3</sub> in activated murine dendritic cells can function as effective mucosal adjuvants to subcutaneously administered vaccines. *Vaccine* 2008; 26: 601-613
- 6 Li A, He M, Wang H, Qiao B, Chen P, Gu H, Zhang M, He S. All-trans retinoic acid negatively regulates cytotoxic activities of nature killer cell line 92. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 42-47
- 7 Maggini S, Wintergerst ES, Beveridge S, Hornig DH. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr* 2007; 98 Suppl 1: S29-S35
- 8 McCurry KR, Colvin BL, Zahorchak AF, Thomson AW. Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation. *Transpl Int* 2006; 19: 525-538
- 9 Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol* 2007; 8: 5
- 10 Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311: 1770-1773
- 11 Adorini L, Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Uskokovic M. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 437-441
- 12 Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. Vitamin D<sub>3</sub>-mediated alterations to myeloid dendritic cell trafficking in vivo expand the scope of their antigen presenting properties. *Vaccine* 2007; 25: 1236-1249
- 13 Dong X, Lutz W, Schroeder TM, Bachman LA, Westendorf JJ, Kumar R, Griffin MD. Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16007-16012
- 14 Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA,

### ■应用要点

通过维生素D对免疫系统、抗微生物的作用, 预测维生素D缺乏可能参与了IBD的发病, 其可能会成为IBD治疗及预防恶变的药物.

# ■名词解释

抗菌肽:是生物体内经诱导产生的一类具有生物活性的小分子多肽,存在于多种生物体中,是宿主免疫防御系统的一个重要组成部分。这些抗菌肽能作用于G<sup>-</sup>、G<sup>+</sup>、真菌、寄生虫、癌细胞甚至是包膜病毒,而绝大多数抗菌肽对哺乳动物正常细胞无害,并且其杀菌机制与传统抗生素完全不同,被学者们认为是一种天然抗生素而备受青睐。

- Roberts AB. TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174: 2061-2070
- 15 Meindl S, Rot A, Hoetzenecker W, Kato S, Cross HS, Elbe-Bürger A. Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br J Dermatol* 2005; 152: 231-241
- 16 Penna G, Amuchastegui S, Laverny G, Adorini L. Vitamin D receptor agonists in the treatment of autoimmune diseases: selective targeting of myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Bone Miner Res* 2007; 22 Suppl 2: V69-V73
- 17 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367
- 18 Grande A, Montanari M, Tagliafico E, Manfredini R, Marani TZ, Siena M, Tenedini E, Gallinelli A, Ferrari S. Physiological levels of 1alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 641-651
- 19 Long KZ, Nanthakumar N. Energetic and nutritional regulation of the adaptive immune response and trade-offs in ecological immunology. *Am J Hum Biol* 2004; 16: 499-507
- 20 Hance KW, Rogers CJ, Hursting SD, Greiner JW. Combination of physical activity, nutrition, or other metabolic factors and vaccine response. *Front Biosci* 2007; 12: 4997-5029
- 21 朱可建, 劳力民, 茅晓红. 维生素D3及其类似物对树突细胞表达和分泌白介素10的作用. *中华皮肤科杂志* 2004; 37: 512-514
- 22 Dharajiya N, Choudhury BK, Bacsí A, Boldogh I, Alam R, Sur S. Inhibiting pollen reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-induced signal by intrapulmonary administration of antioxidants blocks allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 646-653
- 23 Froicu M, Zhu Y, Cantorna MT. Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology* 2006; 117: 310-318
- 24 Du X, Tabeta K, Mann N, Crozat K, Mudd S, Beutler B. An essential role for R $\alpha$  in the development of Th2 responses. *Eur J Immunol* 2005; 35: 3414-3423
- 25 Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab* 2007; 51: 301-323
- 26 Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167: 4974-4980
- 27 O'Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, Bishop J, Norman A, Koeffler HP. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* 2002; 109: 1091-1099
- 28 Mathieu C, Jafari M. Immunomodulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: therapeutic implications in hemodialysis and renal transplantation. *Clin Nephrol* 2006; 66: 275-283
- 29 Matsuzaki J, Tsuji T, Zhang Y, Wakita D, Imazeki I, Sakai T, Ikeda H, Nishimura T. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 downmodulates the functional differentiation of Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells beneficial for cytotoxic T lymphocyte generation. *Cancer Sci* 2006; 97: 139-147
- 30 Mathonnet M, Fermeaux V. [Colon cancer in pregnancy] *J Chir (Paris)* 2003; 140: 221-224
- 31 Liberman UA. Vitamin D-resistant diseases. *J Bone Miner Res* 2007; 22 Suppl 2: V105-V107
- 32 Kaneko A, Urnaa V, Nakamura K, Kizuki M, Seino K, Inose T, Takano T. Vitamin D receptor polymorphism among rickets children in Mongolia. *J Epidemiol* 2007; 17: 25-29
- 33 石艳军, 沈轶, 蔡立清, 胡峰, 杨艳燕. 维生素D受体基因多态性与糖尿病的相关性. *中国糖尿病杂志* 2007; 15: 219-221
- 34 Crowle AJ, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25(OH)2-vitamin D3 of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun* 1987; 55: 2945-2950
- 35 Liu N, Nguyen L, Chun RF, Lagishetty V, Ren S, Wu S, Hollis B, Deluca HF, Adams JS, Hewison M. Altered endocrine and autocrine metabolism of vitamin D in a mouse model of gastrointestinal inflammation. *Endocrinology* 2008 Jun 5. [Epub ahead of print]
- 36 张增利, 李冰燕, 童建. 利用基因敲除小鼠研究维生素D在免疫功能发育中的作用. *中华微生物学和免疫学杂志* 2007; 27: 260-263
- 37 Christakos S, Dhawan P, Peng X, Obukhov AG, Nowycky MC, Benn BS, Zhong Y, Liu Y, Shen Q. New insights into the function and regulation of vitamin D target proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 405-410
- 38 Weersma RK, van Dullemen HM, van der Steege G, Nolte IM, Kleibeuker JH, Dijkstra G. Review article: Inflammatory bowel disease and genetics. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 2: 57-65
- 39 Noble C, Nimmo E, Gaya D, Russell RK, Satsangi J. Novel susceptibility genes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1991-1999
- 40 Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 2007; 179: 2060-2063
- 41 Lynch S. Influence of infection/inflammation, thalassemia and nutritional status on iron absorption. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77: 217-223
- 42 Sita-Lumsden A, Lapthorn G, Swaminathan R, Milburn HJ. Reactivation of tuberculosis and vitamin D deficiency: the contribution of diet and exposure to sunlight. *Thorax* 2007; 62: 1003-1007
- 43 Babb C, van der Merwe L, Beyers N, Pfeiffer C, Walzl G, Duncan K, van Helden P, Hoal EG. Vitamin D receptor gene polymorphisms and sputum conversion time in pulmonary tuberculosis patients. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; 87: 295-302
- 44 Kerekes G, Szekanecz Z, Dér H, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipő I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomják E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol* 2008; 35: 398-406
- 45 Ginanjar E, Sumariyono, Setiati S, Setiyohadi B.

- Vitamin D and autoimmune disease. *Acta Med Indones* 2007; 39: 133-141
- 46 Varghese B, Haase N, Low PS. Depletion of folate-receptor-positive macrophages leads to alleviation of symptoms and prolonged survival in two murine models of systemic lupus erythematosus. *Mol Pharm* 2007; 4: 679-685
- 47 Taddei S, Caraccio N, Virdis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Ferrannini E, Salvetti A, Monzani F. Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 5076-5082
- 48 Shuster EA. Hormonal influences in multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 318: 267-311
- 49 Sherr J, Sosenko J, Skyler JS, Herold KC. Prevention of type 1 diabetes: the time has come. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 334-343
- 50 Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Therapeutic potential of vitamin D for multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 2008; 15: 499-505
- 51 Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut* 2000; 47: 211-214
- 52 Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 60-64
- 53 Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2000; 130: 2648-2652
- 54 Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2386-2392
- 55 Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-1359
- 56 Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 105-118
- 57 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521
- 58 Martinesi M, Treves C, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG, Stio M. Vitamin D derivatives induce apoptosis and downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 597-604
- 59 Zouboulis CC, Baron JM, Bohm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, Thielitz A. Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol* 2008; 17: 542-551
- 60 Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 991-998
- 61 Osanai M, Murata M, Nishikiori N, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. *Cancer Res* 2006; 66: 9125-9133
- 62 Murphy EF, Jewell C, Hooiveld GJ, Muller M, Cashman KD. Conjugated linoleic acid enhances transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells: an insight into molecular changes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 74: 295-301
- 63 Kutuzova GD, Deluca HF. Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. *Arch Biochem Biophys* 2004; 432: 152-166
- 64 Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA, Kim KW. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull* 2008; 75: 619-628
- 65 Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> Absorption between Enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 1912-1921
- 66 Ara C, Devirgiliis LC, Massimi M. Influence of retinoic acid on adhesion complexes in human hepatoma cells: a clue to its antiproliferative effects. *Cell Commun Adhes* 2004; 11: 13-23
- 67 Hong SP, Kim MJ, Jung MY, Jeon H, Goo J, Ahn SK, Lee SH, Elias PM, Choi EH. Biopositive Effects of Low-Dose UVB on Epidermis: Coordinate Upregulation of Antimicrobial Peptides and Permeability Barrier Reinforcement. *J Invest Dermatol* 2008 Jun 26. [Epub ahead of print]
- 68 Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, Bissonnette M, Li YC. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G208-G216
- 69 Zhu Y, Mahon BD, Froicu M, Cantorna MT. Calcium and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2005; 35: 217-224
- 70 Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther* 2007; 3: 225-230
- 71 Parisi E, Reñé JM, Cardús A, Valcheva P, Piñol-Felis C, Valdivielso JM, Fernández E. Vitamin D receptor levels in colorectal cancer Possible role of BsmI polymorphism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008 May 23. [Epub ahead of print]

#### 同行评价

本文系综述性文章, 研究内容简单, 技术难度不大, 但研究立题有依据, 综述的内容集中, 观点明确, 条理性颇强, 参考文献适当, 结果对IBD的临床有参考意义。

编辑 李军亮 电编 何基才



# 再生基因家族与消化系统肿瘤

郑声琴, 何杰

## ■背景资料

再生基因家族自被发现以来, 尤其在糖尿病、炎症创伤和肿瘤尤其是消化系统肿瘤中的作用的研究越来越多。

郑声琴, 南京市第二医院十七病区 210009  
何杰, 东南大学附属中大医院 江苏省南京市 210009  
作者贡献分布: 本文由郑声琴综述; 何杰审校。  
通讯作者: 郑声琴, 210009, 江苏省南京市, 南京市第二医院十七病区. zhengshengqin0310@163.com  
电话: 025-83626473  
收稿日期: 2008-06-02 修回日期: 2008-07-07  
接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Advances in regenerating gene family and digestive system neoplasms

Sheng-Qin Zheng, Jie He

Sheng-Qin Zheng, the 17<sup>th</sup> Endemic Area of the Second Hospital of Nanjing City, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China  
Jie He, Zhong Da Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Sheng-Qin Zheng, 210009, the 17<sup>th</sup> Endemic Area of the Second Hospital of Nanjing City, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. zhengshengqin0310@163.com  
Received: 2008-06-02 Revised: 2008-07-07  
Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

## Abstract

Since the first member of regenerating gene (Reg) family was discovered in 1988, it has been verified that regenerating genes play important roles in diabetes, inflammation and injury, and digestive system tumors. Now, more members of Reg family have been cloned. With further investigations, the great role of Reg family, especially Reg IV, in digestive system neoplasms has attracted more and more attention.

**Key Words:** Regenerating gene family; Reg IV; Neoplasm; Digestive system

Zheng SQ, He J. Advances in regenerating gene family and digestive system neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2644-2648

## ■同行评议者

张凤春, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心主任; 李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

## 摘要

再生基因家族自1988年被发现以来, 其在糖尿病、炎症创伤和肿瘤尤其是消化系统肿瘤中的作用越来越受到重视。目前, 越来越多的再生基因家族成员被发现。随着相关研究的逐步

深入, 再生基因家族在肿瘤中所起的重要作用, 尤其是Reg IV在消化系统肿瘤中作用越来越引起人们的注意。

**关键词:** 再生基因家族; Reg IV; 肿瘤; 消化系统肿瘤

郑声琴, 何杰. 再生基因家族与消化系统肿瘤. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2644-2648

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2644.asp>

## 0 引言

再生基因(regenerating gene, Reg)家族自1988年被发现以来, 其在糖尿病、炎症创伤和肿瘤尤其是消化系统肿瘤中的作用越来越受到重视。Reg家族的作用最早是在糖尿病的研究中发现的。目前知道Reg家族可促进胰岛细胞的增殖, 改善糖尿病病鼠的疾病状态。近年来随着研究的深入, Reg家族在肿瘤中的重要作用逐渐被人们所注意。Reg家族尤其是Reg I 和Reg IV在消化系统肿瘤中表达明显上调, 可能起到癌基因的作用, 并可能作为肿瘤的重要标志物而应用于临床, 但Reg家族在肿瘤的发生发展中的确切机制还在进一步的研究中。

## 1 再生基因家族

Reg家族属钙依赖的植物血凝素超家族, 他代表一组分泌蛋白, 其功能相当于急性反应蛋白、抗凋亡因子或胰腺β细胞和神经细胞的分泌因子<sup>[1]</sup>。根据Reg基因编码蛋白的一级结构, Reg家族可分为四个亚型(I、II、III、IV), Reg I 包括Reg I α和Reg I β<sup>[2]</sup>。到目前为止, 所有Reg家族具有相似的基因结构, 均含有5个内含子和6个外显子, 编码158-175个氨基酸的分泌蛋白。除了Reg IV定位在1号染色体外, 其余均在2号染色体<sup>[3]</sup>。胰腺上的Reg基因产物能诱导β细胞凋亡, Reg I 与β细胞再生有关, 在1型糖尿病, Reg II被认为是β细胞上的一种抗原物质, 他能启动T细胞应答<sup>[4]</sup>。Reg蛋白通过其受体发挥功能, 实验证明Reg蛋白通过其受体介导从而诱导β细胞

的再生来缓解实验性糖尿病. Reg蛋白可能不仅只是对 $\beta$ 细胞再生非常关键, 而且还在其他各种生理活动中起调节作用. Reg家族参与肝、胰、胃和肠细胞的增殖分化, 与糖尿病、炎症与创伤、肿瘤有关<sup>[5]</sup>.

## 2 再生基因家族的生物学作用

Reg家族的生物学作用涉及到炎症损伤反应、糖尿病和肿瘤等. Reg I 具有促进胰腺再生, 促进胰腺导管和 $\beta$ 细胞有丝分裂的作用. Bluth *et al*<sup>[6]</sup>研究发现Reg I 蛋白及Reg I 受体mRNA在急性胰腺炎的小鼠胰腺中表达上调, 急性胰腺炎主要导致导管和腺泡的Reg I 蛋白增加, 而导致导管、胰岛和腺泡的Reg I 受体增加三倍. 这表明诱导Reg I 蛋白及Reg I 受体生成可能是急性胰腺炎恢复的一种有效方法. Reg蛋白是除了表皮生长因子, 转化生长因子 $\alpha$ 、 $\beta$ 和肝细胞生长因子之外的另一个对胃细胞再生起作用的基因. Reg I 是一个对胃细胞再生起作用的基因, Reg I 具有促进胃黏膜组织增殖和再生的作用. Ose *et al*<sup>[7]</sup>研究进一步揭示了鼠的Reg I 的促进增殖和再生作用是小肠绒毛的增殖和修复所必需的. Reg I  $\alpha$ 基因的表达还提示胃黏膜的再生进程. 对尸检患者的检测结果发现, 胃泌素与Reg I mRNA峰度相关, 免疫组化检测Reg定位于主细胞和大鼠的胃类嗜铬细胞. 组织芯片研究表明, RegIV主要在消化系统表达, 包括胃、小肠、结肠及胰腺. Kazumori *et al*<sup>[2]</sup>研究进一步证明Reg选择性表达于肠黏膜的神经内分泌细胞及胃黏膜的壁细胞; 炎症性肠病和胃溃疡等导致的黏膜损伤、再生及化生时, RegIV表达明显升高; RegIV在胃肠道肿瘤的发生发展中亦可能具有重要作用, 可能起到癌基因的作用, 其确切机制正在进一步的研究中.

## 3 再生基因家族的调节机制

Reg家族的调节机制目前还不是很清楚, 正在进一步的研究中. Kämäräinen *et al*<sup>[8]</sup>研究了Reg转录的有关机制. 他们用IL26和地塞米松诱导Reg在 $\beta$ 细胞表达. 报告基因分析显示: Reg启动子约在-81到-70区, 是个再生基因表达的顺式反应元件. 凝胶滞后实验显示PARP多聚(ADP2核糖)聚合酶(poly(ADP2ribos-e) synthetase/polymerase)涉及到活化的转录DNA/蛋白复合物, 这种复合物的形成受PARP调节. 其可能的调节机制涉及 $\beta$ 细胞中的再生基因转录和DNA修复.

Zhong *et al*<sup>[9]</sup>认为Reg II 是胰腺外分泌功能损伤的产物, 他的表达受角质素结构的调控. Reg家族可促进 $\beta$ 细胞增殖, 目前Reg蛋白被认为是自身免疫性糖尿病的一种自身抗原. 胰腺 $\beta$ 细胞的IFN $\beta$ 表达促进了1型糖尿病的形成, 而Planas *et al*<sup>[10]</sup>研究表明Reg的过表达加速糖尿病的形成, Reg蛋白的表达受多种因素如炎症因子等的调节, 因此在炎症的时候IFN $\beta$ 通过调节Reg蛋白过表达而导致糖尿病. Reg家族成员在内分泌细胞中的表达具有谱系, 并在多种内分泌细胞中起调节作用. Hervieu *et al*<sup>[11]</sup>研究发现RegIII在正常小肠、升结肠、胰腺中表达, 在胰高血糖素导致的小肠胰管的内分泌细胞和肿瘤性的内分泌细胞中也均有表达.

## 4 再生基因家族与肿瘤

目前, Reg家族在肿瘤中的作用逐渐引起了人们的重视, 越来越多的学者对Reg家族与肿瘤的关系进行了研究, 尤其是Reg I 和RegIV与消化系统肿瘤有密切关系.

**4.1 再生基因家族与食道癌** Reg家族与食管癌的研究主要集中在Reg I. 目前知道, 巴雷特食管是食管癌的癌前病变, 细胞增生过快是巴雷特食管延长或恶变的重要因素. Chinuki *et al*<sup>[12]</sup>研究显示Reg I 在巴雷特食管的表达阳性率为18%(48/266), 尤其在有鳞状上皮化生的巴雷特食管上常见. 而Reg家族作为上皮生长因子后抗凋亡因子, 在巴雷特食管中表达上调, 认为其可能在巴雷特食管恶变中起重要作用. Motoyama *et al*<sup>[13]</sup>研究发现对新辅助化疗敏感的组织学上Reg I 阳性的局部进展期胸段食管鳞癌患者其累计存活率明显高于对新辅助化疗敏感的组织学上Reg I 阴性的患者, 从而表明Reg I 的表达预示了局部进展期胸段食管鳞癌患者予以食管切除术后新辅助化疗可获得长期生存. Hayashi *et al*<sup>[14]</sup>也认为Reg I  $\alpha$ 在食管鳞癌的表达可能为食管鳞癌的放化疗敏感性的一个可靠标记物, Reg I  $\alpha$ 表达阳性的患者对放化疗有较好敏感性, 这可能对患者提供更好的个体化治疗有帮助.

**4.2 再生基因家族与胃癌** Reg I 不仅存在于正常胃黏膜, 而且存在于胃癌组织. Sekikawa *et al*<sup>[15]</sup>认为在胃癌的发展过程中, Reg I  $\alpha$ 可以被细胞因子诱导, 其基因产物可能是一种促有丝分裂因子或抗凋亡因子. 在胃癌细胞中, Reg I  $\alpha$ 通过介导STAT3信号通路的抗凋亡作用导致肿瘤的

■ 研发前沿  
国内对再生基因家族的研究较少.

## ■创新盘点

目前国内还未见再生基因家族和消化系统肿瘤的关系的相关综述。

发生, Reg I  $\alpha$ 在胃癌的发生中具有重要作用<sup>[16]</sup>. RegIV亦为胃癌中表达上调基因之一, 在胃癌的发生发展中具有重要价值. Oue *et al*<sup>[17]</sup>用免疫组化的方法研究发现正常胃组织不表达RegIV, 而癌组织的表达率为29.4%, 胃癌中RegIV的表达与肿瘤分级和预后无相关性. Oqe *et al*<sup>[18]</sup>发现在47.8%的胃癌中RegIV的表达增强, 并认为RegIV的表达与肿瘤的浸润和转移有关, 且RegIV可以作为胃癌的一种特殊的生物标记物. Miyagawa *et al*<sup>[19-21]</sup>采用RT-PCR检测胃癌细胞系及临床胃癌标本中的Reg IV, 发现腹膜播散的胃癌细胞系及胃癌组织高表达RegIV mRNA, 而且mRNA丰度与癌细胞浸润腹膜厚度成正比, 提示RegIV基因的高表达可能与胃癌的发生、腹膜播散及侵袭能力有关; RegIV在伴腹膜播散的胃癌中的表达水平是正常黏膜的20倍, 而且RegIV在伴腹膜播散的胃癌中的表达水平明显高于不伴腹膜播散的胃癌, 从而表明RegIV与胃癌有关, 并可能是胃癌发生腹膜转移的一个生物标记; RegIV在伴腹膜转移的胃癌中的表达明显高于不伴腹膜转移的胃癌, 动物实验表明RegIV稳定表达能明显增加胃癌的腹膜转移, 因此认为RegIV可能为一个独立的预后因素, 可能成为检测胃癌腹膜转移的一个标记物. 马华 *et al*<sup>[22]</sup>的研究还发现 I/II期胃癌不表达RegIV蛋白, 而III/IV期胃癌阳性率为47.83%, 提示RegIV蛋白可能参与胃癌的生长侵袭等过程, 作为临床病理诊断浸润性胃癌的标志物具有重要的参考价值. Mitani *et al*<sup>[23]</sup>认为在胃癌中, 血清RegIV的诊断敏感性优于CEA和CA199, RegIV是预测胃癌患者对含5-FU化疗反感敏感性的一个标记物, RegIV阳性表达的患者较易对5-FU产生耐药.

