

溃疡性结肠炎治疗的新思路

江学良, 崔慧斐

江学良, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 山东省济南市 250031

崔慧斐, 山东大学药学院 山东省济南市 250014

江学良, 男, 主任医师, 医学博士, 中英国际炎症性肠病研究中心主任, 济南军区总医院消化科副主任, 《溃疡性结肠炎》和《溃疡性结肠炎现代诊疗手册》主编, 溃疡性结肠炎网(<http://www.chinaibd.com.cn>)及结肠炎和溃疡性结肠炎网(<http://www.ibdcn.com.cn>)首席医学专家, 《世界华人消化杂志》等8家杂志共同主编和常务编委。在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文50余篇。主要研究方向为溃疡性结肠炎和消化内镜, 获军队及省部级科技成果奖6项。在国内建立了溃疡性结肠炎研究协作中心、患者康复俱乐部和免费的专家会诊信箱(jiangxueliang678@126.com)

通讯作者: 江学良, 250031, 山东省济南市师范路25号, 中国人民解放军济南军区总医院消化科, jiangxueliang678@126.com
收稿日期: 2006-11-25 接受日期: 2006-12-20

A novel thought for treatment of ulcerative colitis

Xue-Liang Jiang, Hui-Fei Cui

Xue-Liang Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Ji'nan Military Command, Ji'nan 250031, Shandong Province, China

Hui-Fei Cui, College of Pharmacology, Ji'nan University, Ji'nan 250014, Shandong Province, China

Correspondence to: Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Ji'nan Military Command, 25 Shifan Road, Ji'nan 250031, Shandong Province, China. jiangxueliang678@126.com

Received: 2006-11-25 Accepted: 2006-12-20

Abstract

The mucosal injury induced by ulcerative colitis can hardly be repaired and the mechanism has not been illuminated yet. No specific method is developed in the treatment of ulcerative colitis, which results in a prolonged course and incurability of this disease. It may provide a novel strategy for the elucidation of the mechanism in ulcerative colitis-induced mucosal injury and the radical cure of this disease to study the relationship between the decrease of mucosal stem cells and the mucosal injury as well as the differentiation and transforming of marrow stem cells, which are transported to colonic mucosa via blood flow, into colonic mucosal stem cells and epidermal cells.

Key Words: Ulcerative colitis; Stem cell

Jiang XL, Cui HF. A novel thought for treatment

www.wjgnet.com

of ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(4):319-322

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)黏膜损伤无法修复的原因还没有阐明, 至今无特异性治疗方法, 造成该病病程迁延、无法治愈。通过研究结肠黏膜干细胞减少与病变黏膜损伤的关系以及骨髓干细胞随血液循环到达结肠黏膜并转分化为结肠黏膜干细胞和上皮细胞情况, 有可能阐明溃疡性结肠炎黏膜损伤无法修复的原因及为从根本上治疗该病提供新思路。

关键词: 溃疡性结肠炎; 干细胞

江学良, 崔慧斐. 溃疡性结肠炎治疗的新思路. 世界华人消化杂志 2007;15(4):319-322

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/319.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)在西方国家的发病率约为10-20人/10万人, 患病率为100-200人/10万人^[1], 仅美国就有高达100万患者, 每年用于治疗该病的费用约为120亿元人民币。溃疡性结肠炎也是我国较常见的消化道疾病, 近年来文献报道的病例数目明显升高, 根据我们对国内10218例患者的统计, 最近10 a报告的病例数目是前10 a的3.8倍^[2]。到目前为止, 该病病因和发病机制尚未阐明^[3-4], 治疗缺乏特异性, 没有治愈的方法^[5-6], 导致病程迁延, 反复发作, 局部(癌变、大出血、肠穿孔等)和全身(多器官累及)并发症增多^[7], 重度溃疡性结肠炎死亡率仍较高, 严重危害患者的健康^[8]。溃疡性结肠炎对社会的影响也非常大^[9-10], 因为他可以发生于幼年而且容易终生不愈, 影响患者的生长发育、出现心理问题及失去教育和工作机会, 皮质类固醇或免疫抑制药物等治疗会导致继发性的健康问题, 外科手术可能导致并发症如肠功能紊乱。因此, 该病被世界卫生组织(WHO)列为疑难病之一, 如何治愈溃疡性结肠炎成为研究的难点和重点。氨基水杨酸类药物及皮质类固醇激素是目前治

■背景资料

溃疡性结肠炎黏膜损伤无法修复的原因还没有阐明, 至今无特异性治疗方法, 造成该病病程迁延、无法治愈。氨基水杨酸类药物及皮质类固醇激素是目前治疗溃疡性结肠炎的主要方法, 这些非特异性抗炎和免疫抑制药物, 只能暂时控制和缓解症状, 不能从根本上治愈该病, 长期应用不良反应增多, 停药后容易复发, 部分激素耐药或抵抗的难治性患者效果更不理想, 因此, 必须寻找新的更加特异的治疗方法。

■ 研究前沿

结肠黏膜的再生和修复依赖于结肠黏膜干细胞,其位于结肠隐窝的底部,数量极少,可分化为成熟的结肠黏膜细胞,维持结肠黏膜的生理更新,但对于结肠黏膜干细胞的来源尚不清楚。溃疡性结肠炎最典型的病理特点是大量隐窝坏死,形成脓肿,而结肠黏膜干细胞位于隐窝基底部,隐窝坏死导致原本极少的结肠黏膜干细胞进一步减少,无法再生和分化成为足够的结肠黏膜上皮细胞以修复损伤的黏膜。由此,我们推测,结肠黏膜干细胞减少可能是导致黏膜损伤无法修复的重要原因。

疗溃疡性结肠炎的主要方法,这些非特异性抗炎和免疫抑制药物,只能暂时控制和缓解症状,不能从根本上治愈该病,长期应用不良反应增多,停药后容易复发(1 a复发率大于50%),部分激素耐药或抵抗的难治性患者效果更不理想^[11-13],因此,必须寻找新的更加特异的治疗方法。

1 干细胞与结肠黏膜损伤可能的关系

由于溃疡性结肠炎主要以结肠黏膜弥漫性损害(炎症、糜烂、溃疡等)为特点,修复损伤的结肠黏膜是治愈该病的关键^[2]。正常情况下,结肠黏膜上皮是机体更新和修复较快的组织,为何在溃疡性结肠炎时机体就不能修复损伤的结肠黏膜呢?目前尚没有一个满意的解释。研究表明,结肠黏膜的再生和修复依赖于结肠黏膜干细胞,结肠黏膜干细胞位于结肠隐窝的底部^[14-15],数量极少,可分化为成熟的结肠黏膜细胞,维持结肠黏膜的生理更新,但对于结肠黏膜干细胞的来源尚不清楚。溃疡性结肠炎最典型的病理特点是大量隐窝坏死,形成脓肿^[2],而结肠黏膜干细胞位于隐窝基底部,隐窝坏死导致原本极少的结肠黏膜干细胞进一步减少,无法再生和分化成为足够的结肠黏膜上皮细胞以修复损伤的黏膜。由此,我们推测,结肠黏膜干细胞减少可能是导致黏膜损伤无法修复的重要原因。因此,如何补充足够的结肠黏膜干细胞就成为治疗该病的关键。

2 补充结肠黏膜干细胞的方法选择

目前,增加结肠黏膜干细胞数目可能的途径有三种:第一种方法是分离鉴定成体结肠黏膜干细胞作为患者移植来源,但由于结肠黏膜干细胞缺乏高度特异的标记,分离、培养、鉴定都非常困难,靠直接补充结肠黏膜干细胞在当前是不现实的^[16]。第二种可能是胚胎干细胞作为结肠黏膜干细胞的来源途径之一,但由于伦理学、免疫排斥和可能发生肿瘤、污染等因素限制了其应用^[17]。第三种可能途径就是骨髓干细胞动员^[18],因为骨髓干细胞是成体中最原始的细胞,有很强的发育潜能,除可发育分化为各种血细胞和免疫细胞外,还具有造血以外的发育潜能^[19-20],如分化为心肌细胞、肝细胞、神经细胞等,这些研究提示,成体组织干细胞可能来源于骨髓干细胞,骨髓干细胞在正常机体中循环,遇有组织更新或再生的需求,便停留下来,本地化为组织干细胞,以补充或更新内源组织干细胞库,随后进入增殖和分化程序,分化为成熟的

组织细胞,即骨髓干细胞是成体中最原始的细胞,由其逐步分化为各组织干细胞,再增殖和分化为特化的组织细胞,符合经典的细胞分化概念^[21]。研究还证实,体外扩增的自体骨髓干细胞回输给因中子照射引起多脏器衰竭的动物,经标记的骨髓干细胞可以在损伤的肠道、皮肤、肌肉中检测到,并且一直可以持续到82 d后^[22]。因此,骨髓干细胞也有可能随血液循环到达溃疡性结肠炎病变结肠黏膜并分化为黏膜上皮细胞。另外,某些异体骨髓移植患者,发生移植宿主反应形成结肠溃疡后的修复提示,供体来源的骨髓干细胞重建了受体肠道的结肠黏膜上皮^[23],也就是说,在成体情况下,骨髓干细胞可能是结肠黏膜干细胞的来源。合并白血病的溃疡性结肠炎患者,在骨髓移植后,停用免疫抑制剂仍然长期缓解、没有复发,更加提示骨髓来源的干细胞可能对严重的结肠黏膜上皮细胞损伤修复具有重要意义^[24]。

3 骨髓干细胞治疗的优点

骨髓干细胞转分化为结肠黏膜干细胞的前提是外周血循环中要有足够量的骨髓干细胞,才能保证到达病变结肠黏膜并在结肠微环境中转化。生理情况下,外周血循环中骨髓干细胞数量很少,只能维持机体生理更新需要,当溃疡性结肠炎隐窝坏死严重导致原本极少的结肠黏膜干细胞大量减少时则无法满足需要。因此,利用骨髓干细胞动员剂-粒细胞集落刺激因子^[25-26]等大幅提高循环中的干细胞数量,以便随血液循环到达病变结肠,在结肠微环境中,受诱导进行增殖和转分化为结肠黏膜干细胞和结肠黏膜上皮细胞,增强机体对病损黏膜的修复能力,促进溃疡愈合,恢复其正常的生理功能。而且,利用自体骨髓干细胞治疗时可不进行结肠黏膜干细胞(数量少,缺乏特异标志)的分离和扩增,骨髓干细胞的增殖和转分化在结肠组织微环境中可自行完成。进行自体骨髓干细胞动员治疗溃疡性结肠炎,还将克服异体移植供体来源少和排斥反应的问题,相当于安全、方便的进行了骨髓干细胞的“自我移植”,临床意义重大,应用前景广阔。

4 骨髓干细胞研究的可行性与前景

新技术的出现为干细胞研究提供了必要条件。激光捕获显微分离技术可以准确捕获单个结肠黏膜干细胞,从而能精确观察干细胞数目与结肠黏膜损伤的关系,具有高灵敏度和良好重复性(<http://www.ebiotrade.com/download/>)

lcmds_vieslet_swf.html); 激光扫描共聚焦显微技术可以观察到细胞核中荧光染色情况, 为研究荧光标记的骨髓干细胞转分化为结肠黏膜干细胞提供了可能。

我们前期预试验结果提示^[2], 骨髓干细胞可随血液循环到达结肠黏膜并转化为结肠黏膜干细胞。前期实验中, 首先在一般生理条件下将♂大鼠骨髓干细胞经尾静脉注射给同窝♀大鼠, 利用PCR方法检测到受体(♀大鼠)结肠组织中存在供体(♂大鼠)骨髓Y染色体的性别决定区(Syr)片段, 说明在生理条件下骨髓干细胞可随血液循环迁移并定居于结肠组织。然后我们采用复合法诱导大鼠溃疡性结肠炎模型, 再经尾静脉注射同窝异性大鼠的骨髓干细胞, 采用体内示踪、免疫荧光和激光共聚焦扫描显微镜技术等观察到荧光标记的骨髓干细胞也可到达结肠受损部位并分化为结肠上皮细胞组织。以上结果提示, 在溃疡性结肠炎病程中骨髓干细胞作为重要参与者发挥着重要的作用。但是这其中还有很多问题尚未搞清楚, 包括骨髓功能对溃疡性结肠炎病情轻重和预后是否有关, 骨髓干细胞在溃疡性结肠炎发生过程中的变化规律, 外周血和原位组织内影响干细胞定植和分化的因子的改变等问题均未知, 较为全面地揭示骨髓干细胞的作用机制将成为治疗的核心问题。

5 参考文献

- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 Suppl 1: S3-S9
- 江学良. 溃疡性结肠炎现代诊疗手册. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 81-90
- Cummings JR, Jewell DP. Clinical implications of inflammatory bowel disease genetics on phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 56-61
- Hyphantis TN, Triantafyllidis JK, Pappa S, Mantas C, Kaltsouda A, Cherakakis P, Alamanos Y, Manousos ON, Mavreas VG. Defense mechanisms in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005; 40: 24-30
- 江学良. 重视溃疡性结肠炎的维持治疗. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1-5
- Kirsner JB. Inflammatory bowel diseases: from the mystical to the cellular and now the molecular. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4127-4128
- Klingenstein G, Levy RN, Kornbluth A, Shah AK, Present DH. Inflammatory bowel disease related osteonecrosis: report of a large series with a review of the literature. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 243-249
- Han SW, McColl E, Barton JR, James P, Steen IN, Welfare MR. Predictors of quality of life in ulcerative colitis: the importance of symptoms and illness representations. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 24-34
- Marri SR, Buchman AL. The education and employment status of patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 171-177
- Pizzi LT, Weston CM, Goldfarb NI, Moretti D, Cobb N, Howell JB, Infantolino A, Dimarino AJ, Cohen S. Impact of chronic conditions on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 47-52
- Jiang XL, Cui HF. Different therapy for different types of ulcerative colitis in China. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1513-1520
- Marakhouki Y, Fixa B, Holoman J, Hulek P, Lukas M, Batovsky M, Romyantsev VG, Grigoryeva G, Stolte M, Vieth M, Greinwald R. A double-blind dose-escalating trial comparing novel mesalazine pellets with mesalazine tablets in active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 133-140
- Chopra A, Pardi DS, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Egan LJ, Faubion WA, Hanson KA, Johnson TA, Sandborn WJ. Budesonide in the treatment of inflammatory bowel disease: the first year of experience in clinical practice. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 29-32
- Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 99-104
- Escaffit F, Perreault N, Jean D, Francoeur C, Herring E, Rancourt C, Rivard N, Vachon PH, Pare F, Boucher MP, Auclair J, Beaulieu JF. Repressed E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res* 2005; 302: 206-220
- Giannakis M, Stappenbeck TS, Mills JC, Leip DG, Lovett M, Clifton SW, Ippolito JE, Glasscock JI, Arumugam M, Brent MR, Gordon JI. Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches. *J Biol Chem* 2006; 281: 11292-11300
- Hopkins Tanne J. Resignation of US judge puts reproductive rights at risk. *BMJ* 2005; 331: 130
- Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002; 8: 1011-1017
- Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115: 326-338
- Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 207-216
- 江学良, 李兆申. 干细胞与胰腺疾病. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2438-2441
- Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure

■同行评价

骨髓干细胞移植治疗溃疡性结肠炎尚属实验阶段, 要过度到临床应用尚有许多需要解决的已知和未知问题。本文作者在“溃疡性结肠炎治疗新思路”一文中, 阐述了干细胞与结肠黏膜损伤的可能关系, 并通过大鼠溃疡性结肠炎实验模型, 证实回输同窝异性大鼠的骨髓干细胞可以达到结肠受损部位并分化为结肠上皮细胞组织。此种方法可能为溃疡性结肠炎的未来治疗提供了的有效途径。文章选题新颖, 有创意, 实验方法较先进, 为探讨UC新的治疗方法提供参考。

- syndrome. *J Gene Med* 2003; 5: 1028-1038
- 23 Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1-6
- 24 Ditschkowski M, Einsele H, Schwerdtfeger R, Bunjes D, Trenchel R, Beelen DW, Elmaagacli AH. Improvement of inflammatory bowel disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1745-1747
- 25 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119
- 26 Kared H, Masson A, Adle-Biasset H, Bach JF, Chatenoud L, Zavala F. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells. *Diabetes* 2005; 54: 78-84

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

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2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班。

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展。征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员。参加学习班者授予国家继续教育学分12分; 在大会论文报告者另授继续教育学分6分。

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658。

联合抑制环氧合酶-2与5-脂氧合酶对胃癌细胞增殖凋亡的影响

陈浩莉, 邹来玉, 李建英, 王小众, 陈治新, 黄月红

陈浩莉, 邹来玉, 李建英, 王小众, 陈治新, 黄月红, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
陈浩莉, 福建医科大学附属协和医院2004级硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤防治研究。

福建省科技人才创新基金资助项目, No. 2002J061

通讯作者: 李建英, 350001, 福建省福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科. jyli99@hotmail.com
电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2006-11-14 接受日期: 2006-11-28

Dual suppression of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cell line AGS

Hao-Li Chen, Lai-Yu Zou, Jian-Ying Li, Xiao-Zhong Wang, Zhi-Xin Chen, Yue-Hong Huang

Hao-Li Chen, Lai-Yu Zou, Jian-Ying Li, Xiao-Zhong Wang, Zhi-Xin Chen, Yue-Hong Huang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Supported by the Innovation Fund for Science and Technology Talent of Fujian Province, No. 2002J061

Correspondence to: Dr. Jian-Ying Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China. jyli99@hotmail.com
Received: 2006-11-14 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor nimesulide, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitor AA861 and their combination on the proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cell line AGS.

METHODS: Human gastric carcinoma cell line AGS was cultured in RPMI1640 medium with 100 mL/L fetal bovine serum (FBS), 100 kU/L penicillin G and 100 kU/L streptomycin in an incubator at 37°C, with 100% humidity and 50 mL/L CO₂. Then AGS cells were treated with AA861 (25, 50, 100 μmol/L) or nimesulide (50, 100, 200 μmol/L) or in combination. The morphological changes of AGS cells were observed

and photographed by inverted microscopy. The proliferation of AGS cells was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assays. Acridineorange-ethidiumbromide (AO-EB) fluorescence staining, TUNEL staining and DNA-fragment assay were used to evaluate the apoptotic of AGS cells.

RESULTS: The morphological changes were observed in AGS cells treated by nimesulide, AA861 or their combination under the inverted microscope. MTT assay revealed that nimesulide and AA861 inhibited the proliferation of AGS cells in a dose- and time-dependent manner, except for nimesulide of 200 μmol/L at the 24th and 48th hour as well as AA861 of 25 μmol/L at the 24th hour. TUNEL staining showed that the apoptosis rate was elevated with the increase of nimesulide and AA861 concentration. MTT assay (AA861: 0.240 ± 0.002 *vs* combination: 0.207 ± 0.001, *P* < 0.01; nimesulide: 0.211 ± 0.002 *vs* combination: 0.207 ± 0.001, *P* < 0.05), AO-EB staining (AA861: 18.17% ± 0.28%, nimesulide: 19.35% ± 0.74% *vs* combination: 23.78% ± 0.04%, *P* < 0.01), TUNEL staining (AA861: 18.67% ± 0.03%, nimesulide: 20.94% ± 0.48% *vs* combination: 23.76% ± 0.92%, *P* < 0.01) and DNA-fragment assay showed that the combined treatment of AA861 and nimesulide was superior to AA861 or nimesulide alone in inhibiting the proliferation and inducing the apoptosis of AGS cells at the 48th hour.

CONCLUSION: Either COX-2 inhibitor nimesulide or 5-LOX inhibitor AA861 can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human AGS cells. The dual inhibition of COX-2 and 5-LOX may present a superior anticancer efficacy to either inhibition of COX-2 or 5-LOX alone.

Key Words: Gastric cancer; AGS cell line; Cyclooxygenase-2; 5-lipoxygenase; Dual inhibition; Proliferation; Apoptosis

Chen HL, Zou LY, Li JY, Wang XZ, Chen ZX, Huang YH. Dual suppression of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cell line AGS. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):323-331

■背景资料

近年来研究发现, 花生四烯酸代谢酶在肿瘤的形成发展中具有重要作用, 其中COX-2与5-LOX代谢花生四烯酸产生大量活性物质, 介导细胞增殖凋亡、肿瘤血管生成、远处转移等生物学行为。胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 至今无有效的治疗方法, 从机制上寻找积极有效的预防与治疗方法具有重要的意义。目前关于联合运用COX-2抑制剂与5-LOX抑制剂对肿瘤细胞的作用的研究多集中于大肠癌、口腔癌, 联合抑制COX-2与5-LOX对胃癌的作用情况, 国内外鲜有研究。

■创新盘点

本实验通过单独及联合应用选择性COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861处理胃癌细胞系AGS, 研究联合抑制COX-2及5-LOX两条通路对胃癌的影响。发现联用尼美舒利和AA861抑制COX-2与5-LOX两条通路, 与单独抑制其中一条通路比较, 能更有效抑制胃癌细胞增殖, 促进凋亡。

摘要

目的: 通过单独及联合应用选择性COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861处理胃癌细胞系AGS, 比较各实验组的增殖凋亡率, 探讨联合抑制COX-2和5-LOX两条通路对胃癌细胞系AGS增殖凋亡的影响。

方法: AGS细胞在含100 mL/L小牛血清+100 kU/L青、链霉素的RPMI1640培养基中培养, 取对数生长期细胞做为实验组。以相差显微镜观察药物处理前后的细胞形态改变; 设立AA861(25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)组, 尼美舒利(50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)组, 及AA861联合尼美舒利处理组(50 $\mu\text{mol/L}$ AA861+100 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利), 用四氮唑蓝(MTT)法在24, 48, 72 h测量细胞吸光度, 以此检测单用及联用AA861与尼美舒利对细胞生长增殖的影响; 实验通过脱氧核糖核酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)和吖啶橙/溴化乙啶(AO/EB)染色法检测细胞凋亡率, 以DNA-LADDER法观察凋亡。

结果: 相差显微镜观察, 药物处理组细胞与对照组相比, 形态发生明显改变。MTT显示, 除尼美舒利200 $\mu\text{mol/L}$ 的24, 48 h处理组及AA861 25 $\mu\text{mol/L}$ 的24 h处理组外, 尼美舒利和AA861基本呈时间、剂量依赖性抑制AGS细胞增殖。TUNEL染色法表明, 尼美舒利或AA861处理组的细胞凋亡率随着剂量的增加而升高。药物处理48 h后, MTT法表明, 细胞增殖在AA861组和尼美舒利组与两药联用组间相比差异显著(0.240 ± 0.002 vs 0.207 ± 0.001 , $P < 0.01$; 0.211 ± 0.002 vs 0.207 ± 0.001 , $P < 0.05$); TUNEL染色法表明, 单药组与两药联用组细胞凋亡率相比差异明显(AA861组: $18.67\% \pm 0.03\%$, 尼美舒利组: $20.94\% \pm 0.48\%$ vs 两药联用组: $23.76\% \pm 0.92\%$, $P < 0.01$); AO/EB染色法也同时表明, 细胞凋亡单药组与两药联用组相比差异明显(AA861组: $18.17\% \pm 0.28\%$, 尼美舒利组: $19.35\% \pm 0.74\%$ vs 两药联用组: $23.78\% \pm 0.04\%$, $P < 0.01$)。DNA琼脂糖凝胶电泳法显示, 两药联合处理AGS细胞组与单药处理组比较, 癌细胞增殖被抑制, 凋亡明显增加。

结论: COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861对胃癌AGS细胞的增殖抑制以及促凋亡作用基本呈时间浓度依赖性。联用尼美舒利和AA861抑制COX-2与5-LOX两条通路, 与单独抑制其中一条通路比较, 能更有效抑制胃癌细胞增殖, 促进凋亡。

关键词: 环氧合酶-2; 5-脂氧合酶; 联合抑制; AGS细胞; 增殖; 凋亡

陈浩莉, 邹来玉, 李建英, 王小众, 陈治新, 黄月红. 联合抑制环氧合酶-2与5-脂氧合酶对胃癌细胞增殖凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(4):323-331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/323.asp>

0 引言

胃癌是严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤, 具体发病机制至今仍不明确, 亦无有效的治疗方法。近几年来, 随着国内外研究的深入, 花生四烯酸(arachidonic acid, AA)代谢通路在胃癌的形成与发展中的作用日益受到广泛关注。环氧合酶(cyclooxygenase, COX)及脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)是催化体内花生四烯酸代谢的两个关键酶。细胞膜上的磷脂在磷脂酶A₂作用下释放出AA, AA经COX及LOX两条通路代谢产生一系列生物活性物质, 如前列腺素(PGs)、血栓素A(TXA₂)、羟基廿碳四烯酸(HETEs)和白细胞三烯(LTs)等。通过这些活性物质, COX及LOX影响细胞信号转导, 结构及代谢, 进而对包括肿瘤, 炎症在内的多种疾病产生作用^[1-3]。COX分为COX-1和COX-2两种亚型, 根据底物加氧位点的不同, LOX也分为5-LOX, 8-LOX, 12-LOX和15-LOX。国内外研究发现, COX-2和5-LOX两条通路在多种肿瘤的形成与发展中扮演重要的角色^[1-4]。研究显示, 在结直肠癌、胃癌、食管癌、胰腺癌等多种肿瘤组织或细胞中存在COX-2和5-LOX的高表达, 而相应正常组织则不表达或者表达量很少^[5-9]; 同时, 体内体外的实验也表明, 应用选择性COX-2抑制剂或5-LOX抑制剂都可降低下游活性产物, 抑制肿瘤细胞增殖, 并诱导凋亡^[7,9-11]。但关于联合抑制COX-2及5-LOX两条通路, 将对肿瘤细胞造成的影响研究较少, 胃癌中的COX-2及5-LOX双通路抑制则未见报道。我们通过单独及联合应用选择性COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861处理胃癌细胞系AGS, 比较各处理组增殖凋亡率, 探讨联合抑制COX-2和5-LOX两条通路对胃癌细胞系AGS增殖凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系AGS(中分化胃腺癌细胞系)购自中国科学院上海细胞生物研究所, 5-LOX抑制剂AA861、选择性COX-2抑制剂尼美舒利和胰酶均购自Sigma公司; 脱氧核糖

表 1 尼美舒利处理后AGS细胞的吸光度(mean \pm SD, $n = 7$)

分组	24 h	48 h	72 h
对照组	0.383 \pm 0.017	0.438 \pm 0.014	0.461 \pm 0.019
50 μ mol/L	0.311 \pm 0.003 ^a	0.316 \pm 0.007 ^b	0.278 \pm 0.004 ^b
100 μ mol/L	0.293 \pm 0.004 ^b	0.272 \pm 0.006 ^b	0.238 \pm 0.004 ^b
200 μ mol/L	0.289 \pm 0.011 ^b	0.276 \pm 0.002 ^b	0.205 \pm 0.004 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

核酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒购自德国罗氏(Roche, Germany)公司; DNA抽提试剂盒购自Gentra公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Fluka公司; RPMI1640购自Gibco公司; 其余试剂均为国产生化试剂.

1.2 方法 细胞在含100 mL/L新生牛血清+100 kU/L青、链霉素的RPMI1640培养基中, 于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中常规培养. 取对数生长期的AGS细胞, 经2.5 g/L胰酶消化后, 按实验要求以不同浓度接种于培养板或培养瓶, 常规培养待细胞贴壁后, 换无血清1640培养液同步化24 h, 按不同实验目的分为对照组、AA861处理组、尼美舒利处理组、AA861联合尼美舒利处理组. 其中AA861组, 可分为25 μ mol/L, 50 μ mol/L, 100 μ mol/L三组; 而尼美舒利则分为50 μ mol/L, 100 μ mol/L, 200 μ mol/L三组; AA861联合尼美舒利处理组则为50 μ mol/L AA861+100 μ mol/L尼美舒利. AA861和尼美舒利都溶于溶剂二甲基亚砜(DMSO)中, 使用时用无血清的1640培养液稀释至终浓度, 对照组含等体积溶剂DMSO, 所有处理组的溶剂DMSO浓度均<1 g/L. 实验皆重复3遍.

1.2.1 倒置显微镜观察细胞形态 AGS细胞以4 \times 10⁴-7 \times 10⁴个/孔接种于6孔细胞培养板中, 于药物处理后48 h取各浓度实验组和对照组细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态.

1.2.2 MTT法检测各实验组的细胞增殖情况 AGS细胞以5 \times 10³/孔接种于96孔细胞培养板中, 同步化后添加药物, 设不接种细胞的空白对照和只加等体积溶剂DMSO的对照组, 每个浓度每个时间点重复7孔. 药物处理后的24, 48和72 h, 每孔加入MTT溶液(5 g/L) 20 μ L, 37℃孵育4 h后吸去上清, 每孔再加入DMSO溶液150 μ L, 振荡10 min. 空白孔调零, 测490 nm波长处每孔的吸光度值(A值), 求平均值. 对照组细胞抑制率记为0. 实验组按照下列公式计算细胞抑制率: 细胞

抑制率 = (1-实验组A值/对照组A值) \times 100%.

1.2.3 实验组AGS细胞凋亡率的检测 (1)TUNEL染色法: 严格按照TUNEL试剂盒的产品说明书操作. DAB染色后, 苏木素复染, 封片, 光镜下观察、计数并拍照. 每片计数500个细胞, 计算细胞凋亡率(即每100个细胞中TUNEL阳性细胞所占的百分比); (2)AO/EB染色法: 细胞接种于六孔培养板中, 按实验要求设立分组, 培养48 h, 按终浓度5 mg/L的比例加入AO染液(acridine orange/AO, 100 mg/L溶于PBS)和EB染液(ethidium bromide/EB, 100 mg/L溶于PBS), 迅速于荧光显微镜下观察、拍照. 每片计数500个细胞, 计算细胞凋亡率, 凋亡率 = (早期凋亡细胞+晚期凋亡细胞)/总细胞数 \times 100%; (3)DNA琼脂糖凝胶电泳法: 常规消化、收集好实验组细胞, 严格按DNA抽提试剂盒产品说明书进行操作. 取细胞总DNA 20 μ g, 18 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 g/L溴化乙锭)电泳分离(80 V, 40 min), 紫外光下自显影, 经计算机扫描成像.

统计学处理 所得数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS13 for windows软件包进行分析, 组间均数比较用 t 检验和方差分析, 率间比较用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 药物处理后AGS细胞的形态学改变 单独及联合应用尼美舒利和AA861处理细胞48 h后, 置于相差显微镜下观察, 50 μ mol/L AA861处理组的细胞, 胞核变小, 核仁明显, 细胞变小, 形态变成梭形或变圆; 而100 μ mol/L尼美舒利处理组的细胞则形态更不规则, 多边似星形; 两药联用组的细胞数目大量减少, 细胞胞体变圆, 脱离贴壁状态, 成为悬浮细胞, 贴壁的细胞则胞质内可见泡状结构, 胞质浓缩, 胞体变小, 形态亦不规则; 对照组细胞则呈多边形贴壁生长, 悬浮细胞很少(图1).

2.2 MTT法检测AGS细胞的生长情况 除尼美舒利200 μ mol/L的24, 48 h处理组及AA861

■应用要点

本实验通过研究联合抑制COX-2及5-LOX两条通路对胃癌的影响, 进一步探讨胃癌的具体发病机制, 并为寻找新的有效治疗方法提供理论依据.

■名词解释

1 环氧合酶: 是前列腺素类生物合成的限速酶, 催化花生四烯酸生成血栓烷素(TXA_2)和前列腺素 E_2 (PGE_2)等活性物质, 参与疼痛、炎症、肿瘤等疾病进程。

2 脂氧合酶: 是以铁离子为辅基的一组同工酶, 可将具有1, 4-顺-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸如花生四烯酸、亚油酸等代谢成为5-HETE, LTB_4 , 12-HETE, 13-S-HETE等生物活性产物, 从而影响细胞信号传导、结构及代谢。

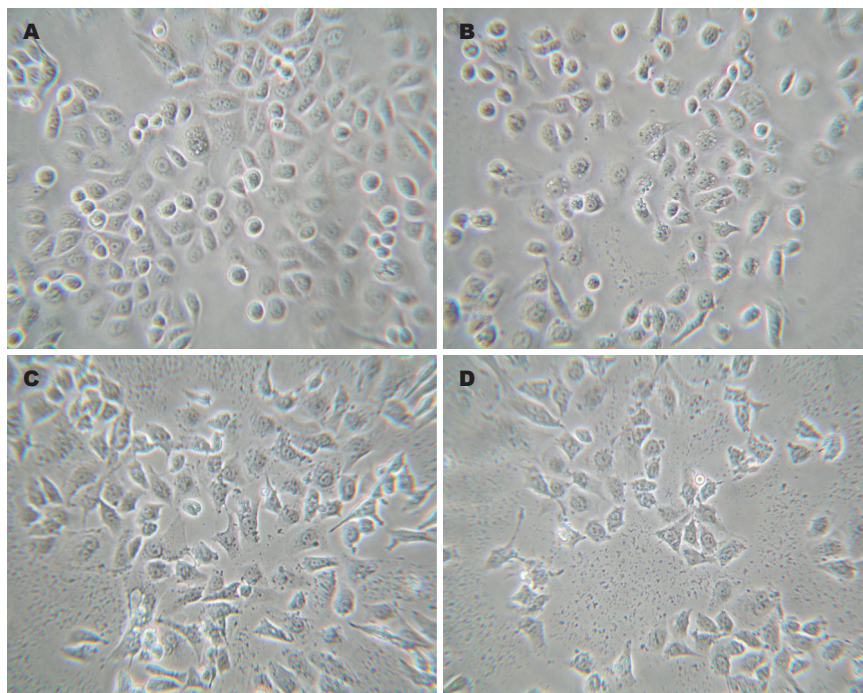


图1 尼美舒利和AA861处理AGS细胞48 h后的细胞形态(相差显微镜×200)。A: 对照组; B: 50 μ mol/L AA861组; C: 100 μ mol/L尼美舒利组; D: 50 μ mol/L AA861+100 μ mol/L尼美舒利组。

表2 AA861处理后AGS细胞的吸光度(mean \pm SD, $n = 7$)

分组	24 h	48 h	72 h
对照组	0.473 \pm 0.02	0.574 \pm 0.07	0.729 \pm 0.05
25 μ mol/L	0.441 \pm 0.04	0.442 \pm 0.05 ^b	0.437 \pm 0.03 ^b
50 μ mol/L	0.369 \pm 0.07 ^a	0.386 \pm 0.04 ^b	0.383 \pm 0.05 ^b
100 μ mol/L	0.280 \pm 0.05 ^b	0.300 \pm 0.03 ^b	0.264 \pm 0.05 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

25 μ mol/L的24 h处理组外, 尼美舒利和AA861基本呈时间、剂量依赖性抑制AGS细胞增殖, 细胞增殖抑制率呈上升趋势。尼美舒利200 μ mol/L处理细胞72 h, 药物的抑制率最高(55.66%), 尼美舒利50 μ mol/L处理细胞24 h, 药物的抑制率最低(18.74%, 表1)。100 μ mol/L AA861作用72 h, AGS细胞的增殖抑制率可达63.80%(表2)。AA861和尼美舒利共同作用AGS细胞48 h, 实验组细胞的增殖抑制率高于分别单用尼美舒利($P < 0.05$)或AA861处理($P < 0.01$)的实验组(表3)。

2.3 TUNEL染色法检测AGS细胞的凋亡率 经TUNEL染色与苏木素复染后, 实验组非凋亡细胞的胞核呈淡蓝紫色着染, 核形态大小比较一致, 凋亡细胞的核呈深棕色着染, 核固缩, 不平整, 大小不一致。对照组凋亡细胞少见, 在不同视野下进行细胞计数, 测得其凋亡率为4.75% \pm 0.15%($n = 3$), 不同浓度的尼美舒利和AA861分别处理48 h, 其促进AGS细胞凋亡的作用基本呈

表3 单用及联用尼美舒利和AA861处理48 h后AGS细胞的吸光度(mean \pm SD, $n = 7$)

分组	AGS
对照组	0.392 \pm 0.048
50 μ mol/L AA861	0.240 \pm 0.002 ^{bd}
100 μ mol/L尼美舒利	0.211 \pm 0.002 ^{ad}
50 μ mol/L AA861+100 μ mol/L尼美舒利	0.207 \pm 0.001 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 两药联用组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

浓度依赖性; 在作用48 h后, 联合应用100 μ mol/L尼美舒利和50 μ mol/L AA861的实验组细胞凋亡率高于单用其中一种同浓度药物的实验组细胞凋亡率($P < 0.01$), 两药联用组为23.76% \pm 0.92%($n = 3$), 尼美舒利组为20.94% \pm 0.48%($n = 3$), 而AA861组为18.67% \pm 0.03%($n = 3$), 药物处理组与对照组(4.75% \pm 0.15%)比较, 均有显著性差异($P < 0.01$) (表4, 图2-4)。

2.4 AO/EB双染色法检测AGS的凋亡率 在AO/

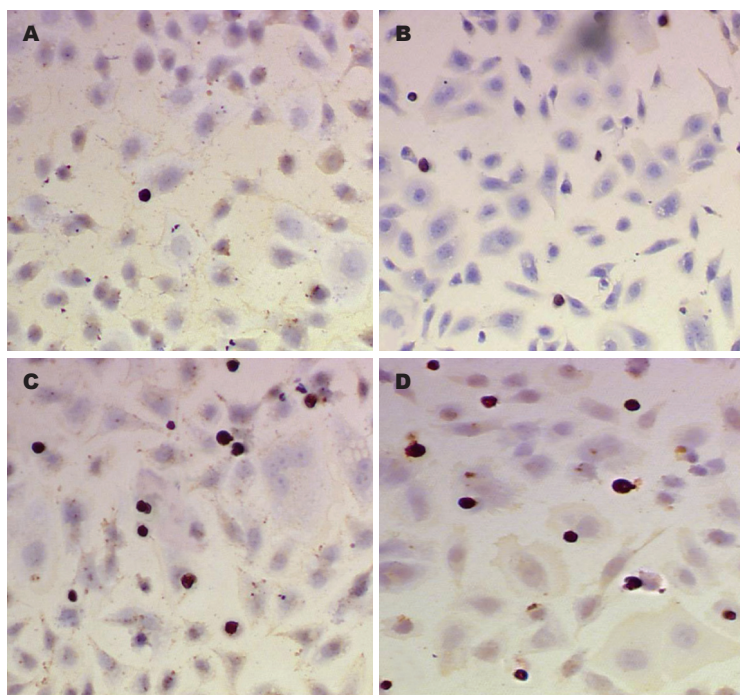


图 2 尼美舒利作用48 h后AGS细胞凋亡指数(TUNEL法×200). A: 对照组; B: 50 μmol/L; C: 100 μmol/L; D: 200 μmol/L.

■同行评价

本文单独及联合应用选择性COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861处理胃癌细胞系AGS, 分析其对胃癌细胞系AGS增殖凋亡的影响, 有一定创新性, 方法较可靠.

EB染色法中, 根据观察可将细胞分为4种类型: 正常活细胞(viable non-apoptotic cell, VNA)细胞核染色质被AO染成均一绿色或黄绿色, 细胞核结构正常; 早期凋亡细胞(viable apoptotic cell, VA)细胞核染色质也被AO染成绿色或黄绿色, 但染色不均一, 细胞核呈固缩状、圆珠状或碎片状; 晚期凋亡细胞(non-viable apoptotic cell, NVA)核染色质被EB染成橙色或红色并呈固缩状或圆珠状; 坏死细胞(non-viable non-apoptotic cell, NVNA)核染色质也被EB染成橙色或红色但细胞核结构正常(图5). 单独及联合应用尼美舒利和AA861作用48 h后, 各组的细胞凋亡率: 对照组为4.17%±0.15%, AA861(50 μmol/L)组为18.71%±0.28%, 尼美舒利单用组(100 μmol/L)为19.35%±0.74%, 尼美舒利(100 μmol/L)与AA861(50 μmol/L)合用组为23.78%±0.04%, 药物组的细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$), 与同等浓度的单药组相比, 合用组的细胞凋亡率明显升高($P<0.01$).

2.5 AGS细胞DNA琼脂糖凝胶电泳 单用及联用尼美舒利和AA861处理48 h后, AGS细胞DNA琼脂糖凝胶电泳呈现出典型的DNA梯状条带(图6), 表明DNA链在核小体间发生断裂, 生成寡核小体, 提示AGS细胞凋亡. 其中, 以两药联用组条带最亮, 对照组未能诱导出梯形条带.

3 讨论

AA的代谢酶在多种肿瘤组织中存在过表达, 并

表 4 TUNEL染色法检测尼美舒利和AA861作用48 h后AGS细胞凋亡率(mean ± SD, $n = 3$)

分组	凋亡率(%)
对照组	4.75 ± 0.15
尼美舒利	50 μmol/L 15.41 ± 0.94 ^{bd}
	100 μmol/L 20.94 ± 0.48 ^b
	200 μmol/L 21.09 ± 0.92 ^{bd}
AA861	25 μmol/L 16.02 ± 4.14 ^{bf}
	50 μmol/L 18.67 ± 0.03 ^b
	100 μmol/L 29.48 ± 0.51 ^{bf}

^b $P<0.01$ vs 对照组; ^d $P<0.01$ vs 尼美舒利100 μmol/L组; ^f $P<0.01$ vs AA861 50 μmol/L组.

参与肿瘤细胞的增殖凋亡分化过程, 与肿瘤的血管生成, 侵袭力, 远处转移以及临床预后有关^[1-2,4,6]. 如何抑制AA的代谢酶通路来预防和治疗肿瘤成为当今的研究热点. 其中, 5-LOX通路和COX-2通路是现今研究得最为深入的两条代谢途径. Hong *et al*^[9]发现, 5-LOX和COX-2在结肠癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌等上皮癌细胞中都存在过表达, 体内体外实验中, 应用5-LOX抑制剂或COX-2抑制剂阻断AA的代谢都可引起多种恶性肿瘤细胞活性降低, 诱导凋亡, 延缓肿瘤生长速度, 降低远处转移率^[10-12]. 研究发现, 使用外源性PGE₂处理或将COX-2基因的质粒转染多种肝细胞癌细胞株都能明显促进肿瘤细胞的增殖; 将反义COX-2质粒转染上述肿瘤细胞则可

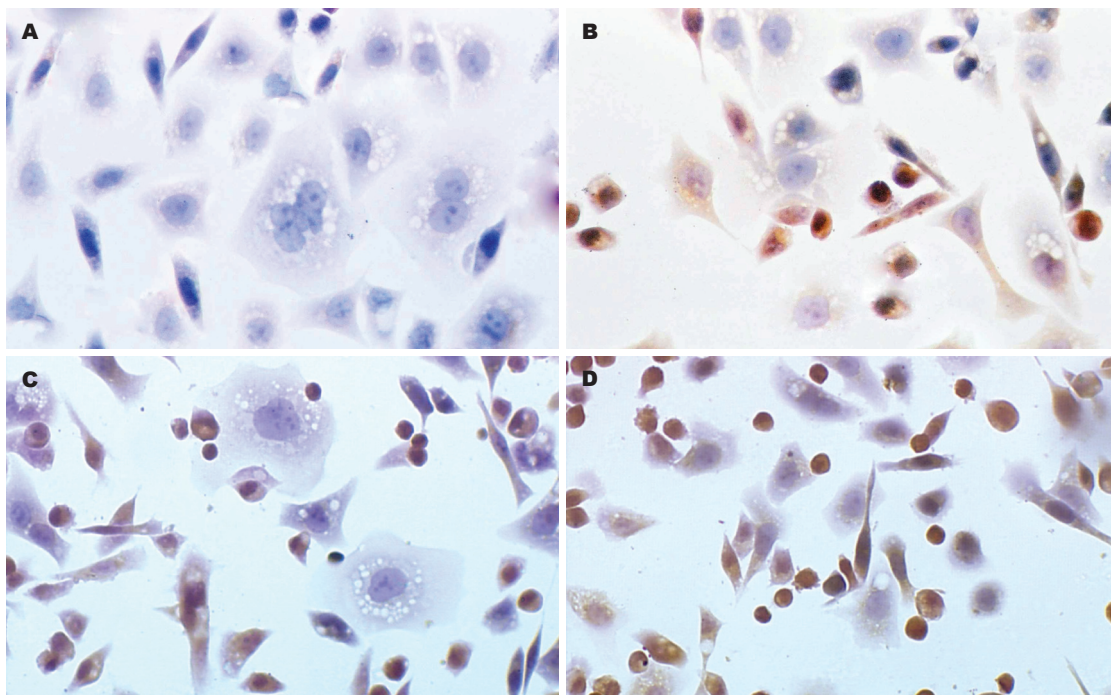


图 3 AA861作用48 h后AGS细胞凋亡(TUNEL法×200). A: 对照组; B: 25 $\mu\text{mol/L}$; C: 50 $\mu\text{mol/L}$; D: 100 $\mu\text{mol/L}$.

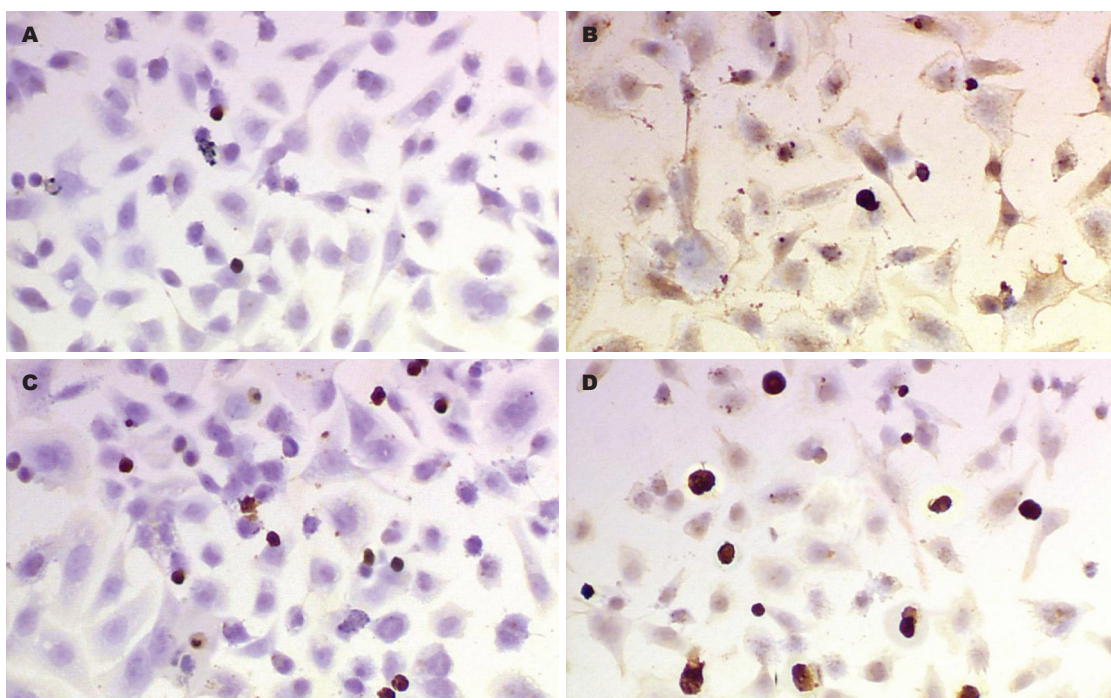


图 4 单用及联合尼美舒利与AA861作用48 h后AGS细胞凋亡(TUNEL法×200). A: 对照组; B: 50 $\mu\text{mol/L}$ AA861; C: 100 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利; D: 100 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利+50 $\mu\text{mol/L}$ AA861.

抑制增殖^[13]. 同时也有报道称, 无论应用药理学上的5-LOX抑制剂还是转染5-LOX的反义寡核苷酸来抑制5-LOX, 都能显著促进培养在纤维连接蛋白上的胰腺癌细胞凋亡^[14].

随着研究的深入, 有学者发现, AA的代谢通路存在着动态平衡, COX途径和LOX途径之间

具有交叉作用. 研究表明, 基因敲除5-LOX^[15]或COX-1/COX-2^[16]会导致其他通路的活化, 一个通路的化学抑制剂有可能也激活其他花生四烯酸代谢通路^[17-18]. 据报道, 单独应用COX-2抑制剂作用烟草提取物预处理过的结肠癌细胞, 肿瘤细胞增殖受抑制, 凋亡增加, 但在PGE₂降低的

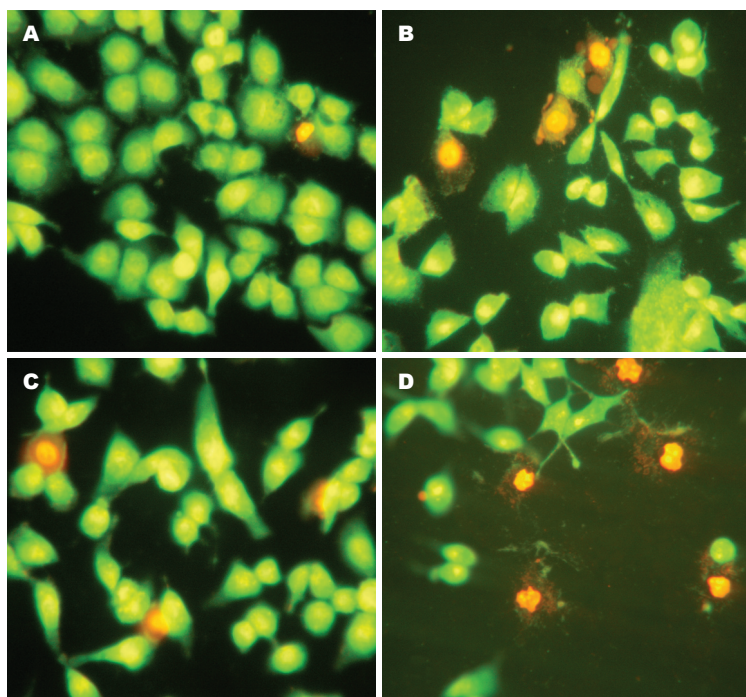


图 5 联合尼美舒利和AA861处理48 h后AGS细胞凋亡率(AO/EB法×200). A: 对照组; B: AA861组; C: 尼美舒利组; D: 尼美舒利+AA861组.

同时, 却伴随 LTB_4 水平升高, 而联合应用COX-2抑制剂和5-LOX抑制剂的实验组对肿瘤的抑制效果优于只用一种同浓度抑制剂的实验组, 同时, PGE_2 和 LTB_4 含量都降低^[19]. 拉伸人髌腱成纤维细胞(HPTFs)的实验中也发现, 加入消炎痛在抑制 PGE_2 产生的同时, 能产生更多的 LTB_4 , 而加入FLAP抑制剂MK-886在抑制 LTB_4 产生的同时, PGE_2 的产生却异常增多^[20]. Cherukuri *et al*^[21]还发现, 在头颈癌UMSCC 14A细胞中加入COX-2抑制剂塞来考昔处理, 随着 PGE_2 水平降低, 5-HETE的水平提高. 而Peters-Golden *et al*^[22]报道, 在因5-LOX基因敲除而LT不足的小鼠模型与野生型小鼠对照中发现, 基因敲除小鼠的 PGE_2 水平明显升高. 从这些学者的研究中, 我们似乎真的可以推测: COX-2和5-LOX通路间存在动态平衡, 抑制其中一种酶可能会引起酶底物向另一种酶转移, 导致这种酶的合成或活性增加^[23]. 那么同时抑制COX-2和5-LOX两条通路在肿瘤的预防和治疗方面将具有重要意义和前景. 有学者报道, 在肺癌模型中发现, 同时抑制COX-2和5-LOX通路比单独抑制某一通路更有效^[24].

国内学者的前期研究发现, COX-2抑制剂尼美舒利显著抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖, 并诱导凋亡, 且伴随COX-2下游产物 PGE_2 含量的降低^[25]. 而在二甲苯蒽诱导的仓鼠口腔癌模型研究中, 单用或者联用5-LOX抑制剂齐留通及COX-2抑制剂塞来考昔都明显降低磷状细胞癌



图 6 单用及联用尼美舒利与AA861作用48 h后AGS细胞凋亡情况. 1: 尼美舒利(100 $\mu\text{mol/L}$ +AA861 50 $\mu\text{mol/L}$); 2: 尼美舒利(100 $\mu\text{mol/L}$); 3: AA861(50 $\mu\text{mol/L}$); 4: 对照组; M: Mark.

的发生率, 并且在相同剂量下两药连用比单药更大程度降低磷癌发生率, 具有累加效应^[26]. 那么联用COX-2抑制剂和5-LOX抑制剂对胃癌细胞的作用如何, 国内外未见报道. 本实验通过检测COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861单独及联合作用于AGS胃癌细胞后, 引起的胃癌细胞增殖凋亡变化, 探讨联合抑制COX-2和5-LOX两条通路对胃癌细胞AGS的作用. 实验中, 我们用相差显微镜观察药物对AGS细胞形态的影响, 单用尼美舒利组和两药联合组细胞形态变化都较大, 对照组形态几乎没有变化, 提示单独及联合抑制COX-2和5-LOX两条通路都会影响细胞的形态. 实验中, MTT结果提示, 尼美舒利和AA861单独作用AGS细胞时, 其抑制细胞增殖的作用基本呈浓度时间依赖性. 200 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利作用24 h, 其细胞增殖抑制率几乎与100 $\mu\text{mol/L}$ 组相等, 作用48 h后, 对细

细胞的增殖抑制率甚至略低于100 $\mu\text{mol/L}$ 组, 考虑可能与高浓度尼美舒利抑制COX-2后, 引起花生四烯酸底物向脂氧合酶途径转移, 刺激5-LOX酶活性升高或者合成增加, 导致5-HETE, LTB_4 等下游活性物质含量升高, 促进细胞增殖有关. 单独及联合应用尼美舒利和AA861处理AGS细胞48 h, 两药联合组的细胞抑制率明显高于单药组, 考虑联合抑制COX-2与5-LOX两条通路, 阻断底物增加对5-LOX通路的刺激作用, 抑制5-LOX下游活性产物的升高, 更有效抑制了细胞增殖. 在TUNEL法检测细胞凋亡率实验中, 不同浓度尼美舒利和AA861单独作用AGS细胞48 h, 处理组的细胞凋亡率随药物浓度升高而升高, 两药联合作用48 h的细胞凋亡率明显高于对照组和同浓度单药组; 进一步AO/EB法检测细胞凋亡率, 也证实两药联合作用的细胞凋亡率高于对照组和同浓度单药组. 但与AO/EB法检测的细胞凋亡率比较, TUNEL法检测的实验组凋亡率略高, 估计与TUNEL法利用DNA聚合酶和末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)来标记DNA链断端的核酸, 应用TdT进行的末端反应将有DNA链断端的细胞着色, 无法区别凋亡与坏死, 故存在一定的假阳性率有关. DNA琼脂糖凝胶电泳实验进一步证实, COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861单独及联合作用于AGS胃癌细胞, 都可诱导细胞凋亡.

总之, COX-2抑制剂尼美舒利和5-LOX抑制剂AA861对胃癌AGS细胞的增殖抑制与促进凋亡的作用, 呈时间剂量依赖性, 而联合应用尼美舒利和AA861抑制COX-2与5-LOX两条通路, 与单独抑制其中一条通路比较, 能更有效的抑制胃癌细胞增殖, 促进凋亡. 但双通路抑制对肿瘤细胞具有更强促凋亡作用的具体机制仍不明确. 据报道, 5-LOX抑制剂可通过降低下游产物5-HETE和 LTB_4 水平, 作用于细胞外调节激酶级联(MEK/ERK)途径及三磷酸肌醇激酶(PI3K)/Akt途径^[27-28], 促进细胞凋亡; 还可干扰抗凋亡蛋白(如Bcl-2, Mcl-1)和促凋亡蛋白(Bax)的平衡, 升高促凋亡蛋白/抗凋亡蛋白比值触发线粒体释放细胞色素C, 激活Caspase级联反应导致凋亡^[29]. 同时, COX-2抑制剂也可降低 PGE_2 水平, 影响PI3K/Akt通路^[30]及调节促/抑凋亡因子(Bcl-2, MAks/ras, Caspase-3, Par-4)的平衡^[31], 以促进细胞凋亡. 那么, 5-LOX抑制剂联合COX-2抑制剂作用于胃癌细胞, 是否也通过减少下游产物, 作用于一系列信号通路及凋亡相关蛋白,

促进细胞凋亡, 并阻断底物转移所致的另一代谢通路激活, 进一步阻断COX-2或5-LOX的促癌作用? 还需要我们今后进行更深入的研究, 以期肿瘤防治找到一条更有效的新途径.

4 参考文献

- 1 Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 207-222
- 2 Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J* 2003; 17: 1986-1995
- 3 Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3431-3447
- 4 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501
- 5 李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新. 胃癌组织中5-脂氧合酶的表达及其与磷酸化Akt的相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3103-3106
- 6 Soumaoro LT, Iida S, Uetake H, Ishiguro M, Takagi Y, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K. Expression of 5-lipoxygenase in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6355-6360
- 7 Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005; 26: 785-791
- 8 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Buchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
- 9 Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 1999; 59: 2223-2228
- 10 Huang RH, Chai J, Tarnawski AS. Identification of specific genes and pathways involved in NSAIDs-induced apoptosis of human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6446-6452
- 11 Kang HF, Wang XJ, Liu XX, Dai ZJ, Xue FJ, Xue XH. Chemopreventive Effect of Tamoxifen Combined with Celecoxib on DMBA-induced Breast Cancer in Rats. *Ai Zheng* 2006; 25: 1346-1350
- 12 Gregor JL, Kilian M, Heukamp I, Kiewert C, Kristiansen G, Schimke I, Walz MK, Jacobi CA, Wenger FA. Effects of selective COX-2 and 5-LOX inhibition on prostaglandin and leukotriene synthesis in ductal pancreatic cancer in Syrian hamster. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 89-97
- 13 Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced

- apoptosis. *Hepatology* 2003; 38: 756-768
- 14 Edderkaoui M, Hong P, Vaquero EC, Lee JK, Fischer L, Friess H, Buchler MW, Lerch MM, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1137-1147
 - 15 Goulet JL, Snouwaert JN, Latour AM, Coffman TM, Koller BH. Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12852-12856
 - 16 Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, Tiano HF, Lee CA, Langenbach R, Roggli VL, Zeldin DC. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 721-732
 - 17 Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1433-1438
 - 18 Schuligoi R, Amann R, Prens C, Peskar BA. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on thromboxane and leukotriene synthesis in rat peritoneal cells. *Inflamm Res* 1998; 47: 227-230
 - 19 Ye YN, Wu WK, Shin VY, Bruce IC, Wong BC, Cho CH. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. *Carcinogenesis* 2005; 26: 827-834
 - 20 李昭铸, James H-C Wang, 林欣. 重复性机械拉伸肌腱成纤维细胞与前列腺素E2和白三烯B4水平异常升高的关系. *中华创伤杂志* 2005; 21: 286-289
 - 21 Cherukuri DP, Nelson MA. Do elevated levels of eicosanoids play a role in head and neck cancer recurrence and metastasis? Implications for prevention and treatment. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 853-854
 - 22 Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, Wilke C, Phan SH, Toews GB, Moore BB. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 229-235
 - 23 Shureiqi I, Lippman SM. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 6307-6312
 - 24 Rioux N, Castonguay A. Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1393-1400
 - 25 李建英, 于皆平, 罗和生, 余保平, 田耕, 梅俏, 黄杰安. 选择性COX-2抑制剂对胃癌细胞增殖的影响. *癌症* 2002; 21: 625-629
 - 26 Li N, Sood S, Wang S, Fang M, Wang P, Sun Z, Yang CS, Chen X. Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2089-2096
 - 27 Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 949-956
 - 28 O'Flaherty JT, Rogers LC, Chadwell BA, Owen JS, Rao A, Cramer SD, Daniel LW. 5(S)-Hydroxy-6,8,11,14-E,Z,Z,Z-eicosatetraenoate stimulates PC3 cell signaling and growth by a receptor-dependent mechanism. *Cancer Res* 2002; 62: 6817-6819
 - 29 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 929-935
 - 30 Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18075-18081
 - 31 Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmolli HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 411-417

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

IL-1 β 致乙酸性胃溃疡复发大鼠的比较蛋白质组学分析

申定珠, 李家邦, 叶川, 凌江红, 马国添, 叶仁群, 黄国栋, 蒋荣鑫

■背景资料

胃溃疡是临床常见病之一, 由于其复发率极高, 其整体治疗水平不尽如人意。因此, 有必要从蛋白质整体水平对胃溃疡复发的产生机制进行研究, 故而对早期预测及其诊断胃溃疡复发, 进一步提高其治愈率, 改善预后具有重要意义。自1994年Wilkins和Williams提出蛋白质组(Proteome)后, 以其为核心的技术的快速发展使胃溃疡复发的早期预测、诊断及药物靶点的筛选成为可能。

申定珠, 李家邦, 凌江红, 叶仁群, 黄国栋, 蒋荣鑫, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所 湖南省长沙市 410008
叶川, 中南大学湘雅医院骨科 湖南省长沙市 410008
马国添, 中南大学湘雅医院心内科 湖南省长沙市 410008
申定珠, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所2004级在读博士研究生, 主治医师, 主要从事内科消化系统疾病的中西医结合临床与实验研究。
湖南省自然科学基金资助项目, No. 04JJ3099
通讯作者: 蒋荣鑫, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所. shensan13@163.com
电话: 0731-4327031
收稿日期: 2006-10-31 接受日期: 2006-12-01

Comparative proteomics analysis on acetic acid-induced gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 β

Ding-Zhu Shen, Jia-Bang Li, Chuan Ye, Jiang-Hong Ling, Guo-Tian Ma, Ren-Qun Ye, Guo-Dong Huang, Rong-Xin Jiang

Ding-Zhu Shen, Jia-Bang Li, Jiang-Hong Ling, Ren-Qun Ye, Guo-Dong Huang, Rong-Xin Jiang, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Chuan Ye, Department of Orthopaedics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Guo-Tian Ma, Department of Cardiology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 04JJ3099

Correspondence to: Dr. Rong-Xin Jiang, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. shensan13@163.com

Received: 2006-10-31 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To screen the proteins related to gastric ulcer recurrence and find out the mechanism of gastric ulcer recurrence through proteomic tools.

METHODS: Acetic acid was used to prepare the model of gastric ulcer, whose occurrence was induced by interleukin-1 β (IL-1 β). Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed to separate the total proteins of ulcer-

ative tissues and normal tissues. PDQuest software was applied to analyze the obtained 2-DE images. The differential protein spots between the two groups were identified by peptide mass fingerprint (PMF) based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching.

RESULTS: The well-resolution and reproducible 2-DE patterns of rat gastric ulcerative and normal tissues were established. A total of 12 differentially expressed proteins were identified, of which 7 proteins were up-regulated, including heat shock protein 27 (HSP27), 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78), L-lactate dehydrogenase B chain, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hemoglobin beta chain, peroxiredoxin-2, peroxiredoxin-1, and 5 ones were down-regulated, including annexin A₂, heat shock protein 60 (HSP60), chloride intracellular channel protein 1, vinculin, gelsolin. The subsequent immunohistochemical analysis of HSP27 and GRP78 in gastric ulcerative and normal tissues also showed a similar expression pattern HSP27: 27.90% \pm 5.34% vs 22.10% \pm 3.67%, $P < 0.05$; GRP78: 43.00% \pm 4.52% vs 26.30% \pm 3.95%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The proteins such as HSP27 and GRP78 may be involved in the occurrence of gastric ulcer, and this may help to further elucidate the mechanism of gastric ulcer recurrence.

