

当前直肠癌治疗的策略

郁宝铭

郁宝铭, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海市 200025

郁宝铭, 1956年毕业于上海第二医学院医疗系, 教授, 主要从事普外科兼肛肠外科研究。

通讯作者: 郁宝铭, 200025, 上海市漕宝路8号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科. baomingiok@163.com

电话: 021-64514139 传真: 021-64514139

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-07-21

Current strategies in treatment of rectal cancer

Bao-Ming Yu

Bao-Ming Yu, Department of Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Bao-Ming Yu, Department of Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, 8 Caobao Road, Shanghai 200025, China. baomingiok@163.com

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-07-21

Abstract

Surgical treatment is still the first choice of management for patients with rectal cancer, but the results were unsatisfied. The difficulties in treatment of rectal cancer are high local recurrence, poor postoperative life quality and low long term survival. First of all, reduction of local recurrence should be our goal and introduction of total mesorectal excision (TME) has significantly improved the outcomes following the curative resection hence the local recurrence rate has reduced to less than 10% and 5-year survival rate has been achieved to 78%. Meanwhile, the sphincter preservation resection has been increased to 70% and become the first choice of procedures in rectal cancer surgery. On the other hand, postoperative genitourinary function has also been improved significantly, so the postoperative quality of life in patients with rectal cancer is now much better than before. Application of neoadjuvant chemoradiation has further improved the surgical and oncological results in patients with locally advanced low rectal cancer (T₃ and T₄ stage) when combined with TME technique. Advances of systemic therapy with new chemotherapeutic agents have been proved

to further improve disease-free survival and overall survival in patients with stage III colorectal cancer. In general, treatment for patients with rectal cancer has entered into a multidisciplinary treatment era, and the outcomes of the patients with rectal cancer may be further improved effectively upon a new basis.

Key Words: Rectal cancer; Total mesorectal excision; Chemotherapy; Radiotherapy; Chemotherapeutic agent; Local recurrence; Outcome

Yu BM. Current strategies in treatment of rectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(22): 2371-2376

摘要

外科手术仍是直肠癌患者治疗的首选方式, 但疗效不能令人满意。直肠癌患者治疗面临3大难题, 局部复发率高, 术后生活质量差和长期生存率低。我们的目标是降低局部复发率。全直肠系膜切除(TME)的采用使根治性切除术后疗效有了明显的提高, 局部复发率降至10%以下, 5 a生存率达到78%。同时保肛手术增至70%, 成为直肠癌术中首选术式。另一方面术后生殖排尿功能也有了显著改善。故现在直肠癌患者术后的生活质量比过去已有了很大的提高。新辅助化疗的应用在与TME技术结合的同时更进一步提高了局部进展期低位直肠癌(T₃和T₄病变)的手术和肿瘤学效果。全身治疗特别是新化疗药物的发展已证实可进一步提高。期结直肠癌患者的无瘤生存和总生存率。总之, 直肠癌患者的治疗进入了多学科治疗的年代, 可望在新的基础上进一步有效的提高疗效。

关键词: 直肠癌; 全直肠系膜切除; 化学治疗; 放射治疗; 化学药物; 局部复发; 疗效

郁宝铭. 当前直肠癌治疗的策略. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2371-2376

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2371.asp>

0 引言

直肠癌在我国发病率不断上升, 对人民健康的

背景资料

长期以来直肠癌治疗面临的困惑是如何在保证手术根治的基础上降低局部复发率, 提高5 a生存率和改善术后生活质量。自1990年代起全直肠系膜切除操作原则的执行使手术后局部复发率有了明显降低, 随之5 a生存率相应提高, 保肛手术比例显著上升, 自主神经保留后生殖排尿功能明显好转, 生活质量明显提高。

创新盘点
本文对当前直肠癌的治疗策略进行了深入浅出的论述,从4个方面叙述了现阶段为了达到改变5 a生存率,降低局部复发率以及提高生活质量3个目标所采取的措施,有较好的参考价值。

危害和生命的威胁也日益加重。无疑,早期发现、早期诊断和早期治疗乃是保证和提高疗效的根本。如能进一步做到预防在前,降低发病率,将疾病消灭于萌芽之中当然更好。遗憾的是目前既缺乏有效的预防措施,又无法做到早期发现和早期诊断,因而临床上约有3/4病例就诊时已属中后期,治疗效果欠佳是意料之中,可以理解的。显然从加强卫生宣教,预防为主来降低发病率,同时提高早期发现率,早期诊断率和早期治疗,应是最有效的,也是最根本的办法。但如何在现有条件下来改变以往5 a生存率低,局部复发率高和生活质量差的3大难题,这是摆在我们面前必须解决的问题。本文从4个方面来叙述当前对达到上述3项目标所采取的措施、认识 and 效果。

1 预防复发和转移是外科治疗的永恒目标

至今外科手术切除肿瘤依然是首选的治疗手段。而复发和转移的出现乃是手术失败2大主要原因。自1908年Miles提出腹会阴切除术治疗直肠癌,并作为直肠癌的金标准术式以来,外科医师为降低术后复发不断探索扩大手术切除的范围,以求更好的疗效。然而一直至80年代,局部复发率高达30%-50%^[1-5],几代人的努力并未收效。从对上述复发病例的进一步分析中表明病期对局部复发起着重要的决定性作用。在Gunderson *et al* 的资料中,II期直肠癌有20%-30%的复发机会,而III期直肠癌的复发危险性高达50%以上^[1]。美国胃肠道肿瘤协作组(GISTSG) 7175研究中II/III期直肠癌的局部复发率为24.1%^[2-3],美国国家乳腺和肠道外科辅助治疗项目(NSABP) R-01研究的结果相仿,局部复发率为25%^[4]。瑞典直肠癌试验(SRCT)报道的结果显示Dukes B和C期手术后的复发率分别为21%和36%^[5]。这些资料均表明病期在决定预后中是不容忽视的因素。那么难道外科手术就无法改变这一局面了吗? Heald *et al*提出全直肠系膜切除(TME)乃直肠根治性切除的操作原则,遵循这一操作要求直肠癌根治性切除后的局部复发率可明显的下降^[6]。起初人们对他提出的观点并未予以重视,直至他的第1篇治疗结果的资料发表后^[7],迅速引起了外科界的关注。随后的研究也确实证明了TME在降低局部复发率上的作用。而且在与传统手术操作进行的对比中清晰地显示出TME对降低局部复发率的确切疗效^[8-11]。在局部复发率降低的同时,5 a生存率也明显地提高了。在TME操作

原则的指导下,术后局部复发率已降至10%以下,5 a生存率则达到78%左右^[12-15]。TME操作原则的提出对直肠癌外科手术的疗效提高是一个突破,成为一个新的里程碑。因而当前TME操作原则已被国际上公认为直肠癌根治性切除术的金标准操作规范。

在贯彻TME操作原则后,疗效提高不但反映在局部复发率的降低和5 a生存率的提高,更表现在患者术后生活质量的改善。具体说,保肛手术的比率增加了,排尿生殖功能障碍的发生率减少了。原因是按照全直肠系膜的操作要求,直肠游离更充分,将直肠系膜全部切除后,肿瘤远端肠段切除1-2 cm即可^[16-18],只要肛提肌和肛管无肿瘤浸润的情况下都可施行保肛手术^[19]。同时由于直肠游离在骶前间隙中进行,可以更清晰地看到腹下交感神经主干及其分支和盆腔内的副交感神经丛从而予保护免受损伤^[20,43]。事实上直肠癌根治手术后患者的生活质量问题自80年代起即逐渐引起重视。术后保持正常的排便控制功能和排尿生殖功能已日趋被视为与长期生存率同样重要的治疗目标。当前保肛手术亦已成为直肠癌的首选术式^[19],腹会阴切除术则成为最后一种术式选择^[20]。而所有上述这一切都是在TME的原则指导下所取得的。无疑,直肠癌外科治疗效果在质和量2方面都取得了突破性的进展。然而我们还必须看到还有10%的局部复发和<80%的5 a生存率。还有没有可能在已取得成绩的基础上再进一步提高? 这就是摆在我们面前需要解决的新任务。在进一步分析TME操作下局部复发病例的原因中,我们再次看到Dukes B期复发率为2.33%, Dukes C期为12.5%, Dukes D期为53.85%。病期显然仍是决定复发的重要因素^[22]。但病期并不是外科医师或患者自己所能决定。因此如能改变病期,那么就可能实现进一步提高的目标。

2 提高术后生活质量是不容忽视的坚定追求

长期以来,人们有一种错觉,认为手术切除范围越大越彻底,越符合根治要求。因此几十年来将腹会阴切除术视为直肠癌的金标准术式,腹部永久性结肠造口是直肠癌患者必须接受的一个结局和为争取长期生存所必须付出的代价,甚至争取作扩大淋巴清扫范围的手术来达到手术的彻底性。当然患者为此付出的代价就不只是结肠造口的问题,而是排尿生殖功能的长期障碍。在这些学者的心目中为达到手术的彻底,器

官功能是次要的. 遗憾的是至今扩大的淋巴结清扫术还不能提供循证医学上令人满意的良好疗效证明, 反之, 长期指导腹会阴切除术的Miles关于直肠癌淋巴转移3个方向的理论被证明是错误的. 直肠逆行扩散的研究又否定了直肠远切端必须5 cm的原则^[23-26], 再加上从解剖学上证明正常直肠躺在弧形骶窝上, 一旦充分分离后尚有3-5 cm的自然延伸, 这样就从理论上完全动摇了直肠癌唯腹会阴切除术为选的基础, 也为施行保肛手术提供了可能性和合理性. 大量临床资料反复证明直肠癌时选作保肛(保留括约功能)手术的疗效丝毫不比腹会阴切除术差^[27]. 术后生活质量的提高则是显而易见的. 随着TME手术操作原则的出现和实行, 不但局部复发率出现了令人惊喜的下降, 保肛手术的成功率显著提高. 同时通过对直肠系膜解剖的了解和熟悉, 为识别和保留自主神经提供了解剖学基础, 从而为进一步保全排尿生殖功能和改善术后总的生活质量提供了保证^[21]. 与此同时, 手术器械的不断改进, 双吻合器的应用和Cantor弧形闭合器的问世, 使低位和超低位前切除术成功率更高, 更安全. 为了进一步改善低位和超低位前切除术后的控便功能, 手术改进上出现了结肠袋肛管吻合术和结肠成形结肠肛管吻合术. 这些手术已被证实术后可更迅速地使低位前切除与超低位前切除术后患者的排便功能恢复正常^[28-33]. 经过近一个世纪几代人的努力, 直肠癌的外科治疗从理论上到手术操作到术式选用, 最后手术疗效都有了突破. 保肛手术已成为直肠癌的首选术式. 目前保肛手术的比例已达50%-70%, 在专科医院中可能更高. 术后排尿生殖功能约有70%左右恢复正常. 在术后生活质量提高的同时, 术后局部复发率已下降至10%左右, 5 a生存率提高到了70%以上. 这表明生活质量的提高并没有牺牲或妨碍患者生存率的提高. 这充分反映了“功能”与“根治”这二者的紧密结合, 丝毫不相矛盾. 也许正是这种重视“功能”, 让人更注意操作的“根治”. 也正是由于要追求“功能”的效果, 在手术操作上提出了更高的要求 and 一致的意见: (1) 不论保肛手术或腹会阴切除术, 都必须遵循TME手术操作原则来进行; (2) 手术不但要求直肠系膜筋膜的完整健全, 远切端必须阴性. 一般肿瘤远端肠段切除2 cm已足够^[16], 同时还必须环切缘阴性, 即组织学上肿瘤距直肠系膜筋膜 ≥ 2 cm; (3) 肠系膜下动脉在左结肠动脉起始部平面结扎切断即可, 无需常规

在肠系膜下动脉起始部进行结扎离断^[34].

3 新辅助放化疗促进肿瘤降期是进一步提高疗效的有效措施

鉴于病期是影响患者预后最主要的因素. 可是病期既不是患者自己主观能决定, 更不是医生所能左右的. 这样一种无能为力的状况, 一旦确诊, 唯有争取尽早尽快进行手术, 这已成为一个共识. 至于手术发现病变已晚, 手术已达不到根治要求, 为控制肿瘤的发展, 延长患者的生存期, 术后可以进行放射治疗作为一种辅助治疗, 也许这是唯一的选择. 这也体现了长时期来放射治疗在直肠癌治疗中的地位. 之后发现放疗作为一种辅助手段能用于根治性切除的病例中, 直肠癌的复发率可明显降低. 但放射治疗会带来一系列不良反应, 因此在剂量和病例选择上需严格掌握, 不能盲目扩大应用范围. 放疗可以降低术后局部复发的发生, 这个结论已被确认, 而且不论术后放疗或术前放疗对降低局部复发的作用都是相同的. 随后发现放化疗联合应用效果尤为明显^[30-34]. 因而90年代起, 对Dukes B和C期的进展期直肠癌, 术后加作辅助治疗被视作标准治疗方案^[35]. 以后发现术前放化疗比术后放化疗更具有几大优点, 特别对低位直肠癌和低位局部进展期T₄直肠癌可使原来不能切除的肿瘤由于肿瘤降期得以切除; 可以使低位病变切除后得以保留括约功能, 肿瘤缩小, 手术野中已播散肿瘤细胞被杀灭, 术中发生种植再播散机会减少; 吻合口不在照射野中, 小肠在腹腔中活动度更大, 也不易受到放射的伤害, 故比术后放疗引起的并发症相对较轻、较少^[36]. 最近德国的一项随机对照研究比较了术前放化疗与术后放化疗的优缺点. 结果表明对局部复发率的降低, 括约功能的保留, 吻合口狭窄的发生率和放射引起的3/4级毒副反应均以术前放化疗优于术后放化疗^[37]. 因而术前放化疗已被包括欧洲和美国接受作为局部进展期低位直肠癌的标准治疗方案^[16,38-39]. 这种术前放化疗由于术前短期放疗迅速手术的方案, 达不到增加保肛手术和提高切除率的疗效, 术后副反应引起的并发症反而增加, 故目前推荐的是中等放射剂量(45-50 Gy)/5 wk+5 FU/LV, 然后休息6-8 wk再行手术.

为什么术前放化疗受到青睐被推荐? 从当前发表的一些资料中我们可以找到答案. Memorial Sloan-kettering癌症中心对T₃期直肠癌给予5-FU/LV+放疗, 之后按TME进行手术, 术后再

应用要点
采用术前放化疗治疗进展期结肠癌, 提高了其根治性切除率和保肛手术成功率. 而且随着90年代以来全身化疗的迅速发展, 辅助化疗地位的确立也为进一步提高中晚期患者的长期生存提供了可能. 本文综合上述进展, 为直肠癌特别是低位直肠癌疗效的进一步提高提供了理论指导.

同行评价
本文从4个方面谈目前直肠癌治疗策略,论述深入,文献使用得体,依据推理充分,对指导临床治疗有意义,是一篇较好的指导性文献。

给予5-FU/LV. 结果显示病理完全消退(pCR)达13%, 并达到极高保肛手术率. 在判断需作APR的病例中89%完成了低位前切除(LAR). 局部复发率仅2%, 3 a生存率95%^[40]. 通过肿瘤缩小完成保肛; 肿瘤降期则是治疗后的重要参数. 此后采用手术前放化疗取得保肛手术的比率高达70%以上, 而且75%以上病例功能良好^[41-44]. 如此高的保肛成功率关键得益于肿瘤降期, 肿瘤缩小, 特别是至少有13%-20%的病理肿瘤完全消退^[16]. 而最近另一些报道的pCR可能还要高. 包括作者最近一组采用以卡培他滨与放疗相结合的60例T₃/T₄期局部进展期低位直肠癌pCR 28%, 保肛成功率高达96.67%^[45]. 究竟肿瘤降期和病理肿瘤完全消退意味着什么呢? 这是从根本上改变病期和治疗效果的有力措施. 这一结论不是推测, 而是有事实依据的. 最近Habr-Gama *et al*报道的一组资料是迄今为止病例数最多, 随访观察时间最长, 也是说服力最大的. 在260例低位直肠癌手术前放化疗的结果中显示临床肿瘤完全消退(c0期)22%未手术, 临床未完全消退的病例中又有9%病理肿瘤完全消退(p0期), 总共肿瘤完全消退(0期)93例占37%. c0期无盆腔复发, 总复发7%, 无癌肿相关死亡, 5和10 a癌肿相关总生存率均为100%. 0期总共有6例发生全身性转移(6.4%), 2例死于疾病进展(2.2%), 直肠内复发2例, 经局部切除或腔内放疗获救. 10 a总生存率97%. 全组随访期间盆腔复发15例(5.7%), 全身性转移34例(13%)^[46].

新辅助放化疗的出现对传统理念是一个极大的挑战. 患了直肠癌不立即手术, 先进行放化疗, 行吗? 万一病情进展了, 不能手术或不能根治性切除怎么办? 虽术前放化疗的肿瘤降期率并非100%, 但至少至今尚无报道这种病情变化不能切除的情况. 从作者的经验来看, 亦未见有病情进展恶化而不能切除的病例. 无疑应用新辅助放化疗很重要的一点就是病例的选择. 按目前国际上的共识, T₃和T₄期不论N₀或N₁都是适于术前放化疗的病例. 为了保证病例选择的适当, 特别强调术前必须通过腔内B超和MRI成像对病期进行评估^[47-51], 以确保不致“过度治疗”的发生, 因为T₁或T₂期病变是无需先行放化疗的. 但由于新辅助放化疗产生的肿瘤降期效应是那么令人向往, 他不但宣告了对原先认为病期偏晚的病变可转变为中期甚至早期病变, 还使很大一部分原先认为需行腹会阴切除术的病例最终可安全的施行保肛手术, 极大地改善了

患者术后的生活质量. 最近有学者特别对T₂期术前判断必须作腹会阴切除术的患者给与术前放化疗. 结果竟有78%的病例最终完成了保肛手术, 15%完全缓解(pCR). 保肛手术的5 a无病生存(DFS) 77%, 总生存率(OS) 85%, 局部复发率10%, 5 a统计局部复发率13%^[52]. 虽然这是1个例数不多的小资料, 其结果还是诱人的. 同时给我们传递了1个信息即当前国际上对患者生活质量的重视. 至于今后是否又会成为新辅助放化疗的1个特殊适应证, 尚有待更多资料来证实.

4 加强术后辅助化疗可减少远处转移的发生, 从而提高长期生存

放疗可以降低局部复发率, 但对预防远处转移却无能为力. 因此预防远处转移的任务就落到了化疗的身上. 术后辅助化疗被证明能提高III期结直肠癌的5 a生存率, 就得益于化疗对微转移灶的有力杀灭作用. 5FU-LV方案是第1个被国际公认为结直肠癌根治性手术后的标准辅助化疗方案. 按照美国每月连续应用5 d为1疗程, 术后应用6 mo亦即6个疗程; 如按欧洲每2周应用2 d为1周期, 2个周期为1疗程则应用12周期; 按德国每周1次, 连用6 wk休息2 wk为1疗程, 共用3疗程, 总共术后辅助化疗时间都是6 mo. 最近MOSAIC研究证明FOLFOX方案即奥沙利铂(OXA)+5-FU/LV每3周1次的疗效明显优于单用5-FU/LV. 前者对II/III期结直肠癌的无病5 a生存可达78%, 高于后者的73%^[47]. 因而被美国FDA批准作为III期结直肠癌新的辅助化疗标准方案取代5-FU/LV. 接着X-ACT研究又证明单药卡培他滨的疗效至少与5-FU/LV相同, 可能更好, 使用更方便, 毒副反应更轻, 故于2005年相继被欧洲药监总局和美国FDA批准, 作为单药治疗方案用于III期结直肠癌, 取代5-FU/LV. 这样, 可供选用的辅助化疗方案已有3个. 对病理证实淋巴结有癌细胞侵犯的III期病例, 无疑首选应用FOLFOX方案为佳. 对术前未进行放化疗治疗的病例, 术后应给予6个疗程, 对术前已经给予化放疗的病例术后应给予4个疗程^[48]. 因为术前已应用了8-10 wk的化疗, 相当于2个疗程. 对于II期病变术后辅助化疗的效果没有III期那么明显, 故目前尚不主张对II期结直肠癌常规给予辅助化疗, 仅对高危病例应用辅助化疗, 包括伴梗阻、穿孔、高恶性低分化癌肿、T₄期癌肿、淋巴管或血管有癌栓以及神经周围有浸润的病例. 至于术前已给予放化疗, 术后病理提示局部

尚有癌肿而淋巴结阴性的病例考虑术前极有可能淋巴结是阳性的, 故术后仍宜给予辅助化疗。但此时考虑淋巴结已转阴性, 故可给卡培他滨 *po* 4个疗程, 就无需再用FOLFOX。因为无淋巴结转移的II期病例在MOSAIC研究中FOLFOX与LV5-FU2 2组疗效无明显差别, 因此用卡培他滨取代5-FU/LV同时又避免奥沙利铂的毒副反应, 这是最合理的给药方案。

总之, 直肠癌的治疗已步入了综合治疗的年代, 尽管外科手术依然是主要手段, 但合理地在手术前后辅以化疗与放疗, 将是取得长期生存和良好生活质量双重目标的主要支柱。随着新药开发, 生物治疗、基因治疗的介入, 直肠癌的疗效有望在新的基础上不断提高。

5 参考文献

- Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, Wolmark N, O'Connell MJ, Begovic M, Allmer C, Colangelo L, Smalley SR, Haller DG, Martenson JA, Mayer RJ, Rich TA, Ajani JA, MacDonald JS, Willett CG, Goldberg RM. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1785-1796
- Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. Gastrointestinal Tumor Study Group. *N Engl J Med* 1985; 312: 1465-1472
- Douglass HO Jr, Moertel CG, Mayer RJ, Thomas PR, Lindblad AS, Mittelman A, Stablein DM, Bruckner HW. Survival after postoperative combination treatment of rectal cancer. *N Engl J Med* 1986; 315: 1294-1295
- Fisher B, Wolmark N, Rockette H, Redmond C, Deutsch M, Wickerham DL, Fisher ER, Caplan R, Jones J, Lerner H. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 21-29
- Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. *N Engl J Med* 1997; 336: 980-987
- Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery-the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69: 613-616
- Heald RJ, Karanjia ND. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg* 1992; 16: 848-857
- Arbman G, Nilsson E, Hallbook O, Sjobahl R. Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83: 375-379
- Bokey EL, Ojerskog B, Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Sinclair G. Local recurrence after curative excision of the rectum for cancer without adjuvant therapy: role of total anatomical dissection. *Br J Surg* 1999; 86: 1164-1170
- Martling AL, Holm T, Rutqvist LE, Moran BJ, Heald RJ, Cedemark B. Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the County of Stockholm. Stockholm Colorectal Cancer Study Group, Basingstoke Bowel Cancer Research Project. *Lancet* 2000; 356: 93-96
- Kapiteijn E, Putter H, van de Velde CJ. Impact of the introduction and training of total mesorectal excision on recurrence and survival in rectal cancer in The Netherlands. *Br J Surg* 2002; 89: 1142-1149
- Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, Sexton R, MacFarlane JK. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch Surg* 1998; 133: 894-899
- Yu Baoming, Li Donghua, Zheng Minghua. Role of total mesorectal excision in curative resection of rectal cancer. *Chinese-German J Clin Oncol* 2002; 1: 126-128
- Wibe A, Moller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig JN, Heald RJ, Langmark F, Myrvold HE, Soreide O. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer--implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 857-866
- Wibe A, Eriksen MT, Syse A, Myrvold HE, Soreide O. Total mesorectal excision for rectal cancer--what can be achieved by a national audit? *Colorectal Dis* 2003; 5: 471-477
- Ross HM, Mahmoud N, Fry RD. The current management of rectal cancer. *Curr Probl Surg* 2005; 42: 72-131
- Reynolds JV, Joyce WP, Dolan J, Sheahan K, Hyland JM. Pathological evidence in support of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83: 1112-1115
- Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Distal spread of rectal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery. *Cancer* 1995; 76: 388-392
- Di Betta E, D'Hoore A, Filez L, Penninckx F. Sphincter saving rectum resection is the standard procedure for low rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 463-469
- Enker WE, Havenga K, Polyak T, Thaler H, Cranor M. Abdominoperineal resection via total mesorectal excision and autonomic nerve preservation for low rectal cancer. *World J Surg* 1997; 21: 715-720
- Havenga K, Maas CP, DeRuiter MC, Welvaart K, Trimbos JB. Avoiding long-term disturbance to bladder and sexual function in pelvic surgery, particularly with rectal cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 235-243
- 郁宝铭, 李东华, 郑民华, 沈耀祥, 王灏. 直肠系膜全切除在双吻合器低位前切除术中的意义. *中华外科杂志* 2000; 38: 496-498
- Williams NS, Dixon MF, Johnston D. Reappraisal of the 5 centimetre rule of distal excision for carcinoma of the rectum: a study of distal intramural spread and of patients' survival. *Br J Surg* 1983; 70: 150-154
- Kwok SP, Lau WY, Leung KL, Liew CT, Li AK. Prospective analysis of the distal margin of clearance in anterior resection for rectal carcinoma. *Br J Surg* 1996; 83: 969-972
- Andreola S, Leo E, Belli F, Lavarino C, Bufalino R, Tomasic G, Baldini MT, Valvo F, Navarra P, Lombardi F. Distal intramural spread in adenocarcinoma of the lower third of the rectum treated with total rectal resection and coloanal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 25-29
- Pollett WG, Nicholls RJ. The relationship between the extent of distal clearance and survival and local recurrence rates after curative anterior resection

- for carcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1983; 198: 159-163
- 27 Nakagoe T, Ishikawa H, Sawai T, Tsuji T, Tanaka K, Hidaka S, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T. Survival and recurrence after a sphincter-saving resection and abdominoperineal resection for adenocarcinoma of the rectum at or below the peritoneal reflection: a multivariate analysis. *Surg Today* 2004; 34: 32-39
 - 28 Lazorthes F, Fages P, Chiotasso P, Lemozy J, Bloom E. Resection of the rectum with construction of a colonic reservoir and colo-anal anastomosis for carcinoma of the rectum. *Br J Surg* 1986; 73: 136-138
 - 29 Parc R, Tiret E, Frileux P, Moszkowski E, Loygue J. Resection and colo-anal anastomosis with colonic reservoir for rectal carcinoma. *Br J Surg* 1986; 73: 139-141
 - 30 Barrier A, Martel P, Gallot D, Dugue L, Sezeur A, Malafosse M. Long-term functional results of colonic J pouch versus straight coloanal anastomosis. *Br J Surg* 1999; 86: 1176-1179
 - 31 Fazio VW, Mantyh CR, Hull TL. Colonic "colo-plasty": novel technique to enhance low colorectal or coloanal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1448-1450
 - 32 Mantyh CR, Hull TL, Fazio VW. Coloplasty in low colorectal anastomosis: manometric and functional comparison with straight and colonic J-pouch anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 37-42
 - 33 Ho YH, Brown S, Heah SM, Tsang C, Seow-Choen F, Eu KW, Tang CL. Comparison of J-pouch and coloplasty pouch for low rectal cancers: a randomized, controlled trial investigating functional results and comparative anastomotic leak rates. *Ann Surg* 2002; 236: 49-55
 - 34 Jeong SY, Chessin DB, Guillem JG. Surgical treatment of rectal cancer: radical resection. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15: 95-107, vi-vii
 - 35 NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264: 1444-1450
 - 36 Yang G, Wagner TD, Thomas CR. Multimodality approaches for rectal cancer. *Curr Probl Cancer* 2004; 28: 316-342
 - 37 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740
 - 38 Schrag D. Improving rectal cancer outcomes with chemotherapy. *Sem Colon Rectal Surg* 2005; 16: 162-169
 - 39 Marr R, Birbeck K, Garvican J, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons WJ, Dixon MF, Mapstone NP, Sebag-Montefiore D, Scott N, Johnston D, Sagar P, Finan P, Quirke P. The modern abdominoperineal excision: the next challenge after total mesorectal excision. *Ann Surg* 2005; 242: 74-82
 - 40 Minsky B, Cohen A, Enker W, Kelsen D, Kemeny N, Ilson D, Guillem J, Saltz L, Frankel J, Conti J. Preoperative 5-fluorouracil, low-dose leucovorin, and concurrent radiation therapy for rectal cancer. *Cancer* 1994; 73: 273-280
 - 41 Valentini V, Coco C, Cellini N, Picciocchi A, Genovesi D, Mantini G, Barbaro B, Cogliandolo S, Mattana C, Ambesi-Impimbato F, Tedesco M, Cosimelli M. Preoperative chemoradiation for extraperitoneal T3 rectal cancer: acute toxicity, tumor response, and sphincter preservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 1067-1075
 - 42 Grann A, Feng C, Wong D, Saltz L, Paty PP, Guillem JG, Cohen AM, Minsky BD. Preoperative combined modality therapy for clinically resectable uT3 rectal adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 987-995
 - 43 Maghfoor I, Wilkes J, Kuvshinov B. Neoadjuvant chemo radiotherapy with sphincter-sparing surgery for low lying rectal cancer. *Pro ASCO* 1997; 16: 274
 - 44 Wagman R, Minsky BD, Cohen AM, Guillem JG, Paty PP. Sphincter preservation in rectal cancer with preoperative radiation therapy and coloanal anastomosis: long term follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 51-57
 - 45 郁宝铭, 吴唯勤. 新辅助化放疗与TME联合治疗局部进展期低位直肠癌. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 270-272
 - 46 Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Nahas SC, Ribeiro U Jr, Silva E Sousa AH Jr, Campos FG, Kiss DR, Gama-Rodrigues J. Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 90-99; discussion 99-101
 - 47 Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351
 - 48 Benson AB 3rd, Choti MA, Cohen AM, Doroshow JH, Fuchs C, Kiel K, Martin EW Jr, McGinn C, Petrelli NJ, Posey JA, Skibber JM, Venook A, Yeatman TJ. NCCN Practice Guidelines for Colorectal Cancer. *Oncology (Williston Park)* 2000; 14: 203-212
 - 49 Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee SH, Hernandez de Anda E, Mellgren A, Wong WD, Finne CO, Rothenberger DA, Madoff RD. Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 10-15
 - 50 Brown G, Radcliffe AG, Newcombe RG, Dallimore NS, Bourne MW, Williams GT. Preoperative assessment of prognostic factors in rectal cancer using high-resolution magnetic resonance imaging. *Br J Surg* 2003; 90: 355-364
 - 51 Mc Cormick JT, Gregorcy KSG. Preoperative evaluation of colorectal cancer. *Surg Clin N Am* 2006; 15: 39-49
 - 52 Rengan R, Paty P, Wong WD, Guillem J, Weiser M, Temple L, Saltz L, Minsky BD. Distal cT2N0 rectal cancer: is there an alternative to abdominoperineal resection? *J Clin Oncol* 2005; 23: 4905-4912

编辑 何燕 电编 张敏

SiRNA沉默*livin*基因表达促进胃癌细胞凋亡

王同杉, 游思洪, 葛红梅, 刘平

王同杉, 游思洪, 葛红梅, 刘平, 南京医科大学第一附属医院
肿瘤科 江苏省南京市 210029

王同杉, 2000年苏州大学医学院本科毕业, 2003年南京医科大学
肿瘤学硕士生, 肿瘤科住院医师, 主要从事消化系肿瘤早期诊
治研究。

江苏省医学重点人才135工程资助项目, No.52-2001

通讯作者: 刘平, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科
大学第一附属医院肿瘤科. liu-ping@cscsco.org.cn

电话: 025-83718836-6415 传真: 025-83724440

收稿日期: 2006-07-01 修回日期: 2007-07-03

Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by small interfering RNA-mediated silencing of the *livin* gene

Tong-Shan Wang, Si-Hong You, Hong-Mei Ge, Ping Liu

Tong-Shan Wang, Si-Hong You, Hong-Mei Ge, Ping
Liu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital
of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu
Province, China

Supported by: "135 Project" for Outstanding Person in
Medicine of Jiangsu Province, No.52-2001

Correspondence to: Ping Liu, Department of Oncology,
the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University,
300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province,
China. liu-ping@cscsco.org.cn

Received: 2006-07-01 Revised: 2007-07-03

Abstract

AIM: To explore the feasibility of small
interfering RNA (siRNA) for inhibiting *livin*
gene expression, and to investigate the apoptotic
susceptibility of SGC-7901 cells to siRNA-
mediated silencing of the *livin* gene.

METHODS: Two siRNAs (si-*livin*1 and si-*livin*2)
that specifically target the *livin* gene were de-
signed based on their coding regions and were
synthesized *in vitro*. They were then transfected
into gastric cancer SGC-7901 cells. Expression
level of *livin* mRNA was assayed by RT-PCR.
Apoptosis was assessed by flow cytometry.
Growth of SGC-7901 cells and 50% inhibitory
concentration (IC₅₀) of 5-fluorouracil (5-FU) and
cisplatin for cell growth were analyzed by the
MTT method.

RESULTS: The expression level of *livin* mRNA

treated for 48 hours by si-*livin*1 was significantly
decreased in SGC7901 cells (*livin* α , 0.167 ± 0.013
vs 0.403 ± 0.036 , 0.389 ± 0.053 ; *livin* β , $0.181 \pm$
 0.028 *vs* 0.413 ± 0.041 , 0.404 ± 0.029 , all $P < 0.01$)
with an inhibited cell growth state, but not in si-
*livin*2-treated cells. IC₅₀ of 5-FU and cisplatin in
SGC-7901 cells treated by si-*livin*1 was decreased
(5-FU, 34.07 ± 2.98 *vs* 74.39 ± 4.91 , 69.85 ± 4.57 ;
cisplatin, 4.56 ± 0.35 *vs* 9.07 ± 0.44 , 7.96 ± 0.64 , all
 $P < 0.01$). The spontaneous apoptosis rate of cells
was increased when they were treated by si-
*livin*1 (11.07 ± 1.36 *vs* 3.54 ± 2.89 , 6.72 ± 1.77 , $P <$
 0.01 , $P < 0.05$), and cells treated by si-*livin*1 were
more susceptible to proapoptotic stimuli (5-FU
and cisplatin) than control groups (5-FU, $34.90 \pm$
 1.76 *vs* 11.54 ± 0.83 , 13.54 ± 2.55 ; cisplatin, $48.14 \pm$
 2.70 *vs* 14.51 ± 0.35 , 15.71 ± 0.34 , all $P < 0.01$).

CONCLUSION: siRNA can silence *livin* gene
expression in SGC-7901 cells and induce cell
apoptosis; thus, *livin* might serve as a new target
for apoptosis-inducing therapy against gastric
cancer.

Key Words: Small interfering RNA; *livin* gene,
SGC-7901 cells; Apoptosis; Reverse transcription
polymerase chain reaction; Flow cytometry

Wang TS, You SH, Ge HM, Lin P. Induction of apoptosis
in SGC-7901 cells by small interfering RNA-mediated
silencing of the *livin* gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*
2007; 15(22): 2377-2381

摘要

目的: 研究*livin*特异性小分子干扰RNA
(siRNA)沉默胃癌SGC-7901细胞*livin*基因及
对促胃癌细胞凋亡的影响。

方法: 设计针对人源*livin*基因的两条SiRNA:
si-*livin*1和si-*livin*2, 分别转染至对数生长期的
胃癌SGC-7901细胞; 逆转录酶链式反应(RT-
PCR)检测转染前后胃癌SGC-7901细胞*livin*基
因表达的变化, MTT法检测转染前后该细胞
对5-FU、顺铂的半数抑制浓度(IC₅₀)的变化
以及检测转染前后细胞增殖能力的变化, PI染色
后流式细胞仪检测转染前后细胞凋亡的变化。

背景资料

细胞凋亡过程调
控异常与肿瘤发
生发展以及对药
物的抵抗密切相
关。*livin*是近年来
发现的人类凋亡
抑制蛋白(IAP)家
族的新成员, 在
多种肿瘤组织中
表达, 能抑制凋
亡诱导剂诱导的
细胞凋亡, 因此
抑制IAP表达可
以促进癌细胞凋
亡, 增加肿瘤
对化疗药物的
敏感性。

研发前沿
许多抗肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的,肿瘤细胞对药物诱导的凋亡产生抵抗可能是耐药的重要原因之一。因此,肿瘤凋亡诱导治疗研究将是克服肿瘤耐药的研究热点,探索各种诱导肿瘤细胞凋亡的途径是亟待研究的问题。

结果: *livin*特异性siRNA转染胃癌SGC-7901细胞48 h后, si-*livin*1组/*livin* α mRNA(灰度值表示)表达较空白对照组和阴性对照组显著减少(*livin* α : 0.167 ± 0.013 vs 0.403 ± 0.036 , 0.389 ± 0.053 ; *livin* β : 0.181 ± 0.028 vs 0.413 ± 0.041 , 0.404 ± 0.029 , 均 $P < 0.01$)。而si-*livin*2组/*livin* mRNA表达相比于空白对照组和阴性对照无显著差异; 转染siRNA后, si-*livin*1组胃癌细胞生长缓慢, 生长曲线较对照组平缓; si-*livin*1组细胞对5-FU和顺铂半数抑制浓度IC₅₀较空白对照组和阴性对照组显著降低(5-FU: 34.07 ± 2.98 vs 74.39 ± 4.91 , 69.85 ± 4.57 ; 顺铂: 4.56 ± 0.35 vs 9.07 ± 0.44 , 7.96 ± 0.64 , 均 $P < 0.01$); 转染siRNA后, si-*livin*1组胃癌细胞自发凋亡率较空白对照组和阴性对照组增加(11.07 ± 1.36 vs 3.54 ± 2.89 , 6.72 ± 1.77 , $P < 0.01$, $P < 0.05$)。5-FU和顺铂作用后, si-*livin*1组胃癌细胞凋亡率较空白对照组和阴性对照组显著增加(5-FU: 34.90 ± 1.76 vs 11.54 ± 0.83 , 13.54 ± 2.55 ; 顺铂: 48.14 ± 2.70 vs 14.51 ± 0.35 , 15.71 ± 0.34 , 均 $P < 0.01$)。

结论: RNA干扰可有效沉默*livin*基因表达从而抑制胃癌SGC-7901细胞生长及增加该细胞凋亡敏感性, *livin*可能成为胃癌凋亡治疗途径的一个分子靶点。

关键词: RNA干扰; *livin*基因; SGC-7901细胞; 凋亡; 逆转录酶链式反应; 流式细胞术

王同杉, 游思洪, 葛红梅, 刘平. siRNA沉默*livin*基因表达促进胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2377-2381
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2377.asp>

0 引言

细胞凋亡过程调控异常与肿瘤发生发展密切相关^[1-2], 随着对凋亡研究不断深入, 人们发现许多抗肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的^[3-4], 诱导细胞凋亡已成为开发新的抗癌药物的研究热点之一。 *livin*是近年来发现的人类凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein family, IAP)家族的新成员^[5-7], 特异的分布于多种肿瘤组织^[8-13], 并能抑制多种凋亡刺激剂诱发的细胞凋亡^[14], 阻断凋亡抑制蛋白后可以促进癌细胞的凋亡^[15-16]。本实验室的前期研究发现, *livin*基因在部分胃癌组织中表达上调, 因此我们设计了以*livin*为靶标的siRNA, 观察RNA干扰对胃癌细胞系SGC-7901 *livin*基因mRNA的抑制作用及对胃癌细胞凋亡敏感性的影响。

1 材料和方法

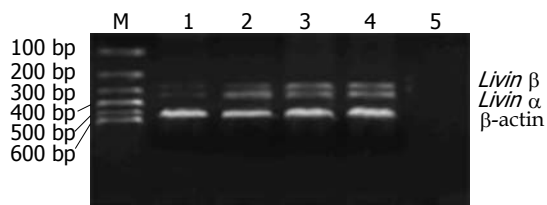
1.1 材料 胃腺癌细胞SGC-7901由本实验室保存; RPMI-1640培养基及小牛血清购自美国Hyclone公司; RT-PCR试剂盒购自美国Promega公司, RNA抽提试剂盒TRIzol购自美国Invitrogen公司、PCR仪为美国MJ Research公司PTC-200型; PCR引物、siRNA和荧光标记的阴性对照及转染用的RNAi-mate试剂来自上海吉玛生物公司; 二甲基亚砜(DMSO)、MTT试剂购自南京生兴生物技术有限公司; 5-FU(250 g/L)和顺铂(20mg/支)购自齐鲁制药厂。 *livin* siRNA的设计: 同时设计两条siRNA的异构体, 首先自Genbank下载*livin*序列, 避开头尾非编码区及两条异构体有差异的部分, 采用麻省理工学院Whitehead研究所的设计程序设计*livin* siRNA序列, 即寻找到“NA”(N代表任一碱基)开头的序列, 连续取其3'端19个碱基, 经同源性比较分析唯一后, 将末尾再加上dTdT, 委托上海吉玛生物技术公司合成, 其正义链序列及起始位点分别为si-*livin*1: 5'-GGUGCUUCUUCUGCUAUGGdTdT-3'(539), si-*livin*2: 5'-GAGAGGUCCAGUCUGAAAGdTdT-3'(788)。

1.2 方法 将呈指数生长的SGC-7901细胞接种于细胞板上(96孔板每孔 5×10^3 细胞, 用于MTT试验, 12孔板每孔细胞数 5×10^4 , 用于流式细胞仪检测, 6孔板每孔细胞数 1.5×10^5 , 用于RT-PCR检测)。

1.2.1 SiRNA转染及RT-PCR检测转染效果 细胞培养24 h后进行2条siRNA转染, 96孔板每孔在总量200 μ L液体中加入0.6 μ g siRNA, 12孔板在1 mL液体中加入2 μ g siRNA; 6孔板中2 mL液体中加5 μ g。应用RNAi-Mate转染试剂, 按说明优化转染条件。 设未转染的空白对照组及转染带荧光标记的无效siRNA做为阴性对照组, 同时在荧光显微镜下观察和判断转染效果(本实验转染效率65%)。 RT-PCR检测转染前后*livin*两条异构体mRNA的表达水平。 6孔板内各孔接种细胞数 1.5×10^5 培养24 h后, 设4组(si-*livin*1组、si-*livin*2组、空白对照组和阴性对照组), 每组设3复孔, siRNA转染48 h后收获细胞提取总RNA。 RT-PCR方法及所需引物参照文献^[17]。 以 β -actin为内参照, 实验重复3次。 获得PCR扩增实验所需*livin*和 β -actin基因的扩增引物。 根据GenBank提供的mRNA序列, 应用引物设计软件Primer Premier 5.0自行设计, 序列见表1。 用美国Promega公司的PCR扩增试剂盒进行PCR。 PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 59℃退火30 s, 72℃

表 1 *livin*和actin PCR引物序列

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)
<i>livin</i> α 和 <i>livin</i> β	上游: 5'-TCCACAGTGTGCAGGAGACT-3' 下游: 5'-ACGGCACAAAGACGATGGAC-3'	312和258
β -actin	上游: 5'-AGCGCAAGTACTCCGTGTG-3' 下游: 5'-AAGCAATGCTATCACCTCCC-3'	501

图 1 siRNA对SGC-7901细胞*livin* α 和*livin* β mRNA表达的抑制。M: Marker; 1: si-*livin*1; 2: si-*livin*2; 3: 阴性对照; 4: 空白对照; 5: 试剂对照。

延伸30 s, 循环32次, 72℃终末延伸5 min, 目的和内参引物同时加入, 同管扩增。PCR反应后取5 μ L PCR产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外照相并进行扫描分析, 以*livin*/ β -actin进行*livin*基因表达水平半定量分析。细胞转染前后*livin*/ β -actin之差与转染前*livin*/ β -actin之比结合转染率计算抑制效率。

1.2.2 MTT法测定细胞生长曲线、顺铂和5-FU的半数抑制浓度(IC₅₀) 取状态良好的对数生长期的细胞, 消化后用含小牛血清的培养液配成单细胞悬液, 每孔 5×10^3 接种于96孔板, 设3组(si-*livin*1组、空白对照组和阴性对照组)每组设6个复孔, 培养24 h后, 按照上述方法转染, 分别于转染后0, 24, 48, 72和96 h各孔加入5 g/L的MTT液20 μ L, 继续培养4 h, 弃上清, 每孔加入DMSO 150 μ L溶解, 492 nm波长测定各孔吸光度值(A), 描绘时间-吸光度值曲线, 吸光度与活细胞数呈正相关。将未转染及经siRNA转染48 h后的各组SGC-7901细胞, 调整细胞浓度, 在96孔板每孔中加入 5×10^3 细胞数和不同浓度的5-FU和顺铂稀释液, 终体积200 μ L, 培养48 h后, 同样以MTT法测定各孔吸光度值(A), 每组设3个复孔, 重复实验3次, 绘出浓度-抑制率曲线, 计算出半数抑制浓度(IC₅₀), 比较各组差异。

1.2.3 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 将未转染及经siRNA转染48 h后的各组SGC-7901细胞, 调整细胞浓度按每孔 5×10^4 细胞数接种至12孔板, 分为未加药组、顺铂组(终浓度为4 g/L)和5-FU(终浓度为20 g/L)组, 培养48 h后, 收集细胞,

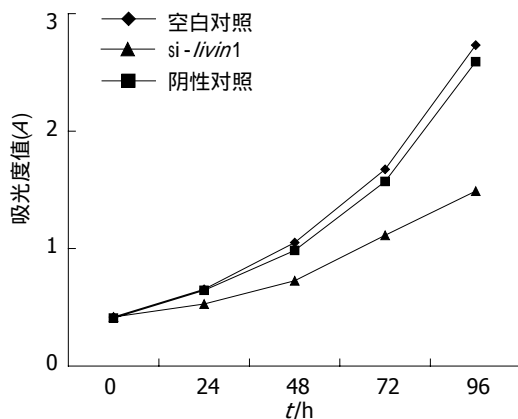


图 2 siRNA转染后SGC-7901细胞生长曲线变化。

700 mL/L的乙醇(乙醇溶于PBS中)固定(-4℃保存备用), 送本校基础公用实验室进行PI染色后流式细胞仪检测。每份标本计数10 000个细胞, 位于G₀-G₁亚二倍体峰为凋亡峰, 所占的比率为凋亡率, 重复实验3次。

统计学处理 用SPSS13.0进行统计学处理, 各组内比较用LSD检验, 组间比较采用方差分析, 所有数据用mean \pm SD表示, 以 $P < 0.05$ 为有统计学显著性。

2 结果

2.1 SiRNA对*livin* mRNA表达的抑制 SGC-7901细胞经siRNA处理48 h后, si-*livin*1组*livin*表达水平显著下调($P < 0.01$), si-*livin*2和阴性对照组则下调不明显($P > 0.05$), si-*livin*1对*livin* α 抑制率为83.7%, 对*livin* β 抑制率为80.2%(图1, 表2)。

2.2 SiRNA对细胞增殖的抑制 由于si-*livin*2对*livin* mRNA抑制效果不明显, 故以下实验不再对si-*livin*2进行研究。实验结果显示si-*livin*1对细胞增殖有抑制作用, si-*livin*1生长曲线较空白和阴性对照组平缓(图2)。

2.3 SiRNA转染后药物敏感性实验 胃癌SGC-7901细胞对5-FU和顺铂的IC₅₀值, si-*livin*1组低于空白对照组和阴性对照组($P < 0.01$)(表3)。

2.4 siRNA转染前后SGC-7901细胞对化疗药

相关报道

2001年Elbashir *et al*首次报道siRNA在体外培养的哺乳动物细胞内成功诱导基因特异阻抑, 相继有人用靶向mdr1的siRNA转染人耐药肿瘤细胞, 结果表明靶向mdr1的siRNA对内外源的mdr1基因均有沉默作用, 并可以恢复细胞对化疗药物的敏感性。Crnkovic-Mertens 1及国内孙建国 *et al*在Hela细胞和肺癌SPC-A1细胞中阻断凋亡抑制蛋白*livin*表达后可以促进癌细胞的凋亡。

创新盘点

目前研究RNA干扰在胃癌中的应用主要集中在沉默胃癌靶基因及耐药基因等方面, 用RNA干扰沉默胃癌细胞*livin*基因的表达尚未见报道。本研究结果表明, siRNA能够有效沉默*livin*基因, 抑制胃癌SGC-7901细胞生长及增加该细胞对化疗药物的敏感性。

应用要点

本研究目前还处于体外研究阶段,但最近有研究报道直接将siRNA注射至小鼠体内抑制基因表达获得成功,本文为进一步了解RNAi在体内发挥的效果提供了实验依据.预计在肿瘤的临床治疗中将具有应用前景.