4.3 再生基因家族与结直肠癌 Reg家族与结直肠癌的关系今年来逐渐引起了人们的注意, 尤其是RegIV在结直肠癌中的作用是近几年研究的热点. 在溃疡性结肠炎-结肠癌事件中, Reg I  $\alpha$ 可以被细胞因子诱导, 其基因产物可能是一种促有丝分裂因子或抗凋亡因子, 促进了溃疡性结肠炎向结肠癌的恶变, 表明Reg I  $\alpha$ 可能在结直肠癌发生的早期其作用<sup>[24]</sup>. RegIV不仅序列与Reg I 同源, 结构有相似之处, 在结直肠癌中的上调率也与Reg I 相近, 那么他在结直肠肿瘤的发生发展中起着重要作用. Violette *et al*<sup>[25]</sup>通过DD-PCR对HT-29耐药的结肠癌细胞株进行筛选, 然后用实时定量PCR、Northern证实了Reg IV在71%的结直肠癌, 特别是黏液腺癌中高表

达. Zhang *et al*<sup>[26-27]</sup>的研究也表明RegIV在结直肠癌中过度表达, 并认为RegIV在结直肠癌的发生发展中可能起重要作用, RegIV的表达可能在结直肠癌早期即发生, 从而RegIV的检测也许可以作为肿瘤转移的一个早期诊断. RegIV的上调与结直肠腺瘤的发生有关, 他的上调在结直肠腺瘤癌变区特别明显, RegIV可能是癌发生的早期标志物, 其表达上调可能与预后有关<sup>[28]</sup>. Reg IV基因在大肠癌中的过表达以及其在血清中的浓度与肝转移相关, RegIV是大肠癌预后差的一个重要预测因素. Bishnupuri *et al*<sup>[29-30]</sup>研究发现Reg基因家族, 尤其是RegIV通过调控抗凋亡基因如Bcl-2、Bcl-X1等介导大肠癌的发生, 认为RegIV通过激活EGFR/Ak-t/AP-1信号通路参与大肠腺瘤的发生发展, 因此阻断Reg信号可能成为治疗大肠腺瘤的一种干预手段.

4.4 再生基因家族与胰腺癌 再生基因与胰腺癌的研究主要集中在RegIV基因. Takehara *et al*<sup>[31]</sup>在早期胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)的血清中检测到RegIV基因, 他们认为RegIV基因可作为一种肿瘤标记物来筛选PDAC, 并且RegIV基因的抗体可能提供一种新的治疗PDAC的方法. Takehara *et al*<sup>[31]</sup>研究发现RegIV在胰腺癌中高表达, 体外实验表明Reg IV单抗能拮抗RegIV的抗凋亡作用, 抑制胰腺癌细胞的生长, 因此认为RegIV可能成为诊断早期胰腺癌的肿瘤标记物, RegIV单抗可能为治疗胰腺癌提供一种新的治疗手段.

## 5 结论

再生基因家族与肿瘤的关系密切, 尤其是在消化系肿瘤组织中可见异常表达, Reg基因的表达增加可以解释溃疡性结肠炎或克隆病的病例患结肠癌的比例增加. 再生基因家族尤其是Reg I 和RegIV可能在肿瘤发生发展中起到癌基因的作用, 但其确切机制还在研究中. 再生基因家族有望成为肿瘤靶基因治疗的又一个新靶点, 预示了其潜在的应用价值. 但再生基因家族参与肿瘤发生发展的确切的分子机制、调控机制、受体及受体后途径还需要进一步的研究.

## 6 参考文献

- 1 Broekaert D, Eyckerman S, Lavens D, Verhee A, Waelput W, Vandekerckhove J, Tavernier J. Comparison of leptin- and interleukin-6-regulated expression of the rPAP gene family: evidence for differential co-regulatory signals. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 78-85
- 2 Kazumori H, Ishihara S, Fukuda R, Kinoshita Y.

## ■应用要点

本文为以后致力于再生基因家族研究的学者提供参考。



- Localization of Reg receptor in rat fundic mucosa. *J Lab Clin Med* 2002; 139: 101-108
- 3 Nata K, Liu Y, Xu L, Ikeda T, Akiyama T, Noguchi N, Kawaguchi S, Yamauchi A, Takahashi I, Shervani NJ, Onogawa T, Takasawa S, Okamoto H. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III. *Gene* 2004; 340: 161-170
- 4 Liu JL, Cui W, Li B, Lu Y. Possible roles of reg family proteins in pancreatic islet cell growth. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008; 8: 1-10
- 5 Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2635-2641
- 6 Bluth MH, Patel SA, Dieckgraefe BK, Okamoto H, Zenilman ME. Pancreatic regenerating protein (reg I) and reg I receptor mRNA are upregulated in rat pancreas after induction of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4511-4516
- 7 Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, Otani H, Takasawa S, Okamoto H, Kinoshita Y. Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. *Oncogene* 2007; 26: 349-359
- 8 Kämäräinen M, Heiskala K, Knuutila S, Heiskala M, Winqvist O, Andersson LC. RELP, a novel human REG-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa. *Am J Pathol* 2003; 163: 11-20
- 9 Zhong B, Strnad P, Toivola DM, Tao GZ, Ji X, Greenberg HB, Omary MB. Reg-II is an exocrine pancreas injury-response product that is up-regulated by keratin absence or mutation. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4969-4978
- 10 Planas R, Alba A, Carrillo J, Puertas MC, Ampudia R, Pastor X, Okamoto H, Takasawa S, Gurr W, Pujol-Borrell R, Verdaguer J, Vives-Pi M. Reg (regenerating) gene overexpression in islets from non-obese diabetic mice with accelerated diabetes: role of IFN $\beta$ . *Diabetologia* 2006; 49: 2379-2387
- 11 Hervieu V, Christa L, Gouysse G, Bouvier R, Chayvialle JA, Bréchet C, Scoazec JY. HIP/PAP, a member of the reg family, is expressed in glucagon-producing enteropancreatic endocrine cells and tumors. *Hum Pathol* 2006; 37: 1066-1075
- 12 Chinuki D, Amano Y, Ishihara S, Moriyama N, Ishimura N, Kazumori H, Kadowaki Y, Takasawa S, Okamoto H, Kinoshita Y. REG I $\alpha$  protein expression in Barrett's esophagus. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 296-302
- 13 Motoyama S, Sugiyama T, Ueno Y, Okamoto H, Takasawa S, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Okuyama M, Ogawa J. REG I expression predicts long-term survival among locally advanced thoracic squamous cell esophageal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by esophagectomy. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1724-1731
- 14 Hayashi K, Motoyama S, Sugiyama T, Izumi J, Anbai A, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Minamiya Y, Koyota S, Koizumi Y, Takasawa S, Murata K, Ogawa J. REG I $\alpha$  is a reliable marker of chemoradiosensitivity in squamous cell esophageal cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1224-1231
- 15 Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Takeda J, Nanakin A, Hisatsune H, Seno H, Takasawa S, Okamoto H, Fujimori T, Chiba T. REG I $\alpha$  protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer. *Gastroenterology* 2005; 128: 642-653
- 16 Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. REG I $\alpha$  protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 76-83
- 17 Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H, Yasui W. Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Reg IV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. *J Pathol* 2005; 207: 185-198
- 18 Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung PP, Kuraoka K, Nakayama H, Yasui W. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004; 64: 2397-2405
- 19 Miyagawa K, Sakakura C, Kin S, Nakase Y, Fukuda K, Hagiwara A, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. [Over expression of Reg IV in peritoneal dissemination of gastric cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31: 1909-1911
- 20 Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Fukuda K, Hagiwara A, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. [Analysis of Reg IV expression in peritoneal dissemination of gastric cancer using real-time RT-PCR] *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32: 1707-1708
- 21 Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Shimomura K, Oue N, Yasui W, Hayashizaki H, Okazaki Y, Yamagishi H, Hagiwara A, Otsuji E. Overexpression of RegIV in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as A novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis. *Anticancer Res* 2008; 28: 1169-1179
- 22 马华, 梅峰, 马千里, 张红军, 周德山. Reg IV在胃癌中的表达及其临床意义. 第三军医大学学报 2006; 28: 441-443
- 23 Mitani Y, Oue N, Matsumura S, Yoshida K, Noguchi T, Ito M, Tanaka S, Kuniyasu H, Kamata N, Yasui W. Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene* 2007; 26: 4383-4393
- 24 Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Kusaka T, Ueno S, Nakase H, Seno H, Fujimori T, Chiba T. Possible role of REG I $\alpha$  protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut* 2005; 54: 1437-1444
- 25 Violette S, Festor E, Pandrea-Vasile I, Mitchell V, Adida C, Dussaulx E, Lacorte JM, Chambaz J, Lacasa M, Lesuffleur T. Reg IV, a new member of the regenerating gene family, is overexpressed in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2003; 103: 185-193
- 26 Zhang Y, Lai M, Gu X, Luo M, Shao L. Reg IV, a differentially expressed gene in colorectal adenoma. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 918-922
- 27 Zhang Y, Lai M, Lv B, Gu X, Wang H, Zhu Y, Zhu Y, Shao L, Wang G. Overexpression of Reg IV in

#### ■同行评价

本文内容新颖, 语言流畅, 具有较好的学术价值。

- colorectal adenoma. *Cancer Lett* 2003; 200: 69-76
- 28 Oue N, Kuniyasu H, Noguchi T, Sentani K, Ito M, Tanaka S, Setoyama T, Sakakura C, Natsugoe S, Yasui W. Serum concentration of Reg IV in patients with colorectal cancer: overexpression and high serum levels of Reg IV are associated with liver metastasis. *Oncology* 2007; 72: 371-380
- 29 Bishnupuri KS, Luo Q, Korzenik JR, Henderson JO, Houchen CW, Anant S, Dieckgraefe BK. Dysregulation of Reg gene expression occurs early in gastrointestinal tumorigenesis and regulates anti-apoptotic genes. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1714-1720
- 30 Bishnupuri KS, Luo Q, Murmu N, Houchen CW, Anant S, Dieckgraefe BK. Reg IV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2006; 130: 137-149
- 31 Takehara A, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Kasugai T, Hosokawa M, Katagiri T, Nakamura Y, Nakagawa H. Novel tumor marker REG4 detected in serum of patients with resectable pancreatic cancer and feasibility for antibody therapy targeting REG4. *Cancer Sci* 2006; 97: 1191-1197

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志外文字符标准

**本刊讯** 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T, V<sub>max</sub>不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °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>, *V*<sub>d</sub>, *T*<sub>1/2</sub>, *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# DNA聚合酶 $\beta$ 基因启动子在食管癌组织中的突变分析

李月白, 于雅丽, 赵国强, 王欢, 董子明

李月白, 于雅丽, 王欢, 郑州大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 河南省郑州市 450001

赵国强, 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室 河南省郑州市 450001

董子明, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 河南省郑州市 450001

国家自然科学基金资助项目, No. 30471952

作者贡献分布: 此课题由董子明, 李月白及赵国强设计; 研究过程由李月白, 于雅丽, 赵国强及王欢操作完成; 数据分析由李月白, 赵国强和董子明完成; 本论文写作由李月白, 于雅丽, 赵国强及董子明完成。

通讯作者: 董子明, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室. dongziming@zzu.edu.cn

收稿日期: 2008-02-26 修回日期: 2008-07-12

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Mutation analysis of DNA polymerase $\beta$ gene promoter in human esophageal cancer

Yue-Bai Li, Ya-Li Yu, Guo-Qiang Zhao, Huan Wang, Zi-Ming Dong

Yue-Bai Li, Ya-Li Yu, Huan Wang, Department of Biochemistry, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Guo-qiang Zhao, Department of Microbiology and Immunology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Zi-ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471952

Correspondence to: Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. dongziming@zzu.edu.cn

Received: 2008-02-26 Revised: 2008-07-12

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the mutations of DNA polymerase  $\beta$  (pol $\beta$ ) gene promoter in esophageal cancer tissue, the corresponding cancer-adjacent tissue and distal normal mucosal tissue.

**METHODS:** We examined the promoter sequence of pol $\beta$  gene in tumor tissues, the corresponding cancer-adjacent tissues and normal mucosal tissues from 25 patients with esophageal cancer using polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequence analysis. DNASIS and OMIGA softwares were used to analyze the

DNA sequencing results.

**RESULTS:** The mutation of pol $\beta$  gene promoter was found in 8 esophageal cancer tissues, 6 corresponding cancer-adjacent tissues and 5 normal mucosa tissues, respectively. No significant change was found among three groups. There were 18, 9 and 8 mutation points in three groups (35 mutation points in total), respectively. Of the 35 mutation points, 25 located the core region of pol $\beta$  gene promoter. In all the specimens, mutation forms of C $\rightarrow$ A at -37 nt, G $\rightarrow$ T at -65 nt, and T $\rightarrow$ C at 29 nt were found 8, 7 and 2 times, respectively. Also, the mutation form of C deletion and insertion at -19 nt was found one time, respectively.

**CONCLUSION:** The mutation of DNA pol $\beta$  gene promoter may be related to the carcinogenesis and development of esophageal cancer.

**Key Words:** DNA polymerase  $\beta$  gene; Promoter; Esophageal cancer; Gene mutation; Sequence analysis

Li YB, Yu YL, Zhao GQ, Wang H, Dong ZM. Mutation analyses of DNA polymerase  $\beta$  gene promoter in human esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2649-2652

## 摘要

**目的:** 研究人食管癌组织、癌旁组织及其远端正常黏膜组织中DNA聚合酶 $\beta$ (DNA polymerase beta, pol $\beta$ )基因启动子的突变情况。

**方法:** 采用聚合酶链反应(PCR)、DNA序列分析技术对25例食管癌患者手术切除的病变标本进行DNA pol $\beta$ 基因启动子序列检测, 并利用DNASIS、OMIGA等软件分析测序数据。

**结果:** 25例中, 食管癌组织、癌旁组织和正常黏膜组织中DNA pol $\beta$ 基因启动子发生突变者分别为8、6、5例, 三组间突变率差异无统计学意义。在三组标本中共有35个突变点(癌组织包括18个突变点, 癌旁组织包括9个突变点, 正常黏膜组织8个突变点), 25个点在pol $\beta$ 核心启动子区域, 其中, -37位C $\rightarrow$ A突变出现8次; -65位G $\rightarrow$ T突变出现7次; 29位T $\rightarrow$ C突变出

## ■背景资料

食管癌为我国常见高发的恶性肿瘤。有研究显示, 在食管癌组织中存在pol $\beta$ 基因mRNA的高表达和明显的pol $\beta$ 基因突变, 提示pol $\beta$ 基因的高表达和突变可能与食管癌的发生发展有关。为探讨pol $\beta$ 启动子是否也有突变的发生, 本实验将突变的筛查扩展到基因5'端的启动子区, 对食管癌患者癌组织中pol $\beta$ 基因启动子的突变情况进行了初步的检测和分析。

## ■同行评议者

崔立红, 副教授, 中国人民解放军海军总医院消化内科



## ■研究前沿

DNA pol $\beta$ 在脊椎动物的细胞内是一个基本表达的碱基切除修复中的关键酶,许多研究证明他参与了肿瘤的发生和发展。哺乳动物DNA修复酶DNA pol $\beta$ 的基因在大多数细胞中都是基本表达,但他以一种组织特异性的方式调节。pol $\beta$ 在细胞内的表达水平必须受到严格的调控, pol $\beta$ 表达过低、突变或缺失,均可造成DNA修复功能的缺陷,细胞中DNA的损伤不能被及时修复则导致突变或细胞毒性。启动子区是调控pol $\beta$ 基因表达的主要调控区域,当pol $\beta$ 启动子出现碱基序列的改变可能影响基因的表达及转录的稳定性,从而影响染色体的稳定性。因此,研究pol $\beta$ 基因启动子与食管癌发生发展的关系,可能成为进一步食管癌研究的热点。

现2次;-19位出现C的缺失和插入C突变各1次。

**结论:** DNA pol $\beta$ 基因启动子突变可能与食管癌的发生和发展有关。

**关键词:** DNA聚合酶 $\beta$ ; 启动子; 食管癌; 基因突变; 序列分析

李月白, 于雅丽, 赵国强, 王欢, 董子明. DNA聚合酶 $\beta$ 基因启动子在食管癌组织中的突变分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2649-2652

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2649.asp>

## 0 引言

DNA pol $\beta$ 在脊椎动物的细胞内是一个基本表达的碱基切除修复中的关键酶,许多研究证明他参与了肿瘤的发生和发展<sup>[1]</sup>。文献提示<sup>[2-3]</sup>, pol $\beta$ 在细胞中的过量表达会影响染色体的稳定性,诱导低水平的微卫星不稳定现象,从而参与肿瘤的发生发展。有研究显示<sup>[4-7]</sup>,在食管癌组织中存在pol $\beta$ 基因mRNA的高表达,且存在明显的pol $\beta$ 基因突变,提示pol $\beta$ 基因的高表达和突变可能与食管癌的发生发展有关。pol $\beta$ 启动子序列与其基因转录后调控及其表达有密切关系,当pol $\beta$ 启动子出现碱基序列的改变将通过调节影响到基因表达产物的活性和含量<sup>[8]</sup>。为探讨pol $\beta$ 启动子是否也有突变的发生,本实验将突变的筛查扩展到基因5'端的启动子区,对食管癌患者癌组织中pol $\beta$ 基因启动子的突变情况进行了初步的检测和分析。以了解食管癌、癌旁及其正常组织中pol $\beta$ 基因启动子有无突变及三者的关系,为进一步研究pol $\beta$ 启动子序列对pol $\beta$ 表达的调节作用及是否该基因的过量表达与启动子突变有关提供实验基础,也为阐明食管癌新的发生机制及基因靶向治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集河南省林州市肿瘤医院和林州市人民医院手术切除的食管癌标本25例(编号为N1-N25),均经病理检查证实为鳞状上皮细胞浸润癌,术前患者未接受任何化疗或放疗。每份标本取癌组织,癌旁组织及正常黏膜组织各一块(0.5 cm $\times$ 0.5 cm),标本离体后迅速置于-196 $^{\circ}$ C液氮保存待用。质粒pGEM-T、IPTG、X-gal、Taq酶、T4DNA连接酶均购自Promega公司,胶回收试剂盒购自AXYGEN; PCR仪为德国Biometra公司产品,紫外凝胶成像仪为美国Pharmacia公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA提取及pol $\beta$ 启动子DNA序列的PCR扩增:** 从液氮中取出食管癌、癌旁及正常组织,加液氮在研钵中研碎,用BIOSCIENCES公司AxyPrep基因组DNA小量提取试剂盒提取标本组织的总DNA。参照pol $\beta$ 基因启动子序列<sup>[9]</sup>,设计扩增pol $\beta$ 启动子引物, P1: 5'-AAAGGATTCCAGATAAACAC-3', P2: 5'-GCTGGAAGGAAAG AAGAAAG-3', 产物大小499 bp, 由上海生工公司合成。PCR 反应体积30  $\mu$ L: 10 $\times$ 缓冲液3  $\mu$ L, 5 mmol/L 4 $\times$ dNTP 2  $\mu$ L, 引物P1、P2各0.5  $\mu$ L, Promega公司高保真Taq酶2 U, 组织标本DNA模板5  $\mu$ L, 去离子水补足30  $\mu$ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性180 s, 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 55 $^{\circ}$ C复性45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 扩增25个循环。取扩增产物5  $\mu$ L, 用琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 256 nm紫外灯下观察结果。

**1.2.2 转化克隆及测序:** 用DNA胶回收试剂盒对PCR产物进行纯化, 纯化后再次用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。鉴定正确, 将纯化所得目的片段与pGEM-T 4 $^{\circ}$ C连接过夜后, 转化感受态细菌DH5 $\alpha$ , 接种含IPTG和X-gal的Amp+LB平板培养。取半个白色菌落留种, 余半个溶到20  $\mu$ L水中, 100 $^{\circ}$ C水浴裂解细菌后, 用通用引物T7/SP6行PCR, 以鉴定目的片段是否转入。鉴定正确后用接种环取留种的阳性克隆细菌接种到LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C摇床培养过夜, 次日将菌液装入EP管中封好待测。

**1.2.3 序列比较分析:** 测得序列利用DNASIS、OMIGA软件与GenBank中查到DNA pol $\beta$ 启动子序列进行同源性比较和分析。

## 2 结果

**2.1 组织标本pol $\beta$ 启动子DNA序列扩增及阳性克隆鉴定结果** 用引物P1/P2 PCR扩增pol $\beta$ 启动子DNA序列, 扩增出499 bp目的片段, 结果与预期一致。用通用引物T7/SP6鉴定阳性克隆菌落后电泳, 目的片段675 bp, 比499 bp多176 bp, 结果正确(图1)。

**2.2 人食管癌组织、癌旁及其正常黏膜组织中pol $\beta$ 基因启动子的突变情况** 测序结果显示, 25例人食管癌组织中pol $\beta$ 基因启动子, 共有8例存在18个位点, 总突变率为32%(8/25); 而25例癌旁组织中pol $\beta$ 基因启动子有6例存在9个突变位点, 突变率为24%(6/25); 正常黏膜组织有5例突变存在8个突变点, 突变率为20%(5/25)。三组比较差异无统计学意义( $P = 0.611$ )。其中, -37位C $\rightarrow$ A

表 1 25例人食管癌组织、癌旁组织及正常黏膜组织中 pol β 基因启动子的突变情况

标本	变异位点		
	癌组织	癌旁组织	正常黏膜组织
1	-65位G→T; 88位T→C	-177位T→C; -65位G→T; 126位A→G	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-131位G→A; -65位G→T; 29位T→C	-	-37位C→A; -19位插入C突变
5	-	-	-
6	-124位C→T; -100位C→A; -37位C→A; 20位G→A	-	-37位C→A; 29位T→C
7	-	-	-
8	-37位C→A	-144位T→C; 17位G→A	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-65位G→T	-	-109位T→C; -65位G→T
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-114位G→A; -37位C→A	-37位C→A	-19位缺失C突变
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-194位T→C	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	115位T→C	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-37位C→A; 12位G→A	-	-37位C→A
24	-167位A→G; -111位T→C; -65位G→T	-	-65位G→T
25	-	-	-

**■应用要点**  
本实验将人食管癌组织、癌旁组织及其远端正常黏膜组织中DNA聚合酶β基因5'端的启动子区的突变情况进行了初步的检测和对比分析. 为进一步研究polβ启动子调控作用及该基因的过量表达与启动子突变相关性提供实验基础, 也为阐明食管癌新的发生机制及基因靶向治疗奠定基础.