Key Words: Comparative proteomics; Gastric ulcer; Recurrence; Two-dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry; Immunohistochemistry

Shen DZ, Li JB, Ye C, Ling JH, Ma GT, Ye RQ, Huang GD, Jiang RX. Comparative proteomics analysis on acetic acid-induced gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 β . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):332-339

摘要

目的: 筛选胃溃疡复发相关的蛋白质, 进一步揭示胃溃疡复发的分子机制。

方法: 以乙酸制备胃溃疡模型, 并用IL-1 β 诱

导复发. 采用二维凝胶电泳(2-DE)技术分离胃溃疡复发大鼠胃溃疡处组织及正常大鼠相应处胃组织的总蛋白质, 图像分析识别差异表达的蛋白质点, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)得到相应的肽质量指纹图(PMF), 搜索数据库鉴定蛋白质.

结果: 获得分辨率较高、重复性较好的胃溃疡复发大鼠和正常大鼠胃组织的2-DE图谱, 质谱分析共鉴定了12个差异蛋白质点, 其中7个表达上调, 含热休克蛋白27(HSP27)、葡萄糖调节蛋白(GRP78)、L-乳酸脱氢酶轻链、磷酸甘油醛脱氢酶、血红蛋白 β 链、过氧化物酶2、过氧化物酶1; 5个表达下调, 含膜联蛋白A₂、热休克蛋白60、氯离子通道蛋白1、黏着斑蛋白、凝溶胶蛋白. 随即采用免疫组化法检测差异蛋白质HSP27和GRP78在两类组织中的表达, 结果显示胃溃疡复发组HSP27和GRP78阳性细胞百分率均显著高于正常对照组(HSP27: 27.90% \pm 5.34% vs 22.10% \pm 3.67%, $P<0.05$; GRP78: 43.00% \pm 4.52% vs 26.30% \pm 3.95%, $P<0.01$).

结论: 差异蛋白如HSP27和GRP78等可能以不同的方式参与了胃溃疡的复发过程, 为揭示胃溃疡复发的机制提供了线索.

关键词: 比较蛋白质组学; 胃溃疡复发; 二维凝胶电泳; 质谱; 免疫组化

申定珠, 李家邦, 叶川, 凌江红, 马国添, 叶仁群, 黄国栋, 蒋荣鑫. IL-1 β 致乙酸性胃溃疡复发大鼠的比较蛋白质组学分析. 世界华人消化杂志 2007;15(4):332-339
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/332.asp>

0 引言

胃溃疡(gastric ulcer, GU)是一多因素、多步骤参与的全球多发性疾病, 随着溃疡病治疗药物的进展, GU的近期愈合已不成问题, 但常规抗酸治疗愈合的溃疡, 停药后一年复发率可接近60%^[1], 深入研究GU复发无疑有着重要的理论和临床意义. 以往的研究^[2-5]虽然揭示了GU复发的某些机制, 但是这些研究多数是从某个或某几个基因出发, 而且多半集中在DNA和RNA水平, 而DNA和RNA水平的变化并不能完全反映蛋白质水平的变化^[6], 可见GU复发的分子机制远未阐明. 因此, 有必要从蛋白质整体水平对GU复发的产生机制进行研究. 蛋白质组学的出现及其研究技术的发展和完善使得从蛋白质组整体水平上研究GU复发的产生机制成为可能. 为此, 我们以乙酸性GU复发大鼠胃组织及正常大鼠胃组织为研究对象,

采用二维凝胶电泳、质谱技术及免疫组化技术筛选与GU复发相关的蛋白质, 以揭示GU复发的产生机制, 为其复发的防治提供新的靶点.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD大鼠80只, δ φ 各半, 体重为150-200 g, 由中南大学医学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(湘)2005-0005. 合成人Interleukin1- β (IL-1 β)系英国Peprotech公司产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素(urea)、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(3-(cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulphonate, CHAPS)、IPG缓冲液(pH3-10)、24 cm固相pH梯度干胶条、两性电解质(pharmalyte, pH3-10)、覆盖液、双向凝胶电泳标准蛋白质均购自Amersham Pharmacia公司; 二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲-酮-胰蛋白酶(TPCK-Trypsin)、铁氰化钾[K₃Fe(CN)₆]、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵(NH₄HCO₃)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)、乙睛、基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)均购自Sigma公司; 作用于HSP27、GRP78的山羊抗鼠多克隆一抗及辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊IgG均系Santa Cruz Biotechnology公司产品; 封闭用血清、DAB显色液、SP即用型试剂盒均由北京中山生物技术有限公司提供. 甲醛、二甲苯、石蜡、伊红、苏木素等均为国产分析纯; 低速高速离心机(Eppendorf)、IPGphor等电聚焦仪、Ettan DALT II垂直电泳槽、Imagescanner扫描仪均为Amersham Biosciences公司产品, Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪为Applied Biosystem公司产品, Elx800自动酶标仪系Bio-Tek Instruments公司产品, PDQuest 7.0凝胶图像分析软件为Bio-Rad公司产品, 采用motic3.0型图像处理分析系统对免疫组化结果进行分析.

1.2 方法

1.2.1 组织标本的处理 将大鼠随机分为正常对照组和模型复发组, 采用改良的Okabe乙酸涂抹法^[7]制作大鼠实验性GU模型. 术后24 h开始正常喂养, 连续90 d后据文献^[8], 采用IL-1 β 复制GU复发大鼠模型, 48 h后颈椎脱臼法处死(处死前禁食24 h)所有大鼠, 经病理组织学指标确定GU及GU复发大鼠模型成立. 于GU复发模型成功后24 h禁食所有大鼠, 48 h后颈椎脱臼法处死所有大鼠, 分别取出溃疡复发模型组大鼠GU处胃组

■ 研究前沿

蛋白质组学作为一门应用大规模蛋白质分离和识别技术研究蛋白质组的学科, 是对基因组所表达的整套蛋白质的分析. 主要分为三个方向: (1)建立蛋白质组或亚蛋白质组及其蛋白质组连锁群; (2)以重要生命过程或重大疾病为对象进行重要生理病理体系或过程的差异蛋白质组学研究; (3)蛋白质组学支撑平台和生物信息学的研究. 其中差异蛋白质组学已成为溃疡研究的最前沿领域.

■创新盘点

利用蛋白质组研究技术,对正常大鼠、胃溃疡复发大鼠胃组织进行对照分析,不仅对胃溃疡复发标志物的筛选鉴定、胃溃疡复发的早期诊断有重要意义,还将促进胃溃疡复发机制的探索,为进一步筛选抗胃溃疡复发的药物提供有效的靶蛋白。

组织和正常组大鼠相应处胃组织,予冰盐水反复清洗干净,以去除血液,并尽可能剪去多余的其他组织,滤纸吸去多余的液体,立即一分为二,一部分予40 g/L多聚甲醛保存,留作石蜡切片,另一部分则立即置液氮中速冻,后移至-80℃低温冰箱保存。

1.2.2 胃组织总蛋白质的提取 将已处理过的标本从-80℃冰箱中取出,称取GU复发组大鼠胃溃疡处组织及正常大鼠相应部位胃组织,置于研磨管,按照1:10比例加入组织裂解液(7 mol/L urea, 2 mol/L硫脲(thiourea), 2 mL/L 乙基苯基聚乙二醇(NP-40), 1 mL/L曲拉通X-100(Triton X-100), 100 mmol/L DTT, 5 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF), 40 g/L CHAPS, 0.5 mmol/L乙二胺四醋酸(EDTA), 40 mmol/L三(羟甲基)氨基甲烷(Tris), 2 g/L pharmalyte, 1 g/L DNase I, 0.25 g/L RNase A)1.0 mL,充分涡旋混匀,置于37℃孵育1 h,取出后再充分涡旋,15000 r/min、4℃离心30 min^[9],吸取上清液即为组织的总蛋白质。蛋白质定量试剂盒2D Quantificatoin Kit(Amersham Biosciences)测定蛋白质浓度,-80℃冻存备用。

1.2.3 二维凝胶电泳 主要按IPGphor等电聚焦系统指南和Gorg *et al*^[10]的方法进行。第一向固相pH梯度等电聚焦凝胶电泳,采用低电压胶内膨胀法。1000 μg总蛋白质与水化液(8 mmol/L urea, 4 g/L CHAPS, 40 mmol/L Tris-HCL, 18 mmol/L DTT, 0.5 mL/L IPG (pH3-10)缓冲液,痕量溴酚蓝)混合至总体积为450 μL。蛋白质样本于IPGphor等电聚焦仪按如下条件:30 V水化16 h后经500 V 1 h、1000 V 1 h、8000 V 8.5 h进行等电聚焦。等电聚焦结束后分别于10 mL平衡A液(50 mol/L Tris-HCL, pH 8.8, 6 mol/L urea, 300 mL/L甘油, 0.2 g/L DTT, 痕量溴酚蓝)和10 mL平衡B液(50 mol/L Tris-HCL, pH 8.8, 6 mol/L urea, 300 mL/L甘油, 3 g/L碘乙酰胺,痕量溴酚蓝)各平衡15 min。平衡后的IPG胶条转移至12.5 g/L的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶上端,在Ettan DALT II垂直电泳槽(Amersham Biosciences)上进行第二向垂直电泳。电泳结束后,参照“Blue Silver”染色方法^[11]对2-D进行考马斯亮蓝染色,二维凝胶电泳分析重复3次。

1.2.4 凝胶图像分析 应用Imagescanner扫描仪扫描染色的2-D胶,PDQuest 2-DE图像分析软件比较分析GU复发大鼠胃组织与正常大鼠胃组织二维电泳图谱的差异,随机选取表达水平相差2倍

以上的12个蛋白质点进行质谱分析。所有数据的统计分析(Student t-test)在SPSS11.5软件上进行,数据以mean±SD表示。

1.2.5 质谱分析 将蛋白质点从凝胶上切割下来后置于1.5 mL Eppendorf管中,经脱色工作液(100 mmol/L Na₂S₂O₃和30 mmol/L K₃Fe(CN)₆以1:1用前混合)脱色,再用水洗数遍直至干燥仪抽干,乙腈脱水直至胶块变为白色,冷冻真空干燥仪抽干,加入TPCK-Trypsin(100 ng/蛋白质点)37℃酶解12 h,然后吸取上清至另一0.5 mL Eppendorf管中,剩下胶块再用萃取液(50 g/L乙腈+2.5 mL/L TFA)萃取2次,合并上清及2次萃取液,冷冻真空干燥仪浓缩样品至5 μL。取0.5 μL样品与等体积饱和的CHCA基质液混合,点样于不锈钢电样板上,空气中干燥,然后用0.1 mL/L的TFA于板上脱盐,制备好的样品在Voyager-DE STR 4307 MALDE-TOF-MS质谱仪上分析,采用反射模式,正离子谱测定,真空度4×10⁻⁷ Torr,离子源加速电压为20 000 V,反射电压比为1.12, N₂激光波长为377 nm,脉冲宽度为3 ns,离子延迟提取100 ns,质谱信号单次扫描累加50次,使用ACTH作为外部标准,胰蛋白酶自切降解峰作为内部标准校正,获得肽质量指纹图谱(PMF)。

1.2.6 数据库查询 获得的PMF图谱用Mascot Distiller软件(Matrixscience)识别单同位素峰,获得的肽段质荷比(m/z)数值输入Mascot软件(Matrixscience, www.matrixscience.com)进行检索。搜索数据库为SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库,其他检索条件为:肽片断质量最大允许误差为100 ppm,允许的漏切胰酶酶切位点数为1个,物种来源为小鼠,离子种类选择[M+H]⁺和单同位素峰(monoisotopic),固定修饰为半胱氨酸乙酰胺化(carbamidomethylation)。

1.2.7 免疫组化方法 10 mL/L的多聚赖氨酸处理玻片,烘干;按SP免疫组化试剂盒要求将石蜡切片常规脱蜡(二甲苯I、二甲苯II分别脱蜡)至水, PBS洗3 min, 3次,加3 mL/L过氧化氢(H₂O₂)处理20 min; PBS洗3 min, 3次, 98℃ 20 min进行抗原修复,室温冷却, PBS洗3 min, 3次,加一抗山羊抗鼠HSP27(1:100)、山羊抗鼠GRP78(1:50), 4℃孵育过夜。PBS洗3 min, 3次,加入生物素化的二抗兔抗山羊(1:200), 37℃ 30 min, PBS洗3 min, 3次,加抗生物素蛋白链菌素辣根过氧化物酶(streptavidin-HRP)(1:200) 37℃ 30 min, PBS洗3 min, 3次。0.04 mL/L DAB+0.03 mL/L H₂O₂溶液显色8-12 min,水洗,苏木素复染1 min,水洗,

表 1 差异蛋白质点应用Mascot 软件在数据库中的搜索结果

编号	Swissprot 登录号	蛋白质名称	分子量	等电点	在胃溃疡复发大鼠 胃组织中的表达	功能 分类
1	P09621	Heat shock protein 27	22865	6.12	↑	Chaperone
2	P06761	GRP78	72428	5.12	↑	Chaperone
3	P35704	Peroxiredoxin2	21955	5.34	↑	Antioxinant
4	Q07936	Annexin A2	33808	7.53	↓	Singal transduction
5	P42123	L-Lactate dehydrogenase B Chain	36481	5.68	↑	Metablism
6	Q63716	Peroxiredoxin 1	22323	8.27	↑	Antioxinant
7	P63039	Heat shock protein 60 GlyceRaldehyde 3-	57868	6.19	↓	Chaperone
8	Q8K4T7	phosphatedehydrogenase (GAPDH)	36098	8.43	↑	Metablism
9	Q9Z0W7	Chloride intracellular channel protein1	28502	5.13	↓	Channel
10	Q68FP1	Gelsolin	86413	5.76	↓	Structural Protein
11	P04443	Hemoglobin beta chain	15952	7.98	↑	blood
12	Q64727	Vinculin	117083	5.77	↓	Structural Protein

■应用要点
通过观察胃溃疡复发大鼠与正常大鼠胃组织蛋白质组整体变化,从整体上寻找潜在的药物靶点,并且通过相关标志物进行胃溃疡复发的早期诊断和治疗,对于抗胃溃疡复发具有重要的意义。

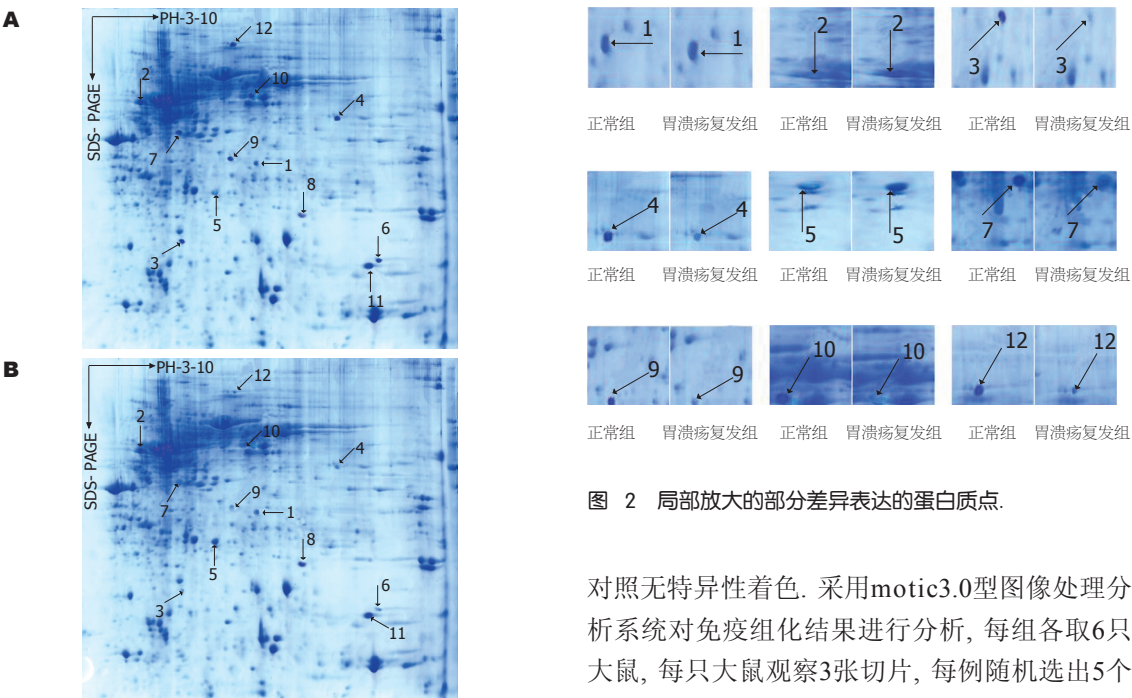


图 1 GU复发大鼠与正常大鼠胃组织典型的二维电泳图谱. A: 正常大鼠胃组织; B: GU复发模型大鼠胃组织.

常规树脂封片,显微镜下观察.

1.2.8 免疫组化结果判断 设阳性对照及同时用PBS代替一抗为空白对照,具体为:已知HSP27和GRP78阳性的GU复发胃组织切片分别作为HSP27和GRP78蛋白免疫组织化学染色的阳性对照,同时予PBS代替一抗为阴性对照.在清晰的背景上出现特异性棕黄色颗粒者为阳性,阴性

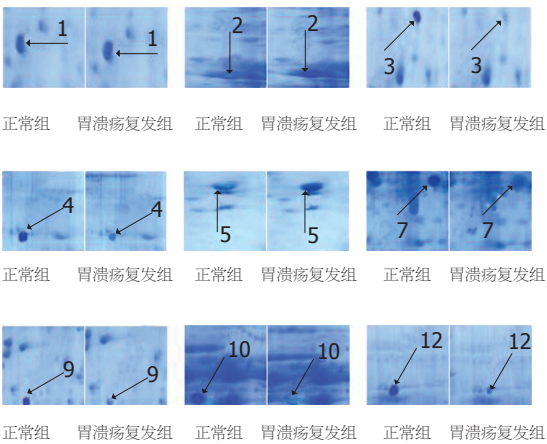


图 2 局部放大的部分差异表达的蛋白质点.

对照无特异性着色.采用motic3.0型图像处理分析系统对免疫组化结果进行分析,每组各取6只大鼠,每只大鼠观察3张切片,每例随机选出5个不重复、不重叠的高倍视野(10×40),计数阳性细胞数及所有细胞数,计算阳性细胞率=阳性细胞总数/视野所有细胞总数×100%.

统计学处理 应用统计软件SPSS11.5进行统计学分析,计量资料以数据均值加减标准差(mean±SD)表示,组间均值的比较采用单因素方差分析,组间均值的比较采用独立样本t检验,检验水准α=0.05.

2 结果

2.1 GU复发组大鼠和正常大鼠胃组织2-DE图谱

■名词解释

差异蛋白质组学研究: 又称功能蛋白质组研究, 以重要生命过程或重大疾病为对象进行重要生理病理体系或过程的比较蛋白质组学研究, 对正常组织及病理组织等进行对照分析, 以进一步探讨疾病的发生机制。

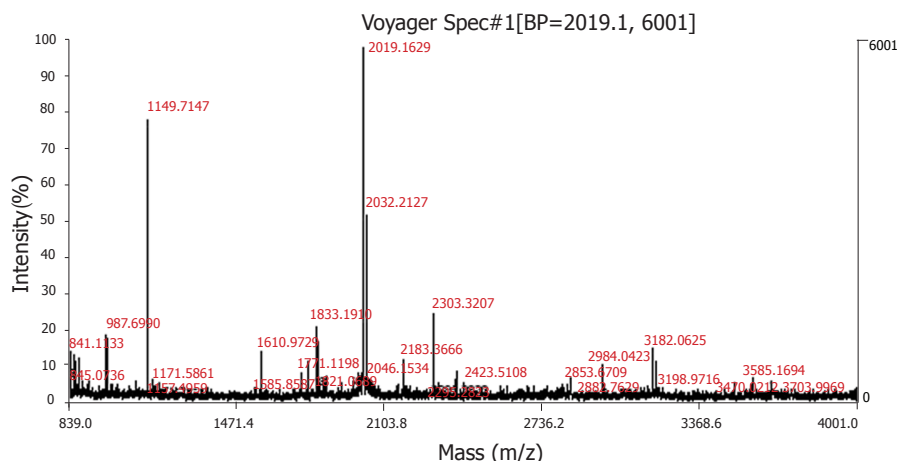


图3 采用MALDI-TOF-MS检测到的1号差异表达蛋白质点的肽质量指纹图(PMF)。

的建立及比较 建立了分辨率较高、重复性较好的胃溃疡复发大鼠胃组织及正常大鼠胃组织蛋白质二维电泳图谱, 应用PDQuest 2DE软件分析GU复发大鼠与正常大鼠胃组织二维电泳图谱, 分别可检测到大约1000个蛋白质点, 质谱鉴定了每组3张2-D胶的平均胶比较(组间比较)后的12个差异表达的蛋白质点。GU复发大鼠与正常大鼠胃组织典型的二维电泳图谱见图1, 图2为局部放大的部分差异表达的蛋白质点。

2.2 差异表达蛋白质点的MALDI-TOF-MS质谱鉴定及数据库查询 从胶中切取12个差异蛋白质点, 胶内酶解后进行MALDI-TOF-MS, 获取肽质量指纹图谱, 数据库搜寻鉴定蛋白质, 1号蛋白质点鉴定结果见图3、图4。该差异蛋白的肽质量指纹图谱经检索SWISSPROT数据库显示为热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)。共有12个差异蛋白质点得到鉴定, 其详细信息见表1。与正常大鼠胃组织比较, 7个蛋白质即HSP27, 葡萄糖调节蛋白(78 kDa glucose-regulated protein), L-乳酸脱氢酶轻链(L-lactate dehydrogenase B chain), 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 血红蛋白β链(hemoglobin beta chain), 过氧化物酶2(peroxiredoxin2), 过氧化物酶1(peroxiredoxin 1)在胃溃疡复发大鼠胃组织中表达上调, 5个蛋白质即膜联蛋白A₂(annexin A₂), 热休克蛋白60(heat shock protein-60, HSP60), 氯离子通道蛋白1(chloride intracellular channel protein 1), 黏着斑蛋白(vinculin), 凝溶胶蛋白(gelsolin)在胃溃疡复发大鼠胃组织中表达下调。基于数据库查询结果, 这些蛋白质按功能大致可以分为5类: 分子伴侣, 细胞信号传导相关蛋白质, 细胞骨架蛋白, 参与物质代谢或能量产生相关生物酶类, 抗

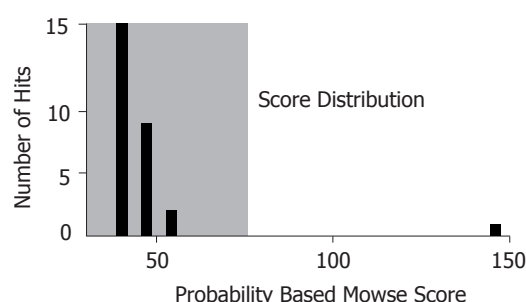


图4 1号差异点肽质量指纹图(PMF)在NCBI数据库中的Mascot检索结果(分值超出阴影区表示有统计学意义)。

氧化蛋白。

2.3 免疫组化检测HSP27, GRP78在GU复发大鼠及正常大鼠胃组织的表达 HSP27, GRP78阳性表达主要位于胞质内, 表现为在清晰的背景上, 胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性, 阴性对照无特异性着色。通过motic3.0型图像处理分析系统对免疫组化结果进行分析, 每组各取6只大鼠, 每只大鼠观察3张切片, 每张切片在400倍光镜下选取5个互不重叠视野, 测量每个视野中所有阳性细胞百分率, 各取均值为一只大鼠的结果, 然后进行统计分析。研究结果表明, GU复发组HSP27和GRP78阳性细胞百分率均显著高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 表2, 图5)。

3 讨论

GU乃至整个消化性溃疡治疗的核心问题是如何提高溃疡愈合质量(QOUH)。Tarnawski *et al*^[12-13]第一次提出溃疡愈合质量(Quality of Ulcer healing, QOUH)的概念, 认为溃疡完全愈合的概念是指修复再生的黏膜上皮组织使之具有完整的黏膜防御能力, 从而使人们对溃疡复发和控制复发的认识发生了变化, 因此溃疡愈

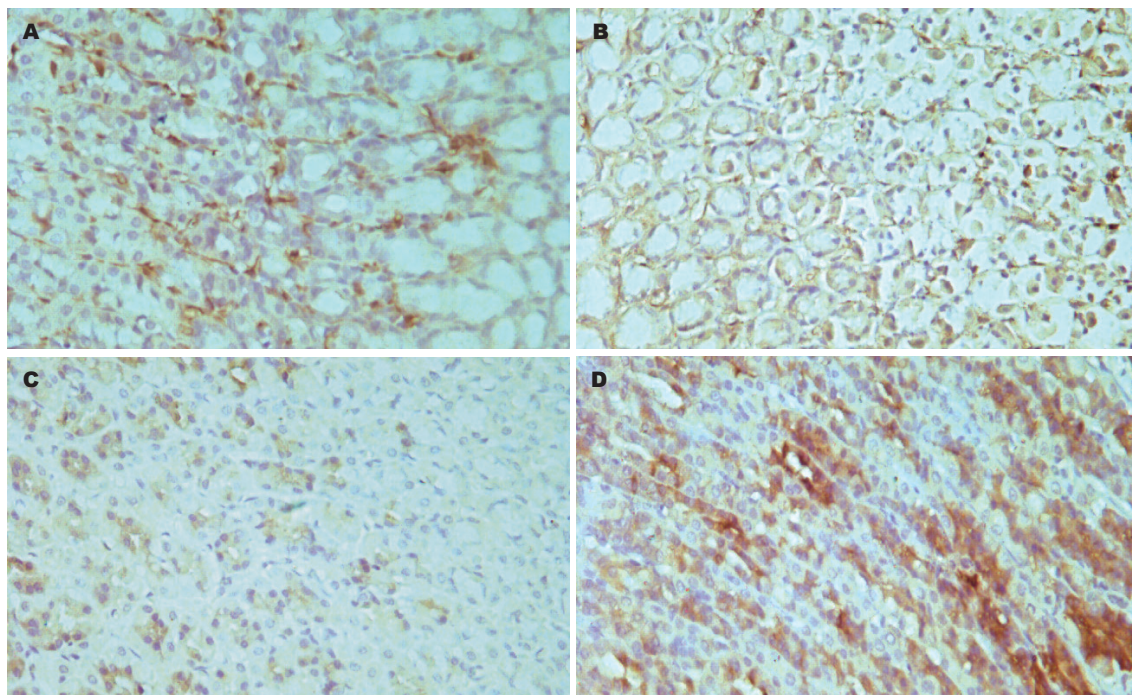


图 5 正常大鼠胃组织及GU复发大鼠胃组织HSP27, GRP78的表达(SP $\times 400$). A: 正常大鼠胃组织HSP27; B: GU复发大鼠胃组织HSP27; C: 正常大鼠胃组织GRP78; D: GU复发大鼠胃组织GRP78.

■同行评价

本文对IL-1 β 致乙酸性胃溃疡复发大鼠的比较蛋白质组学进行了研究, 结果结论可靠, 有理论价值.

合质量理论也逐渐受到重视并被采用. 近年的研究发现, 中药治疗溃疡通过整体调整来实现对局部病理的修复, 最大限度地调动了机体祛邪的能力, 故不仅能有效地调节攻击因子和保护因子之间的失衡, 而且在治愈溃疡的同时, 还能对紊乱的消化功能进行调整而提高其愈合的质量^[14-15]. 临床中我们当以提高QOUH为依据, 筛选出与溃疡复发相关的蛋白质, 进而针对性的开发研制能提高QOUH的药物, 尽可能地防治胃溃疡的复发.

蛋白质组学是后基因组时代的一门新学科, 其目的是从整体角度分析细胞或组织内动态变化的蛋白质组成成分, 了解蛋白质之间的相互作用和相互联系, 揭示蛋白质功能和生命活动规律. 蛋白质组学作为一门应用大规模蛋白质分离和识别技术研究蛋白质组的学科, 是对基因组所表达的整套蛋白质的分析. 其内容包括识别各种蛋白质, 确定他们在细胞内外的定位、修饰、相互反应、活性以及功能, 并对由此获取的数据进行数据库构建, 以及进行相关分析技术的研究^[16]. 蛋白质组学研究涉及蛋白质表达模式研究和功能模式研究, 目前以前者研究较为集中^[17]. 本研究以乙酸性胃溃疡复发大鼠和正常大鼠胃组织为对象, 采用蛋白质组学技术比较两不同组别大鼠胃组织蛋白质表达谱的

表 2 两组大鼠HSP27、GRP78阳性细胞百分率变化(mean \pm SD)($n = 6$)

组别	阳性细胞数百分率(%)	
	HSP27	GRP78
正常对照组	22.10 \pm 3.67	26.30 \pm 3.95
胃溃疡复发组	27.90 \pm 5.34 ^a	43.00 \pm 4.52 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组.

差异, 寻找与胃溃疡复发相关的蛋白质, 这些蛋白质按其功能大致可分为5类: 分子伴侣, 细胞信号传导相关蛋白质, 细胞骨架蛋白, 参与物质代谢或能量产生相关生物酶类, 抗氧化蛋白.

有研究^[18]认为, 应激性溃疡在其发生、发展过程中, 细胞凋亡所起作用不可忽视. 热休克蛋白(HSP)存在于人及动物的胃黏膜, 而胃黏膜是热休克反应的代表场所, 在热应激、水束缚、乙醇等条件下可产生各种HS, 在急性胃黏膜损害过程中起到胃黏膜保护作用, 且健脾益气中药能引起HSP27、HSP70表达增加, 从而促进溃疡的愈合^[19]. 热休克蛋白可提高胃黏膜细胞对应激原的耐受力, 如果热休克蛋白缺乏可降低胃黏膜对攻击因子的防御功能, 易形成溃疡^[20].

HSP27、GRP78均属于热休克蛋白家族成员, 热休克蛋白(HSPs)是一种古老的、进化上高

度保守的蛋白,具有保护细胞、抵御外来损伤的能力,参与细胞信息的传递和基因的调控,被认为对促进溃疡组织修复、提高QOUH有积极意义^[21]。HSP27是HSP家族中小分子量热休克蛋白(sHSP)亚家族中的一员,相对分子质量为27 kDa^[22]。他是热休克基因编码的功能蛋白质,具有可溶性,能阻止应激状态的肌动蛋白和微丝的分裂,有利于细胞骨架的稳定,他不仅对单个细胞产生应激耐受起重要作用,而且通过内皮和上皮的屏障作用,对组成整个有机体起必要的保护作用^[23]。在急性炎症期,HSP27阳性表达增高,可能是由于非磷酸化HSP27a早期提供及时基础保护作用。HSP27细胞中含量,减少刺激HSP27的表达增强,这种表达是在转录水平上调节^[24],可能是由HSP27磷酸化水平决定的。中性粒细胞和活化的巨噬细胞可以释放白细胞介素1(IL-1),肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子,调节免疫,介导炎症反应。同时,炎症因子增强HSP27磷酸化,调节HSP27的表达。GRP78,又名免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),与热休克蛋白70(HSP70)家族具有高度同源性,被认为是HSP70家族的成员之一^[25]。GRP78的功能很多,它作为一种分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运,也是内质网上的一种应激蛋白,在低糖、低氧、低Ca²⁺等应激状态下大量表达以维持内质网的稳定,保护细胞。由于内质网对内外环境的变化极为敏感,GRP78既是内质网上的伴侣蛋白,也是内质网应激的标志物,可促进内质网中未折叠蛋白的正确折叠、修饰,具有保护内质网功能的作用。最近研究显示,组织器官在缺血、缺氧情况下,大量分泌型蛋白多肽在内质网内由于折叠错误而分泌障碍,导致GRP78大量表达^[26]。免疫组化结果表明,HSP27和GRP78在GU复发大鼠胃组织中的表达均明显高于正常组大鼠,这同2-DE及质谱结果基本上是一致的。说明热休克蛋白在正常细胞中也能以低水平持续表达,应激后会明显增加,对维持和恢复细胞正常生理功能有重要的作用。与文献^[27-28]对于HSP家族介导了胃黏膜的细胞保护机制的论述具有一致性。我们分析,胃组织中热休克蛋白表达增加的可能机制:当胃黏膜细胞受到内源性刺激因素(如缺氧、酸碱度改变等)时,细胞内蛋白质构型发生改变,产生变性聚集的蛋白,激发细胞的应激反应,激活热休克基因,编码热休克蛋白。诱导合成的热休

克蛋白又能促进细胞内蛋白质的合成、折叠、装配、转位,并促使细胞从应激中恢复,从而减少了黏膜细胞的损伤,保护细胞膜。同时,我们亦推测,HSP表达增高可引起环氧合酶-1和氧化合成酶的表达上调,而氧化合酶-1又使具有保护胃黏膜作用的前列腺素E2产生增加,而氧化合成酶的催化产物一氧化氮可增加胃黏膜的血流量,也是一种对胃黏膜具有保护作用的物质。据报道,HSP还可以抑制胃黏膜细胞的凋亡以及多种因素引起的细胞损伤等,对于低浓度与高浓度的乙醇引起的凋亡,HSP同样具有抑制作用^[29-30]。

此外,本研究所识别的与GU复发相关的蛋白质还有抗氧化蛋白如过氧化物酶1(peroxiredoxin 1, PDX1)、过氧化物酶2(peroxiredoxin 2, PDX2);信号转导蛋白如annexin A;代谢相关蛋白如L-乳酸脱氢酶轻链、GAPDH,以及细胞结构相关蛋白等,这些蛋白质与GU复发的关系有待进一步的研究。

总之,在本研究中,我们建立了GU复发大鼠与正常大鼠胃组织的二维电泳图谱,识别并鉴定了两种不同组别胃组织之间的12个差异蛋白质,并应用免疫组化验证了部分差异蛋白质的表达水平,说明新兴的蛋白质组学技术与免疫组化等经典的生物学技术相结合,有利于寻找胃溃疡复发过程中的相关蛋白质。同时,本文的结果有助于理解胃溃疡复发这一病变进展的生物学行为,并为最终防治胃溃疡复发提供新的思路和线索。

致谢: 本课题承中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室的技术支持、指导和帮助,在此表示衷心的感谢!

4 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1866-1867
- 2 凌江红, 李家邦, 申定珠, 周兵. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡复发大鼠胃组织核因子- κ B mRNA及其蛋白表达的影响. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 228-231
- 3 熊国良, 李家邦, 陈文红, 喻长远. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡大鼠胃黏膜Bcl-2、Bax表达的调节. 中国中医基础医学杂志 2003; 9: 38-40
- 4 凌江红, 李家邦. NF- κ B与幽门螺旋杆菌相关性胃炎和消化性溃疡. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1864-1866
- 5 凌江红, 陈业强, 李家邦, 潘宇政, 曹阳, 申定珠. 健胃愈疡颗粒对愈合和复发胃溃疡大鼠胃黏膜炎症反应及NF- κ B表达的影响. 中药杂志 2006; 31: 1454-1457
- 6 Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720-1730
- 7 李家邦, 田永立, 陈文红, 熊国良. 中药健胃愈疡颗粒剂治疗大鼠实验性胃溃疡. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1282-1287
- 8 Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K. Role of neutrophils in a rat model of

- gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 beta. *Am J Pathol* 1997; 150: 971-979
- 9 Araki N, Morimasa T, Sakai T, Tokuoh H, Yunoue S, Kamo M, Miyazaki K, Abe K, Saya H, Tsugita A. Comparative analysis of brain proteins from p53-deficient mice by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2000; 21: 1880-1889
- 10 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21: 1037-1053
- 11 Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333
- 12 Tarnawski A, Stachura J, Krause WJ, Douglass TG, Gergely H. Quality of gastric ulcer healing: a new, emerging concept. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13 Suppl 1: S42-S47
- 13 Tarnawski A, Douglass TG, Stachura J, Krause WJ. Quality of gastric ulcer healing: histological and ultrastructural assessment. *Aliment Pharmacol Ther* 1991; 5 Suppl 1: 79-90
- 14 梅武轩, 邓兰琼, 崔世高. 柴胡桂枝汤对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响. *中国中西医结合脾胃杂志* 2000; 8: 278
- 15 张永峰, 赵燕平, 刘立昌, 贾秀琴, 朱炎. 健胃汤抗大鼠乙酸胃溃疡及泼尼松再损伤的实验研究. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 15: 86-88
- 16 李占霞, 张国峰. 大肠癌发展与肝转移的差异蛋白质组研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 508-512
- 17 翁永强, 邱双检, 刘银坤, 汤钊猷. 肿瘤标志物的蛋白质组学. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1188-1190
- 18 牛廷献, 史智勇, 姜进军. 凋亡相关基因bcl-2和Bax在大鼠应激性溃疡中的表达及作用. *中国实验动物学报* 2005; 13: 170-172
- 19 李国成, 陶秀良, 罗树星. 健脾益气中药对乙酸慢性胃溃疡大鼠热休克蛋白表达的影响. *中国中西医结合脾胃杂志* 1999; 7: 133-136
- 20 向廷秀, 王丕龙. 热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 628-631
- 21 任宏宇. 热休克蛋白与胃黏膜病变. *国外医学. 消化系统疾病分册* 1997; 17: 69
- 22 Morino M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, Shirakami T, Yoshimura M, Kiyosuke Y, Matsunaga K, Yoshikumi C, Saijo N. Specific expression of HSP27 in human tumor cell lines *in vitro*. *In Vivo* 1997; 11: 179-184
- 23 Hahm KB, Park IS, Kim YS, Kim JH, Cho SW, Lee SI, Youn JK. Role of rebamipide on induction of heat-shock proteins and protection against reactive oxygen metabolite-mediated cell damage in cultured gastric mucosal cells. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 711-716
- 24 Mehlen P, Coronas V, Ljubic-Thibal V, Ducasse C, Granger L, Jourdan F, Arrigo AP. Small stress protein Hsp27 accumulation during dopamine-mediated differentiation of rat olfactory neurons counteracts apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 227-233
- 25 Ortiz C, Cardemil L. Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Bot* 2001; 52: 1711-1719
- 26 Kuznetsov G, Bush KT, Zhang PL, Nigam SK. Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8584-8589
- 27 Nakamura K, Rokutan K, Marui N, Aoike A, Kawai K. Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1991; 101: 161-166
- 28 Teramae N, Azuma T, Habu Y, Kodama T, Kashima K, Aoike A, Kawai K. Expression of heat shock protein in human gastric mucosa. *Gastroenterol Jpn* 1991; 26: 683
- 29 Mizushima T, Tsutsumi S, Rokutan K, Tsuchiya T. Suppression of ethanol-induced apoptotic DNA fragmentation by geranylgeranylacetone in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 510-514
- 30 李洪, 刘桥义, 杨天德. 热休克蛋白的抗凋亡作用. *国外医学. 临床生物化学与检验学分册* 2002; 21: 118-119

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志被认定为印刷工业市级优质产品

本刊讯 2007-01-12经北京市印刷工业产品质量监督检查站严格审核, 世界华人消化杂志被认定为印刷工业“市级优质产品”。本杂志由世界胃肠病学杂志社出版, 北京科信印刷厂负责印刷, 在此表示衷心感谢。

白藜芦醇对胃癌细胞SGC7901增殖与凋亡的影响

王学清, 王贺玲, 李岩, 田丰, 王颖

■背景资料

白藜芦醇的抗肿瘤机制比较复杂,可能是几种机制共同作用的结果,也可能还有其他未知途径,发挥作用的时间、浓度也因不同细胞类型而不同,这可能与不同类型细胞的信号传递方式、细胞周期的分布差异有关。但迄今为止,其诱导肿瘤细胞凋亡分子水平的具体机制,尚存在一定的争议,甚至得出了一些看似矛盾的结论。尽管近年来,对白藜芦醇抗肿瘤的机制进行了一定的研究,但白藜芦醇对胃癌的作用报道较少,尤其是白藜芦醇对胃癌增殖的影响及其分子机制。

王学清, 李岩, 田丰, 王颖, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

王贺玲, 沈阳市第一人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110044

王学清, 2004年中国医科大学博士在读, 副主任医师, 主要从事胃癌诊治的研究。

通讯作者: 李岩, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科. yanli0227@126.com

电话: 024-83956416

收稿日期: 2006-11-03 接受日期: 2006-11-28

Effect of resveratrol on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC7901

Xue-Qing Wang, He-Ling Wang, Yan Li, Feng Tian, Ying Wang

Xue-Qing Wang, Yan Li, Feng Tian, Ying Wang, Department of Digestive Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

He-Ling Wang, Department of Digestive Diseases, the First People's Hospital of Shenyang City, Shenyang 110044, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yan Li, Department of Digestive Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yanli0227@126.com

Received: 2006-11-03 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of resveratrol on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC7901.

METHODS: Gastric cancer cell line SGC7901 was cultured and treated with different concentrations (0, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$) of resveratrol for 24, 48 and 72 hours. The growth inhibition rate of SGC7901 cells was detected by MTT method, and cell apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM) using annexin V/propidium iodide (PI) double staining. The morphological changes of SGC7901 cells were observed by electron microscopy, and caspase-3 activity was assessed by colorimetric assay.

RESULTS: Resveratrol inhibited the proliferation of SGC7901 cells in a time- and concen-

tration-dependent manner ranging from 20 to 300 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). After resveratrol treatment at 0, 10, 20, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours, the apoptosis rate of SGC7901 cells was 1.17%, 3.73%, 8.75%, 23.35%, 63.97% and 70.10%, while the necrosis rate was 5.66%, 7.22%, 9.86%, 6.91%, 12.51% and 11.98%, respectively. Electron microscopy showed typical morphological changes in SGC7901 cells. After 100 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol treatment for 6 hours, the activity of caspase-3 was increased, and reached the peak at the 18th hour, then declined gradually. Caspase-3 activity was still higher at the 48th hour than the normal level (0.135 ± 0.036 vs 0.069 ± 0.008 , $P < 0.05$). After SGC7901 cells were treated with 20, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol for 18 hours, the activity of caspase-3 was 2.68, 3.92 and 5.61 folds as high as that in control group (0.169 ± 0.017 , 0.247 ± 0.028 , 0.353 ± 0.044 vs 0.063 ± 0.006 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: Resveratrol can inhibit the proliferation and induce apoptosis of SGC7901 cells in concentration- and time- dependent manners by increasing caspase-3 activity.

Key Words: Resveratrol; Gastric cancer; Proliferation; Apoptosis; Caspase-3

Wang XQ, Wang HL, Li Y, Tian F, Wang Y. Effect of resveratrol on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):340-345

摘要

目的: 探讨白藜芦醇(Res)对胃癌细胞SGC7901增殖与凋亡的影响。

方法: MTT法检测不同浓度(0, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)Res处理24, 48, 72 h对SGC7901细胞的抑制率。流式细胞仪采用Annexin V和PI双染检测细胞的早期凋亡率。电镜扫描观察SGC7901细胞形态学改变, 分光光度法检测caspase-3活性。

结果: Res在20-300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 以浓度和剂量依赖的方式抑制胃癌细胞的增殖。

($P<0.01$). 经0, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res处理24 h后, 细胞凋亡率分别为1.17%, 3.73%, 8.75%, 23.35%, 63.97%和70.10%, 晚期凋亡和坏死的细胞比例分别为5.66%, 7.22%, 9.86%, 6.91%, 12.51%及11.98%, 各组之间差异不大. 电镜下见到典型的细胞凋亡的形态学改变. 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理后6 h caspase-3活性增加, 18 h达高峰, 24 h后下降, 48 h仍高于正常(0.135 ± 0.036 vs 0.069 ± 0.008 , $P<0.05$). 经20, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理18 h后的细胞的caspase-3活性分别为 0.169 ± 0.017 , 0.247 ± 0.028 , 0.353 ± 0.044 ($P<0.01$), 较对照组(0.063 ± 0.006)分别增加2.68倍、3.92倍和5.61倍.

结论: Res通过诱导caspase-3活性增加以时间依赖和浓度依赖的方式抑制SGC7901细胞增殖, 诱导细胞凋亡.

关键词: 白藜芦醇; 胃癌; 增值; 凋亡; caspase-3

王学清, 王贺玲, 李岩, 田丰, 王颖. 白藜芦醇对胃癌细胞SGC7901增殖与凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(4):340-345

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/340.asp>

0 引言

白藜芦醇(resveratrol, Res)是广泛存在于葡萄、花生和虎杖等多种药用植物中的一种多酚类化合物. 最近的研究表明, Res具有广泛的预防和抗肿瘤作用, 他对白血病、甲状腺癌、乳腺癌、肝癌等多种肿瘤细胞均具有明显的抑制作用^[1-10]. 但目前, 国际上对Res在胃癌的研究还远未深入. 本实验研究Res对胃癌细胞SGC7901增殖与凋亡及其对caspase-3活性的影响, 旨在探讨Res对胃癌潜在的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC7901购于中国医科大学细胞生物教研室. Res购自Sigma公司, 纯度99%, 用DMSO溶解配成100 mmol/L的原溶液, -20°C 避光保存备用. 实验前以RPMI1640培养液稀释成不同浓度, DMSO终浓度 <5 mL/L. Annexin V荧光试剂盒购自晶美生物技术有限公司. 四甲基偶氮唑蓝(MTT)临用前用PBS(pH 7.4)配成5 g/L溶液. caspase-3活性分光光度计检测试剂盒购于南京凯基生物公司.

1.2 方法 人胃癌细胞株SGC7901接种于无菌培养瓶中, 加入含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基(含有青霉素100 U/mL和链霉素100 U

/mL), 在 37°C 、50 mL/L CO_2 及饱和湿度培养箱中培养.

1.2.1 MTT法检测不同浓度Res对SGC7901细胞的生长抑制作用 取处于对数生长期的SGC7901细胞调整细胞密度为 $4\sim 5\times 10^7/\text{L}$, 接种于96孔板, 细胞贴壁后, 实验组加入不同浓度的Res, 使其终浓度分别为5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$, 对照组则加等量不含药物的培养液, 另设二甲亚砜对照组加入含3 g/L的二甲亚砜的培养液, 空白对照孔加入200 μL 培养基作本底, 对照调零. 每个剂量3个平行孔. 于24, 48, 72 h, 各取一块96孔培养板中, 每孔加入新鲜配制的浓度为5 g/L的MTT 20 μL . 继续培养3 h后取出培养皿, 小心吸弃培养基, 每孔加DMSO 150 μL , 轻轻震荡10 min后, 用酶联仪于490 nm处测出各孔吸光度值(A值), 按下式计算细胞抑制率: 细胞抑制率(%) = $(1 - \text{给药孔平均A值} / \text{对照孔平均A值}) \times 100\%$. 实验重复3次.

1.2.2 流式细胞仪(FCM) Annexin V 荧光染色检测细胞凋亡 以0, 10, 20, 50, 100和200 $\mu\text{mol/L}$ Res处理24 h的细胞, 分别消化收集各组细胞, 调整细胞浓度至 $1\times 10^{10}/\text{L}$ 各取100 μL ; PBS洗涤两次后, 弃上清液; 加入预冷的结合缓冲液100 μL 重悬细胞, 置冰浴; 加入5 μL Annexin V/FITC和10 μL PI于细胞悬液中, 轻轻混匀; 将试管置于室温避光染色15 min; 补加400 μL 结合缓冲液混悬细胞, 流式细胞仪进行检测, 分析细胞凋亡的百分比.

1.2.3 电镜观察 将100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理24 h的细胞用25 g/L戊二醛固定2 h, 10 g/L锇酸固定1.5 h, 逐级酒精脱水, 氧化丙烯浸透, 树脂包埋, 超薄切片机制片, 于透射电子显微镜下观察. 按常规电镜要求制备标本, 600-800 nm的超薄切片收集于带膜的铜网上, 经铀、铅电子染色后观察.

1.2.4 caspase-3活性检测 分别收集0, 20, 50和100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理12 h以及100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理6, 12, 18, 24和48 h的细胞 2×10^6 个, PBS洗细胞2次, 加入50 μL 预冷的细胞裂解液, 冰上孵育20 min, 4°C , 10 000 r/min离心1 min, 回收上清, 测定蛋白浓度, 吸取蛋白裂解上清, 加入50 μL 的 $2\times$ 反应缓冲液、5 μL caspase-3底物DEVD-pNA 5 μL , 37°C 孵育30 min, 分光光度计405 nm波长测定吸光度值, 以此表示caspase-3的相对活性.

统计学处理 本实验所有数据用 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 采用 t 检验进行差异性分析.

■创新盘点

本文用不同浓度的Res处理SGC7901细胞, 细胞内caspase-3活性随着作用时间的延长显著增加, 且有浓度依赖性, 表明在Res诱导胃癌SGC7901凋亡的过程中有caspase-3的活化, 为白藜芦醇的开发和临床应用提供科学的理论依据.

■同行评价

本文探讨白藜芦醇(Res)对胃癌细胞SGC7901增殖与凋亡的影响,有一定创新性,且实验设计尚合理,结果可靠,有一定说服力。

表 1 Res对胃癌SGC7901的生长抑制率(mean \pm SD, %)

分组	24 h	48 h	72 h
对照组	0 \pm 8.36	0 \pm 7.12	0 \pm 6.88
DMSO	1.46 \pm 5.17	-1.94 \pm 6.87	0.95 \pm 10.02
5	3.11 \pm 11.69	4.70 \pm 9.85	1.30 \pm 9.62
10	5.49 \pm 8.35	4.21 \pm 8.50	3.85 \pm 4.99
20	11.09 \pm 7.35	19.87 \pm 6.83 ^b	25.20 \pm 7.64 ^b
50	22.06 \pm 7.21 ^b	27.98 \pm 7.55 ^b	33.94 \pm 6.44 ^b
100	28.99 \pm 11.04 ^b	36.22 \pm 7.19 ^b	42.48 \pm 9.84 ^b
200	42.33 \pm 10.03 ^b	49.99 \pm 12.43 ^b	57.34 \pm 8.64 ^b
300	58.60 \pm 8.12 ^b	66.233 \pm 12.75 ^b	70.22 \pm 9.10 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

2 结果

2.1 Res对胃癌SGC7901细胞的生长抑制作用
Res在10 μ mol/L以下对胃癌细胞生长无显著影响,在20-300 μ mol/L浓度范围内,作用24 h后,对胃癌细胞的增殖有显著的抑制作用($P < 0.01$),并且随着浓度的增加,对细胞的抑制率也逐渐增加。同一浓度Res的对胃癌细胞的抑制作用随着时间的延长也逐渐增强(表1)。

2.2 FCM分析Res诱导SGC7901凋亡的作用
FCM分析检测细胞为4亚群,正常细胞胞膜完整,磷脂酰丝氨酸基团(PS)无外化,Annexin V/FITC不能与之结合,PI不能进入胞内,为AV-/PI-亚群;早期凋亡细胞胞膜完整,但PS外化,为AV+/PI-亚群;晚期凋亡和坏死细胞,为AV+/PI+亚群;还有部分收集过程中出现损伤的损伤细胞(AV-/PI+)。

经10, 20, 50, 100, 200 μ mol/L Res处理24 h后和对照组的细胞,凋亡率分别为3.73%, 8.75%, 23.35%, 63.97%, 70.10%和1.17%,提示Res作用后的SGC7901细胞产生明显凋亡,并有浓度依赖性。经10, 20, 50, 100, 200 μ mol/L Res处理24 h后和对照组的细胞,晚期凋亡和坏死的细胞比例分别为7.22%, 9.86%, 6.91%, 12.51%, 11.98%及5.66%,各组之间变化不大(图1-2)。

2.3 电镜观察 100 μ mol/L Res处理后的细胞可见到典型的细胞凋亡性改变,细胞核缩小,染色质凝集,细胞表面形成许多球形突起(起泡),突起内见被包裹的胞质与细胞器、核的碎片或整个浓缩的细胞核,部分突起与细胞脱离,形成凋亡小体(apoptotic bodies)(图3)。

2.4 Res对胃癌SGC7901细胞caspase-3活性的影响 100 μ mol/L Res处理不同时间后的caspase-3

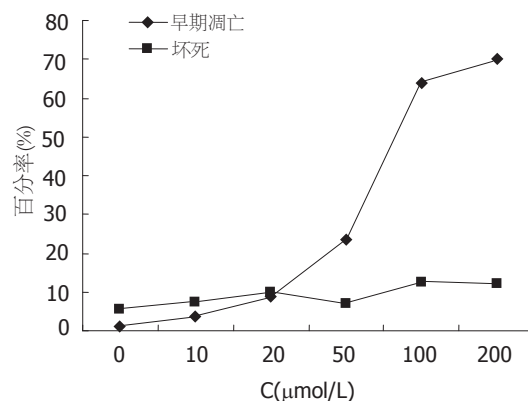


图 1 白藜芦醇对SGC7901诱导凋亡的作用。

活性变化见表2, Res处理后6 h caspase-3活性增加, 18 h达高峰, 24 h后下降, 48 h仍高于正常。经20, 50, 100 μ mol/L Res处理18 h后的细胞的caspase-3活性分别为0.169 \pm 0.017, 0.247 \pm 0.028, 0.353 \pm 0.044($P < 0.01$), 较对照组(0.063 \pm 0.006)分别增加2.68倍、3.92倍和5.61倍。

3 讨论

Res的化学名为3, 4', 5-三羟基反均二苯代乙烯, 分子式C₁₄H₁₂O₃, 分子质量228.25, 属于非黄酮类多酚化合物, 广泛存在于种子植物中, 并以新鲜葡萄皮中含量最高, 在我国, 则以中药植物虎杖中含量最为丰富。Res对植物本身起保护作用, 是植物在不利条件下, 如紫外线照射、真菌感染、以及机械性损伤所产生的“植物补体”。随着研究的深入, 人们发现Res对人类具有抗肿瘤特性和抗氧化性、抗突变作用, 可显著抑制多种人类肿瘤细胞的生长、诱导肿瘤细胞凋亡^[3-13]。Chow *et al*^[14]研究发现, 白藜芦醇以剂量

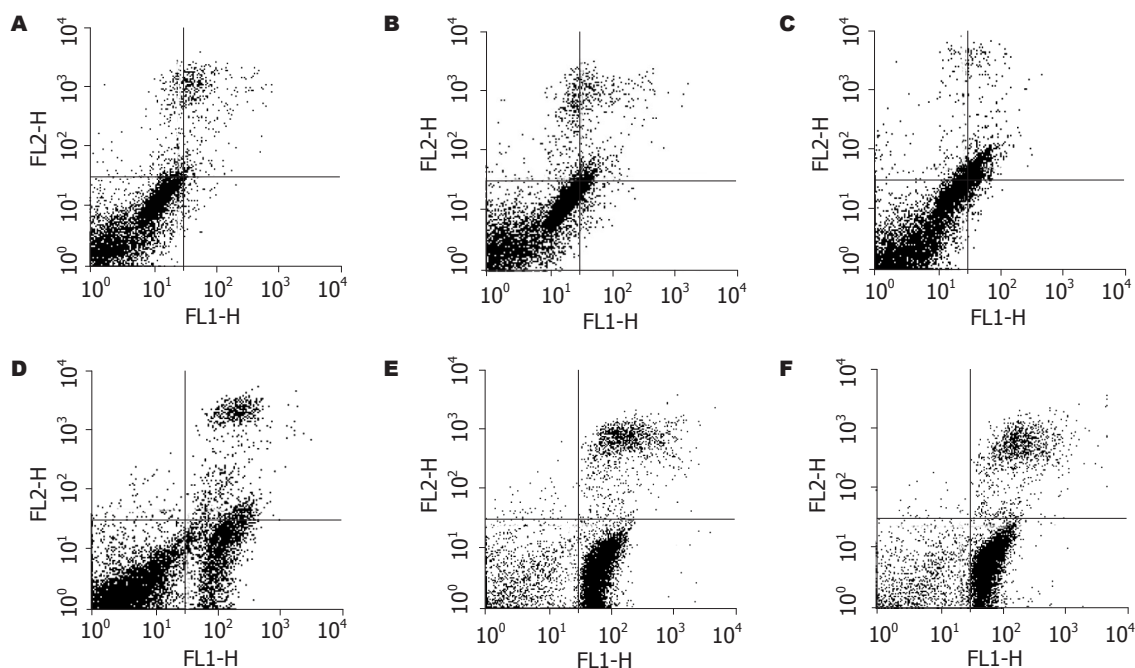


图 2 FCM分析Res诱导SGC7901凋亡的作用. A: 0; B: 10 $\mu\text{mol/L}$; C: 20 $\mu\text{mol/L}$; D: 50 $\mu\text{mol/L}$; E: 100 $\mu\text{mol/L}$; F: 200 $\mu\text{mol/L}$.

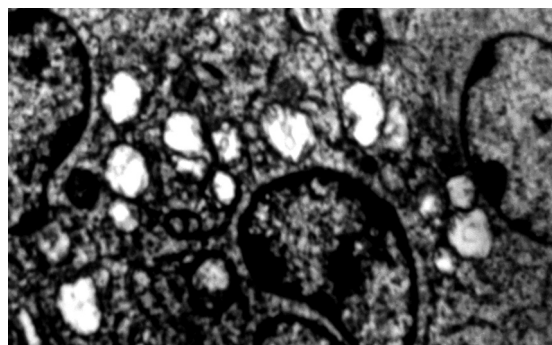


图 3 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理后细胞的凋亡性改变.

表 2 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理不同时间后的caspase-3活性变化

时间	对照组	Res组
6 h	0.066 \pm 0.007	0.118 \pm 0.011 ^b
12 h	0.058 \pm 0.007	0.318 \pm 0.024 ^b
18 h	0.063 \pm 0.006	0.353 \pm 0.044 ^b
24 h	0.073 \pm 0.011	0.245 \pm 0.006 ^b
48 h	0.069 \pm 0.008	0.135 \pm 0.036 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

依赖的方式抑制横纹肌肉瘤细胞RD细胞增殖, 并诱导细胞周期S/G₂期捕获. 白藜芦醇能通过抑制CDK7蛋白激酶的活力、细胞分化、细胞周期的G₂期抑制结肠癌细胞HT129, SW480的增殖^[15], 可通过NF- κ B和钙蛋白酶活性引起的磷酸肌醇3-激酶(PI3K)途经信号抑制, 下调Bcl-2诱导MCF-7人乳腺癌细胞凋亡^[16], 以剂量依赖的方式抑制前列腺癌DU145细胞生长诱导凋亡^[17].

本研究通过MTT法研究表明, 在20-300 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, Res对SGC7901细胞的增殖有抑制作用, 并且表现出时间依赖性和浓度依赖性. Annexin V是Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白家族中的一员, Annexin V与磷脂酰丝氨酸基团(PS)有高特异性结合, PS从细胞膜的脂双层内层迁移至外层是细胞凋亡级联反应的初始事

件, 利用Annexin V高度亲和PS可早期检测凋亡的发生. 本研究中, Annexin V和PI双染提示20-200 $\mu\text{mol/L}$ 处理胃癌细胞24 h后, 凋亡细胞数明显增多, 并且有浓度依赖性, 而坏死的细胞数变化不如凋亡率显著, 说明在该浓度范围内诱导胃癌细胞凋亡效应要强于引起细胞坏死的作用, 进一步证实诱导细胞凋亡是杀伤胃癌细胞的作用机制之一. 我们经过电镜检测发现Res处理后的细胞形态不完整, 细胞核固缩、裂解成细胞膜包绕的碎片, 且有凋亡小体出现, 表现出典型的凋亡的形态改变.

细胞凋亡可由死亡受体途径和线粒体细胞色素C途径所介导. 死亡受体通过与“死亡配体”特异性结合后将凋亡信号由胞外传入胞内, 在连接分子的媒介下, 引起上游procaspase-8的激活, 导致procaspase-9激活, 最终导致caspase-3,

caspase-7激活,进而裂解DNA损伤细胞,引起细胞凋亡.细胞凋亡还可通过细胞色素C途径.细胞色素C从线粒体内释放是关键的一步.在细胞凋亡信号的刺激下,线粒体功能障碍,膜通透性改变,凋亡蛋白包括细胞色素C, Apaf1(apoptotic protease activating factor1)等从线粒体释放到胞质中,胞质内的细胞色素C在dATP存在下,与信号接头分子Apaf1结合,募集并激活caspase-9,继而活化caspase-3,启动caspase的级联反应,引起细胞凋亡.作为凋亡过程中的效应分子,caspase-3既是线粒体途径又是死亡受体途径两条信号途径的共同通道,二者一旦启动,必然引起的caspase-3级联反应并使其活化,引起细胞凋亡.因此,caspase-3的表达增加标志着细胞内的凋亡机制已经启动.

Res是一种生物活性成分,近年来发现其诱导一些肿瘤细胞凋亡中都有caspase-3的参与^[17-26].Cao *et al*^[27]发现白藜芦醇引起急性白血细胞凋亡需要caspase-3激活.用Res处理脑胶质瘤U251细胞有caspase-3的活化,而且Res诱导的DNA断裂能完全被一般的caspase抑制剂(Z-VAD-FMK)或选择性caspase-3抑制剂(Z-DEVD-FMK)阻断^[28].那么Res诱导胃癌SGC7901细胞凋亡的过程中是否有caspase-3的活化呢?本文用不同浓度的Res处理SGC7901细胞,细胞内caspase-3活性随着作用时间的延长显著增加,且有浓度依赖性,表明在Res诱导胃癌SGC7901凋亡的过程中有caspase-3的活化.

细胞凋亡是细胞自身调节的一个程序性死亡过程,他不引起炎症反应,机体亦不会因此而引发不良现象.因此细胞凋亡是肿瘤治疗研究中的一个重要环节.白藜芦醇不仅能抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡,而且能增强放射诱导的白血病细胞株EOL-1凋亡^[29].在特定的肿瘤中白藜芦醇是一种潜在的TRAIL敏感剂,通过G₁细胞周期捕获和survivin减少增强TRAIL诱导的凋亡^[30].在白血病的联合化疗中,白藜芦醇与细胞毒化疗药物协同发挥作用,抑制生长、诱导凋亡^[31-32].本实验证明Res能抑制胃癌细胞SGC7901生长,诱导caspase-3激活引起细胞凋亡,表明他对治疗胃癌有着很好的应用前景.虽然Res对治疗胃癌的前景较好,但是毒性实验、动物实验、体内临床实验都还需要验证,对于Res抑制胃癌细胞生长并诱导凋亡的具体机制的研究也是很必要的.