表 2 siRNA对SGC-7901细胞*livin* mRNA表达的影响($n = 3$, mean \pm SD, 相对灰度)

	空白对照	阴性对照	si- <i>livin</i> 1	si- <i>livin</i> 2
<i>livin</i> α	0.403 \pm 0.036	0.389 \pm 0.053	0.167 \pm 0.013 ^b	0.360 \pm 0.036
<i>livin</i> β	0.413 \pm 0.041	0.404 \pm 0.029	0.181 \pm 0.028 ^b	0.395 \pm 0.042

^b $P < 0.01$ vs 空白对照或阴性对照.

表 3 细胞对5-FU和顺铂的敏感性($n = 3$, mean \pm SD)

分组	5-FU(IC50)	顺铂(IC50)
空白对照	74.39 \pm 4.91	9.07 \pm 0.44
阴性对照	69.85 \pm 4.57	7.96 \pm 0.64
si- <i>livin</i> 1	34.07 \pm 2.98 ^b	4.56 \pm 0.35 ^b

^b $P < 0.01$ vs 空白对照或者阴性对照.

药物诱导凋亡的反应 在不加化疗药的情况下si-*livin*1组凋亡率高于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$),而加入5-FU和顺铂后, si-*livin*1组细胞凋亡率比空白对照组和阴性对照组更为明显($P < 0.01$)(图3).

3 讨论

细胞凋亡过程调控异常不仅与肿瘤发生相关,而且随着近年来对细胞凋亡研究的不断深入,人们发现许多抗肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的^[3-4],诱导细胞凋亡已成为开发新的抗癌药物的研究热点之一.胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,发现时多属中晚期,除手术外,化疗是胃癌的重要治疗手段,肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗可导致治疗失败,其原因是多方面的,癌细胞对药物诱导凋亡的抵抗可能是原因之一^[18-19].凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein family, IAP)家族在凋亡缺陷中的重要作用已受到人们重视.*livin*是IAP家族的新成员,特异的分布于多种肿瘤组织,参与了凋亡过程的调节,能抑制多种凋亡刺激剂诱发的细胞凋亡,有望成为肿瘤治疗的一个新靶点^[20].初步研究结果显示,通过各种手段阻断凋亡抑制蛋白*livin*表达后可以促进癌细胞的凋亡^[15-16].2001年,Elbashir *et al*^[21]首次报道siRNA在体外培养的哺乳动物细胞内成功诱导基因特异阻抑以后,siRNA是否可应用于人类疾病的治疗受到了广泛的关注.相继有人用靶向多药耐药蛋白1(mdr1)的siRNA转染人耐药肿瘤细胞(乳腺癌MCF27/AdrR细胞^[22]、胰腺癌EPP85-181RDB细胞

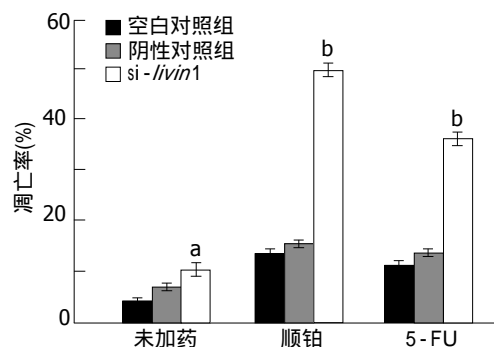


图 3 转染SiRNA转染后SGC-7901细胞对药物诱导细胞凋亡的反应. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

胞、胃癌EPG85-257RDB细胞^[23]等), 研究结果显示, 靶向mdr1的siRNA对内外源的mdr1基因均有沉默作用, 并恢复细胞对化疗药物的敏感性, 为siRNA应用于人类疾病治疗积累了基础研究经验. 目前研究RNA干扰在胃癌中的应用主要集中在RNA干扰沉默胃癌靶基因及耐药基因等方面^[24]. 本实验室前期研究结果显示*livin*在人胃癌组织中过表达, 尤其在淋巴结阳性的胃癌组织有较高表达率^[17], 因此我们针对*livin*基因设计了2条siRNA序列(si-*livin*1, si-*livin*2), 分别转染SGC-7901细胞. RT-PCR检测发现其中一条siRNA(si-*livin*1)能够有效的抑制*livin*两条异构体的表达, 抑制效果在80%左右. 同时细胞经si-*livin*1作用后细胞增殖受到抑制, 自发凋亡及对5-FU和顺铂凋亡敏感性均增加, 对5-FU和顺铂的半数抑制浓度(IC50)则降低. 本研究结果与Crnkovic-Mertens *et al*^[15]及国内孙建国 *et al*^[25]在Hela细胞和SPC-A1细胞所获得结果相似. 本实验结果显示RNAi技术操作简单, 基因沉默效率高, 序列特异性好, 是肿瘤基因干预治疗的良好工具, 但本实验所采用化学合成法合成的siRNA在细胞内存在时间较短, 不能长期稳定表达, 长期的沉默效果不确定, 而采用以病毒为siRNA表达载体进行RNAi可获得长期稳定的表达而产生持久的作用. siRNAs在哺乳动物的作用目前尚不十分清楚, 其主要的作用机制可能是介导

同源RNA降解。最近有两个研究小组报道直接将siRNA注射至小鼠体内抑制基因表达获得成功^[26-27], 提示siRNA用于临床治疗将成为可能。我们将进一步进行体内实验研究, 以了解RNAi在体内发挥的效果。另外由于肿瘤细胞的凋亡缺陷形成除了*livin*表达上调外, 尚可能有*survivin*及*bcl-2*等多种基因参与, 如有研究显示siRNA或反义核酸作用于*survivin*可使胃癌细胞增殖受到抑制和凋亡率增加^[28-30]。因此联合应用针对各种不同凋亡缺陷机制的siRNAs, 将可能更有效地逆转肿瘤细胞的凋亡缺陷, 促进和增强对恶性肿瘤的临床治疗效果。

4 参考文献

- 1 Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64: 271-280
- 2 Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-495
- 3 Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 231-243
- 4 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-164
- 5 Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-3246
- 6 Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 820-831
- 7 Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 2000; 10: 1359-1366
- 8 Carrington CB, Gaensler EA, Coutu RE, Fitzgerald MX, Gupta RG. Usual and desquamative interstitial pneumonia. *Chest* 1976; 69: 261-263
- 9 Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 362: 125-130
- 10 Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Watanabe N. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46: 299-304
- 11 Choi J, Hwang YK, Sung KW, Lee SH, Yoo KH, Jung HL, Koo HH, Kim HJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 109: 471-477
- 12 Xiang Y, Yao H, Wang S, Hong M, He J, Cao S, Min H, Song E, Guo X. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2006; 116: 126-130
- 13 Crnkovic-Mertens I, Muley T, Meister M, Hartenstein B, Semzow J, Butz K, Hoppe-Seyler F. The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2006; 54: 135-142
- 14 Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 2001; 495: 56-60
- 15 Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* 2003; 22: 8330-8336
- 16 Crnkovic-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, Butz K. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells. *J Mol Med* 2006; 84: 232-240
- 17 王同杉, 游思洪, 葛红梅, 陈子庆, 丁小健, 刘平. 凋亡抑制蛋白livin在人胃癌中的表达以及和survivin表达的关系. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2006; 26: 39-43
- 18 Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; 98: 2603-2614
- 19 Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 125-134
- 20 吕建, 陈智超. Livin与肿瘤研究新进展. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 17
- 21 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 22 Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1515-1519
- 23 Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 2003; 545: 144-150
- 24 章璉, 方国恩, 王嘉锋. RNA干扰在胃癌治疗中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1252-1256
- 25 孙建国, 廖荣霞, 陈正堂, 王志新, 张青, 胡义德, 王东林, 粟永萍. livin异构体特异性siRNA表达载体的构建及其在SPC-A1细胞中的稳定表达. *肿瘤* 2006; 26: 139-147
- 26 Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 2002; 32: 107-108
- 27 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; 418: 38-39
- 28 马荣, 陈曦海, 张岂凡, 唐丽萍. 反义Survivin核酸诱导凋亡及逆转胃癌耐药机制的实验研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1139-1145
- 29 赵伟红, 郭俊明, 肖秀秀, 管忠, 肖东升. 生存素siRNA表达质粒对MGC-803细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2302-2305
- 30 Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1170-1174

同行评价

本文采用siRNA的技术研究了*livin*基因及其对胃癌细胞凋亡的影响, 选题先进, 设计合理, 实验数据较详实, 证据充足; 论文科学结论较明确, 对进一步的临床基础研究有一定的指导作用。反映了我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

编辑 张焕兰 电编 何基才

谷氨酰胺和地塞米松对脓毒症幼年大鼠肝脏肿瘤坏死因子- α 与基质金属蛋白酶3的影响

王虹, 孙梅, 周卓

背景资料
肝脏胶原纤维对肝细胞及其周围血管有维持形态和支持的作用, MMP是降解细胞外基质的酶, MMP活性与肝硬化形成明显相关. 已知地塞米松和谷氨酰胺对脓毒症引起的某些脏器MMP过度合成有抑制作用, 但在肝脏中作用尚未见报道.

王虹, 孙梅, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)儿科 辽宁省沈阳市 110004
周卓, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中心实验室 辽宁省沈阳市 110004
王虹, 2005年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事小儿心肌损害研究.
辽宁省教育厅科研基金资助项目, No. 20122166
辽宁省科技厅科研基金资助项目, No. 20052091
通讯作者: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)儿科. sunm@cum2h.com
电话: 024-83955572
收稿日期: 2007-01-30 修回日期: 2007-07-20

Effects of glutamine and dexamethasone on the expression of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase 3 in rat liver with sepsis

Hong Wang, Mei Sun, Zhuo Zhou

Hong Wang, Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Zhuo Zhou, Department of Center Laboratory, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Applied Basic Research Program of the Education Commission Foundation of Liaoning Province, No. 20122166 and the Applied Basic Research Program of the Science and Technology Commission Foundation of Liaoning Province, No. 20052091

Correspondence to: Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@cum2h.com

Received: 2007-01-30 Revised: 2007-07-20

Abstract

AIM: To explore the effect of glutamine (Gln) and dexamethasone (Dex) on the production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and matrix metalloproteinase 3 (MMP3) in the liver of young rats with endotoxemia.

METHODS: Endotoxemia models were established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) in 88 18-day-old young wistar

rats. The rats were then randomly divided into three groups: control group (C, normal saline 1 mL/kg ip, $n = 8$), LPS group (L, LPS 4 mg/kg ip, $n = 40$) and treatment group (T, LPS 4 mg/kg ip, followed 1 hour later by Dex 5 mg/kg plus 13.46% Gln 1 mL/kg ip, $n = 40$). The rats were sacrificed at 0, 2, 4, 6, 24 and 72 h. Liver was isolated, fixed and cut into slices to examine the protein expression of TNF- α and MMP3 by immunohistochemistry.

RESULTS: The protein expression of TNF- α in the L group gradually increased with disease development, until it peaked at 6-24 hours, which was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); it then slowly decreased until 72 hours but was still higher than that in the controls ($P < 0.05$). The variation in the T group was paralleled to that in the L group but significantly milder than that in the L group ($P < 0.01$). In the L group, the change in MMP3 was similar to that for TNF- α ; the peak was at 24 hours, but at 72 hours, it was still higher than in the controls ($P < 0.01$). In the T group, the production of MMP3 was significantly higher than that in the controls ($P < 0.01$), but significantly lower than that in the L group ($P < 0.01$). There were positive correlations between the expression of TNF- α and MMP3 during sepsis (L group, $r = 0.928$; T group, $r = 0.939$).

CONCLUSION: Combination of Gln and Dex can prevent the damage and rebuilding of liver with sepsis by decreasing the productions of TNF- α and MMP3.

Key Words: Glutamine; Dexamethasone; Matrix metalloproteinase3; Liver rebuilding

Wang H, Sun M, Zhou Z. Effects of glutamine and dexamethasone on the expression of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase 3 in rat liver with sepsis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2382-2386

摘要

目的: 通探讨谷氨酰胺(Gln)和地塞米松(Dex)

对脓毒症肝损伤的保护作用.

方法: ip大肠杆菌脂多糖(LPS)制备幼年大鼠脓毒症模型, 按照ip药物不同分为对照组(C, $n = 8$, ip生理盐水1 mL/kg); 内毒素组(L, $n = 40$, ip LPS 4 mg/kg), 治疗组(T, $n = 40$, ip LPS 4 mg/kg 后1 h ip Dex 5 mg/kg+Gln 1 mL/kg), 在注射内毒素后0 h(只限对照组), 2, 4, 6, 24 和 72 h取肝右叶, 采用免疫组化的方法测定肝组织中肿瘤坏死因子(TNF- α)和基质金属蛋白酶3(MMP3)蛋白质合成水平.

结果: 与C相比, L组TNF- α 蛋白质表达明显高于对照组($P < 0.01$), 24 h达高峰, 72 h虽然有所降低但仍明显高于对照组($P < 0.05$). T组各时点TNF- α 蛋白质表达均高于对照组, 但增高幅度明显低于L组($P < 0.01$), 与对照组相比, L组MMP3蛋白质表达明显升高, 24 h达高峰, 72 h有所降低, 但仍高于对照组($P < 0.01$); T组较L 组明显减低($P < 0.01$). L和T组肝组织中TNF- α 与MMP3改变均呈明显正相关($r = 0.928$, $r = 0.939$).

结论: 联合应用谷氨酰胺与地塞米松可以抑制TNF- α 和MMP3的合成, 从而减轻脓毒症幼年大鼠的肝脏损伤和重塑.

关键词: 谷氨酰胺; 地塞米松; 基质金属蛋白酶3; 肝脏重塑

王虹, 孙梅, 周卓. 谷氨酰胺和地塞米松对脓毒症幼年大鼠肝脏肿瘤坏死因子- α 与基质金属蛋白酶3的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2382-2386

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2382.asp>

0 引言

肝脏胶原纤维对肝细胞及其周围血管有支持和维持形态的作用, 一旦其胶原纤维代谢异常, 将引起肝组织重塑, 肝脏纤维化, 进一步影响肝脏的形态和功能. 脓毒症时可以有肝、心、肺、肝等多脏器功能衰竭, 此时是否伴有肝脏胶原纤维的代谢异常, 尤其是是否存在肝脏形态的改变目前尚未见相关报道. 肿瘤坏死因子(TNF- α)的增加是脓毒症时引起多器官损害的关键, 地塞米松(dexamethasone, Dex)在脓毒症时可以抑制TNF- α 以及NO^[1]和IL-6的合成, 减少肝组织中Toll样受体4的表达, 减少级联免疫反应而保护肝脏^[2], 谷氨酰胺(glutamine, Gln)作为自由基清除剂也可以减少脓毒症小鼠的多器官损害和死亡率^[3], 但在脓毒症中是否对肝脏胶原代谢有保

护作用, 目前还没有相关报道. 观察Gln与Dex对幼年大鼠脓毒症肝脏TNF- α 以及胶原代谢的影响, 从而为临床感染性休克的治疗尤其在肝脏的保护方面提供一些理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 参照文献[4]建立幼年大鼠内毒素血症模型, 选健康18日龄Wistar大鼠88只, 体质量 28.1 ± 4.9 g, 不分雌雄, 由我院实验动物中心提供. 分组如下: 对照组(Ctrl, $n = 8$)ip生理盐水1 mL/kg; 内毒素组(L, $n = 40$, ip LPS 4 mg/kg); Gln与Dex治疗组(T, $n = 40$, ip LPS 4 mg/kg, 1 h后ip 13.46 g/L Gln 1 mL/kg+Dex 5 mg/kg). 各组于加LPS后0(仅限于对照组), 2, 4, 6, 24及72 h分别取8只大鼠处死, 分离肝脏右叶, 用冰盐水冲洗后放入0.1 mol/L PBS配制的40 g/L多聚甲醛中固定12-18 h, 常规石蜡包埋, 切片, 用免疫组化方法测定TNF- α 和MMP3蛋白质的表达. 大肠杆菌精制内毒素(LPS, Escherichia coli O55: B5)由美国Sigma公司提供. TNF- α 及MMP3抗体以及即用型试剂盒由武汉博士得生物医学工程公司提供.

1.2 方法 将石蜡切片经常规脱蜡至水, 30 mL/L H₂O₂, 室温5-10 min灭活内源性酶. 热修复抗原, 加5 g/LBSA封闭, 室温20 min, 甩去多余液体, 不洗. TNF- α 指标测定加稀释160倍的小鼠抗TNF- α , 而MMP3指标测定加稀释160倍的小鼠抗MMP3, 37°C, 60 min, 加生物素化山羊抗小鼠IgG, 37°C, 20 min, 加SABC, 37°C, 20 min, PBS洗4次, 每次5 min. DAB显色, 充分水洗, 苏木素复染, 充分水洗, 酒精脱水, 二甲苯透明, 封片. 各时点随机取8张组化染色片, TNF- α 阳性者表现为肝细胞质内棕黄色颗粒, MMP3阳性表现为在肝肝血管周围以及肝细胞周围有棕黄色颗粒沉积, 在8张切片上随机选取24个视野照相, 采用日本产Olympus摄像系统和MetaMorph/BX41型图像数据分析系统测定积分吸光度值(Integrated A Total, IAT), 再随机取3个测定的数据计算其平均值作为1个统计数据, 每个时点共取8个统计数据再进行数据分析.

统计学处理 采用SPSS11.0数据分析软件系统, 数据均以(mean \pm SD)表示, 各组间比较采用Dunnett *t*检验, $P < 0.05$ 为显著性差异. TNF- α 与MMP3的关系采用相关回归方程表示.

2 结果

2.1 脓毒症幼年大鼠肝脏TNF- α 的表达(表1) L组肝脏TNF- α 表达明显高于对照组(图1A,

创新盘点
有研究证实脓毒症时肝脏细胞外基质确实受到损害, 另有报道地塞米松和谷氨酰胺分别在脓毒症时对小肠、心脏的损害有保护作用, 本文首次将其合用作保护大鼠肝脏损害的药物, 取得了满意的效果.

应用要点
地塞米松已广泛用于临床抑制炎症反应,谷氨酰胺在心肌缺血再灌注损伤的防治中作用也比较突出,进一步了解二者的作用机制有望成为脓毒症脏器损伤的保护剂。

表 1 脓毒症幼年大鼠肝脏TNF- α 和MMP3的表达($n = 8$, mean \pm SD, $\times 10^3$)

分组		0 h	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h
TNF- α	L	1.1 \pm 0.3	12.9 \pm 1.4 ^d	31.5 \pm 3.5 ^d	46.8 \pm 3.0 ^d	55.4 \pm 4.7 ^d	23.8 \pm 3.6 ^d
	T	1.1 \pm 0.3	8.3 \pm 0.5 ^{da}	18.9 \pm 1.3 ^{da}	25.9 \pm 2.3 ^{da}	31.3 \pm 2.5 ^{da}	18.9 \pm 2.0 ^{da}
MMP3	L	1.6 \pm 3.0	23.2 \pm 2.2 ^d	33.4 \pm 3.2 ^d	55.2 \pm 3.2 ^d	65.1 \pm 3.4 ^d	48.9 \pm 2.1 ^d
	T	1.6 \pm 3.0	19.6 \pm 1.9 ^{da}	22.9 \pm 1.7 ^{da}	42.2 \pm 2.9 ^{da}	47.4 \pm 2.8 ^{da}	40.0 \pm 2.7 ^{da}

^a $P < 0.05$ vs L组; ^d $P < 0.01$ vs 0 h.

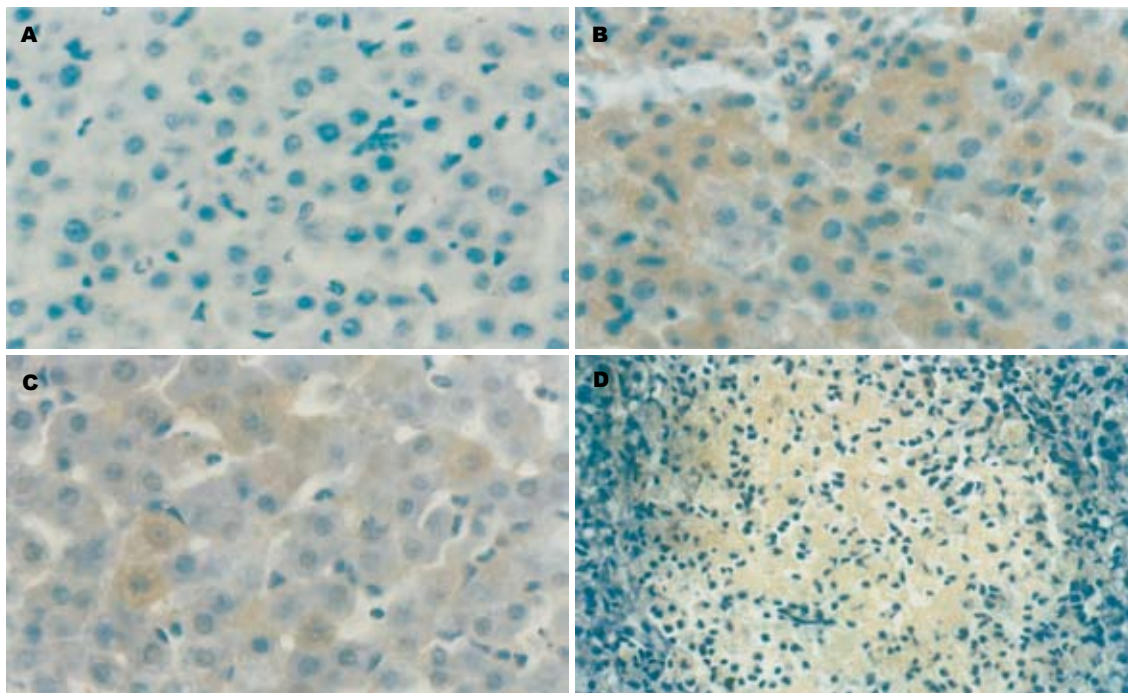


图 1 幼年大鼠肝细胞TNF- α 表达(SABC $\times 100$). A: 正常; B: 脓毒症24 h; C: 脓毒症治疗组24 h; D: 脓毒症72 h.

$P < 0.001$), 24 h达高峰(图1B), 72 h虽然有所恢复但仍强于对照组($P < 0.05$). T组TNF- α 表达趋势与LPS组一致, 但明显低于L组(图1C, $P < 0.01$). 本实验中可以观察到肝脏大体标本在脓毒症时, 其表面可以见到点状坏死, 镜下也可以证实确有灶性坏死(图1D). 脓毒症幼年大鼠肝脏MMP3表达: 脓毒症幼年大鼠肝脏从2组各个时间点表达均强于0 h对照组(图2A); L组最高点在24 h(图2B), 其增高趋势与该组TNF- α 增高趋势一致, 到72 h虽然呈现下降趋势但仍高于对照组, 差异有显著($P < 0.01$). T组MMP3表达趋势于L组一致, 但明显低于L组($P < 0.01$, 图2C). LPS组TNF- α 与MMP3相关系数 $r = 0.928$, 相关回归方程为: $Y = 1.059X + 7.625$; 而治疗组 $r = 0.939$, $Y = 1.467X + 3.419$.

3 讨论

基质金属蛋白酶(MMP)是一组由不同类型细胞

分泌的依赖钙离子并且与锌离子结合的酶,他可以降解所有的细胞外基质成份^[5-6]. 在生理状态下, MMP以无活性的MMP酶原的形式被分泌到细胞外, 很多神经激素、肾上腺皮质激素、细胞因子(尤其是白介素-1, 肿瘤坏死因子 α 和 β)还有细胞外基质金属蛋白酶成份可以影响MMP3的基因传递^[7], MMP3的调节包括MMP3的合成和酶原的激活, 此外内源性基质金属蛋白酶组织抑制因子的抑制也参与了这一病理过程^[8]. 一旦这种调节失衡, 将会导致组织结构重塑, 引发很多疾病, 如: 关节炎、炎症反应、肿瘤的发生与转移等^[9-18]. 酒精中毒性肝炎、乙型、慢性肝损伤和丙肝通过MMP活性增强, 导致肝脏细胞坏死增加以及肝细胞周围具有支持功能的胶原纤维的降解增加, 均有可能导致肝脏的形态和结构改变(肝硬化)^[19-22], 本研究中脓毒症时MMP3合成明显增加, 那么推测脓毒症后幸存

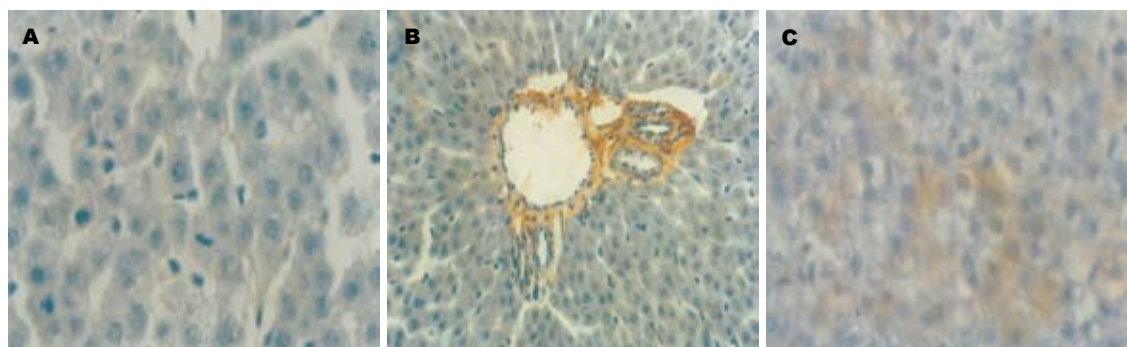


图 2 幼年大鼠肝细胞MMP3表达(SABC $\times 100$). A: 正常; B: 脓毒症 24 h; C: 脓毒症治疗组24 h.

名词解释

1 细胞外基质: 胶原纤维的重要组成部分, 其过度破坏对肝细胞及其周围血管的支持以及形态的维持是有害的.

2 MMP: 是降解细胞外基质的主要酶, 因此监测肝组织中MMP的代谢即可间接监测肝纤维代谢情况.

的大鼠有可能发生肝脏重塑. 对已经受损的肝脏组织, 重组人肝脏再生细胞因子可以促进其MMP3的表达^[23]. 此外LPS 还可以使小肠上皮细胞凋亡增加^[24], 而同时有增生作用的细胞核抗原表达减少^[25], 使小肠的屏障作用降低. TNF- α 是引起多脏器损害的主要细胞毒性因子, 他可以增加肝脏细胞的凋亡和坏死以及MMP3表达增强, 同时还可以通过诱导NO合成酶, 合成过量的NO, 使血管内皮损伤, 抑制呼吸链电子传递而引起肝细胞的损害并促进血清IL-8分泌以及抑制血清IL-10的分泌^[26], 从而延缓损伤组织的修复.

Dex为糖皮质激素, 可以抑制细胞因子的合成, 广泛应用于减轻炎症反应. 有报道12-氧-十四烷佛波醇-13-醋酸盐能促进野生型MMP3转录活性, 后者有较高的促进人类结肠癌基因的表达, Dex可钝化其促进野生型MMP3转录活性的作用, 使直肠癌发生率降低, 小剂量的糖皮质激素就可以抑制MMPs的合成^[27]. IL-1和TNF- α 可以诱导人类齿龈以及关节滑膜细胞的MMP3表达Dex可以抑制这种表达^[28], 我们也证实了用Dex治疗组其肝内TNF- α 与MMP3的合成均较LPS组明显减轻, 而且二者的变化趋势一致, 说明二者有一定的相关性.

由于Dex的副作用较大, 临床医生在应用时往往会产生一些顾虑, 因此人们在不放弃应用糖皮质激素的同时, 又在努力寻找另外的在抗炎方面与之有协同作用且副作用较小的药物. 近年来已经有报道观察到规律进食Gln可以保持小肠基底膜的完整性, 减少其分解^[4], ip Gln也可以减轻内毒素对小肠的损伤^[29]. 对肿瘤细胞, Gln能够使其对TNF- α 的敏感性增强而凋亡^[30]. 本人在以往的研究中也同样发现Gln能够通过减轻内毒素对心肌收缩蛋白合成的抑制作用^[31]和减少心肌重塑^[32]保护心肌收缩功能, 从而保护内毒素血症大鼠的脏器损伤. 本试验中Gln与Dex有协同作用, 在脓毒症发生至72 h之内, 均能使

肝脏的TNF- α 以及MMP3合成减低, 说明Gln对维持肝细胞的形态和功能可能有一定的保护作用.

4 参考文献

- 1 王虹, 吴玉斌, 杜秀华, 潘静坤. 新生大鼠内毒素休克时血清TNF- α 和NO对心肌超微结构的影响. 中国当代儿科杂志 2003; 5: 403-406
- 2 李强, 洪玉才, 唐建中, 徐鑫荣, 王勇, 苗毅. 地塞米松对脓毒症大鼠肝脏Toll样受体4的干预作用. 中华急诊医学杂志 2005; 14: 485-487
- 3 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
- 4 Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G569-G576
- 5 Matsunaga Y, Koda M, Murawaki Y. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004; 115-116: 143-150
- 6 Cheng J, Huo DH, Kuang DM, Yang J, Zheng L, Zhuang SM. Human macrophages promote the motility and invasiveness of osteopontin-knockdown tumor cells. *Cancer Res* 2007; 67: 5141-5147
- 7 von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73
- 8 Hu J, Van den Steen PE, Dillen C, Opdenakker G. Targeting neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase-8 and gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with a peptidomimetic inhibitor protects against endotoxin shock. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 535-544
- 9 Montrull HL, Brizuela NY, Demurtas SL, Strusberg AM, Spitale LS, Meirovich CI. Collagenase production increases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synoviocytes incubated. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2000; 57: 51-57
- 10 Wiencke K, Louka AS, Spurkland A, Vatn M, Schrumpf E, Boberg KM. Association of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter

同行评价

本文研究了谷氨酰胺和地塞米松对脓毒症幼年大鼠肝脏的作用, 研究目的明确, 方法使用恰当, 引用的参考文献较新, 有一定的学术价值。

- polymorphisms with clinical subsets of Norwegian primary sclerosing cholangitis patients. *J Hepatol* 2004; 41: 209-214
- 11 Yu FL, Liao MH, Lee JW, Shih WL. Induction of hepatoma cells migration by phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor through the upregulation of matrix metalloproteinase-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 76-82
- 12 Moran A, Iniesta P, de Juan C, Garcia-Aranda C, Diaz-Lopez A, Benito M. Impairment of stromelysin-1 transcriptional activity by promoter mutations in high microsatellite instability colorectal tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 3811-3814
- 13 Guo SY, Shen X, Yang J, Yuan J, Yang RL, Mao K, Zhao DH, Li CJ. TIMP-1 mediates the inhibitory effect of interleukin-6 on the proliferation of a hepatocarcinoma cell line in a STAT3-dependent manner. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 621-631
- 14 Arai I, Nagano H, Kondo M, Yamamoto H, Hiraoka N, Sugita Y, Ota H, Yoshioka S, Nakamura M, Wada H, Damdinsuren B, Kato H, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Wakasa K, Sakon M, Monden M. Overexpression of MT3-MMP in hepatocellular carcinoma correlates with capsular invasion. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 167-171
- 15 Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ* 2007; 49: 449-454
- 16 Roeb E, Bosserhoff AK, Hamacher S, Jansen B, Dahmen J, Wagner S, Matern S. Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinases: relevance to intracellular signaling pathways. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1096-1104
- 17 Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constantinou CM, Benyon RC, Duffield JS, Iredale JP. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* 2007; 178: 5288-5295
- 18 Hasebe T, Kajita M, Fujimoto K, Yaoita Y, Ishizuya-Oka A. Expression profiles of the duplicated matrix metalloproteinase-9 genes suggest their different roles in apoptosis of larval intestinal epithelial cells during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Dev Dyn* 2007; 236: 2338-2345
- 19 Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3621-3627
- 20 Yu FL, Liu HJ, Lee JW, Liao MH, Shih WL. Hepatitis B virus X protein promotes cell migration by inducing matrix metalloproteinase-3. *J Hepatol* 2005; 42: 520-527
- 21 Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol* 2007; 45: 25-33
- 22 Lichtinghagen R, Bahr MJ, Wehmeier M, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105: 373-382
- 23 王爱民, 梁保忠, 杨晓明, 陈惠鹏, 张彦林, 贺福初. 重组人肝再生增强因子可促进实验性肝纤维化基质分解素-1的基因表达. *中华传染病杂志* 2001; 19: 359-362
- 24 吴秀清, 王虹, 孙梅, 吕庆杰, 周卓. 幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡及Caspase-3的表达. *中国当代儿科杂志* 2005; 7: 167-170
- 25 吴秀清, 王虹, 孙梅, 吕庆杰, 周卓. 幼年大鼠内毒素血症对小肠上皮细胞凋亡及PCNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 621-625
- 26 王虹, 吴秀清, 孙梅. 谷氨酰胺、地塞米松对内毒素血症大鼠血清IL-8, IL-10的影响. *中国优生与遗传杂志* 2005; 13: 24-28
- 27 Richardson DW, Dodge GR. Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflamm Res* 2003; 52: 39-49
- 28 Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modeer T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 302-306
- 29 李军, 许玲芬, 孙梅. 谷氨酰胺对内毒素诱导幼鼠肠损伤的保护作用. *中国优生与遗传杂志* 2006; 14: 30-32
- 30 Obrador E, Carretero J, Esteve JM, Pellicer JA, Pascual A, Petschen I, Estrela JM. Glutamine potentiates TNF-alpha-induced tumor cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 642-650
- 31 Wang H, Pan JK, Sun M, Zhou Z, Gao H. Effects of glutamine on alpha-sarcomeric actin and its mRNA expression of myocardium in rats with endotoxemia. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2005; 43: 925-929
- 32 Wang H, Yu XY, Sun M, Pan JK, Gao H. Effects of glutamine on matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expressions in myocardium of rats with sepsis. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2006; 44: 587-591

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

应用基因芯片技术筛选肝细胞癌相关基因

张弘, 黄介飞, 黄晓平, 黄东风, 魏群, 鲍柏军, 华婷琰

张弘, 黄介飞, 黄晓平, 黄东风, 魏群, 鲍柏军, 华婷琰, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
张弘, 1981年南通医学院大专, 1991年南通医学院硕士, 副研究员, 主要从事消化肿瘤标志物和分子生物学研究。
江苏省卫生厅医学科研项目, No. H200330
通讯作者: 黄介飞, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科, jiefeihuang@163.com
电话: 0513-85806629 传真: 0513-85519820
收稿日期: 2007-04-05 修回日期: 2007-07-21

Genechip used for screening differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma

Hong Zhang, Jie-Fei Huang, Xiao-Ping Huang, Dong-Feng Huang, Qun Wei, Bai-Jun Bao, Ting-Yan Hua

Hong Zhang, Jie-Fei Huang, Xiao-Ping Huang, Dong-Feng Huang, Qun Wei, Bai-Jun Bao, Ting-Yan Hua, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: Health Department of Jiangsu Province, No. H200330
Correspondence to: Dr. Jie-Fei Huang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. jiefeihuang@163.com
Received: 2007-04-05 Revised: 2007-07-21

Abstract

AIM: To ascertain the effectiveness of genechip for screening the same differentially expressed genes of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Total RNAs were isolated from tissues of two cases of HCC and one normal liver by the TRIzol method, and then purified, reverse-transcribed to cDNA incorporating a biotin-labeling probe, and hybridized with genechip (covering 18 400 transcripts, representing 14 500 distinct genes). Picture signals of the fluorescence in the gene array were scanned and compared by computer analysis to the differential expression of the genes in the two tissues.

RESULTS: The same differentially expressed genes were 2756 (19.01%) and the same up regulated and downregulated genes were 1772 and 984, respectively, in two HCC and one normal liver tissues. These genes were initially classi-

fied according to function, and further analysis showed that they play an important role in the pathogenesis of HCC.

CONCLUSION: The analysis of the gene expression profile of HCC using genechip can rapidly select associated abnormal genes, while further analysis of the obtained genes can help elucidate the pathogenicity of HCC.