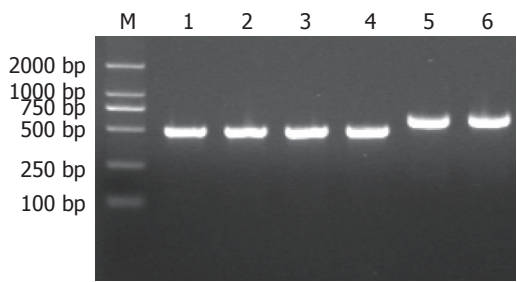


图 1 组织标本polβ启动子DNA序列扩增及阳性克隆鉴定结果. M: DNA marker; 1-2: PCR产物; 3-4: 胶回收产物; 5-6: 通用引物T7/SP6 PCR扩增鉴定的阳性克隆.

突变出现8次; -65 位G→T突变出现7次; 29位T→C突变出现2次; -19位出现C的缺失和插入突变各出现1次(表1).

3 讨论

食管癌为是我国常见高发的恶性肿瘤,在我国居恶性肿瘤的第四位<sup>[10]</sup>. 文献显示<sup>[11-12]</sup>, 在食管癌发生发展中有癌基因和抗癌基因等多种基因发

生突变或缺失和抑癌基因甲基化的现象. polβ是人体修复酶之一, 主要参与碱基切除修复 (base excision repair, BER)以及跨损伤修复, 对受损或突变基因起修复作用<sup>[13-16]</sup>. 哺乳动物DNA修复酶DNA polβ的基因在大多数细胞中都是基本表达, 但他以一种组织特异性的方式调节. polβ在细胞内的表达水平必须受到严格的调控, polβ表达过低、突变或缺失, 均可造成DNA修复功能的缺陷, 细胞中DNA的损伤不能被及时修复则导致突变或细胞毒性<sup>[17]</sup>. 启动子区是调控polβ基因表达的主要调控区域, polβ启动子出现碱基序列的改变可能影响基因的表达及转录的稳定性, 从而影响染色体的稳定性.

根据DNA polβ基因序列分析文献报道[9], polβ基因5'区约-100 bp左右(-113~+62)核心启动子序列是调节基因表达的重要序列, 该区域可维持启动子的绝大部份活性. 因此, 本研究将polβ基因启动子测序范围界定在-261~+238(499

## ■同行评价

本文在众多食管癌基础研究方面有一定新意,但有些表达说服力有限,研究应继续深入。

bp)序列之间,此序列不仅包含了 $\text{pol}\beta$ 基因启动子核心区域,而且延伸跨过第一个外显子。实验结果显示,三组标本总突变位点达35个,其中25个位于该基因的核心启动子区域,表明该启动子核心区域是一个高度突变性或多态性的区域,在食管癌中突变率较高。从 $\text{pol}\beta$ 基因启动子变异位点分析,在所有发生突变的标本中,变异并非独立的突变位点,常是多位点变异的组合,并且有一些变异热点,如,-37位 $\text{C}\rightarrow\text{A}$ 突变出现8次,其出现频率达22.9%(8/35);-65位 $\text{G}\rightarrow\text{T}$ 突变出现7次,其出现频率达20%(7/35),因此,这一突变形式有可能是 $\text{pol}\beta$ 基因启动子在食管癌中的热点突变形式。这2个改变不仅在食管癌组织,而且在癌旁及正常黏膜组织中均有,因此推测他也可能应属于SNP(单核苷酸多态性)。这些变异位点的存在有何意义,是否可导致 $\text{pol}\beta$ 基因表达的上调或下调及是否与 $\text{pol}\beta$ 的活性改变即与发病有关,值得进一步的深入研究。

本研究结果显示 $\text{pol}\beta$ 在食管癌组织、癌旁及正常黏膜组织中的突变率差异无统计学意义。其原因可能是,虽然癌旁组织及正常黏膜组织中表观病理正常,而 $\text{pol}\beta$ 基因变异已存在。光镜下病理学改变很可能正常的移行黏膜已存在着组织化学、细胞增殖动力学及分子基因水平的异常改变,他们早于临床病理学异常之前出现,因此也不能视为正常组织。提示 $\text{pol}\beta$ 基因启动子变异不仅发生在癌变之后,而且极有可能发生在食管癌癌变之前。说明这些细胞已经发生了 $\text{pol}\beta$ 调控或蛋白结构的异常,其分子水平的变化先于形态学的改变,这一区域是临床关注的焦点,可能为潜在癌变区。提示在肿瘤切除边缘的周围存在一定区域,虽然无光镜下可辨认的癌细胞,组织学形态和结构仍表现正常,但存在基因学已发生“癌变”的食管黏膜组织,这些组织可能是造成癌症局部复发的重要原因之一。总之,本研究结果证实了在食管癌中也存在 $\text{pol}\beta$ 基因启动子突变现象,他可能与食管癌的发生、发展存在一定的内在关系。

## 4 参考文献

- 1 Chan K, Houllbrook S, Zhang QM, Harrison M, Hickson ID, Dianov GL. Overexpression of DNA polymerase beta results in an increased rate of frameshift mutations during base excision repair.

- Mutagenesis* 2007; 22: 183-188
- 2 Bergoglio V, Pillaire MJ, Lacroix-Triki M, Raynaud-Messina B, Canitrot Y, Bieth A, Gars M, Wright M, Delsol G, Loeb LA, Cazaux C, Hoffmann JS. Deregulated DNA polymerase beta induces chromosome instability and tumorigenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 3511-3514
- 3 Yamada NA, Farber RA. Induction of a low level of microsatellite instability by overexpression of DNA polymerase Beta. *Cancer Res* 2002; 62: 6061-6064
- 4 赵国强, 王涛, 赵明耀, 何伟, 杨红艳, 王明臣, 汤黎明, 赵继敏, 赵勤, 董子明. 食管正常、癌前及癌变组织中DNA聚合酶 $\beta$ mRNA检测. *郑州大学学报(医学版)* 2005; 40: 603-605
- 5 董子明, 赵国强, 赵勤, 杨洪艳, 薛乐勋, 谭晓辉, 郑乃刚. 人食管癌组织中DNA聚合酶 $\beta$ 基因突变的研究. *中华医学杂志* 2002; 82: 899-902
- 6 Zhao GQ, Wang T, Zhao Q, Yang HY, Tan XH, Dong ZM. Mutation of DNA polymerase beta in esophageal carcinoma of different regions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4618-4622
- 7 赵国强, 赵勤, 刘栋, 杨洪艳, 郑乃刚, 章茜, 董子明. 高发区人食管癌组织中DNA聚合酶 $\beta$ 基因突变检测. *郑州大学学报(医学版)* 2003; 38: 493-495
- 8 Bhattacharyya N, Chen HC, Wang L, Banerjee S. Heterogeneity in expression of DNA polymerase beta and DNA repair activity in human tumor cell lines. *Gene Expr* 2002; 10: 115-123
- 9 Widen SG, Kedar P, Wilson SH. Human beta-polymerase gene. Structure of the 5'-flanking region and active promoter. *J Biol Chem* 1988; 263: 16992-16998
- 10 Liu JF, Wang QZ, Hou J. Surgical treatment for cancer of the oesophagus and gastric cardia in Hebei, China. *Br J Surg* 2004; 91: 90-98
- 11 Kuwano H, Kato H, Miyazaki T, Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M, Fukai Y, Sohda M, Kimura H, Faried A. Genetic alterations in esophageal cancer. *Surg Today* 2005; 35: 7-18
- 12 李小飞, 刘焜, 程庆书, 王小平, 汪健, 卢强, 刘勇. p53和p16在食管癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1476-1478
- 13 Imoto S, Bransfield LA, Croteau DL, Van Houten B, Greenberg MM. DNA tandem lesion repair by strand displacement synthesis and nucleotide excision repair. *Biochemistry* 2008; 47: 4306-4316
- 14 Liu Y, Beard WA, Shock DD, Prasad R, Hou EW, Wilson SH. DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair. *J Biol Chem* 2005; 280: 3665-3674
- 15 Gembka A, Touelle M, Smirnova E, Poltz R, Ferrari E, Villani G, Hübscher U. The checkpoint clamp, Rad9-Rad1-Hus1 complex, preferentially stimulates the activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 2596-2608
- 16 Sykora P, Snow ET. Modulation of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in cultured human cells after low dose exposure to arsenite. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228: 385-394
- 17 Idriss HT, Al-Assar O, Wilson SH. DNA polymerase beta. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 321-324

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



## 2型糖尿病患者上消化道症状与胃排空的超声检测

李春涛, 张 烨

李春涛, 张烨, 中国医科大学北京顺义医院消化内分泌科 北京市 101300

作者贡献分布: 此课题设计与临床调查超声检测由李春涛完成; 资料统计由张烨完成。

通讯作者: 李春涛, 101300, 北京市, 中国医科大学北京顺义医院消化内分泌科, lichuntao33@126.com

电话: 010-69423220-7076

收稿日期: 2008-05-18 修回日期: 2008-07-08

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

### Upper gastrointestinal symptoms in type 2 diabetes mellitus and detection of gastric emptying by ultrasonography

Chun-Tao Li, Ye Zhang

Chun-Tao Li, Ye Zhang, Department of Digestive Endocrinology, Shunyi District Hospital, China Medical University, Beijing 101300, China

Correspondence to: Chun-Tao Li, Department of Digestive Endocrinology, Shunyi District Hospital, China Medical University, Beijing 101300, China. lichuntao33@126.com

Received: 2008-05-18 Revised: 2008-07-08

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between upper gastrointestinal (GI) symptoms and gastric emptying in patients with type 2 diabetes mellitus.

**METHODS:** A total of 411 patients with type 2 diabetes mellitus were examined in Beijing Shunyi District Hospital from November 2005 to October 2007, and 264 normal individuals were used as controls. We statistically analyzed the rate of GI symptoms and the scores of severity. Ultrasound scan was performed to measure the gastric emptying rate 30, 60, 90 min after drinking water.

**RESULTS:** The rate of GI symptoms in diabetic patients was significantly higher than that in normal controls (60.3% vs 16.7%,  $P < 0.01$ ). The most common GI symptoms in diabetic patients were epigastric fullness (77.9%) and abdominal distention or belching (61.1%). The scores of

symptomatic severity were also higher in diabetic patients ( $P < 0.01$ ). The gastric emptying in patients with diabetes was delayed as compared with that in normal controls 30, 60 and 90 min after drinking water ( $P < 0.01$ ). Diabetic patients with normal and delayed gastric emptying in 60 min showed significant differences only in early satiety, nausea and vomiting ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Type 2 diabetic patients have a significantly higher prevalence of upper GI symptoms, and delayed gastric emptying may contribute to these symptoms. Ultrasound is convenient in detecting the gastric emptying of diabetic patients.

**Key Words:** Type 2 diabetes mellitus; Upper gastrointestinal symptom; Gastric emptying

Li CT, Zhang Y. Upper gastrointestinal symptoms in type 2 diabetes mellitus and detection of gastric emptying by ultrasonography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2653-2655

### 摘要

**目的:** 总结分析2型糖尿病患者的上消化道症状, 并检测其胃的液体排空功能。

**方法:** 2005-11/2007-10我院门诊和住院的2型糖尿病患者411例, 统计上消化道症状的出现率及其严重程度评分, 饮水后30、60、90 min时, 应用超声检测胃的排空率, 与264例正常人的对照组进行比较分析。

**结果:** 411例患者中有上消化道症状者, 高于对照组中相应症状的发生率(60.3% vs 16.7%,  $P < 0.01$ ), 症状中最常见的是餐后饱胀(77.9%)和腹胀嗝气(61.1%), 症状严重度的评分也高于对照组( $P < 0.01$ ); 30、60、90 min时, 糖尿病患者胃的排空较对照组显著延缓( $P < 0.01$ )。糖尿病患者中60 min胃排空正常者与延缓者间只有早饱和恶心呕吐症状的发生率和严重程度评分有显著差异( $P < 0.05$ )。

**结论:** 2型糖尿病患者上消化道症状有较高的发生率, 其原因可能与胃排空延缓有关。超声

### ■背景资料

糖尿病是严重危害人类健康的常见病, 是可累及多组织、器官的全身性疾病, 发病率有逐年增长的趋势。在糖尿病的各种并发症中消化道症状不像其他并发症那样受到关注, 常被忽视。事实上糖尿病伴发的消化系统症状不仅降低患者的生活质量, 也妨碍血糖的良好控制。

### ■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

### ■应用要点

防治胃肠并发症, 不仅能改善糖尿病患者的生活质量, 而且良好的血糖控制可能会通过改善胃的排空功能而实现。

法检测糖尿病患者的胃液排空功能简便易行, 具有一定的临床应用价值。

**关键词:** 2型糖尿病; 上消化道症状; 胃排空

李春涛, 张烨. 2型糖尿病患者上消化道症状与胃排空的超声检测. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2653-2655  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2653.asp>

## 0 引言

糖尿病是严重危害人类健康的常见病, 是可累及多组织、器官的全身性疾病, 发病率有逐年增长的趋势. 在糖尿病的多种并发症中消化道症状不像其他并发症那样受到关注, 常被忽视. 事实上糖尿病伴发的消化系统症状不仅降低患者的生活质量, 也妨碍血糖的良好控制. 我们于2005-11/2007-10对411例2型糖尿病患者的上消化道症状进行了总结并应用超声观察了胃的液体排空功能, 现报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-11/2007-10我院门诊和住院的2型糖尿病患者411例, 其中男217例, 女194例, 年龄31-64(平均 $46.1 \pm 17.7$ )岁; 对照组264例, 男124例, 女140例, 年龄29-60岁(平均 $44.7 \pm 16.5$ )岁, 两组间年龄无显著差异. 两组均须除外既往或新近的器质性消化系疾病, 如消化性溃疡、胆石症或其他胆系疾病、肿瘤、做过消化器官手术者, 其他内科情况如心、肝、肾功能不全、脑血管意外、硬皮病等结缔组织病等; 有急性酮症酸中毒或严重尿酮症尿酮体+++以上者亦除外. 记录体质质量指数(BMI)、空腹血糖(PG)、糖化血红蛋白(HbA1c)和糖尿病病程。

**1.2 方法** 根据Horowitz使用的修正问卷调查胃肠症状: (1)胃疼或不适、(2)腹胀或暖气、(3)餐后饱胀感、(4)早饱、(5)纳差、(6)胃液返流或烧心、(7)恶心或呕吐. 用0-4级的评分系统为症状的严重程度分级, 4分, 严重(胃肠问题导致健康受损和营养不良、住院); 3分, 较重(症状妨碍了日常活动并因此就诊); 2分, 中度(症状妨碍了部分日常活动, 需用药物以缓解症状); 1分, 轻度(日常活动不受影响); 0分, 无症状; 症状轻且在过去1年内发作 $\leq 2$ 次者也计为0分<sup>[1]</sup>. 胃排空的检测: 受检查者空腹12 h以上, 半卧位(45度)行超声检查. 测定空腹基础胃截面积, 2 min饮500 mL温开水, 立即测定胃窦最大截面积(Dm), 再测定饮水后30 min(t30)、60 min(t60)、90 min(t90)时

胃最大截面积(Dt). 胃排空率 =  $(Dm - Dt) / Dm \times 100\%$ . 以60 min胃排空 $> 90\%$ 为正常,  $< 90\%$ 为排空延缓<sup>[2]</sup>.

**统计学处理** 计量资料以mean $\pm$ SD表示, 应用两样本均数 $t$ 检验; 记数资料采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

糖尿病患者中伴有上消化道症状者248例(60.3%), 对照组中有44例(16.7%), 两组间有显著差异( $P < 0.01$ ). 糖尿病组的各项上消化道症状出现率及其评分均显著高于对照组( $P < 0.05$ , 表1)。

糖尿病组的胃排空率在30、60、90 min时分别为 $61.3\% \pm 10.2\%$ 、 $72.5\% \pm 17.3\%$ 和 $76.4\% \pm 14.7\%$ , 正常对照组分别为 $78.2\% \pm 5.6\%$ 、 $97.6\% \pm 4.1\%$ 和 $99.3\% \pm 4.7\%$ , 在各时相点两组间均有显著差异( $P < 0.01$ )。

糖尿病组中60 min胃排空率正常者226例(55%), 延缓者185例(45%); 二者间各项症状的出现率及严重程度评分见表2. 早饱症状的发生率二者间有显著性差异( $P < 0.05$ ), 但该症状严重度的评分二者间却无显著差异( $P > 0.05$ ); 恶心呕吐症状发生率二者间有显著性差异( $P < 0.05$ ), 严重程度的评分二者也有显著差异( $P < 0.05$ ). 其余的情况两者间均无显著差异( $P > 0.05$ ). 正常对照组中胃排空在60 min时全部 $> 90\%$ 。

糖尿病组中60分钟胃排空率正常与延缓者者比较, 年龄( $45.3 \pm 18.5$  vs  $47.8 \pm 16.1$ )、BMI( $24.7 \pm 4.1$  vs  $25.0 \pm 4.0$ )、空腹血糖( $8.8 \pm 4.3$  vs  $10.2 \pm 4.6$ )间均无显著差异( $P > 0.05$ ), 而糖化血红蛋白( $7.4 \pm 2.3$  vs  $9.6 \pm 2.1$ )和糖尿病病程( $4.5 \pm 3.6$  vs  $7.8 \pm 5.2$ )两组比较有显著差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

糖尿病合并的胃肠症状容易被低估, 不仅患者有时医生都更注意其他并发症. Feldman和Shiller曾报告, 如特意询问, 则糖尿病门诊患者有胃肠症状的高达76%. 事实上, 这类患者因易发生不能预料的血糖波动而影响血糖控制<sup>[3]</sup>. 许多临床情况如脆性糖尿病、反复的糖尿病酮症酸中毒和蛋白质-热量营养不良等, 伴有胃肠并发症时常可引起临床处理的困难. 本组资料中糖尿病患者上消症状出现率60.3%. 最常见的依次是餐后饱胀、腹胀暖气、早饱和胃痛不适. 出现这些症状时称为糖尿病性消化不良, 引起的胃排空延缓称糖尿病性胃轻瘫, 现提出用糖

表 1 症状的出现率及其评分 (mean ± SD)

症状	糖尿病组(n = 411)		对照组(n = 264)	
	出现率(%)	评分	出现率(%)	评分
胃痛不适	24.1	0.49 ± 0.64	9.1	0.16 ± 0.31
腹胀暖气	61.1	0.86 ± 0.64	18.2	0.23 ± 0.33
餐后饱胀	77.9	1.37 ± 0.76	36.4	0.41 ± 0.46
早饱	48.4	0.36 ± 0.45	9.1	0.05 ± 0.19
纳差	14.4	0.29 ± 0.37	9.1	0.06 ± 0.20
反流烧心	17.3	0.27 ± 0.41	9.1	0.13 ± 0.22
恶心呕吐	18.2	0.32 ± 0.11	0	0

表 2 胃排空率正常与延缓患者间症状比较 (mean ± SD)

症状	排空率正常(n = 226)		胃排空延缓(n = 185)	
	出现率(%)	评分	出现率(%)	评分
胃疼不适	24.0	0.44 ± 0.87	24.3	0.49 ± 0.90
腹胀暖气	60.0	0.84 ± 0.85	62.2	0.89 ± 0.89
餐后饱胀	80.0	1.36 ± 0.81	75.7	1.30 ± 0.91
早饱	37.5	0.33 ± 0.55	61.8 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.37
纳差	13.0	0.29 ± 0.58	16.2	0.26 ± 0.40
反流烧心	16.0	0.24 ± 0.60	19.0	0.27 ± 0.55
恶心呕吐	16.0	0.28 ± 0.44	21.1 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.60 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 胃排空率正常。

尿病胃病(DG)的概念代替胃轻瘫的称谓。胃排空延缓是糖尿病胃病的特征性表现, 目前认为是多种原因导致的这一现象<sup>[4-5]</sup>, 特别是胃肠动力减弱和胃窦幽门十二指肠运动的不协调<sup>[6-7]</sup>, 这可能与自主神经病变有关, 但不是唯一因素。

本组资料中糖尿病患者的胃排空率正常与延缓者比较, 空腹血糖二者间并未检出差异, 但糖化血红蛋白值则有显著差异, HbA1c反映三个月的血糖平均控制水平, 提示糖尿病病情的控制状况可能影响着胃的排空。糖尿病病程之间的差异, 反映出糖尿病患者并发的胃的排空延缓可能与糖尿病的其他并发症相似, 糖尿病的病程越久, 并发症的危险性就可能越高。

糖尿病患者中胃排空率正常与延缓者比较, 早饱症状的发生率二者间不同但该症状严重度的评分却无显著差异; 只有恶心呕吐的发生率和严重度评分均有差异, 其余症状不论发生率还是严重度评分均无显著差异。反映出糖尿病患者的胃排空率与胃肠症状之间的相关性较差,