4 参考文献

- 1 Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Siriwardana S, Sclafani RA, Agarwal R. Resveratrol causes Cdc2-tyr15 phosphorylation via ATM/ATR-Chk1/2-Cdc25C pathway as a central mechanism for S phase arrest in human ovarian carcinoma Ovar-3 cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1978-1987
- 2 Chen Y, Tseng SH, Lai HS, Chen WJ. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery* 2004; 136: 57-66
- 3 Marier JF, Chen K, Prince P, Scott G, del Castillo JR, Vachon P. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res* 2005; 69: 151-154
- 4 Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004; 24: 2783-2840
- 5 Ulrich S, Wolter F, Stein JM. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 452-461
- 6 Aziz MH, Reagan-Shaw S, Wu J, Longley BJ, Ahmad N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J* 2005; 19: 1193-1195
- 7 Le Corre L, Chalabi N, Delort L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 462-471
- 8 Pervaiz S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 333-344
- 9 Levi F, Pasche C, Lucchini F, Ghidoni R, Ferraroni M, La Vecchia C. Resveratrol and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14: 139-142
- 10 Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaisse JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* 2005; 65: 9943-9952
- 11 Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 408-411
- 12 Liu HS, Pan CE, Yang W, Liu XM. Antitumor and immunomodulatory activity of resveratrol on experimentally implanted tumor of H22 in Balb/c mice. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1474-1476
- 13 Yu L, Sun ZJ, Wu SL, Pan CE. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2341-2343
- 14 Chow AW, Murillo G, Yu C, van Breemen RB, Boddie AW, Pezzuto JM, Das Gupta TK, Mehta RG. Resveratrol inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14: 351-356
- 15 Liang YC, Tsai SH, Chen L, Lin-Shiau SY, Lin JK. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1053-1060
- 16 Pozo-Guisado E, Merino JM, Mulero-Navarro S, Lorenzo-Benayas MJ, Centeno F, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM. Resveratrol-

- induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int J Cancer* 2005; 115: 74-84
- 17 Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food* 2003; 6: 273-280
- 18 Tedesco I, Nappo A, Petitto F, Iacomino G, Nazzaro F, Palumbo R, Russo GL. Antioxidant and cytotoxic properties of lyophilized beer extracts on HL-60 cell line. *Nutr Cancer* 2005; 52: 74-83
- 19 Chan WH. Effect of resveratrol on high glucose-induced stress in human leukemia K562 cells. *J Cell Biochem* 2005; 94: 1267-1279
- 20 Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 2005; 218: 141-151
- 21 Quiney C, Dauzonne D, Kern C, Fourneron JD, Izard JC, Mohammad RM, Kolb JP, Billard C. Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leuk Res* 2004; 28: 851-861
- 22 Jeong WS, Kim IW, Hu R, Kong AN. Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. *Pharm Res* 2004; 21: 661-670
- 23 Cardile V, Scifo C, Russo A, Falsaperla M, Morgia G, Motta M, Renis M, Imbriani E, Silvestre G. Involvement of HSP70 in resveratrol-induced apoptosis of human prostate cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 4921-4926
- 24 Wang Q, Li H, Wang XW, Wu DC, Chen XY, Liu J. Resveratrol promotes differentiation and induces Fas-independent apoptosis of human medulloblastoma cells. *Neurosci Lett* 2003; 351: 83-86
- 25 Kim YA, Lee WH, Choi TH, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF-kappaB in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Oncol* 2003; 23: 1143-1149
- 26 Ito T, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Matsumoto K, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1489-1497
- 27 Cao Y, Wang F, Liu HY, Fu ZD, Han R. Resveratrol induces apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia (NB4) cells. *J Asian Nat Prod Res* 2005; 7: 633-641
- 28 Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AI, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 554-561
- 29 Baatout S, Derradji H, Jacquet P, Mergeay M. Increased radiation sensitivity of an eosinophilic cell line following treatment with epigallocatechin-gallate, resveratrol and curcuma. *Int J Mol Med* 2005; 15: 337-352
- 30 Fulda S, Debatin KM. Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. *Eur J Cancer* 2005; 41: 786-798
- 31 Horvath Z, Saiko P, Illmer C, Madlener S, Hoechtl T, Bauer W, Erker T, Jaeger W, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 329-335
- 33 Wu SL, Sun ZJ, Yu L, Meng KW, Qin XL, Pan CE. Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3048-3052

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(世界胃肠病学杂志社2007-02-08)

L02细胞在倒千里光碱处理大鼠肝中的增殖

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 蒋黎

■背景资料

移植细胞在人鼠嵌合肝内的增殖是其存活及发挥功能的关键, 要建立稳定持久的人鼠嵌合肝动物模型, 必须提高移植细胞的增殖能力。本文课题组曾实验肝脏毒性药物2-乙酰氨基酚与部分肝切除术(2-AAF/PH)联合, 证实2-AAF/PH模型中, 2-AAF对移植L02细胞无明显增殖作用; L02细胞在2-AAF/PH处理人鼠嵌合肝动物模型中存活10 wk。

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 蒋黎, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038
林沪, 硕士, 主治医师, 主要从事肝炎发病机制和病毒性肝炎动物模型的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271173

通讯作者: 毛青, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所。

qingmao@yahoo.com

电话: 023-65399064 传真: 023-68754475

收稿日期: 2006-11-20 接受日期: 2006-12-08

Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with retrorsine

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Li Jiang

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Li Jiang, Institution of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271173

Correspondence to: Qing Mao, Institution of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, 30 Gaotanyan Center Street, Shapingba District, Chongqing 400038, China. qingmao@yahoo.com

Received: 2006-11-20 Accepted: 2006-12-08

Abstract

AIM: To investigate whether human L02 hepatocytes can repopulate after transplantation into the normal and immunocompetent rats treated with retrorsine.

METHODS: Human L02 hepatocytes were injected into the peritoneal cavities of fetal Sprague Dawley rats to induce immune tolerance. The 3-week-old rats were injected with retrorsine or normal saline. After DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) staining, L02 hepatocytes were transplanted into the 7-week-old rats via the spleen. Immunofluorescent staining, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), S-P immunohistochemistry, and DiI staining were used to detect human albumin, human albumin mRNA and specific proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat livers. The distribution of human L02 hepatocytes was observed under fluores-

cent microscope. The number density and area density of PCNA were obtained with the help of computer-assisted image analyzer.

RESULTS: Dynamic distribution of human L02 hepatocytes in rat livers was observed from the 1st week to 6th month after transplantation, but it was from the 1st to 10th week in the controls. Human albumin and albumin mRNA (241 bp) were detected from the 2nd week to the 6th month after transplantation, but they could only be detected from the 1st to 8th week in the controls. The highest expression of human albumin and albumin mRNA appeared at the 4th week. Specific human PCNA was detected in rat livers from the 2nd week to the 6th month after transplantation, but it could only be examined from the 2nd to 6th week in the controls. The number of PCNA-positive cells reached the peak at the 4th week. The number density and area density of PCNA were significantly different between specific PCNA group and its control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Retrorsine is able to promote the repopulation of transplanted human L02 hepatocytes, and L02 hepatocytes can survive more than 6 months, and repopulate at the same time.

Key Words: Hepatocytes; Chimeric liver; Transplantation; Repopulation; Rats; Retrorsine

Lin H, Mao Q, Wang YM, Jiang YG, Jiang L. Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with retrorsine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):346-352

摘要

目的: 应用倒千里光碱(retrorsine, Rts), 研究正常人L02肝细胞移植到具有正常免疫活性的大鼠肝内的存活与增殖情况。

方法: SD大鼠出生前宫内ip人L02肝细胞, 诱导胎鼠对人L02肝细胞产生免疫耐受, 出生3 wk后分别ip Rts或生理盐水, 再经脾移植DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)染色后的人L02

肝细胞,建立人鼠嵌合肝动物模型.采用免疫荧光、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、免疫组化、DiI荧光示踪等方法,在不同时相分别检测人白蛋白、人白蛋白mRNA、特异性人增殖细胞核抗原(PCNA)以及在荧光显微镜下观察人L02肝细胞在鼠肝内的分布,并采用计算机图像分析系统分析不同时相PCNA阳性细胞的数密度和面积密度.

结果:实验组于移植后1 wk-6 mo,在荧光显微镜下观察到人L02肝细胞在鼠肝内的动态分布,而对照组为移植后1-10 wk;实验组移植后2 wk-6 mo,大鼠检测出人白蛋白、人白蛋白mRNA及特异性人增殖细胞核抗原PCNA,而对照组分别于移植后2-8 wk检测出人白蛋白及人白蛋白mRNA,移植后2 wk-6 mo检测出特异性人PCNA.以上各组阳性细胞的出现均以移植4 wk最多. PCNA阳性细胞的数密度和面积密度均显示,特异性人PCNA组与其对照组比较有统计学差异($P<0.05$).

结论:Rts对移植L02细胞有明显的增殖作用, L02细胞在人鼠嵌合肝动物模型中存活并增殖6 mo以上.

关键词:肝细胞;嵌合肝;移植;大鼠;增殖;倒千里光碱

林沪,毛青,王宇明,蒋业贵,蒋黎. L02细胞在倒千里光碱处理大鼠中的增殖. 世界华人消化杂志 2007;15(4):346-352
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/346.asp>

0 引言

直接给予受体鼠移植人肝细胞,移植细胞的存活数量与时间很有限,移植细胞在受体肝内的增殖是其存活及发挥功能的关键,要建立稳定持久的人鼠嵌合肝动物模型,必须提高移植细胞的增殖能力^[1].研究认为,移植细胞要大量增殖,必须满足两个条件:移植肝细胞有更强的生长优势;受体细胞的更新必须超过正常肝细胞更新水平,二者相辅相成的^[2].前者常用肝脏毒性药物:倒千里光碱(retrorsine, Rts)、2-AAF等^[3-6],阻断受体肝细胞进入再生周期;后者常采用四氯化碳、2/3肝切除等^[7-9]再生刺激作用,二者共同促进移植肝细胞增殖.倒千里光碱与部分肝切除术(retrorsine/partial hepatectomy, Rts/PH)联合应用,是移植肝细胞增殖常用模式^[10].部分肝切除术给予嵌合肝再生刺激,提高受体细胞的更新水平,倒千里光碱强烈而持续阻断

宿主肝细胞增殖的细胞周期,而移植肝细胞增殖的细胞周期却不受影响,使移植肝细胞有更强的生长优势,其具体机制尚不清楚.二者共同促进移植肝细胞增殖.我们将诱导免疫耐受的大鼠ip Rts, 2 wk后行2/3肝切除术,同时经脾移植DiI (1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)染色后的L02细胞,建立Rts/PH肝细胞增殖模型;采用免疫荧光、RT-PCR、免疫组化、DiI荧光示踪以及计算机图像分析系统等方法,检测嵌合于具有正常免疫活性大鼠肝内人L02细胞的存活、增殖情况.

1 材料和方法

1.1 材料 生育期SD大鼠6只,购自第三军医大学实验动物中心.选择大鼠孕龄15-17 d,体质量250-300 g者为实验对象. L02细胞属于人正常肝细胞,购自中国科学院上海细胞生物研究所.加入胰酶酶解后,重新混悬.血细胞计数板计算肝细胞的数量,台盼蓝拒染法计算存活率,超过80%的用于实验.

1.2 方法

1.2.1 模型的制备与分组 孕龄15-17 d的SD大鼠乙醚吸入麻醉,孕鼠腹白线逐层剪开,暴露子宫. 1 mL注射器将50 μ L人L02细胞培养液(含 1×10^8 个细胞)缓慢经孕鼠子宫壁注射到胎鼠腹腔,逐层缝合.至孕鼠自然生产.药物配制的方法见参考文献[11].孕鼠随机分2组,产胎鼠各约30只:免疫耐受胎鼠出生3 wk和5 wk腹腔内各注射Rts 30 mg/(kg·只);对照组:免疫耐受鼠出生3 wk和5 wk腹腔内各注射生理盐水,其余与药物组同.出生7 wk,两组大鼠乙醚麻醉下行2/3肝切除并经脾移植已标记DiI的L02肝细胞培养液100 μ L(浓度为 10^{12} /L以上).2/3肝切除术:大鼠在乙醚吸入麻醉下,腹白线暴露肝脏,用细丝线分别结扎左前叶、右前叶、右后叶及尾叶后切除,保留肝中叶,腹腔青霉素抗炎. DiI荧光染色:具体方法见参考文献[12],标记细胞经4 g/L台盼蓝染色计数后,用PBS液调整细胞浓度为 1.0×10^{12} /L;于荧光显微镜(日本Olympus公司)诺丹明滤片下进行荧光观察并照相. L02细胞移植:出生7 wk实验组胎鼠,乙醚吸入麻醉,孕鼠腹白线逐层剪开,暴露脾,自脾系膜缘进针,向脾体和脾尾方向,将100 μ L经DiI染色的L02细胞培养液缓慢注入,轻压注射点,防止出血和渗液.标本收集: L02细胞移植后wk 1取标本, wk 2开始每2 wk取一次,至wk 8后按移植后4 mo, 6 mo取材.

■ 研发前沿

倒千里光碱与部分肝切除术(Rts/PH)联合应用,是移植肝细胞增殖常用模式. PH给予嵌合肝再生刺激,而Rts使移植肝细胞有选择性生长优势,其具体机制尚不清楚.

■创新盘点

在具有正常免疫活性的人鼠嵌合肝模型基础上,应用倒千里光碱提高移植细胞增殖能力;采用多样化检测手段:DiI动态示踪、免疫荧光、免疫组化及RT-PCR,证实移植细胞在嵌合肝中的生物学功能及增殖能力;计算机细胞图像定量分析PCNA数密度和面积密度,反映了移植细胞的增殖情况。

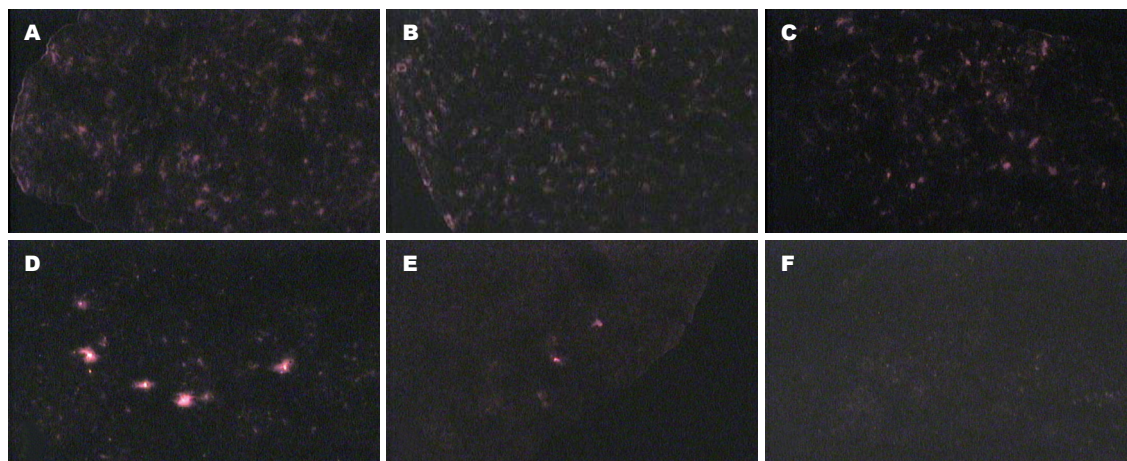


图1 DiI染色L02细胞荧光图像($\times 200$). A, B, C: 实验组移植4 wk, 8 wk, 6 mo; D, E, F: 对照组移植4 wk, 8 wk, 6 mo.

每次每组取4只大鼠. 大鼠在乙醚吸入麻醉下行肝部分切除术, 新鲜肝组织送冰冻切片, 在荧光显微镜诺丹明滤片下观察; 部分组织用40 g/L中性甲醛固定, 送石蜡包埋切片.

1.2.2 DiI荧光示踪法 用DiI染色L02肝细胞后, 移植前于荧光显微镜诺丹明滤片下观察; L02细胞移植后, 大鼠取新鲜肝组织送冰冻切片, 在荧光显微镜下观察.

1.2.3 免疫荧光检测肝组织人白蛋白 新鲜肝组织用冰冻切片4-8 μm , 室温放置30 min后, 入4 $^{\circ}\text{C}$ 丙酮固定10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下100 mL/L封闭血清孵育20 min, 滴加鼠抗人白蛋白mAb(Sigma公司, 滴度1:400) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加荧光标记二抗, 异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗大鼠IgG(滴度1:100), 37 $^{\circ}\text{C}$ 暗室下孵育45 min. 用900 mL/L缓冲甘油封片, 激光共聚焦显微镜(瑞士Zeiss公司)下观察. PBS替代一抗作阴性对照.

1.2.4 免疫组化检测肝组织特异人增殖细胞核抗原(PCNA) 采用链霉菌亲生物素蛋白-过氧化酶法(SP法)染色. 新鲜肝组织用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋切片, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烤1-2 h, 脱蜡至水, 加入含0.5 g/L的Triton $\times 100$ 的PBS室温下孵育5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下30 mL/L过氧化氢孵育20 min, 特异性人增殖细胞核抗原mAb (Chemicon公司, 滴度1:200)或非特异性增殖细胞核抗原mAb (滴度1:200, 检测所有脊椎动物)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加聚合物辅助剂和辣根酶标记羊抗鼠IgG多聚体. 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 中性树脂封片, 光镜下观察. PBS替代一抗作阴性对照. 采用LeicaQWin计算机图像分析系统(德国Leica公司), 在100倍PCNA免疫组化切片下, 每个切片

随机选取5个测量区域, 计算在不同时相PCNA阳性细胞的数密度(个/ μm^2)和面积密度($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$).

1.2.5 RT-PCR检测鼠肝组织人白蛋白mRNA 按TRIzol提取RNA试剂说明进行, 采用BioDev公司RT-PCR试剂盒的两步法逆转录和扩增反应, 引物由大连TaKaRa公司设计合成. 人白蛋白mRNA引物, 正向引物Hs: 5'-TCGACAACGGCTCCGGCAT-3', 逆向引物Ha: 5'-AAGGTGTGGTGCCAGATTTTC-3', 扩增目的片段为241 bp; 正常大鼠白蛋白mRNA引物, 正向引物Rs: 5'-CGGTTTAGGGACTTAGGAGAACAGC-3', 逆向引物Ra: 5'-ATAGTGTCCCAGAAAGCTGGTAGG-3', 扩增目的片段为388 bp. 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性50 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火50 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min; 共32个循环, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min. 采用未加入AMV反转录酶的扩增作为阴性对照以排除假阳性的可能. 产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上获取图像.

统计学处理 数据均以mean \pm SD表示, 采用SPSS10.0统计分析软件, 两均数的比较采用配对 t 检验.

2 结果

2.1 DiI荧光示踪 DiI染色的阳性细胞在绿色滤光片下显示红色荧光, 细胞均匀着色呈圆形或椭圆形, 不能区分胞核与胞质. 实验组于移植后1 wk-6 mo, 观察到L02肝细胞在鼠肝内的动态分布. L02细胞自第1周起一直呈亮度不大的散在均匀分布, 该状态维持4 mo, 至第6月荧光细胞数目开始减少, 亮度有所减弱, 显示为片状均匀分布. 对照组早期时相可见L02细胞分布在受体

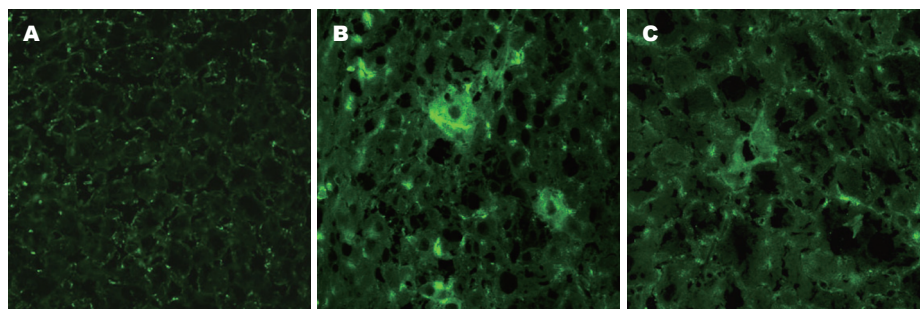


图 2 正常鼠肝组织和移植4 wk嵌合鼠肝组织中胞质呈绿色荧光的L02细胞($\times 400$). A: 正常鼠肝组织; B: 实验组; C: 对照组.

■应用要点

通过应用倒千里光碱, 提高L02细胞在人鼠嵌合肝中的增殖能力, 延长存活时间, 可获得稳定持续性的动物模型; 该模型构建在正常免疫系统基础上, 为进一步研究病毒感染发病机制、病毒原学诊断和治疗等提供良好的平台.

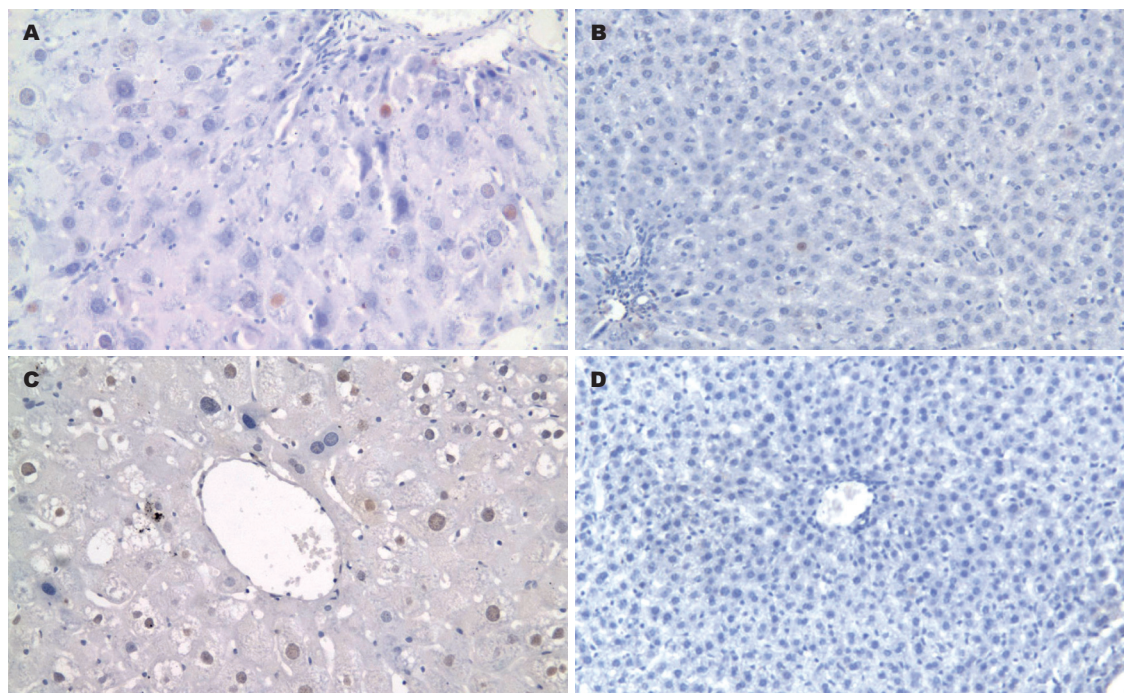


图 3 正常鼠肝组织和移植4 wk嵌合鼠肝组织中胞核呈棕色的L02细胞($\times 200$). A: 实验组1; B: 对照组; C: 实验组2; D: 正常鼠肝组织.

鼠肝内的门静脉区域, 聚集成团, 以后扩散到肝实质区域, 荧光细胞数目减少较快, 亮度逐渐减弱, 维持10 wk左右. 相应时相荧光细胞数目较实验组明显稀少(图1).

2.2 鼠肝组织中人白蛋白的表达 FITC标记荧光二抗, 阳性细胞的胞质在激光共聚焦显微镜的蓝色滤光片下显示为绿色荧光, 与周围大鼠肝细胞界限清楚, 胞核未着色. 实验组移植后2 wk-6 mo大鼠均检测出人白蛋白; 对照组移植后2-8 wk大鼠可检测出人白蛋白. 两组均以4 wk发现绿色荧光细胞最多, 实验组比相应时相对照组阳性细胞数目多. 实验组肝实质显示了轻度到中度肝索结构的破坏、门脉区炎性细胞浸润和分散的巨大肝细胞, 这些巨大肝细胞都有大的细胞核; 对照组未见明显上述现象. 实验组和对照组均未见肝纤维化、肝坏死等(图2).

2.3 特异人PCNA的表达 特异性人和非特异性PCNA阳性细胞核DAB显色后均为棕色(图3). 实验组和对照组各取两份切片, 分为实验组1: 一抗为特异性人增殖细胞核抗原mAb, 其实验组移植后2 wk-6 mo检测出特异性人PCNA, 4 wk最多, 以后逐渐减少, 6 mo后仍有少量; 对照组移植后2-6 wk, 检测出特异性人PCNA, 仍以4 wk最多. 对照组相应时相阳性细胞数量略少于实验组; 实验组2: 一抗为非特异性增殖细胞核抗原mAb, 其实验组与对照组差别不大, 均移植后1 wk-6 mo, 检测出大量非特异性人PCNA, 阳性细胞核数量未见减少. PCNA阳性细胞的数密度和面积密度均显示, 实验组1与其对照组比较有统计学差异($P < 0.05$); 实验组2与其对照组比较无统计学差异($P > 0.05$)(表1).

2.4 人白蛋白mRNA的表达 实验组移植后2 wk-

■名词解释

倒千里光碱与部分肝切除术联合肝细胞增殖模型(Rts/PH): 是移植肝细胞增殖常用模式。部分肝切除术给予嵌合肝再生刺激, 提高受体细胞的更新水平; 倒千里光碱强烈而持续抑制宿主肝细胞的增殖, 而不影响移植肝细胞增殖, 使移植肝细胞有选择性生长优势, 二者共同促进移植肝细胞增殖, 其具体机制尚不清楚。

表 1 大鼠不同时相PCNA的数密度和面积密度(mean \pm SD, $n = 4$)

指标	分组	1 wk	2 wk	4 wk	6 wk	4 mo
数密度 ($10^{-4} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	实验组1		0.47 \pm 0.08 ^a	1.33 \pm 0.34 ^a	0.56 \pm 0.38 ^a	0.08 \pm 0.03
	对照组1		0.10 \pm 0.07	0.46 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04	
	实验组2	5.53 \pm 1.12	5.68 \pm 0.89	6.02 \pm 0.87	6.78 \pm 1.03	5.77 \pm 0.68
	对照组2	6.20 \pm 0.85	5.77 \pm 1.18	6.16 \pm 1.02	5.46 \pm 1.03	6.73 \pm 0.58
面积密度 ($10^{-4} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)	实验组1		2.14 \pm 0.22 ^a	7.85 \pm 1.46 ^a	3.54 \pm 1.63 ^a	0.58 \pm 0.72
	对照组1		1.47 \pm 0.04	2.94 \pm 0.64	2.37 \pm 0.48	
	实验组2	74.8 \pm 1.06	69.3 \pm 2.84	45.3 \pm 3.38	77.3 \pm 4.84	84.7 \pm 2.67
	对照组2	84.2 \pm 6.84	67.5 \pm 2.73	66.3 \pm 4.48	74.2 \pm 5.73	83.3 \pm 4.83

^a $P < 0.05$ vs 对照组1.

6 mo, 检测出人白蛋白mRNA, 对照组移植后2-8 wk, 检测出人白蛋白mRNA. 分别采用人和大鼠白蛋白mRNA引物作RT-PCR时, 可在实验大鼠肝组织中检测到相应的人白蛋白mRNA条带(241 bp)及大鼠白蛋白mRNA条带(388 bp)(图4).

3 讨论

动物在胚胎发育时期免疫系统尚未成熟, 接触到外来抗原时, 可能由于“T淋巴细胞克隆消除”的原因^[13], 会逐渐对这些抗原产生耐受, 因此, 先用人胎肝细胞诱导胎鼠对人肝细胞产生免疫耐受, 再把人肝细胞移植到正常大鼠肝内, 从而建立针对移植物耐受的动物模型^[14]. 由于我们的人鼠嵌合肝模型建立在正常免疫系統上, 嵌合于鼠肝细胞中的是正常人肝细胞, 对多种肝炎致病因子易感, 因此可利用人鼠嵌合肝模型进行已知和未知肝炎致病因子的研究. 应用标记技术, 在荧光显微镜或流式细胞仪下, 移植肝细胞与受体肝细胞很容易区别开来, 且能直观的监测移植肝细胞的功能与转归、分布与存活. 我们采用亲脂性碳花青荧光染料DiI标记整个细胞, 荧光衰减非常慢, 有报道^[15]用DiI标记的神经元在体外保持活性4 wk以上, 体内保持9 mo以上, 仍没有明显衰减和向周围的神经元细胞转移. 本实验DiI荧光及免疫组化均显示, 移植的L02细胞首先到达远端门静脉区域和肝窦, 聚集成团, 逐渐扩散到肝实质区域, 并散在分布, 在Rts的作用下, 散在分布的L02细胞开始成簇增殖. 实验组L02细胞一直呈亮度不大的散在均匀分布, 提示移植细胞扩散到肝实质区域后很快分裂增殖, 导致荧光细胞亮度减弱; 而对照组相应时相荧光细胞亮度虽大, 但数目较实验组明显稀少, 提示其分裂增殖相对较少, 说明Rts对移

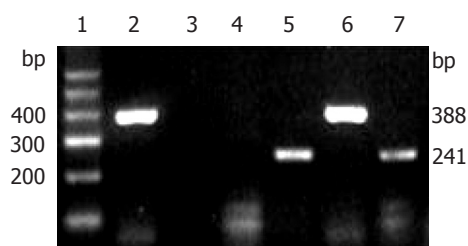


图 4 RT-PCR检测肝组织人白蛋白和鼠白蛋白mRNA. 1: 标准分子量DNA Marker; 2, 3: 正常大鼠肝组织; 4, 5: 人肝组织; 6, 7: 嵌合鼠肝组织; 2, 4, 6: 大鼠白蛋白mRNA引物; 3, 5, 7: 人白蛋白mRNA引物.

植细胞有明显增殖作用. 实验组荧光细胞维持6 mo以上, 而对照组维持8 wk, 证实DiI荧光染料衰减很慢, 对照组荧光最后的消失不是因为衰减, 而是移植细胞有限的增殖能力和细胞活性下降所致.

我们采用免疫荧光技术和RT-PCR, 从移植后2 wk-6 mo嵌合肝大鼠肝组织中检测出人白蛋白及人白蛋白mRNA; 对照组于移植后2-8 wk检出. 两组均证实人L02细胞在嵌合肝中的存在, 并具有生物学功能, 但实验组比对照组阳性持续时间明显延长, 均未见肝纤维化、肝坏死现象, 说明Rts不仅提高了L02细胞在大鼠肝组织中的增殖, 而且其肝细胞毒性不影响移植细胞生物学功能. 另外发现, 实验组肝实质出现肝索结构的破坏、大量炎性细胞浸润和巨大核肝细胞, 而对照组不明显, 体现了移植肝细胞与受体细胞的整合过程, 并逐渐发生移植细胞的增殖、替代. Laconi *et al*^[21]发现, 由于肝脏总重量和DNA含量在移植细胞增殖过程, 均未超过正常水平值, 说明移植细胞并不是简单的与受体细胞共存, 而是移植细胞的缓慢替代, 而除了Rts,

移植细胞也可能加速了受体细胞的消亡过程。研究表明,经脾注射大量移植肝细胞(1×10^8 以上)、肝细胞的多次移植或者移植前诱导肝毒性等增殖方法,与注射Rts相比,肝细胞增殖均显得很轻微^[16]。Rts的毒性包括肝细胞坏死,并未对肝细胞增殖造成影响,为Rts在移植肝细胞的有效增殖和临床应用提供了依据^[17]。Rts是千里光属植物种中所含吡咯烷类生物碱,可强烈而持续阻断宿主肝细胞增殖的细胞周期,而移植肝细胞增殖的细胞周期却不受影响,从而促进了移植肝细胞的选择性生长,虽半衰期很短,但对肝细胞增殖的抑制作用可持续数周至数月^[18]。Rts主要阻断肝细胞周期S晚期和G2期,即阻断了随后的细胞有丝分裂;也能阻断肝细胞进入S期,与DNA结合阻断其合成^[19],但其他结合DNA的试剂如二乙基亚硝胺却不能维持移植肝细胞的增殖过程,提示了生物碱的特殊性^[2]。Laconi *et al*^[20]发现,在外源性生长刺激如部分肝切除缺乏下,仅给予Rts处理,其结果同Rts/PH联合相似,提示除了维持移植肝细胞选择性生长优势以外, Rts的作用可能还有其他机制存在。我们也试验了单独给予Rts,无pH作用下, Rts同样能提高L02细胞的增殖能力,延长其生存时间,只是移植细胞的增殖似乎较慢。Gordon *et al*^[21]研究Rts所致不可逆损伤的巨大肝细胞清除机制,发现Rts除了阻断肝细胞的有丝分裂,导致S晚期和G2期细胞增加外,也可因凋亡前体蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-xl的相对水平高低和所处位置,诱导凋亡,导致细胞损伤。

目前,计算机图像分析系统应用广泛,对免疫组化切片分析和计算移植肝细胞的数量、数密度、面积、面积密度、细胞最大直径及形态因子等参数,可以反映移植肝细胞的增殖情况,我们采用计算机图像分析以及统计学分析,检测不同时相PCNA细胞的数密度和面积密度。实验发现,特异性人PCNA作一抗时,实验组与对照组相应时相的数密度和面积密度有明显差异且有统计学意义,前者比后者持续时间明显延长,说明倒Rts既能抑制受体肝细胞增殖,促进卵圆细胞活化,也能促进移植肝细胞的增殖。Zheng *et al*^[22]推测,应用Rts后,肝严重损伤后的再生可能首先是移植的成年肝细胞的增殖分化,其次是单能或双能前体细胞的增殖与分化的过程。实验组与对照组增殖期L02细胞高峰均出现在第4周,只是前者数量明显多于后者,以后检测均逐渐减少,移植4 mo后,阳性细胞仅有

少量,6 mo与4 mo水平相当,说明L02肝细胞在鼠肝脏内保持高度分化增殖持续到移植后4 mo左右,增殖能力持续时间长,且最后仍维持在低水平复制状态。Zheng *et al*^[22]应用Rts和部分肝切除处理的二肽酶(dipeptidyl peptidase, DPP)IV⁻大鼠,移植的DPPIV⁺肝细胞在第1月复制和分裂次数最多,以后很快减少,第3月到达细胞增殖的相对平台,但复制一直维持在低水平而不停止,我们的结论与之基本相符。非特异性PCNA作一抗时,经计算机图像和统计学分析,实验组与对照组在时间和数量上无明显差异,非特异性PCNA在1 wk-6 mo一直持续存在且数量很多,说明鼠肝细胞在行部分肝切除术后迅速表现出强烈而持续的增殖趋势,实验组由于Rts虽允许受体肝细胞的DNA合成作用,但主要阻断肝细胞wk期S晚期和G2期,即阻断了随后的细胞有丝分裂,使受体肝细胞增殖受阻。该机制也解释了应用Rts后出现的巨大核肝细胞,是由于部分受体肝细胞能够在核内复制合成DNA,但不能有丝分裂的结果^[20]。70%肝切除是常见的大鼠肝再生模型,由于移植肝细胞数量在嵌合肝中比例很小,部分肝切除术促进L02细胞增殖的数量很少,所以,非特异性PCNA在wk 1出现,而特异性人PCNA在wk 1未能发现,并且即使Rts能提高移植细胞的增殖能力,但在相应时相特异性人PCNA与非特异性PCNA比较,数量明显稀少。

通过应用药物Rts后,提高L02细胞在人鼠嵌合肝中的增殖能力,延长存活时间,可获得稳定持续性的动物模型。从理论和实践中都能够证明人鼠嵌合肝动物模型的应用前景,构建在正常免疫系统基础上的动物模型,为进一步研究病毒感染免疫应答、致病机制、抗病毒治疗和开发强效疫苗开辟了道路。

4 参考文献

- 1 Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 378-385
- 2 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 433-438
- 3 Witek RP, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant* 2005; 14: 41-47
- 4 Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 2004; 22: 1049-1061
- 5 Fandrich F, Ruhnke M. Stem cells and liver

■同行评价

文章提供了有意义的信息,具有新颖性,符合伦理学要求,能较好的反映我国胃肠病学基础研究的先进水平。

- replacement. *Med Klin (Munich)* 2003; 98 Suppl 2: 18-22
- 6 Shafritz DA, Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002; 36: 552-564
- 7 Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jager MD, Neipp M, Piso P, Klempnauer J, Schlitt HJ. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003; 39: 365-373
- 8 Guha C, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif Organs* 2001; 25: 522-528
- 9 Okumoto K, Saito T, Haga H, Hattori E, Ishii R, Karasawa T, Suzuki A, Misawa K, Sanjo M, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol* 2006; 41: 62-69
- 10 Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000; 156: 607-619
- 11 Avril A, Pichard V, Bralet MP, Ferry N. Mature hepatocytes are the source of small hepatocyte-like progenitor cells in the retrorsine model of liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 737-743
- 12 韩明子, 邹亚男, 赵宪琪, 李福德, 韩桂萍, 赵瑞波, 温洁. DiI荧光示踪剂在小鼠骨髓细胞肝内移植中的研究. *中华器官移植杂志* 2003; 24: 251
- 13 Kim HB, Shaaban AF, Milner R, Fichter C, Flake AW. In utero bone marrow transplantation induces donor-specific tolerance by a combination of clonal deletion and clonal anergy. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 726-729; discussion 729-730
- 14 Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1416-1423
- 15 Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp Neurol* 1988; 102: 92-101
- 16 Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153: 319-329
- 17 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005; 14: 31-40
- 18 Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 2002; 73: 1818-1824
- 19 Laconi S, Curreli F, Diana S, Pasciu D, De Filippo G, Sarma DS, Pani P, Laconi E. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999; 31: 1069-1074
- 20 Laconi S, Pillai S, Porcu PP, Shafritz DA, Pani P, Laconi E. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 2001; 158: 771-777
- 21 Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Bax-mediated apoptosis in the livers of rats after partial hepatectomy in the retrorsine model of hepatocellular injury. *Hepatology* 2000; 32: 312-320
- 22 Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H. Quantitative evaluation of long-term liver repopulation and the reconstitution of bile ductules after hepatocellular transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6176-6181

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.

早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠回肠p-ERK通路的影响

郭光华, 邓志云, 范 骏, 张红艳, 李国辉

郭光华, 邓志云, 范骏, 张红艳, 李国辉, 南昌大学第一附属医院烧伤中心 江西省南昌市 330006
郭光华, 医学硕士, 教授、主任医师, 博士生导师, 主要从事烧伤方面的研究。

江西省自然科学基金项目, No. 0340078

通讯作者: 郭光华, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院烧伤中心. guogh2000@hotmail.com
电话: 0971-8692572

收稿日期: 2006-09-09 接受日期: 2006-10-11

Effect of initial enteral glutamine supplementation on p-ERK1/2 pathway in ileal mucosa of scalded rats

Guang-Hua Guo, Zhi-Yun Deng, Jun Fan, Hong-Yan Zhang, Guo-Hui Li

Guang-Hua Guo, Zhi-Yun Deng, Jun Fan, Hong-Yan Zhang Guo-Hui Li, Center of Burn Injury, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 0340078

Correspondence to: Guan-Hua Guo, Center of Burn Injury, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. guogh2000@hotmail.com

Received: 2006-09-09 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the effect of initial enteral glutamine supplementation on p-ERK1/2 expression in ileal mucosa of scalded rats.

METHODS: Healthy adult Sprague Dawley rats were randomly divided into enteral nutrition (EN) group ($n = 40$), enteral nutrition plus glutamine (EN + Gln) group ($n = 40$) and pseudo-scalded (PS) group ($n = 8$). Scalded model (30% total body surface area, III⁰ scald injury) was established in the rats of the former two groups, and the corresponding methods were used. The expression of p-ERK1/2 in ileal mucosa was analyzed by immunohistochemical staining and Western blot, and the changes of plasma D-lactate concentration in portal vein were measured by ultraviolet spectrophotometry.

RESULTS: The concentration of D-lactate was

heightened after scalding, and it restored to the normal level after 48 hours in EN + Gln group, which was significantly lower than that in EN group (4.7 ± 0.9 vs 6.9 ± 1.2 , $P < 0.05$). Immunohistochemistry revealed the number of p-ERK1/2-positive cells had been increased after scalded injury, and the percentages of p-ERK1/2-positive cells had been markedly higher in EN + Gln group than that in EN group at the 24th, 48th, and 96th hour (villus: $87.6\% \pm 9.6\%$, $84.4\% \pm 10.3\%$, $74.6\% \pm 9.7\%$ vs $64.6\% \pm 7.3\%$, $59.6\% \pm 7.1\%$, $58.4\% \pm 7.4\%$, $P < 0.05$; recess: $73.6\% \pm 11.2\%$, $67.4\% \pm 8.6\%$, $63.6\% \pm 7.9\%$ vs $54.3\% \pm 6.3\%$, $51.6\% \pm 5.9\%$, $48.4\% \pm 5.3\%$, $P < 0.05$). Western blot showed that the expression of p-ERK1/2 had been obviously increased in EN group at the 12th hour after scalded injury, and then decreased gradually, while it reached the peak at 24th hour, and then decreased gradually in EN + Gln group.

CONCLUSION: In comparison with enteral nutrition, enteral glutamine supplementation can promote the expression of p-ERK1/2 in ileal mucosa and improve the function of intestinal barrier in scalded rats.

Key Words: Enteral nutrition; Glutamine; p-ERK1/2; D-lactate

Gao GH, Deng ZY, Fan J, Zhang HY, Li GH. Effect of initial enteral glutamine supplementation on p-ERK1/2 pathway in ileal mucosa of scalded rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(4):353-358

摘要

目的: 观察早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠回肠p-ERK1/2表达的影响。

方法: 选健康SD大鼠88只随机分为肠内营养组(EN组, $n = 40$)、肠内营养加谷氨酰胺补给组(EN+Gln组, $n = 40$)和伤前对照组($n = 8$), 制备总烧伤面积(TBSA)为30%的III⁰烫伤动物模型, 伤后早期分别给予肠内营养制剂能全力和能全力加Gln, 于6, 12, 24, 48和96 h观察肠黏膜细胞p-ERK的表达分布及血浆D-乳酸浓度变化。

■背景资料

严重烧伤后早期肠内营养, 维护肠黏膜屏障功能, 减少肠内细菌、内毒素移位, 同时提高机体免疫功能, 已成为治疗的关键。肠黏膜屏障功能的维护除应有良好的血供、氧供外, 还应促进肠黏膜细胞的生长与修复。肠内免疫营养剂中的谷氨酰胺是肠黏膜细胞的组织特需营养物质, 加之肠黏膜细胞必须从肠腔内获得营养与在食糜的刺激下才能增长, 这是肠外营养所不能, 故免疫营养配方多为肠内营养, 具有维护肠黏膜屏障功能的作用, 是未来首选的营养支持途径。

■创新盘点

本研究根据免疫营养理论,将Gln加入肠内营养剂能全力(Nutricia公司),应用于烫伤动物模型,通过与单纯应用肠内营养剂能全力(Nutricia公司)的比较,采用免疫组化、蛋白印迹等先进研究方法和检测手段,观察肠内免疫营养对烫伤大鼠回肠黏膜细胞p-ERK1/2的表达,从分子生物学和细胞学水平,探讨肠内免疫营养对严重烫伤后肠黏膜屏障功能的影响及其可能机制,为严重烧伤患者营养支持和免疫功能紊乱的治疗提供理论依据。据Internet检索,目前未见相关报道。

结果: 烧伤后血浆D-乳酸水平升高, EN组在观察时间内血浆D-乳酸水平没有恢复正常($P<0.05$), EN+Gln组血浆D-乳酸水平在伤后48 h恢复至伤前水平且明显低于EN组(4.7 ± 0.9 vs 6.9 ± 1.2 , $P<0.05$)。p-ERK1/2免疫组化染色显示烧伤后阳性细胞数量显著增加, EN+Gln组回肠阳性细胞百分比在24, 48, 96 h明显高于EN组(绒毛: $87.6\% \pm 9.6\%$, $84.4\% \pm 10.3\%$, $74.6\% \pm 9.7\%$ vs $64.6\% \pm 7.3\%$, $59.6\% \pm 7.1\%$, $58.4\% \pm 7.4\%$, $P<0.05$; 隐窝: $73.6\% \pm 11.2\%$, $67.4\% \pm 8.6\%$, $63.6\% \pm 7.9\%$ vs $54.3\% \pm 6.3\%$, $51.6\% \pm 5.9\%$, $48.4\% \pm 5.3\%$, $P<0.05$)。Western blot显示EN组伤后6 h p-ERK1/2表达明显增加, 12 h达高峰, 然后逐渐下降, EN+Gln在24 h达到高峰并逐渐下降。

结论: 相对于肠内营养, 早期肠内给予Gln能促进肠上皮细胞p-ERK1/2的表达, 改善黏膜局部的屏障功能。

关键词: 肠内营养; 谷氨酰胺; p-ERK1/2; D-乳酸

郭光华, 邓志云, 范骏, 张红艳, 李国辉. 早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠回肠p-ERK通路的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(4):353-358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/353.asp>

0 引言

在严重烧伤、感染、休克等应激条件下, 因肠道缺血缺氧、炎性因子的瀑式释放、营养底物的缺乏等导致肠黏膜受损, 上皮细胞通透性增加及增殖受抑制, 肠屏障功能受损, 肠道细菌移位。丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)级联是细胞内重要的信号转导途径, 其将细胞外刺激传递至细胞核, 参与细胞的生长、发育、分化等一系列生理过程。肠道损伤所涉及缺血、炎症、凋亡等多个病理机制与MAPK信号道路的调节有关, MAPK/ERK是其中一条重要的信号转导通路, 可被生长因子、G蛋白偶联受体的配体和转录因子等激活^[1], ERK通路在促进肠上皮增生、分化、抑制凋亡中发挥重要作用。近来研究发现, 谷氨酰胺(Gln)能促进肠黏膜细胞的增生、减轻肠道损伤、防止肠黏膜萎缩等作用, 有利于维持肠黏膜屏障功能。为此我们设计了本实验, 对烧伤后大鼠早期肠内补给Gln, 观察其对MAPK/ERK的活性形式p-ERK1/2的激活作用, 探讨肠内Gln补给与ERK信号途径关系及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康Wistar大鼠88只, 体质量220-250 g, 雌雄兼用, 由南昌大学医学院医学实验动物科学部提供。雌雄分笼, 适应性喂养1 wk, 自由摄水饮食。p-ERK鼠mAb购自美国cell signaling technology公司, 以及相应的试剂(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 烫伤模型的制作 动物随机分为两组, 即肠内营养组(EN组)和肠内营养组加谷氨酰胺补给组(EN+Gln组), 两组所有大鼠均制成烫伤模型, 每组40只。另取8只作为伤前对照, 制成假烫模型, 所得数据作为伤前参考值。大鼠烫伤前禁食12 h时, 10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉, 背部电推剃毛, 称其质量后采用本实验中心自制蒸汽烫伤控制器, 设定压力为0.03 mPa, 温度108℃, 持续8 s, 造成总体表面积(TBSA)为30%的III°烫伤。伤后立即腹腔注射平衡液50 mL/kg抗休克。将大鼠放入限制笼内饲养, 于伤后6, 12, 24, 48和96 h检测观察指标, 在每个时间点, 每组大鼠均为8只。

1.2.2 营养液的配制与供给 各组给予同等热量的肠内营养物, EN组给予肠内营养剂能全力(Nutricia公司), EN+Gln组在此基础上添加Gln(重庆药友制药有限公司惠赠)0.3 g/d·kg; 伤后4 h开始灌喂营养液; 每日总热量按文献[3]报道的731.5 kJ/kg给予, 每天计划量分3-5次喂完, 不限饮水。

1.2.3 检测指标和方法 (1)血浆D-乳酸测定: 门静脉血离心后分离血浆, -80℃保存, 用酶联紫外分光光度法测定血浆D-乳酸水平。(2)肠黏膜p-ERK1/2的免疫组化测定: 取大鼠回肠末段石蜡包埋后切片, 应用p-ERK小鼠mAb(cell signaling technology, Inc, 美国)以及相应的第二抗体, 按照试剂说明书要求进行免疫组织化学技术操作。结果以细胞质或细胞核着棕色者为阳性染色。另用PBS代替一抗做阴性对照。光镜下观察阳性细胞在小肠黏膜的分布; 每只大鼠观察50个纵向切开的隐窝和绒毛, 统计阳性细胞百分率。其结果以均数±标准差表示; (3)Western blot法检测p-ERK1/2的表达: 主要步骤为载玻片刮取大鼠回肠黏膜层, 称其质量后加入去污剂裂解缓冲液, 匀浆器匀浆, 冰上裂解30 min, 将已裂解的组织转移入1.5 mL EP管中, 4℃, 10 000 g离心10 min, 取上清, 用Folin酚法进行蛋白定量后, 取40 μL蛋白, 加入上样缓冲液

表 1 烧伤后门静脉血浆D-乳酸浓度变化(酶联紫外分光光度法)

分组	n	伤前值	伤后时间(h)				
			6	12	24	48	96
EN组	8	3.8±0.6	10.8±1.7 ^b	8.3±1.4 ^b	7.9±1.3 ^b	6.9±1.2 ^a	6.1±1.1 ^a
EN+Gln组	8		9.4±1.6 ^b	7.8±1.2 ^b	7.2±1.3 ^b	4.7±0.9 ^c	4.1±0.8 ^c

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 伤前; ^c*P*<0.05 vs EN组.

表 2 回肠绒毛p-ERK1/2的阳性细胞百分比变化(%)

分组	n	伤前值	伤后时间(h)				
			6	12	24	48	96
EN组	8	55.3±6.6	64.1±9.6	69.3±9.7 ^a	64.6±7.3	59.6±7.1	58.4±7.4
EN+Gln组	8		60.3±9.3	70.7±8.9 ^a	87.6±9.6 ^{ac}	84.4±10.3 ^{ac}	74.6±9.7 ^{ac}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 伤前; ^c*P*<0.05 vs EN组.

表 3 回肠隐窝p-ERK1/2的阳性细胞百分比变化(%)

分组	n	伤前值	伤后时间(h)				
			6	12	24	48	96
EN组	8	31.3±4.3	54.1±7.6 ^b	57.3±6.7 ^b	54.3±6.3 ^b	51.6±5.9 ^b	48.4±5.3 ^a
EN+Gln组	8		52.3±7.4 ^b	56.7±8.6 ^b	73.6±11.2 ^{bc}	67.4±8.6 ^{bc}	63.6±7.9 ^{bc}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 伤前; ^c*P*<0.05 vs EN组.

煮沸3 min变性后,完成十二磺基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白转膜操作,膜片分别与一抗(鼠抗p-ERK1/2 mAb, 稀释浓度为1:1000)进行抗原抗体结合反应,然后将NC移入10 mL含有羊抗大鼠IgG-HRP的反应液(二抗1:1000溶于封闭液)中,室温平摇120 min;经适当洗涤,膜片与ECL温浴1 min,保鲜膜包裹后,经X光片曝光,显影和定影,显现特异的蛋白信号.激光光密度仪扫描,所得p-ERK1/2蛋白带的综合密度除以伤前相对应样的综合密度的比值,即相对A值代表蛋白的相对表达量.

2 结果

2.1 血浆D-乳酸浓度的变化 在烧伤后6 h时EN组和EN+Gln组动物血浆D-乳酸浓度较伤前均升高,在实验所观察时间内EN组均高于伤前水平(*P*<0.01或*P*<0.05);EN+Gln组在48和96 h时D-乳酸浓度与伤前比较差异无显著性意义(*P*>0.05),组间对照EN+Gln组在48和96 h时D-乳酸浓度明显低于EN组(*P*<0.05),说明补充Gln的肠内营养

能降低血浆D-乳酸浓度(表1).

2.2 回肠绒毛p-ERK1/2的阳性细胞百分比 烧伤后肠绒毛p-ERK1/2阳性细胞百分升高,EN组和EN+Gln组在伤后12 h与伤前比较均明显升高(*P*<0.01或*P*<0.05);组间比较EN+Gln组在24, 48和96 h时p-ERK1/2阳性细胞明显高于EN组(*P*<0.05)(表2).

2.3 回肠隐窝p-ERK1/2的阳性细胞百分比 在烧伤后EN组和EN+Gln组肠绒毛p-ERK1/2阳性细胞百分比比较伤前均显著升高(*P*<0.01或*P*<0.05);组间比较EN+Gln组在24, 48和96 h时p-ERK阳性细胞与EN组相比均显著升高(*P*<0.05).隐窝p-ERK阳性细胞百分比比较伤前均升高(*P*<0.01或*P*<0.05)(表3).

2.4 肠黏膜p-ERK1/2的表达 Western blot分析显示,烧伤后p-ERK1/2蛋白表达的水平升高,EN组在伤后12 h达到最高后逐渐下降;EN+Gln组在24 h时达到峰值后逐渐下降;在伤后24, 48 h时EN+Gln组p-ERK1/2表达明显高于EN组(*P*<0.01或*P*<0.05),说明补充Gln的肠内营养能促进伤后

同行评价

本文描述了早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠回肠p-ERK通路的影响,总体上书写比较流畅,有一定科学性.

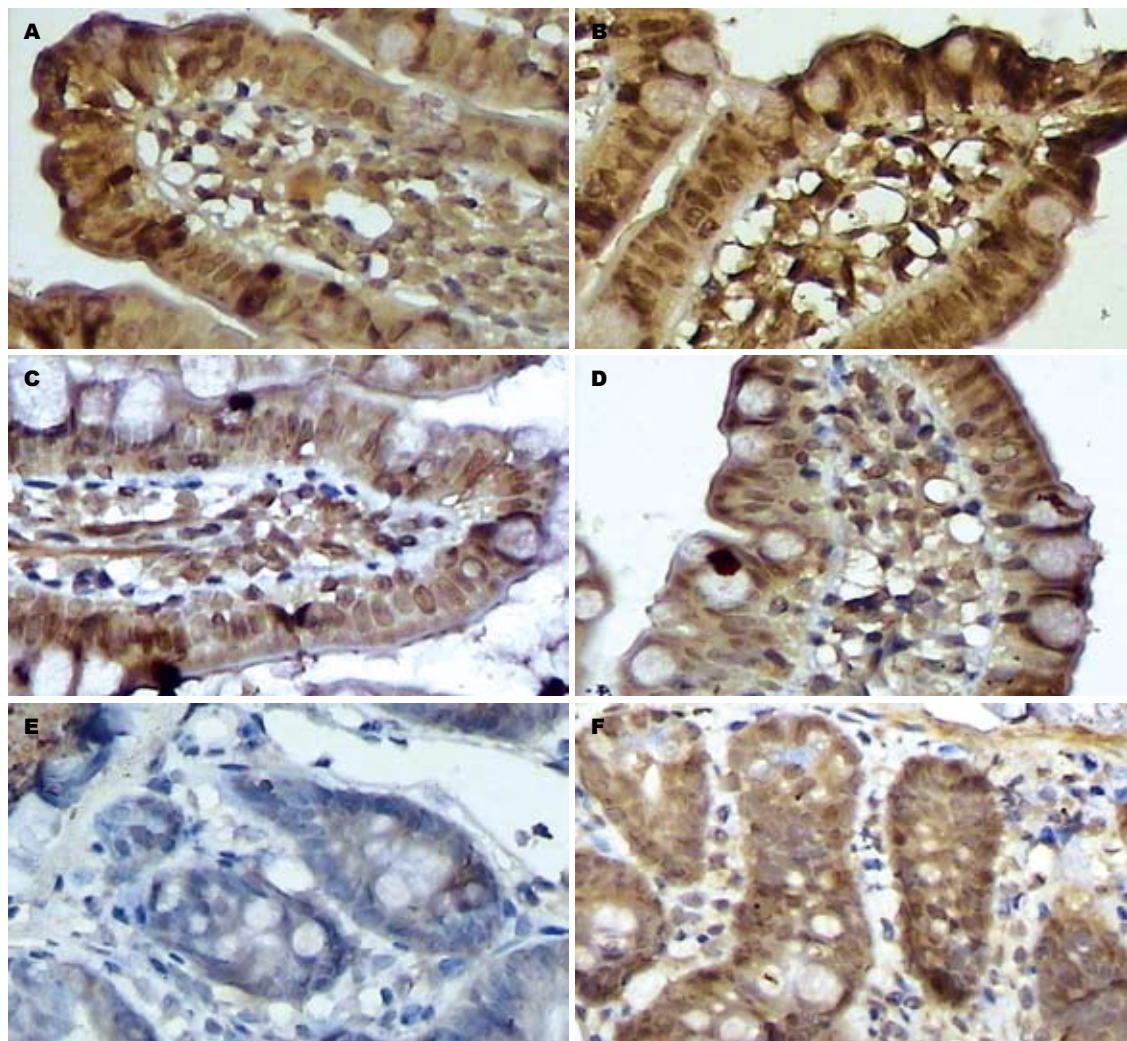


图1 烫伤大鼠肠黏膜p-ERK1/2的免疫组化. A: 回肠绒毛EN+Gln组(12 h); B: 回肠绒毛EN+Gln组(24 h); C: 回肠绒毛EN组(12 h); D: 回肠绒毛EN组(24 h); E: 回肠隐窝EN组(24 h); F: 回肠隐窝EN+Gln组(24 h).

p-ERK1/2蛋白的表达(图1-2).

3 讨论

严重烧伤后机体呈低血容量状态,在烧伤等应激状态下,在各种细胞因子、激素作用下以高代谢为特征,机体组织血流发生改变;因局部营养物质、供氧不足和细胞因子的瀑式释放等使肠道黏膜及其屏障功能受损;近来的研究表明,创伤后Gln补给能通过自身代谢和调节细胞增生分化的作用,以维护肠黏膜细胞、保持肠黏膜屏障的功能. ERK1/2在胞质内分布广泛,已证明p-ERK1/2途径是成纤维细胞、角质细胞、IEC-6等细胞增生的主要细胞内信号传导通路^[2].在未受刺激的细胞内主要表现为脱磷酸型,其苏氨酸和酪氨酸残基被磷酸化后发生激活,对机体细胞的生长、分化和增殖过程中发挥重要的调控作用^[3],p-ERK1/2被激活后,可以表现

为持久激活或短暂激活,持久激活(活性高的)p-ERK1/2可部分转入核内,可以使相应的转录因子发生磷酸化,而短暂激活(活性低)的p44/42 MAPK不能进入核内,二者由于“入核量”的差异使细胞表达不同质或量的产物,从而产生不同的细胞生物学效应,因此ERK1/2在转录水平上的差异可以使其产生不同的效应.

本实验中在伤前大鼠的回肠黏膜上皮细胞内,p-ERK1/2主要存在于胞质中,核内少量表达.烧伤后肠上皮和小肠隐窝阳性细胞的比例显著增加,表明烧伤后机体的应激可以激活p-ERK1/2通路.在实验各个时间点免疫组化切片可见小肠绒毛和隐窝处p-ERK1/2阳性细胞均明显高于伤前;Western blot半定量分析显示,在EN组p-ERK1/2的表达在伤后6 h升高后逐步下降,而在Gln组则在24 h时再次升高并持续一定时间;对此我们推测p-ERK1/2的表达在6 h时的

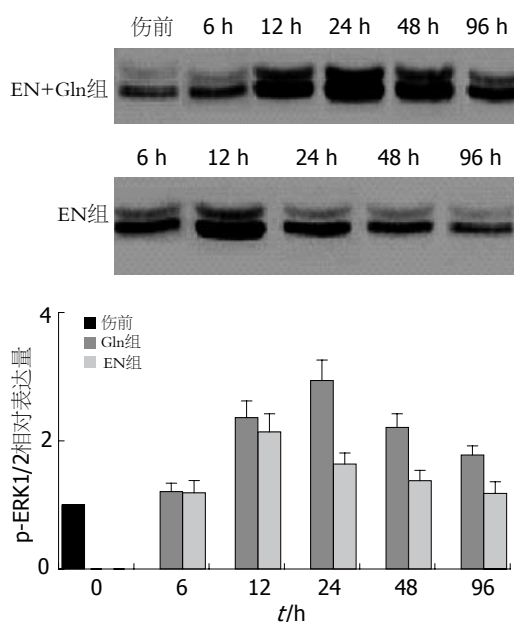


图2 烫伤前后各组肠黏膜p-ERK1/2的表达Western blot分析。

上升主要是由烧伤后机体的应激状态引起; Gln组出现再次升高是肠内补充Gln的结果。Gln是快速增殖细胞如肠上皮细胞、淋巴细胞的主要能量来源, 众多的研究显示, Gln在肠黏膜代谢和维护中的作用, 如参与葡萄糖三羧酸循环、氧化生成ATP供能, 参与黏膜细胞核酸及蛋白质的合成代谢, 促进肠黏膜细胞的更新和再生, 保持其超微结构的完整性^[4]。在烧伤后机体对Gln的需求量远远超过体内合成Gln的能力, 可使肠道黏膜萎缩、绒毛变稀变矮, 肠黏膜屏障功能下降。在近几年的临床和动物实验中发现, 补充Gln后能明显增加大鼠肠黏膜的质量、DNA和RNA含量, 恢复绒毛高度、黏膜表面积和隐窝深度, 增加隐窝细胞的有丝分裂, 加快肠上皮细胞更新速度, 增强修复能力, 并能增强细胞间的紧密连接, 减少上皮细胞的凋亡, 阻止肠黏膜萎缩及炎症所致的通透性增加, 从而恢复并维持黏膜形态和功能的完整性^[5]。但对于其作用的具体机制目前尚无具体的报道。

Wiren *et al*^[6]利用肠切除的动物模型观察早期肠内谷氨酰胺补给对回肠黏膜表皮细胞生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-II (IGF-II)的影响, 发现Gln能特异性增加两者的水平。EGF是强有力的促细胞分裂因子, 对肠黏膜细胞具有促进生长和增生的作用^[7-8], p-ERK1/2转导通路被认为是EGF调节细胞生长和增生的一个关键通路^[9], 在EGF等生长因子刺激引起的细胞反

应中起重要调控作用^[10]。体外研究证实, EGF可以通过激活p-ERK1/2通路促进小肠上皮细胞的增生反应^[11-13], 因此我们推测Gln组p-ERK1/2在24 h时再次升高可能是Gln补充引起EGF增加的结果。

D-乳酸是肠道细菌特有的代谢产物, 在肠道应激缺血时, 肠道细菌产生的大量D-乳酸可通过受损的肠黏膜进入血循环, 引起血浆D-乳酸水平升高。在本实验中我们发现, 烧伤后D-乳酸均升高, Gln组在48和96 h时D-乳酸浓度基本恢复正常, 说明Gln早期肠内补给能改善肠黏膜屏障功能。这可能与Gln在的直接作用及间接调控有关。最新研究表明, Gln可以作为信号分子和生存因子, 起到减轻炎症反应和抗细胞凋亡的作用, 更为重要的是有试验证实Gln可以诱导HSP70的产生, 提高细胞生存能力^[14-29]; 另一方面, 在应激、感染等情况下, 由于钙耗竭等因素导致上皮细胞间紧密连接的重要成分Occludin去磷酸化而致紧密连接蛋白(TJ)的破坏^[30]; 而Basuroy *et al*^[31]利用Caco-2细胞的体外培养体系发现, p-ERK1/2直接和Occludin的C末端相互作用, 阻止Occludin苏氨酸残基的去磷酸化, 引起TJ蛋白及其相关信号分子的磷酸化, 从而上调上皮细胞间TJ的表达, 维护肠黏附的完整性及其屏障功能。我们通过Western blot法分析了肠黏膜中p-ERK1/2表达的变化, 发现Gln补充24 h后再次升高且持续一定的时间, 上述变化对于局部屏障功能的维护无疑是有益的, 这也可能是Gln组D-乳酸浓度下降的重要原因。

总之, 烧伤后早期肠内补给Gln能促进p-ERK1/2的表达, 从而促进肠黏膜细胞的增殖活化, 改善肠黏膜的屏障功能。这也可能是Gln改善伤后肠道功能的重要机制之一。

4 参考文献

- 1 Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-735
- 2 Thrane EV, Schwarze PE, Thoresen GH, Lag M, Refsnes M. Persistent versus transient map kinase (ERK) activation in the proliferation of lung epithelial type 2 cells. *Exp Lung Res* 2001; 27: 387-400
- 3 Zhao D, Letterman J, Schreiber BM. beta-Migrating very low density lipoprotein (beta VLDL) activates smooth muscle cell mitogen-activated protein (MAP) kinase via G protein-coupled receptor-mediated transactivation of the epidermal growth factor (EGF) receptor: effect of MAP kinase activation on beta VLDL plus EGF-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 2001; 276: 30579-30588
- 4 Coster J, McCauley R, Hall J. Glutamine: metabolism and application in nutrition support.