Key Words: Genechip; Hepatocellular carcinoma; Gene expression profile

Zhang H, Huang JF, Huang XP, Huang DF, Wei Q, Bao BJ, Hua TY. Genechip used for screening differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2387-2393

摘要

目的: 探讨基因表达谱芯片技术在筛查肝细胞癌(HCC)相关基因群表达中的作用。

方法: TRIzol法抽提2例HCC及正常肝脏组织总RNA, 分离纯化两种组织的mRNA; 逆转录合成掺入生物素标记的cDNA合成探针, 与基因芯片(涵盖了18 400个转录本, 代表了14 500个明晰的基因)杂交, 扫描芯片荧光信号图像, 计算机分析, 比较2种组织基因表达谱差异。

结果: 2例HCC组织与正常肝脏组织相比, 有2756条基因(19.01%)共同表达差异, 其中共同上调基因1772条和共同下调基因984条。对2756条共同差异表达基因作了初步功能分类, 这些基因与HCC的发病机制存在相关性。

结论: 基因表达谱芯片技术可以筛选出HCC表达异常的相关基因群, 有助于认识肝癌的发病机制。

关键词: 基因芯片; 肝细胞癌; 基因表达谱

张弘, 黄介飞, 黄晓平, 黄东风, 魏群, 鲍柏军, 华婷琰. 应用基因芯片技术筛选肝细胞癌相关基因. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2387-2393
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2387.asp>

背景资料

肝癌是我国较为常见的恶性肿瘤, 居恶性肿瘤死亡率的第2位。肝癌与其他肿瘤一样, 其发生发展是一个复杂的多因素、多步骤的过程, 是许多肿瘤相关基因表达失常或多种肿瘤抑制基因失活所致, 因此对肿瘤组织癌变过程中相关基因及基因组的变化研究显得尤为重要。

研发前沿
基因芯片技术在肝癌中的研究不过短短几年, 但已涉及到致癌分子的机制, 肝癌的复发、转移和预后相关基因的表达以及对化疗药物敏感性的评价和中药对肝癌的治疗。目前的研究趋势是应用基因芯片技术对肿瘤表型进行分类, 提高早期诊断率, 预测预后, 指导临床治疗。

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国较为常见的恶性肿瘤, 占肿瘤发病率中的第3位。该病具有较高的死亡率, 占恶性肿瘤死亡的第2位。HCC未能切除者1 a生存率低于30%, 即使行根治术, 5 a复发率达80%左右, 小HCC的复发率也高达40%-50%, 可见其治疗的关键在于早期发现和早期诊断。基因芯片技术是近几年发展起来的一项新的技术, 可在一次实验中快速、准确、高效的检测成千上万种基因的表达, 是探知基因在肿瘤组织与正常组织中表达差异的重要手段, 现已被广泛地用于肿瘤发生的分子生物学研究领域。我们通过基因表达谱芯片技术检测HCC和正常肝脏组织中基因群表达的不同, 筛选出相关的基因群, 为进一步深入研究其在肝癌的发生、发展中的作用提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料 HCC组织标本2例由南通大学附属医院手术切除组织提供, 正常肝组织1例由上海生物芯片有限公司-生物芯片上海国家工程研究中心提供。HCC组织取肿瘤中无坏死、出血及淤胆的组织。分别于标本切取后立刻(10 min内)将所取组织放入液氮中冻存备用。所有标本均由病理证实。所用基因芯片为美国Affymetrix公司的U133 A 2.0基因表达谱芯片, 由上海生物芯片有限公司-生物芯片上海国家工程研究中心提供。Affymetrix U133 A 2.0基因表达谱芯片涵盖了18 400个转录本(RNA), 代表了14 500个明晰的基因。

1.2 方法 每例切取肝组织50-100 mg, 再加入TRIzol 1 mL, 然后用匀浆器将组织彻底打碎。均质化的肝组织在15-30℃放置5 min, 然后加入0.2倍体积的氯仿, 盖子盖紧后剧烈振摇15 s混匀, 15-30℃放置2-3 min, 4℃ 5600 g离心15 min, 离心后形成下层红色的酚氯仿相, 中间相和上层无色水相。上层水相转移至一个新的离心管(水相的体积大约为均质化时所用TRIzol体积的60%), 加入0.8倍体积的异丙醇, 剧烈振摇使混匀, 4℃ 5600 g离心15 min, 弃上清。加入700 mL/L酒精, 颠倒离心管数次以洗去沉淀所含盐分。如沉淀较大可用Tip头先将沉淀打散。然后4℃ 5600 g离心10 min, 弃上清。重复以上步骤1次。15-30℃晾干, 然后加入适量的无RNase的水溶解。用分光光度计分析RNA浓度, 在260 nm $1A = 40$ mg/L的RNA。 A_{260}/A_{280} 应接近2.0为较纯

的RNA(比值在1.9-2.1均可)。10 g/L琼脂糖电泳按Qiagen Oligotex Direct mRNA kit提供的操作手册提取Poly(A)+mRNA。

1.2.1 由RNA合成双链DNA第1链cDNA合成 在Eppendorf管中加入逆转录试剂, 然后70℃温浴10 min, 稍微离心, 立即放置冰上至少2 min。在相应Eppendorf管中再加入dNTP及缓冲液, 混合均匀, 42℃温浴1 h, 反应结束放置冰上至少2 min。第2链DNA合成在第1链合成的管中加入第2链反应试剂, 混匀后稍微离心, 16℃放置2 h。加2 μ L 10 U/ μ L T4 DNA聚合酶, 16℃放置5 min。再加0.5 mol/L EDTA 10 μ L终止反应。纯化双链DNA, 在合成的双链cDNA产物中加入cDNA Binding Buffer 600 μ L, 然后混匀待用。把500 μ L样品加入cDNA Cleanup Spin Column, ≥ 8000 g离心1 min, 弃流出液。把剩余的样品加入离心柱, 以上述同样的方法离心。弃流出液和收集管。把离心柱转移至一个新的收集管。加入cDNA Wash Buffer 750 μ L至离心柱内。 ≥ 8000 g离心1 min, 弃流出液。打开离心柱管盖, 以最大速度离心5 min($\geq 25\ 000$ g), 弃流出液和收集管。打开管盖离心可以确保离心柱内膜的干燥。把离心柱转移至一个新的1.5 mL收集管, 加入cDNA Elution Buffer 14 μ L。室温下静置1 min。以最大转速($\geq 25\ 000$ g)离心1 min洗脱DNA。一般14 μ L的洗脱液可以收集到约12 μ L流出液。严格按Qiagen RNeasy Total RNA Isolation kit试剂盒提供的操作手册纯化生物素标记的cRNA。用分光光度计分析RNA浓度。

1.2.2 杂交和分析 芯片使用前需平衡至室温, 杂交炉中45℃, 60 r/min预杂交芯片10 min。配制杂交液, 加等体积处理好的杂交液, 然后在杂交炉中45℃, 60 r/min杂交芯片16 h。把杂交好的芯片进行洗脱、染色, 最后扫描芯片。用Affymetrix扫描仪扫描芯片后, GCOS1.2软件读取、处理数据。差异基因筛选标准: change为Increase或Marginal Increase, log ratio(实验组和对照组比值取Log2后的值) ≥ 1 , 实验组(肝癌组)Detection为Present的为上调基因; change为Decrease或Marginal Decrease, log ratio ≤ -1 , 对照组(正常组)Detection为Present的为下调基因。

2 结果

2.1 样品总RNA的质量和基因芯片检测 所提取的总RNA, 经分光光度计检测 A_{260} , A_{280} 的吸光度, 确定样品的浓度和纯度。算得 A_{260}/A_{280} 均

>1.9, 表明所提取总RNA纯度较高, 而且没有蛋白质和DNA残留。RNA样品高分化HCC为1.256 g/L; 低分化HCC为1.465 g/L; 正常肝组织为1.806 g/L; cRNA A值分别为1.93, 1.95, 1.94。经10 g/L甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后, 18 S和28 S电泳条带清晰, 28 S条带无明显降解(图1), 说明总RNA质量完好, 结果合格, 可以进行芯片实验。2例基因芯片检测结果显示, 符合质控标准, 信号强度达到要求, 5'/3'比值正常。正常肝组织cRNA、HCC组织cRNA分别与含18 400条转录本的芯片杂交, 图2A, B以散点图的形式描述了HCC组织/正常肝组织对应的184 00条转录本的信号平均强度。按差异显著性标准从18 400个转录本(代表了14 500个明晰的基因)中筛选出在HCC组织中共同差异表达基因共有2756条, 占筛选基因总数的19.01%, 其中上调表达的基因有1772条, 下调表达的基因有984条。

2.2 HCC中共同差异表达的基因 两例HCC组织中共同差异表达的基因中有1772条基因上调包括抗氧化活性相关基因、凋亡或肿瘤相关基因、结合蛋白相关基因、代谢相关基因、细胞周期相关基因、酶活性调节相关基因、分子马达相关基因、营养储备相关基因、分子功能退化相关基因、信号传导相关基因、结构分子相关基因、转录调控相关基因、翻译调控相关基因和物质运输相关基因。在2例组织中未发现共同上调的包括未知分子功能相关基因和分子伴侣调控相关基因(表1)。两例肝癌组织中共同差异表达的基因中有984条基因下调, 包括抗氧化活性相关基因、凋亡或肿瘤相关基因、结合蛋白相关基因、代谢相关基因、细胞周期相关基因、酶活性调节相关基因、分子马达相关基因、分子功能退化相关基因、信号传导相关基因、结构分子相关基因、转录调控相关基因、翻译调控相关基因和物质运输相关基因。在2例组织中未发现共同下调的分子伴侣调控相关基因、未知分子功能相关基因和营养储备相关基因(表2)。很多基因具有多功能, 参与细胞周期, 信号传导, 结合蛋白, 转录, 翻译, 凋亡。这些基因均至少参与两种不同的细胞活动过程(表3)。

3 讨论

众所周知, 肿瘤的发生、发展是一个复杂的多因素、多步骤的过程, 是许多肿瘤相关基因表达失常或多种肿瘤抑制基因失活所致, 因此肿瘤组织癌变过程中相关基因及基因组的变化研

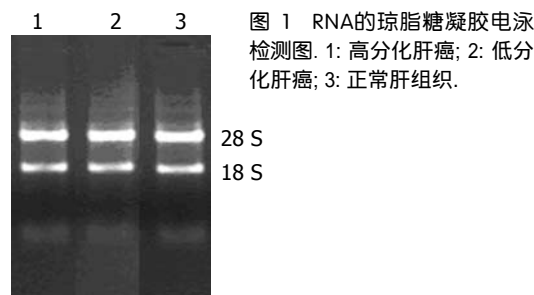


图1 RNA的琼脂糖凝胶电泳检测图。1: 高分化肝癌; 2: 低分化肝癌; 3: 正常肝组织。

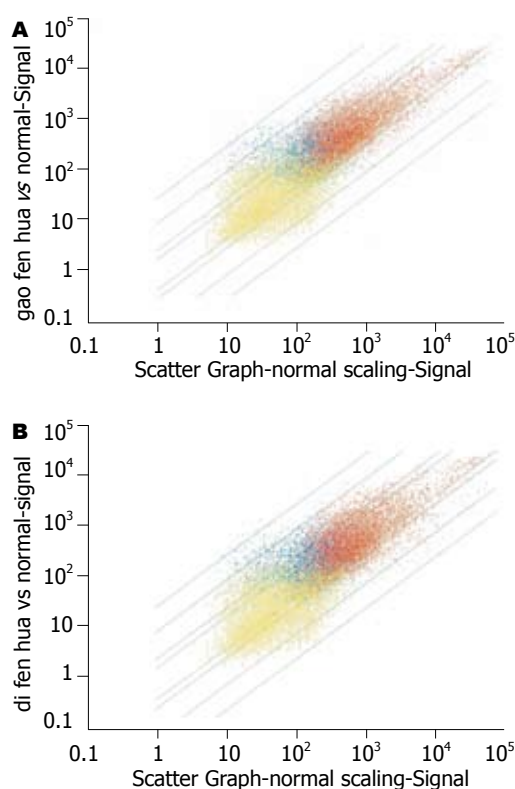


图2 HCC基因表达散点图。A: 高分化; B: 低分化; 红点: 两组中该基因的Detection均为Present; 蓝点: 两组中有一个值不是Present的; 黄点: 两组均为Absent; X轴: 正常肝信号值; Y轴: 高分化HCC信号值。

究显得更为重要。随着人类基因组计划的完成, 基因芯片作为后基因时代发展起来的一项DNA分析技术, 该技术具有高通量、高效率、样本少等特点, 满足了对多种样本中基因差异表达研究的要求, 已被广泛地用于肿瘤发生、发展的分子生物学研究中。本实验中我们采用了美国Affymetrix公司的U133 A 2.0基因表达谱芯片, 在肝癌组织中筛选出2756条差异表达的肝癌相关基因, 占筛选基因总数的19.01%, 其中上调表达的基因有1772条, 下调表达的基因有984条。这些差异基因初步分为16类, 包括凋亡或肿瘤相关基因、细胞周期、分子马达、信号传导、结构分子、转录调控、翻译调控等。我们的结果表明肝癌的发生发展是一个多基因参与的复

创新盘点
本文利用美国Affymetrix公司寡核苷酸基因芯片对肝癌进行了基因表达谱的分析, 并对差异表达基因进行了分类, 初步分为16类, 包括细胞周期、信号传导、结构分子、转录调控、翻译调控、代谢相关、分子马达、营养储备、物质运输、酶活性调节、凋亡或肿瘤相关基因等, 具有一定的创新性。

应用要点

本文应用基因芯片技术从2例肝癌组织中筛选出2756条差异表达基因,为认识肝癌发病的分子生物学机制提供了科学依据.为肝癌的基因治疗和寻找出肝癌早期诊断的分子生物学标志物具有十分重要的意义.

表 1 HCC组织中共同差异表达为上调的部分基因

功能分类	GenBank ID	基因名称	基因代码	染色体定位	Signal Log Ratio
抗氧化活性	NM_002083	谷胱甘肽过氧化物酶	GPX2	chr14q24.1	2.7
	NM_003330	硫氧还蛋白还原酶	TXNRD1	chr12q23	3.9
凋亡或肿瘤相关	NM_001467	v - myc	MYC	chr8q24.12	1.4
	NM_013250	r - ras癌基因同系物2	RRAS2	chr11p15.2	4.7
	NM_003350	死亡相关蛋白	DAXX	chr6p21.3	3.1
	AI582238	肿瘤排斥抗原	TRA1	chr12q24.2	2.1
	NM_012325	微管相关蛋白	MAPRE1	chr20q11.1	1.8
结合蛋白相关	NM_001903	细胞选择蛋白 α 1	CTNNA1	chr5q31	3.0
	NM_006396	核仁蛋白5A	NOL5A	chr20p13	1.6
	NM_021299	醛酮还原酶	AKR1B10	chr7q33	1.7
代谢相关	NM_002402	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	G6PD	chrXq28	6.4
	NM_003745	丝裂原活化蛋白激酶1	MAPK1	chr22q11.2	1.5
	NM_004396	RNA解旋酶	DDX5	chr17q21	2.1
	NM_002786	细胞分裂周期2	CDC2	chr10q21.1	3.7
细胞周期相关	NM_003237	细胞周期素 A2	CCNA2	chr4q25 - q31	3.3
	NM_001592	增殖细胞核抗原	PCNA	chr20pter - p12	1.6
	NM_002734	cAMP依赖的蛋白激酶	PRKARIA	chr17q23	2.0
	NM_004039	钙结合蛋白A2	ANXA2	chr15q21	3.3
酶活性调节	NM_006241	蛋白磷酸酶1调节亚单位2	PPP1R2	chr2q29	1.6
	AF250307	细胞质动力蛋白	DNCI	chr2Q31.1	1.0
	BF432550	肌球蛋白IB	MYOIB	chr2q12	1.3
	NM_016141	细胞质动力蛋白多肽1	DNCLI1	chr3p23	2.0
营养储备相关	NM_005637	关节肉瘤	SS18	chr18q11.2	2.8
退化分子功能相关	AI761759	钙联接蛋白	CANX	chr5q35	1.3
	AU146237	剪接因子11	SFRS11	chr1p31	2.2
	U40763	亲环蛋白G	PPIG	chr2q31.1	2.2
信号传导相关	NM_007354	肿瘤相关钙信号转导物1	TACSTD1	chr2p21	4.8
	NM_001315	信号传导子及转录激活子1	STAT1	chr2q32.2	1.9
	NM_002875	胰岛素样生长因子1受体	IGF1R	chr15q26.3	3.9
结构分子相关	NM_005582	分泌型磷蛋白1	SPP1	chr4q21 - q25	4.2
	NM_007227	层粘蛋白 α 3	LAMA3	chr18q11.2	3.7
	NM_001224	角蛋白18	KRT18	chr12q13	1.6
	NM_006315	信号传导子及转录激活子1	STAT1	chr2q32.2	1.9
转录调控相关	NM_014739	BCL2相关转录因子1	BCLAF1	chr6q22	2.0
	NM_001518	转录因子	GTP2L	chr7q11.2	1.4
	NM_015904	真核翻译起始因子5B	EIF5B	chr2p11.1	4.0
	NM_004730	真核翻译起始因子1	EIF1	chr5q31.1	2.0
翻译调控相关	NM_002453	线粒体翻译起始因子2	MTIF2	chr2p14	2.3
	NM_003100	分类连接蛋白2	SNX2	chr5q23	2.4
	NM_001444	脂肪酸结合蛋白5	FABP5	chr8q21.1	6.6
	AI816243	突触融合蛋白12	STX12	chr1p35	2.0

杂的变化过程,涉及到许多相关基因的变化.

在我们筛选出的差异表达基因中有一些是原癌基因和抑癌基因.原癌基因是生长因子信号系统的组成成分,在恶性肿瘤中其改变常为点突变、扩增、染色体易位、基因剪切等.许多原癌基因的表达产物对细胞膜的稳定、受体

的活性、信号传递、酶的活性和基因的表达具有显著的调节作用.抑癌基因是正常的细胞基因,有诱导组织分化、细胞凋亡和调节细胞生长等功能,一旦突变和缺失,可导致癌发生.MYC基因是一种细胞癌基因,定位于8号染色体上,可通过染色体易位及DNA扩增而活化.常见

表 2 HCC组织中共同差异表达为下调的部分基因

功能分类	GenBank ID	基因名称	基因代码	染色体定位	Signal Log Ratio
抗氧化活性相关	NM_000962	前列腺素内过氧化 物合酶1	PTGS1	chr9q32 - q33.3	-1.2
凋亡或肿瘤相关	BC001453	谷胱甘肽转移酶zeta1	GSTZ1	chr14q24.3	-3.4
	NM_000358	转化生长因子 β 1	TGFB1	chr5q31	-1.5
	X07868	胰岛素样生长因子	IGF -	chr11p15.5	-4.2
结合蛋白相关	NM_005538	抑制素 β C	INHBC	chr12q13.1	-3.3
	X07868	胰岛素样生长因子	IGF -	chr11p15.5	-4.2
	NM_005125	超氧化物歧化酶 铜伴侣蛋白	CCS	chr11q13	-1.7
代谢相关	NM_002162	细胞间黏附分子3	ICAM3	chr19p13.3 - p13.2	-2.7
	M33318	细胞色素P450家族2, 亚科A, 多肽6	CYP2A6	chr19q13.2	-5.1
	NM_004563	线粒体磷酸烯醇丙酮 酸羧激酶2	PCK2	chr14q11.2	-3.8
细胞周期相关	NM_013267	肝线粒体谷氨酰胺酶2	GLS2	chr12q13	-4
	NM_000592	补体成分4A/4B	C4A / C4B	chr6p21.3	-1.5
	N33167	周期素依赖性蛋 白激酶抑制子1C	CDKN1C	chr11p15.5	-1.6
酶活性调节相关	NM_000064	补体成分3	C3	chr19p13.3 - p13.2	-3.1
	NM_000125	雌激素受体1	ESR1	chr6q25.1	-3.2
	NM_021131	蛋白质磷酸酶2A, 调节亚单位B'	PPP2R4	chr9q34	-1.9
分子马达相关	NM_006944	分泌的磷蛋白2, 24 kDa	SPP2	chr2q37 - qter	-4.7
	M13149	富含组氨酸糖蛋白	HRG	chr3q27	-1.7
	BF593594	驱动蛋白2	KNS2	chr14q32.3	-1.5
分子功能退化相关	X98507	肌球蛋白IC	MYO1C	chr17p13	-1.1
	NM_004343	钙网织蛋白	CALR	chr19p13.3 - p13.2	-1.2
	NM_003097	核内小分子核糖 核蛋白多肽N	SNRPN	chr15q11.2	-2.5
信号传导相关	NM_006275	富含精氨酸/丝氨 酸胱硫醚 γ -裂解酶-6	SFRS6	chr20q12 - q13.1	-2.1
	X07868	胰岛素样生长因子	IGF -	chr11p15.5	-4.2
	NM_000358	转化生长因子 β	TGFB1	chr5q31	-1.5
结构分子相关	NM_005538	抑制素 β C	INHBC	chr12q13.1	-3.3
	NM_003227	转铁蛋白受体2	TFR2	chr7q22	-2.8
	NM_006097	肌球蛋白轻链9调节子	MYL9	chr20q11.23	-1.8
转录调控相关	NM_007234	动力蛋白激活蛋白3	DCTN3	chr9p13	-1.6
	AY029208	VI型胶原 α 2	COL6A2	chr21q22.3	-1.6
	L27624	组织因子通道抑制剂2	TFPI2	chr7q22	-4.8
翻译调控相关	NM_003195	转录延伸因子A2	TCEA2	chr20q13.33	-2.5
	NM_005693	细胞核受体亚科1, 组H, 成员3	NR1H3	chr11p11.2	-1.6
	NM_004364	CCAAT/增强子结合蛋白 α	CEBPA	chr19q13.1	-2.7
物质运输相关	AI524138	转录因子EB	TFEB	chr6p21	-1.7
	NM_003321	线粒体Tu翻译延伸因子	TUFM	chr16p11.2	-2.1
	NM_001961	真核翻译延伸因子2	EEF2	chr19pter - q12	-1.1
	AB014564	KIAA0664蛋白	KIAA0664	chr17p13.3	-2.2
	NM_006623	磷酸甘油酸脱氢酶	PHGDH	chr1p12	-4.1
	NM_000690	线粒体醛脱氢酶2家族	ALDH2	chr12q24.2	-2.5
	NM_002899	细胞视黄醇结合蛋白 1	RBP1	chr3q23	-3.1
	NM_000898	B型单胺氧化酶	MAOB	chrXp11.23	-2.5

名词解释

1 基因芯片: 指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 样品DNA/RNA通过PCR扩增、体外转录等技术掺入标记分子, 然后按碱基配对原理进行杂交, 再通过检测系统等对芯片的杂交信号进行量化, 得出所要的信息。

2 基因表达谱: 常被称为是某一生理病理现象的“分子图像”。这类复杂的“分子图像”, 可用于同时检测成千上万个基因的表达水平, 再经专门的计算机软件解读出来。研究人员通过比较源于不同病理条件下的“分子图像”的结果, 可以识别出引发癌症等复杂疾病的标志物。

同行评价

本文采用了基因表达谱芯片技术对肝癌表达异常的相关基因群进行了筛选, 有助于认识肝癌的发病机制, 方法成熟, 设计合理, 对临床有一定的意义。

表 3 HCC组织中共同差异表达且具有多功能的部分基因

	GenBank ID	基因名称	基因代码	染色体定位	Signal Log Ratio
上调	NM_007315	信号传导及转录激活因子1	STAT1	chr2q32.2	3.1
	NM_004539	天冬酰氨酰 - tRNA合成酶	NARS	Chr18q21.2	1.6
	NM_007145	锌指蛋白146	ZNF146	Chr19q13.1	3.0
	NM_002398	核仁磷蛋白	NPM1	Chr5q35	2.5
	NM_004501	不均一核糖核蛋白U	HNRPU	Chr1q44	1.6
	NM_003750	真核翻译起始因子3	EIF3S10	Chr10q26	1.8
下调		亚单位100			
	AI582238	肿瘤排斥抗原	TRA1	Chr12q24.2	2.1
	NM_002734	cAMP依赖的蛋白激酶	PRKARIA	Chr17q23	2.0
	NM_002997	多配体1	SDC1	chr2p24.1	-1.8
	NM_021913	AXL受体酪氨酸激酶	AXL	chr19q13.1	-1.4
	NM_000029	血管紧张素原	AGT	chr1q42 - q43	-1.5
	NM_004364	CCAAT/增强子结合蛋白, α	CEBPA	chr19q13.1	-2.7
	BC005174	转录激活因子5	ATF5	chr19q13.3	-2.3
	NM_000125	雌激素受体1	ESR1	chr6q25.1	-3.2
	NM_002567	前列腺结合蛋白	PBP	chr12q24.23	-2
	NM_006006	锌指和BTB 域封闭物16	ZBTB16	chr11q23.1	-1.9
	NM_002387	结肠直肠癌突变体	MCC	chr5q21 - q22	-1.6
	X07868	胰岛素样生长因子	IGF -	chr11p15.5	-4.2

的是通过8号染色体与14号染色体易位, 使得8号染色体上的MYC基因与14号染色体的免疫球蛋白重链融合而被活化, 活化的MYC基因在细胞的生长调控中发挥作用. 朱波 *et al*^[1], Niu *et al*^[2]认为MYC基因可促使HCC细胞增殖, 使HCC癌细胞具有更强的侵袭力, 与HCC的发生发展密切相关. Ras基因定位于人类第12号染色体上, 正常细胞中Ras基因对细胞生长分化具有重要作用, Ras基因的突变被认为在癌变过程中起启动作用并是一个早期事件^[3-4]. 最常见的激活方式是点突变, Ras基因编码的鸟苷酸结合蛋白在细胞增殖分化信号从激活的跨膜受体传递到下游蛋白激酶的过程中起作用, 从而产生具有致癌活性的P21蛋白^[5], 导致Ras蛋白与GTP的持续结合继而促进细胞生长. 因此Ras基因的突变以及扩增被认为是肿瘤发生的重要原因. 我们的结果中这两种基因及其相关基因群均呈上调表达, 表明与HCC的发生发展密切相关.

肿瘤的发生是细胞凋亡与细胞增殖失衡的结果, 凋亡减弱/增殖增强是肿瘤的重要发生机制. 我们检测到survivin基因呈上调表达. survivin基因位于17q25, 其表达产物survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 近年来研究证实他能抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖. 也有研究表明, survivin还参与血管的生成. 肿瘤血管形成是肿瘤生长、转移的基础^[6-7]. 有研究报道^[8-9]survivin

在结肠癌组织中呈高度表达, 而癌旁组织不表达, 并与结肠癌的转移有关联性. 因此survivin在结肠癌的发生发展及转移过程中发挥着重要作用. 同样我们推测其在HCC发生发展及转移过程中也发挥着重要作用. 肿瘤从原位增殖到侵袭转移的过程中, 肿瘤细胞必须具备降解细胞外基质和血管基底膜的能力, 必须借助某些酶. 基质金属蛋白酶家族(MMPs)是具有降解细胞外基质及基底膜的一种酶. MMPs家族具有多个成员, 其表达上调、活性增强是促进多种恶性肿瘤侵袭和转移的重要机制. 有研究表明, HCC组织中MMPs蛋白的高表达促进了肿瘤细胞的运动及对基底膜的侵袭能力, 从而导致HCC细胞发生转移, 影响患者预后^[10]. 本研究结果中基质金属蛋白酶家族成员基因表达谱在HCC中呈上调表达, 这一结果表明肝癌具有高转移性、高侵袭性的生物学特征.

我们在对差异表达基因进行分类时发现有许多基因具有多种功能, 参与多种细胞活动过程, 涉及到细胞凋亡或肿瘤相关、结合蛋白相关及信号传导等多个方面. 例如胰岛素样生长因子2(IGF-2)就具有这样的功能, 该基因位于人类染色体11 p15.5, 他的表达产物IGF-2是一种多功能调节因子, 对促进机体正常发育具有重要作用, 在胚胎发育、细胞增殖分化、机体物质代谢等方面均有重要功能^[11-13]. 近来研究显示

IGF-2还是干细胞分化的重要因子^[14-15]。IGF-2基因属于印迹基因, 是第1个被证实的内源性印迹基因, 该基因正常情况下在成人大脑脉络丛、软脑膜及肝组织为双等位基因表达, 其他组织中是父系等位基因表达, 而母系等位基因印迹。在哺乳动物基因组中只有一小部分基因属于印迹基因, 由于各种原因引起的印迹基因异常表达如过高、过低或缺失均可导致肿瘤的发生^[13,16-17]。在本研究中IGF-2基因表达呈下降, 而IGF-2基因在肝细胞中是呈双等位基因表达, 该基因在肝癌中的低表达是否与该基因的印迹或突变有关有待进一步研究。

目前, 基因芯片技术正在被广泛地应用于对各种肿瘤复杂发生发展过程认识的研究及通过基因表达谱的分析来认识肿瘤的发病机制, 为肿瘤的诊断和治疗提供了科学依据。本研究结果表明, 共有16类基因群2756条基因在HCC组织中异常表达, 表明HCC中很可能存在着互相协调的共同表达的基因群。因此利用基因表达谱芯片技术对HCC进行基因群水平研究, 筛选在肿瘤相关的多个环节上起重要作用的分子和起关键调节作用的基因, 以揭示HCC在基因水平上的本质, 为HCC的早期诊断和早期治疗提供理论依据。

4 参考文献

- 1 朱波, 欧超, 罗元, 曹骥, 班克臣, 焦杨, 李璦, 苏建家. CyclinD1 c-myc和p53的表达与肝细胞癌生物学行为关系. *中国肿瘤临床* 2006; 33: 67-70
- 2 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p53 and C-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 822-826
- 3 朱人敏, 张予蜀. ras癌基因和大肠癌关系的研究. *江苏医药* 1997; 23: 103-104
- 4 孙佰秀, 殷凡, 朱伟, 高玉, 孙淑红, 罗兵. EBV相关胃癌ras基因突变及法尼基转移酶 β -亚单位基因的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1294-1299
- 5 Sekine I, Takami S, Guang SG, Yokose T, Kodama T, Nishiwaki Y, Kinoshita M, Matsumoto H, Ogura T, Nagai K. Role of epidermal growth factor receptor overexpression, K-ras point mutation and c-myc amplification in the carcinogenesis of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 1998; 5: 351-354
- 6 O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398
- 7 Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2683-2692
- 8 刘强, 陈卫昌, 李锐, 康苏娅. 大肠癌发生过程中Survivin蛋白的表达及其与凋亡、增殖的关系. *江苏医药杂志* 2003; 29: 481-484
- 9 王贵红, 夏荣龙, 郑兰东. 结肠癌组织survivin表达的意义. *第四军医大学学报* 2006; 27: 170-171
- 10 何萍, 张雁瑞, 徐雪冬, 车丽洪, 吴惠茜, 薛玲. 影响肝细胞癌生物学行为及预后的相关因子分析. *临床与实验病理学杂志* 2006; 22: 61-64
- 11 Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1472-1489
- 12 Moschos SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 2002; 63: 317-332
- 13 Jerome L, Shiry L, Leyland-Jones B. Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 561-578
- 14 Paunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, T anasie G, Bunu C, Anghel S, Tatu CA, Oprea TI, Henschler R, Ruster B, Bistriar R, Seifried E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 502-508
- 15 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 16 Jirtle RL. Genomic imprinting and cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 18-24
- 17 段琼红, 吕美霞, 卢祖洵, 聂绍发. 大肠癌中IGF-2蛋白的表达及相关性研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 83-86

编辑 程剑侠 电编 何基才

隐源性肝炎相关新基因CHBP2的原核表达及蛋白纯化

李 锐, 叶 进, 肖 凡, 李国力, 洪 源, 魏红山

背景资料
隐源性肝炎是一组异质性疾病, 又称未分类肝炎、特发性肝炎, 其病因和发病机制隐匿, 肝组织学特征不明显。目前关于隐源性肝炎病因及发病机制的研究较多, 但存在诸多争议。

李锐, 叶进, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
肖凡, 李国力, 洪源, 魏红山, 北京地坛医院传染病研究室 北京市 100011
李锐, 华中科技大学同济医学院2004级硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝病的分子生物学及临床研究。
通讯作者: 叶进, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. yejin8688@sina.com
电话: 027-85726381
收稿日期: 2007-03-04 修回日期: 2007-07-18

Expression and purification of new gene CHBP2 associated with cryptogenic hepatitis in prokaryote cells

Kun Li, Jin Ye, Fan Xiao, Guo-Li Li, Yuan Hong, Hong-Shan Wei

Kun Li, Jin Ye, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Fan Xiao, Guo-Li Li, Yuan Hong, Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Dr. Jin Ye, Department of Digestive Disease, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yejin8688@sina.com
Received: 2007-03-04 Revised: 2007-07-18

Abstract

AIM: To construct a prokaryotic cell expression vector for a new gene, CHBP2, associated with cryptogenic hepatitis, and to abundantly express and purify CHBP2 protein.

METHODS: The open reading frame (ORF) of CHBP2 was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), in which an mRNA template was extracted from Huh7 cells and ligated into the pGEM-T cloning vector. After sequencing, the correct DNA fragment was inserted into inducible *Escherichia coli* BL21. After the CHBP2 protein was induced with Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), it was analyzed by SDS-PAGE and western blotting. Expressed bacteria were atomized by ultrasound and analyzed with SDS-PAGE. The expressed product was purified and renatured

by Ni^{2+} affinity column chromatography.

RESULTS: The prokaryotic cell expression vector pET-32a(+)-CHBP2 was successfully constructed and CHBP2 protein was abundantly expressed. The protein's specificity was verified by western blotting. Protein production was mainly in the inclusion body, as shown by SDS-PAGE analysis, and was purified and renatured by Ni^{2+} affinity column chromatography. Purified protein was successfully obtained.

CONCLUSION: Expression and purification of CHBP2 protein will be useful for studying the biological functions of CHBP2.

Key Words: Cryptogenic hepatitis, CHBP2; Prokaryotic expression; Protein purification

Li K, Ye J, Xiao F, Li GL, Hong Y, Wei HS. Expression and purification of new gene CHBP2 associated with cryptogenic hepatitis in prokaryote cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2394-2398

摘要

目的: 构建隐源性肝炎相关新基因CHBP2原核表达载体, 在大肠杆菌中进行表达, 并纯化CHBP2融合蛋白。

方法: 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR), 以提取的Huh7细胞mRNA为模板, 扩增获得CHBP2基因片段, 连接到pGEM-T载体, 测序正确后插入至原核表达载体pET-32a(+)中, 构建原核表达载体pET-32a(+)-CHBP2, 转化大肠杆菌BL21, 以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 获得CHBP2融合蛋白的可诱导性表达, 通过SDS-PAGE电泳、Western blot免疫印迹分析证实蛋白表达的特异性。超声破碎表达细菌, SDS-PAGE分析。利用镍离子亲和柱对表达蛋白进行纯化及柱上复性。

结果: 成功构建原核表达载体pET-32a(+)-CHBP2, 并将CHBP2融合蛋白成功表达, 通过Western blot免疫印迹, 证实了蛋白表达的特异性。SDS-PAGE分析表明其为包涵体表达, 并对蛋白成功进行了纯化和复性, 获得了表达蛋

白的纯品.

结论: 成功表达、纯化CHBP2蛋白, 为研究CHBP2蛋白的生物学功能打下了基础.

关键词: 隐源性肝炎; CHBP2; 原核表达; 蛋白纯化

李锐, 叶进, 肖凡, 李国力, 洪源, 魏红山. 隐源性肝炎相关新基因CHBP2的原核表达及蛋白纯化. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2394-2398

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2394.asp>

0 引言

隐源性肝炎是一组异质性疾病, 又称未分类肝炎、特发性肝炎^[1], 占暴发性肝炎的24%-47%^[2], 急性肝炎的10%-20%^[3-4], 慢性肝炎的5%^[5], 其病因和发病机制隐匿, 肝组织学特征不明显. 关于隐源性肝炎病因及发病机制的研究较多, 但至今尚未有某种学说得到公认. 陈京龙 *et al*^[6]用噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白, 得到相应基因序列, 我们对其筛到的新基因进行原核表达, 并将所表达的蛋白纯化和复性, 为进一步研究蛋白功能, 探讨隐源性肝炎发病的分子生物学机制提供了条件.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系Huh7及大肠杆菌DH5 α , BL21为本室保存, Taq酶, T4DNA连接酶、pGEM-T, IPTG及X-Gal购于Promega公司, 玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司, 限制性核酸内切酶Xho I, BamH I 购自TaKaRa生物公司, 质粒提取试剂盒, BCA蛋白分析试剂盒购自Sigma公司. 抗His mAb、HRP标记羊抗鼠IgG均购自北京中杉金桥生物公司, ECL化学发光试剂盒购自GE公司. AKTA purifier、His Trap-FF 5亲和层析柱为GE公司产品. 引物合成由上海生工生物技术公司完成, 测序由奥科生物公司完成.

1.2 方法

1.2.1 新基因CHBP2的PCR扩增 陈京龙 *et al*^[6]用噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎相关基因, 挑选克隆测序, 与GenBank数据库进行初步比较, 发现一个新基因, 将该未知功能基因命名为CHBP2, 发现其开放读码框长564 bp, 编码164个氨基酸残基. 根据CHBP2的全长编码基因, 设计2条引物, 有义链引物5'-GGATCCATGAAGCAT TCAAAGAAGAC-3', 引入BamH I 酶切位点, 反义链引物5'-CTCGAGATTTCCTCGCAGCTTT-3',

引入Xho I 酶切位点, 提取Huh7细胞的总RNA, 进行反转录, 以反转录产物cDNA为模板进行PCR, PCR参数如下: 95℃ 5 min预变性, 95℃ 30 s变性, 58℃ 30 s退火, 72℃ 40 s延伸, 共35个循环, 72℃延伸10 min. 获得该基因的PCR产物.

1.2.2 重组表达质粒的构建 将PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-T载体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37℃培养12-16 h, 挑取在培养板上生长的白色菌落提取质粒, 经酶切(BamH I /Xho I)及测序鉴定. BamH I /Xho I 双酶切重组质粒pEGM-T-CHBP2, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至pET-32a(+)载体, 构建成重组质粒pET-32a(+)-CHBP2, 小量提取质粒酶切鉴定.

1.2.3 重组蛋白的表达和纯化 将鉴定为阳性的质粒转化大肠杆菌BL21, 挑取单菌落, 37℃振荡培养12 h, 37℃转摇, 至A₆₀₀ = 0.6, 加入IPTG至终浓度1 mmol/L. 同时设阴性对照, 继续37℃振荡培养2, 4 h. 对经SDS-PAGE电泳证实的表达菌株, 进行大量诱导, 超声裂解破碎, 分别收集裂解上清和沉淀. 将沉淀用包涵体洗液洗涤, 溶于8 mol/L尿素(pH8)中.

1.2.4 融合蛋白的柱上复性和纯化 配制尿素浓度分别为0.5, 1, 2, 3 mol/L的包涵体洗液(其余成分为20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 5 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 10 g/L Triton), 探索最佳洗液条件并依此条件洗涤沉淀3次. 离心收集洗涤后包涵体. A液(8 mol/L尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L PB, 20 mmol/L咪唑)充分溶解包涵体(置摇床低速转摇助溶). 离心收集上清, 经0.22 μ m滤膜滤过后进行复性和纯化. 具体步骤如下: 样品上经5个柱床体积A液洗涤的亲和层析柱, 然后用B液(20 mmol/L咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L PB)逐渐按线性梯度降低尿素浓度至零进行蛋白柱上复性(共40 mL复性液, 流速为5 mL/min), 最后以20-500 mmol/L的咪唑线性梯度洗脱已经复性的融合蛋白, 分别收集洗脱峰, 得到融合蛋白纯品. 蛋白分析试剂盒测定纯化蛋白浓度, SDS-PAGE分析蛋白纯度.

1.2.5 Western blot检测 SDS-PAGE电泳后将凝胶按常规方法转膜(45 V, 1.5 h), 50 g/L脱脂奶粉封闭1 h, 抗His mAb(1:200)孵育3 h, TBST洗膜3次(10 min/次); HRP标记羊抗鼠IgG(1:2500)孵育1 h, TBST洗膜3次(10 min/次), 最后加入显

创新盘点
本文所表达的新基因CHBP2, 经检索, 尚未有人对其进行功能研究. 某种致病因素导致了该基因的异常表达, 或者该基因导致了隐源性肝炎的发病, 均是一个新的领域. 值得探讨. 蛋白的复性是蛋白功能研究中的难点. 该研究应用镍离子亲和层析柱, 完成了蛋白纯化和复性的双重过程. 这也为研究蛋白功能创造了条件.

应用要点
本研究成功表达了
隐性肝炎相关新基
因,为进一步制备该
基因的多克隆抗体、
单克隆抗体以及研
究该基因的功能,探
索隐性肝炎的发病
机制及新的治疗方
案,打下坚实的基础。

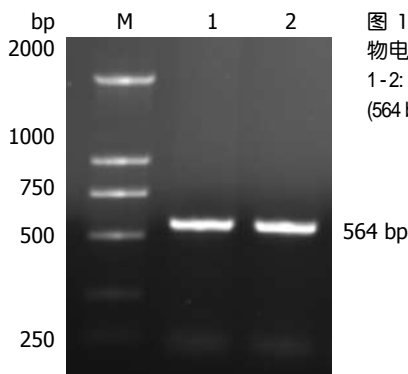


图1 CHBP2 PCR产物电泳图: M: Marker; 1-2: CHBP2电泳条带(564 bp).

色液, X光片曝光。

2 结果

2.1 新基因CHBP2的扩增 应用PCR技术扩增新基因CHBP2(图1), 其CDS共564 bp,将该序列上传美国国立医学图书馆(NLM)国立生物信息中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)并被收录, 编号为EF413023, 编码187个氨基酸残基, 经检索, 未发现该基因功能的相关研究。

2.2 CHBP2重组表达载体的构建 CHBP2的PCR扩增产物连接至pGEM-T载体, 经测序及酶切鉴定正确后, 插入表达载体pET-32a(+)相应的酶切位点上, *Bam*H I/*Xho* I酶切鉴定表明原核表达载体pET-32a(+)-CHBP2构建成功(图2)。

2.3 CHBP2融合蛋白的检测 pET-32a(+)-CHBP2重组质粒转化大肠埃希菌BL21, 经1 mmol/L IPTG诱导2, 4 h后进行SDS-PAGE电泳, 发现在约42 kDa处有一特异条带, 与预测的蛋白分子量一致, 并随着时间增加蛋白表达量呈增多趋势(图3)。Western blot结果表明, CHBP2蛋白特异性强且条带清晰(图4)。

2.4 CHBP2融合蛋白的大量获得 经IPTG 37℃诱导4 h后, 离心集菌。超声破碎菌体, 1 mL超声产物离心分离上清及沉淀, 分别常规制样后取10 μL进行SDS-PAGE。结果表明, 融合蛋白大量诱导表达成功, 表达物基本都存在于沉淀中, 即为包涵体形式。蛋白沉淀电泳显示明显融合蛋白条带, 分子量约42 kDa(图5)。

2.5 CHBP2融合蛋白的柱上复性和纯化 超声后离心分离沉淀, 不同浓度的包涵体洗液洗涤沉淀, 发现尿素浓度为0.5 mol/L时洗涤效果最好。收集充分洗涤后的包涵体, 再用包涵体溶解液充分溶解, 上清经Ni²⁺亲和层析柱纯化、复性。取10 μL纯化融合蛋白进行SDS-PAGE, 软件分析显示纯化融合蛋白纯度在95%左右(图5)。BCA蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度为0.5 g/L。

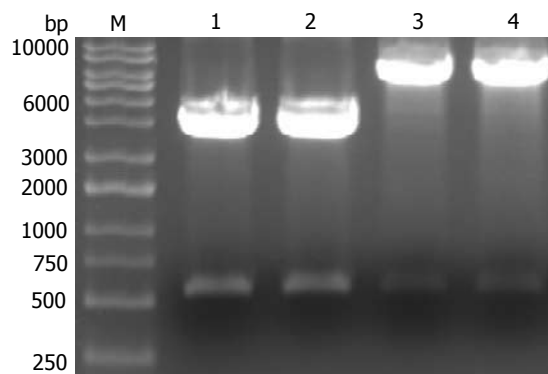


图2 pGEM-T-CHBP2及pET-32a(+)-CHBP2的酶切鉴定: M: Marker; 1-2: pGEM-T-CHBP2的*Bam*H I/*Xho* I酶切鉴定; 3-4: pET-32a(+)-CHBP2的*Bam*H I/*Xho* I酶切鉴定。

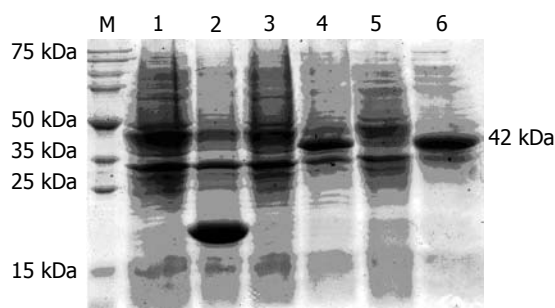


图3 CHBP2融合蛋白表达的SDS-PAGE分析: M: 蛋白Marker; 1: 带有空pET32a(+)载体的未诱导菌株; 2: 带有空pET32a(+)载体的诱导菌株; 3: 带有pET32a(+)-CHBP2的未诱导菌株, 摇菌2 h; 4: 带有pET32a(+)-CHBP2的菌株, 诱导2 h; 5: 带有pET32a(+)-CHBP2的未诱导菌株, 摇菌4 h; 6: 带有pET32a(+)-CHBP2的菌株, 诱导4 h。

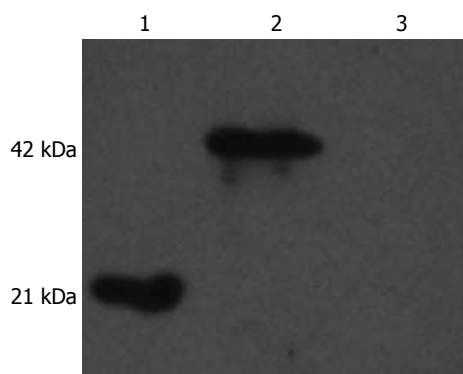


图4 Western blot. 1: 带有空pET32a(+)载体的诱导菌株; 2: 带有pET32a(+)-CHBP2的诱导菌株; 3: 带有pET32a(+)-CHBP2的未诱导菌株。

3 讨论

隐性肝炎的诊断, 首先需排除甲-戊型病毒性肝炎。这也使人们有理由猜测, 应该还有新型的嗜肝病毒存在。随着1997年TT病毒(TTV)^[7]及随后SEN病毒(SENV)、TTV样微小病毒(TTV-like-mini virus, TLMV)等相关病毒的发现, 国内外关

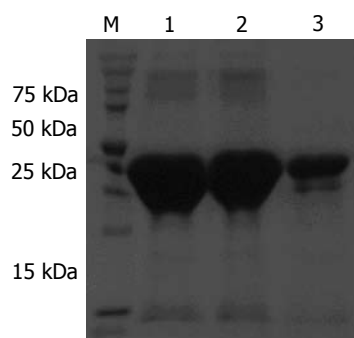


图5 CHBP2融合蛋白的纯化和复性。M: 蛋白Marker; 1: CHBP2融合蛋白大量表达, 沉淀电泳; 2: CHBP2融合蛋白包涵体穿透Ni²⁺亲和层析柱; 3: 纯化、复性的CHBP2融合蛋白。

于新型肝炎病毒的研究和争论就没有停止过。TTV在献血员的感染率为1.9%-62%, 各国报道差距较大^[8-14]。有研究者发现, TTV在各种肝病患者中的检出率要高于献血员^[14-15], 有的研究则从临床或病理方面证实了TTV的致病性^[7,16-18]。但近年来持相反意见的研究者占了多数, 有人认为TTV的感染率在献血员和肝病患者之间无明显差异^[19-20], TTV感染与血清转氨酶的升高及肝脏组织学损伤无明显相关性^[21-26], TTV与其他肝炎病毒无相互作用^[27]。其他几种新病毒的情况也类似。另外, 有研究证实, 在乙型肝炎高流行区, 隐匿性乙型肝炎病毒感染在隐源性肝炎患者中占比例较高^[28-29], 而在中低流行区所占比例则较低^[30-31]。研究者均认为, 仍有比例不等的隐源性肝炎患者病因不明, 需进一步研究。