通常不能由某一特定症状推断必定存在胃的排空延缓。提示糖尿病胃病患者的胃排空障碍可以引起上消化道症状, 可能并不是引发症状的唯一原因<sup>[8]</sup>。

糖尿病时胃的排空功能的研究方法中, 主要有同位素示踪法(标记食物)、药物吸收法和B超测量法等。莫永珍比较了<sup>13</sup>C-辛酸呼气试验与超声法诊断糖尿病性胃排空障碍<sup>[9-10]</sup>, 结果显示同一时间点前者所得胃排空率明显低于后者, 但二者具有高度的相关性。超声法检测胃排空功能有多种方法, 在饮水后同一时间点的胃的排空率或检测胃的半排空时间也不尽相同<sup>[11]</sup>。

防治胃肠并发症, 不仅能改善糖尿病患者的生活质量, 而且良好的血糖控制可能会通过改善胃的排空功能而实现, 因此非侵入性、低成本、可重复且容易操作的胃排空检测方法包括超声检测法, 将在糖尿病的综合治疗中得到更多的应用。

#### 4 参考文献

- Horowitz M, Harding PE, Maddox AF, Wishart JM, Akkermans LM, Chatterton BE, Shearman DJ. Gastric and oesophageal emptying in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1989; 32: 151-159
- 何一然, 李瑜乐, 王新北. 功能性消化不良的超声研究. *中华消化杂志* 1996; 16: 181-182
- Drenth JP, Engels LG. Diabetic gastroparesis. A critical reappraisal of new treatment strategies. *Drugs* 1992; 44: 537-553
- Camilleri M. Gastrointestinal problems in diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25: 361-378
- 柯美云, 蓝宇. 糖尿病胃肠并发症的动力障碍及其机制. *中华内分泌代谢杂志* 2003; 19: 164-165
- Abrahamsson H. Gastrointestinal motility disorders in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 1995; 237: 403-409
- 柯美云, 谷成明, 姜玉新, 朱昭辉, 张淑琴, 王智凤, 李方. 消化不良患者的胃幽门十二指肠运动协调性研究. *中国医学科学院学报* 2000; 22: 240-244
- Samsom M, Smout AJ. Abnormal gastric and small intestinal motor function in diabetes mellitus. *Dig Dis* 1997; 15: 263-274
- 莫永珍, 卞茸文, 娄青林, 顾刘宝, 张建国, 夏晖, 欧阳晓俊, 何戎华. <sup>13</sup>C-辛酸呼气试验与超声法诊断糖尿病性胃排空障碍的比较研究. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2005; 25: 819-823
- McLellan J, Wyse CA, Dickie A, Preston T, Yam PS. Comparison of the carbon 13-labeled octanoic acid breath test and ultrasonography for assessment of gastric emptying of a semisolid meal in dogs. *Am J Vet Res* 2004; 65: 1557-1562
- 陈日曙, 庄国礼, 金振晓, 郑建国. 糖尿病胃轻瘫患者胃排空功能的超声显像观察. *中国现代医学杂志* 2002; 12: 100-104

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

#### ■同行评价

本文设计合理, 选取病例样本量大, 实验结果具有一定的临床价值。



# $p14^{\text{ARF}}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$ mRNA在肝细胞癌中的表达及临床意义

覃新干, 罗殿中, 吕自力, 林静, 苏传丽

## ■背景资料

肝癌是一个多基因参与的疾病, 其发病率和死亡率有逐年升高的趋势, 而疗效仍不佳。泛素连接酶 $ARF-BP1$ 与肿瘤的发生发展有密切关系。 $P14^{\text{ARF}}$ 蛋白通过 $P14^{\text{ARF}}$ -Mdm2-P53的P53途径和非P53途径发挥抑癌作用。激活的 $c-myc$ 基因可导致细胞恶性转化。 $P14^{\text{ARF}}$ 与 $ARF-BP1$ 、 $P14^{\text{ARF}}$ 与 $Myc$ 、 $ARF-BP1$ 与 $Myc$ 之间存在关系。

覃新干, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科 广西壮族自治区南宁市 530021

罗殿中, 吕自力, 林静, 苏传丽, 广西医科大学病理教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

广西自然科学基金资助项目, No. 桂科自0542071

广西科学研究与技术开发计划资助项目, No. 桂科能05112001-4D

作者贡献分布: 此课题由罗殿中、吕自力及覃新干设计; 研究过程由覃新干、林静及苏传丽操作完成; 本论文写作由覃新干、罗殿中及吕自力完成。

通讯作者: 罗殿中, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学病理教研室, luodianzhong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-06-08 修回日期: 2008-07-12

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-18

## Expression of $p14^{\text{ARF}}$ , $ARF-BP1$ and $c-myc$ mRNAs in hepatocellular carcinoma and their significances

Xin-Gan Qin, Dian-Zhong Luo, Zi-Li Lv, Jing Lin, Chuan-Li Su

Xin-Gan Qin, Department of Gastrointestinal and Gland Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Dian-Zhong Luo, Zi-Li Lv, Jing Lin, Chuan-Li Su, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0542071; the Science Research and Technology Exploitation Program of Guangxi, No. 05112001-4D

Correspondence to: Dian-Zhong Luo, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. luodianzhong@yahoo.com.cn

Received: 2008-06-08 Revised: 2008-07-12

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of  $p14^{\text{ARF}}$ ,  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  mRNAs in hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinical significances.

**METHODS:** Abundance of  $p14^{\text{ARF}}$ ,  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  mRNAs was detected by semi-quantification reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique in the samples from 52 HCCs and their 45 non-tumorous liver tissues, and their clinical significances were assayed with the clinical parameters.

**RESULTS:** The expression levels of  $p14^{\text{ARF}}$ ,  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  mRNAs (77.0%, 77.0%, 75.0%) were higher in HCC tissues than those in the non-tumorous liver tissues (11.1%, 20.0%, 53.3%), respectively. The expression of  $p14^{\text{ARF}}$  mRNA and  $ARF-BP1$  mRNAs were related to tumor size ( $t = 2.169, 2.087$ ; both  $P < 0.05$ ), but the expression of  $c-myc$  mRNA was not. The expression of  $p14^{\text{ARF}}$ ,  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  mRNAs were not related to the gender, age, AFP level, clinical staging, HBV infection, envelopes, infiltration and metastasis. There was a positive correlation between  $p14^{\text{ARF}}$  and  $ARF-BP1$  expression,  $p14^{\text{ARF}}$  and  $c-myc$  expression as well as  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  expression ( $r = 0.565, 0.436, 0.584$ ; all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Over-expression of  $p14^{\text{ARF}}$ ,  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  mRNAs are markers in the early stage of HCC, and  $ARF-BP1$  over-expression play an important role in the genesis and development of HCC.  $ARF-BP1$  may become a novel therapeutic target against HCC.

**Key Words:**  $p14^{\text{ARF}}$ ;  $ARF-BP1$ ;  $c-myc$ ; Hepatocellular carcinoma; Reverse transcription polymerase chain reaction

Qin XG, Luo DZ, Lv ZL, Lin J, Su CL. Expression of  $p14^{\text{ARF}}$ ,  $ARF-BP1$  and  $c-myc$  mRNAs in hepatocellular carcinoma and their significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2656-2660

## 摘要

**目的:** 探讨肝细胞癌组织中 $p14^{\text{ARF}}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$ 的mRNA表达及其与临床参数关系。

**方法:** 采用半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术, 对52例HCC组织及其中45例相应癌旁组织 $p14^{\text{ARF}}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$ 的mRNA表达丰度进行检测并分析他们之间的关系及其与临床参数的关系。

**结果:** 在52例HCC组织中 $p14^{\text{ARF}}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$ 的mRNA各表达77.0%、77.0%和75.0%,

## ■同行评议者

邱宝安, 主任医师, 中国人民解放军海军总医院肝胆外科

与45例相应癌旁组织(11.1%、20.0%、53.3%)比较,呈高表达。*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1* mRNA的表达与肿瘤大小有关( $t = 2.169, 2.087$ , 均 $P < 0.05$ );而*c-myc* mRNA表达与肿瘤大小无关。*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc*的mRNA表达在性别、年龄、AFP、临床病理分级、浸润转移、HBV、包膜等无统计学差异。*p14<sup>ARF</sup>*与*ARF-BP1*、*p14<sup>ARF</sup>*与*c-myc*及*ARF-BP1*与*c-myc*的mRNA表达两两成正相关( $r = 0.565, 0.436, 0.584$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*、*c-myc*过度表达可能是HCC发生的早期指标; *ARF-BP1*过度表达可能是影响HCC发生、发展的关键, 干预*ARF-BP1*可能是治疗HCC的新途径。

**关键词:** *p14<sup>ARF</sup>*; *ARF-BP1*; *c-myc*; 肝细胞癌; 逆转录-聚合酶链式反应

覃新干, 罗殿中, 吕自力, 林静, 苏传丽. *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA在肝细胞癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2656-2660  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2656.asp>

## 0 引言

越来越多的研究表明E3泛素连接酶在癌形成过程中扮演着重要的角色<sup>[1]</sup>, ARF-BP1是具有HECT(homologous to E6-AP C terminus)区域的E3泛素连接酶, 与*p14<sup>ARF</sup>*、*p53*、*Myc*蛋白相互作用<sup>[2-3]</sup>。*p14<sup>ARF</sup>*是*p53*上游基因, 也是抑癌基因, 通过抑制*ARF-BP1*功能, 抑制肿瘤的生长<sup>[2]</sup>, 激活的癌基因如*Myc*、*Ras*及*E1A*诱导*p14<sup>ARF</sup>*表达<sup>[4]</sup>。*c-myc*是细胞原癌基因, 与细胞的增殖、分化、凋亡有关。在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中, *ARF-BP1*是否与*p14<sup>ARF</sup>*、*c-myc*发生相互作用并影响HCC的发生、发展, 目前仍未清楚。我们采用半定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法, 检测52例HCC组织中的*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*和*c-myc* mRNA表达水平并分析他们之间的关系及其与临床参数的关系, 探讨三者与HCC发生、发展的关系及其意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2005-03/2006-04在我院接受手术治疗的52例肝细胞癌患者的癌组织及其中相应的45例癌旁组织, 2例肝血管瘤患者的肝组织, 并收集相关临床资料。52例HCC患者中, 男性45例, 女性7例, 年龄23-70(平均年龄43.60±10.87)岁。所有病例均经病理学确诊, 肝癌组织

学按WHO 2000年标准分级。所有标本离体后迅速置入液氮速冻, 然后转-80℃超低温冰箱保存。TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen公司)、逆转录试剂盒(Fermentas公司)、PCR试剂Premix Tag(TaKaRa公司)、dNTP(上海生物工程技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 总RNA提取:** 取50 mg癌组织加入1 mL TRIzol, 按TRIzol总RNA提取试剂盒说明书进行操作, RNA放-80℃保存备用。

**1.2.2 RT合成cDNA:** 取3 μg RNA, 按逆转录试剂盒说明书进行操作, 产物-20℃保存备用。

**1.2.3 PCR引物设计及扩增:** 扩增目的基因*p14<sup>ARF</sup>*片段引物序列参见文献[5], 经NCBI BLAST软件确认其特异性。扩增目的基因*ARF-BP1*、*c-myc*片段引物序列通过Primer3软件设计获取并经NCBI BLAST软件确认其特异性。看家基因GAPDH作内对照具体见表1。

**1.2.4 PCR扩增产物的鉴定:** 20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段, 在157 bp处显带者为*ARF-BP1* mRNA阳性, 200 bp处显带者为*p14<sup>ARF</sup>* mRNA阳性, 248 bp处显带者为*c-myc* mRNA阳性, 452 bp处显带者为GAPDH mRNA阳性。PCR扩增产物送广西医科大学医学科学实验中心测序鉴定。

**1.2.5 目的基因RT-PCR产物半定量分析:** *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*、*c-myc*、GAPDH RT-PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳后, 用凝胶电泳成像分析系统(Bio-Rad GeLDOC2000)对*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*、*c-myc*进行半定量分析。用目的基因和看家基因两电泳条带单位面积内的灰度比值来反映目的基因的相对表达水平, 灰度分析采用凝胶电泳成像分析系统中的Quantity One软件分析。

**统计学处理** 采用SPSS10.0统计软件进行统计, 计量资料采用 $t$ 检验, 两变量间相关分析采用直线相关和偏相关分析。

## 2 结果

**2.1 *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*、*c-myc* RT-PCR产物大小与鉴定** RT-PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳后, 凝胶图像显示: 200 bp处显带为*p14<sup>ARF</sup>* mRNA阳性; 157 bp处显带为*ARF-BP1* mRNA阳性; 248 bp处显带为*c-myc* mRNA阳性。所有条带显示清晰可见, 无杂带, 如图1。测序结果经blast软件核对与GenBank的*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*、*c-myc* mRNA序列呈完全一致性, 未见缺失与突变(图1)。

### ■相关报道

有研究表明过表达的*c-Myc*蛋白引起ARF表达, 而异常*c-Myc*蛋白表达又是ARF作用的靶点, 形成ARF与*c-Myc*负反馈调控机制, ARF结合*c-Myc*并调控*c-Myc*的转录活性功能, 阻止细胞增殖和转化, 同时抑制*c-Myc*蛋白诱导的基因表达。不管*P53*状态如何, ARF抑制*ARF-BP1*泛素连接酶活性, 就抑制肿瘤细胞生长。*ARF-BP1*通过赖氨酸63连接多聚泛素链, 泛素化*Myc*。存在*p14<sup>ARF</sup>*-*ARF-BP1*-*Myc*抑癌途径。

## ■创新盘点

*ARF-BP1*、*c-myc*、*p14<sup>ARF</sup>* mRNA在肝癌中高表达，他们之间两两成正相关；*ARF-BP1*可能是影响*p14<sup>ARF</sup>*抑制*c-myc*的因素。

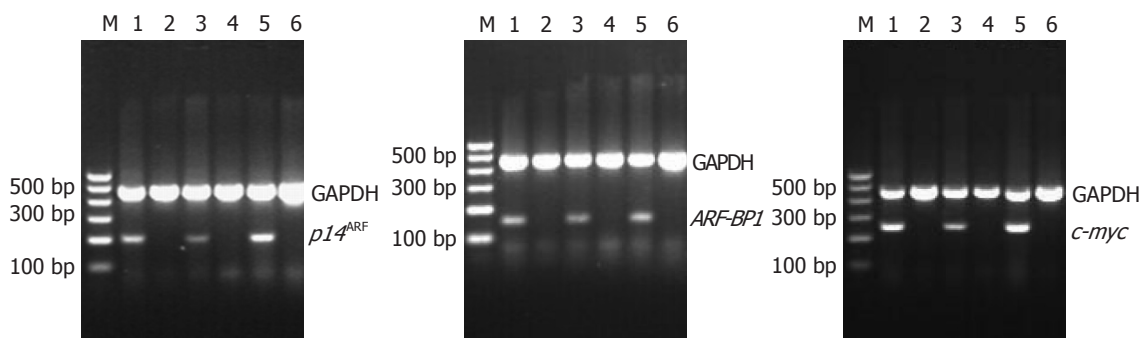


图1 HCC组织及癌旁肝组织*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*、*c-myc* RT-PCR产物琼脂糖电泳结果。M: 标准参照物; 1, 3, 5为癌组织; 2, 4, 6: 对应癌旁组织; GAPDH: 内参对照, 扩增产物长度为452 bp, *p14<sup>ARF</sup>*基因扩增产物长度为200 bp, *ARF-BP1*基因扩增产物长度为157 bp, *c-myc*基因扩增产物长度为248 bp。

表1 *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*和*c-myc* PCR引物设计及扩增情况

基因	引物	产物长度(bp)	退火温度(℃)	循环数(个)
<i>p14<sup>ARF</sup></i>	上游: 5'-ccctcgtgctgatgctactga-3'	200	60	30
	下游: 5'-accaccagcgtgtccaggaa-3'			
<i>ARF-BP1</i>	上游: 5'-ccacccctccagcttctacagc-3'	157	57	30
	下游: 5'-ttgactgtgtgtgccatgtt-3'			
<i>c-myc</i>	上游: 5'-cctaccctctcaacgacagc-3'	248	55	30
	下游: 5'-ctctgacctttgcccaggag-3'			
GAPDH	上游: 5'-accacagtccatgcatcact-3'	452		30
	下游: 5'-tccaccacccctgtgtcgtga-3'			

2.2 *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* RT-PCR产物半定量测定结果 RT-PCR检测52例癌组织, *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA阳性表达率分别为76.9%(40/52)、76.9%(40/52)、75.0%(39/52), 表达产物经半定量测定并结合临床资料统计分析, *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1* mRNA表达与肿瘤大小有关, *p14<sup>ARF</sup>* mRNA在大肝癌组织中表达明显高于小肝癌( $t = 2.169$ ,  $P = 0.04$ ,  $P < 0.05$ ), *ARF-BP1* mRNA在大肝癌组织中表达明显低于小肝癌( $t = 2.087$ ,  $P = 0.04$ ,  $P < 0.05$ )。 *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1* mRNA表达在性别、年龄、AFP、临床分级、浸润转移、HBV、包膜关系中无统计学差异( $P > 0.05$ ); *c-myc* mRNA表达在性别、年龄、肿瘤大小、AFP、临床分级、浸润转移、HBV、包膜关系中均无统计学差异( $P > 0.05$ , 表2)。45例癌旁组织中*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA阳性表达率分别为11.1%(5/45)、20.0%(9/45)、53.3%(24/45), 表达产物经半定量测定并结合临床资料统计分析, 三者mRNA表达与性别、年龄、肿瘤大小、AFP、临床分级、浸润转移、HBV、包膜关系中均无统计学差异( $P > 0.05$ )。 *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA在癌组织和癌旁组织中的表达有显著差异( $P < 0.05$ )。2例肝血管

瘤中, *p14<sup>ARF</sup>* mRNA、*ARF-BP1* mRNA均不表达; *c-myc* mRNA有1例表达(HBV阳性), 1例不表达。

2.3 *p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA表达的相关性 RT-PCR方法检测52例癌组织的*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA表达, 结果*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc* mRNA各表达40、40、39例, 表达产物经凝胶电泳成像分析系统测定灰度比值。灰度比值经相关分析*p14<sup>ARF</sup>*与*ARF-BP1*( $r = 0.565$ ,  $P < 0.01$ )、*p14<sup>ARF</sup>*与*c-myc*( $r = 0.436$ ,  $P < 0.01$ )及*ARF-BP1*与*c-myc*( $r = 0.584$ ,  $P < 0.01$ )的mRNA表达两两成正相关; 灰度比值经偏相关分析, 控制*c-myc*则*p14<sup>ARF</sup>*与*ARF-BP1*不相关( $r = 0.069$ ,  $P > 0.05$ ), 控制*p14<sup>ARF</sup>*则*ARF-BP1*与*c-myc*表达成正相关( $r = 0.632$ ,  $P < 0.01$ ), 控制*ARF-BP1*则*p14<sup>ARF</sup>*与*c-myc*表达成正相关( $r = 0.527$ ,  $P < 0.01$ ), 而且*ARF-BP1*与*c-myc*相关性强于*p14<sup>ARF</sup>*与*c-myc*。

## 3 讨论

*p14<sup>ARF</sup>*是*INK4α/ARF*基因编码的两种蛋白(*P16<sup>INK4α</sup>*和*ARF*(*P14<sup>ARF</sup>*(人)/*p19<sup>ARF</sup>*(鼠))之一, 具有抑癌功能但机制尚未完全清楚。ARF在正常细胞表达很低, 激活的癌基因如*Myc*、*ras*及*E1A*

## ■应用要点

干预*ARF-BP1*可能是治疗HCC的新途径。



表 2  $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$  mRNA在HCC中表达的产物灰度比值与临床参数关系

临床参数		<i>n</i>	$p14^{ARF}$	<i>n</i>	$ARF-BP1$	<i>n</i>	$c-myc$
性别	男	34	0.48 ± 0.24	36	0.58 ± 0.28	34	0.58 ± 0.27
	女	6	0.45 ± 0.24	4	0.62 ± 0.18	5	0.34 ± 0.24
年龄(岁)	≤40	15	0.43 ± 0.20	15	0.52 ± 0.25	15	0.61 ± 0.28
	>40	25	0.50 ± 0.25	25	0.63 ± 0.27	24	0.51 ± 0.27
肿瘤大小(cm)	>5	28	0.53 ± 0.23	29	0.53 ± 0.22	29	0.52 ± 0.27
	≤5	12	0.36 ± 0.22	11	0.72 ± 0.34	10	0.65 ± 0.28
AFP(μg/L)	≥400	19	0.52 ± 0.22	19	0.55 ± 0.22	19	0.56 ± 0.29
	<400	21	0.44 ± 0.25	21	0.62 ± 0.31	20	0.54 ± 0.24
HCC分级	高-中分化	26	0.49 ± 0.23	27	0.60 ± 0.28	26	0.56 ± 0.28
	低分化	14	0.46 ± 0.25	13	0.55 ± 0.24	13	0.54 ± 0.27
浸润转移	有	17	0.46 ± 0.23	16	0.61 ± 0.20	15	0.47 ± 0.27
	无	23	0.49 ± 0.24	24	0.57 ± 0.31	24	0.60 ± 0.27
HBV	HBsAg(+)	31	0.48 ± 0.24	31	0.62 ± 0.28	30	0.55 ± 0.28
	HBsAg(-)	9	0.46 ± 0.23	9	0.48 ± 0.19	9	0.56 ± 0.26
包膜	有	26	0.52 ± 0.25	24	0.59 ± 0.27	14	0.54 ± 0.28
	无	14	0.40 ± 0.18	16	0.59 ± 0.28	15	0.58 ± 0.27