- Asia Pac J Clin Nutr* 2004; 13: 25-31
- 5 Ding LA, Li JS. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1327-1332
- 6 Wiren M, Adrian TE, Arnelo U, Permert J, Staab P, Larsson J. Early gastrointestinal regulatory peptide response to intestinal resection in the rat is stimulated by enteral glutamine supplementation. *Dig Surg* 1999; 16: 197-203
- 7 Berlanga-Acosta J, Playford RJ, Mandir N, Goodlad RA. Gastrointestinal cell proliferation and crypt fission are separate but complementary means of increasing tissue mass following infusion of epidermal growth factor in rats. *Gut* 2001; 48: 803-807
- 8 Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP, de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. *Toxicol Pathol* 2001; 29: 159-173
- 9 Krueger JS, Keshamouni VG, Atanaskova N, Reddy KB. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene* 2001; 20: 4209-4218
- 10 Sah JF, Eckert RL, Chandraratna RA, Rorke EA. Retinoids suppress epidermal growth factor-associated cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 9728-9735
- 11 Tanimura S, Nomura K, Ozaki K, Tsujimoto M, Kondo T, Kohno M. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *J Biol Chem* 2002; 277: 28256-28264
- 12 Lewis MD, Ham J, Rees DA, Lewis BM, Scanlon MF. Mitogen-activated protein kinase mediates epidermal growth factor-induced morphogenesis in pituitary GH3 cells. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 361-367
- 13 Marques SA, Dy LC, Southall MD, Yi Q, Smietana E, Kapur R, Marques M, Travers JB, Spandau DF. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 1026-1035
- 14 Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD, Ren H, Musch MW, Kahana M, Chang EB. Glutamine attenuates tumor necrosis factor- α release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 2003; 19: 1-6
- 15 Peng ZY, Hamiel CR, Banerjee A, Wischmeyer PE, Friese RS, Wischmeyer P. Glutamine attenuation of cell death and inducible nitric oxide synthase expression following inflammatory cytokine-induced injury is dependent on heat shock factor-1 expression. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 400-406; discussion 406-407
- 16 Morrison AL, Dinges M, Singleton KD, Odoms K, Wong HR, Wischmeyer PE. Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1625-1632
- 17 Singleton KD, Serkova N, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med* 2005; 33: 1206-1213
- 18 Singleton KD, Serkova N, Banerjee A, Meng X, Gamboni-Robertson F, Wischmeyer PE. Glutamine attenuates endotoxin-induced lung metabolic dysfunction: potential role of enhanced heat shock protein 70. *Nutrition* 2005; 21: 214-223
- 19 Peng ZY, Serkova NJ, Kominsky DJ, Brown JL, Wischmeyer PE. Glutamine-mediated attenuation of cellular metabolic dysfunction and cell death after injury is dependent on heat shock factor-1 expression. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 373-378; discussion 379
- 20 Wischmeyer PE. Glutamine: role in gut protection in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 607-612
- 21 Wischmeyer PE. The glutamine story: where are we now? *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 142-148
- 22 Wischmeyer PE. Glutamine: the first clinically relevant pharmacological regulator of heat shock protein expression? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 201-206
- 23 Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* 2002; 18: 225-228
- 24 Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2403-2410
- 25 Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock* 2001; 16: 398-402
- 26 Wischmeyer PE. Clinical applications of L-glutamine: past, present, and future. *Nutr Clin Pract* 2003; 18: 377-385
- 27 Ko YG, Kim EY, Kim T, Park H, Park HS, Choi EJ, Kim S. Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutamyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 2001; 276: 6030-6036
- 28 Exner R, Weingartmann G, Eliassen MM, Gerner C, Spittler A, Roth E, Oehler R. Glutamine deficiency renders human monocytic cells more susceptible to specific apoptosis triggers. *Surgery* 2002; 131: 75-80
- 29 Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. *Circulation* 2002; 106: 2601-2607
- 30 Simonovic I, Rosenberg J, Koutsouris A, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol* 2000; 2: 305-315
- 31 Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J* 2006; 393: 69-77

EGCG对乙酸诱导大鼠结肠炎的治疗作用及抗氧化机制

冉志华, 陈迟, 萧树东

冉志华, 陈迟, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院
消化内科 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
冉志华, 1999年德国海德堡大学医学系博士毕业, 教授, 博士生导师, 主要从事炎症性肠病和消化道肿瘤研究。
上海市重点学科建设资助项目, No. Y0205
通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市山东中路145号, 上海市消化疾病研究所。z-ran@online.sh.cn
电话: 021-63200874 传真: 021-63266027
收稿日期: 2006-10-18 接受日期: 2006-11-16

Therapeutic effect and antioxidation mechanism of epigallocatechin-3-gallate in rats with colitis induced by acetic acid

Zhi-Hua Ran, Chi Chen, Shu-Dong Xiao

Zhi-Hua Ran, Chi Chen, Shu-Dong Xiao, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China
Supported by the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipality, No. Y0205
Correspondence to: Dr. Zhi-Hua Ran, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. z-ran@online.sh.cn
Received: 2006-10-18 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effect and antioxidation mechanism of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in rats with acetic acid-induced colitis.

METHODS: Sixty male rats were randomly assigned into 4 groups: normal control ($n = 10$), model placebo ($n = 20$), EGCG ($n = 15$), sulfasalazine (SASP, $n = 15$). The rats in normal group were treated with regular feeding, while those in the other three groups were treated orally with normal saline (2 mL/d), EGCG [50 mg/(kg · d)], and SASP [0.25 g/(kg · d)] respectively for 7 days after the colitis model was induced by 80 g/L acetic acid. The general condition, food intake, weight, stool consistency, and bloody stool were observed, and then the disease activity index (DAI) and the therapeutic effects were evalu-

ated. All the rats were sacrificed on day 8. The colon mucosal damage index (CMDI), and histological scores were evaluated and the tissue contents of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) were measured as well.

RESULTS: As compared with the placebo and SASP, EGCG notably improved the DAI (1.1 ± 0.9 vs 3.9 ± 0.4 , 3.0 ± 1.2 , $P < 0.01$), CMDI (1.5 ± 0.9 vs 3.3 ± 0.6 , 2.3 ± 0.9 , $P < 0.05$) and histological scores (4.6 ± 3.1 vs 9.3 ± 2.8 , 7.9 ± 4.0 , $P < 0.01$). In comparison with those in model placebo group, the levels of NO and MDA in EGCG group were significantly reduced (NO: $9.1 \pm 5.6 \mu\text{mol/g}$ vs $15.4 \pm 5.0 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$; MDA: $0.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$ vs $1.5 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), while the level of SOD was increased remarkably ($3090.6 \pm 568.4 \text{ nkat/mg}$ vs $1373.6 \pm 410.1 \text{ nkat/mg}$, $P < 0.05$). Besides, the level of SOD was remarkably higher in EGCG group than that in SASP group ($3090.6 \pm 568.4 \text{ nkat/mg}$ vs $1268.6 \pm 431.8 \text{ nkat/mg}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: EGCG may ameliorate the inflammatory reactions in colitis by its antioxidative activity, and its therapeutic effect is superior to that of the conventional medicine SASP.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate; Colitis; Antioxidation; Mechanism

Ran ZH, Chen C, Xiao SD. Therapeutic effect and antioxidation mechanism of epigallocatechin-3-gallate in rats with colitis induced by acetic acid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):359-364

摘要

目的: 在大鼠结肠炎的模型中, 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)的治疗作用及其抗氧化损伤作用的机制。

方法: SD大鼠60只, 随机分为正常对照组($n = 10$)、模型安慰剂组($n = 20$)、EGCG治疗组($n = 15$)、柳氮磺吡啶(SASP)治疗组($n = 15$)。正常组常规饲养, 模型安慰剂组、EGCG

■背景资料

溃疡性结肠炎是一种发生于结肠黏膜的慢性、炎症性及溃疡性疾病, 病因未明, 可能与免疫、感染、遗传和精神因素有关, 主要症状是腹泻、黏液脓血便、腹痛, 并且病情轻重不一, 常反复发作, 病程漫长。本病好发于青、中年, 我国发病率较欧、美低, 且轻型病例多见, 但近20 a来本病的发病率有上升趋势。本病虽有药物控制病情, 但由于反复迁延, 常出现并发症, 甚至癌变。近年来, 应用中药及天然植物有效成分治疗溃疡性结肠炎取得一定进展, 但是, 其治疗的作用机制多不明确。

■研究前沿

溃疡性结肠炎虽有5-ASA类药物控制病情,但病程反复迁延,目前国内外尚未找到特异性治疗药物,寻找其他疗效显著且副作用小的药物以替代目前的常规药物已成为全世界研究的热点和主要方向。而表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是从中国绿茶中提取的一种成份,他是绿茶主要的活性和水溶性成份,占绿茶毛重的9%-13%,因为具有特殊的立体化学结构,EGCG具有非常强的抗氧化活性,在抗癌和心血管疾病方面担当了重要的角色,进一步开发其药用价值,尤其在溃疡性结肠炎治疗中的价值是当前的一大热点。

组、SASP组80 g/L乙酸造模后分别予以生理盐水2 mL/d、EGCG 50 mg/(kg·d)、SASP 0.25 g/(kg·d)灌胃治疗7 d,观察大鼠活动状态,进食量,体质量,大便性状,大便出血情况,计算疾病活动指数(DAI),判断疗效。第8天处死大鼠并进行结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分,组织学评级,测定组织一氧化氮自由基(NO)、脂质过氧化产物丙二醛(MDA)以及超氧化物歧化酶(SOD)含量。

结果:与模型安慰剂组相比,EGCG显著改善DAI(1.1 ± 0.9 vs 3.9 ± 0.4 , $P < 0.01$)、CMDI(1.5 ± 0.9 vs 3.3 ± 0.6 , $P < 0.05$)和组织学评级(4.6 ± 3.1 vs 9.3 ± 2.8 , $P < 0.01$)。与SASP组相比,EGCG显著改善DAI(1.1 ± 0.9 vs 3.0 ± 1.2 , $P < 0.01$)、CMDI(1.5 ± 0.9 vs 2.3 ± 0.9 , $P < 0.05$)和组织学评级(4.6 ± 3.1 vs 7.9 ± 4.0 , $P < 0.05$)。与模型安慰剂组相比,EGCG组NO含量显著下降(9.1 ± 5.6 $\mu\text{mol/g}$ vs 15.4 ± 5.0 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$),MDA含量也显著下降(0.9 ± 0.6 $\mu\text{mol/g}$ vs 1.5 ± 0.6 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$),SOD含量显著提高(3090.6 ± 568.4 nkat/mg vs 1373.6 ± 410.1 nkat/mg, $P < 0.05$)。与SASP组相比,EGCG组SOD含量显著提高(3090.6 ± 568.4 nkat/mg vs 1268.6 ± 431.8 nkat/mg, $P < 0.05$)。

结论:EGCG可通过抑制氧化损伤减轻结肠炎症反应,且疗效优于传统药物SASP。

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯;结肠炎;抗氧化;机制

冉志华, 陈迟, 萧树东. EGCG对乙酸诱导大鼠结肠炎的治疗作用及抗氧化机制. 世界华人消化杂志 2007;15(4):359-364
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/359.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是病因尚未确定的慢性非特异性肠道炎症性疾病,近年来有迹象表明我国UC的发生率正逐年增高。由于该疾病自然病程的复杂特殊及对患者生活质量的严重影响,UC的治疗现已成为消化系统疾病中的难点,日益受到关注^[1]。由于目前国内外尚未找到特异性治疗药物,寻找其他疗效显著且副作用小的药物以替代目前的常规药物已成为全世界研究的热点和主要方向。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶中茶多酚的主要成分,为全天然提取,无毒无害,具抗氧化、免疫调节及抗肿瘤等多种生物学活性。本实验将EGCG作为保护剂应用于

乙酸诱导的大鼠结肠炎模型,观察其治疗作用并探讨其抗氧化损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠,体质量 235 ± 4 g, 60只,由中国科学院上海实验动物中心提供。饲养环境:清洁级,温度为20-27°C,湿度为40%-70%,人工照明,12 h暗12 h明,全价颗粒料(Co^{60} 辐照),饮纯净水。80 g/L乙酸(分析纯 500 mL中国振亚化工厂,苏州),EGCG(罗氏公司,纯度99%),柳氮磺吡啶(SASP, 0.25 g/片,上海三维制药公司)。NO, MDA, SOD试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 分组造模治疗与标本采集 大鼠造模前称其体质量,随机分组。正常对照组10只,常规饲养。模型安慰剂组20只、EGCG治疗组和SASP治疗组各15只造模。按经典方法造模^[2],禁食不禁水24 h,予以乙醚麻醉后,取仰卧位,5 g/L肥皂水灌肠,插入直径3 mm的聚乙烯纤维导管至直肠内,注入80 g/L乙酸溶液1.5-2 mL,保留15 s后再注入生理盐水3-5 mL冲洗两次。造模24 h后开始治疗,3组分别予以生理盐水2 mL、EGCG 50 mg/kg, SASP 0.25 g/kg灌胃治疗,每日一次,连续7 d。第8天处死大鼠,分离结肠,沿肠系膜纵轴剪开,冷生理盐水冲洗干净,立即进行肉眼大体损伤评分及结肠长度测量。在远端结肠或横结肠取一块组织(5 mm×10 mm),另于炎症或溃疡处至少取1块组织,置40 g/L甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片(4 μm)、HE染色,组织学评级。另于远端结肠或炎症明显处取适量结肠新鲜标本,置于液氮中冻存。

1.2.2 观察指标 (1)疾病活动指数(DAI):体质量下降的百分率(体质量不变为0分,下降1%-5%为1分,下降5%-10%为2分,下降10%-15%为3分, >15%为4分)、大便黏稠度(正常为0分,松散但不附着于肛周为2分,腹泻为4分)和大便出血(正常0分,隐血阳性为2分,显性出血为4分)的均数即为DAI。DAI综合评分介于0-4分之间,0分代表正常,4分代表炎症最大活动度^[3]。(2)结肠黏膜损伤指数(CMDI):为大体标本评价,评分标准:无损伤为0分,轻度充血,水肿,表面光滑,无糜烂或溃疡为1分,充血水肿,黏膜粗糙呈颗粒状,有糜烂或肠黏连为2分,高度充血水肿,黏膜表面有坏死及溃疡形成,溃疡最大纵径<1.0 cm,肠壁增厚或表面有坏死及炎症为3分,在3分基础上

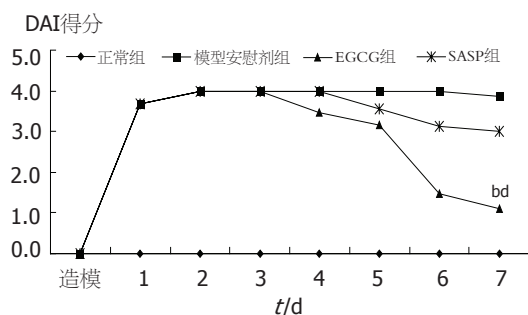


图1 DAI疾病活动指数变化图。^b $P<0.01$ vs 模型组; ^d $P<0.01$ vs SASP组。

溃疡最大纵径 >1.0 cm, 或全肠壁坏死为4分^[4]。

1.2.3 组织学评级 切片15个高倍视野的平均评分。指标为溃疡、炎症、肉芽肿、上皮细胞异型增生、病变深度, 按有无及轻中重度程度分别计为0, 1, 2和3, 病变深度达黏膜下层、肌层、浆膜层分别计为1, 2和3, 以上各项相加得总分。实验过程中死亡的动物疾病活动指数(DAI)计为4分, 但由于死亡原因与结肠炎并不一定相关, 因此死后的各项评分如组织学评级等不计入统计分析。

1.2.4 氧化损伤指标测定 将液氮冻存的组织标本研磨, 加入试剂盒提供的匀浆液, 制成的组织匀浆, 吸取上清液待测抗氧化指标, NO自由基、MDA、SOD测定分别根据试剂盒说明操作。NO自由基采用硝酸还原酶法, MDA采用硫代巴比妥酸法(TBA), SOD采用黄嘌呤氧化酶法。

统计学处理 统计软件为SAS6.12, 结果用均数±标准差表示, 各组总体比较采用单因素方差分析, 组间均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为统计学差异。

2 结果

2.1 实验大鼠一般情况及实验终点时死亡数 各组造模后大鼠24 h即出现腹泻、肉眼血便、体质量下降, 伴神萎、少动、毛松, 进食减少。EGCG组和SASP组治疗3, 4 d后症状好转, 血便逐渐消失, 大便性状改善, 体质量增加。实验终点时, 模型安慰剂组死亡9只, 4只肠穿孔, 3只肠出血, 2只巨结肠; EGCG组2只死于肠穿孔; SASP组死亡2只, 1只肠穿孔, 1只巨结肠。

2.2 DAI DAI是评判疾病活动情况和治疗效果的重要临床指标, DAI >0.5 即代表疾病发生。模型安慰剂组、EGCG组、SASP组在造模第2天即出现疾病发作。安慰剂组在整个实验过程中炎症活动持续, 无自愈倾向。EGCG组和SASP组

表1 各实验组大鼠结肠组织内NO, MDA和SOD含量检测结果

	NO ($\mu\text{mol/g}$)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (nkcat/mg)
正常组	8.5 ± 2.0	0.9 ± 0.5	3485.7 ± 583.5
模型安慰剂组	15.4 ± 5.0^a	1.5 ± 0.6^a	1373.6 ± 410.1^a
EGCG组	9.1 ± 5.6^c	0.9 ± 0.6^c	3090.6 ± 568.4^{bd}
SASP组	9.8 ± 7.7^c	1.4 ± 0.7	1268.6 ± 431.8

^a $P<0.05$ vs 正常组; ^c $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 模型安慰剂组; ^d $P<0.01$ vs SASP组。

分别在治疗后第3天和第4天开始出现DAI下降趋势, 实验终点时均有好转, EGCG组DAI(1.1 ± 0.9)低于SASP(3.0 ± 1.2)和安慰剂(3.9 ± 0.4), 具统计学显著差异($P<0.01$, 图1)。提示EGCG可减轻临床症状, 且疗效优于传统药物SASP。

2.3 CMDI 正常组黏膜光滑、完整, 未见病变。造模各组结肠均见明显肉眼病变, 结肠缩短变宽、水肿增厚、充血出血及溃疡。模型安慰剂组病变最重, 黏膜广泛糜烂坏死, 出血严重, 多发性溃疡, 并发肠黏连。EGCG及SASP组病变较轻, EGCG组以水肿、充血、片状出血为主, 散在溃疡, 但面积小。SASP组充血出血较明显, 溃疡多, 无肠黏连。CMDI指数EGCG组(1.5 ± 0.9)明显低于模型安慰剂组(3.3 ± 0.6)($P<0.01$), 亦低于SASP组(2.3 ± 0.9)($P<0.05$)。

2.4 组织学评级 光镜下见正常组黏膜上皮完整, 细胞形态正常, 杯状细胞可见, 腺体排列整齐, 黏膜下层、肌层、浆膜层结构清晰。模型安慰剂组黏膜上皮坏死脱落, 炎症渗出, 肉芽组织增生, 典型溃疡形成, 多且广泛, 溃疡周边上皮细胞异型增生明显, 黏膜下层及肌层水肿, 大量炎性细胞浸润, 可见出血性坏死, 系膜炎。EGCG组上皮细胞坏死轻, 溃疡小而浅, 大部分腺体结构保持完整, 排列稍紊乱, 炎性细胞浸润。肠壁各层结构基本完整。SASP组黏膜上皮细胞坏死脱落, 溃疡较多, 溃疡周边上皮细胞异型增生, 腺体结构破坏, 炎症细胞浸润(图2)。组织学评级EGCG组(4.6 ± 3.1)低于模型安慰剂组(9.3 ± 2.8)和SASP组(7.9 ± 4.0), P 值分别小于0.01和0.05。

2.5 氧化损伤指标 模型安慰剂组中NO自由基、MDA含量显著升高, SOD含量显著下降, EGCG组可降低组织内NO, MDA含量, 提高SOD含量, 具统计学差异; SASP抗氧化作用弱, 只能降低NO含量, 对降低MDA、提高SOD无作用(表1)。

■相关报道

Peng *et al*的研究表明EGCG有很强的还原能力, 因此能抑制组织的氧化损伤。Itoh和Basini *et al*的研究表明EGCG通过调节SOD发挥抗氧化损伤作用, 而氧化应激正是溃疡性结肠炎的发病原因之一, 他们的研究为应用EGCG开展溃疡性结肠炎治疗提供了有力的理论支持。

■创新盘点

目前针对结肠炎的治疗药物研究,很多仅局限于临床症状的观察,同时缺乏对天然植物有效成分及作用机制的探讨,本文在上述方面作了较大改进,对天然植物-茶叶的有效成分治疗结肠炎的效果和机制做了深入的研究。

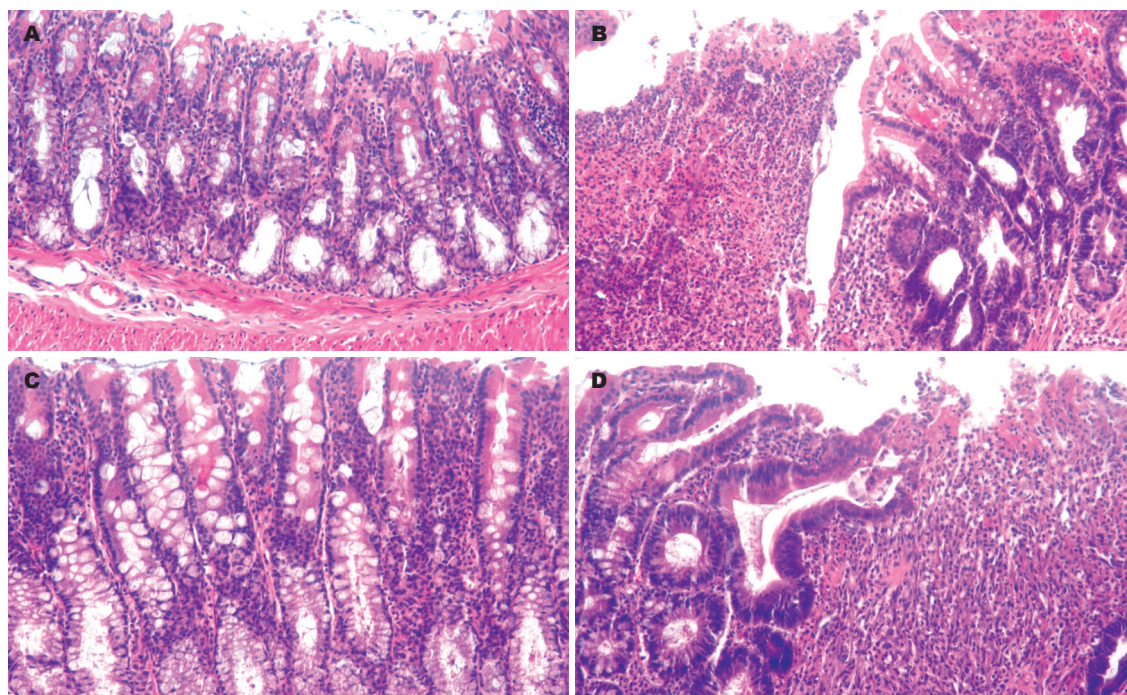


图2 结肠炎大鼠光镜下组织学观察(HE × 200). A: 正常组; B: 模型安慰剂组; C: EGCG组; D: SASP组。

3 讨论

由于UC病因和发病机制目前尚未完全阐明,因此治疗缺乏特异性,常用药物由于疗效的不肯定以及副作用带来的并发症并不能缩短UC的实际病程,对如何减少复发以及提高难治性患者的疗效仍然是一个难题.因此,目前在UC高发的欧美地区,辅助及替代治疗成为重要的治疗手段之一,其方法多种多样,主要包括纯天然制剂、中草药、营养学治疗(饮食及静脉营养)、复合维生素、肠益生菌、按摩针灸等^[5-9].大规模问卷调查显示欧美大约50% UC患者使用这些治疗,尤其在青少年UC患者中已取得很好的疗效^[10-11].为发掘新药并了解其作用机制,各种模拟人类疾病的动物模型应运而生.乙酸刺激法是实验性结肠炎的成熟经典动物模型^[12-13],主要机制是利用乙酸的化学刺激造成结肠黏膜屏障结构破坏,使血管通透性增加,炎症介质增多,激活激肽,促进纤维蛋白水解及干扰凝血过程等作用引起炎症.该法简单易行、稳定可靠、周期短、成功率高、重复性好,适合用于新药的开发和疗效评估。

近年来大量研究证实,EGCG是一种具有高效生物活性、全天然提取、无毒无害的化合物,在医学及生物学上有着广泛的应用前景,其药理作用主要有消除自由基、抗氧化;调节免疫、治疗免疫系统疾病;抑菌、抗病毒;抑制肿

瘤;防治心血管疾病;防辐射;抗衰老等^[14-17].因此,我们选择了EGCG作为保护剂.在动物实验中,根据体质量、大便性状、大便隐血、DAI指数、CMDI、组织学评级初步判断EGCG能显著改善乙酸所致大鼠结肠炎的临床症状,且疗效优于传统药物SASP.在EGCG药理机制的研究中发现EGCG可降低组织内NO,MDA含量,提高SOD含量,这正符合UC的发病机制.近年来国内外大量的研究证实氧化损伤是UC发病的重要机制,NO自由基、脂质过氧化产物丙二醛MDA增多,以及SOD抗氧化酶系活性降低都已被证明参与炎症的始动和发展.NO在体内参与诸多的病理生理过程,在UC早期,NO通过增加靶细胞内5-环磷酸鸟苷(5-cGMP)浓度及抑制P-选择素基因表达维持微循环的完整性,抑制血小板、白细胞在内皮细胞表面的黏附、积聚,防止血栓形成和内皮细胞与中性粒细胞、单核细胞的相互作用.而在UC中晚期,NO转变为氧化能力更强的氧化亚硝酸(OONO-),后者通过自由基链式反应导致含巯基蛋白和脂质的细胞膜、细胞器过氧化,从而使组织细胞损伤^[18].除NO自由基外,中性粒细胞还产生其他超氧化物和过氧化物破坏肠上皮^[19-21],这些活性氧产物通过触发细胞膜上的多链不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应并产生MDA等脂质过氧化物,引起细胞膜结构受损和细胞死亡^[22-23].活性氧产物和NO衍

■应用要点

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是从中国绿茶中提取的一种成份,他是绿茶主要的活性和水溶性成份,具有非常强的抗氧化活性,本研究探讨了EGCG对大鼠结肠炎的治疗作用,为使用EGCG治疗结肠炎提供了实验室的理论支持。

生物一起还可以造成细胞再生过程中的DNA损伤,从而使上皮发生异型增生,研究已证明这是导致UC癌变的重要原因^[24]。另外,机体的抗氧化系统功能削弱也加重了氧化损伤。SOD是存在于生物体内的重要的抗氧化酶系,能有效清除氧自由基,催化O₂-分解成H₂O₂,进而在过氧化氢酶的作用下分解成水和氧分子,从而抑制肠组织中的脂质过氧化反应^[25-26]。许多学者认为UC体内,特别是肠黏膜组织局部SOD活性降低,清除氧自由基能力降低是导致自由基堆积造成肠黏膜损伤的重要机制之一^[27-28]。因此,NO,MDA水平及SOD活性可间接反映机体的脂质过氧化反应强度和抗脂质过氧化反应的能力。而EGCG分子结构中含有多个游离酚羟基,能够提供氢质子参与还原反应,有很强的还原能力,因此能抑制组织的氧化损伤^[29]。国外一些实验表明EGCG通过调节SOD发挥抗氧化损伤作用^[30-31],为应用EGCG开展UC治疗提供了有力的理论支持。

总之,我们对EGCG治疗乙酸所致大鼠结肠炎的疗效做了评估,并发现其疗效优于传统药物SASP,机制为通过抑制氧化损伤从而减轻炎症反应,对EGCG的开发和临床应用提供了一定的理论意义和实践价值。

4 参考文献

- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-429
- Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39: 407-415
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-1355
- Myers KJ, Murthy S, Flanagan A, Witchell DR, Butler M, Murray S, Siwkowski A, Goodfellow D, Madsen K, Baker B. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor- α in two murine models of colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 411-424
- Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5941-5950
- Joos S, Wildau N, Kohlen R, Szecsenyi J, Schuppan D, Willich SN, Hahn EG, Brinkhaus B. Acupuncture and moxibustion in the treatment of ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1056-1063
- Joos S, Rosemann T, Szecsenyi J, Hahn EG, Willich SN, Brinkhaus B. Use of complementary and alternative medicine in Germany - a survey of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Complement Altern Med* 2006; 6: 19
- Ockenga J, Borchert K, Stuber E, Lochs H, Manns MP, Bischoff SC. Glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59: 1302-1309
- Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care* 2004; 7: 56-68
- Day AS, Whitten KE, Bohane TD. Use of complementary and alternative medicines by children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Paediatr Child Health* 2004; 40: 681-684
- Langhorst J, Anthonisen IB, Steder-Neukamm U, Ludtke R, Spahn G, Michalsen A, Dobos GJ. Amount of systemic steroid medication is a strong predictor for the use of complementary and alternative medicine in patients with inflammatory bowel disease: results from a German national survey. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 287-295
- Mustafa A, El-Medany A, Hagar HH, El-Medany G. Ginkgo biloba attenuates mucosal damage in a rat model of ulcerative colitis. *Pharmacol Res* 2006; 53: 324-330
- Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Chen R. Effects of four regulating-intestine prescriptions on pathology and ultrastructure of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4800-4806
- Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003; 133: 3275S-3284S
- Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Cooper KD, Mukhtar H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2117-2124
- Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 528-533
- Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 2001; 131: 27-32
- McCafferty DM. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 46: 436-439
- Cao W, Vrees MD, Potenti FM, Harnett KM, Fiocchi C, Pricolo VE. Interleukin 1 β -induced production of H₂O₂ contributes to reduced sigmoid colonic circular smooth muscle contractility in ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 60-70
- Cao W, Fiocchi C, Pricolo VE. Production of IL-1 β , hydrogen peroxide, and nitric oxide by colonic mucosa decreases sigmoid smooth muscle contractility in ulcerative colitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C1408-1416
- Sasaki K, Iizuka M, Konno S, Shindo K, Sato A, Horie Y, Watanabe S. Ecabet sodium prevents the delay of wound repair in intestinal epithelial cells induced by hydrogen peroxide. *J Gastroenterol* 2005; 40: 474-482
- Bartsch H, Nair J. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res* 2005; 591: 34-44
- Gulec B, Yasar M, Yildiz S, Oter S, Akay C, Deveci S,

■名词解释

1 溃疡性结肠炎: 是一种发生于结肠黏膜的慢性、炎症性及溃疡性疾病, 主要症状是腹泻、黏液脓血便、腹痛。病因未明, 可能与免疫、感染、遗传和精神因素有关。

2 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG): 是从中国绿茶中提取的一种成份, 他是绿茶主要的活性和水溶性成份, 占绿茶毛重的9%-13%, 具有非常强的抗氧化活性, 在抗肿瘤和心血管疾病方面担当了重要的角色。

■同行评价

本文研究了EGCG对乙酸诱导大鼠结肠炎的治疗作用及抗氧化机制,总体设计清楚,方法严谨,具有较高的理论价值。

- Sen D. Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. *Physiol Res* 2004; 53: 493-499
- 24 Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 2003; 24: 353-362
- 25 Liu LN, Mei QB, Liu L, Zhang F, Liu ZG, Wang ZP, Wang RT. Protective effects of Rheum tanguticum polysaccharide against hydrogen peroxide-induced intestinal epithelial cell injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1503-1507
- 26 Jubeh TT, Nadler-Milbauer M, Barenholz Y, Rubinstein A. Local treatment of experimental colitis in the rat by negatively charged liposomes of catalase, TMN and SOD. *J Drug Target* 2006; 14: 155-163
- 27 Barazzone C, White CW. Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia: role of cytokines and Bcl-2 family proteins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 517-519
- 28 Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001; 194: 1207-1218
- 29 Peng IW, Kuo SM. Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *J Nutr* 2003; 133: 2184-2187
- 30 Itoh Y, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Examination of the anti-oxidative effect in renal tubular cells and apoptosis by oxidative stress. *Urol Res* 2005; 33: 261-266
- 31 Basini G, Bianco F, Grasselli F. Epigallocatechin-3-gallate from green tea negatively affects swine granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 28: 243-256

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。

表皮生长因子介导的核转录因子- κ B活化促进胰腺癌细胞尿激酶型纤溶酶原激活物表达及侵袭和转移

刘宇, 张浩, 郭仁宣

刘宇, 张浩, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外二科
辽宁省沈阳市 110001

刘宇, 医学博士, 主要从事肝、胆、胰腺肿瘤的外科治疗.

通讯作者: 张浩, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一
医院普外二科. liuyuhouseman@yahoo.com.cn

电话: 024-83283330

收稿日期: 2006-10-13 接受日期: 2006-11-08

Epidermal growth factor-mediated nuclear factor kappa B activation induces urokinase plasminogen activator expression and invasion, metastasis of pancreatic cancer cells

Yu Liu, Hao Zhang, Ren-Xuan Guo

Yu Liu, Hao Zhang, Ren-Xuan Guo, the Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Hao Zhang, the Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. liuyuhouseman@yahoo.com.cn

Received: 2006-10-13 Accepted: 2006-11-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of epidermal growth factor (EGF) on the adhesion, proliferation, and invasion as well as the expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and urokinase plasminogen activator (uPA) of pancreatic cancer cell line KP4.

METHODS: The invasion, adhesion and proliferation of pancreatic cancer cell line KP4 were examined by the corresponding test, respectively. Western blot, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were used to investigate NF- κ B activity and uPA expression. The changes of NF- κ B activity, uPA expression and invasion of tumor cells were observed as pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), a NF- κ B inhibitor, was used.

RESULTS: EGF significantly increased the invasion of KP4 cells in a concentration-dependent way (50, 25, 5 μ g/L vs 0 μ g/L: 116 ± 13 , 97 ± 10 , 83 ± 7 vs 72 ± 5 ; $t = 3.552$, 3.018 , 2.373 ; $P = 0.006$, 0.015 , 0.042), but did not affect the proliferation or adhesion of the cells. NF- κ B activity was obviously enhanced with the increasing of EGF concentration. EGF up-regulated the expression of uPA at both mRNA and protein levels in a dose-dependent manner. In addition, pretreatment with PDTC markedly attenuated EGF-induced NF- κ B activity, uPA expression as well as invasion of pancreatic cancer cells.

CONCLUSION: EGF can induce uPA expression by NF- κ B activation, which accelerates the invasion and metastasis of pancreatic cancer cells.

Key Words: Epidermal growth factor; Pancreatic cancer; Urokinase plasminogen activator; Nuclear factor kappa B

Liu Y, Zhang H, Guo RX. Epidermal growth factor-mediated nuclear factor kappa B activation induces urokinase plasminogen activator expression and invasion, metastasis of pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):365-369

摘要

目的: 观察表皮生长因子(EGF)对胰腺癌细胞KP4增殖、黏附及侵袭力和核转录因子(NF- κ B)、尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)表达的影响。

方法: 通过细胞侵袭、增殖及黏附实验观察在EGF影响下肿瘤细胞侵袭、增殖及黏附能力变化。Western blot, RT-PCR及EMSA实验检测胰腺癌细胞的NF- κ B活性和uPA表达并观察在NF- κ B抑制物PDTC抑制下EGF诱导的NF- κ B活性和uPA表达及肿瘤细胞侵袭力变化。

结果: EGF能够明显促进胰腺癌细胞的侵袭能力, 具有明显的剂量依赖性(50, 25, 5 μ g/L vs 0 μ g/L: 116 ± 13 , 97 ± 10 , 83 ± 7 vs 72 ± 5 ; $t = 3.552$, 3.018 , 2.373 ; $P = 0.006$, 0.015 , 0.042), 然而对增殖及黏附力无明显影响。随着EGF浓度

■背景资料

表皮生长因子及其受体在胰腺癌中表达明显增高, 并与肿瘤的发展和预后密切相关, 提示可能促进胰腺癌细胞侵袭而加速肿瘤的进程。然而, 其促进胰腺癌细胞侵袭的机制还有待进一步阐明。

■应用要点

本研究为EGF促进胰腺癌细胞侵袭力增强这一功能提供了进一步的证据。通过抑制肿瘤细胞NF- κ B通路,可以降低胰腺癌细胞的侵袭和转移特征,为胰腺癌生物靶向治疗开辟了一条新途径。

的增加, NF- κ B活性明显增强。EGF上调uPA蛋白及mRNA表达,具有浓度依赖性。PDTC显著抑制EGF诱导的NF- κ B活性、uPA表达及胰腺癌细胞的侵袭力。

结论: EGF通过激活NF- κ B而诱导uPA表达,促进胰腺癌细胞的侵袭和转移。

关键词: 表皮生长因子; 胰腺癌; 尿激酶型纤溶酶原激活物; 核转录因子- κ B

刘宇, 张浩, 郭仁宣. 表皮生长因子介导的核转录因子- κ B活化促进胰腺癌细胞尿激酶型纤溶酶原激活物表达及侵袭和转移. 世界华人消化杂志 2007;15(4):365-369

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/365.asp>

0 引言

胰腺癌是一种较常见的恶性肿瘤。90%的患者在诊断后1 a内死亡, 5 a生存率仅为1%-3%。早期的侵袭和转移而导致的肿瘤扩散是引起患者死亡的重要原因之一。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体在胰腺癌中表达明显增高, 并与肿瘤的发展和预后密切相关^[1-4], 提示EGF可能促进胰腺癌细胞侵袭而加速肿瘤进程。然而, EGF促进胰腺癌细胞侵袭的机制还有待进一步阐明。肿瘤侵袭转移是一个多步骤的复杂过程, 包括肿瘤细胞的黏附和脱黏附、细胞外基质的降解和重建等过程。胞外基质降解是肿瘤浸润转移的首要步骤和分子基础, 大量的研究资料表明, 尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)参与胞外基质降解, 在肿瘤浸润和转移中起到重要作用^[5-9]。核转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)参与调控侵袭相关基因表达, 是促进肿瘤细胞的侵袭和转移的重要转移因子^[10-15]。本文研究了EGF对胰腺癌细胞侵袭、增殖及黏附力的影响和其对NF- κ B活性、uPA表达的影响, 探讨EGF促进胰腺癌侵袭的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞系KP4由日本九州大学医学部外科片野光男教授惠赠。用含双抗及100 mL/L小牛血清的DMEM培养液, 在37℃含50 mL/L CO₂的培养箱中传代培养。人重组EGF购自Biomedical Technologies公司。

1.2 方法

1.2.1 Transwell体外侵袭实验 应用24孔Transwell侵袭小室进行侵袭实验(美国Millipore公司)。上

室的聚碳酸酯膜-Matrigel (250 μ g/cm²) 在37℃聚合后待用。不同浓度的EGF处理细胞24 h后, PBS洗2次后, 在上室孔中准确加入细胞 2×10^5 /孔, 下室中加入趋化因子400 μ L (MRC-5细胞48 h无血清的条件培养液), 培养8 h。待培养时间结束后将Transwell上室的附着细胞用湿棉签擦去, 苏木精染色, 封片后显微镜下(300倍)观察穿过膜的细胞数。每张膜中央部分和周围部分各随机取3个视野, 计数每个视野内的穿过8 μ m微孔的细胞数, 每组重复3次。

1.2.2 细胞增殖实验 于24孔培养皿内接种 1×10^4 个对数生长期的细胞, 24 h后分别加入不同浓度的EGF, 48 h后采用WST-1细胞增殖试剂盒(TaKaRa, Kyoto, Japan)对细胞增殖情况进行检测, 具体方法参见厂家说明书。

1.2.3 细胞黏附实验 Matrigel (30 μ g/孔)包被24孔培养板后37℃过夜待用。不同浓度的EGF处理细胞24 h后, 按 5×10^4 个细胞(50 μ L)/孔将细胞加入包被Matrigel的24孔板, 50 mL/L CO₂培养箱内于37℃孵育1 h。PBS漂洗3次移去悬浮细胞, 黏附细胞数经WST-1细胞增殖试剂盒测定吸光度进行评估。

1.2.4 Western印记实验 不同浓度的EGF处理胰腺癌细胞48 h后, PBS洗后离心弃上清, 适当体积裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.0), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 1 g/L SDS, 1 mg/L抑肽酶, 10 mg/L抑胃酶肽, 10 mg/L亮抑蛋白酶肽, 10 mg/L抑蛋白酶肽, 10 mg/L大豆胰蛋白酶抑制剂]重悬细胞, 超声裂解细胞45 s, 4℃ 15 000 g离心20 min, 收集上清-70℃保存。BCA定量试剂盒测定蛋白浓度(Bio-Rad, Hercules, CA)。取等量蛋白泳道上样, 经100 g/L十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。封闭缓冲液[0.1 mmol/L三羟甲基氨基甲烷缓冲液盐水(TBS), 50 g/L脱脂奶粉, 1 g/L吐温20]封闭, 加入1:500抗MMP-2 (FUJI Chemical Industries, LTD, Toyama, Japan), MMP-9(Santa Cruz, CA), β -actin(Biomedical Technologies, Stoughton, MA) 4℃孵育过夜。1:2000稀释的酶标二抗室温孵育1 h, TBS洗净后, 增强化学发光剂(ECL)显色, 暗房中压片, 观察结果。

1.2.5 RT-PCR实验 细胞总RNA的提取采用ISOGEN总RNA提取试剂盒(Nippon Gene,

表 1 EGF对胰腺癌细胞的侵袭、增殖及黏附力的影响(mean \pm SD)

实验方法	EGF (μ g/L)			
	0	5	25	50
细胞侵袭实验	72 \pm 5	83 \pm 7 ^a	97 \pm 10 ^a	116 \pm 13 ^a
细胞增殖实验	0.151 \pm 0.027	0.139 \pm 0.007	0.142 \pm 0.012	0.143 \pm 0.006
细胞黏附实验	0.324 \pm 0.024	0.330 \pm 0.017	0.328 \pm 0.016	0.323 \pm 0.025

^a $P < 0.05$ vs EGF 0 μ g/L.

Tokyo, Japan), 具体方法参见厂家说明. 电泳鉴定RNA质量并在 $A_{260\text{nm}}$ 测其浓度. 所有引物均经GenBank查询为目前已知基因特异性引物序列. uPA sense(5'-AGAATTCACCACCATCGAGA-3'), antisense(5'-ATCAGCTTCACAACAGTCAT-3'), 474 bp. GAPDH sense (5'-CCACCCATGGCAA ATTCCATGGCA-3'), antisense (5'-TCTAGACG GCAGGTCAGGTCCACC-3'), 593 bp. 按第一链合成试剂盒说明进行逆转录(TaKaRa, Kyoto, Japan). PCR扩增条件: 变性94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火55 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环30次. PCR产物以20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 用溴化乙锭染色后长波紫外灯下观测照相, 观察结果.

1.2.6 EMSA实验 应用EMSA实验检测细胞的NF- κ B的活性, 提取不同浓度EGF处理后的胰腺癌细胞的核蛋白各5 μ g, 分别于结合液[20 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.9), 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 100 g/L glycerol, 2 g/L NP-40, 聚乙烯, ³²P标记的包含NF- κ B结合位点的双链寡核苷酸(核酸序列为5'-AGTTGAGGGG ACTTTCCAGGC-3', 购自美国Promega公司)]中室温下作用30 min, 反应后的混合物上样于40 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 行放射自显影.

1.2.7 NF- κ B抑制因子PDTC(pyrrolidine dithiocarbamate)抑制实验 NF- κ B抑制因子PDTC预先处理胰腺癌细胞2 h, 依照上述方法进行细胞侵袭、增殖及黏附实验、Western印记实验、RT-PCR实验和EMSA实验. 观察PDTC干预下的细胞侵袭、增殖、黏附能力变化及NF- κ B活性和uPA的表达情况, 作直方图比较.

统计学处理 所有数据均在SPSS13.0软件包上进行, 实验数据用mean \pm SD表示. 组间数据的比较采用两样本均值的 t 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异的检验标准.

2 结果

2.1 EGF对胰腺癌细胞侵袭、增殖及黏附的影响

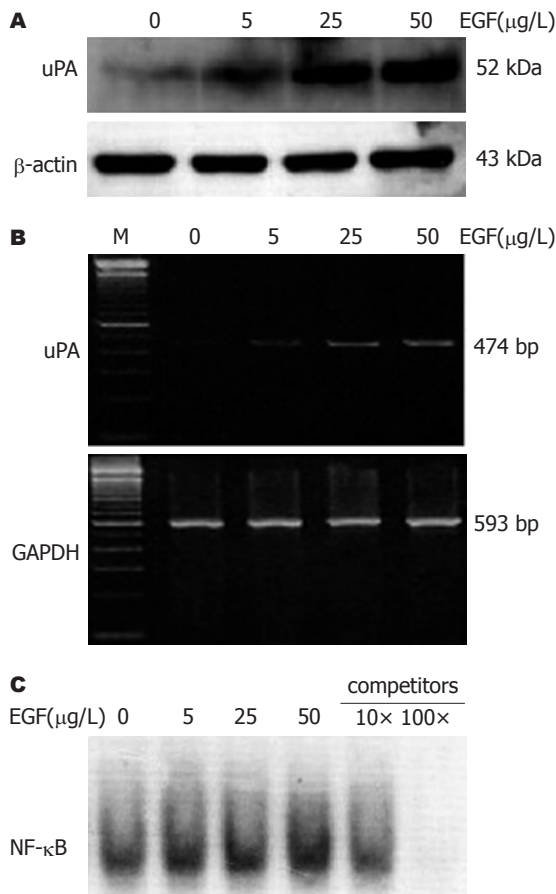


图 1 EGF对uPA表达和NF- κ B活性的影响. A: Western blot; B: RT-PCR; C: EMSA.

EGF能够明显促进胰腺癌细胞的侵袭能力(分别为83 \pm 7 vs 72 \pm 5, $t = 2.373$, $P = 0.042 < 0.05$; 97 \pm 10 vs 72 \pm 5, $t = 3.018$, $P = 0.015 < 0.05$; 116 \pm 13 vs 72 \pm 5, $t = 3.552$, $P = 0.006 < 0.01$), 具有明显的剂量依赖性. 然而, 即使浓度达到100 μ g/L, EGF对胰腺癌细胞的增殖及黏附力并无明显影响(表1).

2.2 EGF对胰腺癌细胞表达uPA及NF- κ B活性的影响 uPA及NF- κ B与胰腺癌细胞的侵袭密切相关^[16-17], 因此, 我们检测了EGF对胰腺癌细胞表达uPA及NF- κ B活性的影响. Western blot实验显

同行评价

本文研究了EGF对胰腺癌细胞侵袭、增殖及黏附力的影响和其对NF- κ B活性、uPA表达的影响, 探讨EGF促进胰腺癌侵袭的相关机制, 研究目的明确, 思路清晰, 方法设计合理, 图表清晰, 结论可靠.

示, EGF处理后, 肿瘤细胞的uPA活性明显升高, 有剂量依赖性. RT-PCR与Western blot一致, EGF上调uPA mRNA表达(图1A-B). EMSA结果显示随着EGF浓度的增加, NF- κ B活性明显增强, 具有明显的剂量依赖性. 竞争实验表明条带有特异性(图1C).

2.3 NF- κ B抑制物PDTC(pyrrolidine dithiocarbamate)抑制EGF介导的NF- κ B活性及uPA表达及肿瘤细胞侵袭力 NF- κ B抑制物PDTC明显抑制EGF诱导的NF- κ B的活化, 同时也抑制EGF介导的uPA表达及胰腺癌细胞侵袭力, 表明EGF是通过激活NF- κ B进一步上调uPA表达, 促进肿瘤侵袭(图2).

3 讨论

大多数的胰腺癌患者死于肿瘤的侵袭及转移, 虽然目前已经发现EGF及其受体的高表达与胰腺癌的增殖和局部侵袭有关, 但其确切的分子机制还不明了. 我们的研究表明, EGF与胰腺癌细胞的侵袭力存在剂量依赖性. 而且, 为了进一步阐明其中的分子机制, 我们还观察了在EGF影响下的细胞黏附、增殖能力变化, 检测了胰腺癌细胞uPA和NF- κ B的活性实验结果显示肿瘤细胞的侵袭力与EGF呈剂量依赖性正相关. 尽管肿瘤细胞的增殖和黏附也与其侵袭力密切相关, 但在我们的研究中EGF并没有明显增加细胞的增殖和黏附力. 这表明EGF对胰腺癌细胞的侵袭促进作用与这种细胞株的增殖、黏附无关, 提示还有其他的机制在发挥作用.

肿瘤侵袭是一个复杂的过程, 与肿瘤细胞的增殖、黏附、移动及分泌各种酶类有关. 在这些环节中, 细胞外基质和细胞基底膜的降解是肿瘤侵袭过程中的关键所在. uPA作用系统被认为在细胞外基质和基底膜的降解、促进肿瘤侵袭转移过程中起核心作用^[18]. 高水平的uPA已经被证实代表了快速增殖和低分化胰腺癌的高侵袭性的临床特征, 而在几种胰腺细胞株中也有报道称uPA系统的激活与侵袭力有关^[19-20]. 我们证实了EGF可以显著诱导uPA的活性及表达^[21-23], 提示uPA参与了EGF诱导肿瘤细胞的侵袭. 进一步我们对EGF激活uPA的机制进行了研究. NF- κ B对uPA表达的作用已经得到证实^[24-27], 最近的研究证明, 在某些特定的肿瘤细胞中EGF可以激活NF- κ B^[28-29]. 本研究显示EGF显著激活了NF- κ B活性, 而且, 其诱导uPA的表达可以被NF- κ B抑制因子PDTC抑制, 提示EGF调节uPA活

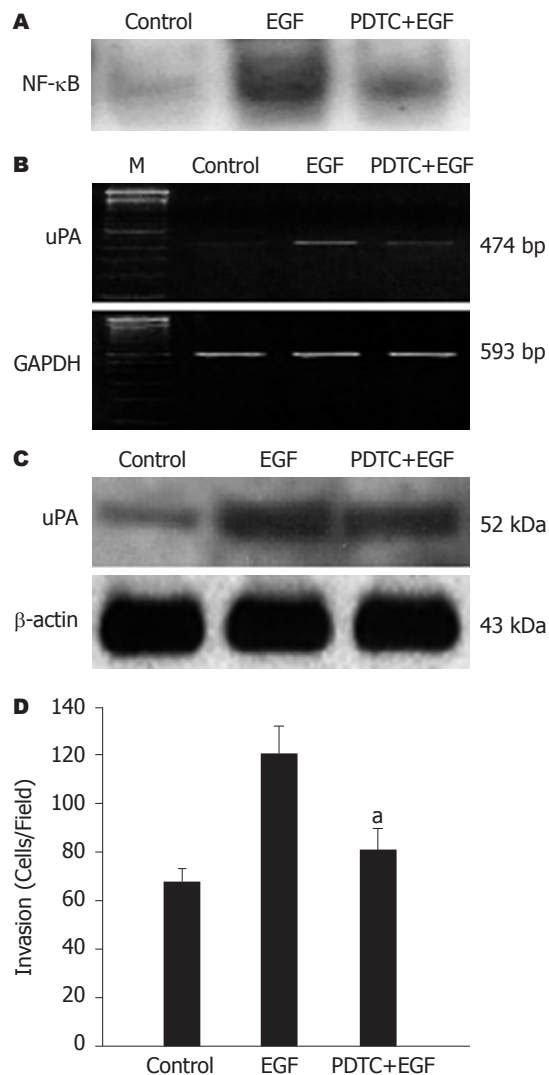


图2 PDTC抑制EGF诱导的NF- κ B活性和uPA表达及肿瘤细胞侵袭力. A: EMSA; B: RT-PCR; C: Western blot; D: 细胞侵袭实验, ^a $P < 0.05$ vs EGF组.

性与激活NF- κ B有关. 因此, 我们可以推测在这些胰腺癌细胞中EGF诱导uPA表达是通过或至少是部分通过激活NF- κ B来实现的. 为证实EGF是通过上调NF- κ B活性来提高肿瘤细胞侵袭力的理论, 我们进行了NF- κ B抑制因子PDTC干预下的侵袭实验. 在PDTC干预下, EGF激发细胞侵袭力增加的能力被抑制了, 这表明由EGF引起肿瘤细胞侵袭力的增加与NF- κ B的活化有关. 但是, 抑制NF- κ B的活性并不能完全阻断EGF对肿瘤细胞侵袭力的影响, 这说明NF- κ B并不是EGF诱导肿瘤侵袭唯一的下游事件, 一定存在某个或多个其他通路. 进一步分析其他可能的信号通路, 将对阐明EGF诱导肿瘤细胞侵袭机制有所帮助.

总之, 我们的研究为EGF促进胰腺癌细胞侵袭力增强这一功能提供了进一步的证据. 概括

的讲, EGF通过激活了NF- κ B的活性, 进而诱导了uPA的表达, 增高其对细胞基底膜及细胞外基质的降解, 导致细胞侵袭力的增加, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 而这一过程可被NF- κ B抑制因子-PDTC抑制. 这一通路发现的意义在于通过抑制肿瘤细胞NF- κ B通路, 可以降低胰腺癌细胞的侵袭和转移特征, 为胰腺癌生物靶向治疗开辟了一条新途径.

4 参考文献

- Zhang Y, Banerjee S, Wang ZW, Marciniak DJ, Majumdar AP, Sarkar FH. Epidermal growth factor receptor-related protein inhibits cell growth and induces apoptosis of BxPC3 pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3877-3882
- Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Mark Evers B. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004; 239: 763-769; discussion 769-771
- 方友文, 许国铭, 朱人敏, 张洪富, 李兆申. 胰腺癌组织表皮生长因子mRNA表达的意义. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 256-257
- Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Ohtani K, Rutherford T, Naftolin F. Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and ezrin translocation are stimulated by interleukin 1 α and epidermal growth factor. *Cancer* 2001; 92: 3068-3075
- Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, Caputi M, Carriero MV, Iaccarino I, Stoppelli MP. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* 2005; 93: 205-211
- 秦蓉, 盛霞, 吴继锋, 王道斌. 胃癌组织中uPA系统及VEGF表达与侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 706-710
- 汤文浩, 李国强, 王凤臣, 高乃荣, 嵇振岭, 杨德同, 王尔慧. 胰腺癌组织中纤溶成份的表达及其意义. *中国肿瘤临床与康复* 2002; 9: 11-13
- 刘军, 张晓明. 乳腺癌尿激酶型纤溶酶原激活物及其特异受体表达及意义. *肿瘤学杂志* 2005; 11: 202-204
- 王勇, 毛伯镛, 程宏伟, 王洪新. uPA和KDR在髓母细胞瘤中的表达及意义. *中华神经外科杂志* 2003; 19: 106-108
- 田芳, 许培荣, 侯卫红, 刘红涛, 陈奎生, 薛乐勋. NF- κ B信号通路在食管鳞癌细胞系中的激活. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 11-14
- 李子红, 潘宏铭, 汤元兴, 金梅. NF- κ B表达与胃癌的相关性研究. *浙江临床医学* 2006; 8: 114-115
- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/1 κ B α kinase-dependent nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 38921-38935
- 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春. 肝癌组织中TGF- β 1、TGF- β 1 R II和NF- κ B的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1663-1666
- Suh J, Rabson AB. NF- κ B activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004; 91: 100-117
- Rahman KM, Li Y, Sarkar FH. Inactivation of akt and NF- κ B play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr Cancer* 2004; 48: 84-94
- 吴桂珠, 郑秀. 肿瘤的浸润、转移与uPA系统的关系. *海峡预防医学杂志* 2005; 11: 25-27
- Wang Z, Sengupta R, Banerjee S, Li Y, Zhang Y, Rahman KM, Aboukameel A, Mohammad R, Majumdar AP, Abbruzzese JL, Sarkar FH. Epidermal growth factor receptor-related protein inhibits cell growth and invasion in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7653-7660
- 邓玮, 易永芬, 刘丹丹. 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 660-665
- Tan X, Egami H, Nozawa F, Abe M, Baba H. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 28: 369-374
- Nielsen A, Scarlett CJ, Samra JS, Gill A, Li Y, Allen BJ, Smith RC. Significant overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 256-263
- Henic E, Sixt M, Hansson S, Hoyer-Hansen G, Casslen B. EGF-stimulated migration in ovarian cancer cells is associated with decreased internalization, increased surface expression, and increased shedding of the urokinase plasminogen activator receptor. *Gynecol Oncol* 2006; 101: 28-39
- Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL, Biordi L, Millimaggi D, Muzi P, Vicentini C, Bologna M. Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost* 2005; 93: 964-975
- Mahabeleshwar GH, Das R, Kundu GC. Tyrosine kinase, p56lck-induced cell motility, and urokinase-type plasminogen activator secretion involve activation of epidermal growth factor receptor/extracellular signal regulated kinase pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 9733-9742
- Li H, Ye X, Mahanivong C, Bian D, Chun J, Huang S. Signaling mechanisms responsible for lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator expression in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10564-10571
- Sliva D. Signaling pathways responsible for cancer cell invasion as targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 327-336
- Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: its role in regulation of cell motility and nuclear factor κ B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB Life* 2005; 57: 441-447
- Cicek M, Fukuyama R, Welch DR, Sizemore N, Casey G. Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor- κ B activity. *Cancer Res* 2005; 65: 3586-3595
- Liptay S, Weber CK, Ludwig L, Wagner M, Adler G, Schmid RM. Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF- κ B/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003; 105: 735-746
- Haussler U, von Wichert G, Schmid RM, Keller F, Schneider G. Epidermal growth factor activates nuclear factor- κ B in human proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F808-815

电编 张敏 编辑 张焕兰

大肠癌组织bFGF, PKB, Cyclin A的表达及其与临床的相关性

林杰, 王桂玲, 单吉贤

■背景资料

近年来, 细胞生长因子、信号转导与肿瘤的关系已日益受到重视. bFGF作为一种细胞丝裂原和促血管生成因子, 可能参与肿瘤病理发生的主要途径, 具有重要的研究价值. PKB是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, PKB是磷脂酰肌醇3-激酶的下游靶蛋白, PKB成为信号转导深入研究的焦点, 所介导细胞存活且在恶性肿瘤发生中起着关键的作用. 细胞周期是所有肿瘤发生机制的“最后公路”. Cyclin A是参与细胞周期G₂/M转换的重要作用的蛋白, 其过度表达使细胞周期G₂/M转换时间缩短, 进而促进细胞周期的进程和细胞过度增殖, 导致细胞癌变.

林杰, 单吉贤, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

王桂玲, 中国医科大学细胞生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001

林杰, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科博士生, 主要从事消化道肿瘤的研究工作.

通讯作者: 单吉贤, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科. wanggl2000@163.com

电话: 024-23256666-6228

收稿日期: 2006-09-29 接受日期: 2006-11-02

Expression of basic fibroblast growth factor, protein kinase B, Cyclin A and their clinical significances in colorectal cancer

Jie Lin, Gui-Ling Wang, Ji-Xian Shan

Jie Lin, Ji-Xian Shan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Gui-Ling Wang, Department of Cell Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ji-Xian Shan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. Wanggl2000@163.com

Received: 2006-09-29 Accepted: 2006-11-02

Abstract

AIM: To investigate the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), protein kinase B (PKB), and Cyclin A in colorectal cancer and their correlations with the clinical pathology.

METHODS: After RNA was extracted by TRIzol method from 60 cases of colorectal cancer, their adjacent tissues and 10 cases of normal colorectal tissues, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of bFGF, PKB, Cyclin A. The correlation between the results and clinical pathology was analyzed.

RESULTS: Compared with those in the cancer-adjacent tissues, the expression of bFGF, PKB, Cyclin A mRNA were significantly up-regulated in colorectal cancer tissues (bFGF: 60% vs 10%; PKB: 55% vs 35%; Cyclin A: 70% vs 5%; all $P < 0.05$).

0.05), which were significantly correlated with Dukes stages (bFGF: $\chi^2 = 4.434$, $P < 0.05$; PKB: $\chi^2 = 13.549$, $P < 0.01$; Cyclin A: $\chi^2 = 21.210$, $P < 0.01$). The level of PKB expression was markedly higher in lowly-differentiated tumor than that in highly and moderately-differentiated one (14/14 vs 29/46, $P < 0.05$), but Cyclin A expression showed reverse results (3/14 vs 37/46, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of bFGF, PKB, Cyclin A mRNA may play important roles in the carcinogenesis and development of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Basic fibroblast growth factor; Protein kinase B; Cyclin A; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Lin J, Wang GL, Shan JX. Expression of basic fibroblast growth factor, protein kinase B, Cyclin A and their clinical significances in the colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):370-374

摘要

目的: 研究大肠癌组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、蛋白激酶B(PKB)及细胞周期蛋白A(Cyclin A)mRNA的表达水平及与临床病理的关系.

方法: 采用TRIzol法分别提取60例大肠癌组织、癌旁组织和10例正常组织的RNA, 应用RT-PCR方法检测bFGF, PKB, Cyclin A mRNA的表达水平, PCR产物经凝胶成像及分析系统扫描后, 以 β -actin为参照标化bFGF, PKB, Cyclin A的含量. 通过统计学分析其与临床病理关系.

结果: bFGF, PKB, Cyclin A在大肠癌组织中的表达与癌旁组织相比有显著差异(bFGF: 60% vs 10%; PKB: 55% vs 35%; Cyclin A: 70% vs 5%; all $P < 0.05$), 其表达水平与大肠癌Dukes分期有关(bFGF: $\chi^2 = 4.434$, $P < 0.05$; PKB: $\chi^2 = 13.549$, $P < 0.01$; Cyclin A: $\chi^2 = 21.210$, $P < 0.01$). PKB在低分化肿瘤中的表达阳性率高于中高分化肿瘤(14/14 vs 29/46, $P < 0.05$). Cyclin A的表达在高、中分化肿瘤中明显高于低分化肿

瘤(37/46 vs 3/14, $P<0.05$).

结论: bFGF, PKB, Cyclin A的mRNA水平与大肠癌的发生、发展相关.

关键词: 大肠癌; 碱性成纤维细胞生长因子; 蛋白激酶B; 细胞周期蛋白A; 逆转录-聚合酶链反应

林杰, 王桂玲, 单吉贤. 大肠癌组织bFGF, PKB, Cyclin A的表达及其与临床的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(4):370-374

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/370.asp>

0 引言

大肠癌是我国发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一, 其发病机制尚未完全清楚. 手术治疗是大肠癌首选治疗方法, 但相当一部分在发现时已出现浸润或转移, 即便手术切除之后仍有复发, 对放疗和化疗的治疗效果亦不甚理想. 细胞生长因子、信号转导与肿瘤的关系已日益受到重视. 我们采用RT-PCR法检测了60例大肠癌组织及相应癌旁黏膜、正常黏膜中bFGF, PKB及Cyclin A mRNA的表达水平, 并结合临床病理情况进行分析, 以探讨其在大肠癌发生发展过程中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 辽宁省肿瘤医院2005-01/2005-05大肠癌手术切除的新鲜标本60例, 其中男38例, 女22例; 年龄27-78(平均55.4)岁. 其中高分化28例(47%), 中分化18例(30%), 低分化14例(23%); Dukes分期A期14例(23%), B期20例(33%), C期+D期26例(44%). 每例标本于手术中取250 mg左右组织, 置于-70℃超低温冰箱备用. 所有患者术前均未接受化疗或放疗. 全部标本均经病理学证实为大肠腺癌. 癌旁组织取距癌组织5 cm的肠组织; 对照组10例, 均为正常大肠组织. RT-PCR试剂盒Ver2.1购于TakaRa公司. bFGF, PKB, Cyclin A及 β -actin引物购于TakaRa公司; TRIzol试剂购于Gibcobl公司; 自动电泳凝胶成像分析仪为Olympus公司产品; PCR扩增仪PTC-100™为美国PE公司产品.

1.2 方法 采用TRIzol法提取总RNA, 用紫外分光光度计检测RNA纯度及浓度设计并合成引物见表1, 进行逆转录和PCR检测大肠癌组织中bFGF, PKB, Cyclin A的表达, 用 β -actin做内对照. PCR产物经凝胶成像及分析系统扫描后, 以 β -actin为参照标化bFGF, PKB, Cyclin A的含量.

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件包, 进行 χ^2

表 1 各引物序列和长度

引物名称	引物序列	引物长度(bp)
bFGF	5'-GGCTACAAGGTCCGTTATG-3' 5'-GATGCTGCCGTACTCATTG-3'	105
PKB	5'-ACCTTTGGGCTCTTGAT-3' 5'-GCTCTATGTTGCTGCCTGAC-3'	450
cyclin A	5'-TGGAGTTGTGCTGGCTAC-3' 5'-TCAGGGAGTGCTTTCTTT-3'	216
β -actin	5'-GAAACTACCTTCAACTCCATC-3' 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGCC-3'	498

■ 研究前沿

肿瘤细胞信号转导特别是细胞生长因子与肿瘤发生的信号转导更是该领域的研究热点, bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞生长的信号转导机制是其中之.