本研究将陈京龙 *et al*^[6]应用噬菌体表面展示技术筛选得到的隐源性肝炎相关新基因进行原核表达, 并将所表达的蛋白纯化和复性。我们采用柱上复性法对所表达的蛋白包涵体进行复性。首先, 带有His标签的已融于高浓度变性剂的蛋白包涵体与固定化镍离子相结合, 杂蛋白因为不带有His标签而被除去; 随后, 结合于柱上的融合蛋白在变性剂浓度降低过程中逐渐复性; 最后, 通过增加咪唑浓度或降低pH值将复性蛋白从柱上洗脱下来, 从而完成蛋白纯化和复性的双重过程。这也为研究蛋白功能创造了条件。发现一种新的基因, 同时把其编码的新蛋白的结构与生物学功能、与生物学和临床医学之间的相互关系、以及新基因表达调节的机制阐明, 是目前基因的分子生物学研究领域中最具挑战性的工作^[32]。有研究指出, 病毒等病原体基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间相互作用, 可能是病原体致病的重要分子机制^[33]。某种致病因素导致了新基因CHBP2的异常表达, 或者该基因的表达导致了隐源性肝炎的发病, 均值得进一步探讨。我们将隐源性肝炎相关新基因CHBP2编码蛋白成功表达、纯化、复性, 为进一步研

究蛋白功能, 探讨隐源性肝炎发病的分子生物学机制, 打下了坚实的基础。

4 参考文献

- 1 范建高. 隐源性肝炎的病因分类与处理. 中华传染病杂志 2003; 21: 386-389
- 2 Detre K, Belle S, Beringer K, Daily OP. Liver transplantation for fulminant hepatic failure in the United States: October 1987 through December 1991. *Clin Transplant* 1994; 8: 274-280
- 3 Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-1905
- 4 Alter HJ, Bradley DW. Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis* 1995; 15: 110-120
- 5 Kodali VP, Gordon SC, Silverman AL, McCray DG. Cryptogenic liver disease in the United States: further evidence for non-A, non-B, and non-C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1836-1839
- 6 陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖. 噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3509-3512
- 7 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97
- 8 Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* 1999; 57: 259-263
- 9 Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J Med Virol* 1998; 56: 234-238
- 10 Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998; 352: 191-195
- 11 Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Erker JC, Simons JN, Chalmers ML, Birkenmeyer LG, Pilot-Matias TJ, Mushahwar IK. Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. *J Infect Dis* 1999; 179: 1242-1244
- 12 凌斌华, 庄辉, 李奎, 杨永芳, 李盛, 马为民, 王跃民. 我国不同人群输血传播病毒感染调查. 中华流行病学杂志 1999; 20: 277-279
- 13 Zhong S, Yeo W, Lin CK, Lin XR, Tang MW, Johnson PJ. Quantitative and genotypic analysis of TT virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion* 2001; 41: 1001-1007
- 14 Tuveri R, Jaffredo F, Lunel F, Nalpa B, Pol S, Feray C, Marcellin P, Thibault V, Delagneau JF, Opolon P, Scarpa B, Brechot C, Thiers V. Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and non viral-

同行评价
本文从隐源性肝炎的发病与肝细胞某些基因的相关性入手, 将隐源性肝炎相关新基因成功表达, 方法先进, 结果可靠, 为进一步研究隐源性肝炎的发病机制打下了基础。

- related liver diseases. *J Hepatol* 2000; 33: 121-127
- 15 Al-Moslih MI, Abuodeh RO, Hu YW. Detection and genotyping of TT virus in healthy and subjects with HBV or HCV in different populations in the United Arab Emirates. *J Med Virol* 2004; 72: 502-508
- 16 Tomasiewicz K, Modrzewska R, Lyczak A, Polz-Dacewicz M, Rajtar B. TT virus (TTV)--etiologic agent of acute hepatitis? *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 2004; 59: 539-542
- 17 Kasirga E, Sanlidag T, Akcali S, Keskin S, Aktas E, Karakoc Z, Helvacı M, Sozen G, Kuzu M. Clinical significance of TT virus infection in children with chronic hepatitis B. *Pediatr Int* 2005; 47: 300-304
- 18 郎振为, 许德军, 周育森, 阎惠平, 金荣华, 李俊强. 纯TTV感染的临床病理. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 226
- 19 Masia G, Ingianni A, Demelia L, Faa G, Manconi PE, Pilleri G, Ciancio A, Rizzetto M, Coppola RC. TT virus infection in Italy: prevalence and genotypes in healthy subjects, viral liver diseases and asymptomatic infections by parenterally transmitted viruses. *J Viral Hepat* 2001; 8: 384-390
- 20 Erensoy S, Sayiner AA, Turkoglu S, Canatan D, Akarca US, Sertoz R, Ozacar T, Batur Y, Badur S, Bilgic A. TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection* 2002; 30: 299-302
- 21 Dai CY, Yu ML, Hou C, Lu SN, Wang JH, Huang JF, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Tsai JF, Wang LY, Chuang WL, Chang WY. Clinical characteristics and distribution of genotypes of TT virus infection in a hepatitis C virus-hyperendemic township of a hepatitis B virus-endemic country (Taiwan). *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1192-1197
- 22 Dai CY, Yu ML, Chuang WL, Sung MH, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY. Epidemiology and clinical significance of chronic hepatitis-related viruses infection in hemodialysis patients from Taiwan. *Nephron* 2002; 90: 148-153
- 23 Hsu HY, Ni YH, Chen HL, Kao JH, Chang MH. TT virus infection in healthy children, children after blood transfusion, and children with non-A to E hepatitis or other liver diseases in Taiwan. *J Med Virol* 2003; 69: 66-71
- 24 Komatsu H, Inui A, Sogo T, Kuroda K, Tanaka T, Fujisawa T. TTV infection in children born to mothers infected with TTV but not with HBV, HCV, or HIV. *J Med Virol* 2004; 74: 499-506
- 25 Kheradpezhoh M, Taremi M, Gachkar L, Aghabozorgi S, Khoshbaten M. Presence and significance of transfusion-transmitted virus infection in Iranian patients on maintenance hemodialysis. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 106-111
- 26 Das K, Kar P, Gupta RK, Das BC. Role of transfusion-transmitted virus in acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure of unknown etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 406-412
- 27 Irshad M, Sharma Y, Dhar I, Singh J, Joshi YK. Transfusion-transmitted virus in association with hepatitis A-E viral infections in various forms of liver diseases in India. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2432-2436
- 28 Chan HL, Tsang SW, Leung NW, Tse CH, Hui Y, Tam JS, Chan FK, Sung JJ. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence of HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1211-1215
- 29 何忠平, 庄辉, 宋淑静, 王雪萍, 王融冰, 刘庄. 临床诊断为非甲-戊型肝炎患者的病原学研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002; 16: 7-10
- 30 Marrero JA, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection in patients with hepatocellular carcinoma: Innocent bystander, cofactor, or culprit? *Gastroenterology* 2004; 126: 347-350
- 31 Kaviani MJ, Behbahani B, Mosallai MJ, Sari-Aslani F, Taghavi SA. Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5048-5050
- 32 成军. 新基因结构与功能研究的策略. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 373-377
- 33 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003; 124: 327-334

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展,中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作.此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊,其中,社科期刊110种、科技期刊86种.评估结果如下:一级(优秀)期刊共88种,其中社科期刊42种,科技期刊46种,包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志;二级期刊共103种,其中社科期刊64种,科技期刊39种;三级期刊共5种,其中社科期刊4种,科技期刊1种.(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅 2007-01-30)

槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝核转录因子表达的影响

张 禁, 谭诗云, 蒋 琳, 朱卫芳, 程景辉

张禁, 谭诗云, 朱卫芳, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
蒋琳, 武汉大学人民医院检验科 湖北省武汉市 430060
程景辉, 湖北省嘉鱼县人民医院内科 437200
张禁, 武汉大学人民医院硕士, 主要从事脂肪肝防治研究。
通讯作者: 谭诗云, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路238号, 武汉大学人民医院消化内科. tanshiyun@medmail.com.cn
电话: 027-88041919-2135
收稿日期: 2007-04-02 修回日期: 2007-07-21

Effects of quercetin on the expression of nuclear factor kappaB in alcoholic fatty liver of rats

Jin Zhang, Shi-Yun Tan, Lin Jiang, Wei-Fang Zhu, Jing-Hui Cheng

Jin Zhang, Shi-Yun Tan, Wei-Fang Zhu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Lin Jiang, Department of Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Jing-Hui Cheng, Department of Medicine, Renmin Hospital of Jiayu Country, Jiayu 437200, Hubei Province, China
Correspondence to: Shi-Yun Tan, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. tanshiyun@medmail.com.cn
Received: 2007-04-02 Revised: 2007-07-21

Abstract

AIM: To explore the effect and possible mechanism of quercetin on alcoholic fatty liver (AFL) in rats.

METHODS: Forty-eight male wistar rats were randomly divided into four groups: normal control, model, quercetin and naloxone groups. By the end of the fourth week, all rats were weighed, narcotized, sacrificed, and tested for expression levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in plasma. Liver samples were analyzed for common histopathological changes and the expression of nuclear factor kappaB (NF- κ B) was measured by immunohistochemical staining.

RESULTS: Levels of AST, ALT, and TNF- α in

plasma were markedly lower in the quercetin and naloxone groups than the model group (quercetin, 150.7 ± 23.6 U/L, 57.4 ± 8.4 U/L, 0.83 ± 0.27 μ g/L; naloxone, 148.3 ± 21.4 U/L, 55.2 ± 7.3 U/L, 0.85 ± 0.34 μ g/L vs 205.0 ± 31.5 U/L, 70.5 ± 9.2 U/L, 4.08 ± 1.23 μ g/L; $P < 0.05$), but were higher in the quercetin and naloxone groups than in the normal contrast group (127.6 ± 17.8 U/L, 47.9 ± 7.1 U/L, 0.22 ± 0.10 μ g/L; $P < 0.05$). Compared with the model group, the degree of liver fatty degeneration in the quercetin and naloxone groups was slight, and the expression level of NF- κ B in liver tissue was clearly lower in the quercetin group ($60.27/\text{HP}$ vs $28.49/\text{HP}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Quercetin may have a role in preventing alcoholic fatty liver by inhibiting expression of NF- κ B and TNF- α .

Key Words: Alcoholic fatty liver; Quercetin; Tumor necrosis factor-alpha; Nuclear factor kappaB; Rat

Zhang J, Tan SY, Jiang L, Zhu WF, Cheng JH. Effects of quercetin on the expression of nuclear factor-kappaB in alcoholic fatty liver of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2399-2402

摘要

目的: 探讨槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝的防治作用及其可能机制。

方法: Wistar δ 鼠48只, 随机分为: 正常对照、酒精性脂肪肝模型、槲皮素处理、纳洛酮处理4组。实验4 wk末, 处死所有大鼠, 检测血AST, ALT和TNF- α , 并行肝脏病理组织学及核转录因子(NF- κ B)表达的检测。

结果: 槲皮素和纳洛酮组血AST, ALT和TNF- α 明显低于模型组(槲皮素组: 150.7 ± 23.6 U/L, 57.4 ± 8.4 U/L, 0.83 ± 0.27 μ g/L; 纳洛酮组: 148.3 ± 21.4 U/L, 55.2 ± 7.3 U/L, 0.85 ± 0.34 μ g/L vs 205.0 ± 31.5 U/L, 70.5 ± 9.2 U/L, 4.08 ± 1.23 μ g/L; $P < 0.05$), 而高于正常对照组(127.6 ± 17.8 U/L, 47.9 ± 7.1 U/L, 0.22 ± 0.10 μ g/L; $P < 0.05$)。槲皮素和纳洛酮组肝脏脂肪变

背景资料

酒精性肝病在我国发病率越来越高, 目前国内外尚无针对酒精性脂肪肝的满意治疗药物。槲皮素具有较强的抗氧化、清除自由基、降血糖、降血脂及降低血压作用。本研究通过其干预实验性酒精性脂肪肝大鼠的体内研究, 探讨其作用机制。

创新盘点
本文采用槲皮素干预实验性酒精性脂肪肝大鼠模型,检测血AST、ALT和TNF- α 的含量,并行肝脏病理组织学及核转录因子(NF- κ B)表达的检测。分析了槲皮素的作用机制。为临床应用槲皮素治疗酒精性脂肪肝提供了实验依据。

程度较模型组轻,且槲皮素组肝内NF- κ B表达水平显著低于模型组(60.27个/HP vs 28.49个/HP, $P < 0.05$)。

结论: 槲皮素可能通过抑制NF- κ B及TNF- α 的表达,发挥防治酒精性脂肪肝的作用。

关键词: 酒精性脂肪肝; 槲皮素; 肿瘤坏死因子- α ; 核转录因子; 大鼠

张禁, 谭诗云, 蒋琳, 朱卫芳, 程景辉. 槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝核转录因子表达水平的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2399-2402
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2399.asp>

0 引言

随着生活水平及生活方式的改变,酒精消耗量逐年增加,酒精性肝病在我国发病率也越来越高^[1]。目前国内外尚无针对酒精性脂肪肝的满意治疗药物^[2-7]。槲皮素是一种从植物中提取的具有多种生物活性且无明显毒副作用的黄酮类化合物,具有较强的抗氧化、清除自由基、降血糖、降血脂及降低血压作用^[8-11]。我们通过建立大鼠酒精性脂肪肝模型,以探讨槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝的防治作用及其可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 槲皮素购自Sigma公司。二锅头白酒(520 mL/L, 150 mL/L)由北京双庆和酒业有限责任公司生产, NF- κ B p50兔抗鼠多抗, 购自中山生物公司分装Santa Cruz公司, 生物素标记的兔抗大鼠与兔抗山羊IgG(二抗)购自Sigma公司; SABC复合物与DAB显色试剂盒购自Sigma公司。免疫组织化学LsAB kit购自武汉博士德公司。健康♂ Wistar大鼠48只, 体质量180-220 g, 购自武汉市实验动物中心。

1.2 方法^[12] 大鼠正常喂养1 wk后, 随机抽取12只作为正常对照组, 给予生理盐水15 mL/kg ig, 每日上午1次; 喂以普通饲料; 其余36只大鼠d1-3给予150 mL/L二锅头白酒15 mL/kg ig, 每日上午1次; d4起再随机分为模型组($n = 12$)、槲皮素处理组($n = 12$)和纳洛酮处理组($n = 12$), 给予520 mL/L二锅头白酒15 mL/kg ig, 每日上午1次, 饲以自制饲料(普通饲料: 猪油为85:15, 每千克饲料加硫酸亚铁5 g)。所有大鼠自始至终均自由饮水。在二锅头白酒ig后1 h, 模型组给予生理盐水5 mL/kg, ip; 槲皮素处理组给予槲皮素0.5 mg/kg, ip; 纳洛酮处理组给予纳洛酮0.08 mg/kg, ip;

正常对照组给予生理盐水5 mL/kg, ip。4 wk末, 所有大鼠禁食禁水一晚, d2上午称体质量, 麻醉, 心尖部采血, 离心, 随后处死动物, 取全肝称质量。计算肝指数: 肝脏湿质量/鼠质量(g/kg)。血清AST, ALT应用日立7060全自动生化分析仪测定, 严格按照试剂盒说明书操作。肝组织块, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m厚切片, HE染色, 光镜下观察肝脏脂肪变性的程度: 脂肪变肝细胞达30%-50%者为轻度, 50%-75%者为中度, 大于75%者为重度。血清TNF- α 的测定采用双抗体夹心法。用抗TNF mAb T5和T6包板, 以100 mL/L小牛血清封闭, 加入待测血清及倍比稀释的标准TNF- α , 继之加入TNF- α 抗体及辣根过氧化物酶羊抗兔抗体, 底物显色剂, 中止反应后测A值, 根据标准曲线计算TNF- α 的浓度(试剂盒由军事医学科学院生产)。另石蜡切片, 常规抗原修复, 阻断内源性过氧化氢酶, 用抗鼠的NF- κ B抗体检测, 最后DAB复合底物显色。

统计学处理 检测结果以mean \pm SD表示, 采用 t 检验, 用SPSS10.0软件进行数据分析。组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝指数及体质量 模型组和槲皮素处理组各有1只大鼠因酒精误呛入肺而死亡。纳洛酮处理组有2只大鼠因ig不慎而致胃穿孔死亡。死因均经术后病理解剖证实。体质量变化模型组与槲皮素处理组、纳洛酮处理组之间差别不大($P > 0.05$), 与正常对照组相比差异有显著性($P < 0.05$)。模型组与纳洛酮处理组、槲皮素处理组、正常对照组相比, 肝指数逐渐降低, 差异有显著性($P < 0.05$); 槲皮素处理组和纳洛酮处理组之间差别不大($P > 0.05$)。

2.2 肝组织病理学 正常对照组肝脏颜色红润, 质软。模型组肝脏肿大, 呈明显红白花纹, 整个肝脏颜色黄腻。槲皮素处理组和纳洛酮处理组肝脏大多颜色红润, 但个别可见红白花纹。光镜下观察, 正常对照组肝细胞排列整齐, 肝脏结构完全正常。模型组表现为中度或重度脂肪肝, 病变成弥漫性, 肝细胞索排列紊乱, 肝细胞内脂滴大小不等, 肝细胞核被挤压移位, 肝细胞肿胀呈气球样变, 可见炎性细胞浸润。处理组(槲皮素处理组、纳洛酮处理组)表现为轻度脂肪肝, 有少数炎性细胞浸润。

2.3 血AST、ALT及TNF- α 模型组与正常对照

表 1 槲皮素、纳洛酮对大鼠肝指数、体质量, 血AST、ALT和TNF- α 变化的影响(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	肝指数(g/kg)	体质量变化(g)	AST(U/L)	ALT(U/L)	TNF- α (μ g/L)
正常对照	12	3.5 \pm 0.3 ^a	37.9 \pm 5.3 ^a	127.6 \pm 17.8 ^a	47.9 \pm 7.1 ^a	0.22 \pm 0.10 ^a
模型	11	5.4 \pm 0.4	19.2 \pm 7.3	205.0 \pm 31.5	70.5 \pm 9.2	4.08 \pm 1.23
槲皮素	11	4.2 \pm 0.6 ^a	26.8 \pm 6.0	150.7 \pm 23.6 ^a	57.4 \pm 8.4 ^a	0.83 \pm 0.27 ^a
纳洛酮	10	4.2 \pm 0.4 ^a	27.0 \pm 5.4	148.3 \pm 21.4 ^a	55.2 \pm 7.3 ^a	0.85 \pm 0.34 ^a

^a*P* < 0.05 vs 模型。

组相比, AST, ALT活性和TNF- α 含量明显升高(*P* < 0.05); 处理组与模型组相比, AST, ALT活性和TNF- α 含量明显下降(*P* < 0.05); 槲皮素处理组和纳洛酮处理组之间差别不大(*P* > 0.05, 表1)。

2.4 肝组织NF- κ B的表达 部分肝细胞胞质呈阳性染色反应。阳性细胞的数量在模型组(60.27 \pm 11.43个/HP)(图1B)较正常对照组(28.49 \pm 9.77个/HP)(图1A)明显增高(*P* < 0.05), 且多为沿血管区表达, 与脂肪细胞浸润伴行。与之相比, 槲皮素治疗组(图1C)肝组织NF- κ B阳性细胞数目明显减少, 且散在分布, 与血管无明显相关性。

3 讨论

近来, 平均每年约有12%的酒精性脂肪肝患者发生肝硬化, 一小部分甚至可发展成肝癌。纳洛酮对酒精性脂肪肝有防治作用^[13-14]。槲皮素及其衍生物是植物界分布最广、具有多种生物活性的黄酮类化合物, 近年来发现他有许多新作用和多种生物效应如抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等。其部分作用机制可能与TNF- α 有关^[15-16], 但其对抗脂肪肝的作用目前还不十分清楚, 我们通过酒精性脂肪肝动物模型探讨了槲皮素与TNF和NF- κ B之间的某些关系。给予酒精及高脂饮食4 wk后, 模型组AST, ALT明显升高, 且肝脏发生水样变性和脂肪变性的病理改变, 表明酒精中毒性脂肪肝模型成立。我们发现, 槲皮素及纳洛酮组血浆AST, ALT和TNF- α 含量明显低于模型组(*P* < 0.05), 而高于正常对照组(*P* < 0.05)。且TNF与转氨酶之间也存在一定的关系, 转氨酶升高者, TNF的水平也显著升高。在模型组中, 肝组织中可见炎性细胞浸润, 此为TNF产生的基础, 肝脏内生成的TNF可直接作用于肝细胞造成坏死和炎症, 同时TNF- α 引发的中性粒细胞通过释放蛋白酶或氧自由基也可造成肝损害。提示TNF等多种细胞因子在酒精性肝损害模型中起着一定的作用^[17-21]。在槲皮素、纳洛酮组肝脏脂肪变性程度较模型组轻, 免疫组织化学检查显示, NF- κ B

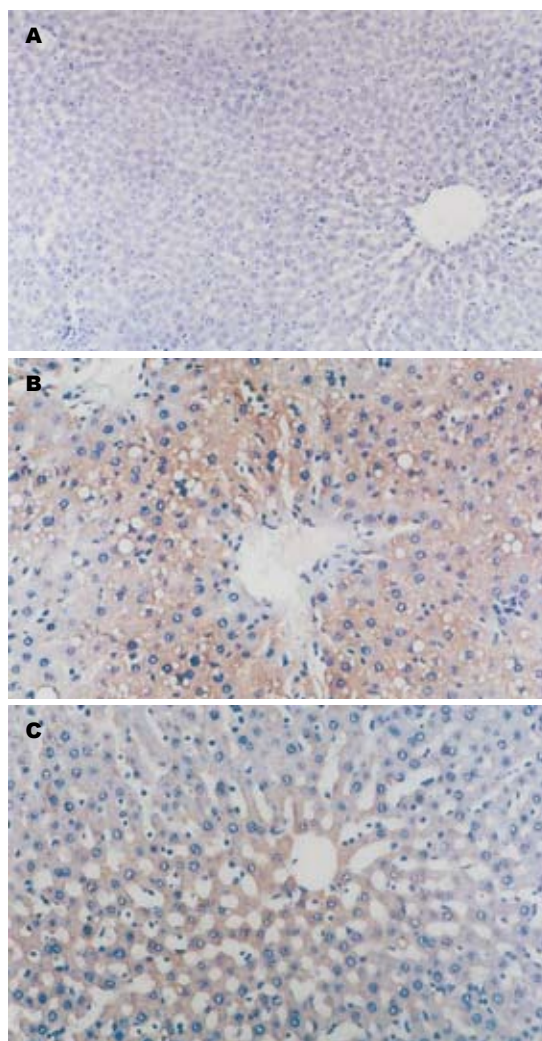


图 1 大鼠肝组织NF- κ B表达(SABC \times 400)。A: 正常肝组织; B: 模型组; C: 槲皮素治疗组。

在槲皮素处理组的大鼠肝组织中表达明显少于模型组, 与正常对照组肝脏镜下表现接近; 槲皮素组与模型组相比, 肝指数明显下降。这些也都从侧面说明了槲皮素对酒精性脂肪肝的形成具有一定防治作用。原因为: 槲皮素能清除氧自由基, 减轻或抵消酒精及其代谢物乙醛产生的脂质过氧化损伤, 增加肝脏的能量代谢, 起到保护肝脏的作用。据报道, 槲皮素能抑制许多酶的活

应用要点

本研究证实了槲皮素能降低血AST、ALT浓度并可抑制NF- κ B及TNF- α 的表达, 发挥防治酒精性脂肪肝的作用, 进一步为临床应用槲皮素治疗酒精性脂肪肝提供了理论依据。

名词解释

皮素: 槲皮素化学名为3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮, 是一种从植物中提取的具有多种生物活性且无明显毒副作用的黄酮类化合物, 具有较强的抗氧化、清除自由基、降血糖、降血脂及降血压作用。

同行评价

本文研究了槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝的作用。结果提示他可能通过可能通过抑制NF- κ B及TNF- α 的表达,发挥防止酒精性脂肪肝的作用。分析有据,论证有理,结构严谨,数据可信,有一定的可读性。

性例如蛋白酶C和酪氨酸激酶,其抗炎作用机制与其抗氧化作用密切相关^[10-11]。槲皮素是一种非特异性蛋白激酶抑制剂和TNF- α 诱导的NF- κ B活化的抑制剂,他可能是通过阻断IKB α 的降解从而阻断接下来的NF- κ Bp65亚基的核转位而发挥作用^[22-24]。

此外,我们在实验中也发现,虽然槲皮素可以改善酒精性脂肪肝的生化指标,但未能将这些生化指标调节到正常水平,可能与槲皮素用量不足或其他因素有关。值得在以后的研究中进一步探索。

4 参考文献

- 1 陈晓超,刘树滔,陈躬瑞,饶平凡. 酒精性肝炎的治疗进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1130-1136
- 2 Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 1637-1648
- 3 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 4 范建高. 衣食住行与脂肪肝酒精肝防治. 重庆: 重庆出版社, 2002: 198
- 5 Tsutsumi And M, Takase S. Effect of fenofibrate on fatty liver in rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 75S-79S
- 6 Lumeng L, Crabb DW. Alcoholic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 211-220
- 7 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644
- 8 Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, Egawa T, Kitamura Y, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Neuroprotective Effects of Quercetin and Rutin on Spatial Memory Impairment in an 8-Arm Radial Maze Task and Neuronal Death Induced by Repeated Cerebral Ischemia in Rats. *J Pharmacol Sci* 2007
- 9 Sun H, Cheng XP, You-Ye Z, Jiang P, Zhou JN. Quercetin subunit specifically reduces GlyR-mediated current in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 2007
- 10 Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J*

Hepatol 2007; 47: 253-261

- 11 Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin Prevents Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *Dig Dis Sci* 2007
- 12 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞. 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1189-1192
- 13 曹绍歧, 谭诗云, 冯志强, 沈志祥. 纳洛酮对鼠酒精性脂肪肝血浆 β -内啡肽水平的影响. 中国药理学通报 2004; 20: 1276-1279
- 14 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 漆楚波, 郭洁, 李海霞. 纳洛酮和必需磷脂防治酒精性脂肪肝的实验研究. 中华消化杂志 2003; 23: 752-753
- 15 Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1671-1683
- 16 Ruiz PA, Braune A, Holzwimmer G, Quintanilla-Fend L, Haller D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr* 2007; 137: 1208-1215
- 17 冯志强, 沈志祥, 谭诗云. 酒精性脂肪肝的发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 346-348
- 18 Song Z, Zhou Z, Uriarte S, Wang L, Kang YJ, Chen T, Barve S, McClain CJ. S-adenosylhomocysteine sensitizes to TNF-alpha hepatotoxicity in mice and liver cells: a possible etiological factor in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 40: 989-997
- 19 Prandota J. Important role of prodromal viral infections responsible for inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes in the pathomechanism of idiopathic Reye's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, autoimmune hepatitis, and hepatotoxicity of the therapeutic doses of acetaminophen used in genetically predisposed persons. *Am J Ther* 2002; 9: 149-156
- 20 Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol Res* 2004; 28: 1-11
- 21 Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20: 39-47
- 22 Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res* 2007; 56: 210-215
- 23 Hutter D, Greene JJ. Influence of the cellular redox state on NF-kappaB-regulated gene expression. *J Cell Physiol* 2000; 183: 45-52
- 24 Nathens AB, Bitar R, Watson RW, Issekutz TB, Marshall JC, Dackiw AP, Rotstein OD. Thiol-mediated regulation of ICAM-1 expression in endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* 1998; 160: 2959-2966

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

高迁移率族蛋白1对多形核白细胞黏附和游出肺毛细血管内皮细胞的影响及其机制

杨智勇, 陶京, 周峰, 熊炯炘, 吴河水, 王春友

杨智勇, 陶京, 周峰, 熊炯炘, 吴河水, 王春友, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科 湖北省武汉市 430022
杨智勇, 1999年华中科技大学学士, 2002年华中科技大学硕士, 2005年华中科技大学博士, 主治医师. 主要从事胰腺疾病研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30600593
通讯作者: 杨智勇, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科. dryzy@163.com
电话: 027-85351621
收稿日期: 2007-04-16 修回日期: 2007-07-11

Effect and mechanism of high mobility group box 1 protein on adhesion to pulmonary capillary endothelial cells and transendothelial migration of polymorphonuclear leucocytes

Zhi-Yong Yang, Jing Tao, Feng Zhou, Jiong-Xin Xiong, He-Shui Wu, Chun-You Wang

Zhi-Yong Yang, Jing Tao, Feng Zhou, Jiong-Xin Xiong, He-Shui Wu, Chun-You Wang, Department of Pancreatic Surgery, Xiehe Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600593

Correspondence to: Zhi-Yong Yang, Department of Pancreatic Surgery, Xiehe Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. dryzy@163.com

Received: 2007-04-16 Revised: 2007-07-11

Abstract

AIM: To observe the effect of high mobility group box 1 protein (HMGB1) on adhesion to pulmonary capillary endothelial cells (PCECs) and transendothelial migration of polymorphonuclear leucocytes (PMNs), and to investigate the mechanism involved.

METHODS: PMNs and PCECs of rats were isolated and cultured. PCEC monolayers were cultured with different concentrations of rHMGB1, 10, 10, 100, 1000 or 10 000 $\mu\text{g/L}$. The adhesion rate of PMNs was then detected. A migration model of a boyden chamber was used to evaluate chemotaxis of HMGB1 to PMNs. Transendo-

thelial migration was also investigated. PMNs were cultured with 100 $\mu\text{g/L}$ rHMGB1 and the expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 was detected by flow cytometry.

RESULTS: With increasing rHMGB1 concentration, adhesion and transendothelial migration rates of PMNs gradually increased (adhesion rate, $2.5 \pm 0.5\%$, $5.1 \pm 0.9\%$, $10.7 \pm 1.7\%$, $14.6 \pm 2.6\%$, and $25.4 \pm 4.3\%$; transendothelial migration rate, 0% , $1.1\% \pm 0.3\%$, $6.3 \pm 1.2\%$, $12.4 \pm 2.7\%$, and $14.2 \pm 3.1\%$). rHMGB1 could increase CD11a/CD18 and CD11b/CD18 expression of PMNs (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: HMGB1 is not a chemotactic factor for PMNs but it can promote their adhesion and transendothelial migration by increasing expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 on the surface of PMNs.

Key Words: High mobility group box 1 protein; Polymorphonuclear leucocytes; Pulmonary capillary endothelial cell; Cell adhesion; Transendothelial migration; CD11/CD18; Flow cytometry

Yang ZY, Tao J, Zhou F, Xiong JX, Wu HS, Wang CY. Effect and mechanism of high mobility group box 1 protein on adhesion to pulmonary capillary endothelial cells and transendothelial migration of polymorphonuclear leucocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2403-2407

摘要

目的: 探讨高迁移率族蛋白1(HMGB1)对多形核白细胞(PMN)黏附和游出肺毛细血管内皮细胞(PCEC)的影响机制。

方法: 分离培养大鼠PMN和PCEC, 分别加入0, 10, 100, 1000和10 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度的rHMGB1与PCEC单层培养. 记录PMN黏附率. 在Boyden小室迁移模型中加入上述浓度的rHMGB1, 观察PMN穿过PCEC的迁移率. 将PMN与100 $\mu\text{g/L}$ 的rHMGB1孵育, 流式细胞仪检测其表面CD11a/CD18和CD11b/CD18的表达式。

背景资料

HMGB1一直被认
为只是1种DNA
结合蛋白. 近年
来发现, 在细胞外
HMGB1是1种重
要的炎症介质, 与
多种炎症疾病的
发生发展密切相
关. HMGB1在数
种急性肺损伤动
物模型中均高表
达, 但其作用并不
完全清楚。

研发前沿
ALI是急性胰腺炎患者最常出现的胰外脏器损伤,致损伤机制还不完全明了。我们的前期研究提示HMGB1参与了急性胰腺炎ALI的发展。本研究有助于进一步认识ALI持续进展的机制。

结果: 随着rHMGB1浓度的增加, PMN的粘附率($2.5\% \pm 0.5\%$, $5.1\% \pm 0.9\%$, $10.7\% \pm 1.7\%$, $14.6\% \pm 2.6\%$, $25.4\% \pm 4.3\%$)和穿过PCEC的游出率(0% , $1.1\% \pm 0.3\%$, $6.3\% \pm 1.2\%$, $12.4\% \pm 2.7\%$, $14.2\% \pm 3.1\%$)逐渐增加, 但对向下室的迁移率无影响。rHMGB1可明显增加PMN表面CD11a/CD18和CD11b/CD18表达的阳性率(均 $P < 0.05$)。

结论: HMGB1通过上调CD11a/CD18和CD11b/CD18的表达增加PMN对PCEC的黏附率和游出率。

关键词: 高迁移率族蛋白1; 多形核白细胞; 肺毛细血管内皮细胞; 黏附; 游出; CD11/CD18; 流式细胞仪

杨智勇, 陶京, 周峰, 熊炯忻, 吴河水, 王春友. 高迁移率族蛋白1对多形核白细胞黏附和游出肺毛细血管内皮细胞的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2403-2407
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2403.asp>

0 引言

高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)是一类广泛存在于真核细胞内的非组核蛋白^[1-2]。HMGB1是一个重要的转录调节因子^[3-6], 与细胞的生长、分化有关^[7-11]。近年来, 研究显示HMGB1在细胞外是一种重要的炎症因子, 在脓毒症、风湿性关节炎、弥散性血管内凝血、出血性休克、急性肺损伤等多种疾病中发挥作用^[12-20]。我们的前期研究显示, HMGB1在急性出血坏死性胰腺炎大鼠肺部高表达, 提示其可能作为晚期炎症因子参与了急性肺损伤(ALI)的发展, 但机制并不十分清楚。

多形核中性白细胞(PMN)的过度激活在急性胰腺炎ALI的发生中起重要作用, 具体表现为PMN聚集和最终脱颗粒释放蛋白水解酶、炎症细胞因子、氧自由基、血管活性物质等启动炎症级联反应导致肺损伤。有研究显示HMGB1可激活PMN合成IL-1 β 、IL-8和TNF- α ; 小鼠气管内滴入HMGB1可导致ALI, 表现为PMN在肺部聚集、肺水肿、肺组织学评分增加^[21], 提示HMGB1可使PMN向肺部聚集、分泌炎症因子导致肺损伤。但是PMN向肺组织渗出要经过趋化、贴壁、滚动、黏附和游出一系列的过程, HMGB1在此过程中所起的作用及其机制未见报道。本课题对此进行了进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 I型胶原酶、rHMGB1(美国Sigma公

司); 小牛血清、牛血清白蛋白、RPMI 1640培养基、DMEM培养基、胰蛋白酶(美国Gibco公司); Transwell嵌套培养板(6.5 mm \times 12孔、聚碳酸酯膜、微孔直径5 μ m, 丹麦Costar Corning公司); 抗CD11a/CD18抗体和抗CD11b/CD18抗体(小鼠IgG1 mAb)、FITC标记抗小鼠IgG1抗体(美国Genzyme公司); VIII因子抗体、碱性磷酸酶标记的二抗、苏木精染液、淋巴细胞分离液(北京中山生物公司); 免疫组化SP试剂盒(武汉博士德公司); 清洁级成年 δ SD大鼠(200-250 g, 华中科技大学同济医学院实验动物学部)。实验通过同济医学院医学伦理委员会审核。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肺毛细血管内皮细胞(PCEC)分离培养 成年SD大鼠, 断颈处死。10 g/L活力碘浸泡消毒。无菌下开胸暴露肺组织, 沿肺叶边缘2-3 mm剪下肺组织, 放入D-Hank's液2 mL中漂洗2次。洗净的肺组织剪成1 mm³的组织碎块, 剪时可在瓶中滴入DMEM培养液2-3滴和小牛血清1滴, 将剪碎的肺组织吸入100 mL培养瓶, 平铺于瓶底, 放入37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂-950 mL/L空气贴壁2-3 h^[22], 加入DMEM培养液(100 mL/L小牛血清)5 mL后, 培养60-72 h后, 换液去掉肺组织碎片。继续培养7-10 d, 每隔2 d换液1次, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化传代。倒置光学显微镜下观察细胞生长、传代过程中的形态学变化, 以及细胞内的显微结构, 并进一步采用VIII因子免疫组化染色鉴定^[2]。取2-3代细胞做实验。

1.2.2 PMN分离培养 PMN分离培养参照文献[3]方法进行。大鼠以10 g/L戊巴比妥钠(35 mg/kg)ip麻醉成功后, 颈动脉插管采血, Hanks液(含50 mL/L小牛血清)2倍稀释后加在淋巴细胞分离液层面上, 500 g离心8 min, 吸弃上层血浆和单个核白细胞, 向下层粒细胞和红细胞中加入5倍体积的红细胞溶解液, 0 $^{\circ}$ C溶解15 min后400 g离心10 min, Hanks液洗2次后弃上清, RPMI 1640(含100 mL/L小牛血清)重悬, 调细胞浓度 1×10^9 /L, 涂片Gimsa染色分类计数PMN纯度 $>92\%$, 台盼蓝染色活细胞计数 $>95\%$ 。

1.2.3 PMN黏附试验 将PCEC(1×10^6 /well)接种在包被纤维连接蛋白的12孔培养板中, 在50 mL/L CO₂-950 mL/L空气37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h; PCEC融合成单层后, 去血清培养24 h; 换新鲜无血清RPMI 1640培养液(含10 g/L BSA), 按实验分组分别加入PMN 100 μ L(10^6 个)和终浓度为0, 10, 100, 1000和10 000 μ g/L的rHMGB1培养30

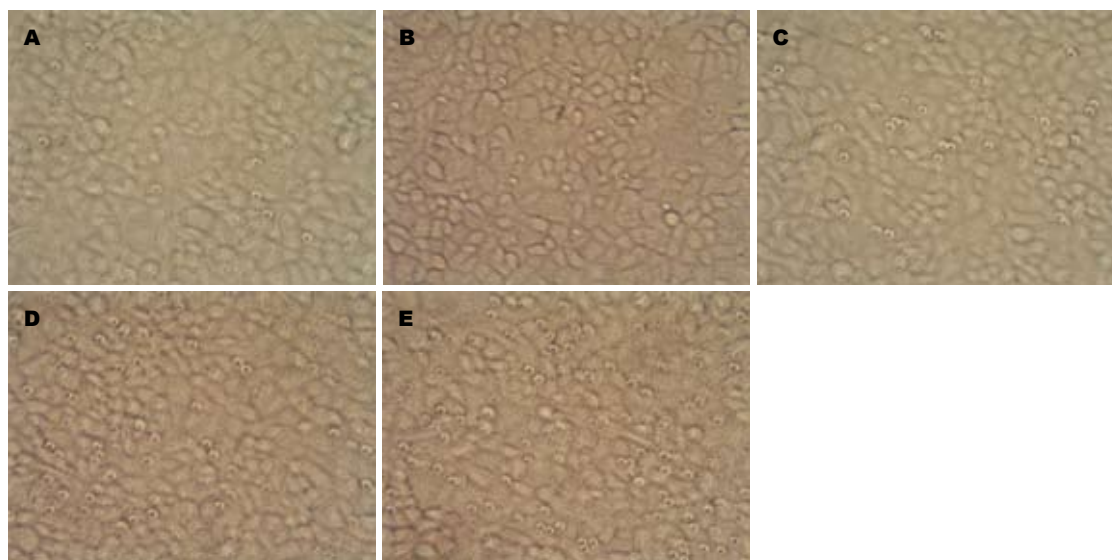


图1 HMGB1对PMN内皮黏附率的影响($\times 200$). A: 阴性对照组; B-E: 10, 100, 1000, 10 000 $\mu\text{g/L}$.

相关报道
研究显示, HMGB1在数种急性肺损伤动物模型中均高表达, 小鼠气管内滴入rHMGB1可导致ALI的发生.

min; Hank's液洗涤2遍去除未黏附的PMN; 在光学倒置显微镜下进行10个200倍视野下EC和黏附的PMN计数, 并计算黏附率 = 黏附的PMN数/EC数^[4].

1.2.4 PMN游出单层PCEC试验 在Transwell上室接种PCEC, 细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{well}$ (100 μL), 下室加入新鲜培养液600 μL ; PCEC融合成单层后, 去血清培养24 h; 换新鲜无血清RMP 1640培养液(含10 g/LBSA), 50 mL/L CO_2 -950 mL/L空气37 $^\circ\text{C}$ 培养24 h; 弃去培养液, 用Hank's液洗涤2遍; 换新鲜无血清RMP 1640培养液(含10 g/L BSA), 上室加入PMN 10^5 个, 按实验分组下室培养液分别含0, 10, 100, 1000和10 000 $\mu\text{g/L}$ 的rHMGB1, 50 mL/L CO_2 -950 mL/L空气37 $^\circ\text{C}$ 培养3 h; 弃去培养液, 用Hanks液洗涤2遍; 在光学倒置显微镜下进行游出单层PCEC的PMN计数. 穿过率为已穿过单层血管内皮的PMN占总数的百分比^[5].

1.2.5 PMN表面CD11a/CD18、CD11b/CD18表达的检测 PMN $1 \text{ mL}(10^7 \text{个})$ 加入终浓度100 $\mu\text{g/L}$ 的rHMGB1在50 mL/L CO_2 -950 mL/L空气37 $^\circ\text{C}$ 分别孵育30 min和3 h; 500 g 离心10 min, PBS洗涤2次, 取PMN悬浮液100 $\mu\text{L}(10^6 \text{个})$ 加入小鼠抗CD11a/CD18和CD11b/CD18 mAb 20 μL ; 阴性对照组加入PBS, 25 $^\circ\text{C}$ 室温放置15 min, 离心后去上清液, 用PBS清洗1次后加20 μL 异硫氰酸荧光素标记的二抗, 室温放置3 min, 离心PBS清洗2次, 然后在美国Becton-Dicknson公司的FACSsort型流式细胞仪上测量CD11a/CD18和CD11b/CD18免疫阳性细胞数, 在5000个白细胞中计算免疫阳性细胞数及百分率.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件, 计量资料作 t 检验, $P < 0.05$ 有显著统计学意义.

2 结果

倒置显微镜下观察, 可见PCEC不断生长, 由圆形逐渐变为梭形、多边形, 当其铺满培养瓶瓶底时呈鹅卵石镶嵌排列. 细胞胞质内可见对EC具有特异性的W-P小体. VIII因子免疫组化染色显示细胞内有棕黄色沉淀, 说明有VIII因子抗原存在.

2.1 HMGB1对大鼠PCEC细胞PMN黏附的影响 随着HMGB1刺激浓度的增加, PMN的黏附率由5.1%(10 $\mu\text{g/L}$)逐渐增加至25.4%(10 000 $\mu\text{g/L}$), $P < 0.05$; 分别为 $2.5\% \pm 0.5\%$, $5.1\% \pm 0.9\%$, $10.7\% \pm 1.7\%$, $14.6\% \pm 2.6\%$ 和 $25.4\% \pm 4.3\%$ (图1).

2.2 HMGB1对PMN穿过大鼠PCEC迁移率的影响 随着HMGB1处理浓度的增加, PMN穿过PCEC单层的迁移率由1.1%(10 $\mu\text{g/L}$)逐渐增加至14.2%(10 000 $\mu\text{g/L}$), $P < 0.05$; 分别为0, $1.1\% \pm 0.3\%$, $6.3\% \pm 1.2\%$, $12.4\% \pm 2.7\%$ 和 $14.2\% \pm 3.1\%$. 但无细胞穿过聚碳酸酯膜迁移到下室.

2.3 HMGB1对PMN细胞表面CD11a/CD18和CD11b/CD18表达的影响 100 $\mu\text{g/L}$ HMGB1刺激30 min和3 h后, 表达CD11a/CD18和CD11b/CD18的阳性PMN细胞比例均明显升高(图2).

3 讨论

正常情况下组织中少见PMN, 而循环中的PMN呈非活化状态, 必须在趋化因子和激活剂作用下才被激活, 继而侵入炎症组织中. PMN向肺组

创新盘点
诸多研究显示HMGB1可激活多种炎症细胞释放炎症因子. 但对HMGB1在PMN向肺组织聚集过程中的作用并不清楚. 本课题对此过程中的趋化、黏附和游出3个环节进行了研究.