## ■名词解释

偏相关分析: 是排除其他变量的干扰之后所测量到的2个变量真正的相关系数, 即偏相关分析是控制“第三者”后所获得的甲乙二者的“净”相关系数。

诱导ARF表达<sup>[4]</sup>。基因缺失、不恰当甲基化等引发ARF基因表达下调, 导致ARF基因抑癌功能下降或丧失, 如膀胱癌、非小细胞肺癌发生 $p14^{ARF}$ 基因缺失<sup>[6-7]</sup>; 在胃癌、结直肠癌中存在 $p14^{ARF}$ 基因启动子区CpG岛甲基化, 引发该基因表达下调<sup>[8-9]</sup>。 $p14^{ARF}$ 在肝细胞癌、宫颈癌有过表达报道<sup>[10-11]</sup>, 本组资料结果与他们相似。 $ARF-BP1$ 基因位于染色体Xp11.22上, 是近年来新发现的具有HECT区域的E3泛素连接酶, 他在多种人类肿瘤组织中的过表达是肿瘤细胞增殖所必需的<sup>[3]</sup>。 $ARF-BP1$ 与ARF相互作用, 与ARF抑癌功能密切相关, ARF抑制ARF-BP1功能进而抑制肿瘤生长<sup>[2]</sup>。同时, ARF-BP1与c-Myc的促细胞增殖、生长等作用有关, 抑制ARF-BP1表达则削弱Myc依赖基因的激活并消除Myc诱导细胞增殖功能<sup>[2]</sup>。 $c-myc$ 基因属于癌基因<sup>[12]</sup>, 过表达有促进肿瘤发生的作用<sup>[12-15]</sup>。本研究结果显示 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$ 三者mRNA在HCC高表达,  $p14^{ARF}$ 在小肝癌中表达低于大肝癌( $P<0.05$ ),  $ARF-BP1$ 在小肝癌中表达高于大肝癌( $P<0.05$ ), 提示: (1)乙型肝炎病毒感染<sup>[16]</sup>, DNA低甲基化<sup>[17-18]</sup>等原因引起 $c-myc$ 过度表达, 促使肝细胞过度增殖、分化、恶性病变。同时, c-Myc过度表达诱导 $p14^{ARF}$ 基因过度表达, 从而发挥 $p14^{ARF}$ 肿瘤抑制作用。(2) $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 、 $c-myc$ 三者相互影响, 相互制约。基于 $p14^{ARF}$  mRNA在小肝细胞癌表达低于大肝细胞癌,  $ARF-BP1$  mRNA在小肝细胞癌表达高于大肝细胞癌,

$c-myc$ 过表达有促进肿瘤发生的作用, 可以推测高表达的 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$  mRNA可能是肝细胞过度增殖及恶性变的一个间接指征, 检测这些基因的表达可能为早期发现HCC提供依据。

ARF与ARF-BP1相互作用, 抑制ARF-BP1功能而抑制肿瘤生长<sup>[2]</sup>; ARF-BP1与 $c-myc$ 相互作用, 抑制 $ARF-BP1$ 表达则影响c-Myc蛋白功能, 导致肿瘤细胞增殖抑制并引起细胞周期停滞于G<sub>1</sub>期<sup>[3]</sup>。研究表明过表达的c-Myc蛋白引起ARF表达, 而异常c-Myc蛋白表达又是ARF作用的靶点, 形成ARF与c-Myc蛋白负反馈调控机制, ARF结合c-Myc蛋白并调控他的转录活性功能, 阻止细胞过增殖和转化, 同时抑制c-Myc蛋白诱导的基因表达<sup>[19-20]</sup>。 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 、 $c-myc$ 三者相互影响, 相互制约。本实验检测结果 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 及 $c-myc$  mRNA在HCC高表达, 通过相关分析发现:  $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 、 $c-myc$ 的mRNA表达成两两正相关。偏相关分析发现: 对影响 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 相关的 $c-myc$ 进行控制, 则 $p14^{ARF}$ 与 $ARF-BP1$ 的mRNA表达不相关( $r = 0.069$ ,  $P>0.05$ )。同样, 控制 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 与 $c-myc$ 的mRNA表达成正相关( $r = 0.632$ ,  $P<0.01$ ); 控制 $ARF-BP1$ ,  $p14^{ARF}$ 与 $c-myc$ 的mRNA表达成正相关( $r = 0.527$ ,  $P<0.01$ )。 $p14^{ARF}$ 、 $ARF-BP1$ 、 $c-myc$ 可能存在如下关系: 各种致癌因素导致原癌基因 $c-myc$ 激活并过度表达, 引发细胞恶性变, 为了克服这一异常过程诱发机体出现保护性的 $p14^{ARF}$ 抑癌基因高表

## ■同行评价

本研究内容全面,设计合理,层次分明,具有较好的学术价值。

达从而使*ARF-BP1*基因低表达,进而影响c-Myc蛋白功能,阻止细胞恶变<sup>[21]</sup>。本实验结果*ARF-BP1*基因却高表达,打破了*c-myc*过度表达引起*p14<sup>ARF</sup>*高表达使*ARF-BP1*低表达进而影响c-Myc蛋白功能,阻止细胞恶变的负反馈调节路径,导致肝癌的发生、发展,提示在HCC中*ARF-BP1*是*p14<sup>ARF</sup>*、*ARF-BP1*及*c-myc*三者关系的中心环节,*ARF-BP1*过度表达可能是影响HCC发生、发展的关键,干预*ARF-BP1*可能是治疗HCC的新途径,其机制有待进一步研究。

## 4 参考文献

- 1 Chen C, Matesic LE. The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 587-604
- 2 Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 2005; 121: 1071-1083
- 3 Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 2005; 123: 409-421
- 4 Vousden KH. p53: death star. *Cell* 2000; 103: 691-694
- 5 Tannapfel A, Busse C, Geissler F, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. INK4a-ARF alterations in liver cell adenoma. *Gut* 2002; 51: 253-258
- 6 Chang LL, Yeh WT, Yang SY, Wu WJ, Huang CH. Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J Urol* 2003; 170: 595-600
- 7 Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP, Borner MM, Altermatt HJ, Kappeler A, Tobler A, Fey MF, Thatcher N, Yarbrough WG, Betticher DC. Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene* 1998; 17: 2779-2785
- 8 Iida S, Akiyama Y, Nakajima T, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K, Yuasa Y. Alterations and hypermethylation of the p14(ARF) gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 2000; 87: 654-658
- 9 Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000; 60: 129-133
- 10 Tannapfel A, Busse C, Weinans L, Benicke M, Katalinic A, Geissler F, Hauss J, Wittekind C. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2001; 20: 7104-7109
- 11 Kanao H, Enomoto T, Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y, Miyatake T, Yoshizaki T, Buzard GS, Kimura T, Yoshino K, Murata Y. Correlation between p14(ARF)/p16(INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 2004; 213: 31-37
- 12 Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL. The c-Myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 1985; 318: 533-538
- 13 Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by Myc in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 1999; 4: 199-207
- 14 Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, Bachmann MH, Borowsky AD, Ruebner B, Cardiff RD, Yang Q, Bishop JM, Contag CH, Felsher DW. Myc inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; 431: 1112-1117
- 15 张弘, 黄介飞, 黄晓平, 黄东风, 魏群, 鲍柏军, 华婷琰. 应用基因芯片技术筛选肝细胞癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2557-2593
- 16 Wu CG, Salvay DM, Forgues M, Valerie K, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with Hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001; 20: 3674-3682
- 17 翁玉蓉, 房静远, 孙丹凤, 陈朝飞, 陆嵘, 顾伟齐, 朱红音. 胃癌组织中肿瘤相关基因甲基化及其表达与叶酸和代谢酶MTHFR基因多态性的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2192-2198
- 18 苏颖, 王峰. 胃肠道和眼附属器MALToma C-Myc的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1219-1221
- 19 Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR. p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* 2004; 431: 712-717
- 20 Datta A, Nag A, Pan W, Hay N, Gartel AL, Colamonici O, Mori Y, Raychaudhuri P. Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J Biol Chem* 2004; 279: 36698-36707
- 21 Chen D, Brooks CL, Gu W. ARF-BP1 as a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 2006; 94: 1555-1558

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。(常务副总编辑:张海宁 2008-08-18)

# 热休克蛋白gp96、髓样细胞白血病-1和阻抑蛋白在肝硬化和肝癌组织中的表达

华婷琰, 黄介飞, 张弘, 黄东风, 魏群

华婷琰, 黄介飞, 张弘, 黄东风, 魏群, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

江苏省卫生厅医学科研项目, No. H200330

作者贡献分布: 黄介飞与华婷琰对此文所作贡献均等; 此课题由黄介飞, 张弘, 魏群, 黄东风及华婷琰设计; 研究过程由华婷琰操作完成; 数据分析由华婷琰完成; 本论文写作由华婷琰与黄介飞完成。

通讯作者: 黄介飞, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科. jiefei Huang@163.com

电话: 0513-85806629 传真: 0513-85519820

收稿日期: 2008-06-03 修回日期: 2008-07-16

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

## Expression of heat shock protein gp96, myeloid cell leukemia sequence-1 and prohibitin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma

Ting-Yan Hua, Jie-Fei Huang, Hong Zhang, Dong-Feng Huang, Qun Wei

Ting-Yan Hua, Jie-Fei Huang, Hong Zhang, Dong-Feng Huang, Qun Wei, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Medical Research Fund from Health Department of Jiangsu Province, No. H200330

Correspondence to: Dr. Jie-Fei Huang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Western Temple Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. jiefei Huang@163.com

Received: 2008-06-03 Revised: 2008-07-16

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To analysis the expression pattern of heat shock protein (HSP) gp96, myeloid cell leukemia sequence-1 (MCL-1) and prohibitin (PHB) in liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC), as well as their clinical significances.

**METHODS:** Two-step immunohistochemical method was employed to detect the expression of gp96, MCL-1 and PHB in 19 cases of LC, 32 cases of HCC and 21 controls (non-LC or non-HCC liver tissues) respectively. Their relationships with the clinicopathological characteristics of HCC were investigated.

**RESULTS:** HSP gp96 expression increased by turns in the controls, LC and HCC ( $P < 0.05$ ), and it was significantly elevated in tumors without envelope, with necrosis or portal venous thrombosis. HSP gp96 expression correlated negatively with tumor differentiation ( $r = -0.4655$ ,  $P = 0.0073$ ) and positively with TNM staging ( $r = 0.5157$ ,  $P = 0.0025$ ). Both MCL-1 and PHB were over-expressed in HCC, with the former higher in tumors with necrosis and the latter higher in tumors without envelope than their counterpart ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Over-expression of HSP gp96, MCL-1 and PHB may play a role in the genesis and progression of HCC. Gp96 may be implicated in the development of LC as well as its subsequent malignant transformation, and may serve as a prognostic biomarker for HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Liver cirrhosis; Heat shock protein gp96; Myeloid cell leukemia sequence-1; Prohibitin; Immunohistochemistry

Hua TY, Huang JF, Zhang H, Huang DF, Wei Q. Expression of heat shock protein gp96, myeloid cell leukemia sequence-1 and prohibitin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2661-2665

## 摘要

**目的:** 分析热休克蛋白gp96、髓样细胞白血病-1(MCL-1)和阻抑蛋白(PHB)在LC和HCC组织中的表达及其临床意义。

**方法:** 免疫组化二步法分别检测19例LC, 32例HCC和21例对照组肝组织中gp96, MCL-1和PHB的表达, 并分析其与肝癌临床病理学特征的关系。

**结果:** gp96在对照组、LC组和HCC组的表达逐渐增强( $P < 0.05$ ); HCC无包膜、有坏死和门静脉有癌栓者gp96表达较高; gp96表达与HCC分化程度呈负相关( $r = -0.4655$ ,  $P = 0.0073$ ), 与TNM分期呈正相关( $r = 0.5157$ ,

## ■背景资料

肝硬化和肝癌的发生、发展是一个多步骤演进的过程, 了解肝硬化和肝癌发生、发展过程中的分子事件, 阐明其复杂的发生机制具有重要的临床意义。

## ■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科; 刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院



## ■研发前沿

肝硬化与肝癌关系密切,肝硬化尤其是乙型肝炎后肝硬化是肝癌发生、发展最重要的一个危险因素.因此阻断肝硬化的发生、发展及早期预测癌成为医学攻关的一个热点.

$P = 0.0025$ ). MCL-1和PHB在HCC组织中过表达, HCC有坏死者MCL-1表达高于无坏死者, HCC无包膜者PHB表达高于有包膜者( $P < 0.05$ ).

**结论:** gp96, MCL-1和PHB的过表达可能与HCC的发生、发展有关. gp96可能参与LC的发生、发展及向HCC的恶性转化, 有助于判断HCC患者的预后.

**关键词:** 肝细胞癌; 肝硬化; gp96; 髓样细胞白血病-1; 阻抑蛋白; 免疫组化

华婷琰, 黄介飞, 张弘, 黄东风, 魏群. 热休克蛋白gp96、髓样细胞白血病-1和阻抑蛋白在肝硬化和肝癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2661-2665  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2661.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见、恶性程度最高的肿瘤之一, 位居全球恶性肿瘤发病率的第5位、死因的第3位<sup>[1]</sup>. 肝硬化(liver cirrhosis, LC)尤其是乙型肝炎后肝硬化是肝癌发生最重要的一个危险因素<sup>[2]</sup>. LC和HCC的发生、发展涉及众多基因改变和分子事件. 我们曾利用基因芯片筛选出LC和HCC相关基因<sup>[3-5]</sup>, RT-PCR对部分基因表达进行了验证, 发现LC和HCC组织中热休克蛋白(heat shock protein)gp96和髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia sequence-1, MCL-1)上调显著, 而阻抑蛋白(prohibitin, PHB)下调显著. 本研究旨在用免疫组织化学方法研究三者对LC和HCC组织中的表达, 并初步探讨其与LC和HCC发生、发展的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集南通大学附属医院病理科2004-03/2007-05原发性肝癌组织石蜡标本32例, 均为HCC, 其中高分化癌9例, 中分化癌12例, 低分化癌11例, 男25例, 女7例, 平均年龄 $50.06 \pm 13.63$ 岁, 所有肝癌患者术前均未接受任何全身化疗、放射治疗、肝动脉栓塞和无水酒精注射等治疗; LC组织石蜡标本19例, 其中男12例, 女7例, 平均年龄 $52.37 \pm 12.14$ 岁; 同时选取非癌非硬化肝组织石蜡标本21例(癌旁非硬化肝组织11例, 肝血管瘤4例, 肝内胆管结石6例)作为对照, 其中男10例, 女11例, 平均年龄 $47.14 \pm 14.55$ 岁. 大鼠抗人gp96 mAb(1:100)、小鼠抗人MCL-1 mAb

(1:50)和小鼠抗人PHB mAb(1:100)均为美国NeoMarkers公司产品, PV9000通用二步法试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

**1.2 方法** 石蜡包埋标本经4  $\mu\text{m}$ 连续切片, 免疫组化PV9000二步法按说明书进行, DAB显色, 苏木素复染, 透明封片. 以PBS代替一抗作空白对照. 每张切片随机选取十个高倍视野, 每个视野计数100个细胞, 计算阳性细胞百分率. gp96和MCL-1以胞质或胞核出现棕黄色颗粒为阳性表达, 阳性细胞数 $<10\%$ 为阴性(-),  $10\%-25\%$ 为弱阳性(+),  $26\%-50\%$ 为阳性(++),  $51\%-75\%$ 为强阳性(+++),  $>75\%$ 为超强阳性(++++) . PHB以胞质出现棕黄色颗粒为阳性表达, 阳性细胞数 $<25\%$ 为阴性(-),  $26\%-50\%$ 为弱阳性(+),  $51\%-75\%$ 为阳性(++),  $>75\%$ 为强阳性(+++).

**统计学处理** 采用Stata 7.0统计软件, 阳性率的比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher's精确概率法, 阳性表达强度的两组间比较采用秩和检验, 多组间两两比较采用秩变换方差分析, 相关性分析采用Spearman等级相关,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 gp96的表达** gp96阳性表达物呈棕黄色颗粒, 在肝细胞和肝癌细胞主要分布于细胞质, 少数定位于胞核. HCC组、LC组和对照组gp96阳性表达率分别为93.75%(30/32), 78.95%(15/19)和57.14%(12/21); 表达强度分别为HCC组(-)2例, (+)3例, (++)6例, (+++)12例, (++++)9例, LC组(-)4例, (+)5例, (++)9例, (+++)1例, 对照组(-)9例, (+)12例. gp96阳性表达率和表达强度在对照组、LC组和HCC组均逐渐增加, 组间差异显著( $P < 0.05$ ).

HCC无包膜者gp96表达强于有包膜者, HCC有坏死者表达强于无坏死者, 门静脉有癌栓形成者表达强于无癌栓者( $P < 0.05$ ). 低分化HCC中gp96的表达高于高、中分化, gp96表达强度与HCC分化程度呈负相关( $r = -0.4655$ ,  $P = 0.0073$ ), 与肝癌TNM分期呈正相关( $r = 0.5157$ ,  $P = 0.0025$ , 表1). HCC组织gp96的表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小和数目、血清AFP值及肝脏基础疾病无关( $P > 0.05$ ).

**2.2 MCL-1的表达** MCL-1阳性表达物呈棕黄色颗粒, 在HCC组织主要分布于细胞质, 在LC和对照组主要分布于胞核. 各组间MCL-1阳性表达率无差异( $P > 0.05$ ); 表达强度在对照组、LC组和HCC组有逐渐增强的趋势, 但统计学差异仅见

## ■相关报道

本课题组曾利用基因芯片筛选出肝硬化和肝癌相关基因, RT-PCR对部分基因表达进行了验证, 发现肝硬化和肝癌组织中gp96和MCL-1表达上调显著, 而PHB表达下调显著.

表 1 gp96表达与HCC临床病理学特征的关系

项目	n	表达强度				
		-	+	++	+++	++++
肿瘤包膜						
有	6	2	0	2	2	0
无	26	0	3	4	10	9
肿瘤坏死						
有	8	0	0	0	3	5
无	24	2	3	6	9	4
门静脉癌栓						
有	7	0	0	0	3	4
无	25	2	3	6	9	5
分化程度						
高分化	9	1	1	2	4	1
中分化	12	1	2	4	3	2
低分化	11	0	0	0	5	6
TNM分期						
I 期	18	1	3	5	7	2
II 期	4	1	0	1	1	1
III 期	10	0	0	0	4	6

于HCC组和对照组之间( $P<0.05$ , 表2).

32例HCC中8例发生坏死, 其MCL-1表达分别为(-)1例, (++)4例, (+++)3例; 24例未发生坏死, 其MCL-1表达分别为(-)11例, (+)6例, (++)6例, (+++)1例. MCL-1表达在肿瘤有坏死者强于无坏死者( $P<0.05$ ). HCC组织MCL-1表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小和数目、肿瘤有无包膜、门静脉有无癌栓、血清AFP值、肝脏基础疾病、肿瘤分化程度及TNM分期均无关( $P>0.05$ ).

**2.3 PHB的表达** PHB阳性表达物呈棕黄色颗粒, 在肝细胞和肝癌细胞中分布于细胞质. 肝癌组PHB的阳性表达率和表达强度均高于肝硬化组和对照组( $P<0.05$ , 表3).

32例HCC, 6例有肿瘤包膜, 其PHB表达分别为(+)4例, (++)2例; 26例无肿瘤包膜, 其PHB表达分别为(+)6例, (++)13例, (+++)7例. 肿瘤无包膜者PHB表达强于有包膜者( $P<0.05$ ). HCC组织PHB表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小和数目、肿瘤有无坏死、门静脉有无癌栓、血清AFP值、肝脏基础疾病、肿瘤分化程度及TNM分期均无关( $P>0.05$ ).

### 3 讨论

gp96是存在于真核生物细胞内质网中分子质量为96 kDa的热休克蛋白, 属HSP90家族. Fu *et al*<sup>[6]</sup>认为, gp96的高表达可促进肿瘤的发生. 在乳腺癌、肾癌、黑色素瘤、肺癌、食管癌、胃癌、

表 2 Mcl-1在HCC, LC和对照组肝组织中的表达

分组	n	表达强度			
		-	+	++	+++
HCC组	32	12	6	10	4
LC组	19	10	5	4	0
对照组	21	12	9	0	0

表 3 PHB在HCC, LC和对照组肝组织中的表达

分组	n	表达强度			
		-	+	++	+++
HCC组	32	0	10	15	7
LC组	19	4	6	8	1
对照组	21	4	12	5	0

肝癌和结肠癌等组织中都发现gp96有不同程度的高表达. Singh-Jasuja *et al*<sup>[7]</sup>认为gp96的表达能增强机体对肿瘤的免疫反应. gp96自体肿瘤疫苗对黑色素瘤和结肠癌的治疗作用已经进入了临床I/II期评价<sup>[8-9]</sup>.

肝硬化与肝癌的发生密切相关, 每年约有2%-6.6%的肝硬化患者进展为肝癌, 而非肝硬化患者的肝癌发生率仅为0.4%. 本研究中gp96的阳性表达率和表达强度在对照组、LC组和HCC组逐渐增高, 推测其可能参与了肝硬化的发生、发展及向肝癌的恶性转化过程. 在肝硬化的形成过程中, 肝细胞再生, 需要gp96作为分子伴侣来调节、稳定这一过程; 在肝癌的发生、发展过程中, 由于肿瘤组织生长快, 局部缺血、缺氧及酸中毒, 这些应激条件诱使肿瘤组织产生热休克蛋白, 从而保护肿瘤细胞战胜机体内各种不利的生理环境. 同时, 作为一种抗凋亡蛋白<sup>[10]</sup>, gp96可能通过诱导细胞凋亡和增殖失衡, 而在肝硬化和肝癌的发生中发挥重要作用. 此外, 大分子HBV表面蛋白可以活化gp96的转录增强子, 诱导gp96表达升高. 本研究51例肝硬化和肝癌患者中有45例血清HBsAg为阳性, 可能是造成gp96高表达的另一个原因.