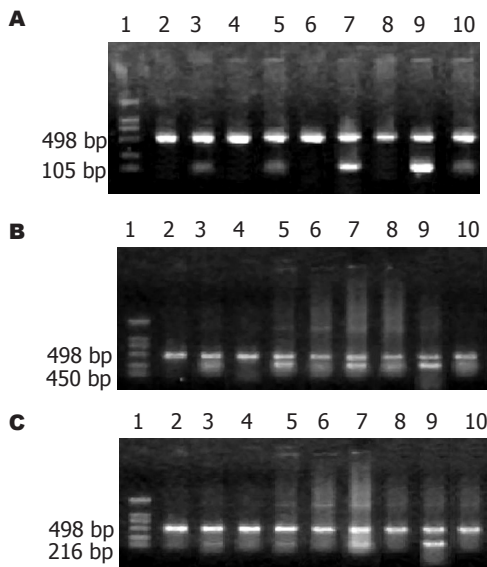


图 1 大肠癌中bFGF, PKB, Cyclin A的表达. A: bFGF; B: PKB; C: Cyclin A. 1: Marker; 2: 正常大肠组织; 3, 5, 7, 9: A, B, C, D期; 4, 6, 8, 10: 相应癌旁组织.

检验, 检测bFGF, PKB, Cyclin A mRNA的表达水平与临床病理因素的关系.

2 结果

2.1 bFGF, PKB, Cyclin A在大肠癌中的表达 RT-PCR扩增后bFGF产物为105 bp(图1A), PKB产物为450 bp(图1B); Cyclin A产物为216 bp(图1C). 内参照 β -actin为498 bp, 所有组织中均有稳定表达. 以正常大肠组织为对照, 取其相对含量95%的可信区间为0.547-0.682, 当所测mRNA/ β -actin>0.69为阳性表达. 60例大肠癌中, bFGF阳性表达45例(60%), PKB 33例(55%), Cyclin A 42例(70%); 相应癌旁组织中, bFGF阳性表达6例(10%), PKB 21例(35%), Cyclin A 3例(5%). 上述三项指标在大肠癌中的阳性表达率均明显高于癌旁组织($P<0.05$).

2.2 bFGF, PKB, Cyclin A的mRNA表达水平与临床病理因素的关系 癌组织中bFGF表达明显高于癌旁组织($P<0.01$), C期和D期明显高于A, B

■创新盘点

本文通过对60例大肠癌组织中bFGF, PKB及Cyclin A mRNA的检测, 进一步证实bFGF, PKB及Cyclin A在大肠癌组织中有过度表达, 其表达水平与大肠癌Dukes分期有关。为研究bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞增殖的信号转导机制提供了更有力的支持。

期($P<0.05$), 而bFGF的表达水平与大肠癌组织分化程度无关($P>0.05$)(表2)。PKB在正常组织和癌旁组织中的表达差异无统计学意义($P>0.05$); 但其阳性表达率和强度均显著低于大肠癌组织($P<0.05$), C、D期阳性表达率高A、B期($P<0.01$), PKB在低分化肿瘤中的表达阳性率高于中和高分化肿瘤($P<0.05$)(表3)。大肠癌中Cyclin A的表达阳性率与癌旁相比, 差异有非常显著性($P<0.01$), A、B期无淋巴结转移组明显高于C、D期有淋巴结转移组($P<0.01$); 在高、中分化肿瘤中Cyclin A明显高于低分化肿瘤($P<0.01$)(表4)。

上述结果表明bFGF, PKB, Cyclin A在大肠癌组织中有过度表达, 其表达水平与大肠癌Dukes分期有关。且PKB, Cyclin A的mRNA表达水平与大肠癌的分化组织有关。

3 讨论

bFGF作为一种细胞有丝分裂原和促血管生成因子, 在许多肿瘤的生长中起着重要的作用。他对神经胶质瘤、白血病、肺癌、肝癌等细胞有促增殖分化功能, 参与了胚胎发育、血管生成、损伤修复、神经再生、肿瘤生长等多项生理及病理过程^[1-2]。但对大肠癌细胞这方面的研究报道很少。现代分子生物学研究表明bFGF过度表达与肿瘤发生、发展及预后密切相关^[3-6]。在大肠癌中也表现出相似结果^[7]。PKB与人类多种恶性肿瘤, 如结肠癌、卵巢癌、乳腺癌和前列腺癌的发生密切相关, 其过量产生和活化参与细胞转化^[8-14]。体外实验发现, 不仅PKB水平在人肺癌癌前病变细胞和肺癌细胞中明显高于正常支气管上皮细胞, 而且PKB在前二者中处于持续活化状态, 在后者中却处于非活化状态, 提示PKB在肺癌的发生过程中可能起重要作用^[15-17]。本研究结果表明, PKB在大肠癌组织中表达的阳性率和强度均明显高于癌旁大肠组织和大肠良性病变组织, 也提示PKB在大肠癌的发生过程中可能发挥作用。我们还发现, PKB在晚期大肠癌组织中的表达明显高于在早期大肠癌组织中的表达, 在伴有淋巴结转移大肠癌中的表达也显著高于在无淋巴结转移大肠癌中的表达。这与PKB在前列腺癌中的表达规律相似^[16]。有研究证实, 在非小细胞肺癌细胞株中, PKB能增强肿瘤细胞的生存能力, 对化疗和放疗产生对抗作用^[18-21]; 在乳腺癌和卵巢癌中, PKB过表达能增强其外侵和转移能力^[13]。这些结果提示, PKB与大肠癌的进展可能也密切相关, 甚至可能是预防和治疗中晚期和

表 2 bFGF mRNA的表达与临床病理因素的关系

病理参数	n	癌组织(n)		癌旁组织(n)	
		+	-	+	-
Dukes分期					
A	14	8	6	1	13
B	20	14	6	2	18
C	18	16	2	2	16
D	8	7	1	1	7
组织学分级					
高分化	28	21	7	2	26
中分化	18	14	4	2	16
低分化	14	10	4	2	12

表 3 PKB mRNA的表达与临床病理因素的关系

病理参数	n	弱阳性表达(n)	中或强阳性(n)	阳性(n)
组织类型				
正常组织	10	3	1	4
癌旁组织	60	15	6	21
癌组织	60	8	35	43
Dukes分期				
A、B期	34	3	15	18
C、D期	26	5	20	25
组织学分级				
高中分化	46	5	24	29
低分化	14	3	11	14

表 4 Cyclin A mRNA的表达与临床病理参数的关系

病理参数	n	癌组织(n)		癌旁组织(n)	
		+	-	+	-
Dukes分期					
A	14	13	1	2	12
B	20	18	2	1	19
C	18	6	12	0	18
D	8	3	5	0	8
组织学分级					
高分化	28	23	5	2	26
中分化	18	14	4	1	17
低分化	14	3	11	0	14

高恶性大肠癌的有效靶分子。

恶性肿瘤的发生有多种可能的机制, 如目前公认的癌基因的过度扩增、抑癌基因的缺失、生长因子信号传导通路的持续激活等, 这些机制正是通过直接或间接影响细胞周期调控因子的功能, 促进细胞周期持续演进, 细胞进入自主的无限制的增殖和分裂, 表现出旺盛的增殖活性而发生恶性转化。从一定程度上细胞周期是所有这些机制的“最后公路”。近年研究认为, 细胞周期主要由细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物三类物质在G₁/S, G₂/M两个关键性限制点进行调控。Cyclin A是细胞周期G₂/M限制点的主要调控元件, 在部分恶性肿瘤中呈过度表达^[22-23]。Cyclin A是参与细胞周期G₂/M转换的重要正性调节因子。

他们过度表达使细胞周期G₂/M转换时间缩短, 进而促进细胞周期的进程和细胞过度增殖, 导致细胞癌变^[24]. Cyclin A是一类在哺乳动物细胞S期和G₂/M期两个节点均起重要作用的蛋白, 这提示Cyclin A的过表达可能是大肠癌发生的早期事件, Cyclin A是细胞周期进入S期和M期所必须的调节蛋白, 他的过度表达将会使出于S期和G₂/M期的细胞百分比增加, 从而影响细胞周期的过程, 促进细胞的增殖, 因此可能是影响大肠黏膜细胞正常细胞周期重要途径之一.

本实验结果表明, 60例大肠癌组织中Cyclin A表达阳性者42例, 阳性率70%, 相应癌旁黏膜仅检出6例阳性表达, 占10%, 而正常黏膜未见有Cyclin A的阳性表达, 说明在大肠癌组织中存在Cyclin A的过表达. 本实验通过进一步分析Cyclin A的表达与大肠癌临床病理特点之间的关系, 发现在高、中分化癌中的表达均显著高于低分化癌中的表达($P<0.01$); 在浸润至肌层组中的表达明显高于浸润至浆膜层组($P<0.05$). 这提示Cyclin A的过表达可能是大肠癌发生的早期事件, Cyclin A是细胞周期进入S期和M期所必须的调节蛋白, 他的过度表达将会使出于S期和G₂/M期的细胞百分比增加, 从而影响细胞周期的进程, 促进细胞的增殖, 因此可能是影响大肠黏膜细胞正常细胞周期重要途径之一.

4 参考文献

- 1 Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 165-169
- 2 Okada-Ban M, Thierry JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 263-267
- 3 Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000; 55: 800-806
- 4 Jang JH, Chung CP. A novel splice variant of fibroblast growth factor receptor 2 in human leukemia HL-60 cells. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 133-137
- 5 周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁. 胃癌组织与血清中VEGF和bFGF的表达意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2087-2092
- 6 Zhao J, Miao J, Zhao B, Zhang S, Yin D. Suppressing Akt phosphorylation and activating Fas by safrrole oxide inhibited angiogenesis and induced vascular endothelial cell apoptosis in the presence of fibroblast growth factor-2 and serum. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1603-1613
- 7 林瑶光, 韦良宏. 大肠癌和大肠腺瘤COX-2和bFGF表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2199-2202
- 8 Zhang B, Cao H, Rao GN. Fibroblast growth factor-2 is a downstream mediator of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 2006; 281: 905-914
- 9 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-7
- 10 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 306-311
- 11 Chou CH, Wei LH, Kuo ML, Huang YJ, Lai KP, Chen CA, Hsieh CY. Up-regulation of interleukin-6 in human ovarian cancer cell via a Gi/PI3K-Akt/NF-kappaB pathway by lysophosphatidic acid, an ovarian cancer-activating factor. *Carcinogenesis* 2005; 26: 45-52
- 12 Okada-Ban M, Thierry JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 263-267
- 13 Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 196-206
- 14 Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 201-205
- 15 Zinda MJ, Johnson MA, Paul JD, Horn C, Konicek BW, Lu ZH, Sandusky G, Thomas JE, Neubauer BL, Lai MT, Graff JR. AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2475-2479
- 16 Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1168-1171
- 17 Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4929-4937
- 18 Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001; 61: 3986-3997
- 19 Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH, Kuo ML. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 1169-1175
- 20 Chaudhary LR, Hruska KA. Inhibition of cell survival signal protein kinase B/Akt by curcumin in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 1-5
- 21 Maffucci T, Piccolo E, Cumashi A, Iezzi M, Riley AM, Saiardi A, Godage HY, Rossi C, Brogginini M, Iacobelli S, Potter BV, Innocenti P, Falasca M. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res* 2005; 65: 8339-8349
- 22 Dobashi Y, Jiang SX, Shoji M, Morinaga S, Kameya T. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas.

■应用要点

本研究通过检测大肠癌组织及相应癌旁黏膜、正常黏膜中bFGF、PKB及Cyclin A的表达, 并结合临床病理情况进行分析, 为探求包括大肠癌等肿瘤的发生、发展、浸润和转移的机制以及治疗和预后提供重要理论和临床依据.

■同行评价

本文通过对大肠癌组织bFGF, PKB, Cyclin A的表达的研究,探讨了bFGF, PKB, Cyclin A对于诊断治疗的特殊价值,与目前国内外报道一致. 论文具有较高的理论水平及临床应用价值.

- 23 J Pathol 2003; 199: 208-220
Ohashi R, Gao C, Miyazaki M, Hamazaki K, Tsuji T, Inoue Y, Uemura T, Hirai R, Shimizu N, Namba M. Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21: 657-662
- 24 Shih HC, Shiozawa T, Kato K, Imai T,

Miyamoto T, Uchikawa J, Nikaido T, Konishi I. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum Pathol* 2003; 34: 471-478

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10

大肠癌E-cadherin, β -catenin, MMP-7表达及其临床意义

顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 郑爱民, 黄蓉蓉, 胡益云

顾国利, 魏学明, 王石林, 郑爱民, 黄蓉蓉, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100036

任力, 胡益云, 中国人民解放军空军总医院病理科 北京市 100036

顾国利, 硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事普外科临床肿瘤学的研究。

通讯作者: 魏学明, 100036, 北京市中国人民解放军空军总医院普通外科. kzxwm@163.com

电话: 010-68410099-6302

收稿日期: 2006-11-03 接受日期: 2006-11-28

Expression of E-cadherin, β -catenin, matrix metalloproteinase-7 and their significances in colorectal carcinoma

Guo-Li Gu, Xue-Ming Wei, Shi-Lin Wang, Li Ren, Ai-Min Zheng, Rong-Rong Huang, Yi-Yun Hu

Guo-Li Gu, Xue-Ming Wei, Shi-Lin Wang, Ai-Min Zheng, Rong-Rong Huang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, 100036 Beijing, China

Li Ren, Yi-Yun Hu, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Air force, 100036 Beijing, China

Correspondence to: Xue-Ming Wei, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, 100036 Beijing, China. kzxwm@163.com

Received: 2006-11-03 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To detect expression of E-cadherin, β -catenin and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) as well as their correlations in colorectal carcinoma (CRC).

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of E-cadherin, β -catenin and MMP-7 protein in 60 specimens of CRC and 8 specimens of normal colorectal tissues. The corresponding clinical data were analyzed retrospectively.

RESULTS: The positive rates of E-cadherin, normal β -catenin, abnormal β -catenin and MMP-7 expression in CRC were 73.3%, 66.7%, 63.3% and 73.3%, respectively, which were significantly correlated with the depth of invasion and lymph node metastasis, but not with the age, sex and

tumor size or position and differentiation of the patients'. The normal expression of β -catenin was positively correlated with E-cadherin expression ($r = 0.359$, $P = 0.005$) in CRC, but negatively correlated with the abnormal expression of β -catenin ($r = -0.324$, $P = 0.012$). There existed positive correlation between the expression of MMP-7 and the abnormal expression of β -catenin ($r = 0.487$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: The expression of E-cadherin, β -catenin and MMP-7 are closely correlated with the invasion/metastasis and prognosis of CRC, and they may serve as effective markers in the judgement CRC prognosis.

Key Words: Colorectal carcinoma; E-cadherin; β -catenin; Matrix Metalloproteinase-7; Histopathology; Immunohistochemistry

Gu GL, Wei XM, Wang SL, Ren L, Zheng AM, Huang RR, Hu YY. Expression of E-cadherin, β -catenin, matrix metalloproteinase-7 and their significances in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):375-380

摘要

目的: 探讨大肠癌(CRC)中上皮钙黏附蛋白(E-cad)、 β -连接素(β -cat)和基质金属蛋白酶-7 (MMP-7)的表达水平, 并分析三者的相互关系。

方法: 应用免疫组化方法检测60例CRC肿瘤组织标本和8例正常大肠组织标本中E-cad, β -cat和MMP-7的表达水平, 分析E-cad, β -cat和MMP-7在二者中表达的差异, 并结合其临床病理资料进行综合分析。

结果: E-cad、正常 β -cat、异常 β -cat和MMP-7在CRC中的阳性表达率分别为73.3%(44/60), 66.7%(40/60), 63.3%(38/60)和73.3%(44/60)。E-cad, β -cat和MMP-7的阳性表达率与患者的年龄、性别和肿瘤的大小、部位及分化类型均无关。而与肿瘤的侵犯深度和转移与否密切相关。E-cad和 β -cat正常表达之间呈明显正相关($r = 0.359$, $P = 0.005$)。 β -cat正常表达和 β -cat

■背景资料

大肠癌(CRC)是我国的常见消化道恶性肿瘤, 在CRC的侵袭转移过程中MMP-7的作用比其他MMP成员更重要。目前国内研究MMP-7在大肠癌中表达的文献较少, 综合研究E-cad, β -cat和MMP-7三者在CRC病变中表达的报道很少, 而三者在CRC中相互关系的研究尚未见报道。

■创新盘点

本文通过对所经治CRC病例的临床病理资料总结和免疫组化染色,配合国内外文献的学习,探讨E-cad, β -cat, MMP-7表达与CRC临床病理之间的关系,对临床医生提高E-cad, β -cat, MMP-7在CRC中表达意义的认识、制订更合理的治疗方案、提高大肠癌综合治疗的疗效有一定参考价值。

异常表达之间呈明显负相关($r = -0.324, P = 0.012$). β -cat异常表达和MMP-7之间呈明显正相关($r = 0.487, P = 0.000$).

结论: E-cad, β -cat和MMP-7的表达与CRC的侵袭转移和预后密切相关,可作为判定CRC预后的有效指标.

关键词: 大肠癌; 基质金属蛋白酶-7; 上皮钙黏附蛋白; β -连接素; 组织病理; 免疫组化

顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 郑爱民, 黄蓉蓉, 胡益云. 大肠癌 E-cadherin, β -catenin, MMP-7表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(4):375-380
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/375.asp>

0 引言

大肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是常见消化道恶性肿瘤,随着我国人口老龄化、生活习惯、饮食结构以及环境的改变, CRC的发病率呈上升趋势^[1]. 影响CRC预后的主要因素是肿瘤的侵袭转移^[2-4]. 研究发现, 上皮钙黏附蛋白(E-cadherin, E-cad)、 β -连接素(β -catenin, β -cat)和基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[3-10]. E-cad是一种 Ca^{2+} 依赖性细胞黏附分子, 介导上皮细胞黏附, 保持肿瘤组织的完整性, 阻止肿瘤细胞脱离原发灶, 从而抑制肿瘤转移. E-cad需与 β -cat结合才能发挥上述生物作用. β -cat除了参与细胞间黏附外, 也是Wnt/ β -cat信号通路的关键因子. MMP-7则是Wnt/ β -cat信号通路的下游靶基因产物, 其直接参与分解基底膜和细胞外基质造成肿瘤侵袭、转移^[8-12]. 因此, E-cad, β -cat和MMP-7的突变或表达异常直接影响肿瘤的侵袭、转移, 并与生存和预后密切相关. 目前, 综合研究3者在CRC病变中表达的报道不多, 而且3者在CRC中相互关系的研究尚未见报道. 我们通过观察CRC中E-cad, β -cat和MMP-7的表达水平, 分析其与CRC临床病理以及3者间的相互关系. 探讨其在CRC生长分化及侵袭转移中的作用和意义.

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取1996-04/2006-04我院经手术切除的60例CRC患者肿瘤组织和8例正常大肠组织的石蜡固定标本. 60例CRC患者中, 男36例, 女24例. 年龄34-83(中位年龄58.6)岁. 肿瘤部位: 右半结肠22例、左半结肠20例、直肠18例. 肿瘤长径2-10(平均 4.5 ± 1.6)cm. 病理类型:

高分化腺癌16例、中分化腺癌24例、低分化腺癌10例、黏液腺癌10例. Dukes分期: A期4例(6.7%), B期32例(53.3%), C期20例(33.3%), D期4例(6.7%). E-cad鼠抗人mAb(ZM-0092)、 β -cat鼠抗人mAb(ZM-0442)、MMP-7鼠抗人mAb(ZM-0334)、SP试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司.

1.2 方法 上述标本均经HE染色确诊. 试验由LAB vision Autostainer360自动染色仪系统(福建迈新公司)程控完成、镜下图像以Olympus Dp70图像采集分析仪进行采集、分析. 实验按产品说明书操作. 切片常规脱蜡至水, E-cad和 β -cat组微波修复5 min, MMP-7组不需抗原修复. 30 mL/L H_2O_2 孵育10 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 滴加正常兔血清工作液, 孵育10 min后倾去, 不洗; 滴加一抗37℃孵育2 h, PBS冲洗3 min \times 3次. 滴加二抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min \times 3次. 滴加三抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min \times 3次, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS代替一抗作阴性对照, 正常大肠黏膜上皮表达情况作阳性对照. 计数每个点阵全部正常黏膜或癌细胞. E-cad表达定位于细胞膜; 胞膜阳性细胞数 $\geq 70\%$ 记为E-cad阳性, $\geq 90\%$ 记为E-cad强阳性. 从细胞膜、细胞质两方面观察 β -cat的表达^[2]. β -cat在胞膜阳性细胞数 $\geq 70\%$ 记为 β -cat正常表达, β -cat在胞膜阳性细胞数 $< 70\%$ 或胞质阳性细胞数 $> 30\%$ 记为 β -cat表达异常. MMP-7定位于细胞质. 依据染色强度和阳性细胞率综合计算评分. 染色强度: 0为无染色; 1为染色弱; 2为中等染色强度; 3为染色强. 阳性细胞率: 0为 $< 5\%$; 1为 $< 25\%$; 2为 $< 50\%$; 3为 $< 75\%$; 4为 $\geq 75\%$. 以染色强度与阳性细胞率之和计算评分, 0-2分为阴性(-), 3-5分为阳性(+), 6-7分为强阳性(++). 两名高年资病理科医生双盲法读片.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件统计分析. 数据用mean \pm SD表示, 计数资料采用两个或多个样本率的比较(即: 四格表或 $R \times C$ 表的 χ^2 检验), 免疫组化表达积分采用Spearman等级相关分析, 检验水准为 $P < 0.05$.

2 结果

2.1 E-cad, β -cat, MMP-7蛋白在CRC中的表达 E-cad和 β -cat呈棕黄色细颗粒状主要表达于上皮细胞-细胞接触侧的胞膜上(图1A, C), β -cat也可在胞质异常表达; 肿瘤间质不染色或浅染(图1B, D). MMP-7主要表达在细胞质(图1E), 呈棕黄

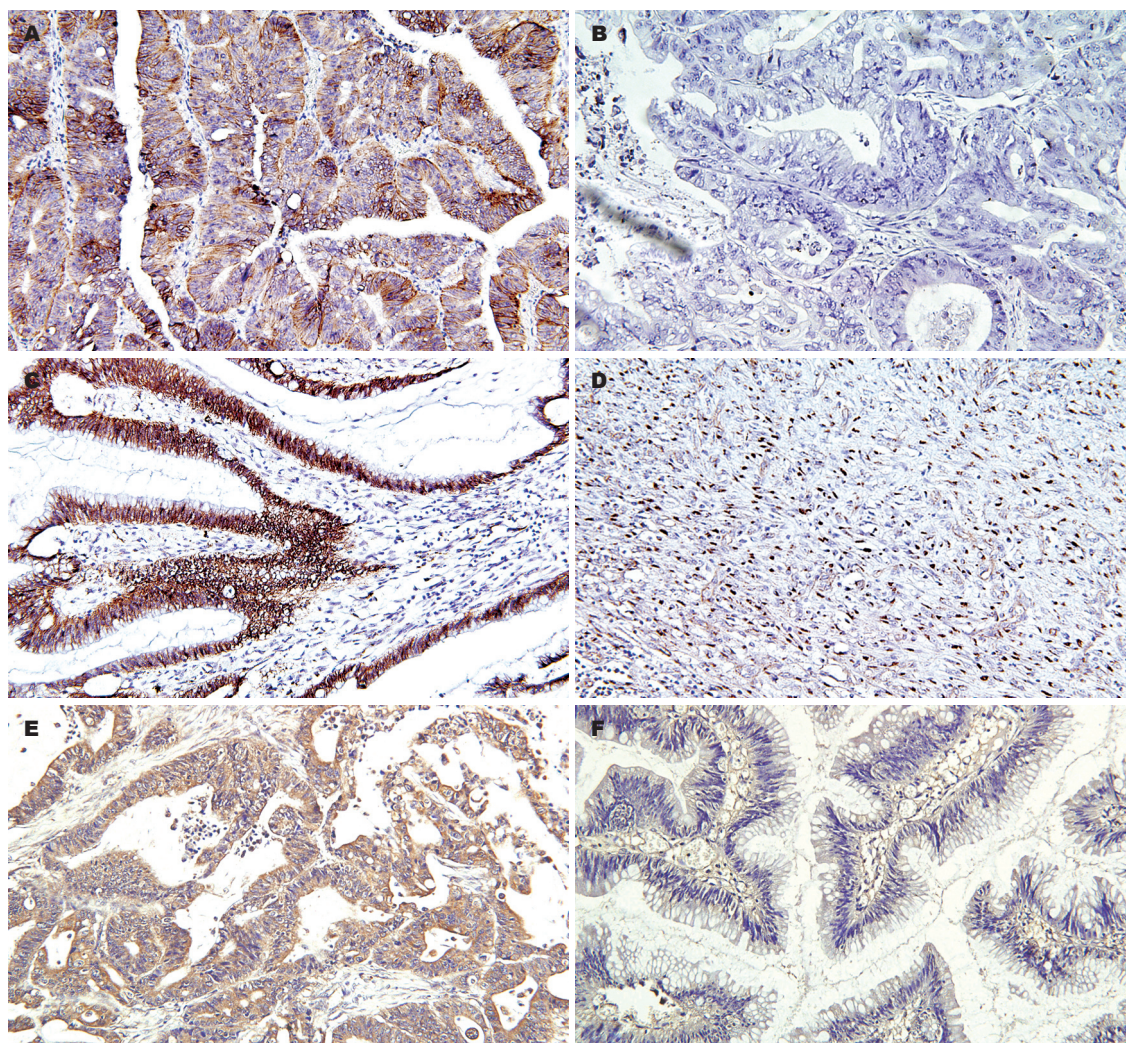


图1 E-cad, β -cat和MMP-7在大肠癌中的表达(SP, $\times 200$). A: E-cad染色阳性; B: E-cad染色阴性; C: β -cat染色阳性; D: β -cat染色阴性; E: MMP-7染色阳性; F: MMP-7染色阴性.

■应用要点

本文结果提示 E-cad, β -cat 和 MMP-7 的表达与大肠癌的侵袭转移密切相关. E-cad 和正常表达的 β -cat 可能是 CRC 侵袭转移的抑制因素, 而异常表达的 β -cat 和 MMP-7 则是 CRC 侵袭转移的促进因素. 三者之间的相关关系明显. 这在评估 CRC 预后方面具有一定的临床价值. 本文结果也对开始进入临床的 β -cat 抑制剂和 MMP 抑制剂的应用提供了一个有益的理论参考.

色颗粒状, 部分胞膜染色. 肿瘤间质不染色或浅染. 在CRC中E-cad阳性表达率为73.3%(44/60), 其中36.7%(22/60)强阳性表达. β -cat的正常表达率为66.7%(40/60), 异常表达率为63.3%(38/60). MMP-7阳性表达率为73.3%(44/60), 其中40.0%(24/60)强阳性表达. 在8例正常大肠黏膜组织中E-cad和 β -cat均为胞膜(强)阳性表达, 胞质阴性或弱阳性表达. 而MMP-7均为阴性表达(图1F). 两组中E-cad、异常 β -cat和MMP-7表达差异显著($P < 0.05$); 正常 β -cat的表达无显著性差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 E-cad, β -cat, MMP-7蛋白表达与CRC临床病理参数之间的关系 E-cad, β -cat, MMP-7的阳性表达率与患者的性别、年龄及肿瘤的大小、部位和分化类型均无明显关系($P > 0.05$), 而与肿瘤的侵犯深度和淋巴结转移密切相关. 即: E-cad, β -cat, MMP-7的表达与CRC的Dukes分期密切相

关. 其中 β -cat异常表达和MMP-7在侵犯浆膜外组织和有转移者的阳性表达率明显高于侵犯限于浆膜内和无转移者($P < 0.05$). 而E-cad和 β -cat正常表达在侵犯限于浆膜内和无转移者中的阳性率明显高于侵犯浆膜外组织和有转移者($P < 0.05$, 表2).

2.3 CRC中E-cad, β -cat, MMP-7表达的相关性 Spearman等级相关分析显示, E-cad和 β -cat正常表达之间呈明显正相关($r = 0.359$, $P = 0.005$). β -cat正常表达和 β -cat异常表达之间呈明显负相关($r = -0.324$, $P = 0.012$). β -cat异常表达和MMP-7之间呈明显正相关($r = 0.487$, $P = 0.000$)(表3).

3 讨论

Wnt/ β -cat信息通路在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中起着非常重要的作用^[12-15]. 其关键分

■同行评价

本文研究了大肠癌E-cadherin, β -catenin, MMP-7表达及其临床意义, 文章的科学性、创新性和可读性较好, 可以反映我国结肠癌的临床和基础研究的先进水平。

表 1 E-cad, β -cat, MMP-7在正常大肠黏膜和大肠癌中的表达

分组	n	E-cad表达			β -cat正常表达		β -cat异常表达		MMP-7表达		
		(++)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)
正常大肠黏膜	8	7	1	0	8	0	0	8	0	0	8
大肠癌	60 ^a	22 ^a	22 ^a	16 ^a	40	20	38 ^b	22 ^b	24 ^b	20 ^b	16 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常大肠黏膜。

表 2 E-cad, β -cat, MMP-7表达与大肠癌临床病理参数之间的关系

	n	E-cad表达			P值	β -cat正常表达		P值	β -cat异常表达		P值	MMP-7表达			P值
		(++)	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)		(++)	(+)	(-)	
性别															
男	36	10	16	10	>0.05	26	10	>0.05	22	14	>0.05	14	10	12	>0.05
		(27.8)	(44.4)	(27.8)		(72.2)	(27.8)		(61.1)	(38.9)		(38.9)	(27.8)	(33.3)	
女	24	12	6	6		14	10		16	8		10	10	4	
		(50.0)	(25.0)	(25.0)		(58.3)	(41.7)		(66.7)	(33.3)		(41.7)	(41.7)	(16.7)	
年龄(岁)															
≥60	30	10	14	6	>0.05	20	10	>0.05	18	12	>0.05	10	10	10	>0.05
		(33.3)	(46.7)	(20.0)		(66.7)	(33.3)		(60.0)	(40.0)		(33.3)	(33.3)	(33.3)	
<60	30	12	8	10		20	10		20	10		14	10	6	
		(40.0)	(26.7)	(33.3)		(66.7)	(33.3)		(66.7)	(33.3)		(46.7)	(33.3)	(20.0)	
肿瘤长径(cm)															
<4	24	8	8	8	>0.05	16	8	>0.05	12	12	>0.05	8	8	8	>0.05
		(33.3)	(33.3)	(33.3)		(66.7)	(33.3)		(50.0)	(50.0)		(33.3)	(33.3)	(33.3)	
≥4	36	14	14	8		24	12		26	10		16	12	8	
		(38.9)	(38.9)	(22.2)		(66.7)	(33.3)		(72.2)	(27.8)		(44.4)	(33.3)	(22.2)	
肿瘤部位															
右半	22	6	8	8	>0.05	15	7	>0.05	14	8	>0.05	12	6	4	>0.05
		(27.3)	(36.4)	(36.4)		(68.2)	(31.8)		(63.6)	(36.4)		(54.5)	(27.3)	(18.2)	
左半	20	10	6	4		15	5		14	6		8	7	5	
		(50.0)	(30.0)	(20.0)		(75.0)	(25.0)		(70.0)	(30.0)		(40.0)	(35.0)	(25.0)	
直肠	18	6	8	4		10	8		10	8		4	7	7	
		(33.3)	(44.4)	(22.2)		(55.6)	(44.4)		(55.6)	(44.4)		(22.2)	(38.9)	(38.9)	
肿瘤分化															
好-中等	40	16	14	10	>0.05	28	12	>0.05	24	16	>0.05	15	13	12	>0.05
		(40.0)	(35.0)	(25.0)		(70.0)	(30.0)		(60.0)	(40.0)		(37.5)	(32.5)	(30.0)	
差	20	6	8	6		12	8		14	6		9	7	4	
		(30.0)	(40.0)	(30.0)		(60.0)	(40.0)		(70.0)	(30.0)		(45.0)	(35.0)	(20.0)	
侵袭深度															
浆膜内	32	10	17	5	<0.05	25	7	<0.05	16	16	<0.05	8	12	12	<0.05
		(31.3)	(53.1)	(15.6)		(78.1)	(21.9)		(50.0)	(50.0)		(25.0)	(37.5)	(37.5)	
浆膜外	28	12	5	11		15	13		22	6		16	8	4	
		(42.9)	(17.9)	(39.3)		(53.6)	(46.4)		(78.6)	(21.4)		(57.1)	(28.6)	(14.3)	
淋巴结转移															
无	36	12	18	6	<0.05	28	8	<0.05	19	17	<0.05	9	13	14	<0.05
		(33.3)	(50.0)	(16.7)		(77.8)	(22.2)		(52.8)	(47.2)		(25.0)	(36.1)	(38.9)	
有	24	10	4	10		12	12		19	5		15	7	2	
		(41.7)	(16.7)	(41.7)		(50.0)	(50.0)		(79.2)	(20.8)		(62.5)	(29.2)	(8.3)	

子 β -cat在胞膜、胞质和胞核均可表达。胞膜上的 β -cat与E-cad等构成连接复合体^[16-18], 介导同

表 3 大肠癌中E-cad, β -cat, MMP-7表达的相关性

		E-cad表达			β -cat正常表达		β -cat异常表达	
		(++)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
β -cat正常表达	(+)	12	20	8				
	(-)	10	2	8				
		$r = 0.359, P = 0.005$						
β -cat异常表达	(+)	16	14	8	24	14		
	(-)	6	8	8	16	6		
		$r = 0.034, P = 0.797$			$r = -0.324, P = 0.012$			
MMP-7表达	(++)	12	8	4	20	4	20	4
	(+)	6	8	6	10	10	14	6
	(-)	4	6	6	10	6	4	12
		$r = 0.152, P = 0.247$			$r = 0.104, P = 0.428$		$r = 0.487, P = 0.000$	

型细胞相互黏附。 β -cat的丝/苏氨酸磷酸化促进E-cad与 β -cat的结合;而表皮生长因子等生长因子及其受体使 β -cat的酪氨酸磷酸化,促使 β -cat从复合体中解离而进入细胞质。胞质中的 β -cat与APC等形成“破坏复合体”,经蛋白酶体水解作用而降解。未被降解的 β -cat进入细胞核,调节相关靶基因的转录。在大肠癌细胞,该通路主要的基因APC, β -cat的突变或缺失将使Wnt/ β -cat通路在无Wnt信号刺激时仍保持持续激活状态。研究发现,70%-80%的大肠癌存在APC缺失或突变^[19-21]。本研究检测了E-cad和 β -cat在正常大肠组织和CRC中的表达;其中 β -cat在胞核中的异常表达情况较少,考虑为样本量较少所致,因 β -cat胞核表达与胞质表达意义基本相同,故未作胞核表达的统计分析。本研究发现,E-cad在CRC中的表达较正常组织减少;且随肿瘤侵袭深度加深、出现淋巴结转移而E-cad和 β -cat正常表达明显降低, β -cat异常表达升高,差异显著。这说明E-cad表达较少和 β -cat的异常表达不但参与了CRC的侵袭、转移,而且还影响到CRC的早期发生。目前认为,肿瘤的发生、发展、侵袭、转移属于肿瘤整个生物学进程的不同阶段,从基因突变意义上可以认为在肿瘤的起源阶段已决定了肿瘤的转移性状^[22]。本研究结果显示,E-cad和 β -cat蛋白表达异常贯穿了CRC从早期发生直至晚期转移的全过程,与这一理论相吻合。

MMP-7在MMP家族中分子量最小,而且是唯一在肿瘤细胞表达、不在肿瘤间质表达的MMP。因MMP-7分子结构中缺乏与金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)相互作用的C末端区域,

使其具有强大的基质降解功能和广泛的底物特异性,同时受TIMP的负调节作用较小。因此,在CRC的侵袭转移过程中MMP-7的作用比其他MMP成员更重要^[23-25]。本研究显示,MMP-7在肿瘤组织中的表达明显高于正常组织;并且随着肿瘤侵袭转移MMP-7表达明显增高,这说明在CRC侵袭、转移过程中MMP-7起促进作用。

肿瘤的发生、发展过程存在着多种基因结构或功能改变,先发生改变的上游基因可能是其下游基因改变的原因。因此,上游基因在肿瘤的发生、发展中可能起着更关键的作用。研究显示, β -cat在CRC中可能是一个上游基因,其突变失活直接影响Wnt/ β -cat通路中信息的传递,并可影响MMP-7等下游基因的表达^[26-28]。本研究显示,在CRC中 β -cat的异常表达与MMP-7呈正相关,与 β -cat的正常表达呈负相关。提示 β -cat表达异常与MMP-7表达改变有密切关系,因此也影响CRC的侵袭转移。

总之,E-cad, β -cat, MMP-7的表达与CRC肿瘤的侵袭转移密切相关,因此,检测E-cad, β -cat, MMP-7在评估CRC预后方面具有一定的临床价值。目前化学合成的 β -cat抑制剂和MMP抑制剂已开始进入临床并成为肿瘤治疗领域的热点^[29-30]。我们的研究结果为临床应用选择性 β -cat抑制剂和MMP抑制剂治疗CRC的侵袭转移提供了一个有益的参考。

4 参考文献

- 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 534-536
- Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, Rothe M, Florin A, Wernert N. Stromal expression of invasion-promoting, matrix-

- degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2003; 107: 183-188
- 3 Nan KJ, Qin HX, Yang G. Prognostic factors in 165 elderly colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2207-2210
- 4 于雁, 毛银玲, 尚丽华. 大肠癌淋巴结微转移免疫组化检测与预后关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2504-2506
- 5 赵晶, 王凤安, 刘津, 闫庆辉, 张杰英, 薛平, 蔡建辉. 上皮钙黏蛋白在大肠癌转移淋巴结癌细胞中的再表达及意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1351-1352
- 6 Schuierer MM, Graf E, Takemaru K, Dietmaier W, Bosserhoff AK. Reduced expression of beta-catenin inhibitor Chibby in colon carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1529-1535
- 7 李霞, 朱允庆, 罗峻, 陶文惠, 黄超, 张金梅. 血管生成素-2与基质金属蛋白酶-7在大肠癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 434-437
- 8 王瑞婷, 申兴斌, 金小东, 于再东. 基质金属蛋白酶-7和组织金属蛋白酶抑制剂-1与大肠癌的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1344-1345
- 9 Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 1033-1038
- 10 Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* 2005; 118: 4901-4912
- 11 戴文斌. Wnt通路中APC、 β -catenin及c-myc与大肠癌的关系. *广西医学* 2006; 28: 233-235
- 12 李琳娜, 袁守军. Wnt/ β -catenin信号通路与大肠癌的始发和防治策略. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 201-206
- 13 Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 477-487
- 14 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850
- 15 Le Floch N, Rivat C, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M, Dale T, Gispach C. The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3beta and c-Jun/AP-1 signaling. *FASEB J* 2005; 19: 144-146
- 16 Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002; 109: 987-991
- 17 Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 2001; 154: 1185-1196
- 18 Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002; 160: 389-401
- 19 张丽娟. β -catenin、APC及C-myc与大肠癌的关系. *实用癌症杂志* 2006; 21: 93-96
- 20 Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Shitara N, Iwama T, Kuroki T. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 4506-4509
- 21 Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003; 2: 41
- 22 Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S44-51
- 23 沈丹, 邓长生. PPAR γ 、MMP-7和TIMP-1在大肠癌的表达及意义. *中华内科杂志* 2005; 44: 609-610
- 24 Nemoto T, Kubota S, Ishida H, Murata N, Hashimoto D. Ornithine decarboxylase, mitogen-activated protein kinase and matrix metalloproteinase-2 expressions in human colon tumors. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3065-3069
- 25 Li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 20-27
- 26 薛彦萍, 史成章. 以 β -catenin为中心的Wnt信号通路在消化道肿瘤发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2858-2861
- 27 Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2117-2123
- 28 Johnson V, Volikos E, Halford SE, Eftekhari Sadat ET, Popat S, Talbot I, Truninger K, Martin J, Jass J, Houlston R, Atkin W, Tomlinson IP, Silver AR. Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* 2005; 54: 264-267
- 29 袁云霞, 徐文方, 刘健, 陈明慧, 孟红, 曲显俊. 基质金属蛋白酶抑制剂LY52对人卵巢上皮癌细胞SKOV3中MMP-2, MMP-9表达及其侵袭转移能力的抑制作用. *癌症* 2006; 25: 663-670
- 30 段光杰, 阎晓初, 章容, 卞修武, 王清良, 刘丽梅, 陈春燕. β -catenin和MMP-7表达与大肠癌侵袭转移的关系研究. *第三军医大学学报* 2006; 28: 227-230

电编 张敏 编辑 王晓瑜

p-STAT3与E-cadherin在胰腺癌中的表达及其临床意义

黄陈, 裘正军, 胡宏惠, 江弢, 朱麟, 张放, 黄克俭, 曹俊

黄陈, 裘正军, 胡宏惠, 江弢, 朱麟, 张放, 黄克俭, 曹俊, 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海市 200080
胡宏惠, 上海交通大学附属第一人民医院病理科 上海市 200080

通讯作者: 裘正军, 200080, 上海武进路85号, 上海交通大学附属第一人民医院普外科, qiuwryb@online.sh.cn
电话: 021-63240090-3091 传真: 021-63240825
收稿日期: 2006-11-14 接受日期: 2006-12-08

Expression of p-STAT3 and E-cadherin in pancreatic cancer and their clinical significances

Chen Huang, Zheng-Jun Qiu, Hong-Hui Hu, Tao Jiang, Lin Zhu, Fang Zhang, Ke-Jian Huang, Jun Cao

Chen Huang, Zheng-Jun Qiu, Tao Jiang, Lin Zhu, Fang Zhang, Ke-Jian Huang, Jun Cao, Department of General Surgery, the First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Hong-Hui Hu, Department of Pathology, the First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Zheng-Jun Qiu, Department of General Surgery, the First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. qiuwryb@online.sh.cn

Received: 2006-11-14 Accepted: 2006-12-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of phosphorylated signal transduction and activators of transcription-3 (p-STAT3) and E-cadherin as well as their correlations with the clinicopathological parameters in pancreatic cancer, and to reveal the role of STAT3 signal pathway in the invasion and metastasis of pancreatic cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of p-STAT3 and E-cadherin in 34 cases of pancreatic cancer and 10 cases of normal pancreatic tissues. Cell invasion assay kit was used to examine the invasion ability of pancreatic cancer cells SW1990 and CaPan-2. Western blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were applied to detect the protein expression of p-STAT3 and STAT3 DNA-binding activity in SW1990 and CaPan-2 cells.

RESULTS: Immunohistochemistry revealed high expression of p-STAT3 (64.7%) but low expression of E-cadherin in pancreatic cancer. The expression of p-STAT3 was significantly correlated with the clinical stages ($P = 0.017$) and lymph node metastasis ($P = 0.013$), and the expression of E-cadherin was correlated with the pathological degrees ($P = 0.002$), clinical stages ($P = 0.034$) and lymph node metastasis ($P = 0.019$). There was a negative correlation between p-STAT3 and E-cadherin expression in pancreatic cancer ($r = -0.537$, $P = 0.001$). Cell invasion assay indicated a more invasive ability in SW1990 cells than that in CaPan-2 cells ($P < 0.05$). Finally, Western blot and EMSA showed that p-STAT3 protein level and STAT3 DNA-binding activity were significantly higher in SW1990 cells as compared with those in CaPan-2 cells ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of p-STAT3 is closely related to the invasion and metastasis of pancreatic cancer and abnormal expression of E-cadherin. The combined detection for these two proteins may be useful in determining of the metastasis potency of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Signal transduction and activators of transcription-3; E-cadherin; Invasion; Metastasis

Huang C, Qiu ZJ, Hu HH, Jiang T, Zhu L, Zhang F, Huang KJ, Cao J. Expressions of p-STAT3 and E-cadherin in pancreatic cancer and their clinical significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):381-386

摘要

目的: 观察信号传导和转录激活因子3 (STAT3)活化形式-磷酸化STAT3(p-STAT3)和上皮型-钙黏附素(E-cadherin)在胰腺癌组织及细胞中的表达及其临床意义, 探讨STAT3信号通路在胰腺癌侵袭转移中的作用。

方法: 免疫组化检测34例胰腺癌和10例正常胰腺组织中p-STAT3和E-cadherin的表达, 并分析其与胰腺癌临床病理特征的关系。细胞侵袭测定试剂盒检测胰腺癌细胞株SW1990和CaPan-2侵袭能力; 分别采用Western blot和电泳迁移

■背景资料

STAT3在多种肿瘤组织与细胞系中异常表达和活化, 并与肿瘤的多种生物学特性密切相关, 但是STAT3在胰腺癌侵袭转移的作用机制尚未完全明确。

■研究前沿

STAT3是近年来研究较多的转录因子,已经成为肿瘤治疗中的一个很有前途的靶点。今后研究的重点是进一步弄清STAT3上游信号通路及其激活的具体细节,发现一些新的STAT3下游靶基因,进一步揭示STAT3在致癌中的作用机制。

率变迁实验(EMSA)检测2种细胞中p-STAT3蛋白表达及STAT3-DNA结合活性。

结果:免疫组化发现p-STAT3在胰腺癌组织中存在高表达(64.7%),与临床分期及淋巴结转移有关($P = 0.017$, $P = 0.013$); E-cad在胰腺癌组织中表达明显降低,与组织学分级($P = 0.002$)、临床分期($P = 0.034$)及淋巴结转移($P = 0.019$)有关。在胰腺癌组织中, p-STAT3与E-cad的表达呈负相关($r = -0.537$, $P = 0.001$)。体外侵袭实验发现SW1990细胞比CaPan-2细胞具有更高的侵袭能力($P < 0.05$)。Western blot发现在胰腺癌高侵袭力细胞株SW1990中p-STAT3蛋白呈高表达,而在低侵袭力细胞株CaPan-2中呈低表达; EMSA实验亦证实SW1990细胞较CaPan-2细胞具有更高的STAT3-DNA结合活性($P < 0.05$)。

结论: p-STAT3与胰腺癌侵袭转移及E-cad异常表达密切相关; 联合检测两种蛋白对于胰腺癌恶性潜能的判断具有一定的参考价值。

关键词: 胰腺癌; 信号传导与转录激活因子3; E-钙黏附素; 侵袭; 转移

黄陈, 裘正军, 胡宏惠, 江弢, 朱麟, 张放, 黄克俭, 曹俊. p-STAT3与E-cadherin在胰腺癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(4):381-386

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/381.asp>

0 引言

信号传导和转录激活因子3 (signal transduction and activators of transcription-3, STAT3)是近年来研究异常活跃的转录因子,多项研究结果显示STAT3在多种肿瘤组织与细胞系中异常表达和活化,并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生和免疫逃避等密切相关^[1-7]。本课题组前期已证实胰腺癌组织中存在p-STAT3的过表达,并与胰腺癌临床病理分期、淋巴结转移和微血管密度有关^[8-9],提示STAT3的激活可能在胰腺癌的侵袭转移中起着重要作用。E-cad为钙黏附素家族成员之一,主要通过钙依赖的同种亲和性细胞间的黏附参与建立和维持细胞间的连接。大量研究表明在多种肿瘤组织和细胞中存在E-cad的异常表达,且其异常表达与肿瘤的侵袭转移密切相关^[10-13]。本研究采用免疫组化技术探讨p-STAT3和E-cad在胰腺癌组织中的表达、其与临床病理特征的关系以及两种蛋白表达的相关性;并检测不同转移潜能胰腺癌细胞株中p-STAT3蛋白的表达水平和STAT3-DNA结合活

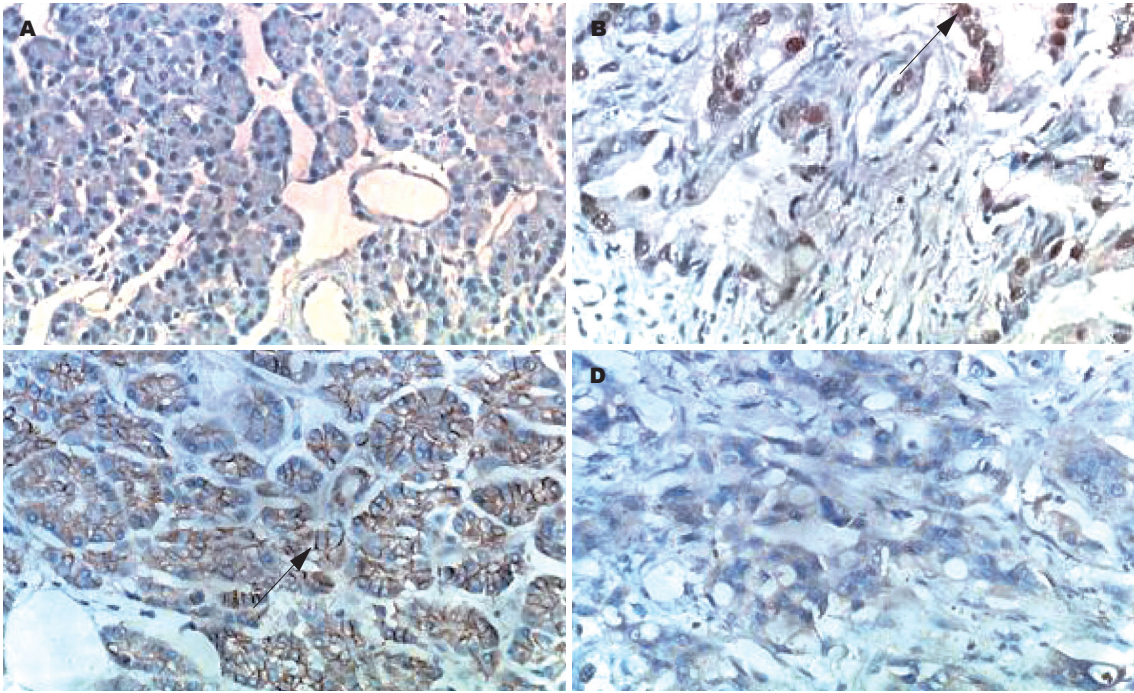
性,探讨STAT3信号通路与胰腺癌侵袭转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我院1998-01/2006-02的34例手术切除的胰腺癌石蜡标本,男22例,女12例,平均年龄 59.74 ± 10.82 岁,按UICC(2002)标准I期3例、II期18例、III期8例、IV期5例,组织学分级高分化18例,中分化14例,低分化2例,供肝附带的胰腺标本10例作为对照,行免疫组化检测。人胰腺癌细胞系SW1990和CaPan-2购自ATCC。细胞在含100 mL/L小牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM完全培养基内,37℃、5 mL/L CO₂、饱和湿度培养箱中培养。细胞单层贴壁生长,至70%-80%融合时2.5 g/L胰蛋白酶消化传代。免疫组化用E-cad第一抗体购自福州迈新公司, p-STAT3第一抗体(针对705位酪氨酸磷酸化位点)购自Cell Signal公司,二抗购自长岛抗体公司。细胞侵袭测定试剂盒购自Chemicon公司。细胞核蛋白抽提试剂盒购自ActiveMotif公司。EMSA试剂盒购自Pierce公司,生物素标记的STAT3探针由上海生工合成。Western blot所用p-STAT3第一抗体亦为Cell signal公司产品,辣根过氧化物酶结合的第二抗体和电化学发光(ECL)试剂盒均购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 对常规石蜡包埋的胰腺癌组织连续切片;二甲苯脱蜡,梯度乙醇逐级水化;30 mL/L H₂O₂甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶;微波抗原修复;羊血清封闭非特异性抗原,一抗和二抗分别孵育、ABC试剂作用、DAB显色、苏木精复染,封片观察。以已知的有p-STAT3表达的乳腺癌标本和E-cad表达的甲状腺标本作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性空白对照。结果采用双人双盲读片, p-STAT3阳性细胞为细胞核内出现棕黄色颗粒, E-cad阳性细胞为细胞膜上出现棕黄色颗粒。p-STAT3染色分级标准按照Campbell *et al*^[14]方法:400倍镜下任取5个视野进行计数,着色细胞少于5%为阴性(-),着色细胞占5%-25%为弱阳性(+),着色细胞占26%-50%为阳性(++),着色细胞大于50%为强阳性(+++). E-cad染色分级标准按照Jawhari *et al*^[15]方法:以正常胰腺或癌组织周围残存的正常胰腺组织E-cad表达模式为阳性对照,癌细胞染色完全消失者为0分;癌细胞质表达为1分;癌细胞染色一致性降



■ 相关报道
Kusaba发现结直肠癌标本中存在p-STAT3的高表达, 且p-STAT3的表达与肿瘤浸润深度、血管浸润、淋巴结转移及Dukes分期有关; Xie *et al*发现STAT3可调控恶性黑色素瘤细胞中MMP-2表达, 促进恶性黑色素瘤细胞的肺转移和脑转移。

图 1 p-STAT3和E-cad在胰腺组织中的表达. A: 正常胰腺组织, p-STAT3阴性; B: 胰腺癌组织, P-STAT3阳性(箭头所指为胞核阳性); C: 正常胰腺组织, E-cad阳性(箭头所指为胞膜阳性); D: 胰腺癌组织, E-cad阴性.

低或灶性降低者为2分; 癌细胞染色与正常胰腺组织相同者为3分. 0、1和2分者均为异常表达“-”; 3分为正常表达“+”.

1.2.2 细胞侵袭实验 按照我们的方法^[16], 取对数生长期细胞, 胰酶消化, 收集细胞, 加入无血清培养基, 制成 $1 \times 10^9/L$ 的单细胞悬液, 将300 μL 细胞接种于已水化的包被ECMatrix胶(人工重组基底膜)的小室内, 分别加入不同浓度AG490 1 μL , 使其终浓度分别为5, 10, 20 $\mu mol/L$, 对照组加等量PBS. 将小室放置于含100 mL/L胎牛血清培养基的24孔板中, 继续培养48 h, 用PBS浸湿的面签擦去小室内上部表面的细胞和ECMatrix胶, 染色液染色20 min, 光学显微镜下观察穿透的细胞染为蓝色, 200 μL 的100 mL/L醋酸溶解小室下面已穿透的细胞, 溶解液转移入96孔板中, 酶标仪检测560 nm处A值(A_{560}), 以 A_{560} 值代表侵袭的细胞数.

1.2.3 Western blot 按照我们的方法^[17], 用ActiveMotif公司试剂盒提取细胞核蛋白, 分别将相同含量的蛋白样品和2倍上样缓冲液等体积混合, 100℃水中煮沸5 min使蛋白变性. SDS-PAGE电泳后电转移至硝酸纤维素膜上. 50 g/L脱脂奶粉封闭后, 加入1:1000稀释的第一抗体, 4℃孵育过夜, TBS洗膜后, 加入1:5000稀释的第二抗体, 室温60 min, TBS洗膜后, ECL增强发光, X线

表 1 p-STAT3和E-cad蛋白在胰腺癌中表达的关系

	<i>n</i>	E-cad(<i>n</i>)	
		(+)	(-)
p-STAT3(+)	22	6	16
p-STAT3(-)	12	10	2

曝光3 min. 以BAND SCAN图像分析软件进行光密度积分值分析, 将各目标条带与内参照 β -actin条带进行灰度比较, 进行半定量分析.

1.2.4 EMSA 取对数生长期细胞, 参照ActiveMotif公司方法提取细胞核蛋白. 参照Pierce公司方法将1 μg 核蛋白与12 μL 纯水、2 μL 10 \times binding Buffer, 1 μL 500 mL/L glycerol, 1 μL 100 nmol/L $MgCl_2$, 1 μL Poly(dI-dC), 1 μL 10 g/L NP-40和1 μL 生物素标记的STAT3探针(5'biotin-GAT CCT TCT GGG AAT TCC TAG ATC-3', 3'-CTA GGA AGA CCC TTA AGG ATC TAG-biotin5')共20 μL 反应体系室温孵育10 min, 于60 g/L聚丙烯酰胺凝胶120 V电泳2 h, 380 mA半干转膜 45 min, 将尼龙膜置于紫外交联仪中120 mJ/cm²交联1 min, 封闭15 min, HRP连接封闭液孵育15 min, PBS洗膜, 平衡液孵育5 min, 与化学发光液作用5 min后, 将结果曝光于胶片上. 以BAND SCAN图像分析软件进行EMSA电泳条带的灰度比较

■应用要点

本文对STAT3在胰腺癌侵袭转移中的作用机制做出了初步探讨,为深入了解STAT3信号通路在肿瘤进展中的作用奠定了基础。

表 2 p-STAT3和E-cad的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

			p-STAT3		E-cad	
			阳性表达(%)	P值	异常表达(%)	P值
年龄	≥60岁	19	12(63.2)	0.832	8(42.0)	0.154
	<60岁	15	10(66.7)		10(66.7)	
性别	男	22	14(63.6)	1.000	12(54.5)	0.800
	女	12	8(66.7)		6(50.0)	
肿瘤大小	>2cm	31	20(64.5)	1.000	17(54.8)	0.591
	≤2cm	3	2(66.7)		1(33.3)	
肿瘤部位	胰头	29	18(62.1)	0.635	15(51.7)	1.000
	胰体尾	5	4(80.0)		3(60.0)	
病理分级	高分化	18	11(61.1)	0.642	5(27.8)	0.002
	中低分化	16	11(68.8)		13(81.3)	
临床分期	I+II期	19	9(47.4)	0.017	7(36.8)	0.034
	III+IV期	15	13(86.7)		11(73.3)	
淋巴结转移	阴性	25	13(52.0)	0.013	10(40.0)	0.019
	阳性	9	9(100.0)		8(88.9)	

分析。

统计学处理 应用SPSS11.5 统计学软件,采用 χ^2 检验或四格表确切概率检验及Spearman等级相关检验,计量资料用 t 检验, $P<0.05$ 定为具有统计学意义。

2 结果

2.1 p-STAT3和E-cad在胰腺癌中的表达 p-STAT3的阳性表达主要位于胰腺癌细胞的胞核内,染色较深,多呈散在或灶性分布;E-cad的阳性表达主要位于正常胰腺组织腺泡及导管上皮细胞膜上,尤其是细胞交界处,呈较强的均质染色(图1)。p-STAT3在胰腺癌组织中的阳性表达率为64.7%(22/34),对照组正常胰腺组织中表达率为0%(0/10),两者差异有显著性($P<0.05$)。E-cad在胰腺癌组织中异常表达率为52.9%(18/34),对照组正常胰腺组织中异常表达率为0%(0/10),两者差异亦有显著性($P<0.05$)。

2.2 p-STAT3和E-cadherin蛋白在胰腺癌中表达的关系 22例p-STAT3蛋白阳性病例中有16例E-cad蛋白异常表达,12例p-STAT3蛋白阴性病例中有10例E-cad蛋白正常表达,p-STAT3和E-cad表达呈负相关($r = -0.537, P = 0.001$)(表1)。

2.3 p-STAT3和E-cad蛋白的表达与胰腺癌临床病理特征的关系 p-STAT3蛋白的表达与患者的年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、病理分级无关,与临床分期、淋巴结转移有关($P<0.05$);E-cad蛋白的异常表达与患者的年龄、肿瘤大小、肿瘤部位无关,与病理分级和淋巴结转移有关

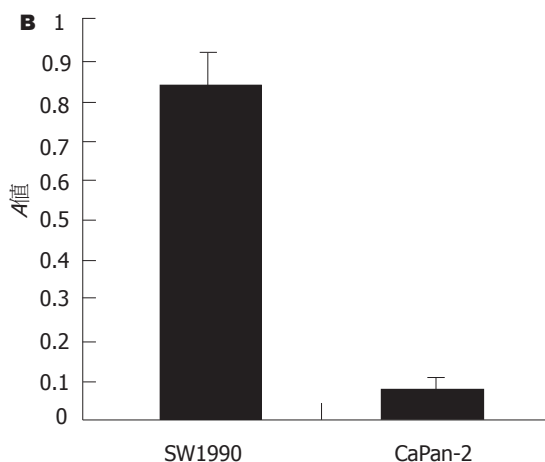
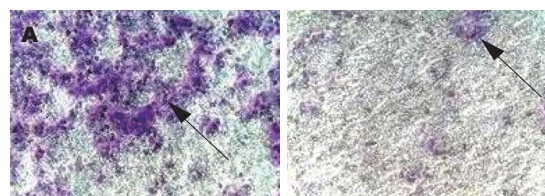


图 2 SW1990和CaPan-2细胞的体外侵袭能力比较。A: 光镜下观察侵袭的细胞染为蓝色,SW1990侵袭的细胞明显高于CaPan-2细胞;B: A值分析显示SW1990侵袭力明显高于CaPan-2细胞。

($P<0.05$)(表2)。

2.4 胰腺癌细胞的体外侵袭能力 体外侵袭实验发现胰腺癌细胞株SW1990比CaPan-2具有更高的侵袭能力,两者相比有显著性差异($P<0.05$)(图2)。

2.5 Western blot和EMSA结果 Western blot发现在胰腺癌高侵袭力细胞株SW1990中p-STAT3蛋白呈高表达,而在低侵袭力细胞株CaPan-2

中呈低表达; EMSA实验亦证实SW1990细胞较CaPan-2细胞具有更高的STAT3-DNA结合活性(图3)。

3 讨论

信号传导和转录激活因子3(signal transduction and activators of transcription-3, STAT3)是近年来研究异常活跃的转录因子, 当细胞因子或生长因子激活其上游Janus激酶(Janus kinase, JAK)时, STAT3激活并形成磷酸化STAT3(p-STAT3), 二分子p-STAT3相互作用形成二聚体进入细胞核, 调节靶基因转录^[18-21]。研究表明STAT3在肺癌^[22]、胰腺癌^[23]、恶性黑色素瘤^[24]、前列腺癌^[25]、胃癌^[26]、淋巴瘤^[27]等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达和激活, 提示STAT3在肿瘤进展中起着重要作用。本研究结果显示p-STAT3蛋白在胰腺癌组织中存在着高表达, 且p-STAT3表达与肿瘤分期和淋巴结转移密切相关。此外, 我们发现胰腺癌高侵袭力细胞株SW1990比低侵袭力细胞株CaPan-2具有更高的STAT3-DNA结合活性和p-STAT3蛋白表达, 提示STAT3的异常激活可能在胰腺癌的侵袭转移中起着重要作用, 但其详细机制还有待阐明。

E-cad是介导上皮细胞间黏附的主要黏附分子, 其功能的正常发挥对维持上皮组织的形态有重要作用。多项研究表明E-cad的表达异常和/或功能丧失在胰腺癌侵袭转移过程中起着重要作用^[28-29], 本研究结果亦显示E-cad的异常表达与胰腺癌的病理分级、临床分期和淋巴结转移有关, 但E-cad的调控机制尚未完全阐明。最近, Suiqing *et al*^[30]使用免疫组织化学的方法检测了30例皮肤鳞状细胞癌标本, 发现在皮肤鳞状细胞癌中E-cad蛋白呈现低表达, 而p-STAT3蛋白表达呈现高表达, 且p-STAT3的表达与肿瘤浸润深度和转移密切相关, 进一步分析证实p-STAT3和E-cad表达呈现高度负相关。此外, 有报道显示STAT3信号通路异常可以改变E-cad所介导的细胞间连接复合物的形成, 增强结直肠癌细胞运动性和侵袭性^[31], 提示肿瘤中E-cad功能调控可能与转录因子STAT3的磷酸化密切相关。本研究结果显示在胰腺癌组织中p-STAT3与E-cad表达亦呈负相关($r = -0.537$, $P = 0.001$), 这与Suiqing *et al*^[30]的研究结果相似。因此, 笔者认为STAT3作为肿瘤细胞内重要的转录因子, 可能通过信号传导途径, 影响E-cad的表达及其功能, 从而减弱细胞间黏附能力, 促进胰腺癌的侵袭

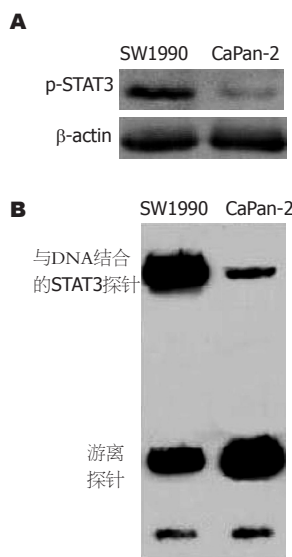


图3 SW1990和CaPan-2细胞p-STAT3表达和STAT3-DNA结合活性比较。A: SW1990细胞的p-STAT3表达明显高于CaPan-2细胞; B: SW1990细胞的STAT3-DNA结合活性明显高于CaPan-2细胞。

■名词解释

STAT3是一类由细胞因子、生长因子等多肽类配体激活的转录因子, 多项研究结果显示STAT3在多种肿瘤组织与细胞系中异常表达, 并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡和血管新生密切相关。最近, STAT3作为癌基因在肿瘤的免疫逃避和侵袭转移中的作用也日益受到人们重视, 以STAT3为靶点进行的肿瘤治疗研究已成为肿瘤基因治疗的热点。

转移。

本研究初步探讨了STAT3信号通路与胰腺癌恶性潜能的关系, 结果表明p-STAT3与胰腺癌侵袭转移及E-cad表达密切相关, 说明STAT3信号通路在胰腺癌侵袭转移中起着重要作用, 而联合检测胰腺癌组织中p-STAT3与E-cad的表达有望成为判断胰腺癌恶性程度的新指标。

4 参考文献

- 1 Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 2001; 107: 351-362
- 2 Kanda N, Seno H, Konda Y, Marusawa H, Kanai M, Nakajima T, Kawashima T, Nanakin A, Sawabu T, Uenoyama Y, Sekikawa A, Kawada M, Suzuki K, Kayahara T, Fukui H, Sawada M, Chiba T. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 4921-4929
- 3 Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2000-2008
- 4 Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 319-329
- 5 Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004; 10: 48-54
- 6 Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang

■同行评价

本文观察了p-STAT3和E-cad在胰腺癌组织及细胞中的表达及其临床意义,认为联合检测两种蛋白对于胰腺癌恶性潜能的判断具有一定的参考价值。文笔流畅,内容丰富,图表清晰,结论明确,有较强的临床参考价值。

- 7 S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mule J, Kerr WG, Jove R, Pardoll D, Yu H. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 2005; 11: 1314-1321
- 8 Hsieh FC, Cheng G, Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 292-299
- 9 裘正军, 刘辰, 胡宏慧, 曹俊. STAT3和Cyclin D1在胰腺癌中的表达及其临床意义. *胰腺病学* 2005; 5: 24-27
- 10 刘辰, 裘正军, 孙红成, 胡宏慧, 黄克俭. STAT3和VEGF在胰腺癌中的表达及其临床意义. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 471-473
- 11 Mialhe A, Levacher G, Champelovier P, Martel V, Serres M, Knudsen K, Seigneurin D. Expression of E-, P-, n-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *J Urol* 2000; 164: 826-835
- 12 Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 2000; 60: 3650-3654
- 13 Chan AO. E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 199-203
- 14 Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 368-372
- 15 Campbell CL, Jiang Z, Savarese DM, Savarese TM. Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158: 25-32
- 16 Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 1997; 112: 46-54
- 17 Huang C, Cao J, Huang KJ, Zhang F, Jiang T, Zhu L, Qiu ZJ. Inhibition of STAT3 activity with AG490 decreases the invasion of human pancreatic cancer cells *in vitro*. *Cancer Sci* 2006; 97: 1417-1423
- 18 黄陈, 裘正军, 刘辰, 孙红成. 阻断STAT3信号转导通路对人胰腺癌细胞生长增殖的抑制作用. *肿瘤* 2006; 26: 414-417
- 19 Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-2488
- 20 Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8: 409-422
- 21 Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 97-105
- 22 Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 315-324
- 23 Seki Y, Suzuki N, Imaizumi M, Iwamoto T, Usami N, Ueda Y, Hamaguchi M. STAT3 and MAPK in human lung cancer tissues and suppression of oncogenic growth by JAB and dominant negative STAT3. *Int J Oncol* 2004; 24: 931-934
- 24 Scholz A, Heinze S, Detjen KM, Peters M, Welzel M, Hauff P, Schirner M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2003; 125: 891-905
- 25 Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 315-327
- 26 Lee SO, Lou W, Qureshi KM, Mehraein-Ghomi F, Trump DL, Gao AC. RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate* 2004; 60: 303-309
- 27 Yu LF, Cheng Y, Qiao MM, Zhang YP, Wu YL. Activation of STAT3 signaling in human stomach adenocarcinoma drug-resistant cell line and its relationship with expression of vascular endothelial growth factor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 875-879
- 28 Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 2003; 101: 1535-1542
- 29 Shin SJ, Kim KO, Kim MK, Lee KH, Hyun MS, Kim KJ, Choi JH, Song HS. Expression of E-cadherin and uPA and their association with the prognosis of pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 342-348
- 30 Dansranjav T, Mobius C, Tannapfel A, Bartels M, Wittekind C, Hauss J, Witzigmann H. E-cadherin and DAP kinase in pancreatic adenocarcinoma and corresponding lymph node metastases. *Oncol Rep* 2006; 15: 1125-1131
- 31 Suiqing C, Min Z, Lirong C. Overexpression of phosphorylated-STAT3 correlated with the invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol* 2005; 32: 354-360

电编 李琪 编辑 张焕兰

慢性胃炎的内镜分类与胃黏膜炎症演变过程的关系

巴图, 牧骑

巴图, 中蒙医院消化内科 内蒙古自治区赤峰市 024000
牧骑, 锦州医学院2005级硕士研究生 辽宁省锦州市 121001
通讯作者: 巴图, 024000, 内蒙古自治区赤峰市红山区哈达街东段, 中蒙医院消化内科. hasibatu666@sohu.com
电话: 0476-8665611
收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-11-04

Relationship between endoscopic classification of chronic gastritis and evolution of gastric mucosal inflammation

Tu Ba, Qi Mu

Tu Ba, Department of Gastroenterology, Chinese and Mongolian Hospital, Chifeng 024000, Inner Mongolia Autonomous Region, China
Qi Mu, Postgraduate of Class 2005 in Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Tu Ba, Department of Gastroenterology, Chinese and Mongolian Hospital, Chifeng 024000, Inner Mongolia Autonomous Region, China. hasibatu666@sohu.com
Received: 2006-09-08 Accepted: 2006-11-04

Abstract

Chronic gastritis is closely correlated with the occurrence of gastric cancer, and it can be detected in 80% adults in our country. Standardization of diagnosis and treatment for chronic gastritis is starved for solution. Various manifestations of chronic gastritis are shown by endoscopy, and erythema and exudative inflammation are the common features under kinds of endoscopes, which are the basis for the evolution of chronic gastritis. Following-up analysis shows that chronic gastritis is in dynamic progression and endoscopic classification is of important significance for the prediction, development monitoring, clinical treatment guidance, efficacy evaluation, and outcome of this disease.