应用要点
TNF- α 和IL-1 β 等细胞因子释放早、持续时间较短, 对其进行针对性治疗的时窗较窄。HMGB1高表达持续时间长的特点为阻止PMN向肺组织聚集和ALI的防治提供了良好的靶点。

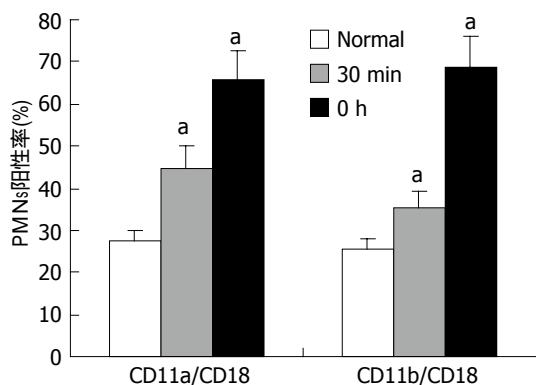


图2 HMGB1对PMN细胞表面CD11a/CD18和CD11b/CD18表达的影响。^a $P < 0.05$ vs 正常或30 min。

组织渗出要经过趋化、贴壁、滚动、黏附和游出一系列的过程^[26]。我们按成熟的方法分离PCEC, 鉴定结果显示倒置显微镜下可见PCEC瓶底时呈鹅卵石镶嵌排列; 高倍镜下可见具有内皮细胞特异性的W-P小体; VIII因子免疫组化染色阳性。说明PCEC的分离培养是成功的。我们采用Boyden小室趋化模型来研究HMGB1对PMN是否具有趋化作用, 经向下室加入不同浓度的HMGB1(假定“趋化物质”), 结果并无PMN穿过聚碳酸酯膜进入下室。说明HMGB1并非PMN的趋化因子。但在PMN的黏附试验中, 我们观察到随着HMGB1刺激浓度的增加, PMN对PCEC的黏附逐渐增加, 其黏附率由5.1%逐渐增加至25.4%。同时, HMGB1对PMN游出也有促进作用, 随着HMGB1作用浓度的提高, PMN穿过PCEC单层到EC与聚碳酸酯膜之间的迁移率由1.1%逐渐增加至14.2%。

上述结果表明, HMGB1并非PMN的趋化因子, 但可促进PMN向血管内皮黏附和游出。PMN向血管内皮黏附和游出与细胞表面黏附分子的相互作用有关。CD11/CD18和ICAM-1参与PMN和血管内皮细胞的黏附, 抗CD11/CD18抗体可明显减少穿越内皮细胞层的PMN数^[27], CD11/CD18表达升高和L-选择素表达下降, 则有利于PMN穿越内皮细胞侵入组织^[28]。有研究证实, HMGB1可刺激HUVEC合成和表达黏附分子ICAM-1^[29]。可激活PMNs表达IL-1 β 、IL-8和TNF- α ^[30], 但对于CD11/CD18表达的影响并无研究报道。

本研究结果显示, HMGB1刺激30 min和3 h后, PMN细胞表面CD11a/CD18和CD11b/CD18的表达均有升高。因此, 我们认为HMGB1可能通过上调血管内皮表面黏附分子ICAM-1和

PMN表面黏附分子CD11a/CD18和CD11b/CD18的表达, 促进肺毛细血管内的PMN黏附、游出, 并同时刺激PMN合成并分泌炎症因子导致肺损伤。

4 参考文献

- Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J* 2001; 20: 4337-4340
- Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5237-5246
- Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 1999; 22: 276-280
- Verrier CS, Roodi N, Yee CJ, Bailey LR, Jensen RA, Bustin M, Parl FF. High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1009-1019
- Seeler JS, Marchio A, Sitterlin D, Transy C, Dejean A. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7316-7321
- Flohr AM, Rogalla P, Meiboom M, Borrmann L, Krohn M, Thode-Halle B, Bullerdiek J. Variation of HMGB1 expression in breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3881-3885
- Sparatore B, Pedrazzi M, Passalacqua M, Gaggero D, Patrone M, Pontremoli S, Melloni E. Stimulation of erythroleukemia cell differentiation by extracellular high-mobility group-box protein 1 is independent of the receptor for advanced glycation end-products. *Biochem J* 2002; 363: 529-535
- Fages C, Nolo R, Huttunen HJ, Eskelinen E, Rauvala H. Regulation of cell migration by amphoterin. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 4): 611-620
- Xiang YY, Wang DY, Tanaka M, Suzuki M, Kiyokawa E, Igarashi H, Naito Y, Shen Q, Sugimura H. Expression of high-mobility group-1 mRNA in human gastrointestinal adenocarcinoma and corresponding non-cancerous mucosa. *Int J Cancer* 1997; 74: 1-6
- Passalacqua M, Patrone M, Picotti GB, Del Rio M, Sparatore B, Melloni E, Pontremoli S. Stimulated astrocytes release high-mobility group 1 protein, an inducer of LAN-5 neuroblastoma cell differentiation. *Neuroscience* 1998; 82: 1021-1028
- Sparatore B, Passalacqua M, Patrone M, Melloni E, Pontremoli S. Extracellular high-mobility group 1 protein is essential for murine erythroleukemia cell differentiation. *Biochem J* 1996; 320 (Pt 1): 253-256
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator

- of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251
- 13 Alsous F, Khamiees M, DeGirolamo A, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA. Negative fluid balance predicts survival in patients with septic shock: a retrospective pilot study. *Chest* 2000; 117: 1749-1754
- 14 Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 296-301
- 15 Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, Andersson J, Tokics L, Treutiger CJ. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 564-573
- 16 Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 1999; 354: 1446-1447
- 17 Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000; 165: 2950-2954
- 18 Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, Maruyama I, Yamada S, Hasegawa N, Soejima J, Koh H, Ishizaka A. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1310-1316
- 19 Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 971-981
- 20 Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, Uemoto S, Yamada S, Maruyama I. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 975-979
- 21 Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin Chim Acta* 2007; 375: 36-42
- 22 Chen SF, Fei X, Li SH. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc Res* 1995; 50: 119-128
- 23 Fernandes MJ, Rollet-Labelle E, Pare G, Marois S, Tremblay ML, Teillaud JL, Naccache PH. CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochem J* 2006; 393: 351-359
- 24 Nakamura H, Herzenberg LA, Bai J, Araya S, Kondo N, Nishinaka Y, Herzenberg LA, Yodoi J. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 15143-15148
- 25 Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepantalo M, Carpen O, Parkkinen J, Rauvala H. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood* 2004; 104: 1174-1182
- 26 Round table conference. Acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 675-679
- 27 Smith CW, Kishimoto TK, Abbassi O, Hughes B, Rothlein R, McIntire LV, Butcher E, Anderson DC. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1991; 87: 609-618
- 28 Berends C, Dijkhuizen B, de Monchy JG, Dubois AE, Gerritsen J, Kauffman HF. Inhibition of PAF-induced expression of CD11b and shedding of L-selectin on human neutrophils and eosinophils by the type IV selective PDE inhibitor, rolipram. *Eur Respir J* 1997; 10: 1000-1007
- 29 Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Yang H, Tracey KJ, Andersson J, Palmblad JE. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med* 2003; 254: 375-385
- 30 Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, Choe KH, Strassheim D, Pitts TM, Tracey KJ, Abraham E. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C870-879

同行评价
本文探讨了高迁移率族蛋白1对多形核白细胞黏附和游出肺毛细血管内皮细胞的影响及其机制。内容有一定的新颖性, 层次较清晰, 讨论观点较明确, 行文流畅, 有一定的科学性。

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 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。

新疆哈萨克族和汉族食管癌组织ECRG2基因遗传多态性与易感性的关系

陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍, 李洪安, 蒋金芳, 杨磊, 李锋

背景资料
食管癌相关基因 (ECRG) 是从食管癌组织中筛选出的与食管癌发生高度相关的基因, 近年来其遗传多态性与食管癌的关系受到关注, 但国内外有关其遗传易感性在新疆哈萨克族食管癌中的研究尚无报道。

陈湘川, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院病理教研室, 新疆维吾尔自治区人民医院人事科, 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍, 李洪安, 蒋金芳, 李锋, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院病理教研室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
杨磊, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院生化教研室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
陈湘川, 主要从事肿瘤分子病理的研究。
科技部重大基础研究前期研究专项, No. 2005CCA03700
教育部科学技术研究重点项目, No. 206167
2004年度石河子大学技术研究发展计划 - 重点项目, No. ZRKX2004-Z10
通讯作者: 李锋, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院病理教研室, lifeng7855@yahoo.com.cn
电话: 0993-2057125 传真: 0993-2057136
收稿日期: 2007-1-12 修回日期: 2007-07-22

Relationship between polymorphism of esophageal cancer related gene 2 and esophageal squamous cell cancer in Han and Kazakh populations in Xinjiang Uygur Autonomous Region

Xiang-Chuan Chen, Li-Juan Pang, Ling Chen, Lan Yang, Jin-Fang Zhang, Yan Qi, Hong-An Li, Jin-Fang Jiang, Lei Yang, Feng Li

Xiang-Chuan Chen, Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002; People Hospital in Xinjiang Autonomous Region, 835100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Li-Juan Pang, Ling Chen, Lan Yang, Jin-Fang Zhang, Yan Qi, Hong-An Li, Jin-Fang Jiang, Feng Li, Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Lei Yang, Department of Biochemistry, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Special Foundation for Major Basic Research Program of the Ministry of Science and Technology, No. 2005CCA03700; the Scientific and Technological Research Key Program of Ministry of Education, No. 206167; and the Technology Research and Development Project of Shihezi University During 2004 Period, No. ZRKX2004-Z10

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

Received: 2007-01-12 Revised: 2007-07-22

Abstract

AIM: To investigate the relation between polymorphism of esophageal cancer related Gene (ECRG2) (short tandem repeat) STR and susceptibility in Xinjiang's esophageal squamous cell cancer (ESCC).

METHODS: A case-control study was conducted with 178 case of esophageal cancer (94 of Kazakh and 84 of Han) and 153 populations (100 of Kazakh and 53 of Han) based controls in high incidence area of ESCC of Xinjiang. ECRG2 genotypes were detected by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method.

RESULTS: The frequencies of ECRG2 STR genotypes, TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4 were 58.8%, 7.8% and 3.3% in metastasis esophageal cancer, and 14.2%, 40.9% and 44.9% in cases who have no metastasis, respectively. There was statistical difference between the two groups ($\chi^2 = 40.74$, $v = 2$, $P < 0.01$). In both of the Han and Kazakh populations, subjects who carried the TCA3/TCA3 genotype were at an increased risk of ESCC compared to those carrying the TCA4/TCA4 genotype, with the adjusted odds ratios (ORs) being 3.25 (95% CI, 1.25-8.45) for the subjects of Han population and 4.06 (95% CI, 1.69-9.74) for the subjects of Kazakh population.

CONCLUSION: Subjects who carried the TCA3/TCA3 genotype are an increased risk of ESCC and metastasis compared to those carrying the TCA4/TCA4 genotype.

Key Words: Esophageal cancer related gene 2; Gene polymorphism; Esophageal cancer; Short tandem repeat; Polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism

Chen XC, Pang LJ, Chen L, Yang L, Zhang JF, Qi Y, Li HA, Jiang JF, Yang L, Li F. Relationship between polymorphism of esophageal cancer related gene 2 and esophageal squamous cell cancer in Han and Kazakh populations in Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2408-2412

摘要

目的: 研究食管癌相关基因2(ECRG2)短串联重复序列(STR)多态性与新疆哈萨克族和汉族食管癌易感性的关系。

方法: 新疆地区食管癌哈萨克族94例, 汉族84例; 人群对照哈萨克族100例, 汉族53例, 采用聚合酶链反应单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术检测研究对象的ECRG2 STR基因型。

结果: ECRG2 STR呈多态性, 可分为3种类型: TCA3/TCA3, TCA4/TCA4和TCA3/TCA4。3种基因型在有转移的食管癌中分布为58.8%, 7.8%和33.3%, 在无转移的食管癌中分布为14.2%, 40.9%和44.9%, 两者相比有显著差异($\chi^2 = 40.74$, $\nu = 2$, $P < 0.01$), 携带TCA3/TCA3基因型个体更容易发生转移。汉族人群中, 携带TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险比TCA4/TCA4基因型个体高3.25倍(95%的可信区间为1.25-8.45); 在哈萨克族人群中, 携带TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险比TCA4/TCA4基因型个体高4.06倍(95%的可信区间为1.69-9.74)。

结论: 携带ECRG2基因TCA3/TCA3基因型个体与TCA4/TCA4基因型个体比较, 增加了患食管癌和发生转移的风险。

关键词: 食管癌相关基因2; 基因多态性; 食管癌; 短串联重复序列; 聚合酶链反应单链构象多态性

陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍, 李洪安, 蒋金芳, 杨磊, 李锋. 新疆哈萨克族和汉族食管癌组织ECRG2基因遗传多态性与易感性的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2408-2412
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2408.asp>

0 引言

食管癌是我国常见的十大恶性肿瘤之一^[1], 在高发区, 食管癌的发生具有明显的家族聚集倾向, 这说明遗传易感性以及与此相关的环境因素在该肿瘤的发生中起到了重要作用^[2]。食管癌在种族方面有很大的差异, 中国部分少数民族食管癌死亡情况的比较统计结果表明, 以新疆哈萨克族食管癌最多见(表1), 其男女合计死亡率比其他少数民族高2-31倍, 比全国平均水平高2.3倍^[3], 其调整死亡率达68.88/10万, 是其他民族调整死亡率(5.13/10万)的10倍之多^[4-5], 严重威胁着哈族人民的健康。

表 1 我国部分少数民族食管癌的年龄调整死亡率(1/10万)^[3]

民族	男	女	合计
哈萨克族	39.27	27.08	33.90
回族	18.90	6.32	13.14
蒙古族	12.89	5.73	9.85
维吾尔族	12.87	7.93	10.60
藏族	7.8	5.34	6.45
朝鲜族	5.82	1.62	3.73
彝族	1.67	0.91	1.72
苗族	1.61	0.63	1.09
全国	19.68	9.85	14.59

食管癌相关基因(esophageal cancer related gene, ECRG1-4), 是Su *et al*^[6]在1998年从食管癌组织中筛选出的4个在基因库中无同源序列且与食管癌的发生高度相关的基因, 其中ECRG2基因定位于5q33.1。Yue *et al*^[7]最近研究发现, 食管癌相关基因2(ECRG2)外显子4处有一短串联重复序列(short tandem repeat, STR), 其中有3个基因型TCA3/TCA3, TCA3/TCA4, TCA4/TCA4, 在同一患者的癌组织、癌旁组织和血样中检测的基因型是相同的, 他们选取了北京和食管癌高发区河南林县的汉族人群分别做了病例对照研究, 认为携带TCA3/TCA3基因型其患食管癌的危险性高于TCA4/TCA4基因型。我们采用PCR-SSCP方法对新疆哈萨克族食管癌患者ECRG2基因STR多态性与食管癌易感性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 新疆石河子大学医学院第一附属医院、新疆伊犁州友谊医院、新华医院、农四师医院病理科1980-2004年病理诊断为食管癌的石蜡包埋的组织中收集哈萨克族食管癌患者94例, 男52例, 女42例; 高分化鳞癌17例, 中分化鳞癌68例, 低分化鳞癌9例, 有淋巴结转移23例; 汉族食管癌84例, 男47例, 女37例; 高分化鳞癌21例, 中分化鳞癌44例, 低分化鳞癌19例, 有淋巴结转移28例。所有标本均用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋后保存; 所有病例均经过2名资深病理医师复查。同时在当地收集相近年龄组无肿瘤史的一般体检人群血样作为对照, 哈萨克族100例(男59例, 女41例); 汉族53例(男29例, 女24例), 对照组人群抽静脉血, 肝素钠抗凝, 液氮保存。

1.2 方法 每例石蜡组织5 μm 10张入2.0 mL消毒的EP管中, 经脱蜡水化后, 加细胞裂解液(0.02 mmol/L Tris HCl, 0.02 mmol/L EDTA, 20 g/L

研发前沿
近年来基因多态性与遗传易感性是食管癌研究的热点之一, 基因型多态性是以STR为核心, 依据核心序列重复次数不同而形成的。这种遗传标记具有丰富的多态性, 他的杂合度和所含信息较高, 所以对STR的应用越来越受到人们重视。

相关报道

近年来一些研究已报道, ECRG2基因多态性与汉族食管癌的发生有关, 认为携带TCA3/TCA3基因型显著增加汉族食管癌的发病风险。

SDS), 蛋白酶K(终浓度0.3 g/L)55℃水浴振荡过夜。待组织完全裂解后依次加入等体积的Tris饱和酚(pH8.0), 酚/氯仿为1:1, 氯仿/异戊醇为24:1, 各抽提1次, 无水乙醇沉淀DNA, 干燥, 加入TE(pH8.0)50-80 μL溶解DNA沉淀12-24 h, 测定所提取DNA的 A_{260} , A_{280} 并计算 A_{260}/A_{280} 以确定DNA的质量和纯度, 提取的DNA置于-20℃冰箱保存备用。血样DNA的提取采用上海生工的小剂量DNA抽提试剂盒提取基因组DNA。特异扩增ECRG2基因多态性的引物参照文献, 引物为 ECRG2-forward: 5'-ctgtgctaataatctgtgaactgtg-3' ECRG2-reverse: 5'-aaactttctccattcagtcagattac-3', 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物扩增的目的片段长度为235 bp。PCR扩增体系为25 μL, 内含基因组DNA 40-50 ng, 10×Buffer 2.5 μL, 引物终浓度0.2 μmol/L, 200 μmol/L的各种dNTP和Taq DNA聚合酶8.34 nkat/L。扩增条件为: 95℃预变性2 min, 然后进行36个循环(95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min), 最后1次循环在72℃延伸7 min。选用PCR扩增产物测序确定是ECRG2基因阳性的食管癌标本作为阳性对照, 以高压双蒸水代替DNA模板作为空白对照。反应完成后取反应产物5 μL在20 g/L的琼脂糖凝胶上电泳, 检查扩增情况。取5 μL反应产物, 加入等体积的变性缓冲液(950 g/L的甲酰胺, 25 g/L溴酚蓝, 25 g/L二甲苯青, 10 mmol/L EDTA)混匀, 95℃变性10 min后迅速置冰浴上, 120 g/L聚丙烯酰胺凝胶(预电泳20 min)上样, 电压100 V, 电泳3-5 h。凝胶用100 mL/L乙酸溶液固定15 min, 去离子水冲洗3次, 2 g/L硝酸银和1 g/L甲醛染色20 min, 去离子水冲洗3次, 30 g/L Na₂CO₃, 1 g/L甲醛及100 g/L硫代硫酸钠染色至清楚, 100 mL/L乙酸终止显影。选取部分PCR产物由上海申速生物技术公司纯化并测序(其中在聚丙烯酰胺凝胶电泳上单一条带样本双向测序1次, 两条带样本双向测序多次)。

统计学处理 数据采用 χ^2 检验。

2 结果

食管癌178例和正常对照组153例的ECRG2 STR基因型的检测见图1-3。在所有食管癌中, 性别、分化程度与基因型分布无显著差异; 哈萨克族食管癌高、中与低分化之间基因型分布无显著差异; 汉族食管癌高、中与低分化之间基因型分布无显著差异; 哈萨克族和汉族食管癌病例组和对照组中基因型分布无显著差异。汉族食管癌中, TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4这3种基因型在有转移的食管癌中分布为

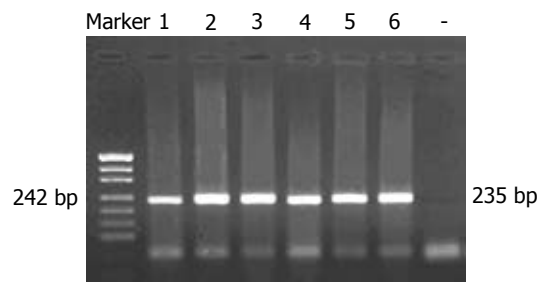


图1 ECRG2基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳图。

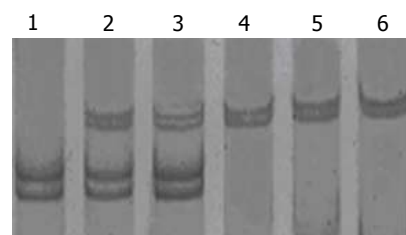


图2 ECRG2聚丙烯酰胺凝胶电泳图。1: TCA3/TCA3型; 2-3: TCA3/TCA4型; 4-6: TCA4/TCA4型。

67.9%, 7.1%, 25.0%, 在无转移的食管癌中分布为14.3%, 44.6%, 41.1%, 两者相比有显著差异($\chi^2 = 40.74$, $\nu = 2$, $P < 0.01$), 携带TCA3/TCA3基因型个体更容易发生转移。病例对照研究中, ECRG2基因型TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4在食管癌组中所占比例分别为32.1%, 32.1%, 35.7%, 而正常对照组中分别是15.1%, 49.1%, 35.8%(表2), 比较两组中3种基因型总构成比有显著差别($\chi^2 = 6.100$, $\nu = 2$, $P = 0.047$)。与TCA4/TCA4基因型相比, 携带TCA3/TCA4基因型汉族个体患食管癌的风险增加, 其OR值为1.52(95%的可信区间为0.69-3.34), 而TCA3/TCA3基因型汉族个体患食管癌的风险则更大, 其OR值为3.25(95%的可信区间为1.25-8.45)。

哈萨克族食管癌中, TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4, 3种基因型在有转移的食管癌中分布为47.8%, 8.7%, 43.5%, 在无转移的食管癌中分布为14.1%, 38.0%, 47.9%, 两者相比有显著差异($\chi^2 = 13.77$, $\nu = 2$, $P < 0.01$), 携带TCA3/TCA3基因型个体更容易发生转移。病例对照研究中, ECRG2基因型TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4在食管癌组中所占比例分别为22.3%, 30.9%, 46.8%, 正常对照组中分别是10.0%, 56.0%, 34.0%(符合Hardy-Weinberg平衡定律, 表2), 比较两组中3种基因型总构成比, 有显著差别($\chi^2 = 13.589$, $\nu = 2$, $P < 0.01$)。与TCA4/TCA4基因型相比, 携带TCA3/TCA4基因型哈萨克族个体患食管癌的风险增加, 其

创新盘点

本研究以新疆哈萨克族、汉族食管癌为研究对象, 首次表明, ECRG2基因TCA STR与新疆地区食管癌之间的相关性, 携带TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险与TCA4/TCA4基因型个体之间发病风险不相同, 哈萨克族略高于汉族。

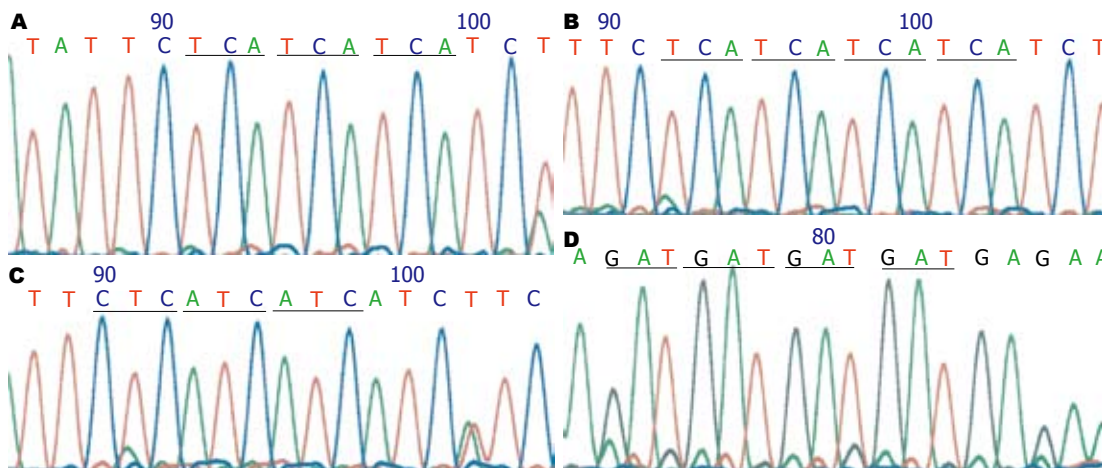


图 3 ECRG2 STR 3种基因型测序图. A: TCA3/TCA3型测序图(双向一致); B: TCA4/TCA4型测序图(双向一致); C: TCA3/TCA4型测序图(正向); D: TCA3/TCA4型测序图(反向).

应用要点
本研究为进一步研究新疆哈萨克族食管癌的遗传背景和肿瘤遗传易感基因及其作用机制奠定基础, 提供一个较为明确的参考信息.

表 2 ECRG2 TCA STR 基因型分布与食管癌风险的关系

基因型	汉族			哈萨克族			合并		
	病例	对照	OR(95%)	病例	对照	OR(95%)	病例	对照	OR(95%)
TCA4/TCA4	27 (32.1)	26 (49.1)	1.00	29 (30.9)	56 (56.0)	1.00	56 (31.4)	82 (53.6)	1.00
TCA3/TCA4	30 (35.7)	19 (35.8)	1.52 (0.69-3.34)	44 (46.8)	34 (34.0)	2.50 (1.33-4.71)	74 (41.6)	53 (34.6)	2.05 (1.25-3.34)
TCA3/TCA3	27 (32.1)	8 (15.1)	3.25 (1.25-8.45)	21 (22.3)	10 (10.0)	4.06 (1.69-9.74)	48 (27.0)	18 (11.8)	3.91 (2.06-7.40)

OR值为2.50(95%的可信区间为1.33-4.71), 而TCA3/TCA3基因型哈萨克族个体患食管癌的风险则更大, 其OR值为4.06(95%的可信区间为1.69-9.74).

将汉族和哈萨克族两个人群合并之后, TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4, 3种基因型在有转移的食管癌中分布为58.8%, 7.8%, 33.3%, 在无转移的食管癌中分布为14.2%, 40.9%, 44.9%, 两者相比, 有显著差异($\chi^2 = 40.74$, $\nu = 2$, $P < 0.01$), 携带TCA3/TCA3基因型个体更容易发生转移. 在病例对照研究中, ECRG2基因型TCA3/TCA3, TCA4/TCA4, TCA3/TCA4食管癌组中所占比例分别为27.0%, 31.4%, 41.6%, 正常对照组中分别是11.8%, 53.6%, 34.6%(表2), 比较两组中3种基因型总构成比, 有显著差别($\chi^2 = 20.24$, $\nu = 2$, $P < 0.01$). 与TCA4/TCA4基因型相比, 携带TCA3/TCA4基因型个体患食管癌的风险增加, 其OR值为2.05(95%的可信区间为1.25-3.34), 而TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险则更大, 其OR值为3.91(95%的可信区间为2.06-7.40).

3 讨论

在ECRG1-4中ECRG2基因定位于5q33.1. ECRG2基因包含4个外显子, 全长3540 bp, 编码1条85个氨基酸的多肽. Cui *et al*^[8-9]研究发现, 生物信息学分析显示ECRG2蛋白97%的氨基酸序列与KAZAL型的丝氨酸蛋白酶抑制剂同源, 而KAZAL型的丝氨酸蛋白酶抑制剂与肿瘤发生高度相关; 荧光定位技术显示ECRG2基因与金属硫蛋白2A(MT2A)基因共转染后分布在细胞的同一部位, 因而ECRG2基因编码的蛋白质与MT2A基因编码的蛋白质之间存在相互作用; ECRG2基因不但可以抑制食管癌细胞系的增殖, 还可以抑制MT2A基因的促细胞增殖作用, 同时ECRG2基因不仅可以诱导食管癌细胞系的凋亡, 而且在细胞凋亡方面与MT2A基因存在负相关性. 最近还有研究表明, ECRG2基因对EC9706细胞的恶性增殖有抑制作用^[10].

基因型多态性是以STR为核心, 依据核心序列重复次数不同而形成的. 这种遗传标记具有丰富的多态性, 他的杂合度和所含信息较高, 所以对STR的应用越来越让人们重视. 雄激素受体

同行评价
本文研究了新疆哈萨克族和汉族食管癌组织ECRG2基因遗传多态性与易感染性的关系, 技术路线明确, 结果可信, 对临床有一定的参考价值。

基因定位与Xq11-12, 其编码的雄激素受体涉及了细胞增殖和分化的调控。雄激素受体基因第一外显子区含有两个多态性三联体质量复序列(CAG)n和(GGC)n。Dietzsch *et al*^[11]的研究显示, 在非洲食管癌患者中, (GGC)n的平均长度远远小于健康对照组($P=0.018$)。

我们用PCR-SSCP方法检测了ECRG2基因STR在新疆汉族和哈萨克族食管癌中的多态性分布, 可以看到该多态性在所检测的人群中普遍存在, 并且与食管癌的易感性高度相关。在汉族人群中, 携带TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险比TCA4/TCA4基因型的个体高3.25倍(95%的可信区间为1.25-8.45); 在哈萨克族人群中, 携带TCA3/TCA4基因型个体患食管癌的风险比TCA4/TCA4基因型个体高2.50倍(95%的可信区间为1.33-4.71), 携带TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险比TCA4/TCA4基因型个体高4.06倍(95%的可信区间为1.69-9.74), 这提示ECRG2基因TCA STR与食管癌之间的相关性具有明显的等位基因剂量效应, 与Yue *et al*^[7]的研究结果相类似。我们还比较了有淋巴结转移和无淋巴结转移的食管癌病例中ECRG2基因TCA STR的分布, 发现他们之间差异显著, 携带TCA3/TCA3基因型与携带TCA4/TCA4基因型食管癌患者比较, 更容易发生转移。

我们的研究首次表明, ECRG2基因TCA STR与新疆地区食管癌之间的相关性, 在地理环境相近的新疆地区的两个不同人群哈萨克族和汉族之间, 携带TCA3/TCA3基因型个体患食管癌的风险与TCA4/TCA4基因型个体之间发病风险不相同, 哈萨克族略高于汉族, 这与哈萨克族的食管癌高发相一致, 因此推测除了环境因素以外, 遗传因素也可能影响了ECRG2基因活性。同时也从侧面说明食管癌的发生是一个多基因多步骤的复杂过程, 是多个基因参与、基

因-基因相互作用以及基因-环境相互作用的受遗传因素和环境因素共同影响的结果。我们认为ECRG2基因TCA STR可能是新疆地区食管癌的特异性多态位点, 对新疆食管癌高发人群ECRG2基因TCA STR的检测有助于早期诊断和发现食管癌。

4 参考文献

- 1 Lam AK. Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 33: 71-90
- 2 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 3-9
- 3 侯浚, 陈志峰, 贺宇彤. 食管癌的流行病学. *河北职工医学院学报* 2000; 17: 27-29
- 4 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究. *中华流行病学杂志* 2003; 24: 939-943
- 5 张月明. 新疆食管癌分布. *新疆医学院学报* 1998; 11: 139-144
- 6 Su T, Liu H, Lu S. [Cloning and identification of cDNA fragments related to human esophageal cancer] *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1998; 20: 254-257
- 7 Yue CM, Bi MX, Tan W, Deng DJ, Zhang XY, Guo LP, Lin DX, Lu SH. Short tandem repeat polymorphism in a novel esophageal cancer-related gene (ECRG2) implicates susceptibility to esophageal cancer in Chinese population. *Int J Cancer* 2004; 108: 232-236
- 8 Cui Y, Wang J, Zhang X, Lang R, Bi M, Guo L, Lu SH. ECRG2, a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, interacts directly with metallothionein 2A and links to apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 904-915
- 9 Cui YP, Wang JB, Zhang XY, Bi MX, Guo LP, Lu SH. Using yeast two-hybrid system to identify ECRG2 associated proteins and their possible interactions with ECRG2 gene. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1892-1896
- 10 Li MN, Huang G, Guo LP, Lu SH. Inhibitory effects of esophageal cancer related gene 2 on proliferation of human esophageal cancer cell EC9706. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 2785-2788
- 11 Dietzsch E, Laubscher R, Parker MI. Esophageal cancer risk in relation to GGC and CAG trinucleotide repeat lengths in the androgen receptor gene. *Int J Cancer* 2003; 107: 38-45

编辑 王晓瑜 电编 张强

新辅助放化疗对中晚期食管鳞癌病理分期及预后的影响

曹秀峰, 王山, 吴必超, 黄志华, 朱海文, 王和明, 黄水清, 朱斌, 纪律, 肖建

曹秀峰, 王和明, 黄水清, 朱斌, 纪律, 肖建, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心 江苏省南京市 210006
王山, 吴必超, 黄志华, 朱海文, 江苏省盐城市肿瘤医院 江苏省盐城市 224002
曹秀峰, 胸外科主任医师, 肿瘤学研究员, 外科学教授, 主要从事消化道肿瘤以手术为主的综合治疗及早诊早治规范化模式研究.
通讯作者: 曹秀峰, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心. cxf551101@sina.com
电话: 025-52271474
收稿日期: 2007-04-19 修回日期: 2007-07-23

Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological stage and prognosis of middle and advanced esophageal carcinoma

Xiu-Feng Cao, Shan Wang, Bi-Chao Wu, Zhi-Hua Huang, Hai-Wen Zhu, He-Ming Wang, Shui-Qing Huang, Bing Zhu, Lv Ji, Jian Xiao

Xiu-Feng Cao, He-Ming Wang, Shui-Qing Huang, Bing Zhu, Lv Ji, Jian Xiao, Oncology Center of Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Shan Wang, Bi-Chao Wu, Zhi-Hua Huang, Hai-Wen Zhu, Yancheng Tumor Hospital, Yancheng 224002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xiu-Feng Cao, Oncology Center of Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 68 Changle Road, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. cxf551101@sina.com
Received: 2007-04-19 Revised: 2007-07-23

Abstract

AIM: To evaluate the effects of neoadjuvant radiochemotherapy on the pathological stage and prognosis of middle and advanced esophageal carcinoma.

METHODS: Between January 1991 and December 2000, 473 patients with middle and advanced esophageal carcinoma were randomly divided into four groups; neoadjuvant radiotherapy ($n = 118$), neoadjuvant chemotherapy ($n = 119$), neoadjuvant radiochemotherapy ($n = 118$) and control (surgery alone) ($n = 118$). The differences in resection rates, pathological stage, treatment-related complications and survival rates were

statistically analyzed.

RESULTS: The data showed that the radical resection rate for patients in the radiotherapy, chemotherapy and radiochemotherapy groups was increased compared with that of the control group (97.5%, 86.6% and 98.3% vs 73.7%, all $P < 0.01$). The pathological stages of the radiotherapy and radiochemotherapy groups were more significantly regressed than that of the control group ($P < 0.01$). The chemotherapy group did not show the same effect. Treatment-related complications of the three neoadjuvant groups showed no significant difference from that of the control group ($P > 0.05$). The 3-year survival rates of the radiotherapy and radiochemotherapy groups were significantly higher than that of the control group (69.5% and 73.7% vs 53.4%, both $P < 0.01$). The 5-yr survival rate of the radiochemotherapy group was higher than that of the radiotherapy group, but did not demonstrate statistical significance (45.0% vs 40.7%, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The rational application of neoadjuvant radiochemotherapy appears to provide a modest survival benefit and to improve the quality of life for patients with middle and advanced esophageal carcinomas.

Key Words: Esophageal carcinoma; Neoadjuvant radiochemotherapy; Pathological stage; Prognosis

Cao XF, Wang S, Wu BC, Huang ZH, Zhu HW, Wang HM, Huang SQ, Zhu B, Ji L, Xiao J. Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological stage and prognosis of middle and advanced esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2413-2417

摘要

目的: 评估新辅助放化疗对中晚期食管鳞癌病理分期及预后的影响.

方法: 1991-01/2000-12中晚期食管鳞癌患者473例, 随机分为4组, 新辅助放疗组($n = 118$)、新辅助化疗组($n = 119$)、新辅助放化疗组($n = 118$)及对照组(单纯手术)($n = 118$). 统计分析4组在切除率、病理分期、并发症、生

背景资料

食管鳞癌新辅助放化疗能否延长患者的术后生存期众说纷纭, 本文选择可以外科治疗的食管鳞癌患者, 进行新辅助放化疗的前瞻性研究, 并探讨其对该类患者切除率、病理分期、并发症及术后1, 3和5a生存率的影响.

研发前沿
本研究主要探讨新辅助放化疗对中晚期食管鳞癌病理分期及预后的影响,为提高根治性切除率和延长这类患者的生存期提供了比较有价值的论据。

存期等方面的差别。

结果:放疗组、化疗组、放化组与对照组相比均可提高根治性切除率(97.5%, 86.6%, 98.3% vs 73.7%, 均 $P<0.01$);放疗组、放化组与对照组相比有明显降期作用($P<0.01$);而化疗组没有明显降期作用。放疗组、化疗组、放化组与对照组相比,手术并发症无明显增加($P>0.05$),放疗组、放化组的3 a生存率相比对照组显著提高(69.5%, 73.7% vs 53.4%, 均 $P<0.01$),放化组的5 a生存率优于放疗组,但无统计学意义(45.0% vs 40.7%, $P>0.05$)。

结论:合理应用新辅助放化疗可提高中晚期食管鳞癌患者生存期并提高其生存质量。

关键词:食管肿瘤;新辅助放化疗;病理分期;预后

曹秀峰, 王山, 吴必超, 黄志华, 朱海文, 王和明, 黄水清, 朱斌, 纪律, 肖建. 新辅助放化疗对中晚期食管鳞癌病理分期及预后的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2413-2417
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2413.asp>

0 引言

食管鳞癌新辅助放化疗(neoadjuvant radio-chemotherapy)是否能延长患者的术后生存期众说纷云^[1-2],我们通过前瞻性研究^[3],选择1991-01/2000-12收治的可以外科治疗的食管鳞癌患者1080例,把其中愿意接受该项研究的473例临床分期属II b期或更晚的患者随机分为新辅助放疗组(放疗组)、新辅助化疗组(化疗组)和新辅助放化疗组(放化组)及对照组(单纯手术),并比较各组的切除率、病理分期、并发症和术后1, 3和5 a生存率。

1 材料和方法

1.1 材料 II b期或更晚的食管鳞癌患者473例,剔除非鳞癌患者,随机分为放疗组、化疗组、放化组和对照组。术前各组的一般情况相似(表1)。

1.2 方法 放疗组采用瓦里安6MV医用电子直线加速器,每次单次剂量2 Gy,每周5次,总量40 Gy。化疗组采用PFM方案,即丝裂霉素C(MMC)8-10 mg, iv, d 1; 顺铂(DDP)20-30 mg, iv, d 1-5; 5-氟尿嘧啶(5-FU)1000-1250 mg, iv, d 1-5。放化组先采用化疗组的方案进行治疗,待化疗结束后1-2 wk进行放疗,放疗方案同放疗组。临床反映评估一般于放疗结束后2 wk复查内镜、食管超声和CT。评估参照WHO制订的标准,分为临床症状完全缓解(ycCR),部分缓解(ycPR),缓解不明显

(ycMR)和无变化(ycNC)。CT作为常规的检查应用在每位患者的评估上,由有经验的放射科专家负责评估肿瘤的长径和肿瘤侵犯管径的深度在新辅助放化疗前后的变化。所有检查结果由主持实验的肿瘤学家收集和评估,并由肿瘤外科,内科以及放疗科组成的专家委员会讨论通过。对照组患者接受综合评估后限期手术,术式采用标准的经胸食管鳞癌切除术加二野淋巴结清扫,消化道重建采取胃代食管,胃拖入胸腔或颈部与食管残端吻合。手术切除标本在24 h内用50 g/L甲醛固定,整体标本制作成石蜡标本,将石蜡标本切成5 μ m的薄片并用HE或PAS染色,供病理检查,切片取材要求包含肿瘤所在的食管全壁,吻合圈,近端和远端切除组织以及所有检出的淋巴结。所有的病理标本由两位有经验的病理学家参照UICC标准进行病理分期。病理反应评估分为病理完全缓解(ypCR),大部分缓解(ypSR),部分缓解(ypPR),缓解不明显(ypMR)和无病理变化(ypNC)。ypCR的标准为病理检查中没有发现残留的有活力的肿瘤细胞;ypSR指有活力的肿瘤细胞所占百分比 $<10\%$;ypPR指有活力的肿瘤细胞占 $10\%-50\%$;ypMR指有活力的肿瘤细胞占 $>50\%$,ypNC指未发现肿瘤细胞有任何消退的迹象。

统计学处理 应用SPSS10.0软件进行统计学分析,采用卡方检验,确切概率法和logrank法。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

本组中晚期食管鳞癌放疗组、化疗组、放化组的根治性切除率分别为97.5%、86.6%和98.3%,与对照组(73.7%)相比均有显著统计学意义($\chi^2_1 = 32.53, P_1<0.001$; $\chi^2_2 = 6.90, P_2<0.01$; $\chi^2_3 = 34.90, P_3<0.005$)。放疗组、放化组术后病理分期中II a期的比例分别为50.8%, 54.2%, 与对照组(0%)比较有显著统计学意义($\chi^2_1 = 80.45, P_1<0.005$, $\chi^2_2 = 76.45, P_2<0.005$)(表3)。放疗组、化疗组、放化组的临床完全缓解率分别为27.2%, 1.7%和33.89%,放化组、放疗组与化疗组比较有显著统计学意义($P<0.05$)。放疗组、化疗组、放化组的病理完全缓解率分别15.2%, 1.7%和22.3%(表2)。各组1 a生存率比较均无显著统计学意义($P>0.05$), 3 a生存率比较,放疗组(69.5%)与对照组(53.4%)相比有显著统计学意义($\chi^2 = 13.32, P = 0.005$);化疗组为57.1%,与对照组相比无显著统计学意义($\chi^2 = 0.34, P>0.05$);放化组(73.7%)与对照组相比有显著统计学意义($\chi^2 = 10.43$,

相关报道
食管鳞癌选用新辅助放化疗是否能提高切除率和延长生存期尚无定论。Hermann *et al*研究认为辅助放化疗可以降低肿瘤分期,提高中晚期食管鳞癌的手术切除率。Schneider *et al*研究显示多种基因在新辅助治疗后的食管鳞癌切除标本中的表达水平大幅下降。

表 1 食管鳞癌患者3组术前一般情况比较(n)

分组	n	性别		年龄				病灶归段			
		男	女	40-49	50-59	60-69	≥70	颈段	胸上段	胸中段	胸下段
放疗	118	70	48	12	36	48	22	8	35	60	15
化疗	119	65	54	14	36	50	19	6	33	63	17
放化	118	60	58	15	40	42	21	5	28	61	24
对照	118	67	51	15	35	47	21	5	32	59	22
合计	473	262	201	56	147	187	83	19	128	243	78

创新盘点

本文将中晚期食管鳞癌的大宗病例分组, 进行新辅助放化疗的对照研究, 其结论是: 合理应用新辅助放化疗可提高中晚期食管鳞癌患者生存期和生存质量, 是食管癌综合治疗中的一个重要手段。

$P<0.005$). 5 a生存率比较4组无显著统计学意义($P>0.05$)(表3).

3 讨论

食管鳞癌应进行综合治疗以提高切除率和延长患者的术后生存期^[4-7]. Hermann *et al*^[8]研究认为辅助放化疗可以降低肿瘤分期, 提高中晚期食管鳞癌的手术切除率, 另有研究认为辅助放化疗可改善患者术后生活质量和延长生存期^[9-12], 但同时有增加并发症和死亡率的危险^[13-14]. 目前仍缺乏足够证据证明辅助放化疗可以提高食管鳞癌术后5 a生存率^[15-16]. 本研究显示术前放疗和同时进行的放化疗能显著降低食管鳞癌的临床病理分期, 并能显著提高Ⅱb期及更晚期患者的根治性切除率; 化疗虽能提高手术切除率, 但降低手术病理分期的作用有限($P>0.05$). 新辅助放疗组和新辅助放化组都可有效提高食管鳞癌患者的临床和病理完全缓解率, 而化疗组则无明显作用. 放化组在临床和病理缓解率上虽均高于放疗组, 但无显著统计学意义($\chi^2 = 3.21$, $P>0.05$). 分析术后1, 3和5 a生存率, 说明术前放疗和放化疗组能显著提高食管鳞癌患者术后3 a生存率, 但均不能提高5 a生存率.