本研究显示, 无包膜的HCC组织中gp96表达强于有包膜者; 肿瘤有坏死者表达强于无坏死者; 门静脉有癌栓形成者表达强于无癌栓者; gp96表达与HCC分化程度呈负相关, 与TNM分期呈正相关. 表明gp96的表达与HCC的生物学行为有关, 其过表达可能是造成HCC扩散、浸润和转移的原因之一, 是HCC预后不良的重要

### ■应用要点

gp96, MCL-1和PHB的过表达可能与肝癌的发生、发展有关, 有可能成为肝癌包括小肝癌的诊断标志物. gp96可能参与了肝硬化的发生、发展及向肝癌的恶性转化, 有助于判断肝癌患者的预后.

## ■名词解释

1 MCL-1基因: 是在研究人髓样白血病细胞系ML-1用佛波酯诱导后, 沿单核/巨噬细胞途径分化过程中, 作为早期诱导基因被首次发现的, 属Bcl-2基因家族的抗凋亡成员。

2 PHB基因: 是一种潜在的肿瘤抑制基因, 因其具有明显的抗细胞增殖、抗凋亡作用而得名。

因素。

目前对于小肝癌的诊断主要是依据AFP和影像学检查。肝癌患者的血清AFP浓度与肿瘤大小大体上呈正相关。本研究显示, gp96的表达与肿瘤大小和血清AFP值无关, 在HCC直径 $\leq 3$  cm组和直径 $> 3$  cm组之间无差异, 在AFP $< 400$   $\mu\text{g/L}$ 组和AFP $\geq 400$   $\mu\text{g/L}$ 组之间无差异, 提示gp96对小肝癌也具有一定的诊断价值。

MCL-1基因是在研究人髓样白血病细胞系ML-1用佛波酯诱导后, 沿单核/巨噬细胞途径分化过程中, 作为早期诱导基因被首次发现的, 属Bcl-2基因家族的抗凋亡成员。MCL-1的亚细胞定位与细胞生长状态密切相关<sup>[11]</sup>: 在呈指数生长的细胞中, MCL-1主要位于线粒体; 在静止期细胞, MCL-1主要位于细胞核。本研究中HCC组织MCL-1主要呈浆型表达, LC和对照组则以核型表达为主。

MCL-1基因定位于人染色体1q21, 该区域在肿瘤性疾病及其癌前病变中是一个易变化的区域, 再加上MCL-1所表现出来的抗细胞凋亡作用, 人们推测MCL-1的表达改变可能与肿瘤发生有关。这种推测首次被证实是在MCL-1转基因小鼠实验中, 人们发现MCL-1转基因小鼠B细胞淋巴瘤的发生率增加<sup>[12]</sup>。随后, 越来越多的研究表明MCL-1在人类多种肿瘤组织中过表达, 如非小细胞肺癌<sup>[13]</sup>、非霍奇金淋巴瘤<sup>[14]</sup>、多发性骨髓瘤<sup>[15]</sup>等。MCL-1在HCC组织的表达显著高于邻近癌旁组织, 且与肿瘤大小、肿瘤分级和肝移植术前接受的治疗无关<sup>[16]</sup>。反义寡核苷酸技术干扰HCC细胞株MCL-1的表达后, HCC细胞凋亡增加, 且对化疗药物的敏感性增加<sup>[17]</sup>。

本研究中MCL-1在对照组、LC组和HCC组的表达有逐渐增强的趋势, 但统计学差异仅见于HCC组和对照组之间, 考虑受样本量的限制, 可能导致某些统计趋势未能充分显现。MCL-1表达与肿瘤大小无关, 在HCC直径 $\leq 3$  cm组和直径 $> 3$  cm组之间无差异, 提示MCL-1对小肝癌也具有一定的诊断价值。另外, 我们发现HCC有坏死者MCL-1的表达强度高于无坏死者。肿瘤组织由于代谢旺盛, 局部缺血、缺氧和酸性代谢产物积聚, 引起肿瘤细胞坏死, 坏死局部炎症反应强烈, 产生大量的细胞因子, 而细胞因子可以迅速诱导MCL-1表达升高<sup>[18]</sup>。同时MCL-1的高表达可以保护中性粒细胞免于凋亡, 延长其寿命, 进而参与炎症反应。

PHB基因是一种潜在的肿瘤抑制基因, 因

其具有明显的抗细胞增殖、抗肿瘤作用而得名。关于肿瘤组织中PHB表达的研究结果存在不一致现象。Ryu *et al*<sup>[19]</sup>研究发现PHB在胃癌组织中的表达显著高于癌旁组织; 而Jang *et al*<sup>[20]</sup>的研究显示早期胃癌组织中PHB的表达下调。目前有关PHB在肝癌中的研究尚不多。蛋白质组研究发现肝癌细胞株HCC-M中PHB表达上调<sup>[21]</sup>。

本研究中, 免疫组化显示HCC组织PHB的阳性表达率和表达强度均显著高于LC和对照组, PHB表达与肿瘤大小无关, 在HCC直径 $\leq 3$  cm组和直径 $> 3$  cm组之间无差异, 提示PHB对肝癌包括小肝癌具有一定的诊断价值。

通常肿瘤组织中癌蛋白增加, 抑癌蛋白减少, 但为什么PHB在肿瘤组织中表达会增加呢? Nijtmans *et al*<sup>[22]</sup>提出了这样的解释: 增殖细胞中PHB的过表达是由于其启动子区存在能与MYC癌蛋白相结合的调控元件, 而肿瘤组织中MYC等癌蛋白的表达通常升高, 从而诱导了PHB的表达。

有趣的是, 在我们基因芯片和RT-PCR实验中, LC组织和HCC组织PHB表达均下调; 而免疫组化结果显示, LC组织PHB蛋白表达与对照组无差异, HCC组织PHB蛋白表达上调。推测可能由于翻译水平及翻译后水平的调控机制, 导致了PHB的mRNA水平和蛋白水平出现不一致现象。

本研究表明, gp96、MCL-1和PHB的过表达可能与HCC的发生、发展有关, 有可能成为肝癌包括小肝癌的诊断标志物。gp96可能参与了肝硬化的发生、发展及向肝癌的恶性转化, 有助于判断肝癌患者的预后。结合之前我们的研究, 充分证明了基因芯片技术能快速、高效地筛选出肝硬化和肝癌相关基因, 对这些基因进一步进行功能研究将为阐明肝硬化和肝癌复杂的发生机制, 发现肝硬化和肝癌的诊断标志物及药物治疗干预靶点提供可能。

**致谢:** 衷心感谢南通大学附属医院病理科章建国、黄华老师对本课题的大力支持和帮助。

## 4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Luo RH, Zhao ZX, Zhou XY, Gao ZL, Yao JL. Risk factors for primary liver carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4431-4434
- 3 张弘, 黄介飞, 黄晓平, 黄东风, 魏群, 鲍柏军, 华婷琰. 应用基因芯片技术筛选肝细胞癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2387-2393
- 4 黄东风, 黄介飞, 张弘, 黄晓平, 鲍柏军, 魏群, 华婷琰. 应用基因芯片技术筛选肝硬化相关基因. *世界华人消*



- 化杂志 2007; 15: 3377-3384
- 5 张弘, 黄介飞, 黄晓平, 黄东风, 魏群. 基因芯片在肝细胞癌相关基因筛选中的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2007; 16: 326-329
- 6 Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 741-744
- 7 Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2211-2215
- 8 Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR, Gallino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carrabba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchianò A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Corsi M, Cascinelli N, Lewis JJ, Srivastava P, Parmiani G. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4169-4180
- 9 Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, Rivoltini L, Schiavo M, Regalia E, Mariani L, Camerini T, Marchianò A, Andreola S, Camerini R, Corsi M, Lewis JJ, Srivastava PK, Parmiani G. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3235-3245
- 10 Reddy RK, Lu J, Lee AS. The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 28476-28483
- 11 Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 3117-3126
- 12 Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CY, Gascoyne RD, Craig RW. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 2001; 97: 3902-3909
- 13 Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB. Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 267-276
- 14 Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Admirand JH, Oyarzo M, Ramalingam P, Paraguya A, McDonnell TJ, Amin HM, Medeiros LJ. MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2004; 35: 1095-1100
- 15 Wuilleme-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Gouill S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 2005; 19: 1248-1252
- 16 Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Müller M, Krammer PH, Galle PR. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 25-32
- 17 Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S, Bodingbauer M, Crevenna R, Monia BP, Peck-Radosavljevic M, Wacheck V. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol* 2006; 44: 151-157
- 18 Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; 16: 444-454
- 19 Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, Myong NH, Hwang CH, Lee GS, Yom HC. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 505-509
- 20 Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res* 2004; 14: 491-499
- 21 Seow TK, Ong SE, Liang RC, Ren EC, Chan L, Ou K, Chung MC. Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1787-1813
- 22 Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 143-155

#### ■同行评价

本研究实验对照设计合理可靠, 统计处理方法恰当, 具有一定的科学性、创新性和可读性, 学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志被收录情况

**本刊讯** 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(常务副总编辑: 张海宁 2008-08-18)

# 阿德福韦酯对HBeAg(+)慢性乙型肝炎的治疗作用

王艳斌, 谢雯, 欧蔚妮, 闫杰, 成军

## ■背景资料

慢性乙肝治疗中抗病毒治疗越来越为医生们所共识。进口阿德福韦酯是一种在临床上应用较广泛的核苷类抗病毒药物, 相关临床试验数据较多。但同类国产药物虽然在临床应用较广泛, 但尚未有大量明确实验数据。本文目的想通过观察国产同类药物治疗一年期间效果及副作用, 使对此类药物疗效及副作用的认识更加明确, 以指导临床应用。

王艳斌, 谢雯, 欧蔚妮, 闫杰, 成军, 北京地坛医院 北京市 100011

作者贡献分布: 本课题病例搜集及资料填写由王艳斌、欧蔚妮及闫杰完成; 试验设计由成军与谢雯完成; 资料汇总、统计学处理及本论文撰写由王艳斌完成。

通讯作者: 王艳斌, 100011, 北京东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院。wangyanbin01@163.com

电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64227308

收稿日期: 2008-07-04 修回日期: 2008-08-04

接受日期: 2008-08-06 在线出版日期: 2008-08-18

## Therapeutic effect of adeforvir dipivoxil for HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B

Yan-Bin Wang, Wen Xie, Wei-Ni Ou, Jie Yan, Jun Cheng

Yan-Bin Wang, Wen Xie, Wei-Ni Ou, Jie Yan, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Yan-Bin Wang, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Avenue, Dongcheng District, Beijing 100011, China. wangyanbin01@163.com

Received: 2008-07-04 Revised: 2008-08-04

Accepted: 2008-08-06 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To verify the efficacy and safety of adeforvir dipivoxil in the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB).

**METHODS:** A total of 40 HBeAg-positive patients with CHB were divided into group A ( $n = 26$ ) and B ( $n = 14$ ). The patients in group A and B were treated with adeforvir dipivoxil (10 mg/d) and placebo, respectively, for 12 wk, and then all the patients were treated with adeforvir dipivoxil (10 mg/d). The responses were observed 12, 24, and 48 wk after treatment, and the hepatitis B virus markers (HBVMs), and HBV DNA, liver function, kidney function, blood routine and urine routine were also measured.

**RESULTS:** After 12 wk of treatment, the viral response rates were significantly different between group A and B (80.77% vs 7.14%,  $P < 0.01$ ); the ALT/AST normalization rates had no marked difference between the two groups. After 48 wk of treatment, the viral response rates in both groups were 78.38%, and the ALT/AST

normalization rates were 59.46%; the levels of ALT, AST and TBIl level reduced significantly ( $t = 5.19, 4.48, 2.47, P < 0.01$ ) compared with those before treatment, and the HBeAg-negative rates were 18.92%. No severe adverse reactions were found in both groups.

**CONCLUSION:** Adeforvir dipivoxil has obvious effect on viral and biochemical responses in CHB patients, and it is effective and safe in the treatment of CHB.

**Key Words:** Adeforvir dipivoxil; Chronic hepatitis B; Efficacy

Wang YB, Xie W, Ou WN, Yan J, Cheng J. Therapeutic effect of adeforvir dipivoxil for HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2666-2668

## 摘要

**目的:** 验证阿德福韦酯对HBeAg(+)慢性乙型肝炎的抗病毒疗效及安全性。

**方法:** 试验组给予阿德福韦10 mg/d, 口服, 对照组给予安慰剂治疗。试验12 wk后, 对照组全部改为阿德福韦10 mg/d治疗。在治疗12、24、48 wk时检测患者HBVMs、HBV DNA、肝功能、肾功能、血常规和尿常规。

**结果:** 治疗12 wk时治疗组与对照组比较病毒学应答率差异有统计学意义(80.77% vs 7.14%,  $P < 0.01$ ), ALT/AST水平复常率在两组间差异并无统计学意义。治疗48 wk时病毒学应答率为78.38%, ALT/AST复常率为59.46%, 治疗48 wk后ALT、AST、TBIl水平较治疗前有明显下降( $t = 5.19, 4.48, 2.47$ , 均 $P < 0.01$ ), HBeAg转阴率为18.92%。所有观察病例均无严重不良反应发生。

**结论:** 阿德福韦酯对乙肝病毒复制有显著抑制作用, 能明显改善肝功能, 服用10 mg/d剂量对肾功能、血常规及肝脏合成功能无不良影响。

**关键词:** 阿德福韦酯; 慢性乙型肝炎; 疗效

## ■同行评议者

唐晓鹏, 教授, 中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科; 杨林, 副研究员, 中山大学附属第三医院感染科

王艳斌, 谢雯, 欧蔚妮, 闫杰, 成军. 阿德福韦酯对HBeAg(+)慢性乙型肝炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2666-2668

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2666.asp>

## 0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是一种难治性疾病. 全世界约有20亿人感染过乙肝病毒(HBV), 全球每年约100万人死于与HBV感染相关的肝脏疾病<sup>[1-3]</sup>, 我国是CHB的高流行区, 约10%为乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者, 其中25%进入慢性肝病阶段, 而现在已有大量资料显示<sup>[4]</sup>, 通过有效的抗乙肝病毒治疗, 可延缓疾病进程. CHB发病机制十分复杂, 病毒持续复制和免疫功能紊乱是发病重要因素. 目前CHB的治疗主要包括抗病毒、免疫调节、抗炎保肝、抗纤维化和对症治疗, 其中抗HBV药物是目前治疗CHB最重要和有效的方法<sup>[5]</sup>. 我院于2005-09/2006-12用阿德福韦酯治疗HBeAg(+)CHB患者40例, 结果显示治疗效果良好.

## 1 材料和方法

1.1 材料 选择成年HBeAg(+)CHB患者40例, 其中男33例, 平均年龄 $29.91 \pm 9.11$ , 女7例, 平均年龄 $26.5 \pm 5.83$ , 诊断符合2000年《病毒性肝炎防治方案》中病毒性肝炎诊断标准<sup>[6]</sup>. 所有病例符合下列条件: (1)HBV DNA(荧光定量) $\geq 10^8$ 拷贝/L; (2)乙肝病毒血清标志物(HBVMS)为: HBsAg阳性, HBeAg阳性, 抗-HBc阳性. 抗-HBs阴性, 抗-HBe阴性; (3)ALT $\geq 80$  U/L且ALT $\leq 500$  U/L血总胆红素水平(SB) $< 40$   $\mu\text{mol/L}$ ( $20$   $\mu\text{mol/L}$ 为正常值); (4)排除由药物、酒精和其他因素所致的肝功能异常. (5)女性排除妊娠.

1.2 方法 试验前12 wk为双盲对照, 试验组给予阿德福韦10 mg/d po, 对照组给予安慰剂治疗. 试验组与对照组在年龄、性别、病史、肝功能、HBV DNA定量方面条件齐同, 无显著性差异. 按照医学伦理学要求, 为减少对安慰剂组患者可能产生的不良影响, 试验12 wk结束时揭盲, 对照组全部改为阿德福韦10 mg/d治疗. 在治疗12、24、48 wk时分别抽取患者静脉血查HBVMS(放射免疫法检测)及HBV DNA(荧光定量聚合酶链反应法检测)、肝功能、肾功能、血常规、尿常规.

**统计学处理** 计数资料用mean $\pm$ SD表示, 组间比较用成对资料t检验, 率的比较采用四格表资料 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为有显著性.

表 1 12、24、48 wk疗效前后比较

分组	n	病毒学应答		生化学应答		HBeAg转阴		HBeAg转换	
		n	应答率(%)	n	应答率(%)	n	应答率(%)	n	应答率(%)
治疗组	26	21	80.77	11	42.30	2	7.69	1	3.85
12 wk									
对照组	14	1	7.14	2	14.29	0	0.00	0	0.00
12 wk									
对照组	14	12	85.71	6	42.86	2	14.29	2	14.29
24 wk									
全部	37 <sup>N</sup>	29	78.38	22	59.46	7	18.92	6	16.22
48 wk									

<sup>N</sup>至48 wk患者因妊娠, 自行停药及转氨酶升高各退出1例.

## 2 结果

2.1 肝功能变化: 治疗12 wk时治疗组生化学应答为11例(11/26, 42.30%), 而对照组仅为2例(2/14, 14.29%), 但经统计学检验无统计学意义( $\chi^2 = 3.25$ ,  $P > 0.05$ ). 至24 wk时, 对照组共有6例发生生化学应答(6/14, 42.86%), 至48 wk, 所有观察病例中22例发生生化学应答(22/37, 59.46%, 表1). 治疗前ALT、AST及TbIL水平与治疗48 wk存在明显差异, 经统计学检验有统计学意义( $P < 0.01$ , 表2).

2.2 HBV DNA变化: 治疗12 wk治疗组病毒学应答为21例(21/26, 80.77%), 而对照组仅为1例(1/14, 7.14%), 两组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 17.07$ ,  $P < 0.01$ ), 至24 wk, 对照组共有12例发生病毒学应答(12/14, 85.71%, 表1). 提示阿德福韦酯10 mg/d口服治疗12 wk即可获得较好的病毒学应答. 至48 wk, 所有观察病例中29例发生病毒学应答(29/37, 78.38%, 表1), 而其中48 wk HBV DNA阴转例数为11例(11/37, 29.73%).

2.3 HBVMS 治疗12 wk治疗组与对照组发生HBeAg转阴率分别为7.69和0, 两组间差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.02$ ,  $P > 0.05$ ). 治疗12 wk时治疗组与对照组发生血清学转换率(即HBeAg转阴, 抗-HBe转阳性)分别为3.85和0, 两组间差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.10$ ,  $P > 0.05$ , 表1). 对照组用药至24 wk又有2例患者HBeAg转阴及HBeAg血清学转换. 全部观察病例用药至48 wk共有7例发生HBeAg转阴(7/37, 18.92%), 6例发生HBeAg血清学转换(6/37 16.22%).

2.4 安全性评价 在整个试验中共有4例患者发生不良反应, 表现为转氨酶升高1例, 恶心1例, 腹泻1例, 脱发1例, 不良反应发生率为10.26%. 未发现肾功能损害, 对血象无影响(表2). 尿常规检查未见异常.

## ■ 研发前沿

国内外关于此方面研究多集中在阿德福韦酯疗效、曾见大剂量时肾功能损害、耐药发生等方面, 针对其长期使用所导致乙肝病毒耐药变异位点不同, 建议使用拉米呋定或恩替卡韦耐药者换用阿德福韦酯治疗, 或在早期联合应用减少耐药发生.