Key Words: Chronic gastritis; Classification; Inflammation; Endoscope

Ba T, Mu Q. Relationship between endoscopic classification of chronic gastritis and evolution of gastric mucosal inflammation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):387-389

摘要

慢性胃炎与胃癌的发生密切相关, 80%以上成年人具有不同程度的慢性胃炎, 规范慢性胃炎的诊断与治疗是我们目前急待解决的问题。内镜下观察, 慢性胃炎有多种表现, 红斑渗出性胃炎是各类内镜下胃炎的共性特征, 也是慢性胃炎演变过程的基础。随访结果表明, 各类胃炎的病变处于不断变化和缓慢发展的动态过程, 内镜下胃炎的形态分类对该病的预防、进展以及临床指导治疗, 判断疗效和分析病变的转归具有重要意义。

关键词: 慢性胃炎; 分类; 炎症; 内镜

巴图, 牧骑. 慢性胃炎的内镜分类与胃黏膜炎症演变过程的关系. *世界华人消化杂志* 2007;15(4):387-389
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/387.asp>

0 引言

慢性胃炎是一类在人群中发病率很高的疾病。有关资料显示, 80%以上成年人具有不同程度的慢性胃炎, 在各级医院消化门诊中, 因慢性胃炎前来就诊患者比例也很高。同时慢性胃炎与胃癌发生密切相关。可见该病不但影响了人们的生活质量, 对人类健康亦构成了严重的危害。正因如此, 要搞清内镜下胃炎的形态分类与胃黏膜炎症演变过程的关系十分重要。为此, 笔者查阅近期主要文献, 结合个人临床经验的点滴体会, 做简要综述报道。

1 慢性胃炎的内镜分类

我们通过5090例胃炎观察^[1], 认为悉尼胃炎新分类标准内镜部分以肉眼所见病变描述为主, 观察简明准确, 内镜医师可以掌握, 把我国2000年全国慢性胃炎研讨会制定的内镜下慢性胃炎分为浅表性胃炎(点、片状、条状红斑, 黏膜粗糙不平, 点/斑状出血)和萎缩性胃炎(黏膜呈颗粒状, 黏膜血管显露, 色泽灰暗, 皱襞细小)共识意见^[2], 纳入国际统一标准是完全可以做到, 这样有利于我国胃炎分类诊断的标准化与规范化, 对提高慢性胃炎诊断的一致性和与国际间进行

■背景资料

我国制定了慢性胃炎的诊断与治疗标准, 但规范慢性胃炎的诊断与治疗仍是目前亟待解决的问题, 对内镜下慢性胃炎的形态分类与胃黏膜炎症演变过程的关系尚缺乏深入研究和认识。

■同行评价

本文样本含量较大, 有较好的临床说服力, 能体现当今研究的热点.

更广泛的学术交流有很大的帮助.

慢性胃炎内镜下炎症的形态特征有黏膜颜色改变、充血性红斑、水肿、渗出物、红白相间、血管透见、黏膜增生(结节状、细颗粒状、乳头状隆起)、黏膜糜烂(平坦糜烂、隆起糜烂、凹陷糜烂)、黏膜出血、黏膜皱襞改变(皱襞增粗、变细)、胆汁反流等11种表现. 经临床资料表明, 红斑渗出性胃炎(65.5%), 平坦糜烂性胃炎(9.4%), 隆起糜烂性胃炎(8.2%), 胆汁反流性胃炎(9.2%), 萎缩性胃炎(5.6%), 出血性胃炎(1.0%), 皱襞增粗性胃炎(0.2%)等7种类型. 病变部位分为胃窦(37.2%), 胃窦胃体(30.9%), 全胃(27.2%), 贲门胃底(4.7%). 病变程度分为轻度(16.7%), 中度(78.6%), 重度(4.7%). 根据悉尼胃炎诊断标准^[3], 并结合1619例慢性胃炎的内镜和活检组织检查结果进行对照研究, 笔者提出了慢性胃炎的内镜分型分级诊断标准^[4], 这对慢性胃炎的内镜特征和分级标准作了进一步细分和量化, 便于基层医院操作, 而且对慢性胃炎病变程度的评估和对药物疗效的观察提供了可靠依据.

2 慢性胃炎的内镜分类与胃黏膜炎症演变过程的关系

2.1 红斑渗出与各类型胃炎之间的关系 内镜下所见的充血性红斑(点、片状、条状)、水肿、红白相间、渗出物等称为红斑渗出性胃炎, 是各类内镜下胃炎的共性特征, 也是慢性胃炎演变过程的基础(图1). 通过认识内镜下胃炎的共性表现, 而找出内镜下个性表现, 这样才能提高认识与鉴别诊断水平, 也有利于观察各型之间的演变过程.

2.2 平坦糜烂与胃溃疡的关系 我们观察发现, 无糜烂性胃炎时胃溃疡发生率为10.9%, 而胃内有平坦糜烂时胃溃疡发生率为30.5%-41%, 大大超过前者. 在红斑渗出性胃炎或萎缩性胃炎中, 有平坦糜烂者其幽门螺杆菌(*H pylori*)阳性率、活动性炎症发生率均显著高于无糜烂者, 胃溃疡发生率亦显著高于无糜烂者. 同时胃窦糜烂合并红斑渗出性胃炎时, 胃溃疡发生率亦显著高于糜烂合并萎缩性胃炎, *H pylori*阳性率及活动性炎症发生率亦相应较高. 因此, 推测胃内平坦糜烂合并胃溃疡的发生首先与糜烂的存在有关, 而糜烂往往是*H pylori*引起的活动性炎症的表现, 其次与胃窦红斑渗出性胃炎有关. 目前许多研究证明消化性溃疡形成与*H pylori*感染密切相

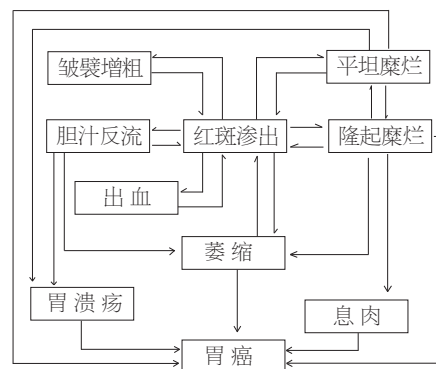


图1 慢性胃炎的演变过程示意图.

关, 从形态学上讲, 糜烂和溃疡仅仅是溃烂深度的区别, 因此, 糜烂和溃疡具有共同的病理基础.

2.3 平坦糜烂与隆起糜烂的关系 90例胃黏膜糜烂中, 平坦糜烂胃底胃体(86.7%)明显多于胃窦(13.3%), 平坦糜烂伴有隆起糜烂(13.3%), 消化性溃疡(1.8%), 肠上皮化生(1.3%), 不典型增生(2.3%), *H pylori*检出率为43.2%, 而隆起糜烂胃窦(91.8%)明显多于胃底胃体(8.2%), 隆起糜烂伴有平坦糜烂(1.8%), 消化性溃疡(7.3%), 肠上皮化生(5.3%), 不典型增生(6.5%), *H pylori*检出率为90.2%. 资料显示, 胃黏膜隆起糜烂与平坦糜烂存在着明显的部位差异, 这主要是由于十二指肠反流和*H pylori*主要增殖于胃窦而引起. 平坦糜烂性胃炎既可在短期内(6-12 wk)内愈合, 亦可长期存在, 并有相当一部分演变为隆起糜烂性胃炎, 由于*H pylori*感染及高胃酸等因素损害胃黏膜内腺细胞, 导致腺管及腺上皮细胞增生, 以及嗜中性粒细胞浸润(病变为活动期者)、淋巴细胞、浆细胞浸润, 黏膜肌肥厚导致黏膜隆起, 形成隆起糜烂性胃炎. 随着胃黏膜糜烂类型的不同伴发病变也不同, 在隆起糜烂中伴有消化性溃疡、萎缩、肠上皮化生、不典型增生是明显多于平坦糜烂者, 这些都属于癌前病变和相关病变. 曾对2例平坦糜烂性胃炎和2例隆起糜烂性胃炎分别在6 mo和1 a进行随访复查中发现转为IIc早期胃癌和I型早期胃癌. 因此, 对胃黏膜糜烂患者定期随访十分必要.

2.4 红斑渗出与胃黏膜萎缩的关系 对86例红斑渗出性胃炎和76例萎缩性胃炎患者进行6 a随访, 结果显示, 中度红斑渗出性胃炎患者在随访中有49例(56.9%)病变稳定, 30例(34.9%)病变程度转为重度, 其中20例(23.3%)转为轻-中度的萎缩性胃炎, 另有7例(8.2%)红斑渗出性胃炎由中度好转为轻度. 萎缩性胃炎中有53例(70.7%)病

变稳定, 22例(29.3%)病变程度转为重度, 曾经过2个疗程(6 mo)持续性蒙药治疗, 有10例患者由重度转为中度, 7例患者由中度转为轻度, 3例患者转为轻-中度红斑渗出性胃炎, 其中有2例分别第2、第3年转为黏膜内癌。随访结果表明, 红斑渗出性胃炎和萎缩性胃炎的病变都处于不断变化的动态过程中, 他们又各自表现一些不同特点, 红斑渗出性胃炎比萎缩性胃炎的病变活跃, 在一定条件下, 病变加重可发展为萎缩性胃炎。通过对红斑渗出性胃炎发展成萎缩性胃炎的20例患者的病情分析可以看出, 35岁以上特别是50-60岁的年龄组的重度红斑渗出性胃炎患者, 原有重度红斑渗出炎症和存在轻-中度肠上皮化生的患者, 还有不合理应用H₂受体阻滞剂和质子泵抑制剂药物的患者, 发展为萎缩性胃炎的比例较高, 这不但说明红斑渗出性胃炎可发展为萎缩性胃炎, 而且提示炎症、*H. pylori*感染、胆汁反流、肠上皮化生可能促进萎缩性胃炎发生的主要因素。因此, 红斑渗出性胃炎向萎缩性胃炎的发展是一个较为复杂和缓慢的过程, 所以, 只要我们准确诊断和合理应用药物治疗, 可以延缓胃炎的发展, 阻止转为萎缩性胃炎, 而且能防止癌前病变的发生。

2.5 胆汁反流与胃黏膜萎缩的关系 510例慢性胃炎患者中, 内镜诊断单纯胆汁反流性胃炎120例, 检出率为23.5%, 其中25.0%的胆汁反流性胃炎患者存在*H. pylori*感染, 而非胆汁反流性胃炎患者的*H. pylori*阳性率达79.5%, 两者间有显著性差异($P<0.01$)。120例单纯胆汁反流性胃炎患者中, 病理检查发现有50%存在胃黏膜萎缩, 16.7%伴肠上皮化生, 5%出现不典型增生, 而非胆汁反流性胃炎患者中, 28%存在胃黏膜萎缩, 4.1%伴肠上皮化生, 0.5%出现不典型增生, 差异非常显著意义($P<0.01$)。本组资料观察表明, 胆汁反流性

胃炎患者中*H. pylori*感染率较低于非胆汁反流性胃炎, 提示胆汁反流性胃炎与*H. pylori*的感染无明显关系, 这与有关文献报道一致^[5-7]。*H. pylori*能产生强有力的尿素酶, 分解尿素产生氨, 改变局部环境, 引起黏膜炎症。*H. pylori*在高浓度的胆汁酸作用下, 其外形原来的杆状变成表面带有气泡的球状, 最后浓缩呈团块状而失去活性。由于胆汁破坏胃黏膜屏障, 使胃腔内的H⁺逆弥散到黏膜, 破坏了黏膜下的中性环境, 不利于*H. pylori*生长。因此, 单纯胆汁反流性胃炎患者*H. pylori*感染率较低。病理检查中, 胆汁反流性胃炎有胃黏膜萎缩、肠上皮化生、不典型增生明显高于非胆汁反流性胃炎, 提示胃黏膜组织学的异常与胃液胆酸浓度的升高密切相关。慢性胃炎→胃黏膜萎缩→肠上皮化生→不典型增生→胃癌这一模式过程已为国内外多数学者所公认。由此看来, 胆汁反流与萎缩性胃炎, 胃癌关系似乎较*H. pylori*相关性胃炎更为密切, 值得进一步研究。

总之, 慢性胃炎的内镜下形态分类与胃黏膜炎症演变过程的关系研究, 对该病的预防和防止病情进一步发展, 而且对慢性胃炎的临床指导治疗, 判断疗效和分析病变的转归具有重要的临床意义。

3 参考文献

- 1 巴图, 冯立英, 王丽霞. 悉尼胃炎新分类5090例内镜应用体会. 新消化病学杂志 1997; 5: 156-157
- 2 中华医学会消化病学分会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见. 中华消化杂志 2000; 20: 199-201
- 3 张锦坤. 悉尼胃炎新分类. 内镜 1991; 8: 43-44
- 4 巴图. 慢性胃炎的内镜分类及诊断探讨. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 181-182
- 5 刘明东, 徐肇敏. 胆汁反流性胃炎的病因探讨. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 51-52
- 6 余宁, 黄茂涛, 赵悦, 雷佩琪, 郭敬宪. 幽门螺杆菌和胆汁反流性胃炎. 华人消化杂志 1998; 6: 944
- 7 张良臻, 蒋文彬, 朱明真, 冯秋玲, 张红岩. 幽门螺杆菌感染与胆汁反流相关性胃炎. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 34-35

电编 张敏 编辑 王晓瑜

埃索美拉唑对胃黏膜的保护作用及其机制

乐桥良, 张志坚, 林克荣

■背景资料

埃索美拉唑是在酸相关性疾病治疗中第一个发展为光学异构体形式的PPI, 是奥美拉唑的左旋异构体, 通过抑制胃壁细胞分泌小管的H⁺/K⁺-ATP酶, 抑制胃酸分泌, 但对胃黏膜亦有保护作用, 这方面研究较少, 其机制目前不清楚。一氧化氮合成酶(NOS)广泛存在于胃肠道中, 其产物NO可增加胃肠道黏膜上皮屏障、刺激上皮细胞分泌黏液和碳酸氢盐、减少中性粒细胞黏附、增加肥大细胞稳定性、抗自由基作用及增加黏膜血流量等调节胃肠道黏膜防御功能, 对胃肠道黏膜损伤有重要保护作用。有关NO是否介导埃索美拉唑对胃黏膜保护作用尚未见报道。

乐桥良, 张志坚, 林克荣, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化科 福建省福州市 350025

通讯作者: 乐桥良, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化科。

leqiang@sohu.com

电话: 0591-87893856

收稿日期: 2006-12-21 接受日期: 2006-12-27

Effect of esomeprazole on gastric mucosal lesion and its mechanism in rats

Qiao-Liang Le, Zhi-Jian Zhang, Ke-Rong Lin

Qiao-Liang Le, Zhi-Jian Zhang, Ke-Rong Lin, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Qiao-Liang Le, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, 156 Xi'erhuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. leqiang@sohu.com

Received: 2006-12-21 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To observe the protective effect of esomeprazole on gastric mucosa and its mechanism.

METHODS: Before the model of gastric mucosal lesion was made by pure alcohol, esomeprazole (20 mg/kg) was intragastrically administered while N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 4 mg/kg) and L-arginine (250 mg/kg) were intravenously injected into the rats. Gastric mucosal blood flow (GMBF) was measured with laser Doppler flowmetry (LDF), while gastric mucosal and serum NO $_2^-$ /NO $_3^-$ levels were examined by cadmium granulation reduction and colorimetric method. The changes of ulcer index and the severity of tissue necrosis and neutrophil infiltration were also observed.

RESULTS: The ulcer index was significantly lower in the rats with esomeprazole pretreatment than that in the model rats (5.6 \pm 2.2 vs 25.3 \pm 2.4, $P < 0.01$), and the degree of tissue necrosis and neutrophil infiltration were also much milder (P

< 0.01). Prior administration of L-NAME obviously inhibited the protective effect of esomeprazole on gastric mucosa, but the inhibition was alleviated by L-arginine. Esomeprazole increased GMBF and gastric mucosal or serum NO $_2^-$ /NO $_3^-$ level, which was suppressed by L-NAME. Esomeprazole had no marked effect on the secretion of gastric acid.

CONCLUSION: Esomeprazole can protect gastric mucosa against alcohol-induced injury, which is mediated by nitric oxide.

Key Words: Esomeprazole; Gastric mucosal lesion; Cytoprotection; Nitric oxide

Le QL, Zhang ZJ, Lin KR. Effect of esomeprazole on gastric mucosal lesion and its mechanism in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):390-393

摘要

目的: 探讨埃索美拉唑对大鼠胃黏膜保护的作用及其机制。

方法: 在乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤前, 预先给予埃索美拉唑(20 mg/kg)灌胃, L-硝基-精氨酸甲酯(L-NAME, 4 mg/kg)和L-精氨酸(250 mg/kg)iv. 采用激光多普勒血流计(LDF)测定胃黏膜血流量(GMBF), 镉粒还原和比色法测定胃黏膜和血浆NO $_2^-$ /NO $_3^-$ 含量, 并观察胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI)、溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润严重程度的变化。

结果: 与模型损伤组比, 埃索美拉唑组大鼠UI明显降低(5.6 \pm 2.2 vs 25.3 \pm 2.4, $P < 0.01$), 溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润程度明显减轻($P < 0.01$)。预先用L-NAME处理后, 埃索美拉唑保护胃黏膜损伤作用明显减弱; L-NAME抑制作用可被L-精氨酸拮抗。向胃内灌注埃索美拉唑, 可增加GMBF、胃黏膜和血浆NO $_2^-$ /NO $_3^-$, L-NAME可逆转这种作用, 但对埃索美拉唑抑制酸分泌作用无明显影响。

结论: 埃索美拉唑通过NO介导对大鼠胃黏膜损伤有重要的保护作用, 而与埃索美拉唑抑制

酸分泌作用无关。

关键词: 埃索美拉唑; 胃黏膜损伤; 细胞保护; 一氧化氮

乐桥良, 张志坚, 林克荣. 埃索美拉唑对胃黏膜的保护作用及其机制. 世界华人消化杂志 2007;15(4):390-393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/390.asp>

0 引言

埃索美拉唑(esomeprazole)是人工合成的新一代质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI), 对胃酸分泌有显著的抑制作用^[1-3]; 同时他对胃黏膜具有保护作用^[4-12], 但这方面作用机制尚未完全阐明。一氧化氮(nitric oxide, NO)是扩血管物质, 可增加胃黏膜血流量, 对胃黏膜具有保护作用^[13-22]。本实验研究了埃索美拉唑对大鼠胃黏膜保护作用, 并探讨NO是否参与了这一过程。

1 材料和方法

1.1 材料 纯种、♂、健康SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供), 体质量200-260 g, 实验前禁食24 h, 但不禁水。埃索美拉唑是阿斯利康公司产品, *L*-硝基-精氨酸甲酯(N ω -nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME)为Sigma公司产品, *L*-精氨酸为上海华美工程公司产品。镉粒为上海亨新工厂产品, 甘氨酸、亚硝酸盐为上海试剂一厂产品, 硫酸铜、N-1-奈乙胺盐酸盐为上海试剂三厂产品, 对氨基苯磺酸为上海山海科技研究所产品, 硫酸、硫酸锌、氢氧化钠、粉红为上海试剂二厂产品。XHF-1高速分解器为上海金山生化仪器厂产品, TG₃₂₈ B型分析天平为上海天平仪器厂产品, 801型离心机为上海手术器械厂产品, 724微型可见分光光度计为上海光学仪器厂产品, 眼科手术器械一套。激光多普勒血流计(LDF), LDF-III型, 南开大学制造, 技术参数如下: He-Ne光源, 功率2毫瓦(mW), 输出功率>1 mW, 光纤长2.5 m, 测定范围为1 mm半球区域, 量程选×1档, 时间常数1 s档, 频率为4 kHz。

1.2 方法

1.2.1 胃黏膜损伤模型制备 大鼠禁食24 h后, 30 g/L戊巴比钠(4 mg/kg) ip麻醉, 用1 mL无水乙醇灌胃, 1 h后腹正中切口进入腹腔, 沿胃大弯处剪开胃, 并进行各项实验指标测定。

1.2.2 给药和分组 取SD大鼠99只, 分为5组, I-IV组每组22只, V组11只。I组: 假手术组, 作为正常对照; II组: 损伤模型组, 作为损伤对照; III组: 埃索美拉唑组, 在用无水乙醇灌胃30 min前, 向胃

内灌注埃索美拉唑(20 mg/kg)。IV组: *L*-NAME组, 用埃索美拉唑灌胃20 min前, iv *L*-NAME (4 mg/kg)。V组: *L*-精氨酸(*L*-arginine)组, 在iv *L*-NAME 15 min前, iv *L*-精氨酸(250 mg/kg)。I-IV组又分成2小组, 其中1组用于胃酸、胃黏膜血流量、胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻测定, 另一组用于胃黏膜损伤指数判定和组织学观察。对照组给予等量的生理盐水。

1.2.3 胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI)判定 按Guth标准计算溃疡指数, 处死动物, 取出胃及十二指肠, 沿大弯侧剪开后, 展平, 按溃疡或糜烂面积大小给予计分: 斑点状糜烂为1分, 糜烂<1 mm为2分, 糜烂介于1-2 mm之间为3分, 糜烂为2-4 mm为4分, 糜烂>4 mm为5分。

1.2.4 组织学观察 将全胃固定于甲醛液, 制成石蜡切片, HE染色, 光镜下观察, 评定标准如下: (1)坏死物质: 未见为0, 仅在溃疡底面边缘有少许为(+), 薄层覆盖整个溃疡底为(++), 厚层覆盖为(+++); (2)中性粒细胞浸润: 未见为0, 偶见(+), 明显(+++), 介于后两者之间为(++)。

1.2.5 胃黏膜血流量(GMBF)测定 采用LDF测定, 开机预热30 min调出LDF-III GMBF测定程序, 从胃大弯处作一小切口, 用LDF的探头轻轻垂直地接触胃黏膜表面, 待血流稳定后, 在胃体大小弯、胃窦大小弯取4点测定GMBF, 取其平均值, 以激光多普勒信号电压值(mV)表示血流量的相对数值。

1.2.6 胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻含量测定 取胃, 用钝性刀片刮取胃黏膜, 组织匀浆, 离心后, 取上清液, -20℃贮存待测; 取外周血2 mL, EDTA抗凝, 离心后, 取上清液, -20℃贮存待测; 采用镉粒还原和比色法测定^[23]。

1.2.7 胃液pH测定 取胃液2 mL, 加酚红指示剂2滴, 黄色表示有胃酸存在。用0.1 mol/L氢氧化钠滴定至粉红色。所耗氢氧化钠mL数乘以50, 即为胃酸浓度(mmol/L), 并换算成pH。

统计学处理 多组计量资料之间比较采用方差分析, 组间两两比较用 q 检验; 方差不齐时, 用秩和检验; 实验数据均以mean±SD表示, 计数资料之间采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 UI测定 损伤模型组大鼠UI(25.3±2.4)比正常对照组(0)明显升高($P<0.01$); 埃索美拉唑组与损伤模型组比明显降低($P<0.01$); *L*-NAME组与损伤模型组比无明显差异($P>0.05$), 而比埃索美

■创新盘点

本研究结果显示, 埃索美拉唑明显降低由乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤的溃疡损伤指数(UI), 溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润程度明显减轻。NOS拮抗剂*L*-NAME可明显减弱埃索美拉唑对胃黏膜损伤保护作用, *L*-NAME抑制作用可被NO前体*L*-精氨酸拮抗。埃索美拉唑可增加胃黏膜血流量(GMBF)、胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻, *L*-NAME可逆转这种作用, 但对埃索美拉唑抑制胃酸分泌作用无明显影响。表明埃索美拉唑通过NO介导对大鼠胃黏膜损伤有重要的保护作用, 而与埃索美拉唑抑制胃酸分泌作用无关。

■同行评价

本研究方法和技术有一定的创新性,实验对照设计合理,统计学处理方法恰当,科学结论较明确,实验证据较充足,讨论条理分明,参考文献引用较新,较好地反映了我国胃病学临床和基础研究的先进水平。

表 1 各组大鼠胃黏膜损伤指数和组织学观察(mean \pm SD, $n = 11$)

组别	UI	坏死物质		中性粒细胞	
		$\leq +$	$++ \sim +++$	$\leq +$	$++ \sim +++$
II	25.3 \pm 2.4	2	9	2	9
III	5.6 \pm 2.2 ^b	9	2 ^b	8	3 ^b
IV	24.8 \pm 2.5 ^d	2	9 ^d	2	9 ^d
V	5.8 \pm 2.3 ^b	8	3 ^b	9	2 ^b

^b $P < 0.01$ vs II组; ^d $P < 0.01$ vs III组。

表 2 I-IV组大鼠GMBF、胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻及胃液pH的变化(mean \pm SD, $n = 11$)

分组	GMBF (mV)	胃黏膜NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (nmol/L)	血浆NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μ mol/L)	pH
I	324 \pm 48	0.35 \pm 0.04	29.94 \pm 2.08	3.45 \pm 0.54
II	190 \pm 24 ^b	0.69 \pm 0.08 ^b	54.78 \pm 4.16 ^b	2.27 \pm 0.37 ^a
III	295 \pm 45	0.88 \pm 0.07	81.56 \pm 6.49	6.89 \pm 0.78
IV	190 \pm 27 ^c	0.44 \pm 0.08 ^d	31.69 \pm 3.47 ^d	6.76 \pm 0.72

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs I, III组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs III组。

拉唑组明显升高($P < 0.01$); *L*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比均明显降低($P < 0.01$)(表1)。

2.2 胃组织学观察 损伤模型组大鼠溃疡底部可见大量坏死物质,周围组织中中性粒细胞浸润明显;埃索美拉唑组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润均比损伤模型组明显减轻($P < 0.01$);*L*-NAME组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润与损伤模型组比均无明显差异($P > 0.05$),而比埃索美拉唑组严重($P < 0.01$);*L*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比二者均明显减轻($P < 0.01$),与埃索美拉唑组比无明显差异($P > 0.05$)(表1)。

2.3 GMBF 损伤模型组大鼠GMBF与正常对照组比明显降低($P < 0.01$),埃索美拉唑组与损伤模型组比明显升高($P < 0.05$),*L*-NAME组与损伤模型组比无明显差异($P > 0.05$),而比埃索美拉唑组明显降低($P < 0.05$)(表2)。

2.4 胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻含量 损伤模型组大鼠胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻比正常对照组均非常显著增加($P < 0.01$);埃索美拉唑组比正常对照组非常显著增加($P < 0.01$),亦比损伤模型组明显增加($P < 0.05$);*L*-NAME组与埃索美拉唑组比显著减少($P < 0.01$),而与正常对照组比无明显差异($P > 0.05$)(表2)。

2.5 胃液pH 损伤模型组大鼠胃液pH与正常对照组比明显降低($P < 0.05$),埃索美拉唑组与损伤模型组比明显升高($P < 0.01$),*L*-NAME组与埃索美拉唑组比无明显差异($P > 0.05$)(表2)。

3 讨论

埃索美拉唑是奥美拉唑的*S*-异构体,通过特异性的靶向作用机制减少胃酸分泌,为壁细胞中质子泵的特异性抑制剂,从而治疗消化性溃疡^[1-3]。有研究表明,埃索美拉唑对胃黏膜损伤具有保护作用^[4-12],Koch *et al*^[4]报道埃索美拉唑能有效

预防消炎痛引起大鼠胃体和胃窦的胃黏膜损伤,在消炎痛引起的溃疡模型中,也能明显改善其UI; Hatlebakk *et al*^[5]报道,埃索美拉唑对乙醇引起的胃黏膜损伤有细胞保护作用的同时能加强细胞保护适应,预先给阿司匹林、氯化氨或应激造成的实验性胃黏膜损伤的大鼠胃内灌注埃索美拉唑,能明显减轻胃黏膜损伤^[6-7];埃索美拉唑对非甾体类消炎药(NSAIDs)引起的胃黏膜损伤有很好的保护作用^[8-9],Genta *et al*^[8]对需要连续长期应用NSAIDs类药治疗的风湿性疾病患者同时给予埃索美拉唑口服,与对照组比,埃索美拉唑能非常有效的预防消化性溃疡发生;埃索美拉唑对危重患者应激性胃黏膜损害及胃黏膜出血有很好的预防作用^[10-11];对于志愿者口服阿司匹林引起的胃黏膜损伤埃索美拉唑也有保护作用^[12]。本实验结果显示,预先用埃索美拉唑给由乙醇诱导胃黏膜损伤大鼠灌胃,与损伤模型组比,胃黏膜损伤指数明显降低,病理组织观察,其溃疡坏死物质和周围中性粒细胞浸润亦明显减少,表明埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用。

一氧化氮(NO)是由血管内皮细胞产生血管舒张因子^[13-14],近年来有报道,NO对胃黏膜损伤有保护作用^[13-22]; Konturek *et al*^[15]发现 NO介导了vit C保护健康志愿者口服阿斯匹林诱导的胃黏膜损伤;NO抑制剂*L*-NAME能增加水应激的胃黏膜损伤,而NO前体*L*-精氨酸能明显减轻这种胃黏膜损伤^[16-18];NO可减轻由乙醇诱导的实验性胃黏膜损伤的严重程度^[19-22],Kalia *et al*^[19]预先用*L*-NAME(NOS抑制剂)处理大鼠,发现会加重由乙醇诱导的胃黏膜损伤,这种胃黏膜损伤并能被*L*-精氨酸逆转,另外,*L*-NAME能明显降低大鼠GMBF和胃黏膜血红蛋白含量^[20],表明NO对胃黏膜损伤有保护作用。我们用*L*-NAME预先处理大鼠,能明显升高埃索美拉唑降低的

胃黏膜损伤指数, 溃疡底部坏死物质增多, 周围中性粒细胞浸润也非常明显, 在 L -NAME给药15 min前给予 L -精氨酸则能抑制这种损伤作用, 表明NO介导了埃索美拉唑对胃黏膜的保护作用。本实验结果显示, 向胃内灌注埃索美拉唑, 能明显增加胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量, 同时GMBF亦升高, 而在埃索美拉唑灌胃20 min前给予 L -NAME则能逆转这种作用。同时, 埃索美拉唑能显著提高胃液pH, 抑制胃酸分泌, 而 L -NAME则对埃索美拉唑抑制胃酸分泌的作用无明显影响。

总之, 我们认为, 埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用, NO通过增加GMBF介导了这种保护作用, 而与埃索美拉唑抑制胃酸分泌作用无关。

4 参考文献

- 1 Sheu BS, Kao AW, Cheng HC, Hunag SF, Chen TW, Lu CC, Wu JJ. Esomeprazole 40 mg twice daily in triple therapy and the efficacy of *Helicobacter pylori* eradication related to CYP2C19 metabolism. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 283-288
- 2 Wilder-Smith CH, Rohss K, Bondarov P, Hallerback B, Svedberg LE, Ahlbom H. Esomeprazole 40 mg i.v. provides faster and more effective intragastric acid control than pantoprazole 40 mg i.v.: results of a randomized study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1099-1104
- 3 Klotz U, Schwab M, Treiber G. CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 2-8
- 4 Koch TR, Petro A, Darrabie M, Opara EC. Effects of esomeprazole magnesium on nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 86-93
- 5 Hatlebakk JG. Review article: gastric acidity--comparison of esomeprazole with other proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 Suppl 1: 10-15; discussion 16-17
- 6 Dent J. Review article: pharmacology of esomeprazole and comparisons with omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 Suppl 1: 5-9
- 7 Sostek MB, Chen Y, Skammer W, Winter H, Zhao J, Andersson T. Esomeprazole administered through a nasogastric tube provides bioavailability similar to oral dosing. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 581-586
- 8 Genta RM, Rindi G, Fiocca R, Magner DJ, D'Amico D, Levine DS. Effects of 6-12 months of esomeprazole treatment on the gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1257-1265
- 9 Mantry P, Shah A, Sundaram U. Celecoxib associated esophagitis: review of gastrointestinal side effects from cox-2 inhibitors. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 61-63
- 10 Spirt MJ. Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther* 2004; 26: 197-213
- 11 Gibbons TE, Gold BD. The use of proton pump inhibitors in children: a comprehensive review. *Paediatr Drugs* 2003; 5: 25-40
- 12 Galmiche JP, Bruley Des Varannes S, Ducrotte P, Sacher-Huvelin S, Vavasseur F, Taccon A, Fiorentini P, Homerin M. Tenatoprazole, a novel proton pump inhibitor with a prolonged plasma half-life: effects on intragastric pH and comparison with esomeprazole in healthy volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 655-662
- 13 Uchida M, Matsueda K, Shoda R, Muraoka A, Yamato S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Jpn J Pharmacol* 2001; 85: 133-138
- 14 Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PCh, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 761-773
- 15 Konturek PC, Kania J, Gessner U, Konturek SJ, Hahn EG, Konturek JW. Effect of vitamin C-releasing acetylsalicylic acid on gastric mucosal damage before and after *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Eur J Pharmacol* 2004; 506: 169-177
- 16 Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001; 43: 535-541
- 17 Samini M, Moezi L, Jabarizadeh N, Tavakolifar B, Shafaroodi H, Dehpour AR. Evidences for involvement of nitric oxide in the gastroprotective effect of bromocriptine and cyclosporin A on water immersion stress-induced gastric lesions. *Pharmacol Res* 2002; 46: 519-523
- 18 乐桥良, 张志坚, 林克荣, 王雯. 潘托拉唑对胃黏膜损伤保护作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2005; 20: 2480-2484
- 19 Kalia N, Bardhan KD, Reed MW, Jacob S, Brown NJ. L-Arginine protects and exacerbates ethanol-induced rat gastric mucosal injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 915-924
- 20 Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2503-2508
- 21 Sanchez S, Martin MJ, Ortiz P, Motilva V, Herreras JM, Alarcon de la Lastra C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. *Inflamm Res* 2002; 51: 385-392
- 22 Gallego-Sandin S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Galvez-Mugica MA, Garcia AG, Pajares JM, Abad-Santos F. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1538-1544
- 23 乐桥良, 林克荣, 张志坚. 一氧化氮在雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2796-2800

电编 李琪 编辑 王晓瑜

中药提取物人街草对乙型肝炎病毒的抑制作用

欧阳雁玲, 李泽琳, 曾毅

■背景资料

目前抗乙型肝炎药物由于效率不高、价格昂贵, 临床治疗仍是难题之一。有目的的从现在已知的中药中筛选有活性的抗乙型肝炎药物, 则可以缩短研究时间, 具有更强的实用性, 显示出巨大的潜力。

欧阳雁玲, 李泽琳, 曾毅, 北京工业大学生命科学与生物工程学院病毒药理室 北京市 100022

通讯作者: 李泽琳, 100022, 北京市北京工业大学生命科学与生物工程学院病毒药理室. ouyang1964@sohu.com

电话: 010-67391668 传真: 010-67392780

收稿日期: 2006-11-24 接受日期: 2006-12-08

Effect of Chinese medicine extract *Ren Xian Cao* on the replication of hepatitis B virus

Yan-Ling Ouyang, Ze-Lin Li, Yi Zeng

Yan-Ling Ouyang, Ze-Lin Li, Yi Zeng, Laboratory of Viral Pharmacology, College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China
Corresponding to: Zelin Li, Laboratory of Viral Pharmacology, College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China. ouyang1964@sohu.com

Received: 2006-11-24 Accepted: 2006-12-08

Abstract

AIM: To study the anti-viral effect of *Ren Xian Cao* (RXC), extracted from compound agent *Qiedu Zengning* capsule ZL-1, on the replication of hepatitis B virus (HBV).

METHODS: HepG2.2.15 cells were co-cultured with different concentrations of RXC, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine the secretion of HBsAg and HBeAg. Duck models of HBV infection was established by intravenous injection of duck HBV, and then treated with different doses of RXC. The changes of duck HBV DNA were observed.

RESULTS: After RXC addition for 8 days, the half toxic concentration (TC_{50}) of RXC was 1126.01 mg/L, and the half inhibitory concentration (IC_{50}) on the secretion of HBsAg and HBeAg was 17.52 and 754.26 mg/L, respectively. The value of therapeutic index (TC_{50}/IC_{50}) for HBsAg and HBeAg was 64.27 and 1.49, respectively. RXC at a dose of 0.8 g/kg significantly lowered the level of serum duck HBV DNA at the 5th, 10th day of treatment and 3 days after the end of treatment as compared with normal saline did (absorbency:

$0.660 \pm 0.07, 0.632 \pm 0.03, 0.663 \pm 0.05$ vs $0.872 \pm 0.08, P < 0.05$).

CONCLUSION: RXC has inhibitory effect on the replication of HBV.

Key Words: Hepatitis B virus; HepG2.2.15; *Ren Xian Cao*; Lamivudine

Ouyang YL, Li ZL, Zeng Y. Effect of Chinese medicine extract *Ren Xian Cao* on the replication of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):394-398

摘要

目的: 观察复方制剂祛毒增宁胶囊(ZL-1)药物有效组分人街草(JH)与HBsAg蛋白的结合情况, 及其体内外抗乙型肝炎病毒的作用。

方法: HepG2.2.15与不同浓度JH共培养, 采用ELISA法HBsAg和HBeAg的分泌情况。建立鸭乙型肝炎病毒感染模型, 以不同剂量JH进行治疗, 观察鸭血清乙型肝炎病毒DNA (DHBV-DNA)的变化。

结果: JH作用于HepG2.2.15细胞8 d后, 对细胞的半数毒性浓度(TC_{50})为1126.01 mg/L, 对HBsAg和HBeAg分泌量的半数抑制浓度(IC_{50})分别为17.52 mg/L和754.26 mg/L, 对HBsAg和HBeAg的治疗指数(TC_{50}/IC_{50})分别为64.27和1.49。JH 0.8 g/kg能降低感染鸭血清DHBV-DNA水平, 给药后5、10 d和停药后3 d DHBV-DNA吸光度(A)值分别为 $0.660 \pm 0.07, 0.632 \pm 0.03, 0.663 \pm 0.05$, 与盐水组 0.872 ± 0.08 比较, 有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: JH有抑制乙肝病毒的作用。

关键词: 乙型肝炎病毒; HepG2.2.15细胞; 人街草; 拉米夫定

欧阳雁玲, 李泽琳, 曾毅. 中药提取物人街草对乙型肝炎病毒的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(4):394-398

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/394.asp>

0 引言

全球大约有3.5亿人感染乙型肝炎病毒^[1], 慢性

携带者有可能发展为原发性肝癌^[2]。尽管有有效的乙肝疫苗可以预防,在许多国家乙肝病毒感染仍然是一个影响健康的主要因素,尤其是在中国。临床上较为常用的药物有干扰素和核苷类似物如拉米夫定^[3]、阿德福韦^[4-5]、恩替卡韦^[6],由于有效率不高和耐药性及价格昂贵使其临床应用受限。因此对中药及其提取组分、有效成分的抗HBV作用研究受到关注。1980年代用HBsAg作为乙型肝炎病毒模型对我国的中草药进行筛选,随着新的乙肝模型的出现,如HepG2.2.15细胞、鸭乙型肝炎病毒感染雏鸭模型等,人们对中药的筛选更加深入^[7-8]。

临床观察复方药物祛毒增宁胶囊(ZL-1)对艾滋患者治疗6 mo,患者CD₄明显上升病毒载量减少^[9]。另有文章报道ZL-1也可降低鸭血清乙型肝炎病毒DNA (DHBV-DNA)水平^[10],具有抗乙型肝炎病毒的作用。为进一步分析ZL-1复方药物中抗HBV的有效组分,我们以HBsAg蛋白为靶点,利用BIAcore技术对ZL-1中的4种主要组分进行筛选,进而采用HepG2.2.15细胞为模型,观察人街草(JH)体外抗HBV活性。以鸭乙型肝炎病毒感染雏鸭模型,观察对鸭血清DHBV DNA水平的影响。进一步肯定有效组分的抗HBV作用及其特点。

1 材料和方法

1.1 材料 1日龄北京鸭(♂♀不分),体质量40-50 g,购自北京前进种鸭动物饲养场。JH是一种中药提取的有效部位,为棕色粉末,易溶于水,生理盐水配制。阳性药物拉米夫定为葛兰素威康制药公司产品,用生理盐水配制。HepG2.2.15细胞(自人肝癌HepG2细胞转染而来,分泌HBsAg和HBeAg及HBV颗粒),细胞购于302医院病毒研究所。鸭乙型肝炎病毒DNA(DHBV-DNA)强阳性血清,采自上海麻鸭, -70℃保存。Dulbeccos's Modified Eagle, s Medium(DMEM)培养基为美国Gibco公司,胎牛血清(FBS)为美国HYclone公司,胰蛋白酶为Amersco公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、G418为Sigma公司,二甲基亚砷(DMSO)为夏思生物,α-32 P-dCTP购自北京福瑞生物技术工程公司,缺口翻译药盒购自普洛麦格公司, Sephadex G-50, Ficoll PVP购自瑞典Pharmacia公司, SDS西德Merck公司产品,鱼精DNA、牛血清白蛋白为中国科学院生物物理所产品,硝酸纤维素膜0.45 nm为Amersham公司产品。

1.2 方法

1.2.1 生物分子相互作用分析仪(BIAcore)筛选 BIAcore是以表面等离子共振系统为基础,进行实时分子相互作用分析的仪器。BIAcore 3000(Uppsala, 瑞典)其中CM5芯片可用于选择中药复方中有效的组分。HBsAg蛋白用10 nm醋酸钠(NaAc)(pH5.0)缓冲液配制,终浓度为30 mg/L,固定蛋白时的流速为10 μL/min。将他耦联到CM5感应片金薄膜表面上,先用NHS/EDC活化感应片的葡聚糖表面,再耦联HBsAg蛋白,获得响应值约为5376.9共振单位(RU)。4种中药提取物溶于PBS,取100 μL以10 μL/min速度进样,分别得到他们的响应值。

1.2.2 细胞培养及MTT法测定药物细胞的毒性 HepG2.2.15细胞用DMEM培养液,培养液中加入100 mL/L胎牛血清,100 mg/L青霉素,100 mg/L链霉素,G418 200 mg/L,10 g/L谷氨酰胺。37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养。用2.5 g/L胰蛋白酶,37℃消化细胞3 min,稀释HepG2.2.15细胞至3×10⁸个/L,96孔板每孔100 μL,37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养。用MTT法测定药物的细胞毒性,96孔板每孔3×10⁸个/L HepG2.2.15细胞100 μL,37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养。1 d后,换用含药培养液,每个浓度5孔,JH用DMEM培养液稀释成1000,500,100,20,4 mg/L,37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中继续培养8 d。向每孔细胞中加入5 mg/L MTT 10 μL,每孔存有上清100 μL,37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养4 h后,可见黄黑色甲瓚颗粒,每孔加入150 μL酸化异丙醇,吹打并在室温下放置,甲瓚颗粒完全溶解后。酶标仪570/630 nm波长测定A值(加入酸化异丙醇1 h内测定)空白对照及细胞对照各5孔。细胞抑制百分率 = [(细胞对照A值-药物作用组A值)/(细胞对照A值-空白对照A值)]×100%。用Bliss方法计算半数毒性浓度(TC₅₀)。

1.2.3 药物对HBsAg和HBeAg分泌的抑制 96孔板每孔3×10⁸个/L HepG 2.2.15细胞100 μL,37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养。1 d后,换用含药培养液,每个浓度4孔,JH用DMEM培养液稀释成200 100,20,4 mg/L,37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养。每3天换同浓度药液培养,第9天收集培养上清,-20℃冰冻保存。ELISA检测试剂盒测定HBsAg和HBeAg,酶标仪540/630 nm波长测定A值。空白对照及细胞对照各4孔。抑制百分率 = [(细胞对照A值-给药组A值)/(细胞对照A值-空白对照A值)]×100%。用Bliss方法计算半数有效浓

■研发前沿

近年来对乙型肝炎药物的研究有很大进展,但是仍存在不少问题有待解决。乙型肝炎病毒引起的体内免疫的分子机制还不完全清楚,如何将各种新技术和试验模型合理结合起来用于评价抗乙型肝炎病毒药物需要进一步的研究探讨。

■创新盘点

以乙型肝炎病毒生命周期中起关键作用的蛋白为靶点,利用Biacore技术有目的地在中药中筛选有效成分,这是快速、高通量筛选和鉴定天然产物体系中有效成分的有效途径。

表 1 JH在2.2.15细胞培养中对细胞的毒性

浓度(mg/L)	A	抑制率(%)	TC50
1000	0.286	60	1126.01
500	0.554	22.5	
100	0.593	17.1	
20	0.687	3.92	
4	0.701	1.96	
对照组	0.715		

表 2 JH在2.2.15细胞中对HBsAg和HBeAg活性的抑制作用

浓度(mg/L)	HBsAg		HBeAg	
	A	抑制率(%)	A	抑制率(%)
200	0.065	78.9	0.735	35.58
100	0.098	68.18	0.829	27.34
20	0.147	52.27	1.001	12.27
4	0.298	32.47	1.062	6.92
对照组	0.308		1.141	

度(IC₅₀). 治疗指数TI = TC₅₀/IC₅₀, 可评价药物临床应用前景, TI<1为有毒无效, TI=2为有效有毒, TI>2为有效低毒. TI值越高, 药物的治疗效果就越好.

1.2.4 鸭乙型肝炎病毒感染及药物治疗 1日龄北京鸭, 经腿胫静脉注射上海麻鸭DHBV-DNA阳性鸭血清, 每只0.2 mL, 在感染后7 d取血, 分离血清, -70℃保存待检. 待DHBV感染雏鸭7 d血清检测为阳性后, 将雏鸭随机分组, 逐只用脚环给动物编号记录, 每组6只, 进行药物治疗实验, JH给药组分3个剂量组, 分别为每天0.8 g/kg, 0.4 g/kg, 0.2 g/kg组, 分2次灌胃给药, 共10 d. 设病毒对照组(DHBV), 以生理盐水代替药物. 阳性药用拉米夫定, 口服给药每天50 mg/kg, 分2次给药, 共10 d. 在感染后第7天即用药前(T0), 用药第5天(T5), 用药第10天(T10)和停药后第3天(P3), 从鸭腿胫静脉取血, 分离血清, -70℃保存待检. 最后颈静脉取血, 分离血清, -70℃保存. 剪断气管, 处死动物, 剖腹取肝, 预冷的生理盐水冲洗肝脏, 剪成小块分装, 置-70℃保存.

1.2.5 血清DHBV-DNA斑点杂交 取上述待检鸭血清50 μL加入96孔板, 加100 μL变性液混匀, 室温10 min. 加150 μL中和液混匀, 室温10 min. 取200 μL上述样品, 每批同时点膜, 测定鸭血清中DHBV-DNA水平的动态. 按缺口翻译试剂盒说明书方法, 用³²P标记DHBV-DNA探针, 做鸭血清斑点杂交, 放射自显影膜片斑点, 在酶标检测仪测定A值(滤光片为490 nm), 计算血清DHBV-DNA密度, 以杂交斑点A值作为标本DHBV-DNA水平值.

1.2.6 鸭肝组织DNA提取和Southern印迹及核酸杂交检测鸭肝中DHBV-DNA 取冰冻肝组织样品, 称取300 mg, 在冰上剪碎、电动匀浆器匀浆总体积为3 mL. 传统方法提取总DNA^[11]. DNA溶于TE, -20℃保存. 检测时取少量进行凝胶电泳. DNA琼脂糖凝胶电泳及转膜, 制备HBV探针, 使用Promega随时引物试剂盒(大片段酶)进行探针

标记, 操作过程按说明书进行. 核酸杂交显影. 利用美国Media Cybernetics公司生产的计算机辅助软件Gel-pro Analyzer version 3.0进行相片分析, 读取条带的A值. 计算每组鸭不同时间血清DNA A值的平均值(mean±SD), 并将每组鸭用药后不同时间(T5, T10)和停药后第3天(P3)血清DHBV-DNA水平与同组给药前(T0) A值比较, 计算每组鸭用药后不同时间血清DHBV-DNA的抑制率, 比较各组鸭血清DHBV-DNA抑制率. DNA抑制率(%) = [给药前A值 - 给药后A值] / 给药前A值 × 100%.

2 结果

2.1 HBsAg蛋白与药物相互作用 首先将HBsAg蛋白耦联到CM₅感应片上, 100 μL的JH及独尾(HQ)、青蒿素(QHS)、红绣球(Cd)溶液以10 μL/min速度进样, 与蛋白结合, JH与HBsAg蛋白结合的响应值为183.7 RU. HQ, QHS, Cd分别为162.1, 66.6, 39.1 RU, 在ZL-1 4种组分中JH响应值最高.

2.2 MTT法测定药物的细胞毒性 JH半数毒性浓度为1126.01 mg/L, JH对HepG2.2.15细胞有低毒作用(表1). JH对HepG2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg的抑制效果见表2, 200 mg/L JH对HepG2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg的抑制率分别为78.9%和35.58%, 有显著性作用. JH对HBeAg的抑制率为35.58%, 在同样浓度下黄芪多糖的抑制率为9.74%. JH对HepG2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg的半数有效浓度(IC₅₀)分别为17.52 mg/L和754.26 mg/L. 治疗指数分别为64.27和1.49, HBsAg治疗指数>2, 提示JH在体外有较好的抗HBV作用.

2.3 JH对DHBV感染鸭体内血清DHBV-DNA的影响 实验感染雏鸭30只第7天血清DHBV-DNA全部阳性. 3TC阳性对照组, 给药第5, 10天(T5, T10) A值为0.421±0.03和0.513±0.08与给药前(T0)的A值0.742±0.15比较, 鸭血清DHBV-DNA

表 3 JH治疗组与病毒感染对照组鸭血清DHBV-DNA A值比较

组别	剂量 (g/kg)	鸭数 (n)	鸭血清DHBV-DNA A ₄₉₀ 值 (mean ± SD)			
			T0	T5	T10	P3
生理盐水		6	0.991 ± 0.10	0.986 ± 0.06	0.945 ± 0.07	0.938 ± 0.06
JH	0.8	5	0.872 ± 0.08	0.660 ± 0.07 ^a	0.632 ± 0.03 ^a	0.663 ± 0.05 ^a
	0.4	6	0.858 ± 0.12	0.705 ± 0.10 ^a	0.803 ± 0.14	0.666 ± 0.06 ^a
	0.2	6	0.775 ± 0.07	0.731 ± 0.13	0.708 ± 0.09	0.707 ± 0.11
	0.05	6	0.742 ± 0.15	0.421 ± 0.03 ^b	0.513 ± 0.08 ^a	0.641 ± 0.09

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 病毒对照组.

表 4 JH治疗组与病毒感染对照组鸭血清DHBV-DNA水平抑制率的比较

药物	剂量 (g/Kg)	鸭数 (n)	抑制率(%)		
			T5	T10	P3
生理盐水		6	0.50	4.64	5.35
JH	0.8	5	24.31 ^a	27.52 ^a	23.97 ^a
	0.4	6	17.83	6.41	22.38 ^a
	0.2	6	5.68	8.65	8.77
3TC	0.05	6	43.26 ^b	30.86 ^a	13.61

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 病毒对照组.

水平明显下降, 差异具有显著性意义($P<0.01$, $P<0.05$, 表3). 对鸭血清DHBV-DNA抑制率与病毒对照组比较, 成组分析, 给药第5天, 差异具有显著性($P<0.01$, 表4). 实验结果表明, JH 0.8 g/kg组, 在给药第3天, 死亡1只(灌胃不当所致). 给药后第5天(T5)和第10天(T10)和停药后3天(P3) DHBV-DNA A值分别为 0.660 ± 0.07 , 0.632 ± 0.03 , 0.663 ± 0.05 , 与盐水组 0.872 ± 0.08 比较对鸭血清DHBV-DNA有显著性意义($P<0.05$). 0.4 g/kg组, 给药后第5天(T5)和10天(T10)和停药后3天(P3)对鸭血清DHBV-DNA有一定作用. 0.2 g/kg组, 给药后第5天(T5)、10天(T10)和停药后第3天(P3)对鸭血清DHBV-DNA无统计学意义.

2.4 JH对DHBV感染鸭肝组织中DHBV-DNA的影响 Southern杂交法检测药物治疗鸭肝组织中的DHBV-DNA, 结果显示, 肝组织中总DHBV-DNA量没有明显减少. 拉米夫定组感染鸭肝组织中总DHBV DNA量虽有所减少, 但A值结果比较显示, 拉米夫定组与盐水组比较鸭肝组织中总DHBV-DNA量无显著性差异. 盐水组鸭肝组织中总DHBV-DNA量无明显变化

3 讨论

BIAcore技术能实时检测生物分子与化学分子间的相互作用^[12], 我们的相关实验初步结果显示:

药物与HBsAg蛋白的结合力与细胞体外实验呈正相关性, JH与HBsAg蛋白结合而与HBeAg蛋白没有结合. 根据上面结果我们通过BIAcore技术, 从ZL-1的四种主要组分中筛选出与HBsAg蛋白结合最强的JH.

HepG2.2.15细胞由人肝癌细胞HepG2细胞转染完整的乙型肝炎病毒基因而来, 可稳定的分泌HBsAg和HBeAg及病毒颗粒, 是体外筛选抗HBV药物和药物评价的较好细胞模型, 被广泛用于抗乙型肝炎病毒药物的体外筛选^[13-16]. 本实验结果表明JH对2.2.15细胞的半数毒性浓度为1126.01 mg/L, 对HBsAg和HBeAg的半数抑制浓度分别为17.52 mg/L和754.26 mg/L. 提示JH体外有较好的抗乙型肝炎病毒作用.

鸭乙型肝炎病毒模型是国家认可的评价抗肝炎药物疗效的一种模型. 本实验在细胞实验的基础上, 利用鸭乙型肝炎病毒模型对JH的抗HBV作用进行研究, 结果显示JH可降低鸭血清中DHBV-DNA, 停药后没有明显反弹, 肝组织中总DHBV-DNA的量无明显变化. 拉米夫定可显著抑制血清中DHBV-DNA, 但停药后出现反弹, 肝组织中总DHBV-DNA的量虽有所减少, 但与盐水组比较无显著性差异. 说明JH可以抑制病毒颗粒在外周血中的释放, 与BIAcore技术结果相一致, 但其作用机制有待进一步研究. JH给药后对鸭血清中DHBV-DNA的抑制率为27.52%,

■应用要点

利用Biacore技术有目的地在中药中筛选抗乙型肝炎药物, 不必使用荧光标记和同位素, 从而保持了生物分子的天然活性, 而且他能实时检测分子间的相互作用. 在此基础上进一步进行细胞的体外研究和动物体内的实验研究, 可以缩短研究时间, 提高研究的效率. 但Biacore技术筛选结果与细胞及动物实验结果的相关性有待继续研究.

■名词解释

BIA技术: 生物分子相互作用分析技术是基于物理光学现象, (即表面等离子共振)来监测传感片表面液体的折射率变化, 而这一变化和传感片表面所结合生物分子的质量成正比。因此可在非标记的情况下实时监测生物分子间的相互作用。当进行分子间相互作用分析时, 将其中一个反应物偶联在传感片上, 含有另一个反应物的样品通过液体输送系统以恒定的流速通过传感片表面, 分子间有结合反应而导致传感片表面分子浓度的变化将由等离子共振信号的改变而得到测定, 并以共振单位(RU)作表达。

牛巍 *et al*^[10]报道ZL-1给药4 wk后, 鸭血清中DHBV-DNA的抑制率为75%, 分析其原因: 一方面是由于我们的实验时间只有10 d, 延长用药时间是否可提高抑制率; 另一方面是由于ZL-1中的组分有协同作用。以上结果值得进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 De Clercq E. Perspectives for the treatment of hepatitis B virus infections. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: 81-95
- 2 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-1745
- 3 姚光弼. 抗乙型肝炎病毒新药拉米夫定. 中国新药与临床杂志 1998; 17: 381-384
- 4 茅益民, 曾民德. 抗乙型病毒性肝炎新药-阿德福韦酯. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 61-63
- 5 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
- 6 刘林华, 陈新月. 抗乙型肝炎病毒新药-恩替卡韦. 国际流行病学传染病学杂志 2006; 33: 58-62
- 7 袁冬生, 王新华, 李常青, 肖会泉. 复方肝癌宁抗乙型

肝炎病毒的体外实验研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1292-1294

- 8 高萍, 程留芳, 谢朝良. 愈肝胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2693-2696
- 9 李泽琳, 王仲民, 刘新周, 张泽书, 王哲, 马士文, 陈春华, 薛晓玲, 温瑞兴, 岳彦超, 朱新朋, 曾毅. 祛毒增宁胶囊治疗艾滋病的疗效观察. 中华实验和临床病毒学杂志 2004; 18: 305-307
- 10 牛巍, 张继明, 王文逸, 龙健儿, 曾毅, 李泽琳, 瞿涤. 复方药物ZL-1在鸭乙型肝炎病毒实验感染模型中抗病毒作用的研究. 上海医药 2003; 26: 234-238
- 11 萨姆布鲁克J, 弗里奇EF, 曼尼阿蒂斯T. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1993: 465-467
- 12 邓宏伟, 郭妍, 孙烨, 徐宇虹. 靶向表皮生长因子受体的全新小分子配体筛选. 生物化学与生物物理进展 2005; 32: 180-186
- 13 苏海滨, 王慧芬, 季伟, 赵艳玲, 蔡光明. 拉米夫定与单磷酸阿糖腺苷联合应用抗-HBV的体外实验研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2002; 16: 16-19
- 14 九平, 白雪帆, 张三奇, 李谨革, 张颖, 张岩, 薛克昌, 顾宜, 王平忠, 骆抗先. 肝靶向十六酸拉咪啶酯固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 191-194
- 15 Ding J, Liu J, Xue CF, Gong WD, Li YH, Zhao Y. Anti-HBV effect of TAT-HBV targeted ribonuclease. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1525-1528
- 16 饶敏, 张淑玲, 董继华, 李淑莉. 高三尖酯碱等四种药物的体外抑制乙肝病毒的实验研究. 中国病毒学 2006; 21: 284-287

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

海风藤酮对急性胰腺炎大鼠的治疗作用

王成果, 马庆久, 鲁建国, 何显力, 王青, 杜锡林, 褚延魁

王成果, 马庆久, 鲁建国, 何显力, 王青, 杜锡林, 褚延魁, 第四军医大学唐都医院普外科 陕西省西安市 710038
通讯作者: 马庆久, 710038, 陕西省西安市新寺路, 第四军医大学唐都医院普外科. tdsurg@fmmu.edu.cn
电话: 029-84777732 传真: 029-87292087
收稿日期: 2006-11-01 接受日期: 2006-11-16

Therapeutic effect of kadsurenone on acute pancreatitis in rats

Cheng-Guo Wang, Qing-Jiu Ma, Jian-Guo Lu, Xian-Li He, Qing Wang, Xi-Lin Du, Yan-Kui Chu

Cheng-Guo Wang, Qing-Jiu Ma, Jian-Guo Lu, Xian-Li He, Qing Wang, Xi-Lin Du, Yan-Kui Chu, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Qing-Jiu Ma, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xinsi Road, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. tdsurg@fmmu.edu.cn
Received: 2006-11-01 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To observe the effect of kadsurenone in the treatment of acute pancreatitis (AP) in rats.