本研究说明中晚期食管鳞癌单纯外科治疗已经不能再提高手术切除率和生存期, 合理应

表 2 食管鳞癌患者辅助治疗结果比较(n)

分组	n	临床评估				病理检查			
		ycCR	ycPR	ycMR	ycNC	ypCR	ypSR	ypMR	ypNC
放疗	118	32 ^a	53	24	9	18	42	40	18
化疗	119	2	12	97	8	2	12	66	29
放化	118	33 ^a	51	25	9	22	43	35	18
对照	118	0	0	0	118	0	0	0	118
合计	473	74	116	142	141	47	108	127	181

^a $P<0.05$ vs 化疗.

用综合治疗方法如辅助放化疗可以增加手术切除率和疗效^[17-18]. 但应注意到影响辅助放化疗的疗效的因素是十分复杂的, 比如患者的全身情况、新辅助治疗的方法以及手术相关因素等等^[19-21]. 如食管鳞癌患者与食管腺癌患者的转归与预后通常有明显差异, 鳞癌患者一般年龄较大且有烟酒等不良嗜好, 而腺癌患者则有可能出现心血管方面的危险^[22-24]. 这些因素都可能影响治疗结果, 有时甚至是致命的. 同时, 术者的手术方式以及熟练程度对食管鳞癌的预后也有关联, 随着手术例数的增加和手术技术的提高, 食管鳞癌患者的手术死亡率以及并发症的发生率呈下降趋势^[25-26]. 还应注意到, 只有部分食管鳞癌患者在新辅助治疗中得益^[27-29]. 因此, 引发

表 3 食管鳞癌患者手术切除情况, 并发症, 术后病理分期和术后生存率比较

分组	n	切除情况n				病理分期n				手术并发症n				术后生存率n(%)		
		根治	姑息	探查	Ⅱa	Ⅱb	Ⅲ	Ⅳ	瘘	狭窄	出血	乳糜胸	死亡	1 a	3 a	5 a
放疗	118	115 ^b	2	1	60 ^b	16	41	1	1	1	1	0	1	104(88.1)	82(69.5) ^b	48(40.7)
化疗	119	103 ^b	14	2	3	15	97	4	0	0	1	2	1	101(84.9)	68(57.1)	36(32.8)
放化	118	116 ^b	2	0	64 ^b	16	37	1	3	2	1	1	1	103(87.3)	87(73.7) ^b	53(45.0)
对照	118	87	25	6	0	6	103	4	1	1	2	1	1	105(89.0)	63(53.4)	37(31.4)
合计	473	423	41	9	127	53	278	10	5	4	5	4	4			

^b $P<0.01$ vs 对照.

应用要点
对中老年食管鳞癌患者术前进行综合评估,合理选用放疗或放化疗可提高该类患者的切除率,降低肿瘤分期,提高患者生存期和改善生存质量。

了一个关键性的问题,在治疗之前如何区分这些可能的受益者而使其得到有效治疗,而非受益者可免遭不必要的打击和减少治疗带来的高额费用?在食管鳞癌的治疗中,许多学者意识到,患者是否在新辅助治疗中得益可能存在着基因表达的差异,带有某种分子标志的人群可能对新辅助治疗敏感^[30]。Schneider *et al*^[31]研究显示多种基因在辅助放化疗后有改变,如胸苷酸合成(TS),二氢嘧啶脱氢酶(DPD),错配切除修复蛋白1(ERCC1),谷胱甘肽硫转移酶Pi(GST-Pi),表皮生长因子受体(EGFR)以及HER2基因在新辅助治疗后的食管鳞癌切除标本中的表达水平大幅下降;Xi *et al*^[32]研究表明,行辅助放化疗的食管鳞癌患者术后标本环氧化酶-2(COX-2)蛋白高表达预示治疗反应差和预后不良,但目前尚无确凿证据证明某些基因可以指导新辅助治疗。总之,本研究结果显示,辅助放化疗作为一种新的治疗食管鳞癌的方法,对提高其切除率,降低肿瘤分期,提高患者的生存期和改善生存质量都有积极的意义。在肿瘤分子生物学研究突飞猛进的时代,应当结合肿瘤的分子生物学特性,遵照循证医学的原则,有针对性地制定个体化的治疗方案,更加“精确”地治疗每个食管鳞癌患者,以最大化的提高疗效。这将是未来食管鳞癌辅助放化疗研究的主要方向,他必将给食管鳞癌患者带来真正的福音。

4 参考文献

- 1 Di Fiore F, Lecleire S, Rigal O, Galais MP, Ben Soussan E, David I, Paillot B, Jacob JH, Michel P. Predictive factors of survival in patients treated with definitive chemoradiotherapy for squamous cell esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4185-4190
- 2 Popescu I, Ionescu M, Ciurea S, Stanescu C, Gheorghe C, Anghel R, Croitoru A. Neoadjuvant radiochemotherapy in the treatment of esophageal squamous carcinoma: Preliminary results in a series of 15 patients. *Chirurgia (Bucur)* 2003; 98: 499-508
- 3 曹秀峰, 王和明, 吴必超, 王山, 杨洪湘. 选择性术前放化疗对食管癌切除率的影响. *江苏医药* 2004; 30: 46-47
- 4 陈克能, 徐光炜. 食管癌的诊断与治疗. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 196-202
- 5 Triboulet JP, Mariette C. Oesophageal squamous cell carcinoma stade III. State of surgery after radiochemotherapy (RCT). *Cancer Radiother* 2006; 10: 456-461
- 6 Geissler M, Schwacha H, Eggstein S, Usadel H, Harder J, Opitz O, Arnold C, Grimm CF, Blum HE. Esophageal carcinoma: non-surgical therapy. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2004; 93: 2057-2064
- 7 Imdahl A, Schoffel U, Ruf G. Impact of neoadjuvant therapy of perioperative morbidity in patients with

- esophageal cancer. *Am J Surg* 2004; 187: 64-68
- 8 Hermann RM, Horstmann O, Haller F, Perske C, Christiansen H, Hille A, Schmidberger H, Fuzesi L. Histomorphological tumor regression grading of esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: which score to use? *Dis Esophagus* 2006; 19: 329-334
- 9 张超南, 曹秀峰, 袁爱华, 杨洪湘, 吴必超, 王山. 新辅助放化疗对中老年食管癌切除率和预后的影响. *临床肿瘤学杂志* 2003; 8: 408-410
- 10 柴树德, 郑广钧. 放射性粒子植入治疗胸部肿瘤. 天津: 天津科技出版社, 2007: 260-282
- 11 Pedrazzani C, Laterza E, Pasini F, Grandinetti A, Bernini M, Giacomuzzi S, Zerman G, Tasselli S, Ruzzenente A, De Manzoni G. Long-term results of neoadjuvant radiochemotherapy in squamous carcinoma of the thoracic esophagus. *Minerva Chir* 2005; 60: 11-16
- 12 Rous J, Simeckova B, Fencel V. Late organic and functional findings in children following tracheotomy. *Cesk Otolaryngol* 1976; 25: 89-96
- 13 Brucher BL, Becker K, Lordick F, Fink U, Sarbia M, Stein H, Busch R, Zimmermann F, Molls M, Hofler H, Siewert JR. The clinical impact of histopathologic response assessment by residual tumor cell quantification in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2006; 106: 2119-2127
- 14 Cagol M, Ruol A, Sileni VC, De Salvo GL, Corti L, Alfieri R, Innocente R, Fumagalli U, Rosati R, Ancona E. Multimodal treatment in locally advanced esophageal cancer: a multicenter phase II study with neoadjuvant oxaliplatin, 5-fluorouracil, leucovorin and neoadjuvant radiotherapy: preliminary results. *Chir Ital* 2006; 58: 433-439
- 15 Mariette C, Piessen G, Lamblin A, Mirabel X, Adenis A, Triboulet JP. Impact of preoperative radiochemotherapy on postoperative course and survival in patients with locally advanced squamous cell oesophageal carcinoma. *Br J Surg* 2006; 93: 1077-1083
- 16 Delgado Gomis F, Gomez Abril SA, Martinez Abad M, Guallar Rovira JM. Assisted laparoscopic transhiatal esophagectomy for the treatment of esophageal cancer. *Clin Transl Oncol* 2006; 8: 185-192
- 17 Msika S, Hay JM. Value of radiotherapy and chemotherapy in treatment of operable cancers of the esophagus. *J Chir (Paris)* 2002; 139: 17-24
- 18 Fietkau R. Definitive and neoadjuvant radiochemotherapy of squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Onkologie* 2004; 27: 39-44
- 19 Mariette C, Finzi L, Fabre S, Balon JM, Van Seuningen I, Triboulet JP. Factors predictive of complete resection of operable esophageal cancer: a prospective study. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1720-1726
- 20 Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F, Baldus SE, Neiss S, Brabender J, Schaefer H, Doerfler W, Bollschweiler E, Dienes HP, Mueller RP, Danenberg PV, Hoelscher AH, Schneider PM. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3794-3799
- 21 Baldus SE, Monig SP, Schroder W, Metzger R, Lang S, Zirbes TK, Thiele J, Muller RP, Dienes HP, Holscher AH, Schneider PM. Regression of oesophageal carcinomas after neoadjuvant radiochemotherapy: criteria of the histopathological

- evaluation. *Pathologie* 2004; 25: 421-427
- 22 Doki Y, Ishikawa O, Mano M, Hiratsuka M, Sasaki Y, Kameyama M, Ohigashi H, Murata K, Yamada T, Miyashiro I, Yokoyama S, Ishiguro S, Imaoka S. Cytokeratin deposits in lymph nodes show distinct clinical significance from lymph node micrometastasis in human esophageal cancers. *J Surg Res* 2002; 107: 75-81
 - 23 Schneider PM, Baldus SE, Metzger R, Kocher M, Bongartz R, Bollschweiler E, Schaefer H, Thiele J, Dienes HP, Mueller RP, Hoelscher AH. Histomorphologic tumor regression and lymph node metastases determine prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy for esophageal cancer: implications for response classification. *Ann Surg* 2005; 242: 684-692
 - 24 Del Genio A. Laparoscopic esophagectomy in palliative treatment of advanced esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy. *G Chir* 2005; 26: 121-129
 - 25 Hartel M, Wente MN, Buchler MW, Friess H. Surgical treatment of oesophageal cancer. *Dig Dis* 2004; 22: 213-220
 - 26 Stein HJ, Siewert JR. Improved prognosis of resected esophageal cancer. *World J Surg* 2004; 28: 520-525
 - 27 Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, Tse A, Trocola R, Schwartz L, Capanu M, Schwartz GK, Kelsen DP. Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5201-5206
 - 28 Warnecke-Eberz U, Hokita S, Xi H, Higashi H, Baldus SE, Metzger R, Brabender J, Bollschweiler E, Mueller RP, Dienes HP, Hoelscher AH, Schneider PM. Overexpression of survivin mRNA is associated with a favorable prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 1241-1246
 - 29 Brucher BL, Stein HJ, Zimmermann F, Werner M, Sarbia M, Busch R, Dittler HJ, Molls M, Fink U, Siewert JR. Responders benefit from neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma: results of a prospective phase-II trial. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 963-971
 - 30 Sunada F, Itabashi M, Ohkura H, Okumura T. p53 negativity, CDC25B positivity, and metallothionein negativity are predictors of a response of esophageal squamous cell carcinoma to chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5696-5700
 - 31 Schneider S, Uchida K, Brabender J, Baldus SE, Yochim J, Danenberg KD, Salonga D, Chen P, Tsao-Wei D, Groshen S, Hoelscher AH, Schneider PM, Danenberg PV. Downregulation of TS, DPD, ERCC1, GST-Pi, EGFR, and HER2 gene expression after neoadjuvant three-modality treatment in patients with esophageal cancer. *J Am Coll Surg* 2005; 200: 336-344
 - 32 Xi H, Baldus SE, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Neiss S, Metzger R, Ling FC, Dienes HP, Bollschweiler E, Moenig S, Mueller RP, Hoelscher AH, Schneider PM. High cyclooxygenase-2 expression following neoadjuvant radiochemotherapy is associated with minor histopathologic response and poor prognosis in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8341-8347

同行评价
本文采用大样本前瞻性研究的方法研究了新辅助放化疗对中晚期食管鳞癌的影响, 研究方法恰当, 内容丰富, 设计合理, 有较高的学术价值。

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation
10 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
12-17 October 2007
Pennsylvania Convention Center
Philadelphia, PA

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology
11-12 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007
15-18 October 2007
Kobe
apdw@convention.co.jp

磁共振扩散加权成像对肝脏局灶病变的价值

卞读军, 胡冬煦, 肖恩华, 司徒卫军, 袁术文, 白未了, 贺忠, 杜万平, 杨立平

背景资料
磁共振弥散加权成像是一种很有价值的MR成像技术。近年来, 随着平面回波成像(echo planar imaging, EPI)等快速序列的应用及硬件的发展, 弥散加权成像在肝脏疾病的研究方面亦显示出良好的前景。

卞读军, 肖恩华, 司徒卫军, 袁术文, 白未了, 贺忠, 杜万平, 杨立平, 中南大学湘雅二医院放射科, 湖南省长沙市 410011
胡冬煦, 中南大学湘雅二医院心胸外科 湖南省长沙市 410011
卞读军, 在读博士研究生, 主管技师, 主要从事医学影像技术研究。
国家自然科学基金项目, No. 30070235, 30470508
通讯作者: 肖恩华, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院放射科. cjr.xiaoenhua@vip.163.com
电话: 0731-8922242
收稿日期: 2007-05-09 修回日期: 2007-07-22

Clinical application of diffusion-weighted imaging for detecting liver lesions

Du-Jun Bian, Dong-Xu Hu, En-Hua Xiao, Wei-Jun Si-Tu, Shu-Wen Yuan, Mo-Liao Bai, Zhong He, Wan-Ping Du, Li-Ping Yang

Du-Jun Bian, En-Hua Xiao, Wei-Jun Si-Tu, Shu-Wen Yuan, Mo-Liao Bai, Zhong He, Wan-Ping Du, Li-Ping Yang, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hu'nan Province, China

Dong-Xu Hu, Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hu'nan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30070235, 30470508

Correspondence to: En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hu'nan Province, China. cjr.xiaoenhua@vip.163.com

Received: 2007-05-09 Revised: 2007-07-22

Abstract

AIM: To investigate the clinical application of diffusion-weighted imaging (DWI) for detecting liver lesions.

METHODS: DWI and routine non-enhanced MRI were used in 91 persons who included 30 cases with primary hepatic carcinoma, 12 with hepatic hemangioma, 13 with hepatic cyst and 36 with normal liver; b values were set at 500 and 800 s/mm², respectively. After identifying definitively diagnosable cases, mean apparent diffusion coefficient (mADC) and exponential apparent diffusion coefficient (eADC) images were acquired using MRI machine software. The four items—mADC, eADC, DI (diffusion index; the ratio of ADC values in lesion/liver), and

the ratio of eADC values in lesion/liver—were measured. Then, one-way analysis of variance was applied to compare different groups of liver foci with the same item, and further, a least significant difference test (LSD test) was utilized to multiply and compare means in those groups where the mean difference was statistically significant.

RESULTS: The mADC level in normal liver ($1.89 \pm 0.62 \times 10^{-3}$ mm²/s) was lower than that in hepatic cyst ($2.93 \pm 0.46 \times 10^{-3}$ mm²/s) and hemangioma ($2.26 \pm 0.45 \times 10^{-3}$ mm²/s) ($P < 0.01$, $P < 0.05$) but higher than hepatic carcinoma ($1.43 \pm 0.52 \times 10^{-3}$ mm²/s, $P < 0.01$); that in hepatic cyst higher than in hepatic hemangioma and carcinoma (both $P < 0.01$); that in hemangioma higher than in hepatic carcinoma ($P < 0.01$). The eADC level in normal liver (0.155 ± 0.07) was higher than that in hepatic cyst (0.052 ± 0.03 , $P < 0.05$), but lower than in hemangioma (0.23 ± 0.10) and hepatic carcinoma (0.31 ± 0.22) ($P < 0.05$, $P < 0.01$); that in hepatic cyst lower than in hemangioma and hepatic carcinoma (both $P < 0.01$); that in hemangioma lower than in hepatic carcinoma ($P < 0.01$). The ratio of ADC values in the lesion/liver values in hepatic cyst (1.93 ± 0.43) was higher than that in hemangioma (1.43 ± 0.44) and hepatic carcinoma (0.95 ± 0.45 , both $P < 0.01$); that in hemangioma higher than in hepatic carcinoma ($P < 0.01$). The ratio of eADC values in lesion/liver values in hepatic cyst (1.00 ± 0.57) was lower than that in hemangioma (1.63 ± 0.36) and hepatic carcinoma (1.46 ± 0.74) ($P < 0.01$, $P < 0.05$); that in hemangioma higher than in hepatic carcinoma, but insignificant ($P > 0.05$).

CONCLUSION: DWI has advantages for detecting focal liver lesions. Differential diagnoses can be improved by comprehensively utilizing items such as mADC and eADC.

Key Words: Magnetic resonance imaging; Diffusion-weighted imaging; Liver; Liver neoplasm

Bian DJ, Hu DX, Xiao EH, Si-Tu WJ, Yuan SW, Bai ML, He Z, Du WP, Yang LP. Clinical application of diffusion-weighted imaging for detecting liver lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2418-2423

摘要

目的: 探讨磁共振扩散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)对肝脏局灶性病变诊断和鉴别诊断的价值。

方法: 原发性肝癌30例, 肝血管瘤12例, 肝囊肿13例, 正常肝36例, 行常规MRI检查加DWI, b 值取500 s/mm²和800 s/mm², 利用MRI工作站软件Functool 2.6.6i, 500 s/mm²扫描的图像得到ADC图及eADC图, 800 s/mm²扫描的图像测出mADC, eADC及瘤肝ADC比值及瘤肝eADC比值等指标, 利用SPSS12.0软件进行统计学处理。

结果: mADC值正常肝($1.89 \pm 0.62 \times 10^{-3}$ mm²/s)低于肝囊肿与肝血管瘤($2.93 \pm 0.46 \times 10^{-3}$ mm²/s, $2.26 \pm 0.45 \times 10^{-3}$ mm²/s, $P < 0.01$, $P < 0.05$)而高于原发性肝癌($1.43 \pm 0.52 \times 10^{-3}$ mm²/s, $P < 0.01$); 肝囊肿高于肝血管瘤($P < 0.01$)与原发性肝癌($P < 0.01$); 肝血管瘤高于肝细胞癌($P < 0.01$)。eADC值正常肝高于肝囊肿而低于肝血管瘤与原发性肝癌(0.155 ± 0.07 vs 0.052 ± 0.03 , 0.23 ± 0.10 , 0.31 ± 0.22 , $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); 肝囊肿低于肝血管瘤($P < 0.01$)与原发性肝癌($P < 0.01$); 肝血管瘤低于肝细胞癌($P < 0.01$)。瘤肝ADC比值肝囊肿高于肝血管瘤与原发性肝癌(1.93 ± 0.43 vs 1.43 ± 0.44 , 0.95 ± 0.45 , 均 $P < 0.01$); 肝血管瘤高于原发性肝癌($P < 0.01$)。瘤肝eADC比值在不同组间比较: 肝囊肿低于肝血管瘤与原发性肝癌(1.00 ± 0.57 vs 1.63 ± 0.36 , 1.46 ± 0.74 , $P < 0.01$, $P < 0.05$); 肝血管瘤高于原发性肝癌, 但无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: DWI有利于显示肝脏病变, 综合运用mADC和eADC可进一步提高鉴别诊断的正确率。

关键词: 磁共振成像; 扩散加权成像; 肝; 肝肿瘤

卞读军, 胡冬煦, 肖恩华, 司徒卫军, 袁术文, 白未了, 贺忠, 杜万平, 杨立平. 磁共振扩散加权成像对肝脏局灶病变的价值. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2418-2423
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2418.asp>

0 引言

磁共振水分子弥散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)在显示疾病的敏感性以及诊断和鉴别诊断方面具有重要的价值。近年来, 随着平面回波成像(echo planar imaging, EPI)等快速序列的应用及硬件的发展, 弥散加权成像在肝脏疾病

的研究方面亦显示出良好的前景^[1-3]。利用DWI及所测得的平均ADC值将有助于进一步鉴别诊断^[1-11]。我院MRI机器自带软件Functool2.6.6i还可测出eADC值, 进一步可得瘤肝ADC比值及瘤肝eADC比值等指标, 而研究此类新指标的文献报道较少, 我们利用DWI并提出新的指标来探讨肝脏局灶性病变的鉴别。

1 材料和方法

1.1 材料 住院原发性肝癌患者30例, 共35个病灶, 男26例, 女4例, 年龄16-74(平均 49.9 ± 13.29)岁, 全部经CT, MRI, 肝动脉造影, AFP检测等临床综合诊断确诊, 其中手术病理证实为肝细胞癌7例, 所有患者均符合2001年全国肿瘤防治办公室、中国抗癌协会制定的原发性肝癌临床诊断标准^[12]。肝血管瘤组12例, 共17个病灶, 男7例, 女5例, 年龄34-70(平均 52.5 ± 10.6)岁。全部病例经64层螺旋CT增强扫描和MRI动态增强临床综合诊断确诊, 其中3例经手术病理证实。肝囊肿组13例, 共14个病灶, 男9例, 女4例, 年龄37-78(平均 59.3 ± 11.7)岁, 其中2例手术病理证实。正常肝组36例, 男21例, 女15例, 年龄14-63(平均 43.2 ± 11.6)岁。检查前询问志愿者确认无肝炎及肝硬化, 近1 wk无服药史, 无饮酒史, 并常规检查肝炎生化、肝功能及肝脏B超、CT及MRI, 除外肝脏疾患。应用GE Signa Horizon LX, 1.5T双梯度磁共振仪, Body线圈。

1.2 方法 肝脏DWI检查采用SE-EPI序列, 体部Body线圈, TR4000 ms, TE Min, 带宽166.67 Hz, 层数10, 层厚8 mm, 层距1.5 mm, NEX 1, FOV36 cm \times 36 cm, 采集矩阵128 \times 128, 参照相关文献[3-5], b 值取500 s/mm²和800 s/mm², 扩散敏感梯度场的施加方向为All, 频率编码方向: R/L。利用工作站软件Functool2.6.6i处理原始数据, 得到ADC值图像及eADC值图像, 选定足够大的感兴趣区(ROI)并避开较大血管、伪影及坏死区, 测出平均ADC值(mean apparent diffusion coefficient, mADC), 指数化ADC值(exponential apparent diffusion coefficient, eADC)、瘤肝ADC比值、瘤肝eADC比值4个指标, 其中ADC = $\ln(S_{\text{低}}/S_{\text{高}})/(b_{\text{高}} - b_{\text{低}})$, 式中 $S_{\text{低}}$ 和 $S_{\text{高}}$ 分别指用低、高 b 值成像所测得的组织信号值; eADC = $\exp(-ADC \cdot b)$; 瘤肝ADC比值 = 病灶ADC值/灶周ADC值; 瘤肝eADC比值 = 病灶eADC值/灶周eADC值。

统计学处理 采用SPSS12.0软件包分析整理各病种组内数据, 以(mean \pm SD)表示, 之后分别

创新盘点
本研究显示eADC值、瘤肝ADC比值及瘤肝eADC比值在肝脏局灶性病变诊断和鉴别诊断中具有重要作用。

应用要点

本文探讨了磁共振扩散加权成像对肝脏局部病变诊断和鉴别,结果显示在临床中综合使用eADC值、瘤肝ADC比值及瘤肝eADC比值可提高病灶的检测率。

表 1 mADC和eADC在不同病组间的统计结果

分组	mADC ($10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}$)	95% CI	eADC	95% CI
正常肝	1.89 ± 0.62	(1.66, 2.09)	0.155 ± 0.07	(0.132, 0.184)
肝囊肿	2.93 ± 0.46^b	(2.59, 3.12)	0.052 ± 0.03^a	(0.036, 0.067)
肝血管瘤	2.26 ± 0.45^{ad}	(2.05, 2.52)	0.23 ± 0.10^{ad}	(0.179, 0.277)
肝癌	1.43 ± 0.52^{bdf}	(1.66, 2.09)	0.31 ± 0.22^{bdf}	(0.238, 0.391)

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常肝; ^d $P < 0.01$ vs 肝囊肿; ^f $P < 0.01$ vs 肝血管瘤。

表 2 瘤肝ADC和eADC比值在不同病组间的统计结果

分组	ADC比值	95% CI	eADC比值	95% CI
肝囊肿	1.93 ± 0.43	(3.57, 3.73)	1.00 ± 0.57	(0.67, 1.32)
肝血管瘤	1.43 ± 0.44^b	(1.28, 1.73)	1.63 ± 0.36^b	(1.45, 1.82)
肝癌	0.95 ± 0.45^{bd}	(1.67, 2.17)	1.46 ± 0.74^a	(1.20, 1.70)

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 肝囊肿; ^d $P < 0.01$ vs 肝血管瘤。

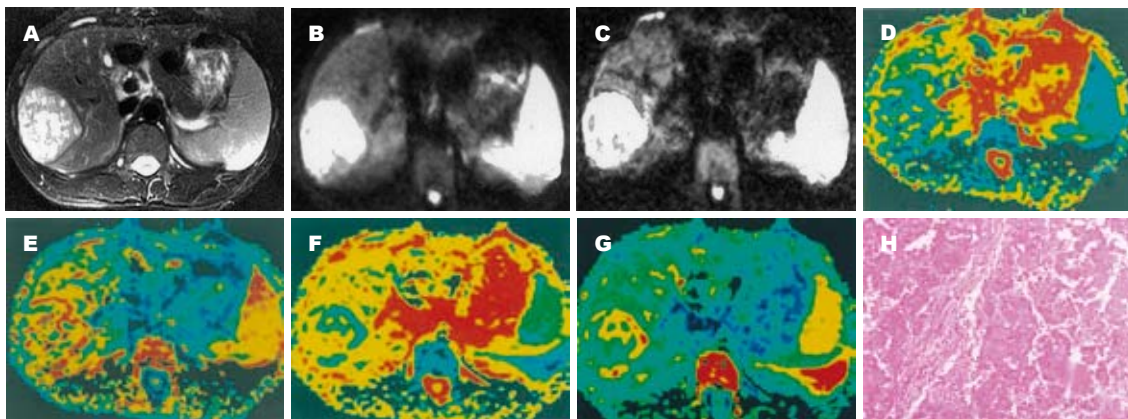


图 1 男, 19岁, 肝右叶原发性肝癌。A: T2WI, 肝右后叶5 cm × 6 cm × 4 cm混杂信号, 边界清楚; B: $b = 500$ 的DWI图像边界非常清楚为混杂信号, 实质部分为高信号, 坏死囊变部分为低信号; C: $b = 800$ 的DWI图像, 随着 b 值的增加病灶信号稍有下降; D, E: $b = 500$ 的ADC图和eADC图, 病灶显示低信号; F, G: $b = 800$ 的ADC图和eADC图, 病灶低信号显示更清晰; H:原发性肝细胞癌II - III级, 侵犯肝被膜, 周边肝组织肝硬化, 间质炎症细胞浸润(HE × 100)。

在同种指标内不同病组间采用单因素方差分析比较各病种组有无差异, 在有统计学差异的组间采用Fisher LSD法行多重比较。

2 结果

各指标在不同病组间的差异均有显著的统计学意义, 进一步用Fisher LSD法行多重比较表明, 在 $\alpha = 0.05$ 的概率水平, 肝血管瘤与肝癌瘤肝eADC比值无显著性差异外, 余病组各指标差异均有显著性($P < 0.05$, 表1-2及图1-5)。

3 讨论

从病灶的形态学特点分析, 认为磁共振的信号强度与肿瘤的分化程度相关, 可以客观地反映

病变的内部空间结构和组织成分^[13-14]。检查过程多先采用自旋回波、平面回波等快速成像序列平扫, 发现病变后, 再注射磁共振对比剂加做增强扫描, 提高对病灶的检出率和定性、定位的诊断能力^[15-16]。但常规T1和T2加权成像判断病变性质的准确率为70%-90%, 即使是动态增强MRI扫描, 对部分病变尤其是小病灶的鉴别仍有困难。动物实验和临床研究已表明, mADC值的大小取决于成像物质及其内部分子的空间分布^[17]。肝脏海绵状血管瘤及肝囊肿主要由液体成分构成, 水分子的运动相对自由, mADC值明显高于实性肿块; 血管瘤内常有纤维间隔、瘢痕及出血, 且血窦中所含的血液黏度高于囊肿的囊液, 因而其mADC值又低于囊肿^[18-19], 这样便造成了

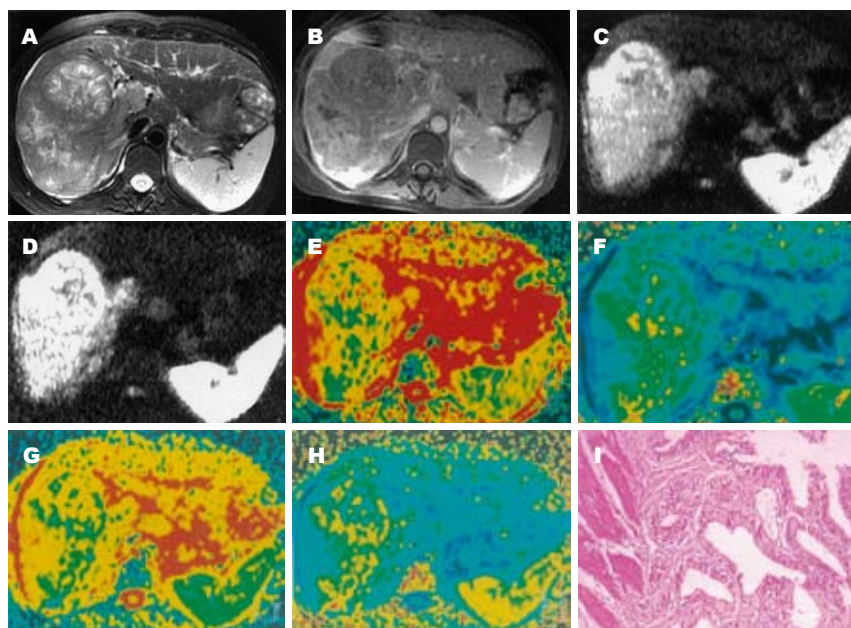


图 2 女, 28岁, 肝右叶原发性肝癌. A(T2WI); B(T1WI): 肝右叶8 cm × 6 cm × 9 cm不均匀混杂信号; C: $b = 500$, DWI图, 病灶呈高信号; D: $b = 800$, DWI图, 病灶信号更高; E-F: $b = 500$ 的ADC图和eADC图, 病灶显示低信号; G-H: $b = 800$ 的ADC图和eADC图, 病灶信号显示更低; I: 手术切除标本; J: 肝细胞癌肝癌III级, 癌组织大片坏死, 呈结节状侵犯周边肝组织(HE × 100).

名词解释
1 瘤肝ADC比值:
病灶ADC值/灶周
ADC值.
2 瘤肝eADC比值:
病灶eADC值/灶
周eADC值.

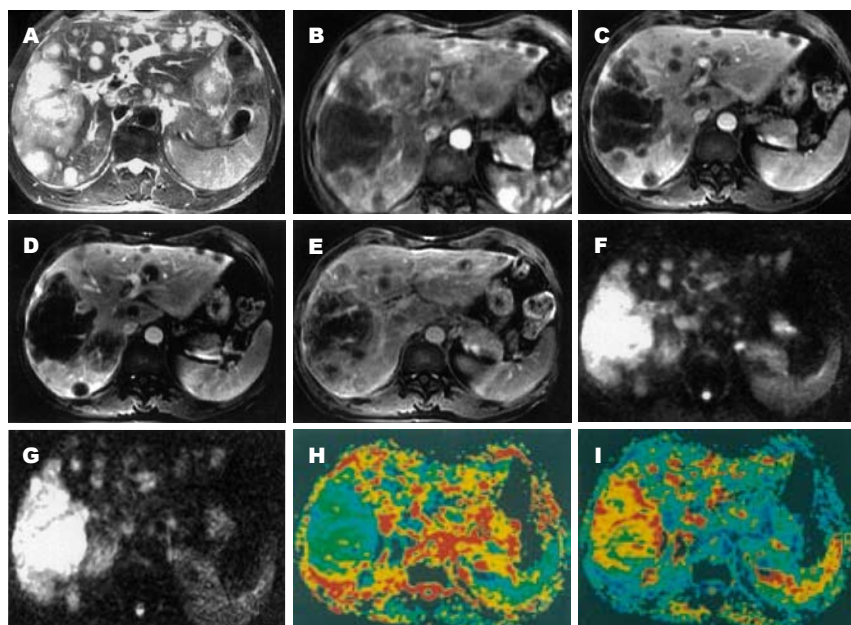


图 3 男, 49岁, 肝右叶原发性肝癌并肝内多发转移, 经导管肝动脉造影证实肝右叶有多个大小不等肿瘤血管染色区, 第1次介入术前. A: T2, 肝右叶7 cm × 9 cm × 10 cm大小不均匀混杂信号, 余肝见多个圆形高信号病灶; B-E: 为同层MRI动态增强图像, 病变于动脉期出现强化, 延时期病灶内信号仍高于正常肝组织, 病变中心亦有未强化区; F: $b = 500$, DWI图, 病灶呈高信号; G: $b = 800$, DWI图, 病灶信号更高; H-I: $b = 500$ 的ADC图和eADC图, 病灶呈低信号.

实体肿瘤、海绵状血管瘤和囊肿mADC值之间存在着显著差异. 因为原发性肝癌多为实体成分, 所含自由水相对较少, 扩散运动较慢, 扩散系数较低; 血管瘤主要由纤维间隔和血窦组成, 血窦内充满血液, 分子运动相对自由, 扩散运动较快, 因此扩散系数大于肝脏恶性肿瘤. 而血管瘤内血液黏滞系数较大以及周围大量的纤维间隔, 相对限制了血液的扩散运动, 扩散系数小于肝囊肿; 肝囊肿内含大量由水, 扩散不受限制, mADC值最高, 也最接近D值.

Yamada *et al*^[20]认为采用低 b 值, 测得ADC值偏高是因为融合了部分微循环血流灌注的影响; 而采用高 b 值, 血流灌注的影响基本上可以被忽

略, 故测得ADC值较接近肝脏的D值, 更能反映组织的扩散特性. 但低 b 值时解剖结构显示比较清晰, 而高 b 值时信号衰减明显, 信噪比下降, EPI序列的各种伪影如化学位移伪影、磁敏感性伪影、鬼影增多, 有时甚至难以观察, 无法选取感性趣区, 而且容易漏诊. 因而本组结果提示大 b 值不宜超过 800 s/mm^2 , 而 b 值为 500 s/mm^2 左右较为适宜, 虽然所得肝脏病变的mADC值不够精确, 距实际D值仍有差距, 但是可以相对地减少血流灌注的影响, 而且图像质量较好, 便于实际操作. 本研究显示mADC值于不同肝脏病变中不同, 可能原因是肝囊肿主要成分为液性, 水分子的运动较自由, mADC值明显高于实性肿块和海

同行评价
本文利用DWI及所测得的值来鉴别诊断肝脏局部病变,行文流畅,结果可信,对临床工作具有一定的指导意义。

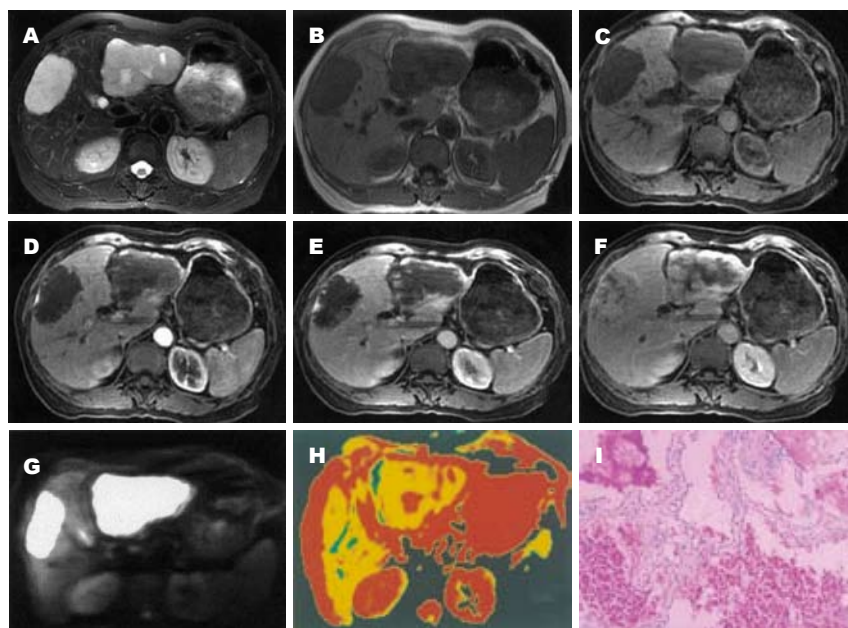


图4 女56岁,肝内多发海绵状血管瘤。A: T2WI,左肝外段8 cm × 5 cm × 7 cm,右肝前段6 cm × 4 cm × 6 cm边界清楚病灶, T2为高信号,呈分叶状; B: T1WI,病灶为低信号; C-F: 为MRI同层动态增强图像,病灶信号逐渐增强,延迟期病灶被造影剂充填,呈均匀高信号; G: $b = 500$ 的DWI图像,病灶为高信号; H: mADC图,病灶呈略高信号; I: 海绵状血管瘤,肿块内纤维组织增生,其余肝细胞水肿,脂变(HE × 100)。

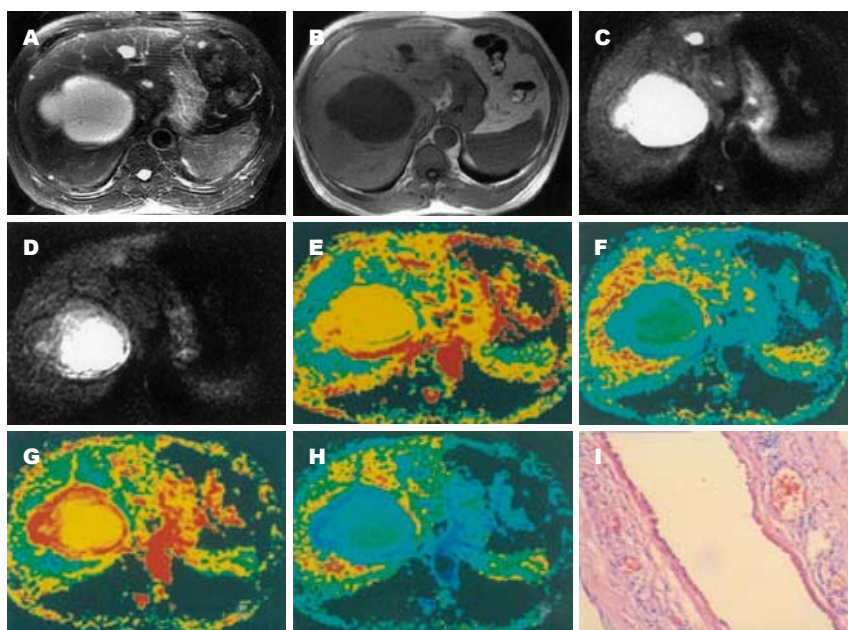


图5 男66岁,肝内多发囊肿。A-B: 肝右后叶及左内叶病灶, T2WI呈明显高信号,有部分T2穿透效应的影响, T1WI呈均匀低信号; C: $b = 500$, DWI图,病灶呈高信号; D: $b = 800$, DWI图,病灶信号更高; E-F: $b = 500$ 的mADC图和eADC图,病灶显示高信号; G-H: $b = 800$ 的mADC图和eADC图,病灶信号显示更高; I: 符合多发性肝囊肿,囊肿壁主要为立方上皮(HE × 100)。

绵状血管瘤,恶性肿瘤主要由分化差的实性成分构成,水分子运动受限,因此其mADC值明显低于肝囊肿和海绵状血管瘤,海绵状血管瘤为大小不等的血窦组成,其内充满血流,血管腔隙间充填有纤维组织及基质,甚至有出血存在,所以其黏滞度比囊肿内液体高,因而其mADC值虽然高于恶性病变,但低于囊肿,在较高 b 值的DWI上病灶信号降低较明显。瘤肝ADC比值在各病组间少有重叠,最能体现各病组间的差异,其原因可能是此指标是个相对数,无量纲,受仪器性能、扫描参数、血流灌注的影响较小,或者说比值变换后可能部分消除个体差异,减少血流灌注的影响。故我们认为瘤肝ADC比值是

不同肝脏病变中较好的鉴别指标,在同类研究中具有较大的可比性。肝癌与血管瘤瘤肝eADC比值无显著性统计学差异,可能的原因是癌组织学特点不同,水分子运动受限的程度变化范围大,因而测得的数据变异大,与血管瘤的数据容易重叠,甚至无显著的统计学差异。

决定DWI图像信号高低的并不只是mADC值,若以mADC值判断病变信号强弱,囊肿和血管瘤应该很低,但实际上二者在DWI图像上信号均较高,这说明了组织的T2特性也参与了成像,也就是说DWI既是水分子扩散加权成像也是T2加权成像。对于肿瘤来说,ROI的选择应尽量避开坏死区,虽然坏死也是肿瘤尤其恶性肿

瘤的特点之一,但他仅仅是肿瘤生长过程中的继发性表现,不代表肿瘤的组织学上的本质特征,若ROI的选取不避开坏死区,则使测值偏高。

总之, DWI 是一种很有价值的MR成像技术,从分子水平为疾病的鉴别提供全新的信息,属于功能成像,但在肝脏病变的应用时还需克服EPI技术所产生的伪影,并选取适合于肝脏成像的 b 值,使DWI的图像清晰、信噪比高、所测得mADC, eADC值准确,这还需更深一步的研究。

4 参考文献

- 1 Sun XJ, Quan XY, Huang FH, Xu YK. Quantitative evaluation of diffusion-weighted magnetic resonance imaging of focal hepatic lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6535-6537
- 2 郑晓林, 徐辉雄, 吕明德, 谢晓燕, 徐作峰. 扩散加权MR I定性诊断肝脏局灶性病变的研究. *中华放射学杂志* 2005; 39: 173-176
- 3 Naganawa S, Kawai H, Fukatsu H, Sakurai Y, Aoki I, Miura S, Mimura T, Kanazawa H, Ishigaki T. Diffusion-weighted imaging of the liver: technical challenges and prospects for the future. *Magn Reson Med Sci* 2005; 4: 175-186
- 4 孙希杰, 梁文, 全显跃, 虞春堂, 贾洪顺, 杨建明. 3 cm以下肝脏常见病变的磁共振成像的量化研究. *肝胆外科杂志* 2005; 14: 112-115
- 5 孙希杰, 全显跃, 梁文, 温志波, 曾盛, 黄凡恒, 唐明. 肝脏病变的磁共振扩散成像的量化研究初探. *实用放射学杂志* 2003; 19: 596-599
- 6 孙希杰, 全显跃, 许乙凯, 梁文. 肝脏常见病变磁共振显像的量化研究. *中国普通外科杂志* 2005; 14: 522-525
- 7 郑晓林, 徐辉雄, 吕明德, 许达生, 徐作峰. 磁共振弥散加权成像检测肝内小病灶的临床应用. *中国医学影像技术* 2004; 20: 1510-1512
- 8 郑晓林, 徐辉雄, 吕明德, 徐作峰, 谢晓燕, 赖英荣. MR扩散加权成像对经皮肝脏消融灶组织成分定性研究的初探. *中华放射学杂志* 2006; 40: 417-422
- 9 张雪辉, 梁碧玲, 赵继泉, 钟镜联. 肝脏常见病变弥散系数的初步研究. *中国医学影像技术* 2004; 20: 26-28
- 10 张毅, 郭顺林, 雷军强, 王文辉, 白亮彩, 赵茜静. 磁共振扩散加权成像在肝癌介入治疗前后应用的初步研究. *中国介入影像与治疗学* 2006; 3: 182-185
- 11 丁爽, 贾文霄, 米日古丽·沙依提, 王俭, 李琛玮, 陈宏. 磁共振扩散加权成像在肝脏占位性病变中的应用. *新疆医科大学学报* 2005; 28: 475-477
- 12 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 135
- 13 Hunsche S, Moseley ME, Stoeter P, Hedehus M. Diffusion-tensor MR imaging at 1.5 and 3.0 T: initial observations. *Radiology* 2001; 221: 550-556
- 14 韩鸿宾, 谢敬霞. MR平面回波快速成像技术应用研究. *中国医学影像技术* 2000; 5: 410-413
- 15 Semelka RC, Helmberger TK. Contrast agents for MR imaging of the liver. *Radiology* 2001; 218: 27-38
- 16 Jeong MG, Yu JS, Kim KW. Hepatic cavernous hemangioma: temporal peritumoral enhancement during multiphase dynamic MR imaging. *Radiology* 2000; 216: 692-697
- 17 Sakuma H, Nomura Y, Takeda K, Tagami T, Nakagawa T, Tamagawa Y, Ishii Y, Tsukamoto T. Adult and neonatal human brain: diffusional anisotropy and myelination with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 1991; 180: 229-233
- 18 Brancatelli G, Federle MP, Blachar A, Grazioli L. Hemangioma in the cirrhotic liver: diagnosis and natural history. *Radiology* 2001; 219: 69-74
- 19 Krinsky GA, Lee VS, Theise ND. Focal lesions in the cirrhotic liver: high resolution ex vivo MRI with pathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2000; 24: 189-196
- 20 Yamada I, Aung W, Himeno Y, Nakagawa T, Shibuya H. Diffusion coefficients in abdominal organs and hepatic lesions: evaluation with intravoxel incoherent motion echo-planar MR imaging. *Radiology* 1999; 210: 617-623

编辑 何燕 电编 张强

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

消化内镜诊疗技术研讨班通知 (第一轮)

本刊讯 2007年国家级继续医学教育项目“消化内镜诊疗技术研讨班”(项目编号2007-03-03-046)将于2007-11在青岛市举办,由青岛大学医学院附属医院主办、世界华人消化杂志协办,特邀国内外著名专家进行专题讲座和现场演示,欢迎消化内镜工作者投稿参会,优秀稿件可优先发表。回执或投稿请于2007-09月底前寄青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心,刘希双收,邮编: 266003, E-mail: liuxishuang1@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672。

蛋白芯片技术对肝细胞癌组织蛋白谱的建立及标志蛋白的筛选

李冬, 张建中, 郑燕华, 纪小龙, 尤红, 舒清明, 范丽娜, 李享春

背景资料
肝细胞癌作为最常见和恶性程度较高的恶性肿瘤之一, 难于早期诊断, 仅有少数患者能够及时接受手术, 因此在HCC临床治疗没有取得突破性进展之前, 研究重点是建立完整的HCC差异蛋白表达谱, 并从中发现新的治疗靶分子以及早期诊断的分子标记物。

李冬, 张建中, 郑燕华, 中国人民解放军306医院病理科 北京市 100101
纪小龙, 舒清明, 范丽娜, 中国人民解放军武警总医院病理科 北京市 100080
尤红, 北京友谊医院肝病研究中心 北京市 100053
李享春, 中国人民解放军装备指挥技术学院士官系门诊部 北京市 102249
李冬, 2002年毕业于第四军医大学, 2004-07/2007-06于航天医学研究所攻读医学硕士, 主要从事航天分子病理学的研究。
通讯作者: 张建中, 100101, 北京市安翔北路9号, 中国人民解放军306医院病理科. zhangjz55@sina.com
电话: 010-66356237 传真: 010-64871261
收稿日期: 2007-04-14 修回日期: 2007-07-21

Using protein chip technology to screen for tissue proteomic profiles and tumor markers in hepatocellular carcinoma

Dong Li, Jian-Zhong Zhang, Yan-Hua Zheng, Xiao-Long Ji, Hong You, Qing-Ming Shu, Li-Na Fan, Xiang-Chun Li

Dong Li, Jian-Zhong Zhang, Yan-Hua Zheng, Department of Pathology, 306 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
Xiao-Long Ji, Qing-Ming Shu, Li-Na Fan, Department of Pathology, General Hospital of Armed Police Force of Chinese PLA, Beijing 100080, China
Hong You, Research Center of Liver Disease, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100053, China
Xiang-Chun Li, Department of Sergeant, The Academy of Equipment Command and Technology of Chinese PLA, Beijing 102249, China
Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, Department of Pathology, 306 Hospital of Chinese PLA, 9 Anxiang North Road, Beijing 100101, China. zhangjz55@sina.com
Received: 2007-04-14 Revised: 2007-07-21

Abstract

AIM: To use the surface-enhanced laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technique to screen for tissue biomarkers in patients with hepatocellular carcinoma (HCC), but with different clinicopathological features.