### ■同行评价

本研究主题较新颖,设计基本合理,无伦理问题,有一定的学术价值。

表 2 治疗前后肝功能、肾功能及血常规变化的比较

		治疗前	治疗48 wk后	t	P
治肝功能	ALT	186.76 ± 152.33	55.27 ± 47.27	5.19	<0.01
		90.68 ± 71.92	36.65 ± 24.30		
	AST	19.32 ± 9.65	14.80 ± 6.16	2.47	<0.01
		9297.11 ± 3392.10	9377.03 ± 2103.64		
肾功能	CHE	9297.11 ± 3392.10	9377.03 ± 2103.64	0.13	>0.05
血常规	ALB	43.81 ± 3.84	46.73 ± 2.19	4.13	<0.01
		4.35 ± 1.16	4.61 ± 1.34		
	BUN	106.63 ± 13.06	91.07 ± 12.91	5.26	<0.01
		5.47 ± 1.31	5.03 ± 0.98		
	HBG	148.91 ± 14.67	158.53 ± 10.91	3.28	<0.01
		171.50 ± 49.62	174.17 ± 59.40	0.21	>0.05
	PLT	171.50 ± 49.62	174.17 ± 59.40		

### 3 讨论

阿德福韦酯是阿德福韦的前体,在体内水解为阿德福韦,在细胞激酶的作用下被磷酸化为有活性的代谢产物即阿德福韦二磷酸盐。他一方面与自然底物脱氧腺苷三磷酸竞争,另一方面整合到病毒DNA后引起DNA链延长终止,而最终抑制HBV cccDNA的复制。阿德福韦还可以诱导内生性干扰素 $\alpha$ ,增加自然杀伤细胞(NK)的活力和刺激机体的免疫反应,因此有较强的抗HBV作用<sup>[7-10]</sup>。随机双盲安慰剂对照的临床试验表明<sup>[11]</sup>,在HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者,口服阿德福韦酯可明显抑制HBV DNA复制,应用1年时的HBV DNA转阴率( $<10^6$ 拷贝/L)为28%,HBeAg血清学转换率为12%,其耐药发生率为0。本临床研究中口服阿德福韦酯10 mg/d治疗HBeAg(+)慢性乙型肝炎12 wk,肝功能复常率达42.30%,而对照组为14.29%。治疗12 wk治疗组病毒学应答率80.77%,对照组为7.14%,二者经统计学检验均有显著性差异,提示阿德福韦酯抗乙肝病毒复制作用并非像有些文献报道的那样起效缓慢、作用温和,但是本研究病例数较少,而且用药前患者肝功能转氨酶升高水平偏高,这样的病例往往伴有内源性病毒清除,所以

显示疗效较好,可能与此也有一定的关系。治疗48 wk肝功能复常率为59.47%,病毒学应答率为78.38%,48 wk病毒学应答率低于24 wk的原因考虑与脱落患者中2例均为12 wk即发生病毒学应答者有关。48 wk HBV DNA阴转率为29.73%,与国内文献报道<sup>[12]</sup>随机双盲安慰剂对照治疗一年的临床试验中HBV DNA阴转率(34%)有一些差别,考虑与本结果将所有入选病例统一分析有关,而按照报道试验结果分组统计则二者结果近似(分组后HBV DNA阴转率31.25%)。48 wk HBeAg血清学转换率为16.22%,HBeAg转阴率为18.92%。不良反应发生率为10.26%,未见严重不良反应病例。本研究提示阿德福韦酯10 mg/d口服对乙肝病毒复制有显著抑制作用,且能明显改善肝功能,起效较快,作用较强,在治疗乙型肝炎时不良反应较少见,是一种有效的、安全的抗乙肝病毒治疗药物。

### 4 参考文献

- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861
- Van Damme P, Van Herck K. A review of the efficacy, immunogenicity and tolerability of a combined hepatitis A and B vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2004; 3: 249-267
- Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol* 2000; 61: 362-366
- 白茵, 赵桂珍. 抗病毒治疗在慢性乙型肝炎治疗中的重要性. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 5-9
- 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 881-891
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Arterburn S, Xiong S, Currie G, Brosgart CL. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2673-2681
- Baker DE. Adefovir dipivoxil: focus on its use in the treatment of chronic hepatitis B. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5: 89-100
- Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Adefovir dipivoxil in the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 475-483
- 茅益民, 曾民德. 抗乙型肝炎病毒新药-阿德福韦酯. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 61-63
- Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfssohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808-816
- 茅益民, 曾民德, 魏来, 谢青, 陆志檬, 牛俊奇, 陈亚岗, 雷秉钧, 张鸿飞, 杨积明, 李军, 唐勤, 吴国祥, 曹爱平. 国产阿德福韦酯治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者48周的多中心、随机、双盲、安慰剂平行对照临床研究. *肝脏* 2007; 12: 355-359

编辑 李军亮 电编 郭海丽

# 肝移植后慢性移植肝失功的病因诊断和治疗18例

施晓雷, 丁义涛, 吴亚夫, 吴星宇, 仇毓东, 周建新, 江春平, 张炜炜

施晓雷, 丁义涛, 吴亚夫, 吴星宇, 仇毓东, 周建新, 江春平, 张炜炜, 南京大学医学院附属南京鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

作者贡献分布: 此课题由丁义涛与施晓雷设计; 研究过程由施晓雷, 丁义涛, 吴亚夫, 吴星宇, 仇毓东, 周建新, 江春平及张炜炜完成; 数据分析由施晓雷完成; 本论文写作由丁义涛与施晓雷完成。

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属南京鼓楼医院肝胆外科, yitaoding@hotmail.com  
电话: 025-83304616-66866

收稿日期: 2008-06-17 修回日期: 2008-07-18

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

## Etiological diagnosis and management of chronic graft dysfunction after liver transplantation: an analysis of 18 cases

Xiao-Lei Shi, Yi-Tao Ding, Ya-Fu Wu, Xing-Yu Wu, Yu-Dong Qiu, Jian-Xin Zhou, Chun-Ping Jiang, Wei-Wei Zhang

Xiao-Lei Shi, Yi-Tao Ding, Ya-Fu Wu, Xing-Yu Wu, Yu-Dong Qiu, Jian-Xin Zhou, Chun-Ping Jiang, Wei-Wei Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

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

Received: 2008-06-17 Revised: 2008-07-18

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To analyze the etiology, diagnosis and management of chronic graft dysfunction after liver transplantation.

**METHODS:** A total of 291 cases underwent orthotopic liver transplantation in our hospital from January 1996 to December 2006. The clinical data of 18 cases with chronic graft dysfunction after liver transplantation were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Of 18 patients with chronic graft dysfunction after liver transplantation, 2 were found with recurrent biliary inflammation, 2 with biliary sludge, 1 with anastomotic biliary stricture, 4 with nonanastomotic biliary stricture, 3 with recurrent hepatitis B, 1 with recurrent hepatitis C,

1 with recurrent primary biliary cirrhosis, 1 with hepatic artery stricture, 1 with cytomegalovirus (CMV) infection and 2 with chronic rejection. After different medical support treatment, intervention or liver re-transplantation, 11 patients were improved, and 4 cases were found with recurrent diseases. The rest 3 cases died.

**CONCLUSION:** Different therapeutic approaches may be taken in accordance with different causes of chronic graft dysfunction after liver transplantation. For irreversible hepatic allograft failure, liver re-transplantation should be carried out.

**Key Words:** Liver transplantation; Chronic graft dysfunction; Etiology; Diagnosis; Treatment

Shi XL, Ding YT, Wu YF, Wu XY, Qiu YD, Zhou JX, Jiang CP, Zhang WW. Etiological diagnosis and management of chronic graft dysfunction after liver transplantation: an analysis of 18 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2669-2672

## 摘要

**目的:** 探讨肝移植后慢性移植肝失功的病因诊断和治疗。

**方法:** 回顾性分析我院1996-01/2006-12完成的291例原位肝移植中18例肝移植后慢性移植肝失功患者的临床资料, 总结肝移植后慢性移植肝失功的病因及诊断和治疗。

**结果:** 18例肝移植后慢性移植肝失功患者发生反复胆道感染2例、胆管广泛胆泥2例、胆管吻合口狭窄1例、胆管非吻合口狭窄4例、乙型肝炎复发3例、丙型肝炎复发1例、胆汁性肝硬化1例、肝动脉狭窄1例、巨细胞病毒感染(CMV)感染1例和慢性排斥反应2例。通过各种内科支持治疗、介入治疗或再次肝移植, 11例好转, 4例病情反复, 3例死亡。

**结论:** 根据肝移植后慢性移植肝失功的不同病因, 可采取不同的治疗手段; 对于不可逆转的移植肝功能衰竭, 应进行再次肝移植。

**关键词:** 肝移植; 移植肝失功; 病因; 诊断; 治疗

## ■背景资料

肝移植是治疗终末期肝病的有效方法, 但是各种原因导致的肝移植后慢性移植肝失功是肝移植领域目前面临的一大难题, 严重影响着肝移植患者的长期生存质量。

## ■同行评议者

王鲁, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所; 邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

## ■研究前沿

分析肝移植后慢性移植肝失功的病因,并针对不同病因探索不同的处理方法是该领域研究的重点。

施晓雷,丁义涛,吴亚夫,吴星宇,仇毓东,周建新,江春平,张炜炜.肝移植后慢性移植肝失功的病因诊断和治疗18例.世界华人消化杂志 2008; 16(23): 2669-2672

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2669.asp>

## 0 引言

肝移植是治疗终末期肝病的有效方法,但是各种原因导致的肝移植后慢性移植肝失功是肝移植领域目前面临的一大难题,严重影响肝移植患者的长期生存.慢性移植肝失功是指在移植后1年以上出现血清谷草转氨酶、碱性磷酸酶、胆红素的不断增加或持续增高(超出正常值上限2倍或2倍以上)<sup>[1]</sup>.本我们回顾1996-01/2006-12完成的291例肝移植患者的中,其中有18例患者属于肝脏移植后慢性移植肝失功,现对其病因诊断和治疗总结如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院1996-01/2006-12间进行的291例肝移植患者.其中男195例,女96例;年龄32-71岁,平均48岁.291例患者中,有18例患者最终被诊断为肝脏移植后慢性移植肝失功.18例肝脏移植后慢性移植肝失功患者中,男12例,女6例,年龄33-62岁,平均41岁.原发疾病分别为:乙型肝炎后肝硬化失代偿期5例;慢性乙型重症肝炎4例;慢性丙型重症肝炎1例;原发性胆汁性肝硬化2例;原发性硬化性胆管炎2例;酒精性肝硬化1例;原发性肝癌3例.首次肝移植与被诊断为肝移植后慢性移植肝失功相距时间为13-37 mo不等.患者无特异性临床表现,部分患者以乏力、纳差、恶心呕吐为主要临床表现;部分以发热、寒颤、黄疸、腹痛等胆管炎为主要临床表现;部分以阻塞性黄疸为主要临床表现,部分以不全胆道梗阻和/或反复发生的胆管炎为主要临床表现.所有患者的共同特点是出现血清谷草转氨酶、碱性磷酸酶、胆红素的不断增加或持续增高。

**1.2 方法** 详细病史询问.包括:(1)肝移植术前原发肝脏疾病情况.(2)肝移植后早期有无并发症:主要询问早期有无感染、胆道并发症、血管并发症、急性及亚急性排斥反应情况.(3)肝移植术后的肝功能:检查随访过程中的肝功能变化情况,及相应的药物治疗情况.(4)免疫抑制剂方案的血液浓度:详细询问患者免疫抑制方案,免疫抑制药的使用情况,检查随访的免疫抑制药的血药浓度.(5)先前的肝活检情况:明确有无排斥反应及复发肝脏疾病.(6)其他:包括随访过程

表 1 肝移植后慢性移植肝失功的病因诊断分析

病因	n
胆道并发症	2
反复胆道感染	2
胆管广泛胆泥	1
吻合口狭窄	4
非吻合口狭窄	3
原发病复发	1
乙型肝炎复发	1
丙型肝炎复发	1
胆汁性肝硬化	1
肝动脉狭窄	1
巨细胞病毒感染	1
慢性排斥反应	2

的肝脏及血管超声检查情况.实验室检查.所有患者的实验室检查必须包括以下内容:(1)血常规.(2)生化检查:包括肝肾功能.(3)病毒性肝炎的血清学检查.(4)免疫抑制剂血药浓度.(5)常见病毒抗体及抗原检查.影像学检查.(1)超声检查明确肝脏有无硬化及占位性病变;血管包括肝动脉及门静脉有无血栓及狭窄情况,肝后下腔静脉有无狭窄情况;胆道有无狭窄及扩张,有无胆泥和结石.(2)腹部核磁共振+胰胆管成像(MRI+MRCP):进一步了解肝脏及肝内外胆道系统情况.(3)其他:血管造影明确血管病变的部位及性质.肝活检.所有患者必须常规检查,以明确有无排斥反应发生,及原发性复发情况。

## 2 结果

**2.1 病因诊断结果** 18例肝移植后慢性移植肝失功患者中,反复胆道感染2例(2/18),胆管广泛胆泥2例(2/18),胆管吻合口狭窄1例(1/18),胆管非吻合口狭窄4例(4/18),乙型肝炎复发3例(3/18),丙型肝炎复发1例(1/18),胆汁性肝硬化1例(1/18),肝动脉狭窄1例(1/18),CMV病毒感染1例(1/18),慢性排斥反应2例(2/18)(表1)。

**2.2 治疗及疗效** 根据不同的病因,通过各种内科支持治疗、介入治疗或再次肝移植,11例好转,4例病情反复,3例死亡(表2)。

## 3 讨论

目前通常认为,引起肝移植术后肝移植后慢性移植肝失功的病因很多,包括:排斥反应<sup>[2]</sup>,血管并发症<sup>[3]</sup>,胆道并发症<sup>[4]</sup>,感染<sup>[5]</sup>,复发性疾病<sup>[6-8]</sup>,新生恶性肿瘤<sup>[9]</sup>及药物毒性作用等. Abbasoglu *et al*<sup>[10]</sup>对159例移植肝慢性失功能患者进行分析发现,移植肝慢性失功的主要原因为:原发



表 2 肝移植后慢性移植肝失功治疗及预后

病因	治疗方法	预后
反复胆道感染	抗感染, 保肝, 支持治疗	进行性恶化, 死亡
胆管广泛胆泥	再次肝移植	预后好
胆管吻合口狭窄	内镜逆行胰胆管造影下胆道内支架	好转
胆管非吻合口狭窄	1例ERCP下放置支架 2例放支架失败, 胆肠吻合	病情有反复 病情有反复
乙型肝炎复发	1例再次肝移植 2例积极的抗乙肝治疗 1例病毒变异, 阿德福韦治疗	预后好 预后好 死亡
丙型肝炎复发	干扰素和利巴韦林治疗 效果不佳, 再次肝移植	预后好
胆汁性肝硬化	保肝, 支持治疗	病情反复
肝动脉狭窄	经皮球囊扩张成形	好转
CMV病毒感染	更昔洛韦治疗	预后好
慢性排斥反应	抗排斥效果不佳, 再次肝移植	预后好

疾病复发48例(30.2%)、心脑血管疾病28例(17.6%)、感染24例(15.1%)和慢性排斥反应15例(9.4%)。在本组资料中, 胆道并发症为主要原因, 占50%, 其次为原发病复发27.8%, 慢性排斥反应11.1%, 血管并发症(肝动脉狭窄)5.55%, 感染(CMV病毒感染)5.55%。

肝移植术后胆道并发症的发生率为17%-30%。胆道并发症的危险因素包括: 缺血再灌注损伤, 胆道灌洗不充分, 缺血时间过长, 肝动脉血栓、肝动脉脂肪变性、慢性排斥、原发性硬化性胆管炎(PSC)或CMV感染再发、老龄供体等。肝移植术后的胆道并发症包括吻合口漏, 吻合口狭窄及非吻合口狭窄, 胆道感染, 肝内外胆道广泛胆泥或结石形成<sup>[11]</sup>。本组中, 与肝移植后慢性移植肝失功相关的胆道并发症主要包括: 吻合口狭窄及非吻合口狭窄、胆道感染、肝内外胆道广泛胆泥或结石形成。胆道并发症的临床表现是非特异性的, 包括发热、寒颤、黄疸、腹痛等胆管炎表现, 胆红素及肝酶增高等。超声检查, 胆道造影, CT及MRI有助于明确诊断。吻合口狭窄与外科技术有关, 常以内镜或介入方法治疗有效。非吻合口狭窄尝试药物治疗效果不佳, 内镜逆行胰胆管造影(ERCP)或经皮球囊扩张胆道造影(PTC)行球囊扩张及放置支架有一定作用, 但多数患者球囊扩张及放置支架失败后, 须行胆肠吻合术。胆肠吻合对非吻

合口狭窄患者能明显改善症状, 缓解肝功能, 降低黄疸指数, 但是非吻合口狭窄往往与胆道缺血有关, 患者肝内外胆管多发狭窄, 故胆肠吻合术后, 病情仍会反复, 彻底的治疗方法是再次肝移植。本组资料中, 有2例患者反复以发热、寒颤、黄疸、腹痛等胆管炎为主要临床表现, 黄疸指数和转氨酶进行性升高, 但是所有影像学检查未发现血管异常, 未有肝内外胆管扩张, 肝活检排除了排斥反应。患者对积极的抗感染治疗有一定疗效, 但病情反复发作, 黄疸指数和转氨酶进行性升高, 因未有及时的肝源, 患者最终因肝功能衰竭而死亡。目前认为, 反复胆道感染与胆道缺血有关, 再移植是唯一的出路。本组中, 2例广泛胆泥形成的患者, 系肝内外广泛病变, 同样与胆道缺血有关, 再移植效果好。

原发疾病的复发是移植肝慢性失功能的重要原因, 严重影响肝脏移植患者的长期生存, 防治原发病复发变得越来越重要。在中国, 乙肝病毒(HBV)相关的终末期肝病是行肝脏移植的首要原因。在本组资料中, 18例患者中9例与乙型肝炎背景有关, 其中3例(33.3%)乙肝复发, 远低于早期文献报道的肝移植后乙型肝炎的复发率为80%。乙型肝炎免疫球蛋白联合抗核苷药物(如拉米夫定)治疗减少了乙肝复发, 极大的改善了移植肝的功能和生存<sup>[12]</sup>, 但是, 对于HBV高水平复制的受者(HBV-DNA及e抗原阳性)虽经预防性治疗, 但术后HBV复发率仍高达20%。另外, 长期使用拉米夫定可导致乙型肝炎病毒聚合酶基因反YMDD序列变异(YMDD变异)突变株的产生<sup>[13]</sup>。目前认为, 阿德福韦对拉米夫定抗药的HBV变异有效。本资料中, 3例乙肝复发患者2例经积极的抗乙肝治疗后, 患者病情有明显好转, 1例患者出现乙肝病毒变异, 虽使用阿德福韦, 患者病情仍进行性恶化, 因没有等到供肝, 患者最终死亡。因此, 对于有乙型肝炎的肝移植患者, 术后如何预防乙型肝炎的复发, 复发后怎样有效抗病毒治疗, 而尽量减少病毒变异株的产生, 虽然目前有相关报道, 但长期疗效有待多中心进一步研究。丙型肝炎病毒(HCV)在中国少见, 但在美国和欧洲, HCV的流行使因HCV行肝脏移植的数量占全部肝脏移植的40%<sup>[14]</sup>。这些患者移植后HCV复发常见<sup>[15]</sup>。HCV复发患者行再次肝脏移植后生存率低, 其可行性也广受争议。本资料中的1例慢性丙型肝炎患者, 行肝移植术后20 mo明确丙肝复发, 经干扰素和利巴韦林治疗后效果不佳, 患者最终进行了再移植, 再移

#### ■应用要点

根据肝移植后慢性移植肝失功的不同病因, 可采取不同的治疗手段; 对于不可逆转的移植肝功能衰竭, 应进行再次肝移植。

## ■同行评价

本文总结了18例慢性移植肝失功的原因,有一定的临床借鉴意义。

植后效果有待长期随访证实。其他常见的原发病复发包括胆汁性肝硬化,原发性硬化性胆管炎,原发性肝癌等。本组资料中,胆汁性肝硬化患者我们先行内科支持治疗,一旦移植肝失代偿,必须进行再移植。

慢性排斥曾是慢性移植肝失功的首要原因。近年来因对免疫抑制的深入认识,慢性排斥反应的发生有下降的趋势。本组资料中发生慢性排斥反应的2例患者,原发病分别为原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎,在移植后30 mo和32 mo后出现全身不适无力等非特异性症状,经积极的保肝治疗后,肝功能和黄疸指数进行性升高,经肝穿证实为慢性排斥反应。文献显示,普乐可复是治疗慢性排斥反应的有效药物,故其中1例患者环孢素(CsA)改成了普乐可复。但是疗效不明显,2例患者经积极的抗排斥及保肝疏胆治疗后,效果不明显,最终通过再次肝移植挽救了患者生命。

感染仍是慢性移植肝失功的重要原因,与过度免疫抑制剂的应用有关。文献报道,肝移植术后感染包括细菌、真菌及病毒的感染。其中真菌感染的死亡率高,真菌感染的发生率为14%-42%,以念珠菌属和曲霉菌属多见<sup>[5]</sup>。病毒感染中,以CMV感染最多见,有研究显示肝移植术后CMV感染高达20%<sup>[16]</sup>。本组资料中1例患者通过抗CMV抗体, pp65抗原检测证实CMV感染,通过更昔洛韦治疗后,患者肝功能明显好转。有报道认为更昔洛韦治疗后也会产生耐药菌株,在本中心尚未见此病历,因此未有这方面诊治经验。移植术后血管并发症包括肝动脉、肝静脉、门静脉的狭窄和血栓形成。但多数与肝移植术后早期急性移植肝功能衰竭有关。本组资料中有1例发现肝动脉狭窄,经皮球囊扩张成形后效果佳。其他与肝移植后慢性移植肝失功相关的病因,因本资料未涉及,在此不做讨论。

在肝移植后慢性移植肝失功的治疗中,有部分患者最终需要通过再移植才能挽救患者生命。那么,如何决定再次肝移植的适应症及选择适当的时机呢?目前认为:在肝移植术后发生并发症后,病程进入不可逆转的移植肝衰竭期应进行再次肝移植,以挽救生命;而对于移植术后长期胆道感染,缺血性胆道病变引起的肝内外胆道多发性、节段性狭窄,肝内外胆道广泛胆泥或结石形成,早期再次肝移植才是最为有效的方法。

## 参考文献

- 1 Wiesner RH, Menon KV. Late hepatic allograft dysfunction. *Liver Transpl* 2001; 7: S60-S73
- 2 Jain A, Demetris AJ, Kashyap R, Blakomer K, Ruppert K, Khan A, Rohal S, Starzl TE, Fung JJ. Does tacrolimus offer virtual freedom from chronic rejection after primary liver transplantation? Risk and prognostic factors in 1,048 liver transplantations with a mean follow-up of 6 years. *Liver Transpl* 2001; 7: 623-630
- 3 Pastacaldi S, Teixeira R, Montalto P, Rolles K, Burroughs AK. Hepatic artery thrombosis after orthotopic liver transplantation: a review of nonsurgical causes. *Liver Transpl* 2001; 7: 75-81
- 4 Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Fujita S, Hayashi M, Matamoros MA, Itou K, Tanaka K. Biliary anastomotic complications in 400 living related liver transplantations. *World J Surg* 2001; 25: 1300-1307
- 5 Patel R, Portela D, Badley AD, Harmsen WS, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Keating MR, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV. Risk factors of invasive Candida and non-Candida fungal infections after liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 926-934
- 6 McCaughan GW, Zekry A. Pathogenesis of hepatitis C virus recurrence in the liver allograft. *Liver Transpl* 2002; 8: S7-S13
- 7 Hernandez HM, Kovarik P, Whittington PF, Alonso EM. Autoimmune hepatitis as a late complication of liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 131-136
- 8 Faust TW. Recurrent primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis after transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7: S99-S108
- 9 Fung JJ, Jain A, Kwak EJ, Kusne S, Dvorchik I, Eghtesad B. De novo malignancies after liver transplantation: a major cause of late death. *Liver Transpl* 2001; 7: S109-S118
- 10 Abbasoglu O, Levy MF, Brkic BB, Testa G, Jeyarajah DR, Goldstein RM, Husberg BS, Gonwa TA, Klintmalm GB. Ten years of liver transplantation: an evolving understanding of late graft loss. *Transplantation* 1997; 64: 1801-1807
- 11 Moser MA, Wall WJ. Management of biliary problems after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7: S46-S52
- 12 Zheng S, Chen Y, Liang T, Lu A, Wang W, Shen Y, Zhang M. Prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation using lamivudine or lamivudine combined with hepatitis B Immunoglobulin prophylaxis. *Liver Transpl* 2006; 12: 253-258
- 13 Liaw YF. Results of lamivudine trials in Asia. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S111-S115
- 14 Davis GL. Chronic hepatitis C and liver transplantation. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; 4: 7-17
- 15 Neumann UP, Berg T, Bahra M, Puhl G, Guckelberger O, Langrehr JM, Neuhaus P. Long-term outcome of liver transplants for chronic hepatitis C: a 10-year follow-up. *Transplantation* 2004; 77: 226-231
- 16 Munoz SJ. Long-term management of the liver transplant recipient. *Med Clin North Am* 1996; 80: 1103-1120

# 十二指肠乳头旁憩室切除在胆道手术中的应用

臧金锋, 陈曦, 曹赣, 高军业

臧金锋, 陈曦, 曹赣, 高军业, 泰州市人民医院肝胆外科 江苏省泰州市 225300

作者贡献分布: 此课题由臧金锋设计, 高军业指导; 研究过程由臧金锋, 陈曦, 曹赣及高军业完成。

通讯作者: 臧金锋, 225300, 江苏省泰州市迎春路210号, 泰州市人民医院肝胆外科. xkfy1979@sina.com

电话: 0523-86361422

收稿日期: 2008-03-21 修回日期: 2008-06-30

接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-08-18

## Application of parapapillary duodenal diverticulum resection in biliary tract surgical procedures

Jin-Feng Zang, Xi Chen, Gan Cao, Jun-Ye Gao

Jin-Feng Zang, Xi Chen, Gan Cao, Jun-Ye Gao, Department of Hepatobiliary Surgery, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jin-Feng Zang, Department of Hepatobiliary Surgery, Taizhou People's Hospital, 210 Yingchun Road, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China. xkfy1979@sina.com

Received: 2008-03-21 Revised: 2008-06-30

Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effectiveness of parapapillary duodenal diverticulum resection in biliary tract surgical procedures.