METHODS: A total of 120 male Sprague Dawley rats were randomized into 3 groups: control group ($n = 40$), AP model group ($n = 40$) and kadsurenone treatment group ($n = 40$). The indexes including the plasma levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), amylase (AMY), the volumes of ascites, and pancreatic pathology were observed at the 3rd, 6th, 12th and 24th hour.

RESULTS: The plasma levels of AMY, MDA, and the volumes of ascites were remarkably elevated while the plasma level of SOD was lowered in AP rats. Kadsurenone significantly decreased the plasma levels of AMY (24 h: $69.6 \pm 6.7 \mu\text{kat/L}$ vs $136.6 \pm 13.4 \mu\text{kat/L}$, $P < 0.01$), MDA (24 h: $1.45 \pm 0.19 \text{ nmol/L}$ vs $1.98 \pm 0.27 \text{ nmol/L}$, $P < 0.05$), and the volumes of ascites (24 h: $4.03 \pm 1.36 \text{ mL}$ vs $5.15 \pm 1.69 \text{ mL}$, $P < 0.05$), while increased the plasma level of SOD (24 h: $35.27 \pm 8.34 \text{ nmol/L}$ vs

$19.03 \pm 8.74 \text{ nmol/L}$, $P < 0.05$). Severe pathological changes were observed in AP rates, but they were notably alleviated after kadsurenone treatment.

CONCLUSION: Kadsurenone is effective in the treatment of AP by decreasing the level of harmful factor MDA while increasing the level of the defensive factor SOD.

Key Words: Acute pancreatitis; Kadsurenone; Malondialdehyde; Superoxide dismutase

Wang CG, Ma QJ, Lu JG, He XL, Wang Q, Du XL, Chu YK. Therapeutic effect of kadsurenone on acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):399-402

摘要

目的: 观察海风藤酮对急性胰腺炎(AP)大鼠自由基水平的影响。

方法: δ SD大鼠120只随机分为对照组($n = 40$), AP组($n = 40$)和海风藤酮(SM)治疗组($n = 40$)。观察3, 6, 12和24 h大鼠血浆丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、淀粉酶(AMY)、腹水量、胰腺病理等指标的变化。

结果: 与对照组比较, AP组腹水、血清AMY和MDA升高, SOD水平降低, 且有差异统计学意义, 经海风藤酮治疗后, 治疗组腹水(24 h: $4.03 \pm 1.36 \text{ mL}$ vs $5.15 \pm 1.69 \text{ mL}$, $P < 0.05$), 血清AMY(24 h: $69.6 \pm 6.7 \mu\text{kat/L}$ vs $136.6 \pm 13.4 \mu\text{kat/L}$, $P < 0.01$)和MDA(24 h: $1.45 \pm 0.19 \text{ nmol/L}$ vs $1.98 \pm 0.27 \text{ nmol/L}$, $P < 0.05$)水平显著降低, SOD水平显著升高(24 h: $35.27 \pm 8.34 \text{ nmol/L}$ vs $19.03 \pm 8.74 \text{ nmol/L}$, $P < 0.05$)。AP组大鼠胰腺病理变化均显著性升高, 而治疗组与AP组相比在早期(3, 6 h)胰腺病理变化明显减轻。

结论: 海风藤酮通过降低损害因子MDA, 升高保护因子SOD对AP有治疗作用。

关键词: 急性胰腺炎; 海风藤酮; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

■背景资料

海风藤酮(kadsurenone)是中药海风藤的提取物, 能扩张外周血管, 改善微循环, 降低血液黏滞度, 改善血流变, 增加脏器微循环的血流量, 被广泛应用于心血管、肺、脑、肾等疾病的防治。本文旨在探讨其对大鼠急性胰腺炎的治疗作用。

■同行评价

海风藤在临床上的功效主治是祛风湿,通经络,行气止痛,利水消肿。本文观察海风藤酮对急性胰腺炎(AP)大鼠的治疗作用,对于寻求急性胰腺炎的有效治疗方法有一定临床意义。

王成果,马庆久,鲁建国,何显力,王青,杜锡林,褚延魁.海风藤酮对急性胰腺炎大鼠的治疗作用.世界华人消化杂志 2007;15(4):399-402

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/399.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种并发症多,病死率很高的急腹症之一,其发展迅速,病理生理表现复杂多变,有多种因素及炎症因子参与救治难度大。氧自由基(OFR)是AP合并其他器官损伤、发展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的重要原因之一^[1-2]。海风藤酮(kadsurenone)是中药海风藤的提取物^[3],本研究通过大鼠AP模型,动态观测大鼠血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、淀粉酶(AMY)、病理改变等,以判定海风藤酮对AP治疗的影响,为探讨该药在临床上应用治疗AP的可能性提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wister大鼠120只,10-12 wk龄,体重200-300 g,♂♀不限,由第四军医大学动物实验中心提供。海风藤酮(150 mg)购自北京大学药学院,牛磺胆酸钠购自Sigma公司,MDA, SOD检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法 采用随机数字把120只大鼠分为3组:对照组($n = 40$)、急性胰腺炎(AP)组($n = 40$)和海风藤酮治疗组($n = 40$)。参照Aho法并加以改进^[4]。所有大鼠术前禁食12 h,自由饮水。称质量,20 g/L戊巴比妥钠腹腔内麻醉,大鼠仰卧固定,上腹正中切口进腹。对照组进腹后轻揉胰腺及十二指肠,暴露时间同其他两组,关腹。AP组、海风藤酮组进腹后提起胃、十二指肠,找到胆总管,然后用无损伤血管夹夹闭肝门处的胆总管,用4号钝性针头穿刺胆管乳头对侧的十二指肠壁,将针头插入胆管内约5 mm处,再用无损伤血管夹夹住针头远侧的胆管向胆管内注射50 g/L牛磺胆酸钠溶液(1 μ L/g),注射速度0.2 mL/min。注射完毕后,保留针头3 min。然后松开2个无损伤血管夹,抽出针头,用1号线缝合关腹。海风藤酮组关腹后立即腹腔内注射海风藤酮,注射量为10 μ g/g,由于海风藤酮均以DMSO(25 g/L)为溶剂,故对照组和AP组均于关腹后腹腔内注射等量的DMSO。术后各组动物自由饮水。分别于术后3, 6, 12, 24 h分批心脏抽血处死大鼠(每组各个时间点10只大鼠),观察腹水性状和量,采集血液标本,在胰头、胰体、胰尾各取一块胰腺组织在

40 g/L中性福尔马林溶液中固定。各组大鼠处死后首先抽取腹水、记量,观察其颜色及浑浊度;观察胰腺大体改变,HE镜下观察病理改变,并按照Kusske *et al*^[5]的方法作胰腺组织病理评分,按照水肿、炎症、出血、坏死程度不同分0-4分进行盲法评分。利用采集的血液标本,提取血清,使用MDA, SOD检测试剂盒进行检测。

统计学处理 用SPSS12.0统计分析软件包进行处理,计量资料以均数 \pm 标准差表示,以 t 检验行统计学处理,计数资料采用 χ^2 检验行统计学处理。

2 结果

2.1 腹水的性状和量 对照组无明显腹水积聚。3 h AP组、海风藤酮组均为淡黄色、澄清的渗出液;6 h AP组、海风藤酮组腹水量增加,为淡红色、浑浊的液体;12, 24 h两组腹水量进一步增加,但AP组比海风藤酮组腹水颜色更深,腹水量更多,二者有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1)。

2.2 血清淀粉酶检测结果 AP组各时间点的淀粉酶(AMY)水平均较对照组显著升高($P < 0.01$),海风藤酮组各时间点的淀粉酶水平均较AP组显著降低($P < 0.01$, 表1)。

2.3 大鼠血清MDA, SOD含量检测 AP组与对照组比较,各时间点的MDA水平显著性升高, SOD水平显著性降低($P < 0.05$);在各个时间点上,与AP组比较,海风藤酮组的MDA水平显著性降低, SOD水平显著性升高($P < 0.05$, 表2)。

2.4 胰腺病理改变及评分 对照组的胰腺组织在肉眼及光镜下观察基本正常,仅3, 6 h时有轻度水肿,无明显出血及坏死。AP组随时间推移病理改变程度加重。其表现为在3, 6, 12, 24 h分别以胰腺间质、被膜下水肿,血管充血、红细胞溢出,大量炎性细胞浸润,胰腺呈片状凝固性坏死及大片胰腺腺泡结构消失,胰腺实质局灶性坏死为主。海风藤酮组则各时间点胰腺组织的病理学改变均较胰腺炎组轻。胰腺组织水肿、腺泡细胞破坏、出血、坏死均较胰腺炎组轻,以3 h及6 h差别最为明显。根据病理学评分可知12, 24 h海风藤酮组病理学评分亦较AP组低,但二者间无显著性差异。AP组与对照组比较,各时间点胰腺病理评分均显著性升高($P < 0.01$);在早期(3, 6 h),与AP组比较海风藤酮组的胰腺病理评分显著性降低($P < 0.05$, 表3)。

表 1 各组大鼠不同时间腹水量和血清淀粉酶的比较 (mean \pm SD, $n = 40$)

分组	腹水量 (mL)				AMY (μ kat/L)			
	3 h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24 h
对照	0	0	0	0	26.6 \pm 6.0	30.0 \pm 3.2	29.7 \pm 2.4	28.1 \pm 2.3
AP	3.19 \pm 1.12 ^b	4.51 \pm 1.42 ^b	4.98 \pm 1.47 ^b	5.15 \pm 1.69 ^b	90.4 \pm 11.9 ^b	156.3 \pm 13.6 ^b	146.4 \pm 13.7 ^b	136.6 \pm 13.4 ^b
海风 藤酮	2.06 \pm 1.48 ^c	2.37 \pm 1.15 ^c	2.51 \pm 1.24 ^c	4.03 \pm 1.36 ^c	79.3 \pm 9.8 ^d	112.9 \pm 7.1 ^d	72.1 \pm 5.1 ^d	69.6 \pm 6.7 ^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs AP组.表 2 各组大鼠血清MDA和SOD含量的比较 (mean \pm SD, $n = 10$, nmol/L)

分组	MDA				SOD			
	3 h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24 h
对照	0.81 \pm 0.17	0.86 \pm 0.18	0.78 \pm 0.17	0.75 \pm 0.21	46.23 \pm 5.94	45.62 \pm 4.36	46.21 \pm 5.32	47.12 \pm 5.10
AP	1.34 \pm 0.28 ^a	1.52 \pm 0.48 ^a	1.80 \pm 0.32 ^a	1.98 \pm 0.27 ^a	34.78 \pm 7.69 ^a	27.69 \pm 7.27 ^a	26.02 \pm 8.31 ^a	19.03 \pm 8.74 ^a
海风 藤酮	0.95 \pm 0.18 ^c	1.07 \pm 0.20 ^c	1.32 \pm 0.24 ^c	1.45 \pm 0.19 ^c	42.04 \pm 6.54 ^c	37.74 \pm 8.81 ^c	34.04 \pm 6.54 ^c	35.27 \pm 8.34 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs AP组.

3 讨论

AP的发病机制至今未能完全阐明,除传统的胰酶在胰腺内被激活,引起自身消化外,多项研究发现胰腺缺血-再灌注损伤导致的自由基损害在AP向SAP的演进过程中具有质量要的作用^[6-7].鉴于AP发病机制的复杂性,对其病理机制及病理过程,仅仅应用西医药手段进行针对性防治是困难的,而采用中西医结合手段显得更为恰当.已有报告指出中药不仅可以抑制胰酶的活性,还可以改善微循环、抑制自由基的产生、降低AP时的炎性细胞因子水平,从而达到治疗AP的目的.自由基是在外层电子轨道上含有单个不配对电子的原子、原子团和分子的总称.主要包括氧自由基和脂性自由基.自由基的化学性质极为活泼,易于失去电子(氧化)或获得电子(还原),特别是其氧化作用强,故具有强烈的引发脂质过氧化的作用^[8-9].

海风藤酮是从中药海风藤中提取出来的一种天然生物物质,具有行经络,和血脉,宽中理气,下湿除风之功效,他主治治风湿痹痛、风寒骨痛、外感风寒、跌打损伤、闭经等症.药理研究证实,海风藤酮是天然的血小板活化因子(PAF)拮抗剂,他能与PAF竞争靶位,有效地抑制组织缺血时PAF活性的发挥,减少内源性花生

表 3 各组大鼠病理评分 (mean \pm SD, $n = 40$)

分组	胰腺病理评分			
	3 h	6 h	12 h	24 h
对照	0.86 \pm 0.51	0	0	1.18 \pm 0.61
AP	5.20 \pm 0.79 ^b	7.10 \pm 0.55 ^b	11.72 \pm 0.14 ^b	13.45 \pm 1.62 ^b
海风 藤酮	3.24 \pm 0.81 ^c	4.93 \pm 1.01 ^c	11.02 \pm 0.74	12.73 \pm 1.42

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs AP组.

四烯酸释放,提高细胞内环磷酸腺苷的水平,抑制TXA₂的合成及促进PGI₂的产生,纠正TXA₂/PGI₂比例失衡,故能扩张外周血管,改善微循环,降低血液黏滞度,改善血流变,增加脏器微循环的血流量^[10-13].最新的研究还发现,海风藤酮还具有显著的抗氧化作用和钙离子拮抗样效应,能有效清除氧自由基,抑制钙离子内流,他还可降低胰腺酶活性,减轻胰腺组织自我消化等功能^[14-15].海风藤酮广泛应用于心血管、肺、脑、肾等疾病的防治.本研究结果显示,诱发胰腺炎后,早期(3 h)即可见血清MDA含量增高、SOD降低;且随着时间推移,血清MDA进行性升高、SOD进行性降低,二者改变的程度与胰腺的病理改变、AMY水平、腹水量的变化相吻合.经海风藤酮治疗后,虽然MDA仍继续升高,但各

时间段均比未治疗组有明显降低; SOD水平在造模12 h达到最低点后, 开始回升, AMY水平、腹水量、胰腺病理改变均较未经治疗的AP组减轻. 这提示AP时产生大量自由基, 而清除氧自由基的能力则明显下降, 可导致AP病程进展, 海风藤酮能减少AP时血清内自由基, 提高保护因子SOD水平, 减轻胰腺的病理损害, 阻止了病变的继续发展. 本实验应用海风藤酮来治疗AP, 初步在自由基水平上了解海风藤酮对AP的影响, 但是, 海风藤酮减轻AP时自由基损害的具体机制仍未能清楚阐明, 有进一步研究的必要.

4 参考文献

- 1 Komatsu K, Shimosegawa T, Uchi M, Maruhama Y, Toyota T. Erythropoietic protoporphyria with severe liver dysfunction and acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2000; 35: 391-395
- 2 Abu-Zidan FM, Bonham MJ, Windsor JA. Severity of acute pancreatitis: a multivariate analysis of oxidative stress markers and modified Glasgow criteria. *Br J Surg* 2000; 87: 1019-1023
- 3 史留斌, 陈怀仁, 王尔慧, 嵇振岭. 海风藤酮对大鼠肝脏缺血再灌注损伤保护作用的实验研究. *中国普外基础与临床杂志* 1998; 15: 195-198
- 4 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 5 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 6 张喜平, 李志军. 急性胰腺炎合并肺损伤时炎性介质的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1900-1905
- 7 施华秀, 任建林. 氧自由基与胃黏膜损伤. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2521-2529
- 8 张喜平, 王英. 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 412-416
- 9 Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems. *Digestion* 1990; 47: 130-137
- 10 Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-2351
- 11 Loucks EB, Qayumi AK, Godin DV, English JC, Lim SP, Al Mahmeed T, Gul S. Therapeutic potential of platelet-activating factor antagonism in the management of myocardial infarction. *Can J Cardiol* 2000; 16: 497-504
- 12 Zhang JX, Dang SC, Qu JG, Wang XQ. Ligustrazine alleviates acute renal injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7705-7709
- 13 Gandhi M, Barone JG. Pediatric renal pseudocyst due to pancreatitis. *Urology* 2006; 68: 1344
- 14 Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Soltesz V, Borjesson A, Andersson R. Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg* 2000; 17: 57-65
- 15 Chowdhury P, Gupta P. Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: an overview. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7421-7427

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位. 2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46. (世界胃肠病学杂志社2007-02-08)

E-cadherin, β -catenin, Cyclin D1在胃腺癌中的表达及临床意义

王渝, 柯昌庶, 赵秋, 马松林, 龚勇, 杨芳

王渝, 赵秋, 马松林, 龚勇, 杨芳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

柯昌庶, 华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科.

tongji461@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2006-10-26 接受日期: 2006-11-03

Expression of E-cadherin, β -catenin and Cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and their clinical significances

Yu Wang, Chang-Shu Ke, Qiu Zhao, Song-Lin Ma, Yong Gong, Fang Yang

Yu Wang, Qiu Zhao, Song-Lin Ma, Yong Gong, Fang Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Chang-Shu Ke, Department of Pathology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2006-10-26 Accepted: 2006-11-03

Abstract

AIM: To investigate the expression of E-cadherin, β -catenin and Cyclin D1 and their relationships and clinical pathological features in gastric adenocarcinoma.

METHODS: Immunohistochemical SP method was used to determine the expression of E-cadherin, β -catenin and Cyclin D1 protein in 73 cases of gastric adenocarcinoma tissues and 18 cases of normal gastric mucosal tissues.

RESULTS: Positive staining for E-cadherin and β -catenin was observed on the cellular membrane of epithelial cells in normal gastric mucosal tissues. The aberrant expression of E-cadherin and β -catenin were observed in the

cytoplasm and/or cellular nucleus of gastric cancer cells. The aberrant expression rates of E-cadherin and β -catenin were 63.01% (46/73) and 56.16% (41/73) in gastric adenocarcinoma, respectively, which were associated with the differentiation degree, TNM stages, depth of infiltration and lymph node metastasis, but not with the gender, age and tumor size. There was a significant correlation between E-cadherin and β -catenin expression in gastric adenocarcinoma. The positive rate of Cyclin D1 expression was 67.12% (49/73) in gastric adenocarcinoma, notably higher than that in normal gastric tissues (0/18, $P < 0.01$), and it was correlated with the differentiation degree and lymph node metastasis. The aberrant expression of E-cadherin and β -catenin were positively correlated with the high expression of Cyclin D1 gastric carcinoma ($r = 0.249, 0.376$, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Down-regulated expression of E-cadherin and β -catenin exist in gastric carcinoma, which may promote the pathogenesis and development of carcinoma by activation of Cyclin D1.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; Immunohistochemistry; E-cadherin; β -catenin; Cyclin D1

Wang Y, Ke CS, Zhao Q, Ma SL, Gong Y, Yang F. Expression of E-cadherin, β -catenin and Cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and their clinical significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):403-407

摘要

目的: 研究E-cadherin, β -catenin, Cyclin D1在胃腺癌组织中的表达, 探讨三者的表达及临床病理意义。

方法: 采用免疫组织化学SP法检测73例胃腺癌组织及18例正常胃黏膜组织中E-cadherin, β -catenin, Cyclin D1蛋白的表达。

结果: 正常胃黏膜组织中E-cadherin和 β -catenin均呈清晰的棕褐色染色在上皮细胞

■背景资料

作为细胞黏附分子重要组成部分的E-cadherin和 β -catenin基因, 在肿瘤分化和转移过程中有着重要的作用, 是肿瘤浸润转移的抑制因子, 他们中的任何一种成分异常均可导致E-cadherin介导的细胞黏附系统功能障碍。 β -catenin除与E-cadherin结合介导细胞黏附反应外, 还参与Wnt信号转导通路激活Cyclin D1, c-myc等癌基因, 与肿瘤发生密切相关。

■同行评价

本文发现胃癌细胞中E-cadherin, β -catenin及Cyclin D1表达异常升高,与胃腺癌的分化程度、TNM分期、浸润深度及淋巴结转移有关,提示他们在胃癌发生过程中起着重要的调节作用,有临床参考价值。

细胞膜。E-cadherin和 β -catenin在胃癌细胞中出现细胞质和/或细胞核异常染色,其异常表达率分别为63.01%(46/73)和56.16%(41/73),且两者的异常表达与胃腺癌的分化程度、TNM分期、浸润深度及淋巴结转移相关,与患者的性别、年龄、肿瘤大小无关。胃腺癌中E-cadherin和 β -catenin表达密切相关。Cyclin D1在胃腺癌组织中的阳性表达率为67.12%(49/73),明显高于其在正常胃黏膜组织中的表达(0%, 0/18),且与胃腺癌的分化程度和淋巴结转移相关。E-cadherin和 β -catenin在胃癌中的异常表达与Cyclin D1的过表达呈显著的正相关($r = 0.249, r = 0.376, P < 0.05$)。

结论: 胃腺癌中存在E-cadherin和 β -catenin基因的失活及蛋白表达下调。E-cadherin和 β -catenin的异常表达可能通过促使或激活Cyclin D1的过表达而参与胃癌的发生和发展。

关键词: 胃癌; 免疫组织化学; E-cadherin; β -catenin; Cyclin D1

王渝, 柯昌麻, 赵秋, 马松林, 龚勇, 杨芳. E-cadherin, β -catenin, Cyclin D1在胃腺癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(4):403-407
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/403.asp>

0 引言

E-cadherin是维持上皮细胞的极性及细胞间黏附连接的主要分子,在 Ca^{2+} 的参与下介导上皮细胞间的黏附。E-cadherin发挥细胞间黏附作用须与细胞内的连环蛋白(α -catenin, β -catenin, γ -catenin)结合形成钙黏附素连环素复合体(E-cad/cat)。在catenin家族中以 β -catenin与肿瘤的关系最为密切, β -catenin异常可导致E-cad/cat复合体结构破坏和功能障碍,并在肿瘤的浸润转移过程中发挥重要作用^[1]。 β -catenin除与E-cadherin结合介导细胞黏附反应外,还参与Wnt信号转导通路激活Cyclin D1, c-myc等癌基因,与肿瘤发生密切相关^[2]。本研究采用免疫组织化学检测73例胃癌组织中E-cadherin, β -catenin和Cyclin D1的表达及其相关性,探讨三者在胃腺癌组织中表达及临床病理意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集同济医学院附属同济医院2004-01/2006-06手术切除的胃癌标本73例,其中男48例,女25例,年龄42-71(平均56.4)岁。肿瘤大小:直径 ≤ 5 cm, 44例;直径 > 5 cm, 29例。淋

巴结转移:阳性者23例,阴性者50例。TNM分期:I-II期31例,III-IV期42例。分化程度:按WHO分类,高分化腺癌8例,中分化腺癌18例,低分化腺癌47例。所有标本均经40 g/L缓冲中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,5 μ m厚度连续切片,1片行HE染色,另3片制成涂胶白片作免疫组化用。另取18例正常胃黏膜标本做对照。兔抗人E-cadherin, β -catenin多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,鼠抗人Cyclin D1 mAb购自Sant Cruz公司,免疫组化SP试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法 采用免疫组织化学SP法对胃癌组织中E-cadherin, β -catenin及Cyclin D1蛋白的表达进行检测。实验步骤严格按照试剂盒说明书操作,石蜡切片经脱蜡,梯度酒精水化后,用30 mL/L H_2O_2 甲醇室温孵育15 min, 0.01 mol/L(pH6.0)枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原15 min,加入50 mL/L山羊血清孵育20 min后再分别加入一抗(工作浓度为1:100)4℃过夜,再分别加二抗和链霉素过氧化酶孵育20 min, DAB显色,苏木素复染,封片,镜检。用阳性切片在相同条件下染色作为阳性对照,用PBS代替一抗作为阴性对照。E-cadherin和 β -catenin的正常染色主要定位于腺上皮细胞膜,以沿细胞膜分布呈棕褐色细小颗粒状连续性着色即连续的细胞膜染色为阳性。染色结果判断标准参照文献[3]方法:将染色记为0-3分。0分:细胞膜、胞质均未染色;1分:细胞质染色为主;2分:异质性染色(细胞膜、胞质混合染色);3分:连续的细胞膜染色。无连续的细胞膜染色被视为异常,即0-2分为异常表达。Cyclin D1以上皮细胞核出现棕褐色颗粒为阳性染色。每张切片随机选取5个高倍视野,以阳性细胞核 $> 10\%$ 细胞总数为阳性,反之为阴性。

统计学处理 采用SPSS13.0 for Windows统计软件包进行 χ^2 检验及Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 E-cadherin和 β -catenin在胃腺癌组织中的表达及临床病理意义 正常胃黏膜上皮细胞E-cadherin和 β -catenin表达呈强阳性,表达部位相似,主要定位于细胞膜及细胞间质,呈黄色网格状分布,均匀一致,细胞质和细胞核表达阴性。胃腺癌组织中癌细胞E-cadherin和 β -catenin细胞膜表达减弱,呈现同质性和/或异质性染色,出现细胞质阳性异常染色或以细胞质为主的混

表 1 E-cadherin, β -catenin和Cyclin D1在正常胃黏膜组织和胃癌中的表达

分组	<i>n</i>	E-cadherin			β -catenin			Cyclin D1		
		正常(%)	异常(%)	<i>P</i> 值	正常(%)	异常(%)	<i>P</i> 值	阴性(%)	阳性(%)	<i>P</i> 值
正常胃黏膜组织	18	18(100)	0(0)	<0.01	18(100)	0(0)	<0.01	0(0)	18(100)	<0.01
胃癌	73	27(36.99)	46(63.01)		32(43.84)	41(56.16)		24(33.88)	49(67.12)	

表 2 E-cadherin, β -catenin和Cyclin D1的表达及与胃癌临床病理因素之间的关系

临床病理特征	<i>n</i>	E-cadherin表达			β -catenin表达			Cyclin D1表达		
		异常(%)	正常(%)	<i>P</i> 值	异常(%)	正常(%)	<i>P</i> 值	阴性(%)	阳性(%)	<i>P</i> 值
年龄										
≤55岁	26	14(53.85)	12(46.15)	>0.05	18(69.23)	8(30.77)	>0.05	10(38.46)	16(61.54)	>0.05
>55岁	47	32(68.09)	15(31.91)		23(48.94)	24(51.06)		14(29.79)	33(70.21)	
性别										
男	48	31(64.58)	17(35.42)	>0.05	25(52.08)	23(47.92)	>0.05	18(37.50)	30(62.50)	>0.05
女	25	15(60.00)	10(40.00)		16(64.00)	9(36.00)		6(24.00)	19(76.00)	
肿瘤大小										
≤5 cm	44	28(63.64)	16(36.36)	>0.05	25(56.82)	19(43.18)	>0.05	15(34.09)	29(65.91)	>0.05
>5 cm	29	18(62.07)	11(37.93)		16(55.17)	13(44.83)		9(31.03)	20(68.97)	
分化程度										
高-中分化腺癌	26	9(34.62)	17(65.38)	<0.01	5(19.23)	21(80.77)	<0.01	15(57.69)	11(42.31)	<0.01
低分化腺癌	47	37(78.72)	10(21.28)		36(76.60)	11(23.40)		9(19.15)	38(80.85)	
淋巴结转移										
有	23	19(82.61)	4(17.39)	<0.05	18(78.26)	5(21.74)	<0.05	12(52.17)	11(47.83)	<0.05
无	50	27(54.00)	23(46.00)		22(44.00)	28(56.00)		12(24.00)	38(76.00)	
浸润深度										
未侵及浆膜	41	20(48.78)	21(51.22)	<0.05	17(41.46)	24(58.54)	<0.01	17(41.46)	24(58.54)	>0.05
侵及浆膜	32	26(81.25)	6(18.75)		24(75.00)	8(25.00)		7(21.88)	25(78.12)	
TNM分期										
I - II 期	31	12(38.71)	19(61.29)	<0.01	9(29.03)	22(70.97)	<0.01	9(29.03)	22(70.97)	>0.05
III - IV 期	42	34(80.95)	8(19.05)		32(76.19)	10(23.81)		15(35.71)	27(64.29)	

合性染色以及完全阴性染色。在73例胃癌组织中, E-cadherin和 β -catenin的异常表达率分别为63.01%(46/73)和56.16%(41/73)(表1)。E-cadherin和 β -catenin在TNM分期III-IV期、高-中分化腺癌、有浆膜浸润及淋巴结转移者中表达阳性率分别低于TNM分期I - II期、低分化腺癌、无浆膜浸润及淋巴结转移者, 差异有显著性统计学意义(表2)。

2.2 Cyclin D1在胃癌中的表达 Cyclin D1阳性产物为棕褐色颗粒, 主要定位于细胞核。正常胃黏膜上皮细胞中Cyclin D1阴性表达。Cyclin D1在73例胃癌组织内的阳性表达率为67.12%(49/73), 显著高于其在正常胃黏膜组织中的表达(表1)。在不同分化程度的胃癌组织中, Cyclin D1蛋白的阳性表达率分别为: 高-中分化腺癌42.31%(11/26), 低分化腺癌80.85%(38/47); 两者

比较, 差异有显著性($P<0.01$)。此外, Cyclin D1在伴淋巴结转移的胃癌组织中的阳性表达率(76.00%)明显高于其在不伴淋巴结转移的胃癌组织中的表达率(47.83%)(表2)。

2.3 E-cadherin, β -catenin和Cyclin D1在胃癌中表达的相关性 E-cadherin和 β -catenin在胃癌中的表达具有一定的相关性(表3), 73例胃癌组织中E-cadherin和 β -catenin均正常表达者为23.29%(17/73), E-cadherin和 β -catenin均异常表达为42.47%(31/73), 两者的表达呈正相关($r = 0.295$, $P<0.05$)。在E-cadherin正常表达的46例中, 35例(76.09%)有Cyclin D1的过表达; 而在27例E-cadherin表达减弱或缺少的病例中, 14例(51.85%)Cyclin D1过表达。E-cadherin表达下降与Cyclin D1的过表达间有着显著的正相关性($r = 0.249$, $P<0.05$)。 β -catenin呈正常表达的41

例中, 33例(80.49%)呈现Cyclin D1过表达; 而在 β -catenin异常表达的32例中, 15例(46.88%)Cyclin D1呈过表达. β -catenin的异常表达与Cyclin D1的过表达间亦存在显著的正相关性($r = 0.376$, $P < 0.01$).

3 讨论

E-cadherin是一类介导细胞之间互相黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白, 是细胞黏附功能的执行者, 其功能是介导细胞与细胞之间的黏附, 维持细胞结构和形态的稳定. E-cadherin以分子的胞质末端与连环蛋白(α -catenin, β -catenin, γ -catenin)及肌动蛋白细胞骨架结合形成钙黏附素连环素复合体(E-cad/cat), 不仅介导细胞黏附, 还直接和间接的参与细胞的信号传导, 与肿瘤的侵袭和转移行为密切相关^[4-6]. E-cadherin主要介导同型细胞的黏附功能, 其阳性表达有抑制肿瘤转移的功能, E-cadherin表达下降或缺失, 会导致细胞间的相互黏附力下降, 从而使细胞易于分散而向外周浸润性生长; 一旦获得转移的必要条件, 便可脱离原发灶而发生转移^[7-8], 这种现象已在多种肿瘤如肺癌、乳腺癌、大肠癌、肝癌、胃癌等的研究中得到证实^[9-14]. catenin家族中的成员 β -catenin是一种连接蛋白, 其编码基因突变、蛋白表达异常及异位与肿瘤发生或转移密切相关. 作为细胞黏附分子重要组成部分的E-cadherin和 β -catenin基因, 在肿瘤分化和转移过程中有着重要的作用, 是肿瘤浸润转移的抑制因子, 他们中的任何一种成分异常均可导致E-cadherin介导的细胞黏附系统功能障碍. E-cadherin下调或 β -catenin自身功能变化都可能造成E-cad/cat复合体的功能降低或丧失, 使 β -catenin由胞膜游离而进入胞质和核, 而核内 β -catenin的水平升高可以活靶基因, 启动细胞周期, 促进细胞增生, 最终导致肿瘤的发生. E-cadherin及 β -catenin的异常表达不仅与细胞分化相关, 还与肿瘤的浸润及转移密切相关. 大量研究表明^[15], E-cad/ β -cat复合物具有抑制肿瘤浸润与转移的作用, E-cadherin表达强度与组织学分级、肿瘤大小、淋巴转移、临床分期和静脉侵犯呈负相关^[16]. Behrens *et al*发现, E-cadherin黏附功能的丧失可使细胞转为高侵袭性表型, 进一步研究表明, 在多种肿瘤组织中, 包括肝癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌及结直肠癌等, 都发现有E-cadherin表达的异常, 特别是在肿瘤的转移灶中, 癌细胞E-cadherin的表达减少甚至消

表 3 E-cadherin和 β -cat在胃癌中表达的相关性

E-cadherin	β -catenin		P值	r
	正常(%)	异常(%)		
正常(%)	17(62.96)	10(33.04)	<0.05	0.295
异常(%)	15(32.61)	31(67.39)		

失^[17-18]. 本研究显示, E-cadherin和 β -catenin在胃癌细胞的细胞膜表达与正常胃黏膜上皮细胞相比明显降低, 并出现细胞质和/或细胞核等各种形态的异常表达. 随着胃癌分化程度的降低、浸润深度的增加、TNM分期的进展以及淋巴结转移的发生, E-cadherin和 β -catenin的异常表达明显增加; 且E-cadherin和 β -catenin在胃癌中的表达强度呈密切正相关($r = 0.295$, $P < 0.05$). 由此推测, 由于 β -catenin基因突变或E-cad/ β -cat复合体的解体, 使得E-cadherin失去与 β -catenin的锚定连接而形成一种活动形式, 加之E-cadherin和 β -catenin表达减少, 细胞失去黏附功能, 导致细胞分散, 癌细胞表型改变, 获得高侵袭性, 易于发生浸润和转移, 这些因素在胃癌的进展中均起重要作用, 看来二者有一定协同作用.

β -catenin是一种多功能蛋白, 除了结合型 β -catenin可与E-cadherin结合形成E-cad/ β -cat复合体外, 游离型 β -catenin是Wnt信号通路重要组成部分, 可介导Wnt信号转导通路的异常激活, 这两种作用均与肿瘤的发生、发展密切相关^[3,19-20]. 当 β -catenin蛋白本身异常或者降解途径异常时, 激活Wnt信号传导途径, β -catenin进入核内与转录调控因子TCF/LEF家族成员结合, 继而激活下游靶基因Cyclin D1, c-myc, 导致肿瘤的发生^[21]. 当Cyclin D1表达失控时会引起细胞增殖周期失调^[22]. 近年的研究发现, 胃癌的发生、发展与Cyclin D1的表达有着较为密切的关系, 夏加增 *et al*^[23]的研究证实, Cyclin D1在不同胃癌组织中的表达增强, 他们认为Cyclin D1过度表达引起胃癌细胞异常增殖. 本研究显示, Cyclin D1在胃癌组织中的阳性表达率为67.12%(49/73), 明显高于其在正常胃黏膜组织中的表达, 且Cyclin D1的过表达与胃癌的分化程度和淋巴结转移密切相关. 正常胃黏膜组织中E-cadherin和 β -catenin均为细胞膜强阳性表达, 细胞质和细胞核几乎不着色, 而E-cadherin和 β -catenin在胃癌组织中大多数表现为细胞质和/或细胞核内聚集表达, 胞膜表达消失. 本研究证明, 胃癌中E-cadherin和 β -catenin的异常表达

与Cyclin D1的过表达之间存在着显著的正相关($P<0.05$)。结果提示, E-cadherin和 β -catenin异常表达与Cyclin D1的激活相关, 继之细胞增殖和分化失控, 这一过程可能在胃癌的发生过程中发挥重要作用。

总之, E-cadherin和 β -catenin在胃腺癌组织中存在异常的胞质和/或胞核表达, 异常表达的E-cadherin和 β -catenin与胃癌的浸润和转移密切相关, 其作用可能通过Cyclin D1基因激活机制而实现。

4 参考文献

- Jawhari AU, Farthing MJ, Pignatelli M. The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. *J Pathol* 1999; 187: 155-157
- Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; 21: 1021-1030
- Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 1997; 112: 46-54
- Yamaguchi A, Goi T, Seki K, Ohtaki N, Maehara M, Kobayashi T, Niimoto S, Katayama K, Hirose K, Nakagawara G, Matsukawa S. Clinical significance of combined immunohistochemical detection of CD44v and sialyl LeX expression for colorectal cancer patients undergoing curative resection. *Oncology* 1998; 55: 400-403
- Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, Gabrielson E. Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol* 2001; 159: 831-835
- Naito A, Iwase H, Kuzushima T, Nakamura T, Kobayashi S. Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasms. *J Surg Oncol* 2001; 76: 176-180
- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153: 333-339
- Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23
- Elzagheid A, Algars A, Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Collan Y, Syrjanen K, Pyrhonen S. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4304-4309
- Wu ZY, Zhan WH, Li JH, He YL, Wang JP, Lan P, Peng JS, Cai SR. Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3139-3143
- Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4789-4796
- Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R217-222
- Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 542-546
- Inagawa S, Itabashi M, Adachi S, Kawamoto T, Hori M, Shimazaki J, Yoshimi F, Fukao K. Expression and prognostic roles of beta-catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 450-456
- Debruyne P, Vermeulen S, Mareel M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62: 393-402
- Takayama N, Arima S, Haraoka S, Kotho T, Futami K, Iwashita A. Relationship between the expression of adhesion molecules in primary esophageal squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes. *Anticancer Res* 2003; 23: 4435-4442
- Schuhmacher C, Becker KF, Reich U, Schenk U, Mueller J, Siewert JR, Hofler H. Rapid detection of mutated E-cadherin in peritoneal lavage specimens from patients with diffuse-type gastric carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8: 66-70
- Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H, Kono M. Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1183-1197
- Ilyas M, Tomlinson IP. The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol* 1997; 182: 128-137
- Hasegawa T, Yokoyama R, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Prognostic significance of histologic grade and nuclear expression of beta-catenin in synovial sarcoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 257-263
- Le Marchand L, Seifried A, Lum-Jones A, Donlon T, Wilkens LR. Association of the cyclin D1 A870G polymorphism with advanced colorectal cancer. *JAMA* 2003; 290: 2843-2848
- 张晓晖, 黄高升, 王文亮. 细胞周期的网络调控系统 cyclins-CDKs-CKIs及其与肿瘤的关系. 国外医学·肿瘤学分册 1997; 24: 77-80
- 夏加增, 张熔熔, 王利军, 杨继昌, 王心南, 尹浩然, 朱正纲. 细胞周期调节蛋白在胃癌中的表达及其意义. 中华病理学杂志 1999; 28: 452-453

电编 张敏 编辑 张焕兰

H2受体阻滞剂联合多潘立酮对肝硬化患者门脉血流的影响

达 炜, 陈金联, 朱金水, 陈尼维, 孙 群, 陈维雄

■背景资料

门静脉高压导致的食道静脉曲张破裂出血是肝硬化患者最危险的并发症之一。目前, 门静脉高压症患者除了行肝脏移植外, 尚没有其他方法去除已经形成的机械性梗阻因素。寻找能够有效降低门静脉高压的药物以及阐明其作用机制成为研究热点, 部分药物如H2受体阻滞剂等已经被动物实验所证明有效, 但缺乏更有力的临床研究依据。

达炜, 陈金联, 朱金水, 陈尼维, 孙群, 陈维雄, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科 上海市 200233

通讯作者: 达炜, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科. daqdong@online.sh.cn

电话: 021-64369181-8969 传真: 021-64837019

收稿日期: 2006-11-04 接受日期: 2006-12-01

Effect of H2-receptor blocker combined with domperidone on the blood flow of portal venous system in patients with liver cirrhosis

Wei Da, Jin-Lian Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Sun Qun, Wei-Xiong Chen

Wei Da, Jin-Lian Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Sun Qun, Wei-Xiong Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Wei Da, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. daqdong@online.sh.cn

Received: 2006-11-04 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To explore the effect of H2-receptor blocker combined with domperidone on the blood flow of portal venous system in patients with liver cirrhosis.

METHODS: A total of 60 patients with liver cirrhosis were randomly and averagely divided into group A, B, and C, treated with H2-receptor blocker, domperidone, and their combination, respectively. Twenty healthy subjects served as normal controls. Portal venous flow (PVF, mL/min), splenic venous flow (SVF, mL/min) and superior mesenteric venous flow (SMVF, mL/min) were determined using Doppler ultrasonography before and after treatment.

RESULTS: After treatment, PVF was significantly higher than that before treatment (850.23 ± 140.78 vs 695.22 ± 221.44 , $P < 0.01$), while SVF and SMVF were lower (both $P > 0.05$) in group

A. PVF was increased as compared with that before treatment in group B, but there was no significant difference ($P > 0.05$). However, SVF and SMVF were markedly decreased as compared with those before treatment in group B (SVF: 598.13 ± 272.33 vs 816.40 ± 279.61 , $P < 0.05$; SMVF: 504.23 ± 188.54 vs 640.30 ± 200.12 , $P < 0.05$). PVF was remarkably higher than that before treatment (876.76 ± 178.65 vs 705.34 ± 200.15 , $P < 0.05$), while SVF and SMVF were lower (SVF: 605.33 ± 252.86 vs 798.33 ± 280.45 , $P < 0.01$; SMVF: 503.43 ± 175.25 vs 650.19 ± 190.62 , $P < 0.01$) in group C.

CONCLUSION: H2-receptor blocker and domperidone can improve the blood flow of portal venous system, and their combination is more effective.

Key Words: Liver cirrhosis; Portal venous system; Blood flow; H2-receptor blocker; Domperidone; Doppler ultrasonography

Da W, Chen JL, Zhu JS, Chen NW, Sun Q, Chen WX. Effect of H2-receptor blocker combined with domperidone on the blood flow of portal venous system in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):408-411

摘要

目的: 探讨H2受体阻滞剂联合多潘立酮对肝硬化患者门静脉系统血流量的影响。

方法: 以20名健康人作为正常对照, 60例肝硬化患者随机分成3组, 分别给予口服高舒达、口服多潘立酮以及联合用药, 治疗前后采用多普勒超声测定门静脉(PVF)、脾静脉(SVF)和肠系膜上静脉(SMVF)血流量(mL/min)。

结果: 治疗后, H2受体阻滞剂组的PVF显著高于治疗前(850.23 ± 140.78 vs 695.22 ± 221.44 , $P < 0.01$), SVF和SMVF低于治疗前, 但无显著差异。多潘立酮组PVF较治疗前有增高, 无显著差异, 而SVF和SMVF显著低于治疗前(SVF: 598.13 ± 272.33 vs 816.40 ± 279.61 , $P < 0.05$;

SMVF: 504.23 ± 188.54 vs 640.30 ± 200.12 , $P < 0.05$). 联合用药组则PVF显著高于治疗前 (876.76 ± 178.65 vs 705.34 ± 200.15 , $P < 0.05$), 而SVF、SMVF显著低于治疗前 (SVF: 605.33 ± 252.86 vs 798.33 ± 280.45 , $P < 0.01$; SMVF: 503.43 ± 175.25 vs 650.19 ± 190.62 , $P < 0.01$).

结论: H2受体阻滞剂组及多潘立酮都具有改善门静脉系统血流的作用, 联合应用作用更为明显.

关键词: 肝硬化; 门脉系统; H2受体阻滞剂; 多潘立酮; 多普勒超声

达炜, 陈金联, 朱金水, 陈尼维, 孙群, 陈维雄. H2受体阻滞剂联合多潘立酮对肝硬化患者门脉血流的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(4):408-411
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/408.asp>

0 引言

门静脉高压导致的食道静脉曲张破裂出血是肝硬化患者最危险的并发症之一, 死亡率高达50%^[1]. 目前, 门静脉高压症患者除了行肝脏移植外, 尚没有其他方法去除已经形成的机械性梗阻因素. 已经发现有多种血管活性物质在门静脉高压的形成过程中发挥着重要的作用^[2-3], 临床观察和实验研究均证实了门静脉高压存在时, 血液中组胺量显著增高, 引起肝脏流出道梗阻, 加剧门静脉高压, 应用其拮抗剂可以达到降低门静脉压力的作用^[4]. 有学者发现, 静脉内注射H2受体阻滞剂可以减少肝脏血管床的阻力, 可以有效降低门静脉的阻力, 还能增加门静脉的血流量, 从而改善肝脏的血液供应, 有利于肝功能的恢复^[5-6]. 此外, 动物实验还显示了多潘立酮能够改善肝硬化时内脏的高动力循环状态, 作者等研究证实, 多潘立酮对门脉血流量影响与相关动物实验报道相符合^[7]. 我们旨在探讨H2受体阻滞剂联合多潘立酮对肝硬化患者门静脉系统血流量的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 本院住院及门诊肝硬化患者60例, 其中男38例, 女22例, 年龄35-76岁, 平均年龄 56.2 ± 6.2 岁. 所有患者均为肝炎后肝硬化伴有食管胃底静脉曲张, 均经过胃镜、B超及腹部CT证实, 既往无脾切除、分流、断流及其他腹部手术史, 无心血管疾病史, 无合并消化性溃疡史, 其中Child A级8例, Child B级36例, Child C级16例, 有

食管胃底静脉曲张破裂出血史者20例. 另取20名健康人(我院工作人员)为正常对照, 其中男12名, 女8名, 年龄36-68岁, 平均年龄 50.0 ± 4.9 岁, 无腹部手术史、心血管疾病史及其他合并用药史.

1.2 方法

1.2.1 分组 入选肝硬化患者随机分成3组, 分别给予H2受体阻滞剂(高舒达, 日本山之内制药有限公司)20 mg, 2次/d、多潘立酮(吗叮琳, 西安杨森制药有限公司)10 mg, 3次/d以及同时给予上述两种药物, 疗程4 wk, 分别于治疗前后采用多普勒超声测定门静脉系统血流参数.

1.2.2 多普勒超声检查 接受检查者在检查前禁食、禁水12 h, 取仰卧位测定门静脉主干、脾静脉主干和肠系膜上静脉的内径 $D(\text{cm})$ 和平均血流速度 $v(\text{cm/s})$, 血流量 $Q = (\pi D^2/4) \times v \times 60$ (mL/min). 获得清晰的血管长轴切面灰阶图像后取样, 取样容积位于血管中心, 大小以血管半径为准, 多普勒声束与血管长轴夹角 $< 60^\circ$, 反复调整角度以获得最佳图像, 所有数据都测定3次, 取其平均值.

统计学处理 采用SPSS统计软件进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

药物治疗前, 肝硬化患者的门静脉血流量(PVF)显著低于正常对照组, 脾静脉血流量(SVF)和肠系膜上静脉血流量(SMVF)均显著高于正常对照组. 治疗后, H2受体阻滞剂组的PVF显著高于治疗前, SVF和SMVF低于治疗前, 但无显著差异. 多潘立酮组PVF较治疗前有增高, 无显著差异, 而SVF和SMVF显著低于治疗前. 联合用药组则PVF显著高于治疗前而SVF、SMVF显著低于治疗前. 但无论何种治疗后, 肝硬化患者组的PVF仍显著低于正常组, 而SVF和SMVF则显著高于正常对照组. 联合用药组治疗后较另两组的PVF升高及SVF和SMVF的下降更为明显, 但无统计学差异(表1).

3 讨论

肝硬化患者门静脉压力增高后可导致食管胃底静脉曲张以及上消化道出血、腹水、肝性脑病等各种致命性并发症^[8], 门静脉高压是多种因素共同作用的结果, 内脏高动力循环以及血液中组胺增加导致血流阻力增加在门脉高压中都起作用^[9-10], Nelson *et al*^[11]通过多普勒超声检查64例肝硬化患者后发现当脾静脉血流量高于门静

■应用要点

本研究旨在探讨H2受体阻滞剂联合多潘立酮对肝硬化患者门静脉系统血流量的影响, 从而为临床应用提供一定的参考依据.

■同行评价

本文研究了H2受体阻滞剂联合多潘立酮对肝硬化患者门脉血流的影响,结果有一定的参考意义,但是科学论证支持还需要后续研究完善。

表 1 肝硬化患者治疗前后与正常对照组门脉系统血流量比较(mean ± SD, mL/min)

分组	PVF	SVF	SMVF
H2受体阻滞剂组治疗前	695.22 ± 221.44 ^b	810.33 ± 266.63	633.33 ± 193.32 ^a
H2受体阻滞剂组治疗后	850.23 ± 140.78 ^{bd}	790.21 ± 243.24 ^b	622.11 ± 200.34 ^a
多潘立酮组治疗前	698.13 ± 210.41 ^b	816.40 ± 279.61 ^b	640.30 ± 200.12 ^a
多潘立酮组治疗后	712.24 ± 254.58 ^b	598.13 ± 272.33 ^{bc}	504.23 ± 188.54 ^c
H2受体阻滞剂联合多潘立酮组治疗前	705.34 ± 200.15 ^b	798.33 ± 280.45 ^b	650.19 ± 190.62 ^a
H2受体阻滞剂联合多潘立酮组治疗后	876.76 ± 178.65 ^{ac}	605.33 ± 252.86 ^{bd}	503.43 ± 175.25 ^d
正常组	1012.33 ± 236.53	298.58 ± 112.33	485.29 ± 224.51

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 同组治疗前后。

脉血流量时,实际入肝的血流量反而减少,促使异常增多的血流反流,其中重要的一条途径是经胃冠状静脉与体循环交通并引起食管静脉曲张^[12],门静脉压力增高与食管静脉曲张程度成正比^[13],因此降低门脉压力,减轻食管静脉曲张是预防其破裂出血的关键^[14]。门静脉血流动力学包括门静脉和脾静脉的压力、血流量、血管内径、血流速度参数测定,直接测量多系创伤性,应用多普勒超声检查具有简便、无创等优点,患者的依从性较好^[15]。Dauzat *et al*^[16]在动物实验研究中同时采用多普勒超声和电磁流量计测定门脉系统血流参数,发现两种方法测得的结果之间有良好的相关性($r = 0.918$, $P < 0.01$),并且进一步发现两者间的差异主要有超声束的角度差异引起,当选择调整角度多次测量取平均值再比较时,两者相关性上升($r = 0.934$, $P < 0.01$)。本研究结果显示,治疗前肝硬化患者组的PVF显著低于正常组,而SVF和SMVF显著高于正常对照组,门静脉高压时,虽然门脉系统总的血流量高于正常人,但是由于存在大量侧支分流,导致由门静脉进入肝脏的血流量反而显著减少,形成这种内脏高动力循环状态的主要原因是此类患者血液中的胰高血糖素、一氧化氮(NO)、血管活性肠肽(VIP)、前列腺素等扩血管物质的生成增多、灭活减少,同时内脏血管本身对循环中的缩血管物质的反应性降低^[17-18]。而在此基础上,随着门静脉入肝的有效血流减少,肝脏灌注不足,肝功能逐渐减退,内脏高动力循环状态进一步加重,进入一种恶性循环。

本研究结果还显示,治疗后H2受体阻滞剂组的PVF显著高于治疗前,SVF和SMVF低于治疗前,但无显著差异,王延龄 *et al*^[19]在研究甲氧咪胍对门静脉高压症犬血液动力学影响时发现,H2受体阻滞剂能够显著同步降低肝硬化门静脉

压力和阻力,同时门静脉血流并不减少,反而有轻度增加。其机制在于拮抗组胺受体兴奋时对肝血管床的收缩作用,使门静脉和肝静脉扩张,血流速度增加,减少了流出道的阻力,从而降低了门静脉压力。已有学者报道,H2受体阻滞剂的作用部位在肝静脉和门静脉壁的H2受体^[20-21]。

多潘立酮组PVF较治疗前有增高,虽无显著差异,但SVF和SMVF显著低于治疗前,与孙群 *et al*^[22]实验报道结果相同,即多潘立酮可能对肝硬化伴食管胃底静脉曲张患者的内脏高动力循环状态有改善作用。这可能与多潘立酮是多巴胺受体拮抗剂,引起血管平滑肌收缩,导致内脏血流量重新分布有关。

H2受体阻滞剂及多潘立酮都具有改善门静脉系统血流的作用,此外H2受体阻滞剂还具有抑制胃酸、保护胃黏膜的作用,联合用药组则PVF显著高于治疗前而SVF、SMVF显著低于治疗前,表明其改善门静脉系统血流,有效降低门静脉高压的作用更为显著,而且治疗后较另两组的PVF升高及SVF和SMVF下降变化更为明显,其作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- Burroughs AK, Panagou E. Pharmacological therapy for portal hypertension: rationale and results. *Semin Gastrointest Dis* 1995; 6: 148-164
- 李书隼, 王新慧, 韩建德. 肝硬化门静脉高压患者周围血及门静脉血中几种液体物质的观察. *中华外科杂志*. 1988; 26: 44-48
- 黄廷庭. 门静脉高压症外科学. 北京, 人民卫生出版社. 2002: 113-116
- Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21: 1-14
- Li S, Feng H, Zhu J, Zhong C, Leng X, Du R. [Effects of urapidil and cimetidine on wedged hepatic venous pressure and systemic hemodynamics in cirrhotic patients with portal hypertension] *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2000; 38: 287-290
- 冷希圣. 门静脉高压症发病机制的研究现状. *世界华*

- 人消化杂志 1999; 7: 369-371
- 7 Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993; 18: 367-372
- 8 郑芝田. 胃肠病学第二版北京人民出版社. 1993: 957-968
- 9 Vezozzo DC, Farias AQ, Cerri GG, Da Silva LC, Carrilho FJ. Assessment of portal hemodynamics by Doppler ultrasound and of liver morphology in the hepatosplenic and hepatointestinal forms of schistosomiasis mansoni. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1413-1419
- 10 El-Gendi MA, Nassar SH. Effect of histamine and histamine antagonists on portal blood pressure in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Br J Clin Pharmacol* 1980; 10: 157-161
- 11 Nelson RC, Sherbourne GM, Spencer HB, Chezmar JL. Splenic venous flow exceeding portal venous flow at Doppler sonography: relationship to portosystemic varices. *AJR Am J Roentgenol* 1993; 161: 563-567
- 12 彭梅, 李凤华, 夏建国, 李继强, 李红丽, 王晓燕. 彩色多普勒超声预测肝硬化食管静脉曲张破裂出血. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1894-1896
- 13 李晓华, 王炼, 方有文, 路又可. 彩色多普勒超声检测肝硬变门; 7: 453
- 14 Scarpignato C. Clinical pharmacology of active variceal bleeding. *Dig Dis* 1992; 10 Suppl 1: 16-29
- 15 Piscaglia F, Gaiani S, Donati G, Masi L, Bolondi L. Doppler evaluation of the effects of pharmacological treatment of portal hypertension. *Ultrasound Med Biol* 1999; 25: 923-932
- 16 Dauzat M, Layrargues GP. Portal vein blood flow measurements using pulsed Doppler and electromagnetic flowmetry in dogs: a comparative study. *Gastroenterology* 1989; 96: 913-919
- 17 潘要干, 周浩庚. 门静脉高压症病理研究进展. 中华消化杂志 1996; 16: 100-101
- 18 Albillos A, Lledo JL, Banares R, Rossi I, Iborra J, Calleja JL, Garrido A, Escartin P, Bosch J. Hemodynamic effects of alpha-adrenergic blockade with prazosin in cirrhotic patients with portal hypertension. *Hepatology* 1994; 20: 611-617
- 19 王延龄, 陈云波, 丁巍, 李桂英, 王淑敏, 李爱景. 甲氧咪胍对肝硬化门脉高压症犬门脉血液动力学的影响. 吉林大学学报(医学版) 2005; 31: 268-271
- 20 张忠明, 冷希圣, 冯洪强, 马富, 王冰. 肝硬变门静脉高压症患者肝组织中组胺H1和H2受体变化的研究. 中华外科杂志 1998; 36: 348-350
- 21 Grace ND, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Burroughs AK, Pagliaro L, Makuch RW, Bosch J, Stiegmann GV, Henderson JM, de Franchis R, Wagner JL, Conn HO, Rodes J. Portal hypertension and variceal bleeding: an AASLD single topic symposium. *Hepatology* 1998; 28: 868-80
- 22 孙群, 陈尼维, 陈维雄, 朱金水, 达伟. 多潘立酮对肝硬化患者门脉系统血流量的影响. 胃肠病学 2003; 8: 290-291

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2007-05月上旬在山东省济南市召开第七次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下.

1 征文内容

消化系统疾病的流行病学、基础及临床(包括内镜诊断和治疗)研究. 因会议论文交流将按下列组别进行分会场交流, 故务必请在下列8个组别中选择1个您认为适合的交流组别, 并在论文摘要的右下角上标明.(1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性疾病; (7)胃肠激素; (8)其他.

2 征文要求

请提供800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者的姓名、单位和邮政编码. 并提供电脑打印稿(附软盘), 经所在的单位审查盖章后寄至中华医学会学术会务部刘亚君收(北京东四西大街42号 邮编 100710), 信封上请注明会议名称. 请最好同时通过本次会议专用网站(网址: www.assimilation2007.com)邮寄电子文稿和报名. 凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理. 截稿日期: 2007-02-28(以当地邮戳为准)

大肠癌中nm23-H1的表达及其与临床病理特征的关系

杨冬冬, 田素礼, 于金玲

■背景资料

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤, 其发病率占我国消化道癌的第2位; 随着我国人口老龄化、生活习惯、饮食结构以及环境的改变, 大肠癌的发病率呈上升趋势。影响大肠癌预后的主要因素是肿瘤的生长分化和侵袭转移, 其过程十分复杂, 诸多因素参与和调控大肠癌的上述生物学行为, 其中最引人注意的是多种(抑)癌基因。nm23是近年来被认为与大肠癌生长分化和侵袭转移关系密切的一个基因。

杨冬冬, 田素礼, 于金玲, 哈尔滨医科大学附属第四医院普外二科, 黑龙江省哈尔滨市 150001

通讯作者: 田素礼, 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二科。
yangdongdong02@163.com
电话: 0451-82576682

收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-01

Expression of nm23-H1 and its relationship with clinicopathological characteristics in human colorectal carcinoma

Dong-Dong Yang, Su-Li Tian, Jin-Ling Yu

Dong-Dong Yang, Su-Li Tian, Jin-Ling Yu, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Su-Li Tian, the Second Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 37 Yiyuan Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. yangdongdong02@163.com

Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To investigate the expression of nm23-H1 and its correlation with the clinicopathological characteristics in human colorectal carcinoma, and to explore the role of nm23-H1 expression in the carcinogenesis, development and metastasis of colorectal carcinoma.

METHODS: S-P immunohistochemical technique was used to detect the expression of nm23-H1 in 63 cases of colorectal cancer (including cancer and cancer-adjacent tissues), 16 cases of adenoma and 25 cases of normal colorectal tissues.

RESULTS: The level of nm23-H1 expression was significantly lower in colorectal cancer tissues than that in cancer-adjacent, normal mucosal or adenoma tissues (58.7% vs 90.5%, 96.0%, 93.8%, $P < 0.05$), as well as in colorectal cancer patients with lymph node metastasis than that

in patients without metastasis (45.5% vs 73.3%, $P < 0.05$). The expression of nm23-H1 was positively correlated with the differentiation degree ($r = 0.192$, $P < 0.05$), but negatively correlated with the depth of invasion ($r = -0.263$, $P < 0.05$). Nm23-H1 expression had no relationship with the sex and age of patients', the morphologic type, histological type and sizes of the tumors.

CONCLUSION: Down-regulation of nm23-H1 expression is an important molecular biological event in the carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma, and can be used as an index for the judgment of tumor cell differentiation, invasion and lymph node metastasis.