METHODS: Proteomic spectra were examined and analyzed by mass spectroscopy in 44 cases, including 26 specimens of HCC tissue that had been pathologically confirmed in patients aged

34-68 years, and 18 specimens of liver cirrhosis tissue in patients aged 38-70 years. The spectra obtained were analyzed using the biomarker wizard system, and the biomarkers were defined by searching www.ExPasy.org.

RESULTS: A total of 16 distinguished proteomic biomarkers, 7 up-regulated and 9 down-regulated, were detected from screening HCC tissue, in contrast with liver cirrhosis tissue. There were significant differences in the protein peaks of different molecular masses of 4.7, 7.2 and 9.8 kDa between HCC and liver cirrhosis tissues. Eleven distinguished proteomic biomarkers were screened when comparing cases of moderately and highly differentiated HCC tissue. All proteins were confirmed by searches of www.ExPasy.org.

CONCLUSION: The SELDI-TOF-MS technique offers a unique platform for proteomic detection in HCC. It is also a non-invasive method for studying proteomic changes in the development and progression of HCC.

Key Words: Spectrometry Mass Matrix-assisted laser desorption-ionization; Hepatocellular carcinoma; Tissue proteomic spectra

Li D, Zhang JZ, Zheng YH, Ji XL, You H, Shu QM, Fan LN, Li XC. Using protein chip technology to screen tissue proteomic profiles and tumor markers in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2424-2430

摘要

目的: 应用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)对肝细胞癌组织的蛋白表达谱进行分析, 从中筛选出标记蛋白。

方法: 采用CM10芯片及SELDI-TOF-MS技术对肝细胞癌组织26例和肝硬化组织18例进行蛋白指纹图谱检测分析; 比较高、中、低分化肝细胞癌组织, 不同TNM分期肿瘤以及AFP阴、阳性肝细胞癌组织的蛋白表达差异,

所得结果均采用Biomarker Wizard软件进行分析; 通过查询蛋白库, 对特定分子质量所对应的标记蛋白进行初步确定。

结果: 肝细胞癌和肝硬化组织蛋白表达图谱之间存在16个稳定的标志蛋白, 7个蛋白在肝细胞癌组织中表达上调, 9个蛋白在肝细胞癌组织中表达下调, 其中4.7 kDa, 7.2 kDa和9.8 kDa蛋白峰差异性最明显; 中分化和高分化肝细胞癌之间存在11个标志蛋白; 通过查询蛋白库ExPasy并进行筛选, 初步确定特定分子质量所对应的蛋白。

结论: 采用SELDI-TOF-MS技术, 证实在肝细胞癌组织中存在多种高度特异性低分子蛋白。

关键词: 基质辅助激光解吸电离; 肝细胞癌; 组织蛋白谱

李冬, 张建中, 郑燕华, 纪小龙, 尤红, 舒清明, 范丽娜, 李享春. 蛋白芯片技术对肝细胞癌组织蛋白谱的建立及标志蛋白的筛选. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2424-2430
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2424.asp>

0 引言

在全世界范围内, 肝细胞癌(HCC)在所有恶性肿瘤中的发病率居于第5位, 致死率在所有恶性肿瘤中位居第3^[1], 每年大约造成1 000 000人死亡^[2]. HCC通常伴发其他慢性肝病, 主要为肝硬化^[3]. HCC的致病因素包括慢性病毒性肝炎、酒精肝、代谢性疾病或其他环境因素^[4], 其中HBV感染是我国肝硬化和HCC的主要病因. 由于HCC对化疗不敏感, 手术, 包括病灶切除或者肝移植, 是目前唯一可能治愈HCC的疗法. 然而, 由于HCC常常晚期才表现出明显的临床症状, 因此难于早期诊断. 实际上, 仅有约15%的患者能够及时接受手术. 总体而言, HCC的5 a存活率始终低于5%^[5]. 在HCC的临床治疗取得突破性进展之前, 研究重点是发现新的治疗靶分子以及早期诊断分子标记物. 最近的研究已经证实, 与甲胎蛋白相比, 还存在其他有诊断价值的分子标记物^[6-7]. 然而, 到目前为止, 还没有哪种标记物具有足够的特异性; 同时, 大多数相关研究都是关联性或回顾性的. 因此, 有必要采用新的蛋白质组学方法寻找具有HCC诊断、预后和治疗意义的蛋白分子. 最直接的方法是采用蛋白质谱对HCC组织和血清进行分析, 从中寻找差异蛋白, 因为恶性肿瘤的起始和演进都源于蛋白表达水平改变及其累积效应。

传统的双向凝胶电泳(2D-PAGE)是分离复杂蛋白复合物时最常用的方法^[8], 并且在HCC蛋白组学研究中应用最为广泛. 2D-PAGE可以同时观察到上千个蛋白位点, 允许对蛋白进行分离, 可重复性好, 并且具有足够的敏感度. 但2D-PAGE并不是一种可以进行大规模样本分析的技术, 也无法观察到所有种类的蛋白(例如膜蛋白, 低丰度蛋白). CIPHERGEN公司的蛋白芯片技术通过将固相色谱和质谱测量结合^[9-11], 可以对组织液、细胞裂解液等生物样本进行分析. 这种所谓的表面增强激光解吸和离子化飞行时间(SELDI-TOF)方法由Yip *et al*^[12]首次描述, 他利用芯片表面的具有特殊亲和力的分子和样本中的蛋白结合, 在激光照射下使其解吸, 通过特定电场, 并根据其带电量的多少和通过电场的时间来推算出分子质量, 可以俘获fmoL级的小分子(<2500 kDa)、低丰度蛋白质, 大大提高了实验的精确性和特异性。

蛋白芯片技术目前已经广泛应用于各种癌症的血清学分析^[13-14], 但少见于对新鲜组织进行的分析^[15-16]. 我们通过对肝细胞癌和肝硬化组织蛋白指纹图谱的初步观察, 筛选HCC特异的标志蛋白, 并分析不同病理学特征肿瘤组织蛋白表达的差异, 旨在发现并鉴定参与HCC肿瘤发生有关的各种蛋白, 并探讨其在临床诊断、预后以及治疗上的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 尿素、乙腈、三氟乙酸、Tris-HCl pH9.0、CHAPS、DTT、NaAc、HPLC H₂O、Hepes购自Sigma公司, 丝氨酸蛋白酶抑制剂(PMSF)购自Solarbio公司. 收集解放军306医院武警总医院及北京友谊医院手术时切除的新鲜HCC组织26例, 男25例, 女1例, 平均年龄55.5(34-68)岁, 低分化3例, 中分化13例, 高分化10例, 癌结节直径大于2 cm 15例, 小于2 cm 11例, 根据免疫组化染色甲胎蛋白(AFP)阳性15例, 阴性11例; 收集武警总医院肝移植手术中切除的肝硬化组织18例, 平均年龄52(30-70)岁, 男15例, 女3例. 所有新鲜肝癌组织均仔细切割, 保证未带有癌旁组织, 手术切除后的组织被立刻投入液氮中. 材料被分为肿瘤和非肿瘤2组. 蛋白飞行时间质谱(protein chip biology system): 美国CIPHERGEN公司生产, 型号PBS II-C. 蛋白质芯片: 采用CM10(弱阳离子交换芯片), 表面结合弱阴型离子羧基, 可以和被分析物表面的正电荷基团相互作用而俘获蛋白, 用于检测高等电点的

研发前沿
目前发现除甲胎蛋白以外, 还存在其他具有HCC诊断价值的分子标记物. 采用新的蛋白质组学方法, 可以直接对HCC组织和血清进行分析, 具有灵敏度高、检测样本量大的优点. 其中, SELDI蛋白指纹技术作为一种较新的质谱技术, 擅长于检测小分子低丰度蛋白分子. 目前其在美国已应用于卵巢癌和前列腺癌的诊断, 其特异性和敏感性远远高于传统方法。

相关报道

目前利用SELDI技术已发现HCC患者和正常人的血清蛋白质指纹图谱之间有17个稳定的标志蛋白,并筛选出两个标志蛋白建立起一个HCC的诊断模型,对HCC的诊断特异性为97.06%,灵敏度为91.18%。

蛋白质和生物标记物。

1.2 方法 融解冰冻组织,每个样品取100 mg,放入匀浆器中加U9缓冲液1 mL和少量PMSF在冰上将组织匀浆。匀浆后液体取出置于1.5 mL离心管中以8500 *g* 4℃离心10 min。每个样品取750 μ L置于2 mL专用离心管,以26000 *g* 15℃离心2 h。分离上清液并以50 μ L分装冻存于-80℃。实验前采用考马斯亮蓝法确定裂解液中蛋白含量在2-10 g/L。将已加样处理的CM10芯片装入Bioprocessor中,每孔加入200 μ L结合缓冲液,室温振荡洗涤2次,每次5 min,甩干。每孔加入样品混合液100 μ L,振荡孵育1 h,甩去样品,用洗脱缓冲液(100 mmol/L, NaAc, pH4.0) 200 μ L室温振荡洗涤2次,每次5 min,甩干;再用HPLC H₂O洗涤1次,立即甩干。拆开Bioprocessor,取出芯片,晾干后,每点加2次SPA 0.5 μ L,晾干后上机测试。采用蛋白飞行质谱仪对结合在弱阳离子CM10芯片上的血清蛋白进行读取分析,设定最高检测分子质量为200 kDa,优化范围为2-20 kDa,激光强度185,检测敏感度为9。考虑到基质峰的存在,将1 kDa以下的峰滤去,以免基质峰对结果造成影响。仪器每天采用塞弗吉公司提供的ALL-IN-ONE蛋白质标准分子校正,系统的质量偏差 $\leq 0.1\%$ 。采用CIPHERGEN Proteinchip 3.1版本的分析软件自动采集数据。

统计学处理 采用CIPHERGEN Proteinchip 3.1软件对数据进行统计学处理,确定两组间蛋白峰比较时, $P < 0.01$ 时具有统计学意义,以Biomarker patterns system软件分析数据建模。

2 结果

2.1 HCC蛋白峰 对HCC和非HCC组蛋白表达谱进行对比分析后,发现两组间存在16个稳定的差异表达蛋白,其中7个表达上调,9个表达下调(表1,图1-2)。通过检索ExPasy蛋白数据库(<http://www.expasy.org>),初步确定特定分子质量所对应的候选蛋白,检索时分子质量设定为质/核比 $\pm 0.1\%$,PI值 9.0 ± 5.0 。检索结果见表2。分析检索结果表明,一些蛋白或肽分子只有一个候选结果,可初步判定检索结果即为该分子质量标记蛋白,其他多候选结果者,根据其组织来源、生物学功能,初步进行筛选(表3)。根据AFP免疫组化染色结果,将HCC组织病例分为AFP(-)和AFP(+)组,对其蛋白表达谱进行分析,结果显示二者之间并没有统计学差异。

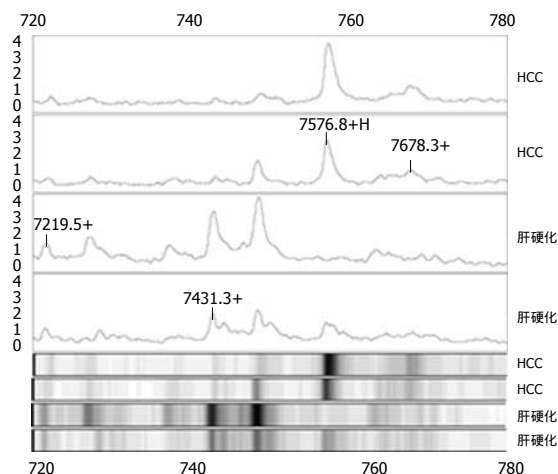


图1 HCC与肝硬化对照在7200-7800 Da区间的蛋白指纹图谱。图中显示随机抽取的肝癌患者7219, 7431, 7576和7678 Da蛋白峰。其中在肝硬化组中出现的7219和7431 Da在肝癌组明显下调,而肝癌组中的7576和7678 Da较肝硬化组明显上调。下面4道为上述结果的模拟电泳图谱。

表1 HCC组织中的标志蛋白

分子质量(Da)	蛋白表达	P
2273		0.0077157109
2641		0.0025471256
4524		0.0065551667
4674		0.0001131722
4974		0.0071142201
6758		0.0083623824
7219		0.000175627
7431		0.0077157109
7576		0.0055540603
7678		0.002125878
9846		0.0000063936
10747		0.0002695077
15137		0.0046930365
15341		0.0051071705
31037		0.0036265565
31748		0.0016126005

“ ”表示在HCC患者组织中蛋白表达上调,“ ”表示在HCC组织中蛋白表达下调。

2.2 不同分化HCC组织蛋白表达谱 通过对3例低分化,13例中分化和10例高分化HCC的蛋白表达谱进行对比分析,寻找具有统计学意义的标记蛋白。低分化组和中分化组、高分化组蛋白表达谱之间都没有统计学意义的差异。中分化组和高分化组蛋白表达谱之间存在11个具有统计意义的标记蛋白,其中3个在中分化HCC中低表达,8个在中分化HCC中高表达。通过检索ExPasy蛋白数据库,初步确定特定分子质量所对应的候选蛋

表 2 SWISS-PROT数据库中检索的人HCC肝组织差异蛋白(肽段)

分子量(Da)	检索结果
	Anaphase - promoting complex subunit 11 (Q9NYG5)
	Cyclin - dependent kinases regulatory subunit 2 (P33552)
	Pro - MCH - like protein 2 (Q9BQD1)
	Protein transport protein Sec61 subunit beta (P60468)
9846.428	Caspase - 9 subunit p10 (P55211)
4674.091	Bax protein, cytoplasmic isoform gamma (Q07815)
7219.294	Platelet basic protein precursor (P02775)
	Cholecystokinins precursor (P06307)
	NADH - ubiquinone oxidoreductase chain 4L (P03901)
10747.82	Protein S100 - A5 (P33763)
31748.55	Nit protein 2 (Q86X76)
	S - adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (P17707)
7678.362	Platelet factor 4 variant precursor (P10720)
2641.05	Endothelin - 3 precursor (P14138)
31037.76	enoyl - coenzyme A hydratase 1, short - chain (Q58EZ5)
	vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform
15137.76	Growth/differentiation factor 9 precursor (O60383)
	Beta - glucuronidase - like protein 1 (Q9NQQ0)
	Interleukin - 2 precursor (P09105)
15341.82	Interleukin - 2 precursor (P60568)
7576.037	Dipeptidyl - peptidase 1 precursor (P53634)
4524.928	Orexigenic neuropeptide QRFP precursor (P83859)
	Beta - defensin 107A precursor (Q8IZN7)
4974.046	Gastric inhibitory polypeptide precursor (P09681)
2273.905	Prolactin - releasing peptide precursor (P81277)
	Guanine nucleotide - binding protein G(I)/G(S)/G(O) gamma - T2 subunit precursor (O14610)
7431.591	Growth - regulated protein alpha precursor (P09341)
	Cytochrome c oxidase polypeptide VIIa - heart, mitochondrial precursor (P24310)
6758.022	WAP four - disulfide core domain protein 10A precursor (Q9H1F0)

括号内为蛋白分子在ExPasy数据库中的编号.

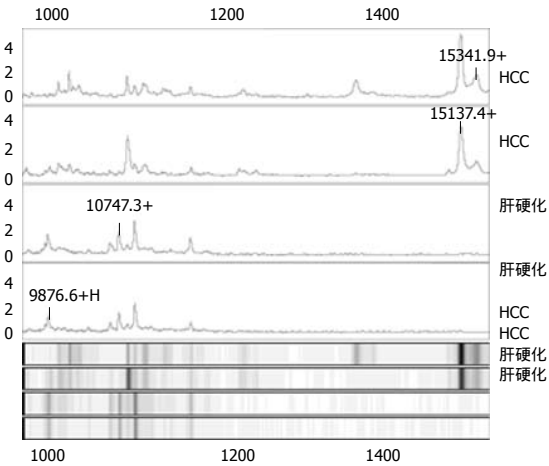


图 2 HCC患者与肝硬化9500 – 1600蛋白指纹图谱. 随机抽取HCC患者9846, 10747, 15137和15341蛋白峰. 其中在肝硬化组中出现的9846和10747在HCC组明显下调, 而HCC组中的15137和15341较肝硬化组明显上调. 下面4道为上述结果的模拟电泳图谱.

表 3 初步确定的肝细胞癌标记蛋白

分子量(Da)	确定的HCC蛋白(肽分子)
9846.428	Caspase - 9亚单位p10
4674.091	BAX蛋白, 胞质异构体gamma
7219.294	血小板碱性蛋白前体
10747.82	胆囊收缩素前体
31748.55	Nit蛋白2
7678.362	血小板因子 变异体前体
2641.05	内皮素3前体
31037.76	烯酰辅酶A水解酶1, 短链
15137.76	血管内皮生长因子(VEGF)异构体
15341.82	β - 葡萄糖苷酸酶样蛋白1
7576.037	二肽基肽酶1前体
4524.928	促食肽QRFP前体
4974.046	β - 防卫素107A前体
2273.905	催乳素释放肽前体
7431.591	生长调节蛋白α前体
6758.022	WAP 4 - 二硫化物核心区蛋白10A前体

白, 检索时分子质量设定为质/核比±0.1%, PI值9.0±5.0. 根据组织来源和生物学功能, 对所得候选蛋白(肽段)进行筛选(表4).

3 讨论

目前, HCC发生的分子机制还不是十分清楚, 但经常观察到非整倍体和多基因改变, 如P53, β-catenin, c-myc以及cyclin-D1^[17-19], 同时杂合子丢失(LOH)也可伴有肿瘤抑制基因的失活^[20-22]. 此外, 一些生长因子也证明参与HCC的发生, 其中AFP已被证实与HCC的侵袭性相关. 然而, 这些发现并不能整合成一个清晰的

创新盘点
我国几乎所有HCC均起源于肝炎后肝硬化, 与国外HCC发病情况相比, 病因学有很大不同. 本文为建立适用于我国人群的肝细胞癌差异蛋白库提供了实验依据, 在寻找特异诊断分子和临床治疗靶分子方面具有重要的意义.

应用要点
本文采用蛋白芯片技术建立HCC组织蛋白谱,并筛选出一些标志蛋白,为下一步进行分离纯化鉴定这些蛋白提供了依据,有助于更深层次的理解HCC基因组学和蛋白组学改变。

HCC蛋白谱,同时,这些生物标记物不具有足够的生物特异性,因为HCC是一种异质性肿瘤^[23],在分子和亚细胞水平可能存在肿瘤发生发展过程中的多重改变。为了解决这一问题,需要可以在蛋白和RNA/DNA水平上进行复杂分析的自动化和高通量技术。蛋白组学继基因组学之后,更彻底的改变我们对肿瘤生物学的理解。通过比较正常组织和病变组织或体液(血清、尿液等)中的蛋白改变,可以鉴定出与肿瘤进展侵袭和转移相关的蛋白,进一步推断出肿瘤复发和转移的可能性。此外还可以发展出更具有特异性的个性化肿瘤治疗。然而,相关的新标记物仅在个别肿瘤中得到初步建立^[24]。SELDI技术是发现肿瘤标记物最有希望的工具之一^[25-26],被广泛应用于体液以及组织蛋白的分析,但不论是血清还是组织,个体之间的蛋白表达谱都存在差异。性别、激素水平、炎症都可以明显改变蛋白表达谱,因此,具有特异性的蛋白必须有很高的表达水平,以便在这些差异分析中被观察到。SELDI技术可以得出蛋白或肽段的近似分子质量,但却无法鉴定是何种蛋白,较简便的解决方法是采用查询蛋白库,如ExPasy蛋白文库,可以初步确定某分子质量代表何种蛋白。但是,这种办法也有其局限性,许多蛋白在生物体内是经过修饰,如糖基化或甲基化,分子质量已发生变化,因此,检索时可能出现误差。就目前而言,最准确的方法仍需要将蛋白纯化后再进行鉴定。

根据此前进行的预实验^[27],本实验在蛋白检测时采用CM10(弱阳离子)芯片,而未采Chiphergen公司的强阴离子交换芯片、疏水芯片和固定金属亲和表面芯片,以便能够俘获更多的差异蛋白,但我们并不排除其他芯片也可能获得少量蛋白峰。HCC和肝硬化组之间共有16个具有统计意义的标记蛋白,其中差异最明显的蛋白峰出现4674, 7219和9846 Da,通过蛋白库检索,可以初步确定其代表Bax蛋白细胞质异构体 γ ,血小板基本蛋白前体和细胞周期蛋白激酶调节亚基, Bax是一种细胞凋亡的促进因子,其促进凋亡的作用可能通过诱导Caspase的释放,激活来自线粒体的细胞色素C实现。目前认为, Bax是一种具有抑癌作用的蛋白分子^[28]。与之相对应, 9846 Da对应的应为Caspase-9亚单位P10。Caspase是半胱氨酸蛋白的一种酶,在细胞凋亡中发挥关键性作用。Caspase家族正常情况下均以无活性的酶原形式存在,当细胞接受死

表 4 初步确定的中分化与高分化HCC标记蛋白

分子量(Da)	蛋白表达	P	对应HCC蛋白(肽段)
10945.197	0.00919		60S 核糖体蛋白 L37(P61927)
11675.955	0.000349		糖蛋白激素 α -2前体(Q96T91)
11893.256	0.003095		Caspase-2前体(P42575)
2553.324	0.005411		内皮素-2前体(P20800)
2911.205	0.007077		Orexin前体(O43612)
3099.609	0.00919		神经肽B前体(Q8NG41)
3627.127	0.00929		Apelin前体(Q9ULZ1)
6186.219	0.005411		60S核糖体蛋白L40(P62987)
6554.271	0.004107		表面活性相关蛋白G(Q6UW10)
9627.260	0.005411		细胞色素C氧化酶多肽VIa-liver, 线粒体前体(P12074)
7155.589	0.00919		FXD区粒子迁移调节子3前体(Q14802)

“ ” 为在中分化HCC组织中高表达, “ ” 为在中分化HCC组织中低表达, 括号内为蛋白质在ExPASY数据库中的编号。

亡信号时, Caspase酶原被蛋白酶裂解而活化, 在目前研究已知的14种Caspase中, Caspase-3, -8, -9和细胞凋亡的关系最为密切。考虑到9846 Da蛋白在HCC组织和肝硬化组织中表达的高特异性, 该蛋白的低表达很可能在肝硬化向HCC转化过程中发挥了重要作用, 并且有可能成为新的HCC诊断和治疗靶分子。

通过结合检索结果和Melle *et al*^[29]以前的研究, 有理由认为15.13 kDa代表一个糖基化的血管内皮生长因子异构体(VEGF110+ N-Glyc, 分子质量15128 Da)。VEGF可以促进微血管形成, 促进肿瘤侵袭和转移, 是目前肿瘤病理学和免疫治疗的一个热点。31.74 kDa和31.03 kDa分别代表Nit蛋白2(Nit 2)和乙酰辅酶A裂解酶1(enoyl-coenzyme A hydratase 1)的短链, 这也和先前的研究相符^[30], Nit2和乙酰辅酶A裂解酶均参与线粒体的能量代谢, 他们在HCC中的高表达可能与肿瘤细胞旺盛的能量消耗有关。

在中分化、高分化HCC组织蛋白中存在11

个标记蛋白, 其中11893 Da在中分化HCC中低表达, 经检索发现其应为Caspase-2前体. Caspase2作为细胞凋亡级联反应的早期因子, 可通过调控Caspase-8, -9参与细胞凋亡, 目前认为通常定位于细胞核, 但对于其在肝脏中的表达情况尚缺乏相关研究. 2553 Da对应的蛋白经分析应为内皮素(endothelin)前体, 内皮素是一组缩血管活性很强的多肽物质, 其作用十分广泛且与恶性肿瘤生长有关. 已有研究证明, HCC患者血清的内皮素水平要明显高于正常人群^[31], 但本实验首次证实其在HCC组织中的存在. 同时, 分析发现中分化与低分化HCC、高分化和低分化HCC之间并不存在具有明显差异的标记蛋白, 分析其原因, 应当是低分化HCC的病例太少(3例), 不具有统计学意义. 根据AFP表达情况将HCC分为阳性(15例)和阴性(11例)对照分析后发现, 两组肿瘤之间并不存在明显差异. 分析其原因, 一是因为AFP属于大分子蛋白(70 kDa), 超出SELDI的检测范围, 二是因为不同病理医生在诊断时的尺度把握有所差异, 以及免疫组化染色存在差异, 造成AFP阴性、阳性没有绝对意义. 如果以患者血清AFP水平为分组标准, 则可能发现某些有统计意义的差异蛋白.

比较本实验与此前进行的HCC血清标记蛋白的研究, 并未发现二者的蛋白谱之间存在明显相关性, 但由于缺乏HCC组织对应的血清样本, 无法进行相应分析. Scarlett *et al*^[32]采用SELDI-TOF-MS技术对胆管癌(CC)患者的血清和组织蛋白进行分析后, 曾发现一个重合的稳定高表达的蛋白峰. 考虑到血清学检测是HCC早期诊断最有效的手段, 因此, 在以后的实验重点应采用SELDI-TOF-MS技术对同一病例组织和血清的蛋白谱进行分析比较, 进一步完善具有诊断和预后意义的HCC蛋白表达谱系.

总的来说, 此研究显示蛋白芯片技术可以绘制较完整的HCC低分子质量差异蛋白表达谱, 并用来找到新的肿瘤蛋白标记. 然而, 鉴于SELDI蛋白质谱技术的局限性, 还需要进一步的研究, 如分析这些蛋白在血清中的表达是否有所差异、分离纯化并鉴定这些蛋白, 这将会有助于更深层次的理解HCC基因学、蛋白组学改变以及其对肿瘤发生机制的认识.

4 参考文献

- 1 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000; 19: 468-471
- 2 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- 3 del Olmo JA, Serra MA, Rodriguez F, Escudero A, Gilabert S, Rodrigo JM. Incidence and risk factors for hepatocellular carcinoma in 967 patients with cirrhosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 560-564
- 4 Tiribelli C, Melato M, Croce LS, Giarelli L, Okuda K, Ohnishi K. Prevalence of hepatocellular carcinoma and relation to cirrhosis: comparison of two different cities of the world--Trieste, Italy, and Chiba, Japan. *Hepatology* 1989; 10: 998-1002
- 5 El-Shanawani FM, Abdel-Hadi AA, Abu Zikri NB, Ismail A, El-Ansary M, El-Raai A. Clinical significance of aflatoxin, mutant P53 gene and sIL-2 receptor in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2006; 36: 221-239
- 6 Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 193-199
- 7 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 16-25
- 8 Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995; 16: 1034-1059
- 9 Davies H, Lomas L, Austen B. Profiling of amyloid beta peptide variants using SELDI Protein Chip arrays. *Biotechniques* 1999; 27: 1258-1261
- 10 Jr GW, Cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, Schellhammer PF, Gong L, Vlahou A. Proteinchip(R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999; 2: 264-276
- 11 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1164-1177
- 12 Yip TT, Hutchens TW. Mapping and sequence-specific identification of phosphopeptides in unfractionated protein digest mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *FEBS Lett* 1992; 308: 149-153
- 13 Jain KK. Role of proteomics in diagnosis of cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2002; 1: 281-286
- 14 高春芳, 赵光, 宋国英, 李冬晖, 王秀丽, 许洋, 马龙化. 用飞行时间质谱技术筛选结肠直肠癌患者中特异性生物标记物的临床意义. *中华检验医学杂志* 2003; 26: 658-661
- 15 Craven RA, Banks RE. Laser capture microdissection and proteomics: possibilities and limitation. *Proteomics* 2001; 1: 1200-1204
- 16 Wulfschuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF 3rd. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 2001; 1: 1205-1215
- 17 Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J*

名词解释

表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS): 该技术主要是在飞行质谱的检测系统中, 芯片特异性地与被测标本中蛋白结合, 再通过选择性清洗, 获得高分辨率的保留蛋白质谱. 当加入能量吸收分子后, 芯片上保留的蛋白形成晶体. 在激光照射下, 晶体发生解吸作用, 带电分子在通过电场时加速, 检测仪记录飞行时间的长短, 质荷比(M/Z)越小, 飞行时间越短, 就会被最先检测到. 被测定蛋白质以一系列峰值的形式呈现.

同行评价

本文采用蛋白芯片技术对肝细胞癌组织中的标志蛋白进行了筛选, 采用的技术先进, 设计合理, 得出的结果和结论较可信, 有一定的参考价值。

- Pathol* 1999; 155: 703-710
- 18 Peng SY, Lai PL, Hsu HC. Amplification of the c-myc gene in human hepatocellular carcinoma: biologic significance. *J Formos Med Assoc* 1993; 92: 866-870
- 19 Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3107-3110
- 20 Kuroki T, Fujiwara Y, Tsuchiya E, Nakamori S, Imaoka S, Kanematsu T, Nakamura Y. Accumulation of genetic changes during development and progression of hepatocellular carcinoma: loss of heterozygosity of chromosome arm 1p occurs at an early stage of hepatocarcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 13: 163-167
- 21 De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Fine RL, Orton TC, Jirtle RL. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene* 1995; 10: 1725-1729
- 22 Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Sadamoto T, Isowa G, Honda K, Yamaoka Y, Ikenaga M, Imura H, Ishizaki K. Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 51: 862-868
- 23 Thorgerirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
- 24 van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536
- 25 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 26 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
- 27 郑燕华, 邹德威, 冯凯, 崔彦, 张铭, 许洋, 李宁, 张建中. 蛋白芯片技术筛选肝癌血清标志蛋白的初步研究. *中华检验医学杂志* 2005; 28: 628-631
- 28 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619
- 29 Melle C, Kaufmann R, Hommann M, Bleul A, Driesch D, Ernst G, von Eggeling F. Proteomic profiling in microdissected hepatocellular carcinoma tissue using ProteinChip technology. *Int J Oncol* 2004; 24: 885-891
- 30 Melle C, Ernst G, Scheibner O, Kaufmann R, Schimmel B, Bleul A, Settmacher U, Hommann M, Claussen U, von Eggeling F. Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2007; 6: 306-315
- 31 Ishibashi M, Fujita M, Nagai K, Kako M, Furue H, Haku E, Osamura Y, Yamaji T. Production and secretion of endothelin by hepatocellular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 378-383
- 32 Scarlett CJ, Saxby AJ, Nielsen A, Bell C, Samra JS, Hugh T, Baxter RC, Smith RC. Proteomic profiling of cholangiocarcinoma: diagnostic potential of SELDI-TOF MS in malignant bile duct stricture. *Hepatology* 2006; 44: 658-666

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。

肝硬化患者肝肺综合征核素诊断方法的一项对比研究

王海燕, 王惠吉, 李春林, 杨志刚, 李书明

王海燕, 北京华信医院消化内科 北京市 100016
王惠吉, 北京友谊医院综合科 北京市 100060
李春林, 杨志刚, 北京友谊医院核医学科 北京市 100060
李书明, 朝阳疾病预防控制中心流行病科 北京市 100021
王海燕, 1993年河北医科大学本科, 2004年首都医科大学硕士研究生, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的临床研究。
通讯作者: 王海燕, 100016, 北京市酒仙桥一街坊六号, 北京华信医院消化内科. wanghaiy@sohu.com
收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-07-09

Contrasting methods for diagnosing hepatopulmonary syndrome in liver cirrhosis

Hai-Yan Wang, Hui-Ji Wang, Chun-Lin Li, Ji-Gang Yang, Shu-Ming Li

Hai-Yan Wang, Department of Gastroenterology, Beijing Huaxin Hospital, Beijing 100016, China
Hui-Ji Wang, Integrated Department of Beijing Friendship Hospital, Beijing 100060, China
Chun-Lin Li, Ji-Gang Yang, Department of Nuclear Medicine, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100060, China
Shu-Ming Li, Department of Epidemiology, Chaoyang Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China

Correspondence to: Hai-Yan Wang, Department of Gastroenterology, Beijing Huaxin Hospital, Beijing 100060, China. wanghaiy@sohu.com

Received: 2007-06-14 Revised: 2007-07-09

Abstract

AIM: To evaluate and compare the methods of ^{99m}Tc -labeled macro-aggregates of albumin (MAA) lung and brain scanning, and whole-body scanning for diagnosis of hepatopulmonary syndrome (HPS) in patients with cirrhosis.

METHODS: We studied 55 consecutive inpatients with cirrhosis seen in 2004, along with eight healthy volunteers. ^{99m}Tc -labeled MAA lung and brain scanning or whole-body scanning was carried out to diagnose HPS. ^{99m}Tc -MAA scanning was undertaken follow the same protocol.

RESULTS: In 55 patients with hepatic cirrhosis, we carried out both 2 mci whole-body scanning and 2 mci lung and brain scanning at the same time, the shunt rate was $3.16 \pm 1.58\%$ and $3.18 \pm$

1.60% , and the detection rate of HPS was 7.27% and 9.09% , respectively ($P = 1.00$). Patients who were diagnosed according to the criteria for HPS were included in the HPS group. Other patients were included in the non-HPS group. For whole-body scanning, the mean shunt rate was 2.76% in the control group, 6.87% in the HPS group, and 2.86% in the non-HPS group. For lung and brain scanning, the mean shunt rate was 2.52% in the control group, 6.85% in the HPS group, and 2.82% in the non-HPS group. The shunt rate in the HPS group was higher than that in non-HPS and control groups ($P < 0.001$). The kappa value was 0.88, which showed that there was good consistency between the two methods.

CONCLUSION: Different methods for diagnosing HPS in patients with liver cirrhosis should be unified and standardized. Both 2 mci ^{99m}Tc -MAA whole-body scanning and 2 mci ^{99m}Tc -MAA lung and brain scanning are safe, reliable and pragmatic means for diagnosing HPS.

Key Words: Hepatopulmonary syndrome; Nuclide; Liver transplantation

Wang HY, Wang HJ, Li CL, Yang JG, Li SM. Contrasting methods for diagnosing hepatopulmonary syndrome in liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2431-2435

摘要

目的: 评价和比较2毫居(mci)全身显像法和2 mci局部显像法诊断肝肺综合征(HPS)的优劣, 探讨更为实用的诊断方法。

方法: 选择2004年住院的55例肝硬化患者和8例健康志愿者, 利用 ^{99m}Tc 标记的多聚白蛋白(MAA)灌注显像技术, 采用2 mci全身显像法和2 mci局部显像法测定其肺内分流率并诊断HPS。

结果: 2 mci全身显像组与2 mci局部显像组的55例肝硬化患者分流率分别为 $3.16\% \pm 1.58\%$ 和 $3.18\% \pm 1.60\%$, 其诊断HPS的检出率分别为 7.27% 和 9.09% , 两种方法检出率相比均无统计学差异。采用2 mci全身显像方法, 测定对

背景资料
肝肺综合征(HPS)是肝脏疾病引起低氧血症的常见原因。在慢性肝病中其发病率约为4%-17%, 肝硬化患者中发病率为10%-19%。目前, 肝移植术是唯一可行的治疗方法。但目前国际上对肝肺综合征的诊断尚缺乏公认的金标准。

相关报道
对于肝肺综合征中气体交换异常以及肺内血管扩张的诊断标准在国际上尚未达成一致。国内报道的研究方法之间也存在很大差异。2000年, Krowka再次提出应当对核素分流率的计算方法进行进一步的规范。

照组分流率均数为2.76%, HPS组为6.87%, 非HPS组为2.86%。采用2 mci局部显像法, 测定对照组分流率均数为2.52%, HPS组为6.85%, 非HPS组为2.82%。两种方法健康对照组与非HPS组分流率均无统计学差异($P = 0.811$ 和 $P = 0.46$), HPS组分流率高于健康对照和非HPS组($P < 0.001$)。经计算Kappa值为0.88, 说明两种检验方法检验结果一致性属于最强。

结论: 肝肺综合征的核素诊断方法应进一步统一和规范, 2 mci全身显像法和2 mci局部显像法在肝肺综合征的诊断中均可靠、安全而实用, 值得在国内推广。

关键词: 肝肺综合征; 核素; 肝移植

王海燕, 王惠吉, 李春林, 杨吉刚, 李书明. 肝硬化患者肝肺综合征核素诊断方法的一项对比研究. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2431-2435
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2431.asp>

0 引言

肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome HPS)是肝脏疾病引起低氧血症的常见原因。在慢性肝病中其发病率约为4%-17%^[1-2], 肝硬化患者中发病率为10%-19%^[3-5], 在拟行肝移植患者中发病率为10%-28%^[3,6-7]。目前, 肝移植术是唯一可行的治疗方法^[8-9]。及早明确HPS的诊断, 可以大大降低围手术期死亡率^[8], 但目前国际上对肝肺综合征的诊断尚缺乏公认的金标准。本文将国内外肝移植中心较多采用的几种核素诊断方法进行了对比研究, 其目的在于初步探讨HPS不同诊断方法的优劣。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2004年住院的肝硬化患者55例, 其中男34例, 女21例, 年龄21-79(平均56.8)岁。肝硬化诊断标准参照1990年全国肝硬化专题学术研讨会制定的诊断标准。55例患者同时采用2毫居(mci)全身显像法和2 mci局部显像法测定其肺内分流率。对照组选择年龄、性别比与病例组相匹配的健康志愿者8例。每例研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 肝肺综合征诊断标准 (1)直立位呼吸室内空气的情况下, 肺泡气-动脉氧分压差 $PO_2(A-a)$ 增加(≥ 20 mmHg)^[1,2,4]。(2)采用核素显像的方法诊断肺内血管扩张, 分流率 $\geq 6\%$ 为阳性^[6]。

1.2.2 研究过程 (1)立位动脉血气分析、胸片。患

者呼吸室内空气, 取坐位或直立位0.5 h后, 取桡动脉血2 mL, 立即置于冰盒中送检血气分析。血气分析仪为ABL750型全自动血气分析仪。测定酸碱度pH, 动脉氧分压 PO_2 , 动脉血二氧化碳分压 PCO_2 , 动脉氧饱和度 SiO_2 , 肺泡气动脉氧分压差 $PO_2(A-a)$ 。每位患者均常规拍胸部正侧位X光片。(2) ^{99m}Tc 标记的多聚白蛋白(macroaggregates of albumin, MAA)灌注显像^[2,6,10]。患者取坐位或直立位0.5 h, 呼吸室内空气, 于右侧肘静脉注射 ^{99m}Tc MAA(药品由北京森科公司提供, 标记率95%以上, 90%的颗粒直径在20-60 μm , 颗粒数 $50 \times 10^4 \pm 10 \times 10^4$), 注射后5 min, 患者取卧位开始静态采集。设备采用Philips IRIX3三探头SPECT, 低能高分辨平行孔准直器, 光电峰值140 keV, 窗宽20%, 采集矩阵 256×256 。采用2种不同方法分别测定分流率: 2 mci全身显像法中 ^{99m}Tc MAA的放射剂量为2 mci, 三探头同时进行全身显像显像, 图像采集时间为10 min。取得全身放射分布影像图, 并分别计数头部和肺部放射剂量进行计算。2 mci局部显像法^[2]中 ^{99m}Tc MAA的放射剂量为2 mci, 三探头同时分别对头部、肺部进行局部显像, 每个部位图像采集时间为5 min。分别取得头部和肺部放射分布影像图, 并分别计数头部和肺部放射剂量进行计算。正常肺毛细血管床的直径为8-10 μm , 20-60 μm 的多聚白蛋白可由肺毛细血管床捕捉并嵌顿在肺内, 因此, 正常情况下只有肺组织有放射性物质显像。HPS时, 肺毛细血管直径可扩张至15-500 μm , 这时MAA就不能被肺毛细血管床所嵌顿, 而随肺静脉进入体循环, 从而导致脑、甲状腺、脾和肾等肺外器官也出现了放射性物质显像。由于脑部的供血比较稳定, 约占心输出量的13%, 因此采用 γ 计数的方法分别测定脑部和肺部的放射量, 计算分流率的公式为: 分流率(%) = (脑部 γ 计数/0.13)/(脑部 γ 计数/0.13+肺部 γ 计数), 分流率大于6%诊断为阳性。

统计学处理 使用SPSS12.0软件, 计数资料采用配对 χ^2 检验, 计量资料采用两配对样本 t 检验, 或单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。分析评价两种检验方法检测结果的一致性用Kappa值计算, 当Kappa值介于0.81-1之间时为一致性最强。

2 结果

2 mci全身显像法和2 mci局部显像法测定的分流率分别为 $(3.16\% \pm 1.58\%)$ 和 $(3.18\% \pm 1.60\%)$,

表 1 肝肺综合征患者资料

年龄(岁)	性别	病因	C-P分级	PaO ₂ (mmHg)	PO ₂ (A-a)(mmHg)	分流率(%)	
						2 mci全身	2 mci局部
46	男	乙肝	A	74.8	30.4	7.4	7.35
41	男	乙肝	B	82.5	26.9	6.6	6.25
56	女	自免肝	B	64.6	50.1	6.46	6.4
70	女	PBC	A	54.5	59.1	7.03	6.76
59	女	隐源	A	75.3	30.8	5.84	7.47

将两组均数进行配对 t 检验, 相关系数为0.958, $P = 0.663$, 差异无显著性. HPS患者临床资料如表1所示. 2 mci全身显像法HPS的检出率为7.27%(4/55), 2 mci局部显像法HPS的检出率为9.09%(5/55), 均与文献报道一致^[3]. 两组分流率采用配对 χ^2 检验, $P = 1.00$, 无统计学差异. 按照HPS的诊断标准, 将分流率大于6%同时PO₂(A-a) ≥ 20 mmHg的患者列入HPS组, 其余列入非HPS组. 对照组8例健康志愿者也同时进行2 mci全身和2 mci局部显像, 分流率分别为2.76%和2.52%. 采用2 mci全身显像方法, 所采集图像如图1所示, 测定对照组分流率均数为2.76%, HPS组为6.87%, 非HPS组为2.86%, 将对照组分别与HPS组和非HPS组分流率比较, 分别为 $P < 0.001$ 和 $P = 0.811$. 采用2 mci局部显像法, 所采集图像如图2所示, 测定对照组分流率均数为2.52%, HPS组为6.85%, 非HPS组为2.82%, 将对照组与HPS组、非HPS组分流率比较, 分别为 $P < 0.001$ 和 $P = 0.46$. 两种方法健康对照组与非HPS组分流率均无统计学差异, HPS组分流率高于健康对照和非HPS组. 经计算Kappa值为0.88, 说明两种检验方法检验结果一致性属于最强.