**METHODS:** Clinical data of 12 patients received diverticulectomy for parapapillary duodenal diverticula from January 2002 to January 2008 were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Of the 12 cases, 4 cases were combined with cholecystectomy, 3 cases with choledochotomy, and 5 cases with cholecystectomy and choledochotomy. Bile leak was found in 1 case, who was managed conservatively by drainage. All the patients were followed up for 3 mo to 6 years, and the results were satisfying.

**CONCLUSION:** Resection of parapapillary duodenal diverticula is reasonable, effective and safe in biliary tract surgical procedures.

**Key Words:** Parapapillary duodenal diverticula; Diverticulectomy; Biliary tract surgical procedure

verticulectomy; Biliary tract surgical procedure

Zang JF, Chen X, Cao G, Gao JY. Application of parapapillary duodenal diverticulum resection in biliary tract surgical procedures. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2673-2675

## 摘要

**目的:** 探讨十二指肠乳头旁憩室切除在胆道手术中应用的方法和疗效。

**方法:** 回顾性分析2002-01/2008-01我院在胆道手术中联合行十二指肠乳头旁憩室切除的12例患者临床资料。

**结果:** 12例患者均施行十二指肠乳头旁憩室切除术, 其中, 4例联合行胆囊切除术, 3例行胆管切开取石, 5例为同时行胆囊切除和胆管切开取石术。1例发生胆漏, 经保守治疗治愈。全组病例随访3 mo至6年, 效果满意。

**结论:** 十二指肠乳头旁憩室切除在胆道手术中的应用是合理、有效、安全的。

**关键词:** 十二指肠乳头旁憩室; 憩室切除术; 胆道手术

臧金锋, 陈曦, 曹赣, 高军业. 十二指肠乳头旁憩室切除在胆道手术中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(23): 2673-2675

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2673.asp>

## 0 引言

十二指肠乳头旁憩室因其发生部位特殊, 与胆胰疾病关系密切, 近年来受到外科医生的重视。我院自2002-01/2008-01在胆道手术中成功施行憩室切除术12例, 取得了满意的效果。

## 1 材料和方法

1.1 材料 男5例, 女7例。年龄32-71岁, 平均56.2岁。病程2 mo至8年, 平均4.6年。胆囊结石4例; 胆管结石合并胆管结石5例, 其中2例为肝内胆管结石; 单纯胆管结石3例。均有不同程度的上腹及右上腹疼痛, 合并胆管炎者4例。既往有胆道

## ■背景资料

十二指肠乳头旁憩室与胆胰疾病关系密切, 其多见于中、老年人, 发病机制可能是由于十二指肠乳头附近是血管、胆管、胰管穿透肠壁的部位, 肌层薄弱, 当肠腔内压力增高, 黏膜可通过薄弱处向外突出形成憩室。

## ■同行评议者

万军, 主任医师, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科



## ■研发前沿

胆道手术中如何同时处理十二指肠乳头旁憩室是外科医生决策的难点。

结石手术史者3例,有胰腺炎史者5例。

**1.2 方法** 12例均经十二指肠镜检查证实开口位于乳头旁。上消化道钡剂造影(GI)检查,位于降部前方3例,后方9例,1例合并十二指肠水平部憩室,1例合并空肠多发憩室。憩室直径0.6-4 cm,平均2.1 cm,经B超、CT、磁共振胰胆管造影(MRCP)、及MRI检查了解胆道结石分布情况。十二指肠憩室切除方法:术前置胃管,右上腹经腹直肌切口或右肋缘下切口,充分游离十二指肠和胰头,结合术前影像学检查寻找游离憩室,完整显露颈部的肠壁肌层,胆道内置入探条指引后再切除憩室,分两层缝合十二指肠切口,将胃管调整至该切口附近,放置腹腔引流。

## 2 结果

本组无手术死亡病例,无胆道残余结石。术后出现切口感染1例,换药后治愈。12例患者均施行十二指肠乳头旁憩室切除术,其中,4例联合行胆囊切除术,3例行胆管切开取石,5例为同时行胆囊切除和胆管切开取石术。1例发生胆漏,经保守治疗治愈。全组病例随访3 mo到6年,效果满意。

## 3 讨论

十二指肠乳头旁憩室是指位于十二指肠乳头周围2 cm内的憩室<sup>[1]</sup>,可单发或多发,不同的检查手段,发现率各异,一般在2%-22%之间,多见于中、老年人。发病机制可能是由于十二指肠乳头附近是血管、胆管、胰管穿透肠壁的部位<sup>[2]</sup>,肌层薄弱,当肠腔内压力增高,黏膜可通过薄弱处向外突出形成憩室。病理上憩室壁由黏膜、黏膜下层与结缔组织构成,肌纤维很少。十二指肠乳头旁憩室与胆胰疾病关系密切<sup>[3]</sup>,其发生机制:憩室炎等因素使Oddi括约肌功能异常,和憩室内食物滞留机械性压迫。作者曾在一例患者的憩室中找到术前3 d服用的片状药物。张柏和 *et al*<sup>[4]</sup>在对700例实施胆囊切除患者术前行胃镜及上消化道钡餐检查(GI)发现十二指肠憩室18例。所以,在胆胰疾病,尤其是胆石症、胆总管扩张的患者中,更要重视憩室的存在。本组12例病人均以胆道疾病为第一诊断入院,在行上腹部CT及MRI检查时发现憩室,然后行GI和十二指肠镜检查,证实憩室存在并了解其位置。在阅读这些患者的CT、MRI<sup>[5-7]</sup>时,注意胆管下端周围结构的异常,在了解胆管和胰腺病变的同时,连续观察十二指肠降部各断面内侧是否有突向

胰头钩突部的囊袋状灶,将有助于憩室的发现。但对于十二指肠憩室的诊断,CT和MRI并不优于GI,只能起到提示的作用。另外,术前影像学检查,特别是GI,对于憩室的定位非常重要,术者如能观察GI的整个过程,将有利于憩室的定位,对于直径小的憩室应充分估计术中寻找难度。术前胃镜检查可以从肠腔内观察憩室与乳头的关系,对于乳头开口于憩室内者,应主动放弃憩室切除术<sup>[8]</sup>。

十二指肠乳头旁憩室处理方式主要有内翻缝合、切除、转流术<sup>[9-10]</sup>。内翻缝合术可能导致肠腔梗阻,对于较大憩室不适宜。转流手术对患者胃肠道干扰大,而且憩室本身未处理,理论上仍有可能对周围的胆管、胰腺造成影响。憩室切除术由于存在术后发生十二指肠瘘、胆胰管损伤及胰腺炎的风险,限制了他的应用。本组患者在充分掌握适应证的基础上选用憩室切除术,取得了较好的效果。我们的体会是,术中充分游离胰头,后方通过Kocher切口,前方主要是打开胃窦和结肠肝曲之间的胃结肠韧带,这样既有利于寻找憩室,也有利于显露胆管下段进行胆道探查,术中及时发现胆道胰腺损伤。本组一例患者在使用胆道探条作为指引时发生胰腺段胆管损伤,由于充分显露胰头后方组织,术中及时发现,通过直接修补、T管引流而未发生胆漏。如果充分游离胰头仍未找到憩室,可能是其位于胰腺组织中,果断放弃憩室切除,以免造成严重损伤。憩室的游离以钝性为主,找到间隙后动作轻柔,切忌暴力;游离也应充分,以显露足够的憩室颈部便于将肌层缝合为宜。憩室切除后置入胆道探条作为向导(单纯胆囊切除者可以经过胆囊管),并经过憩室开口观察乳头位置,选用合成材料的可吸收线,将黏膜层和浆肌层可靠缝合,一是要控制深度,能浅则浅;二是要注意方向,尽量与胆管走行方向平行。最后,放置腹腔引流管和胃肠减压管一定要到位,保证引流有效而通畅,必要时可选有双套管,这是预防胆瘘、胰瘘及肠瘘在腹腔内弥散最有效的方法,可以为并发症的治疗争取主动。本组胆漏病人就是由于引流通畅,未产生弥漫性腹膜炎和腹膜后间隙感染,为瘘口愈合提供了条件。

我们认为,乳头旁憩室切除术在胆道手术中的应用,既切除了可能发生出血、炎症、穿孔的病灶,同时消除了憩室作为胆胰疾病的病因,是一种合理的选择。只要术前准备充分,术

## ■创新盘点

利用胆道外科医师的经验同时行憩室切除,效果好。

中利用胆道探查的有利条件, 精细操作, 两者联合应用是安全可行的.

#### 4 参考文献

- 1 吴在德, 吴肇汉. 外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 468
- 2 Avisse C, Flament JB, Delattre JF. Ampulla of Vater. Anatomic, embryologic, and surgical aspects. *Surg Clin North Am* 2000; 80: 201-212
- 3 Wu SD, Su Y, Fan Y, Zhang ZH, Wang HL, Kong J, Tian Y. Relationship between intraduodenal periampullary diverticulum and biliary disease in 178 patients undergoing ERCP. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 299-302
- 4 张柏和, 刘扬, 陈汉, 吴孟超. 胆囊切除术前上消化道检查的临床意义. *肝胆胰外科杂志* 2002; 14: 50-51
- 5 梁峰, 叶再挺, 贾玮玮, 叶叔文. 十二指肠乳头旁憩室的CT、MRI诊断. *中国医学影像学杂志* 2006; 14: 205-208
- 6 杨小庆, 龚永驰, 汪盛齐, 秦伟. MRCP对乳头旁憩室综合征的诊断价值. *实用放射学杂志* 2006; 22: 1229-1231
- 7 刘辉, 王暖林, 刘红光. CT对壶腹旁憩室综合征诊断价值的探讨. *实用医学影像杂志* 2007; 8: 26-28
- 8 孙益红, 秦新裕, 王承麒. 十二指肠乳头旁憩室切除32例分析. *中华胃肠外科杂志* 2002; 5: 201-203
- 9 胡海田, 向国安, 杨定忠, 杜立学, 耿智敏, 王汉宁. 十二指肠旷置术治疗十二指肠乳头旁憩室致胆管炎的探讨. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 668-669
- 10 闻英, 吴承堂, 朱茗, 石汉平, 韩景龙, 翁剑波, 郑永波, 黄祥成. 十二指肠憩室的诊断与治疗(附110例报告). *中国普外基础与临床杂志* 2005; 12: 41-42

#### ■同行评价

本文对十二指肠乳头旁憩室的治疗进行了有益的探讨, 实用性较强, 具有较好的临床指导意义.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

### • 消息 •

## 北京百世登生物医学科技有限公司第四期编辑培训纪要

本刊讯 2008-01-26, 植物学报主任崔金钟老师应邀为北京百世登生物医学科技有限公司做第五期编辑培训, 此次培训的主题为“如何初审稿件”.

初审稿件已经成为编辑部审稿工作的首要及重要环节, 其可以减轻审稿人和编辑的工作量, 为编辑部节省经费, 同时也为作者节省时间, 并缩短文章发表周期. 崔老师将一篇文章从格式、范围、学术水平和写作水平这四个方面讲述如何初审稿件, 并对符合范围的每篇稿件从IMRAD五部分(Introduction, Material and Methods, Result, Abstract, Discussion)作详细系统的解说. 崔老师指出通过初审稿件可以将优秀的论文快速发表, 最快的传播科研成果, 提高杂志的影响力.

会后, 世界胃肠病学杂志社同行评议科学编辑就平时工作中遇到的初审稿件问题向崔老师进行咨询, 并与他交流了自己的工作经验.

本次会议取得了良好的效果, 编辑不仅进一步明确初审工作, 同时也了解了更多的期刊知识. (编务: 江艳 2008-08-18)

## 肺腺癌孤立性阑尾转移1例

纪艳超, 刘昶, 翟博, 孙岩岩, 韩敬泉

### ■背景资料

肺腺癌因其生物学特点, 易发生远处脏器转移, 常转移至淋巴结、骨、脑及肺内等, 而阑尾转移较罕见。一般无特异性临床表现, 也无特异性的辅助检查, 术前诊断困难, 易误诊。

纪艳超, 刘昶, 翟博, 孙岩岩, 哈尔滨医科大学附属第四医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150001

韩敬泉, 哈尔滨医科大学附属第四医院胸部微创外科 黑龙江省哈尔滨市 150001

通讯作者: 刘昶, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区颐园街37号, 哈尔滨医科大学附属第四医院普外一科。

liuchang4@yahoo.com.cn

电话: 0451-82576687

收稿日期: 2008-06-16 修回日期: 2008-07-15

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-18

### Lung adenocarcinoma-associated isolated appendiceal metastasis: a case report

Yan-Chao Ji, Chang Liu, Bo Zhai, Yan-Yan Sun, Jing-Quan Han

Yan-Chao Ji, Chang Liu, Bo Zhai, Yan-Yan Sun, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Jing-Quan Han, Department of Thoracic Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Chang Liu, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liuchang4@yahoo.com.cn

Received: 2008-06-16 Revised: 2008-07-15

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-18

### Abstract

A male patient of 59 years old was admitted due to the metastatic right lower abdominal pain for 1 day. He was treated with appendectomy because of preoperative diagnosis for acute appendicitis, but the pathological examination confirmed the metastatic adenocarcinoma, which was rare in clinic.

**Key Words:** Lung adenocarcinoma-associated isolated appendiceal metastasis; Acute appendicitis; Abdominal pain

Ji YC, Liu C, Zhai B, Sun YY, Han JQ. Lung adenocarcinoma-associated isolated appendiceal metastasis: a case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(23): 2676-2677

### 摘要

患者, 男, 59岁, 因转移性右下腹痛1 d入院, 术

前诊断为急性阑尾炎, 行阑尾切除术, 术后病理确诊为阑尾转移性腺癌。肺腺癌阑尾转移临床较为罕见。

**关键词:** 肺腺癌阑尾转移; 急性阑尾炎; 腹痛

纪艳超, 刘昶, 翟博, 孙岩岩, 韩敬泉. 肺腺癌孤立性阑尾转移1例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(23): 2676-2677

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2676.asp>

### 0 引言

肺腺癌因其生物学特点, 易发生远处脏器转移, 而阑尾转移较罕见。一般无特异性临床表现, 也无特异性的辅助检查, 术前诊断困难, 易误诊。现报道肺腺癌孤立性阑尾转移1例, 并结合文献加以讨论。

### 1 病例报告

男性患者, 59岁。因转移性右下腹痛1 d于2007-05-08入院。患者1 d前无明显诱因出现脐周疼痛, 后转至右下腹, 呈持续性钝痛, 伴发热, 体温38.2-39.0℃, 无恶心、呕吐、腹胀等。体格检查: 麦氏点压痛, 无反跳痛, 伴肌紧张; 墨菲氏征阴性, 无移动性浊音。血常规: WBC:  $12.8 \times 10^9/L$ , Hb: 118 g/L。术前诊断: 急性阑尾炎。急诊剖腹探查, 回盲部未见转移性结节, 见阑尾浆膜充血水肿, 呈急性炎症, 行阑尾切除术。术后病理: 阑尾转移性腺癌。免疫组化: TTF-1少量(+), CEA(-), 蜂窝织炎性阑尾炎伴阑尾周围炎(图1)。患者及家属不同意二期手术, 痊愈后出院。后于胸外科按吉西他滨+顺铂进行化疗。术后随访4 mo, 无肿瘤复发。患者2007-03在我院行左肺上叶切除术+肺门、纵膈淋巴结清扫术, 术后病理: 左肺上叶低分化腺癌, 免疫组化: 重组人甲状腺转录因子-1(TTF-1)(+), 癌胚抗原(CEA)(+)(图2)。术后行吉西他滨+顺铂化疗1个疗程。

### 2 讨论

肺腺癌因其生物学特点, 易发生远处脏器转移, 常转移至淋巴结、骨、脑及肺内等, 而阑尾转

### ■同行评议者

孙学英, 教授, 哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝胆外科中心; 吕云福, 教授, 海南省人民医院外一科



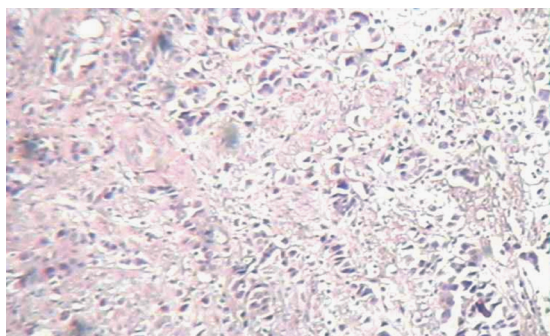


图1 阑尾转移性腺癌(HE染色×400).

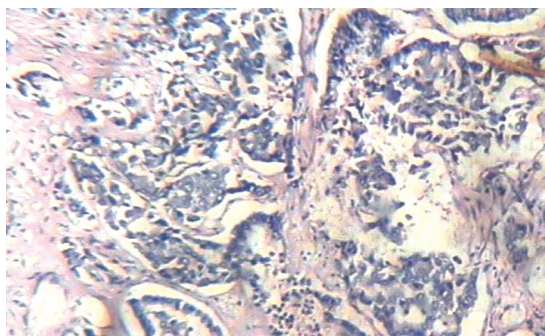


图2 左肺上叶低分化腺癌(HE染色×400).

## ■应用要点

对急性阑尾炎的患者,要做好术前检查,对可疑者,术中应做快速病理检查,以选择适当的手术方式,改善预后.

移较罕见. 阑尾可因瘤体坏死、感染导致急性阑尾炎、阑尾周围脓肿等,临床上常被误诊为急性阑尾炎(44.0%)、阑尾周围脓肿(14.0%)、慢性阑尾炎(11.0%)或其他疾病<sup>[1]</sup>. 一般无特异性临床表现,也无特异性的辅助检查,术前诊断困难,易误诊. 因此要做好术前检查,对可疑者,术中应做快速病理检查,以选择适当的手术方式,改善预后. 阑尾腺癌若不伴肠系膜淋巴结肿大,可行右半结肠切除术;若有肠系膜淋巴结肿大,则须行淋巴结清扫,术后辅以化疗以提高存活

率. 文献报道阑尾腺癌右半结肠切除术5年存活率达68%,而阑尾切除术仅20%<sup>[2]</sup>,因此对单纯阑尾切除术后病理证实为阑尾腺癌者,应尽早行二期手术.

## 3 参考文献

- 1 Hata K, Tanaka N, Nomura Y, Wada I, Nagawa H. Early appendiceal adenocarcinoma. A review of the literature with special reference to optimal surgical procedures. *J Gastroenterol* 2002; 37: 210-214
- 2 刘文方, 林佩波. 原发性阑尾腺癌2例并文献复习. *肿瘤防治研究* 2000; 27: 424

## ■同行评价

本文所报道病例实属罕见,值得发表.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

## ●消息●

## 北京百世登生物医学科技有限公司第五期编辑培训纪要

本刊讯 2008-05-06下午15:30分,北京Thomson Reuters汤姆森科技信息集团业务发展经理吴小勇为北京百世登生物医学科技有限公司做第六期编辑培训. 本次培训的主题为“WEB OF SCIENCE期刊的遴选标准与过程”.

本次培训内容包括: 追溯科学引文索引的历史,定位WEB OF SCIENCE收录的期刊是被筛选过的高质量期刊群,WEB OF SCIENCE的选刊时的评估标准与过程. WEB OF SCIENCE对学术期刊的收录是全面的,但并非无所不包,选刊过程强调质量,评估标准有期刊的定性分析和定量分析. 评估标准包括: (1)基本的期刊出版标准; (2)编辑内容; (3)国际性与区域代表性; (4)引文分析.

会后,由世界胃肠病学杂志社长马连生向吴经理介绍了*World Journal of Gastroenterology*(WJG)出版流程,汇报2007年WJG发表文章和WJG编委会的组成及贡献.

吴经理的授课使每位编辑更进一步了解了基于ISI的数据库WEB OF SCIENCE对期刊的遴选标准与过程,同时对于自己的编辑工作有了更明确的目标和更高的要求. (编务: 江艳 2008-08-18)