Key Words: Colorectal carcinomas; nm23-H1; Immunohistochemistry

Yang DD, Tian SL, Yu JL. Expression of nm23-H1 and its relationship with clinicopathological characteristics in human colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):412-415

摘要

目的: 观察nm23-H1的表达与临床病理特征的关系, 探讨nm23-H1的表达与大肠癌发生、发展、转移的作用。

方法: 选取行结、直肠癌根治术的患者63例, 并取腺瘤组织16例做对照。应用免疫组化S-P法检测大肠癌患者癌组织、同源癌旁组织及正常黏膜组织和大肠腺瘤组织nm23-H1的表达。

结果: nm23-H1在癌组织中表达(58.7%)显著低于癌旁组织(90.5%)、正常黏膜组织(96.0%)及腺瘤组织(93.8%)($P < 0.05$)。在大肠癌组织中, 无淋巴结转移者nm23-H1表达(73.3%)显著高于有淋巴结转移者(45.5%)($P < 0.05$)。大肠癌中nm23-H1表达与肿瘤分化程度呈正相关($r = 0.192$, $P < 0.05$), 与肿瘤浸润深度呈负相关($r = -0.263$, $P < 0.05$)。nm23-H1表达程度与患者年龄、性别、肿瘤大体分型、组织学类型、同期肿瘤大小均无关。

结论: nm23-H1表达下调是大肠癌发生、发展中的重要分子生物学事件, 可作为提示肿瘤分化、侵袭和淋巴结转移的一项指标。

关键词: 大肠癌; nm23-H1; 免疫组化

杨冬冬, 田素礼, 于金玲. 大肠癌中nm23-H1的表达及其与临床病理特征的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(4):412-415
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/412.asp

0 引言

恶性肿瘤的转移是一个复杂的生物学行为, 随着分子生物学的发展, 一种肿瘤转移抑制基因nm23被鉴定出来, 研究发现他与多种恶性肿瘤的浸润及转移密切相关^[1-3]. 大肠癌转移与nm23基因表达相关性的研究较少, 且尚存在争论. 为此, 我们采用免疫组化方法检测大肠癌组织中nm23-H1基因蛋白的表达, 探讨nm23-H1基因表达与大肠癌临床病理特征的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2005-02/2006-02行结、直肠癌根治术的患者, 取癌组织及距癌组织边缘3 cm的癌旁组织各63例、正常的结、直肠组织25例, 并取腺瘤组织16例做对照. 63例癌组织中男39例、女24例, 平均年龄59(43-82)岁. 组织学分型: 高分化腺癌9例、中分化腺癌34例、低分化腺癌20例. 有淋巴结转移33例, 无淋巴结转移30例。

标本采集过程: 手术中, 于肿瘤组织、距肿瘤边缘3 cm的癌旁组织及手术切缘(正常黏膜)各取一块组织(大小约1 cm³). 置入40 g/L甲醛溶液中固定. 同时测量肿瘤大小, 观察大体分型, 记录患者临床资料. 另采集因大肠良性病变行大肠部分切除术的标本16例作为对照组。

1.2 方法 标本用甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片4 μm厚, 分别行组织学观察及免疫组化染色(SP法). nm23-H1抗体及S-P试剂盒均购于福州迈新生物技术开发有限公司. nm23-H1的表达主要位于胞质内, 染色阳性信号为胞质呈棕黄色颗粒. 阴性(-): 全部细胞无显色或阳性细胞数<30%; 阳性(+): 阳性细胞数占30%-60%; 强阳性(++): 阳性细胞数>60%。

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件根据资料性质采用 χ^2 检验、秩和检验及相关系数, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织的nm23-H1表达 大肠癌组织

表 1 不同组织的nm23-H1表达

分组	n	nm23-H1的表达程度			阳性率(%)
		-	+	++	
正常黏膜	25	1	18	6	96.0
腺瘤组织	16	1	11	4	93.8
癌旁组织	63	6	39	18	90.5
癌组织	63	26	31	6	58.7

中nm23-H1表达阳性率58.7%(37/63), 显著低于癌旁组织90.5%(57/63)及正常黏膜组织96.0%(24/25), (均 $P<0.05$). 腺瘤组织nm23-H1阳性率93.8%(15/16), 癌组织与腺瘤组织比较有显著性差异($P<0.05$), 而正常黏膜组织、癌旁组织与腺瘤组织比较无明显差异($P>0.05$)(表1)。

2.2 不同组织分化程度的结直肠癌中nm23-H1的表达 在结直肠癌组织中, 高分化组nm23-H1阳性率(6/9)66.7%; 中分化组阳性率61.8%(21/34); 低分化组阳性率50.0%(10/20). 三者比较有显著性差异, 其表达与肿瘤分化程度呈正相关($r = 0.192, P<0.05$)(表2)。

2.3 不同浸润深度的结直肠癌中nm23-H1的表达 在结直肠癌组织中, 浸润至黏膜层者nm23-H1阳性率83.3%(5/6); 至肌层者阳性率75.0%(9/12); 至浆膜及周围脂肪组织者阳性率51.1%(23/45). 三者比较有显著性差异, 其表达与肿瘤浸润深度呈负相关($r = -0.263, P<0.05$)(表2)。

2.4 nm23-H1在有淋巴结转移的癌组织中的表达 癌组织中, 有淋巴结转移者nm23-H1阳性率45.5%(15/33); 无淋巴结转移者阳性率73.3%(22/30). 二者比较, 有显著性差异($P<0.05$)(表2)。

2.5 不同组织学类型、不同大体分型及不同肿瘤大小的结肠癌中nm23-H1的表达 癌组织中, 乳头状腺癌nm23-H1阳性率55.6%(5/9); 管状腺癌阳性率60.1%(26/43); 黏液状腺癌阳性率57.1%(4/7); 腺鳞状癌、腺瘤恶变阳性率50.0%(2/4). 四者比较, 无显著性差异($P>0.05$). 隆起型阳性率65.2%(15/23), 浸润型阳性率53.3%(16/30), 溃疡型阳性率50.0%(5/10), 三者比较无显著性差异($P>0.05$), 肿瘤纵径>3 cm阳性率60.7%(17/28), <3cm阳性率57.1%(20/35), 二者比较无显著性差异($P>0.05$)(表2)。

2.6 不同年龄、性别nm23-H1的表达 nm23-H1的表达与病人的年龄、性别无相关性($P>0.05$)(表2)。

■ 相关报道

Berney *et al* 研究认为nm23-H1既具有大肠肿瘤转移抑制功能, 也与肿瘤浸润发展呈负相关. 赵茜 *et al* 研究提示nm23-H1表达与大肠癌分化程度和淋巴结转移密切相关. 但也有一些学者提出了相反结论, 认为大肠癌中nm23-H1的表达与其浸润、转移、分期无明显关系。

■应用要点

在大肠癌中, nm23-H1的降表达是大肠癌发生、发展中的重要分子生物学事件, 可作为提示肿瘤分化、侵袭和淋巴结转移的一项指标。检测nm23-H1在肿瘤细胞中的表达情况, 可以早期发现具有转移潜能的肿瘤, 有助于选择合适的治疗措施。

表 2 nm23-H1表达与大肠癌患者临床病理特征的关系

临床病理因素		n	nm23-H1的表达程度			阳性率	P值
			-	+	++		
性别	男	39	15	20	4	61.5%	>0.05
	女	24	11	11	2	54.2%	
年龄	<60岁	36	16	18	2	55.6%	>0.05
	≥60岁	27	10	13	4	62.9%	
大小 (d/cm)	≤3	28	11	16	1	60.7%	>0.05
	>3	35	15	15	5	57.1%	
组织学类型	乳头状腺癌	9	4	4	1	55.6%	>0.05
	管状腺癌	43	17	22	4	60.1%	
	黏液状腺癌	7	3	3	1	57.1%	
	腺鳞状癌腺癌恶变	4	2	2	0	50.0%	
大体分型	隆起型	23	8	13	2	65.2%	>0.05
	浸润型	30	14	13	3	53.3%	
	溃疡型	10	5	4	1	50.0%	
分化程度	高分化	9	3	4	2	66.7%	<0.05
	中分化	34	13	18	3	61.8%	
	低分化	20	10	9	1	50.0%	
淋巴结转移	有	33	18	13	2	45.5%	<0.05
	无	30	8	18	4	73.3%	
浸润深度	黏膜	6	1	4	1	83.3%	<0.05
	肌层	12	3	7	2	75.0%	
	浆膜及周围脂肪组织	45	22	20	3	51.5%	

3 讨论

大肠癌的生长分化和侵袭转移, 其过程十分复杂, 诸多因素参与和调控大肠癌的上述生物学行为; 其中最引人注意的是多种(抑)癌基因^[4-6]。nm23-H1基因是1988年Steeg *et al*^[1]从鼠K-1735黑色素瘤的具有不同转移潜力的细胞系中, 经差示杂交分离出来的。人类的nm23基因定位于17号染色体长臂上, 该基因全长8.5 kb, 由5个外显子及4个内含子组成。该基因主要存在于胞质和脂膜上。该基因编码一种分子量约为17 kDa的蛋白质, 具有二磷酸核苷激酶(NDPK)活性, NDPK的生物学功能是参与体内三磷酸核苷的生成, 通过影响微管聚合状态及G蛋白介导的信号传导通路, 而调节细胞代谢, 从而对肿瘤的增殖、分化、侵袭及转移起重要作用^[1-2,7-8]。1991年Stahl *et al*^[9]发现了第二种nm23, 故分别将其定名为nm23-H1和nm23-H2, 分别编码NDPK的A亚基和B亚基。Leone *et al*^[10]首先报道约22%结肠癌中有nm23等位基因缺失。Berney *et al*^[11]研究认为nm23-H1既具有大肠肿瘤转移抑制功能, 也与肿瘤浸润发展呈负相关。赵茜 *et al*^[12]研究提示nm23-H1表达与大肠癌分化程度和淋巴结转移密切相关。但也有一些学者提出了相反结论, 认为大肠癌中nm23-H1的表达与其浸润、转移、分期无明显关系^[13-15]。

本研究与前一种结果相一致, 通过对63例

结、直肠癌患者及16例大肠腺瘤患者进行的研究, 发现癌组织中nm23-H1的表达显著低于正常黏膜组织、癌旁组织及腺瘤组织。nm23-H1基因的表达与肿瘤分化程度呈正相关, 与肿瘤浸润深度呈负相关, 有淋巴结转移者nm23-H1表达低于无转移者, 而其表达程度与患者年龄、性别、肿瘤大体分型、组织学类型、同期肿瘤大小均无关。以上结果表明: 在大肠癌中, nm23-H1的降表达是大肠癌发生、发展中的重要分子生物学事件, 可作为提示肿瘤分化、侵袭和淋巴结转移的一项指标。检测nm23-H1在肿瘤细胞中的表达情况, 可以早期发现具有转移潜能的肿瘤, 有助于选择合适的治疗措施。

4 参考文献

- 1 Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgerirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 200-204
- 2 Steeg PS, Cohn KH, Leone A. Tumor metastasis and nm23: current concepts. *Cancer Cells* 1991; 3: 257-262
- 3 刘茗露, 刘斌, 邢传平, 陈一伟. 胃癌组织中KAI1、nm23及P53的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 491-496
- 4 蔡善荣, 郑树, 张苏展. 不同年龄组大肠癌预后多因素分析的比较. *中华肿瘤杂志* 2005; 17: 483-485
- 5 张渊智, 武子涛, 李世荣. 原发性结直肠癌594例的临床病理与遗传易感性. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1809-1813
- 6 谭颖, 姚宇亮, 林连捷, 郑长青. 大肠癌基因治疗. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1451-1454
- 7 Lee CS, Gad J. nm23-H1 protein immunoreactivity

- in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Int* 1998; 48: 806-811
- 8 MacDonald NJ, De la Rosa A, Benedict MA, Freije JM, Krutsch H, Steeg PS. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem* 1993; 268: 25780-25789
 - 9 Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; 51: 445-449
 - 10 Leone A, McBride OW, Weston A, Wang MG, Anglard P, Cropp CS, Goepel JR, Lidereau R, Callahan R, Linehan WM. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2490-2493
 - 11 Berney CR, Fisher RJ, Yang J, Russell PJ, Crowe PJ. Protein markers in colorectal cancer: predictors of liver metastasis. *Ann Surg* 1999; 230: 179-184
 - 12 赵茜, 吴秋良, 梁小曼, 区穗芳, 谢秀琴. uPA、uPAR、nm23-H1在大肠癌中的表达及其与肿瘤侵袭和转移的关系. *肿瘤防治研究* 2004; 31: 694-696
 - 13 Heide I, Thiede C, Poppe K, de Kant E, Huhn D, Rochlitz C. Expression and mutational analysis of Nm23-H1 in liver metastases of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1994; 70: 1267-1271
 - 14 Campo E, Miquel R, Jares P, Bosch F, Juan M, Leone A, Vives J, Cardesa A, Yague J. Prognostic significance of the loss of heterozygosity of Nm23-H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 2913-2921
 - 15 Lee JC, Lin YJ, Chow NH, Wang ST. Reappraisal of the role of NM23-H1 in colorectal cancers. *J Surg Oncol* 2001; 76: 58-62

■同行评价

抑癌基因nm23-H1降表达是否与大肠癌转移相关尚存争议. 本文应用免疫组化方法检测nm23-H1在大肠癌组织中的表达情况, 发现nm23-H1降表达与大肠癌的发生、发展呈显著相关. 该结论对于大肠癌的预后评估有一定临床意义.

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007年国际会议

Meeting Canadian Digestive Diseases Week (CDDW)
16-20 February 2007
Banff - AB
cagoffice@cag-acg.org
www.cag-acg.org/cddw/cddw2007.htm

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and
Postgraduate Course
12-15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 158: Intestinal Inflammation
and Colorectal Cancer
23-24 March 2007
Sevilla
symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13th Annual
International Congress
20-23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilts.org

Meeting 42nd Annual Meeting of the European
Association for the Study of the Liver
11-15 April 2007
Barcelona
easl2007@easl.ch
www.easl.ch/liver-meeting/

American College of Gastroenterology Annual
Scientific Meeting
12-17 October 2007
Pennsylvania Convention Center
Philadelphia, PA

Digestive Disease Week
19-24 May 2007
Washington Convention Center,
Washington DC

15th United European Gastroenterology Week,
UEGW
27-31 October 2007
Le Palais des Congrès de Paris,
Paris, France

围手术期腹腔或盆腔热灌注化疗治疗结直肠癌的临床应用

魏志刚, 李国新, 甄莉, 黄祥成, 卿三华, 巴明臣, 崔书钟

■背景资料

尽管治疗方法不断发展, 但结直肠癌患者的预后仍未得到明显改善, 其主要原因是术后腹腔复发及肝转移。热灌注化疗是近年来发展起来的防治胃肠恶性肿瘤术后腹腔复发和肝转移一种新的治疗方法, 在提高患者的生存率及改善预后方面取得一定的成就。近年来国内外学者对CHPPC在胃肠恶性肿瘤防治方面作了广泛深入的研究, 使其在理论、方法及临床应用方面得到进一步的完善, 使该疗法成为胃肠癌术后腹腔复发和肝转移较为重要的治疗措施, 但CHPPC一般只在术中麻醉状态下实施, 治疗环境及次数均受到限制, 疗效也可能因此受限。

魏志刚, 李国新, 甄莉, 黄祥成, 卿三华, 南方医科大学南方医院普通外科 广东省广州市 510515

巴明臣, 崔书钟, 广州医学院广州市肿瘤医院腹外二科 广东省广州市 510095

通讯作者: 李国新, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院普通外科. ligx1966@126.com

电话: 020-61641682

收稿日期: 2006-11-08 接受日期: 2006-11-28

Clinical application of perioperative continuous hyperthermic peritoneal or pelvic perfusion chemotherapy for colorectal cancer

Zhi-Gang Wei, Guo-Xin Li, Li Zhen, Xiang-Cheng Huang, San-Hua Qing, Ming-Chen Ba, Shu-Zhong Cui

Zhi-Gang Wei, Guo-Xin Li, Li Zhen, Xiang-Cheng Huang, San-Hua Qing, Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Ming-Chen Ba, Shu-Zhong Cui, Department of Abdominal Surgery, Guangzhou Cancer Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Correspondence to: Guo-Xin Li, Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. ligx1966@126.com

Received: 2006-11-08 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To evaluate the feasibility, safety, side effect, complications and short-term efficacy of perioperative (intraoperative and early postoperative) continuous hyperthermic peritoneal or pelvic perfusion chemotherapy (CHPPC) for colorectal cancer.

METHODS: Radical or palliative resection was performed in 20 patients with advanced colorectal cancer. During the operation, macroscopic intraperitoneal metastases were demolished with electrosurgical unit (ESU). The patients with colon cancer underwent CHPPC once using 5-fluorouracil (5-FU) and mitomycin during the operation, and then received 5-FU CHPPC once

per day from postoperative day 1 to 4. The hyperthermic perfusion lasted 60-90 minutes with a volume of 3000 mL at 43-44°C. The patients with rectal cancer were treated with intraoperative CHPPC (using 5-FU and mitomycin) once.

RESULTS: The success rate of intraoperative and postoperative CHPPC was 100%, and the temperature during thermochemotherapy was maintained 41-43°C for 60-90 minutes. There were no obvious changes in vital signs during perfusion except temporary fever, abdominal distention and pain. A little amount of hemorrhage in pelvic cavity occurred in 1 case with rectal cancer and incision healing delay was found in another case. All the cases were followed up for 3-27 months, of which 2 cases suffered from postoperative peritoneal recurrence (15%) and 1 was observed with hepatic metastasis (5%). Two cases with colon cancer and rectal cancer, respectively, died of extensive metastasis on postoperative month 14 and 10.

CONCLUSION: Perioperative CHPPC for colorectal cancer is safe and feasible, with fewer side effects and complications, and can be repeated without the restriction of therapeutic environment. Moreover, it may be beneficial to eliminating residual micro cancer and free cancer cells in patients following resection of colorectal tumors.

Key Words: Continuous hyperthermic peritoneal/pelvic perfusion chemotherapy; Colorectal cancer; Perioperative period

Wei ZG, Li GX, Zhen L, Huang XC, Qing SH, Ba MC, Cui SZ. Clinical application of perioperative continuous hyperthermic peritoneal or pelvic perfusion chemotherapy for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):416-420

摘要

目的: 探讨围手术期(术中和术后早期)腹腔或盆腔热灌注化疗治疗结直肠癌的可行性、安全性、毒副作用、并发症和短期抗癌疗效。

方法: 对我院住院治疗的20例进展期结直肠癌患者术中行根治性或姑息性切除术, 术中对腹腔内肉眼可见转移癌灶尽量用电刀戳灭; 结肠癌患者术中行腹腔热灌注化疗1次, 术后前4 d, 每日腹腔热灌注化疗1次, 化疗液加热至43-44℃, 循环灌注60-90 min, 共5次; 直肠癌患者术中盆腔热灌注化疗1次。

结果: 术中及术后早期行腹腔或盆腔热灌注化疗成功率为100%, 热化疗时间内腹腔内化疗液温度均可达到41-43℃, 并恒定保持60-90 min. 热灌注化疗期间患者生命体征无明显异常, 除暂时性发热、腹胀、腹痛外无其他不适, 直肠癌患者盆腔少量出血1例, 切口愈合延迟1例, 无其他明显毒副作用及并发症。随诊率100%, 随访3-27 mo. 其中腹腔转移2例, 盆腔转移1例, 局部复发率为15%, 肝转移1例, 肝转移率5%; 结肠癌、直肠癌患者中各有1例分别在术后14, 10 mo死于全身广泛转移。

结论: 围手术期腹腔或盆腔热灌注化疗结直肠癌安全可行, 治疗不受环境限制, 并可多次进行, 毒副作用小, 并发症少, 可能有利于杀灭腹腔内残余微小癌灶(MC)和游离癌细胞(FCC)。

关键词: 腹腔/盆腔热灌注化疗; 结直肠癌; 围手术期

魏志刚, 李国新, 甄莉, 黄祥成, 卿三华, 巴明臣, 崔书钟. 围手术期腹腔或盆腔热灌注化疗治疗结直肠癌的临床应用. 世界华人消化杂志 2007;15(4):416-420

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/416.asp>

0 引言

腹腔内局部和区域复发以及肝转移是结直肠癌术后最主要的致死原因, 至今仍无理想的防治方法^[1]. 1988年Fujimoto *et al*^[2]在腹腔化疗(intraperitoneal chemotherapy, IPC)的基础上, 首次利用腹腔热灌注化疗(continuous hyperthermic peritoneal perfusion chemotherapy, CHPPC)技术治疗胃肠恶性肿瘤, 近年来CHPPC在防治结直肠癌术后复发方面取得一定的成效, 但目前由于设备的原因, CHPPC一般在术中进行, 术后进行的较少, 使其疗效受到限制. 我们从2004-09年开始用RHL-2000A型热化疗灌注机进行结直肠癌围手术期(术中及术后早期)腹腔或盆腔热灌注化疗, 疗效满意, 现作以介绍。

1 材料和方法

1.1 材料 我院自2004-09/2006-02应用围手术期腹

腔或盆腔热灌注化疗治疗结直肠癌20例, 其中结肠癌11例, 男7例, 女4例, 平均年龄为57岁, Dukes分期: C₁期为3例, C₂期为6例, D期为2例; 直肠癌9例, 男5例, 女4例, 平均年龄65岁, Dukes分期: B期为2例, C期为6例, D期为1例. 诊断均经病理检查证实, 无严重心脑血管疾病及出血倾向. RHL-2000A型热化疗灌注机(吉林迈达医疗器械公司生产), 液体流量/min: 20-600 mL之间可调, 控温精度: ±1.5℃. 该仪器解决了人工腹水、温度不均匀、维持有效治疗温度时间短等腔内灌注设备上的最大困难, 并对工作环境无特殊要求. RHL-2000A型一次性医疗专用循环管路

1.2 方法

1.2.1 术中热灌注 术中腹腔热灌注: (1)术中根治性或姑息性手术切除结肠肿瘤, 腹腔内肉眼癌灶尽量用电刀戳灭, 然后于盆腔两侧和左右上腹腔各置一条长6 cm, 内径为0.8 cm, 外径为1 cm, 前端有多个侧孔的硅胶导管, 放置于盆腔的导管分别从同侧上腹壁另戳口引出, 上腹腔导管则从同侧下腹壁引出, 并加以缝合固定, 以备术中及术后腹腔灌注用, 清洗腹腔后关腹. (2)化疗液的配制及加热: 5-氟尿嘧啶(5-Fu)1000-1500 mg, 丝裂霉素(MMC)20 mg 加入3000 mL生理盐水中配制成化疗液. 打开循环管路包装, 按照说明及无菌要求将管路安装于灌注机上, 并将热探头测温传感器置入相应管路测温筒的测温管内, 用生理盐水将循环管路中的空气全部排净后, 将已经配置好的化疗液用盐水输入器输入到3000 mL输液袋内, 并用循环泵导入到放置在加温盒里的U形管中加热, 并将主控温度设定为45℃. (3)待化疗液加热到45℃并温度保持稳定时, 停止循环泵, 用注液管夹关闭管路的输入段和输出段, 打开管路的接口并将输入端与盆腔引流管相连, 输出端与上腹腔引流管相连, 然后打开输入段的注液管夹, 启动循环泵, 以200-500 mL/min的流速(可随时调整)将已加热好的化疗液灌注到腹腔, 待腹腔内注入1500-2000 mL的化疗液时, 打开管路输出段的注液管夹, 使循环管路与腹腔之间形成闭式循环并维持进出动态平衡, 这样腹腔可达到最大程度的充盈, 使化疗液更加均匀地分布于腹腔, 腹腔各脏器均与化疗液充分接触. 循环灌注过程中, 通过测温系统监测入水口、出水口及腹腔内的温度, 并通过控温系统调控加热装置, 使腹腔内化疗液的温度保持在42-43℃的治疗温度. CHPPC时间为60-90 min, 结束后腹腔内保留1000 mL的化疗液, 其余的放出体外. 关闭循环

■创新盘点

本研究应用新型的热化疗灌注机在患者术中麻醉状态及术后早期床边清醒状态下行热灌注化疗术, 可反复多次进行, 实施环境不受限制, 可能进一步增加其疗效。

应用要点

围手术期腹腔或盆腔热灌注化疗实施时应有相应专业技术人员全程监护, 并注意检测患者主要临床指标; 该治疗方法腔内化疗液及温度分布均匀, 无明显毒副作用及并发症, 可能有利于杀灭术后腹腔或盆腔内残存癌灶和游离癌细胞, 有望成为有效防治结直肠癌术后局部复发及肝转移的重要措施。

表 1 热化疗过程中患者主要临床指标变化

监测指标	0 min	30 min	60 min	90 min
T(°C)	36.92 ± 0.30	37.32 ± 0.21	37.51 ± 0.23	37.22 ± 0.20
HR(次/min)	73.05 ± 6.40	75.04 ± 5.40	77.06 ± 4.06	74.03 ± 5.06
BP(mm Hg)	130.26 ± 5.56	132.33 ± 7.21	133.20 ± 6.21	131.22 ± 5.50
	87.20 ± 5.22	89.31 ± 6.20	89.87 ± 5.30	88.22 ± 5.32
RR(次/min)	18.23 ± 1.56	18.76 ± 1.35	20.21 ± 1.02	18.52 ± 1.25
氧饱和度(%)	99.70 ± 0.30	99.80 ± 0.20	99.81 ± 0.12	99.79 ± 0.23

管路, 解除引流管与管路的连接, 引流管接上负压引流袋或引流瓶。

术中盆腔热灌注: 术中切除直肠肿瘤后, 将腹腔脏器推向上并用纱布将之与盆腔隔开, 在盆腔放置2条硅胶导管(样式同腹腔灌注), 分别经腹部和会阴部切口引出, 并与已装于灌注机上的循环管路相连, 缝合会阴部切口, 化疗液配制同术中腹腔灌注。将已加热好的化疗液以300 mL/min的流速由腹部导管注入盆腔, 待化疗液完全充盈盆腔时打开会阴部引流管, 使盆腔与管路形成循环并维持动态平衡, 盆腔内温度保持42-43℃。灌注结束后, 化疗液约200 mL留于体内, 其余放出现体外后关腹并拔除引流管。

1.2.2 术后早期热灌注 术后第1天开始行CHPPC, 灌注前用已消毒过的特制引流管清除装置清除引流管内的纤维组织、凝血块及坏死脱落组织。将体外循环管路装于灌注机上并安装好相应测温装置后, 输液袋内加生理盐水3000 mL和5-氟尿嘧啶1000-1500 mg, 启动循环泵及加热系统, 待化疗液稳定到38℃, 可将引流连接到体外循环管路, 以200-300 mL/min将灌注液注入腹腔, 待患者适应该温度后, 继续加热至45℃, 并通过控温系统使腹腔内温度稳定在42-43℃, 并维持60-90 min, 根据患者耐受情况, 腹腔内化疗液控制在1500-2000 mL。灌注过程中, 患者行心电图监护, 并有灌注医师监护, 根据患者情况随时调控灌注机, 如患者出现难以耐受的情况, 可肌注杜冷丁50-75 mg。灌注结束后的处理同术中。CHPPC每日1次, 术后共4次, 术后第5天拔除引流管。

1.2.3 观察指标 热灌注化疗过程中观察记录患者的体温、心率、血压、心电图、血氧饱和度及呼吸频率的变化。术后观察指标: (1)记录术后每日的体温, 肠蠕动恢复、肛门或造漏口排气时间及切口愈合情况。(2)观察术后有无黏连性肠梗阻、肠穿孔、吻合口漏、腹腔内出血、腹腔内感染、化学性腹膜炎。(3)术后第1、3、5天血常规、生化检查。

规、生化检查。

1.2.4 术后随访 术后每3 mo复查B超、血常规、CEA及AFP检查, 必要时进一步行腹部CT检查, 以确定患者有无腹腔内复发和/或远处转移。

2 结果

2.1 术中腹腔和盆腔热灌注化疗及术后早期热灌注化疗情况 11例术中腹腔热灌注、9例术中盆腔热灌注及44例术后早期腹腔热灌注均成功进行, 热化疗时间内患者腔内温度90%可达42-43℃的治疗温度, 出水口温度均可达41℃, 开始阶段患者可出现暂时性腹胀、腹痛的情况, 一般可耐受, 治疗过程中患者体温升高, 一般于治疗后3 h内恢复治疗前体温。热化疗灌注过程患者临床指标变化(表1)。

2.2 并发症及毒副作用 热灌注化疗后, 1例发热, 体温39-39.3℃, 经肌注氯丙嗪和物理降温后恢复正常; 结肠癌患者切口愈合延迟1例, 直肠癌患者盆腔少量出血1例; 术后2 d恢复肠蠕动, 4 d恢复肛门排气; 无明显恶心、呕吐、腹痛等不良反应, 无血常规、电解质、肝肾功能明显异常, 无切口及腹腔内感染、化学性腹膜炎、吻合口漏、黏连性肠梗阻等并发症。

2.3 随访结果 随诊率100%, 随访时间3-27 mo, 平均随访20 mo。患者术后复查, CEA, AFP等肿瘤标记物水平下降。结肠癌患者中腹腔转移2例, 直肠癌患者盆腔转移1例, 局部复发率15%; 直肠癌患者肝转移1例, 肝转移率5%; 结肠癌、直肠癌患者中各有1例分别术后14, 10 mo死于全身广泛转移, 均为D期患者。

3 讨论

尽管外科手术方法的不断改进以及放疗、化疗、生物免疫疗法和中医中药的发展, 但结直肠癌患者的预后和死亡率仍未得到明显改善, 其主要原因是术后肿瘤腹腔内复发和肝转移。Sugarbaker *et al*^[3]指出, 胃肠恶性肿瘤本身可扩散

到腹膜而无淋巴和血循环转移, 大肠癌术后复发最常见的解剖部位是手术区域、腹主动脉旁淋巴结、腹膜表面、盆底和卵巢等; 术后最常见的转移部位是肝脏。因此防止这些常见部位的复发和转移对改善结直肠癌患者的预后及生存率有极其重要的意义。

腹腔、盆腔热灌注化疗综合了局部化疗、热疗和大容量化疗液对腹腔的机械灌洗作用, 具有局部化疗药浓度高而系统吸收较少的药代动力学及防止腹腔渗出物形成术后癌细胞保护层的流体力学优势, 并充分利用化疗和热疗的协同作用, 能清除腹腔内游离癌细胞及微小癌灶, 并有利于清除门静脉内癌细胞和肝内微小癌灶^[4-5]。Kecmanovic *et al*^[6]对其所在医院1996-2003行细胞减灭术并行围手术期CHPPC的结直肠癌病例进行回顾性分析, 结果术后病死率率为44.4%, 无治疗相关性死亡, 并发现手术联合CHPPC可延长患者的生存时间。术中及术后早期进行热灌注化疗, 具有诸多优势^[7-10]:(1)切除部位和手术损伤的腹膜表面在术后最易发生癌细胞种植复发;(2)此时根治或姑息性切除肿瘤, 体内肿瘤负荷最小, 细胞分裂、增殖速度快, 对化疗敏感;(3)腹腔黏连尚未形成, 所有腹膜表面都能充分的与化疗液接触;(4)腹腔内温度及化疗液分布较均匀;(5)游离癌细胞及微小癌灶的保护层尚未形成。目前热灌注化疗由于技术原因多在术中进行1次, 疗效可能受到其治疗次数少的限制。Verwaal *et al*^[11]报道结直肠癌腹腔广泛转移经手术联合术中热灌注化疗治疗后腹腔复发率约为80%。本研究采用新型的热化疗灌注机, 解决了术后热灌注易发生管路堵塞的难题, 并通过术中灌注机械冲洗作用, 减轻腹腔内黏连, 保证术后早期热灌注时腔内化疗液及温度分布均匀, 并且不受治疗环境的限制, 在术中及术后多次进行热灌注化疗, 符合化疗药物杀灭肿瘤细胞的“一级动力学”规律, 可能会增加疗效。本组20例结直肠癌患者热灌注化疗过程中及治疗后, 无明显毒副作用及不良反应, 除1例切口愈合延迟(经处理后仍I期愈合), 1例盆腔少量出血外(给予止血药物后停止)外, 其余病例均无吻合口漏、肠穿孔、黏连性肠梗阻、腹腔内出血及感染等并发症, 表明术中及术后早期腹腔或盆腔热灌注化疗治疗结直肠癌安全可行; 腹腔转移2例, 盆腔转移1例, 腔内转移率15%, 肝转移1例, 2例分别于术后14, 10 mo死亡, 均为D期患者, 其余疗效较好。该结果与多数学者^[12-15]认为的由

于抗癌药及热疗对肿瘤的穿透力有限, 术中腹腔热灌注化疗对未能切除的腹腔实体瘤或姑息性切除后残留较广泛癌灶疗效不佳, 可用于治疗腹腔局部转移灶及术后残留米粒状微小癌灶, 根治性术后防治腹腔复发和肝转移的结论相符, 说明围手术期热灌注化疗应注意其病例的选择。

总之, 围手术期腹腔或盆腔热灌注化疗安全性好, 腔内化疗液及温度分布均匀, 并可多次进行而且不受治疗环境的限制, 无明显毒副作用及并发症, 可能有利于杀灭术后腹腔或盆腔内残存癌灶和游离癌细胞, 有望成为有效防治结直肠癌术后局部复发及肝转移的重要措施, 但其远期疗效有待观察。

4 参考文献

- 1 张亚历, 张振书, 杨希山. 大肠癌的基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999: 230-241
- 2 Fujimoto S, Shrestha RD, Kokubun M, Ohta M, Takahashi M, Kobayashi K, Kiuchi S, Okui K, Miyoshi T, Arimizu N. Intraperitoneal hyperthermic perfusion combined with surgery effective for gastric cancer patients with peritoneal seeding. *Ann Surg* 1988; 208: 36-41
- 3 Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JC, Wesley R, Barofsky I, Meyers CE. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluorouracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Surgery* 1985; 98: 414-422
- 4 魏志刚, 卿三华. 腹腔热灌注化疗治疗胃肠癌. 世界华人消化杂志 2006; 14: 134-137
- 5 Jacquet P, Averbach A, Stephens AD, Stuart OA, Chang D, Sugarbaker PH. Heated intraoperative intraperitoneal mitomycin C and early postoperative intraperitoneal 5-fluorouracil: pharmacokinetic studies. *Oncology* 1998; 55: 130-138
- 6 Kecmanovic DM, Pavlov MJ, Ceranic MS, Sepetkovski AV, Kovacevic PA, Stamenkovic AB. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer by cytoreductive surgery and hyperthermic perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 147-152
- 7 Sugarbaker PH, Graves T, DeBruijn EA, Cunliffe WJ, Mullins RE, Hull WE, Oliff L, Schlag P. Early postoperative intraperitoneal chemotherapy as an adjuvant therapy to surgery for peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer: pharmacological studies. *Cancer Res* 1990; 50: 5790-5794
- 8 Sugarbaker PH, Yu W, Yonemura Y. Gastrectomy, peritonectomy, and perioperative intraperitoneal chemotherapy: the evolution of treatment strategies for advanced gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 2003; 21: 233-248
- 9 Yu W, Whang I, Chung HY, Averbach A, Sugarbaker PH. Indications for early postoperative intraperitoneal chemotherapy of advanced gastric cancer: results of a prospective randomized trial. *World J Surg* 2001; 25: 985-990
- 10 尹春柱, 张强. 胃肠道恶性肿瘤术后早期腹腔热灌注化疗. 实用肿瘤学杂志 2004; 18: 155-157
- 11 Verwaal VJ, Boot H, Aleman BM, van Tinteren

■名词解释

腹腔或盆腔热灌注化疗是防治腹腔恶性肿瘤, 尤其胃肠癌术后腹腔复发和肝转移的一项重要措施。其综合利用局部化疗、热疗和大容量化疗液对腹腔或盆腔的机械灌洗作用, 具有药代动力学及流体力学优势, 能有效清除游离癌细胞及微小癌灶。

■同行评价

有一定临床实用价值但如能比较腹腔热化疗效果可能更有说服力。

- 12 卿三华, 周锡庚, 周正端, 齐德林, 姚明, 梁立德, 闻英. 手术联合5-氟尿嘧啶腹腔化疗治疗结直肠癌的实验和临床研究. 第一军医大学学报 1996; 16: 22-24
- 13 Fujimura T, Yonemura Y, Nakagawara H, Kitagawa H, Fushida S, Nishimura G, Miyazaki I, Shibata K. Subtotal peritonectomy with chemohyperthermic peritoneal perfusion for peritonitis carcinomatosa in
- 14 H, Zoetmulder FA. Recurrences after peritoneal carcinomatosis of colorectal origin treated by cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: location, treatment, and outcome. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 375-379
- 15 Moran BJ, Meade B, Murphy E. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a novel treatment strategy with promising results in selected patients. *Colorectal Dis* 2006; 8: 544-550
- Kavanagh M, Ouellet JF. Clinical practice guideline on peritoneal carcinomatosis treatment using surgical cytoreduction and hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy. *Bull Cancer* 2006; 93: 867-874

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编: 210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.联系电话: 025-83472831, 86086091.

消化系统神经内分泌癌及文献分析209例

蒋建霞, 施瑞华, 林琳

蒋建霞, 施瑞华, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科
江苏省南京市 210029

通讯作者: 蒋建霞, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一
附属医院消化科. jjxcasey@yahoo.com.cn

电话: 025-83718836-6255

收稿日期: 2006-10-23 接受日期: 2006-11-16

Neuroendocrine carcinoma in digestive system: case analysis and literature review

Jian-Xia Jiang, Rui-Hua Shi, Lin Lin

Jian-Xia Jiang, Rui-Hua Shi, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jian-Xia Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. jjxcasey@yahoo.com.cn

Received: 2006-10-23 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To analyze the originating sites, clinical manifestations, endoscopic and imaging features, pathologic findings, treatments and prognosis of patients suffered from neuroendocrine carcinoma (NEC) in digestive system.

METHODS: A total of 209 cases, of which 7 cases were from our hospital and the other 202 cases were reported in literatures from 1994 to 2005, were classified as group A and B, respectively. Clinical presentation, therapy and prognosis of NEC arising from digestive system were discussed.

RESULTS: NEC mainly occurred in stomach, pancreas, rectum, esophagus, small intestine, Vater ampullae of duodenum, liver and so on, and it had a wide spectrum of clinical presentations such as abdominal pain, epigastric distention, symptoms of wasting. Periampullary NEC might cause (recurrent) acute pancreatitis, and most of them were non-functioning neoplasms. Only about 2.4% of NEC cases presented an endocrine syndrome. NEC was classified as typical

carcinoid, atypical carcinoid and small cell carcinoma, and its masses varied from 0.5 to 13.0 cm in diameter, and the diagnosis of NEC depended on the features of endoscopic examination, B-ultrasound (BUS), computed tomography (CT), endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), endoscopic ultrasonography (EUS) and pathologic findings, especially immunohistochemical markers such as synaptophysin (Syn), cytokeratin (CK), neuro-specific enolase (NSE), chromogranin A (CgA), epithelial membrane antigen (EMA) and (or) neurosecretory granules (NSG) observed through electronic microscopy. Operation was the dominant strategy in the treatment of NEC, assisted by post-operative chemotherapy, radiotherapy, chemoembolization or biotherapy. The initial treatment of functioning NEC was to control the symptoms caused by excessive hormonal production. Typical carcinoid had a better prognosis than atypical carcinoid or small cell carcinoma, and the 5-year survival rate was as high as 70%. Other important prognostic factors consisted of the size of the mass, metastasis, and the type of surgical resection.

CONCLUSION: NEC in digestive system often originates from stomach, pancreas, rectum, etc. It has miscellaneous clinical manifestations and rare cases have carcinoid syndrome. The diagnosis of NEC mainly depends on pathologic findings and operation is the first-line treatment. The prognosis of NEC is also correlated with the pathologic classifications.

Key Words: Digestive system; Neuroendocrine carcinoma

Jiang JX, Shi RH, Lin L. Neuroendocrine carcinoma in digestive system: case analysis and literature review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(4):421-426

摘要

目的: 探讨消化系统神经内分泌癌(NEC)发生部位、临床表现、内镜及影像学特点、病理特征、诊断和鉴别诊断、治疗及预后。

方法: 将我院2000-2005年收治的7例NEC病

■背景资料

消化系统神经内分泌癌(NEC)较罕见,其生物学特性、恶性程度、病理学特征及预后差异很大,临床表现不典型,病理诊断标准也不统一,以致影响临床治疗及预后判断。本文对消化系统神经内分泌癌的发生部位、临床表现、内镜及影像学特点、病理学特征、诊断和鉴别诊断、治疗及预后作了相应的总结。

■相关报道

消化系统NEC起源于弥散神经内分泌系统(DNES)的周围部分, DNES细胞来源于全能干细胞, 在致癌因素作用下全能干细胞活化并转化为恶性细胞, 具有向鳞癌、腺癌和(或)NEC三相分化的潜能。

例和文献检索的202例病例分为A、B两组, 分别探讨消化系统NEC临床特点, 治疗和预后。

结果: 消化系统NEC临床表现多为无功能NEC, 以局部占位及消耗症状为主, 壶腹周围NEC可以急性胰腺炎发作为首发表现; 有功能的NEC例数约占2.4%。大小在0.5-13.0 cm, 分为典型类癌、不典型类癌和小细胞癌, 确诊需要进行突触素(Syn)、细胞角蛋白(CK)、神经特异性烯醇化酶(NSE)、嗜铬素A(CgA)、上皮膜抗原(EMA)等的免疫组化检查和(或)电镜检查发现神经内分泌颗粒(NSG)。以手术治疗为主, 辅以化疗、放疗, 必要时栓塞化疗, 也可以辅以生物治疗。对于有功能的NEC, 首先需要控制因激素分泌过多所致的相关类癌综合征。小细胞癌预后最差, 不典型类癌次之, 类癌预后较好, 5 a生存率可达70%。肿瘤的大小、转移与否、手术切除是否彻底等等亦是影响预后的重要因素。

结论: 消化系统NEC发生部位以胃、胰腺、直肠等部位多见, 临床表现多样, 少数可有类癌综合征表现, 治疗方法以手术为主, 辅以化疗及生物治疗或介入治疗, 根据病理类型判断其恶性程度和预后。

关键词: 消化系统; 神经内分泌癌

蒋建霞, 施瑞华, 林琳. 消化系神经内分泌癌及文献分析209例. 世界华人消化杂志 2007;15(4):421-426
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/421.asp>

0 引言

消化系统神经内分泌癌(NEC)较罕见, 文献报道约占消化系统恶性肿瘤0.4%-1.8%, 其生物学特性、恶性程度、病理学特征及预后差异很大, 临床表现不典型, 病理诊断标准也不统一, 以致影响临床治疗及预后判断。本文通过总结209例消化系统NEC病例, 对其发生部位、临床表现、内镜及影像学特点、病理学特征、诊断和鉴别诊断、治疗及预后作了相应的总结。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2000/2006收治的7例NEC患者发病年龄37-78 (平均48)岁, 其中男4例, 女3例。检索出符合条件的NEC患者202例(国内142例, 国外60例), 年龄19-83(平均51)岁, 其中男113例, 女89例。对中国学术期刊网(CNKI)和PUBMED进行文献检索(文献时间为1994/2005, 检索词为神经内分泌癌及消化系统脏器如食管、胃、小

肠、结肠、肝、胆、胰等等, 将发生于消化系统的NEC逐一检出并按发生部位归类), 检索出符合要求并且资料完整的消化系统NEC文献74篇并予以统计。

1.2 方法 将209例消化系统NEC分为A、B两组, A组为7例NEC患者, B组为检索出的符合要求的202例病例。分析消化系统NEC的发生部位、临床表现、内镜及影像学检查、病理特点及免疫组化、诊断和鉴别诊断、治疗及预后。

2 结果

2.1 发生部位 A、B组NEC的发生部位见表1。国内统计的文献尚未有胰腺和壶腹部NEC的报道, 但有1例脾脏NEC的报道。

2.2 临床表现 A组临床表现以上腹痛、黄疸、消瘦、发热为主, 亦有体检发现(1/7例), 病程1 d-1 a。B组病程15 d-3 a。食管NEC表现为进行性吞咽困难(15/20), 吞咽疼痛(5/20), 2例食管NEC发生脑转移后以头痛为首发表现; 胃NEC多为上腹部不适, 隐痛或胀痛, 或出现幽门梗阻症状, 1例胃NEC起源于胃的异位胰腺, 表现为消化不良及腹泻; 肝脏NEC表现为上腹胀、隐痛不适、纳差等; 胆囊NEC多表现为右上腹不适、疼痛、发热等; 胰腺NEC的主要表现为发热、黄疸、上腹部不适及疼痛、腰背部痛、消瘦等, 亦仅有通过体检发现, 1例表现为急性复发性胰腺炎3 a后确诊^[1], 1例由肺部小细胞癌转移到胰腺, 以左锁骨上淋巴结肿大及重症急性胰腺炎为首发表现^[2]; 脾脏肿瘤罕见, NEC更为少见, 缺乏特异的症状体征, 经术前普通B型超声B-US等影像检查发现, 确诊依赖于术后病理^[3]; 小肠NEC主要表现为肠梗阻症状; 十二指肠NEC主要表现为皮肤巩膜黄染, 尿黄及肠梗阻症状; 阑尾NEC多以急性阑尾炎的发作为首发表现, 术前诊断非常困难, 确诊依赖于手术后病理; 结肠NEC主要表现为血便、大便习惯改变、下腹包块; 直肠NEC除出现血便, 大便习惯改变外, 可有肛门坠胀, 直肠肿块。文献报道, 极少数患者(1.6%)的胃肠道类癌患者会出现类癌综合征症状, 且往往提示有类癌的扩散, 如肝转移, 应高度重视。本文仅2.4%的病例(5/209例)出现了类癌综合征。1例肝脏原发NEC表现为异位ACTH综合征。1例原发灶不明, 转移到肝脏的NEC表现为WDHA (watery-diarrhea-hypokalemia-achlorhydria, 水样泻、低血钾、胃酸缺乏)综合征^[4]。1例表现为胃泌素分泌过多致腹痛、腹泻。

表 1 NEC的发生部位

例数	胃	胰腺	直肠	食管	小肠	壶腹部	肝	结肠	十二指肠	阑尾	胆囊	胆总管	乳头 ^a	副乳头 ^a	脾脏	盲肠	肛管
A组	4					1			1				1				
B组	35	27 ^b	29	20	19	16	14 ^c	14	9	8	6	1		1	1	1	1
合计	35	31	29	20	19	17	14	14	10	8	6	1	1	1	1	1	1

■创新盘点

本文相当系统的总结了消化系的神经内分泌癌的临床特点、治疗及预后, 不只局限于消化系统的某个脏器神经内分泌癌。

^a十二指肠降部乳头及副乳头; ^b包括肺NEC转移到胰腺1例; ^c包括肝转移性NEC 2例, 其中原发于肺1例, 原发灶不明1例。



图 1 十二指肠球部息肉样隆起, 病理检查示高分化NEC。

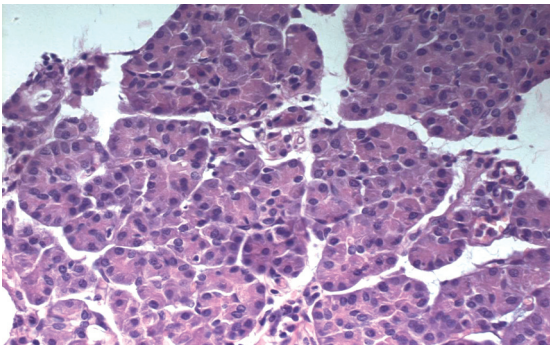


图 2 NEC类癌细胞呈腺样排列(HE × 400)。

1例因生长抑素(SS)过多分泌表现为糖尿病、脂肪泻、胆囊炎。1例表现为血管活性肠肽(VIP)分泌过多所致的WDHA综合征。

2.3 内镜及影像学检查 胃及肠道NEC内镜下可表现为糜烂型、斑块型、溃疡型、息肉型(图1)、结节型、隆起型、蕈伞型, 与腺癌及一些良性病变如息肉、腺瘤等不易区分, 内镜活检常出现假阴性诊断, 小组织活检常因取材表浅发生漏诊或误诊, 因此取材时应尽量深取; 胆囊NEC表现为胆囊壁隆起性病变, 无论B超、CT或MRI, 与胆囊腺癌及其他少见组织学类型的肿瘤鉴别均较困难, 确诊需要病理检查, 影像学检查的意义在于早期发现胆囊占位及周围浸润情况, 以便确定治疗方案; 结合文献认为原发肝脏NEC具有以下影像特征: (1)肝脏肿瘤超声表现: 肝内不均匀强回声或低回声肿块, 内常有小坏死液化区, 肿瘤血供丰富, 动脉血流为低阻力型频谱, 肿瘤广泛出血坏死时则形成巨大囊实性肿块; (2)CT表现: 肝脏内不均匀低密度肿块, 内常有小坏死液化区, 肿瘤广泛出血坏死时则形成巨大囊实性肿块, 动态增强CT扫描早期肿瘤为不均匀增强, 晚期肿瘤逐步转变为等密度及低密度; (3)MRI表现: TwI为不均匀低信号, TwII为不均匀强信号; (4)肝动脉造影: 显示肿瘤血管丰富, 肿瘤明显染色, 当肿瘤坏死、出血及囊性变时, 血管造影表现为瘤体

内无血管, 瘤周血管受压移位征象^[5]。符合以上影像特征, 患者无肝硬化病史时, 应想到该病可能性, 但仍需和其他肝脏肿瘤以及炎性肉芽肿等鉴别; 胰腺NEC, B-US可能提示为低回声占位, 伴随胰、胆管扩张, CT平扫提示低密度软组织占位征象, 增强扫描可被强化, 及发现肿大的淋巴结, 另外可通过ERCP检查及细针穿刺确诊, MRI、经内镜超声检查也是诊断胰腺、壶腹周围NEC的重要检查方法; 食管NEC脑转移MRI表现为囊性损害及周围薄层强化灶^[6]; 核素显像对于诊断NEC同样有重要价值; 国外还报道通过直肠内MRI (EMRI)和内镜超声检查术(EUS)诊断直肠NEC。

2.4 病理特点及免疫组化 巨检肿瘤大小, A组为0.5-3.5 cm, B组1.0-13.0 cm, 其中能分泌生长抑素(SS)的NEC直径多小于4 cm^[7]。1例肝脏NEC发生肝内转移及横结肠系膜转移, 大小达10 cm×8 cm×8 cm。NEC多为单发, 可呈早期糜烂型、斑块型、溃疡型、隆起型、息肉型、结节型。国外报道1例发生于胰腺体部的NEC, 直径为3.0 cm, 肿瘤内含3个独立的结节, 分别为0.4 cm, 0.9 cm和2.4 cm, 每个结节周围均有纤维样包膜, 结节由大量纤维间质分隔, 我院同样发现1例胰腺NEC表现为多发独立结节。分期可分为早期和中晚期癌。早期癌(65/209例)浸润深度不超过黏膜下层, 可有包膜, 体

■应用要点

临床医生通过对消化系统神经内分泌系统的全面了解,会更清楚的认识这一罕见疾病,减少漏诊或误诊,同时提醒临床医生,对消化系统常见的肿瘤有必要进一步研究是否存在神经内分泌分化倾向,从而指导治疗、判断预后。

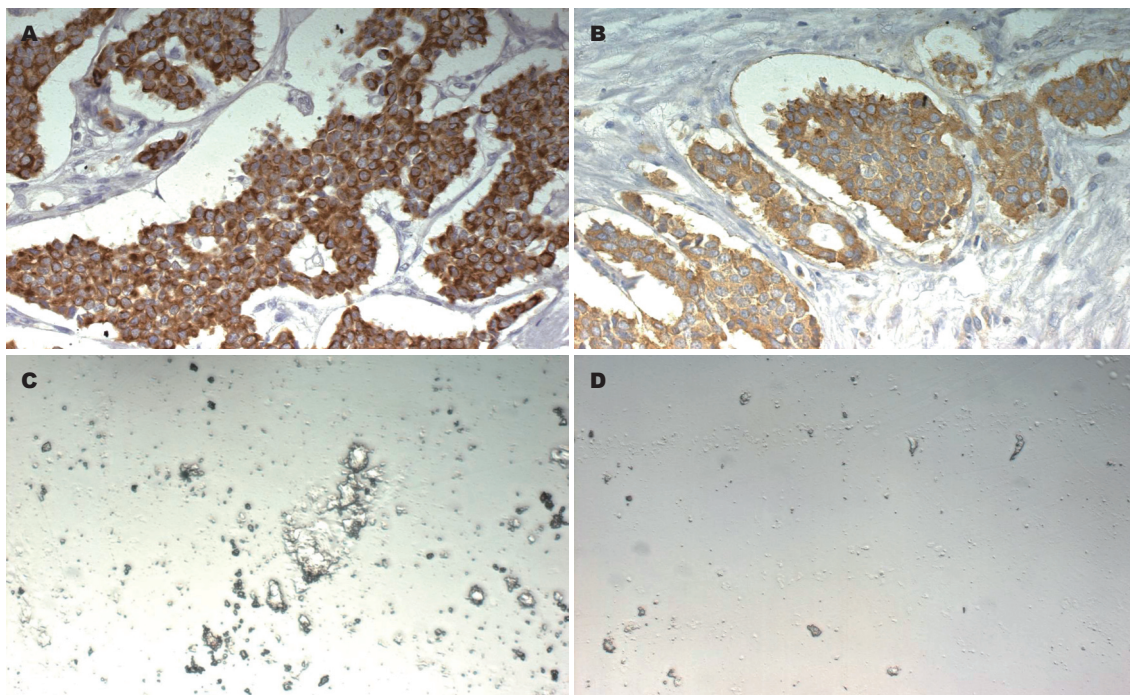


图3 免疫组化阳性细胞($\times 400$). A: CK; B: Syn; C: CgA; D: NSE.

积多小于 $2.0\text{ cm}\times 2.0\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$;中晚期癌(144/209)可浸润肌层、浆膜层甚至邻近脏器,表面多无包膜,边界不清,切面呈灰白色,质地硬,可有出血.分型则根据Ackerman外科病理学和Tahara分类标准分为3型^[8-9],即I型:典型类癌(79/209例),镜下特点为癌细胞形态较一致,中等大小,胞质较丰富,呈淡嗜伊红色或透亮,核呈圆形、卵圆形,居中,核分裂相罕见,癌组织排列较规则,形成巢状、岛屿状、梁索状或腺泡状、小管状结构,无坏死(图2).其中胃类癌多发生于胃底及胃体部,极少发生在胃窦部^[10]. II型:不典型类癌(55/209例),镜下特点为癌细胞形态不一,大小不等,呈圆形、卵圆形或短梭形,胞质中等量,核呈圆形或卵圆形,染色质颗粒粗,核分裂易见,癌细胞排列成巢或片块状、腺管状及菊形团样结构,坏死多见,此型类癌易误诊为低分化腺癌,但是与腺癌比较起来,瘤细胞总体形态较一致,常排列呈巢、条索或小梁状,具有器官样或菊形团样结构等,有助于鉴别,另外可借助于免疫组化染色,腺癌突触素(Syn),细胞角蛋白(CK),神经特异性烯醇化酶(NSE),嗜铬粒蛋白(CgA),细胞膜抗原(EMA)均呈阴性表达,不典型类癌则呈阳性; III型:小细胞癌(75/209例),镜下特点为癌细胞体积小,较一致,胞质稀少或呈裸核状,核呈圆形、卵圆形或短梭形,深染,细胞

界限不清,弥漫排列成片或呈巢团状,并可见大片坏死,有的还可见菊形团样结构,易与恶性淋巴瘤、胚胎型横纹肌肉瘤、小细胞性恶性黑色素瘤等小细胞肿瘤混淆,需根据免疫组化相关标记物确诊^[11]. NEC电镜下可见神经内分泌颗粒(NSG)及张力原纤维、桥粒等结构,其中NSG是电镜诊断NEC的依据.其中16/209例为复合型癌,即癌细胞为混合性,鳞状细胞和(或)腺细胞和NEC细胞共存,根据Tahara标准诊断为NEC并且予以分类^[9]. Syn, CK, NSE, CgA, EMA是目前公认的神内分泌标记(图3),阳性颗粒见于胞质内,2-3种标记同时阳性较有说服力.

2.5 诊断和鉴别诊断 食管、胃及肠道NEC的临床表现与普通胃肠道腺癌并无显著差异,极少数可有典型的类癌综合征,而十二指肠NEC更为罕见,确诊主要经内镜活检及EUS引导下细针穿刺活检;阑尾NEC术前诊断非常困难,绝大多数通过术后病理证实;肝脏NEC常位于肝右叶,多为1-2个结节,少数为多个结节,病程长,进展慢,宜经B-US或CT引导下穿刺活检以诊断;胆囊、胰腺NEC早期临床表现及影像学检查与常见胆囊病变及胰腺癌不易鉴别,但发生于壶腹部或壶腹周围的NEC会出现胰胆管梗阻表现甚至急性胰腺炎,ERCP和EUS对诊断壶腹及其周围NEC更有价值;转移到肝脏、

胰腺等的NEC可能会出现肝脏组织的坏死、(重症)急性胰腺炎,通过影像学检查B-US, CT, MRI, 支气管镜等寻找原发灶. NEC的诊断除了综合临床表现、内镜及影像学检查结果外,确诊依赖内镜下组织活检,或经B-US, CT, EUS引导下的细针穿刺及手术标本的病理检查,而且病理诊断时应综合光镜、组织化学及免疫组化染色甚至电镜技术结果. Ryschich *et al*^[12]报道转铁蛋白受体是诊断胰腺NEC和胰腺癌的有价值的指标之一,有待进一步研究证实. 总结本研究病例,胃肠道NEC转移,多见于肝脏,另外可转移至腹膜、淋巴结、骨骼等.

2.6 治疗及预后 手术仍为治疗的首选方法,部分病例经手术可以治愈,如1例发生于胃内异位胰腺的NEC 85岁男性患者,因一般情况较差,仅进行了病灶的楔形切除,患者恢复良好^[13]. 另外术后辅以化疗及放疗,可提高生存率,1例63岁男性患者,食管小细胞癌累及贲门及纵隔淋巴结,经CDDP(顺铂)和VP-16(依托泊苷)化疗6个疗程后长期生存^[14]. 肝动脉栓塞化疗术对部分不能手术肝NEC病例有一定疗效. 对于肝脏转移性NEC,可在手术切除原发灶、化疗、生物治疗(生长抑素类似物奥曲肽、干扰素治疗)基础上,进行肝内转移病灶的手术治疗及肝脏移植^[15-16]. 需要强调的是,尽管发生类癌综合征致类癌危象的病例非常罕见,预防发生类癌危象及对类癌危象及时而正确的治疗尤为重要. 小细胞癌属于高度恶性,早期即呈弥漫性浸润性生长,难以发现,淋巴结转移早,预后差,不典型类癌预后亦较差,只有类癌预后较好,5 a生存率可达70%,不典型类癌次之,但仍优于低分化腺癌,小细胞癌预后最差. 影响患者预后的因素还包括(1)肿瘤的直径大小,若大于2 cm,转移率高,预后也较差;(2)肿瘤局部侵袭和转移情况,是否存在肝转移对预后亦有重要影响;(3)对原发和转移灶行根治性清除者预后较好;(4)有类癌综合征表现者一般预后较差. 本研究3种类型1 a生存率分别为73.1%, 63.4%和61.7%. 对于消化系统NEC要争取早发现,早治疗,选择手术、放疗、化疗等综合治疗措施,以提高生存率.

3 讨论

消化系统NEC起源于胺前体摄取和脱羧(APUD)细胞,APUD细胞系统是指能摄取胺和胺前体并在细胞内脱羧产生胺和(或)肽类激素

的内分泌细胞总称. 近年来随着APUD细胞类型和分布的不断扩展,发现神经系统内的许多神经元也具有与APUD细胞相同内分泌功能,称分泌性神经元(secretory neuron),因此提出了弥散神经内分泌系统(diffuse neuroendocrine system, DNES)这一概念, DNES把神经系统和内分泌系统统一起来构成一个整体,共同调节机体生理活动的平衡. DNES分中枢和周围两大部分,中枢部分包括下丘脑-垂体轴的细胞和松果体细胞;周围部分包括分布在消化系统胃、胰、肝脏、胆、阑尾、结、直肠及呼吸、泌尿生殖道等的内分泌细胞.

近年来,多数学者认为DNES细胞来源于全能干细胞,在致癌因素作用下全能干细胞活化并转化为恶性细胞,他既可转变为鳞癌,也可转变为腺癌^[17],在少数情况下,他保持其小细胞形态,因此具有向鳞癌、腺癌和(或)NEC三相分化的潜能. 消化系统NEC发生率据文献报道及文献复习,远低于其他类型的恶性肿瘤. 但Waldum *et al*^[18]通过前瞻性研究胃癌组织的组织化学、免疫组化、电镜表现证实约10%为NEC,远比报道的高. Tezel *et al*^[19]通过对44例胰腺癌患者标本分析,发现有20例具有NED特点,由于胰腺NEC较一般的胰腺腺癌预后要好,所以对胰腺癌病理标本要深入分析有无神经内分泌分化倾向及能否确诊NEC,以指导治疗和判断预后. Yang *et al*^[20]成功建立了转基因斑马鱼发生胰腺NEC的模型,将对研究NEC的发生、发展、治疗及预后具有重要价值. 对其他消化系统恶性肿瘤标本有必要深入探讨有无NEC分化倾向,为指导治疗和判断预后,目前此方面的工作开展尚不足.

4 参考文献

- 1 Jukemura J, Montagnini AL, Perini MV, de Almeida JL, Rodrigues JJ, da Cunha JE. Acute pancreatitis associated with neuroendocrine tumor of the pancreas. *JOP* 2006; 7: 56-61
- 2 Papagiannis A, Zarogoulidis K, Delis D, Patakas D. A 52-year-old man with a lung mass and acute abdominal pain. *Chest* 2000; 117: 894-896
- 3 张艺军, 李亚南, 陈晓清, 余中逊, 张晓峰, 毕向军, 肖丽萍. 脾脏原发类癌1例, 世界华人消化杂志 2005; 13: 2634-2635
- 4 Rammer M, Kirchgatterer A, Hobling W, Stockhammer M, Knoflach P. W.D.H.A. Syndrome due to occult neuroendocrine malignancy with concomitant liver metastases. *Z Gastroenterol* 2003; 41: 185-189
- 5 朱世华, 张云山, 贺声, 张晶. 原发性肝、胆囊神经内分泌瘤的影像学表现. 中华放射学杂志 2003; 37:

■名词解释

神经内分泌瘤: 源于神经嵴的弥散分布在全身各器官的神经内分泌细胞具有摄取胺的前身物质经脱羧而形成多肽激素的功能,称为APUD细胞. APUD细胞与分泌性神经元(secretory neuron)合称为弥散神经内分泌系统(DNES),发生于DNES肿瘤称为神经内分泌肿瘤,恶性的即称为神经内分泌癌. 此类肿瘤常同时分泌多种激素或激素样物质,如甲状腺的髓样癌除分泌降钙素外,还可分泌生长抑素、前列腺素、5-羟色胺等,从而引起多种复杂的症状,甚至引起内分泌障碍.

■同行评价

本文通过7例病例报告合并文献检索,探讨了消化系统神经内分泌癌发生部位、临床表现、内镜及影像学特点、病理特征、诊断和鉴别诊断、治疗及预后,内容很好,有临床指导价值。

- 1143-1147
- 6 Takeshima H, Kuratsu J, Nishi T, Soyama N, Miura M, Masumitsu T, Ushio Y. Metastatic brain tumours from oesophageal carcinoma: neuro-imaging and clinicopathological characteristics in Japanese patients. *Acta Neurochir (Wien)* 2001; 143: 31-35, discussion 35-36
- 7 Delcore R, Friesen SR. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. *J Am Coll Surg* 1994; 178: 187-211
- 8 Juan Rosai, 阿克曼外科病理学. 第8版. 辽宁: 教育出版社, 1999: 637-645
- 9 Tahara E, Haizuka S, Kodama T, Yamada A. The relationship of gastrointestinal endocrine cells to gastric epithelial changes with special reference to gastric cancer. *Acta Pathol Jpn* 1975; 25: 161-177
- 10 王苑本, 郑伟. 胃类癌. 世界华人消化杂志 2002; 10: 995-998
- 11 赵尔增, 张建中, 张铭, 景青萍, 郑燕华. 食管小细胞癌的临床病理及免疫组织化学研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1183-1185
- 12 Ryschich E, Huszty G, Knaebel HP, Hartel M, Buchler MW, Schmidt J. Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1418-1422
- 13 Chetty R, Weinreb I. Gastric neuroendocrine carcinoma arising from heterotopic pancreatic tissue. *J Clin Pathol* 2004; 57: 314-317
- 14 Ohmura Y, Takiyama W, Mandai K, Doi T, Nishikawa Y. Small cell carcinoma of the esophagus: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 95-100
- 15 Norton JA, Warren RS, Kelly MG, Zuraek MB, Jensen RT. Aggressive surgery for metastatic liver neuroendocrine tumors. *Surgery* 2003; 134: 1057-63; discussion 1063-1065
- 16 Hengst K, Nashan B, Avenhaus W, Ullerich H, Schlitt HJ, Flemming P, Pichlmayr R, Domschke W. Metastatic pancreatic VIPoma: deteriorating clinical course and successful treatment by liver transplantation. *Z Gastroenterol* 1998; 36: 239-245
- 17 李维华. 神经内分泌肿瘤的类型及其病理诊断问题. 诊断病理学杂志 1998; 5: 5-8
- 18 Waldum HL, Aase S, Kvetnoi I, Brenna E, Sandvik AK, Syversen U, Johnsen G, Vatten L, Polak JM. Neuroendocrine differentiation in human gastric carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 435-444
- 19 Tezel E, Nagasaka T, Nomoto S, Sugimoto H, Nakao A. Neuroendocrine-like differentiation in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 2230-2236
- 20 Yang HW, Kutok JL, Lee NH, Piao HY, Fletcher CD, Kanki JP, Look AT. Targeted expression of human MYCN selectively causes pancreatic neuroendocrine tumors in transgenic zebrafish. *Cancer Res* 2004; 64: 7256-7262

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评议

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评议,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.