3 讨论

肝肺综合征是肝脏疾病引起低氧血症的常见原因. 他包括肝病、气体交换异常、肺内血管扩张在内的三联征. 尽管在1977年, Kennedy和Knudson就提出“肝肺综合征(HPS)”这一概念, 但是随着原位肝移植的成功开展并在全世界步入成熟时期, 医学界对HPS才越来越引起足够的重视: 因为目前肝移植术是解决HPS低氧血症的唯一方法^[8,11].

肝肺综合征的诊断目前还没有公认的金标准^[12-13], 对于气体交换异常以及肺内血管扩张的诊断标准在国际上尚未达成一致^[5]. 国内报道的研究方法之间也存在很大差异. 2000年, Krowka再次提出应当对核素分流率的计算方法进行

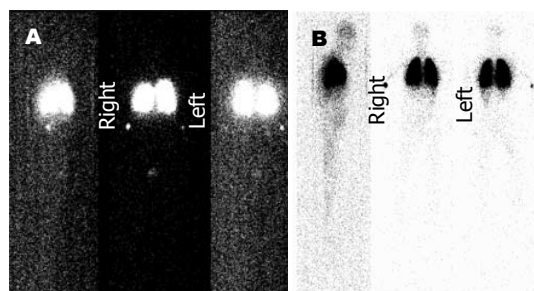


图 1 2 mci全身显像图像. A: 核素显像结果正常的患者图像; B: 核素显像结果阳性的患者图像.

进一步的规范^[6]. 正常人核素测定的分流率为2%-5%, 在HPS时有不同程度的分流率增加. 使用核素显像诊断HPS的优点为可以对肺内血管扩张的严重程度进行定量评价; 即使合并有原发性肺部疾患, 核素显像阳性对HPS诊断也具有特异性^[14].

2 mci^{99m}Tc标记的多聚白蛋白(^{99m}Tc-MAA)肺灌注显像是一项安全而准确的核医学检查方法, 文献报道其诊断HPS的灵敏度为84%, 特异度为100%^[2]. 同时其放射剂量只有2 mci, 是核医学检查中的最小量, 1次显像使用的MAA颗粒数量为 $(1.5-2) \times 10^5$, 一过性阻断肺小血管的数量仅占全部肺血管的1/3000以下, 对血流动力学没有影响, 因而也非常安全. 2 mci全身显像法的优点在于方法简单易操作, 肘静脉注射显像剂后, 1次扫描3个体位获取图像, 再用计算机感兴趣区计数法即可计算出分流率. 其缺点在于由于绝大部分放射性物质聚集在肺内, 机器将扫描区内最大放射剂量默认为1, 图像采用0-1之间的灰度对比呈像, 因此头部影像由于放射性物质所占比例太小而显示欠清晰. 2 mci局部显像法需要探头分别在肺部和头部呈像5 min, 检查过程中需要人工调整探头位置2次, 虽然操作过程稍烦琐一些, 但由于头部和肺部分别独立呈像, 本底放射剂量不同, 因此头部的图像更加清晰. 国内有较多文献报道采用5 mci全身显像

应用要点
核素显像在HPS的诊断中具有重要的应用价值, 技术简便、易于操作, 可定量评价, 值得在全国的肝移植中心推广应用.

名词解释

肝肺综合征是肝脏疾病引起低氧血症的常见原因。它是包括肝病、气体交换异常、肺内血管扩张在内的三联征。

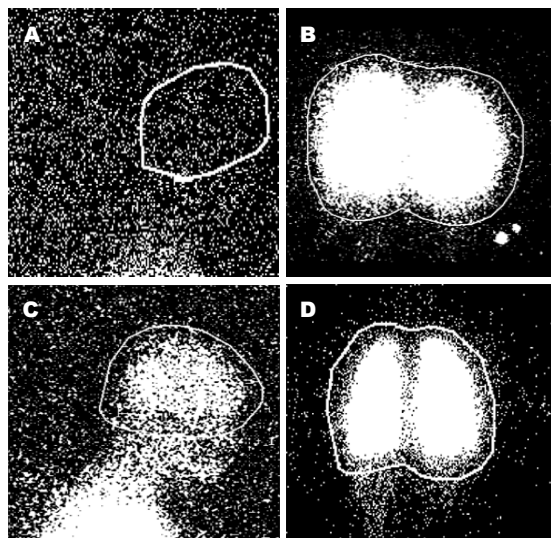


图2 2 mci局部显像图像。A-B: 为核素显像结果正常的患者图像; C-D: 为核素显像结果阳性的患者图像。

法, 计算公式为: 分流率 = (全身-两肺)/全身。此方法测定的分流率数值普遍明显偏高。笔者认为这种诊断方法存在着不足之处在于: 游离的 ^{99m}Tc (指那些没有与MAA结合的游离得, 约占10%左右)由于颗粒小, 直接进入体循环并被肝脾巨噬细胞摄取; 那些在肺内积聚并逐渐衰减的 ^{99m}Tc -MAA也最终通过肝肾排泄, 因此使用该公式计算出的并非真正的分流率。文献显示国外的移植中心均未采用此种方法, 可能也是出于这种考虑。

Krowka *et al*^[15]研究发现从出现呼吸系统症状(原发性呼吸困难)到诊断肝肺综合征的平均时间为 4.8 ± 2.5 a。已知的HPS自然病程表明: 多数患者肺内血管扩张持续进展, 气体交换随时间进行性恶化^[16-17], 自然缓解者极为少见^[13]。肝硬化患者HPS的出现可作为预后的独立危险因素^[19]。因此HPS的早期诊断具有重要的临床意义^[20]。及时施行肝移植已经成为治疗HPS的1种有效的方法^[21-22], 85%以上及时施行肝移植的患者肺内血管扩张得到显著改善^[8,16], 核素显像在HPS的诊断中具有重要的应用价值, 技术简便易于操作, 值得在全国的肝移植中心推广应用。

本研究表明, 2 mci全身显像法和2 mci局部显像法是诊断肝肺综合征的2种敏感而可靠的方法, 可对分流率进行定量评价, 临床应用价值较高。

4 参考文献

- 1 Krowka MJ. Hepatopulmonary syndromes. *Gut* 2000; 46: 1-4
- 2 Abrams GA, Nanda NC, Dubovsky EV, Krowka

MJ, Fallon MB. Use of macroaggregated albumin lung perfusion scan to diagnose hepatopulmonary syndrome: a new approach. *Gastroenterology* 1998; 114: 305-310

- 3 Martinez GP, Barbera JA, Visa J, Rimola A, Pare JC, Roca J, Navasa M, Rodes J, Rodriguez-Roisin R. Hepatopulmonary syndrome in candidates for liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 34: 651-657
- 4 Aller R, Moya JL, Moreira V, Boixeda D, Cano A, Picher J, Garcia-Rull S, de Luis DA. Diagnosis of hepatopulmonary syndrome with contrast transesophageal echocardiography: advantages over contrast transthoracic echocardiography. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1243-1248
- 5 Schenk P, Fuhrmann V, Madl C, Funk G, Lehr S, Kandel O, Muller C. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictive value of various cut offs for arterial oxygenation and their clinical consequences. *Gut* 2002; 51: 853-859
- 6 Krowka MJ, Wiseman GA, Burnett OL, Spivey JR, Therneau T, Porayko MK, Wiesner RH. Hepatopulmonary syndrome: a prospective study of relationships between severity of liver disease, PaO₂(2) response to 100% oxygen, and brain uptake after (99m)Tc MAA lung scanning. *Chest* 2000; 118: 615-624
- 7 Roberts DN, Arguedas MR, Fallon MB. Cost-effectiveness of screening for hepatopulmonary syndrome in liver transplant candidates. *Liver Transpl* 2007; 13: 206-214
- 8 Arguedas MR, Abrams GA, Krowka MJ, Fallon MB. Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation. *Hepatology* 2003; 37: 192-197
- 9 Arguedas MR, Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005; 8: 451-456
- 10 Wang HY, Wang HJ, Jia JD, Li CL, Yang JG, Li SM. Hepatopulmonary syndrome: a study using 99mTc-MAA lung perfusion scan. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2006; 14: 149-150
- 11 Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: implications for liver transplantation. *Clin Chest Med* 2005; 26: 587-597, vi
- 12 Mandell MS. Clinical controversies surrounding the diagnosis and treatment of hepatopulmonary syndrome. *Minerva Anestesiol* 2007; 73: 347-355
- 13 Mandell MS. The diagnosis and treatment of hepatopulmonary syndrome. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 387-405, x
- 14 Fallon MB, Abrams GA. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* 2000; 32: 859-865
- 15 Krowka MJ, Dickson ER, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome. Clinical observations and lack of therapeutic response to somatostatin analogue. *Chest* 1993; 104: 515-521
- 16 Egawa H, Kasahara M, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Fujita S, Kiuchi T, Hayashi M, Yonemura T, Yoshibayashi M, Adachi Y, Shapiro JA, Tanaka K. Long-term outcome of living related liver transplantation for patients with intrapulmonary shunting and strategy for complications. *Transplantation* 1999; 67: 712-717
- 17 Swanson KL, Wiesner RH, Krowka MJ. Natural history of hepatopulmonary syndrome: Impact of

- liver transplantation. *Hepatology* 2005; 41: 1122-1129
- 18 Saunders KB, Fernando SS, Dalton HR, Joseph A. Spontaneous improvement in a patient with the hepatopulmonary syndrome assessed by serial exercise tests. *Thorax* 1994; 49: 725-727
- 19 Schenk P, Schoniger-Hekele M, Fuhrmann V, Madl C, Silberhumer G, Muller C. Prognostic significance of the hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 125: 1042-1052
- 20 Stavrou GA, Fruhauf NR, Lang H, Malago M, Saner F, Broelsch CE. Liver transplantation and severe hepatopulmonary syndrome. *Transplantation* 2003; 76: 746-747
- 21 Carey EJ, Douglas DD, Balan V, Vargas HE, Byrne TJ, Moss AA, Mulligan DC. Hepatopulmonary syndrome after living donor liver transplantation and deceased donor liver transplantation: a single-center experience. *Liver Transpl* 2004; 10: 529-533
- 22 Taille C, Cadranet J, Bellocq A, Thabut G, Soubrane O, Durand F, Ichai P, Duvoux C, Belghiti J, Calmus Y, Mal H. Liver transplantation for hepatopulmonary syndrome: a ten-year experience in Paris, France. *Transplantation* 2003; 75: 1482-1489; discussion 1446-1447

同行评价
本文对比研究了肝硬化患者肝肺综合征的核素诊断方法, 结果表明² mci局部显像法是诊断肝肺综合征的敏感而可靠的方法, 临床应用价值较高。

编辑 王晓瑜 电编 张强

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

•消息•

第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届消化介入新技术论坛会议改期及征文通知 (第二轮)

本刊讯 原定于2007-09-21/25在山东济南召开的第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术论坛因故提前一周改在2007-09-15/18举行。

第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术论坛的主要议题是卫生部“十年百项”适宜技术推广和上海市重大医学成果转化项目内容。是继上海、河北、宁夏、黑龙江、江苏和浙江举办六届研讨会议的延续。本次会议由上海同仁医院、山东省省立医院和山东省医学影像研究所联合主办, 山东省省立医院具体承办, 世界华人消化杂志、中华介入放射学杂志、中华消化内镜杂志以及介入放射学杂志共同参与协办。会议将以专题讲座、论文交流、操作演示及研讨沙龙多种形式相结合, 拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化道病变、门静脉高压、胆道结石等的消化内镜、介入放射、外科及化学治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨。会议中还将安排手术演示, 演示内容非常丰富。相信通过本次大会, 与会者代表必将获益匪浅。

热忱期待全国各地的同仁来到美丽的山东济南做客。我们诚挚邀请您前来参会, 并衷心感谢您的支持和参与。继教学分: 本次会议属国家级继续医学教育, 参会者可获得国家一类继续教育学分12分。

1 征文内容

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

2 投稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文。(2)论著需1000字以内的标准论文摘要。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内。(3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文。优秀论文将安排在国家级杂志上发表。(4)所有稿件一律要求电脑打印(Word格式), 邮寄者需附软盘; 特别鼓励用E-mail投稿(用附件Word格式)。(5)截稿日期: 2007-08-15。

3 征集疑难病例

会议将安排专门时间研讨疑难病例, 欢迎与会代表将临床中遇到的疑难病例带到会上讨论。通信地址: 250021, 济南市经五路纬七路324号, 山东省立医院消化科。联系人: 张春清 电话: 0531-85186350, 0531-86701337 0531-87902348 0531-86701339, Email: zhchqing@medmail.com.cn。

细胞骨架4.1蛋白基因家族在结直肠癌组织中的表达

冯文坡, 陈鲤翔, 寇晓丹, 许晶晶, 康巧珍, 祁元明

背景资料

4.1蛋白是指红细胞膜蛋白经SDS-PAGE后第4.1条染色带, 是红细胞中以血影蛋白为基础的细胞膜骨架的一个基本成份(4.1R)。在维持细胞正常的形态和生物物理特性方面有重要作用, 还与细胞有丝分裂及神经突触的形成有关。4.1蛋白家族包括4.1R, 4.1N, 4.1G, 4.1B, 是一组膜骨架蛋白。

冯文坡, 陈鲤翔, 寇晓丹, 许晶晶, 康巧珍, 祁元明, 郑州大学生物工程系 河南省郑州市 450001

冯文坡, 1996年河南大学生物系本科毕业, 2007年郑州大学生物工程系硕士, 主要从事消化道肿瘤病理研究。

河南省医学科技创新人才项目, No. 200311201

河南省重点科技攻关项目, No. 0495060801

通讯作者: 祁元明, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学生物工程系. qym@zzu.edu.cn.

电话: 0371-67783329

收稿日期: 2007-02-05 修回日期: 2007-07-16

Expression of genes for human membrane skeleton protein 4.1s in colorectal carcinoma

Wen-Po Feng, Li-Xiang Chen, Xiao-Dan Kou, Jing-Jing Xu, Qiao-Zhen Kang, Yuan-Ming Qi

Wen-Po Feng, Li-Xiang Chen, Xiao-Dan Kou, Jing-Jing Xu, Qiao-Zhen Kang, Yuan-Ming Qi, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, He'nan Province, China

Supported by: the Medical Science and Technique Innovation Talent Project of He'nan Province, No. 200311201 and the Tackle Key Problems in Science and Technology Project of He'nan Province, No. 0495060801

Correspondence to: Yuan-Ming Qi, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, 100 Science Road, Zhengzhou 450001, He'nan Province, China. qym@zzu.edu.cn

Received: 2007-02-05 Revised: 2007-07-16

Abstract

AIM: To investigate the expression of protein 4.1 family members (4.1R, 4.1N, 4.1G, 4.1B) and to determine the pathological features of colorectal carcinoma.

METHODS: The expression of 4.1 proteins was detected with an envision immunohistochemical assay in 94 paraffin-embedded samples from patients with colorectal carcinoma. Correlations between proteins 4.1R, N, G and B and colorectal carcinoma were analyzed.

RESULTS: Expression of 4.1s in colorectal carcinoma tissues was clearly lower compared with that in normal tissue ($H_c = 44.70$, $H_c = 31.41$, $H_c = 13.62$; all $P < 0.01$), except for 4.1G. Expression of 4.1N and B in colorectal carcinoma tissues was positively correlated with cell differentiation ($r_s = 0.27$, $r_s = 0.28$; both $P < 0.01$). The expression of

4.1R was associated with the degree of soakage ($r_s = 0.03$, $P < 0.01$) and lymphatic metastasis ($r_s = 0.24$, $P < 0.05$); further, the expression of 4.1G was up-regulated with soakage ($r_s = 0.24$, $P < 0.05$). There was no significant relationship between expression of 4.1s in colorectal carcinoma tissue and patient age or gender.

CONCLUSION: The expression of 4.1s may participate in the occurrence and progression of colorectal carcinoma. Expression of 4.1N and 4.1B are closely related with histological grade, and proteins 4.1R and 4.1G are associated with soakage of colorectal carcinoma.

Key Words: Protein 4.1; Colorectal carcinoma; Immunohistochemistry

Feng WP, Chen LX, Kou XD, Xu JJ, Kang QZ, Qi YM. Expression of genes for human membrane skeleton protein 4.1s in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2436-2441

摘要

目的: 探讨4.1蛋白基因家族(蛋白4.1R, N, G和B)在结直肠癌组织表达的意义。

方法: 采用Envision⁺免疫组织化学的方法, 检测94例结直肠癌组织中蛋白4.1R, N, G和B的表达, 分析他们与结直肠癌病理特征之间的相关性。

结果: 结直肠癌组织中, 除蛋白4.1G外, 蛋白4.1R, N, B在癌组织与癌旁组织之间的表达差异有统计学意义($H_c = 44.70$, $H_c = 31.41$, $H_c = 13.62$; 均 $P < 0.01$); 蛋白4.1N和B与患者的细胞分化呈正相关($r_s = 0.27$, $r_s = 0.28$, 均 $P < 0.01$); 随浸润程度的加深, 淋巴结的癌转移, 4.1R的表达明显下调($r_s = 0.03$, $P < 0.01$; $r_s = 0.24$, $P < 0.05$); 随浸润程度的加深, 4.1G的表达上调($r_s = 0.24$, $P < 0.05$); 4.1蛋白的表达与患者的年龄之间没有相关性, 在不同性别之间, 4.1蛋白表达的差异没有统计学意义。

结论: 蛋白4.1家族与结直肠癌的发生与发展间有着密切的关系, 是一类新的结直肠癌标记

物,其表达程度对结直肠癌的诊断和预后评价有一定的意义。

关键词: 4.1蛋白; 结直肠癌; 免疫组织化学

冯文坡, 陈鲤翔, 寇晓丹, 许晶晶, 康巧珍, 祁元明. 细胞骨架4.1蛋白基因家族在结直肠癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2436-2441
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2436.asp>

0 引言

4.1蛋白家族包括4.1R(红细胞表达), 4.1N(神经元特异表达), 4.1G(广泛表达), 4.1B(主要在脑中表达), 是一组膜骨架蛋白^[1-2]. 4.1蛋白家族成员都有一个保守的N-端FERM结构域(或称膜结合结构域-MBD结构域), 血影蛋白-肌动蛋白结合结构域(SAB结构域), C-端结构域(CTD结构域)^[3-4]. 4.1蛋白不仅通过与肌动蛋白、血影蛋白等家族的蛋白质以及细胞膜蛋白的胞质区相互作用, 维持细胞的正常形态和生理特性, 而且在细胞的有丝分裂^[5-7]和神经细胞突触的形成^[8]过程中起重要作用. 研究发现, 在非小细胞肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中, 都存在着4.1蛋白的表达缺失, 并且越来越多的临床和实验证据证实4.1蛋白在多种肿瘤中表现出抑癌蛋白的作用^[9-13], 这表明4.1蛋白与肿瘤的发生和发展有着密切的关系. 进一步的研究发现, 在结直肠癌中, 4.1B蛋白的表达程度明显降低^[14]. 但是, 关于4.1蛋白在亚洲人群结直肠癌患者中的表达情况, 及其与结直肠癌发病相关性的研究还未见报道. 本研究用Envision⁺免疫组化的方法对多例结直肠癌患者4.1蛋白的表达情况进行了检测, 以探讨4.1蛋白家族的表达与结直肠癌发生、发展的关系, 以期为结直肠癌诊断、治疗和判断预后提供新的理论及实践上的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 病理证实结直肠癌腺癌存档石蜡标本94例, 术前均未接受过放化疗, 男51例, 女43例, 年龄26-86(平均57.6)岁, 癌旁组织做对照. 兔多抗4.1R, 4.1N, 4.1G, 4.1B 抗体由美国纽约血液中心安秀丽博士馈赠; Envision⁺免疫组化试剂盒为美国Dako公司产品. 所有蜡块做4 μ m连续切片, 每个蜡块均切5-6张, 1张行HE染色, 作组织学诊断, 其余做免疫组化染色. 所有HE切片均经病理医师复检确认.

1.2 方法 染色程序按Dako Envision⁺免疫组化试剂盒说明书进行. 4.1R, N, B染色前行热抗原修

复, G行酶抗原修复. 切片以联苯二胺(DAB)显色, 苏木素轻度复染. 磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照, 癌旁组织做阳性对照. 免疫组化染色阳性结果为质膜或胞质、胞核内出现棕褐色颗粒或染色, 结果判定依Mattern *et al*^[15]并稍做修改. 标准如下: 高倍镜下, 与周围间质相比, 无着色记为0分, 浅褐色记为1分, 褐色为2分, 深褐色为3分; 阳性细胞百分率 10%记为0分, 10%-50% 记为1分, 50%-75%记为2分, 75%以上记为3分, 两者相加为综合染色强度评分. 0-1分为阴性, 记为“-”, 2分为弱阳性, 记为“+”, 3-4分为阳性, 记为“++”, 5-6分为强阳性, 记为“+++”. 每张切片均判读癌组织及癌旁组织的染色强度.

统计学处理 采用SAS 8.1软件作数理统计, 等级分组资料用Wilcoxon秩和检验及Spearman秩相关分析.

2 结果

4.1R主要是胞质表达, 胞核也有弥散性分布; 4.1N胞质表达; 4.1G主要是胞膜、胞质表达, 胞核也有少量表达; 4.1B胞膜表达, 集中在细胞连接处(图1). 与癌旁组织相比, 除4.1G蛋白外, 癌组织中4.1R, N, B蛋白的表达明显下调或缺失, 二者差异非常显著($P<0.01$, 表1, 图2). 4.1R蛋白的表达随原发病灶的浸润加深、淋巴结的癌转移呈下降趋势($P<0.01$, $P<0.05$). 4.1N, B蛋白的表达与患者组织学分级之间有非常显著的相关性(均 $P<0.01$), 细胞分化程度越高, 其表达越强. 4.1G蛋白与患者癌细胞的浸润程度有关($P<0.05$), 随癌组织向深处浸润, 其表达上调(表2).

3 讨论

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 侵袭性很强, 在世界各国的发病率很高, 且近年来仍有明显上升的趋势. 因此, 对结直肠癌发病机制, 及诊断和预后评估的深入研究, 尤其是对新的评估指标的研究具有重要的临床和社会价值. 恶性肿瘤的浸润和转移是一个非常复杂的过程, 但起始步骤都是从细胞-细胞间的黏附及细胞与基质间的相互作用调节失控开始的, 包括细胞黏附分子在内的许多细胞膜蛋白的功能是依赖或通过细胞质的骨架成份来完成的^[16-17]. 介导二者在物理结构上直接相连、化学功能上密切统一的蛋白质称为连接蛋白. 此类蛋白连

研发前沿
结直肠癌是一种日趋常见的恶性肿瘤, 西方各国由于其高发, 对其病因、流行病学、预防以及各种诊治方法均有深入而全面的研究, 是消化道肿瘤学术领域中最为活跃的部分. 4.1蛋白在多种肿瘤都出现表达减少或缺失, 但其表达情况与结直肠癌患者临床病理之间的相关性研究还未见报道.

相关报道
4.1蛋白的FERM结构域调节其与许多跨膜蛋白的相互作用, 细胞黏连复合体; CTD结构域与特异的受体及离子通道相互作用; SABD结构域与血影蛋白、肌动蛋白一起, 形成三维复合体, 为细胞提供弹性及维持膜的完整性.

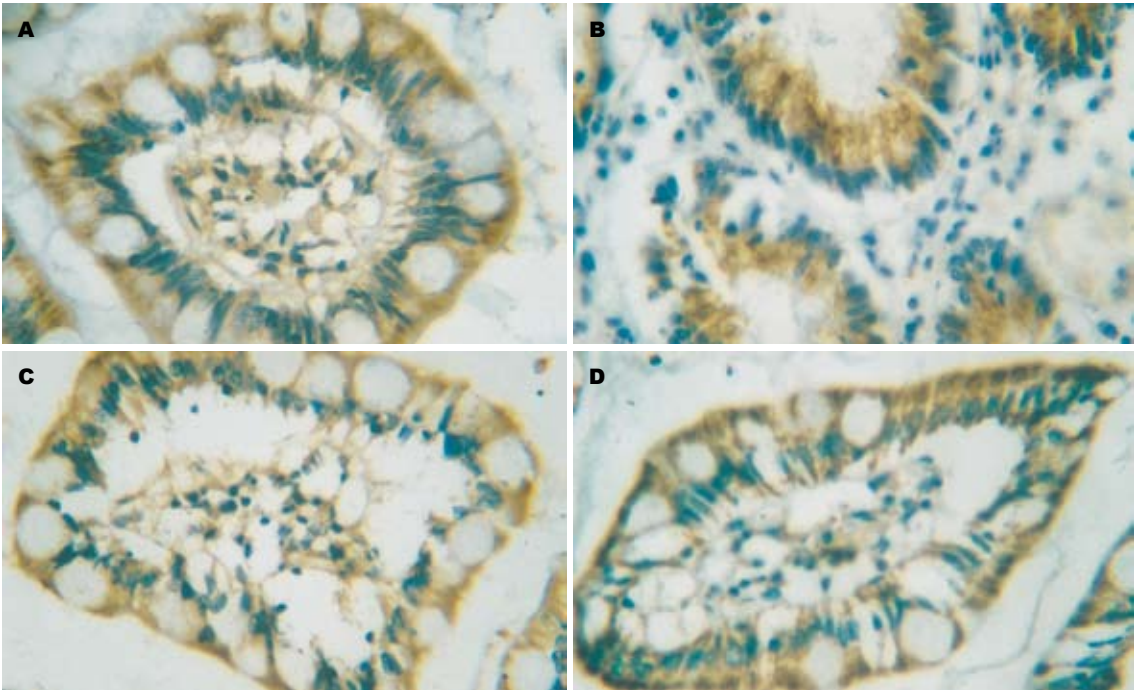


图 1 结直肠组织细胞骨架蛋白的表达(Envision x 400). A: 4.1R; B: 4.1N; C: 4.1G; D: 4.1B.

表 1 4.1蛋白家族在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达					
组织	n	表达情况(n)			
		+++	++	+	-
4.1R					
癌旁	51	33	15	2	1
肿瘤 ^b	94	13	34	15	32
4.1N					
癌旁	56	20	32	3	1
肿瘤 ^b	94	9	41	16	28
4.1G					
癌旁	55	2	8	6	39
肿瘤	94	5	18	16	55
4.1B					
癌旁	64	51	13	0	0
肿瘤 ^b	94	51	25	14	4

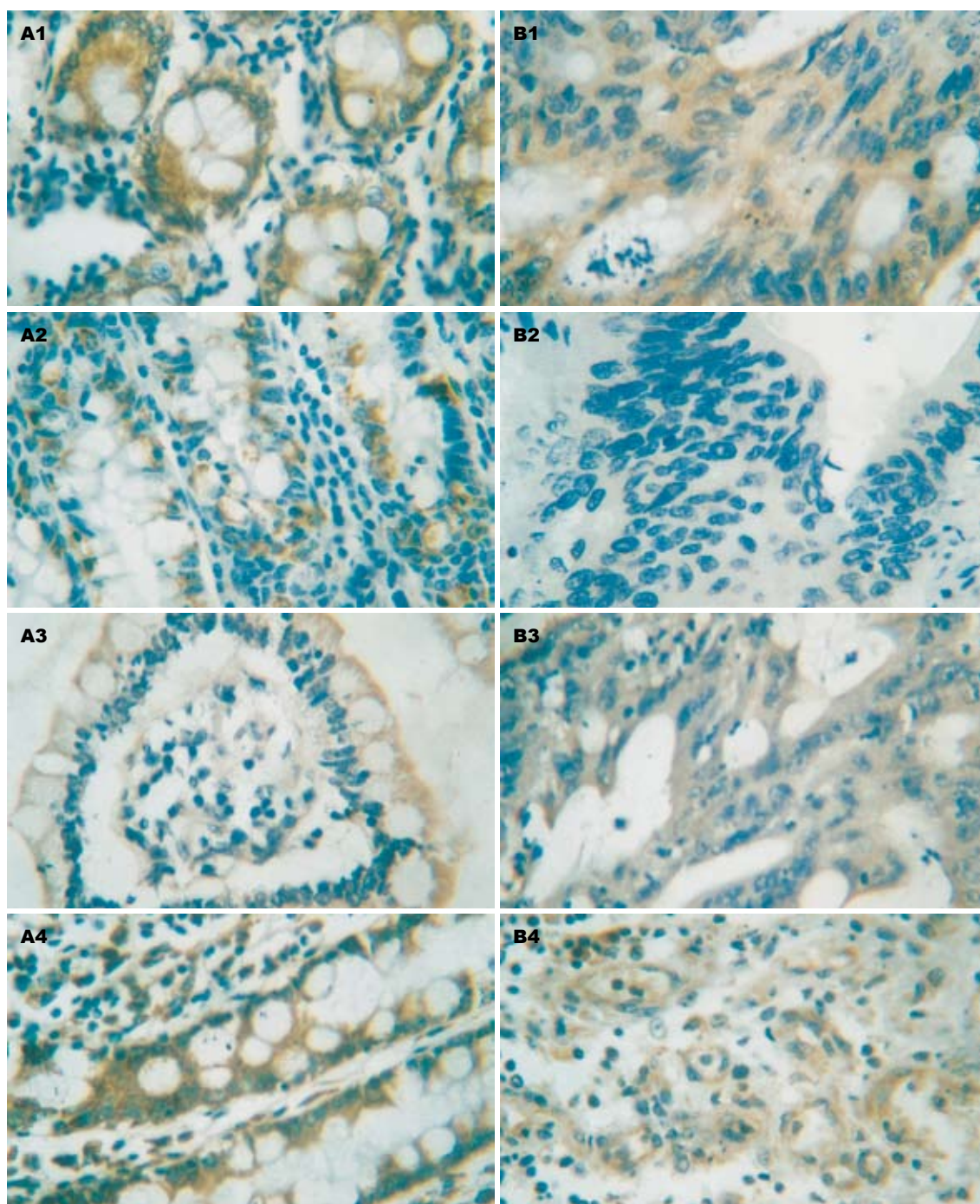
^bP<0.01 vs 癌旁.

接特定的细胞膜蛋白和细胞骨架蛋白, 形成所谓的“蛋白聚合体”, 并介导蛋白-蛋白之间、蛋白-细胞膜之间的相互作用, 以维持细胞的形状、细胞间的黏附、细胞与基质间的黏附以及细胞间的连接^[18-19]. 4.1蛋白就是这样一类蛋白, 他广泛存在于多种上皮细胞内, 主要位于细胞膜上细胞间连接部位, 并参与连接复合体的组成^[20-22]. 作为细胞膜蛋白与细胞骨架之间的连接子, 4.1蛋白能够与E-钙黏附蛋白(E-cadherin), CD44和TSLC-1等多个隶属于

表 2 4.1R, N, G, B与患者临床病理间的关系 n(%)					
	n	4.1R	4.1N	4.1G	4.1B
分化程度					
高分化	30	23(76.7)	27(90.0)	15(50.0)	30(100.0)
中分化	34	23(67.6)	22(64.7) ^b	14(41.2)	34(100.0) ^b
低分化	30	16(53.3)	17(56.7)	10(33.3)	26(86.7)
浸润程度					
黏膜层	10	8(80.0)	7(70.0)	3(30.0)	9(90.0)
肌层	37	29(78.4) ^b	29(78.4)	12(32.4) ^a	36(97.3)
浆膜外	47	25(53.2)	30(63.8)	24(51.1)	45(95.7)
淋巴结转移					
无	38	28(73.7)	33(86.8)	17(44.7)	38(100.0)
有	33	7(51.5) ^a	32(97.0)	12(36.4)	30(90.9)
年龄					
40	14	9(64.3)	12(85.7)	4(28.6)	12(85.7)
40-60	43	31(72.1)	40(93.0)	20(46.5)	43(100.0)
>60	37	22(59.4)	33(89.2)	15(40.5)	35(94.6)
性别					
男	51	35(68.6)	37(72.5)	20(39.2)	49(96.1)
女	43	27(62.8)	29(20.9)	19(44.2)	41(95.3)

^aP<0.05, ^bP<0.01.

不同家族的黏附分子结合^[23-27]. 而已有来自多个研究组的研究证明, 恶性肿瘤的浸润和转移与此类黏附分子具有高度的相关性^[28-29]. 4.1蛋白作为多种细胞黏附因子和下游蛋白之间的连接子, 在细胞黏附因子和细胞内信息传导中处于“信号中转站”的关键性地



创新盘点
肿瘤细胞中4.1蛋白的表达情况, 国外研究的较多, 但大多以细胞株为研究对象, 以临床标本为研究对象的并不多见。

图 2 细胞骨架蛋白的表达(Envision x 400). A: 结直肠癌旁组织; B: 癌组织. 1: 4.1R; 2: 4.1N; 3: 4.1G; 4: 4.1B.

位^[3,20,22,30], 并因此在结直肠癌的发生、发展的过程中起到重要作用. 考虑到4.1蛋白家族成员间分子结构上的同源性, 其成员间在功能上可能也具有相似性, 本研究对4.1蛋白家族不同成员在结直肠癌组织中表达情况的进行了深入的研究.

我们发现, 4.1蛋白家族的不同成员在结直肠癌组织标本中都存在程度不同的表达量降低甚至缺失的现象. 由于4.1蛋白在细胞间信号传导过程中, 以及在稳定细胞结构、调节细胞与

细胞之间、细胞与其他胞外基质之间黏连起到重要作用^[27,31-33], 结合我们的结果, 推测在结直肠癌发生的过程中, 由4.1蛋白介导的信号转导途径被阻断, 从而肠上皮组织细胞的增殖及凋亡失去调控, 而肠上皮细胞之间以及与基质间的黏连也失去调控, 从而引起肠上皮细胞发生癌变. 我们的结果也证明了之前研究者对4.1蛋白在肿瘤发生过程中的作用的推测. 此外, 我们发现, 4.1蛋白家族的不同成员(4.1R, 4.1N, 4.1G, 4.1B)与大肠癌的临床病理学特征的相关性存在

应用要点
4.1蛋白为结直肠癌的临床诊断和预后评估提供了一个新的标志物,可能为结直肠癌的治疗提供一个新的靶点。

一定的差异。4.1N, B的表达情况与患者的组织分化程度有着密切的联系,而4.1R与癌细胞的浸润程度、淋巴结的癌转移之间密切相关,4.1G的表达则随着癌细胞浸润程度的加深而增加。该结果提示,4.1N, B的缺失或下调,削弱了细胞间的黏连性,减少了细胞的凋亡,从而改变了细胞的增殖与分化,是大肠黏膜细胞恶变的早期事件;而4.1R, G与结直肠癌的发展过程紧密相关。此外,我们也发现,与正常组织相比,癌组织里,4.1R, N, B的表达都是缺失或下调,4.1G则例外。这一差异提示,4.1蛋白可能是维持细胞生理功能所必须的;或者,四者在功能上有一定的互补关系,通过这种互补,来维持细胞基本的结构和功能。这一结论与Huang *et al*^[5-6]的观点较为相似。

总之,本研究结果证明4.1蛋白家族在结直肠癌的发生、浸润及迁移的过程中起到重要作用,但还需要做进一步的工作以阐明该作用的机制。本研究的结果为结直肠癌的临床诊断和预后评估提供了一个新的标志物,并且有可能为结直肠癌的治疗提供一个新的靶点。

4 参考文献

- 胡晓燕, 周严, 袁建刚, 强伯勤. 蛋白4.1基因家族的研究进展. 生物化学与生物物理进展 2001; 28: 290-294
- Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 231-248
- Taylor-Harris PM, Keating LA, Maggs AM, Phillips GW, Birks EJ, Franklin RC, Yacoub MH, Baines AJ, Pinder JC. Cardiac muscle cell cytoskeletal protein 4.1: analysis of transcripts and subcellular location-relevance to membrane integrity, microstructure, and possible role in heart failure. *Mamm Genome* 2005; 16: 137-151
- Sun CX, Robb VA, Gutmann DH. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* 2002; 115: 3991-4000
- Huang SC, Liu ES, Chan SH, Munagala ID, Cho HT, Jagadeeswaran R, Benz EJ Jr. Mitotic regulation of protein 4.1R involves phosphorylation by cdc2 kinase. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 117-127
- Huang SC, Jagadeeswaran R, Liu ES, Benz EJ Jr. Protein 4.1R, a microtubule-associated protein involved in microtubule aster assembly in mammalian mitotic extract. *J Biol Chem* 2004; 279: 34595-34602
- Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Snyder M, Marchesi VT, Benz EJ. A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein. *J Cell Biol* 1999; 145: 29-43
- Scott C, Keating L, Bellamy M, Baines AJ. Protein 4.1 in forebrain postsynaptic density preparations: enrichment of 4.1 gene products and detection of 4.1R binding proteins. *Eur J Biochem* 2001; 268: 1084-1094
- Robb VA, Li W, Gascard P, Perry A, Mohandas N, Gutmann DH. Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis. *Neurobiol Dis* 2003; 13: 191-202
- Rajaram V, Gutmann DH, Prasad SK, Mansur DB, Perry A. Alterations of protein 4.1 family members in ependymomas: a study of 84 cases. *Mod Pathol* 2005; 18: 991-997
- Tran YK, Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 35-43
- Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2954-2961
- Haase D, Meister M, Muley T, Hess J, Teurich S, Schnabel P, Hartenstein B, Angel P. FRMD3, a novel putative tumour suppressor in NSCLC. *Oncogene* 2007; 26: 4464-4468
- Ohno N, Terada N, Murata S, Yamakawa H, Newsham IF, Katoh R, Ohara O, Ohno S. Immunolocalization of protein 4.1B/DAL-1 during neoplastic transformation of mouse and human intestinal epithelium. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 579-586
- Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 931-934
- 姚智. 细胞因子与肿瘤转移. 中国免疫学会第五届全国代表大会暨学术会议 2006; 263-265
- 郑敏娜, 陆融, 姚智. 细胞黏附分子与肺癌侵袭转移的关系. 国际肿瘤学杂志 2006; 33: 523-526
- 李立, 唐罗生. 细胞间隙连接蛋白与肿瘤. 国际眼科杂志 2007; 7: 175-178
- 吕丽艳, 关景明, 米丽娜. 细胞间隙连接通讯及其通路蛋白与大肠癌发生关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3493-3499
- Baines AJ. A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function. *BMC Genomics* 2006; 7: 85
- Gimm JA, An X, Nunomura W, Mohandas N. Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins. *Biochemistry* 2002; 41: 7275-7282
- Nunomura W, Takakuwa Y, Parra M, Conboy JG, Mohandas N. Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 6360-6367
- Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci* 1999; 112 Pt 18: 3081-3090
- Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M, Mohandas N. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca2+ and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 1997; 272: 30322-30328
- Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T,

- Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5129-5133
- 26 Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, Murakami Y. Tumor suppressor in lung cancer (TSLC)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis. *J Biol Chem* 2005; 280: 42164-42171
- 27 Nunomura W, Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin. *Front Biosci* 2006; 11: 1522-1539
- 28 Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LY. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2007; 29: 550-558
- 29 Gong Y, Sun X, Huo L, Wiley EL, Rao MS. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Histopathology* 2005; 46: 24-30
- 30 Jiang W, Newsham IF. The tumor suppressor DAL-1/4.1B and protein methylation cooperate in inducing apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 4
- 31 Charboneau AL, Singh V, Yu T, Newsham IF. Suppression of growth and increased cellular attachment after expression of DAL-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2002; 100: 181-188
- 32 Gutmann DH, Hirbe AC, Huang ZY, Haipok CA. The protein 4.1 tumor suppressor, DAL-1, impairs cell motility, but regulates proliferation in a cell-type-specific fashion. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 266-278
- 33 Calinisan V, Gravem D, Chen RP, Brittin S, Mohandas N, Lecomte MC, Gascard P. New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium. *Front Biosci* 2006; 11: 1646-1666

同行评价
本文研究了细胞骨架4.1蛋白家族在结直肠癌组织中的表达, 研究内容比较新颖, 讨论比较充分, 有一定的临床应用价值。

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知

本刊讯 为促进消化内镜诊治技术的发展和学术交流, 由中华消化内镜学会、黑龙江省医学会、黑龙江省医院、黑龙江省临床消化病研究所联合举办的第四届全国消化内镜学术会议定于2007-12-22/23日在哈尔滨召开。大会将邀请国内外著名专家作消化内镜进展方面专题报告及内镜演示, 并制定中华消化内镜学会消化内镜消毒指南(讨论稿)。欢迎消化届同仁积极投稿及参与, 参会代表授予国家继续教育 I 类学分。

1 论著要求

论著要求800字以内摘要(目的、方法、结果、结论), 电脑打印(WORD格式), 网上投稿。截稿时间: 2007-10-31。

2 联系方式

150001, 哈尔滨和平邨宾馆(中山路171号), 哈尔滨市果戈里大街405号, 黑龙江省医院, 联系人: 朱春兰, 电话: 13845048249或0451-88025055, 传真: 0451-53625617, E-mail: zhuchulan@medmail.com.cn

哈尔滨市南岗区1992/2005年结直肠癌发病趋势

崔滨滨, 刘彦龙, 何慧, 吴树岭, 孙喜文, 林英姬, 戴旭东

背景资料
大肠癌是我国位居第4位的常见恶性肿瘤, 其发病率和死亡率有逐年增高的趋势, 发病年龄也明显提高。建立符合我国国情的阶梯型普查筛查方案很有必要。

崔滨滨, 刘彦龙, 哈尔滨医科大学肿瘤医院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150081

何慧, 吴树岭, 哈尔滨市南岗区疾控中心 黑龙江省哈尔滨市 150000

孙喜文, 林英姬, 戴旭东, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所 黑龙江省哈尔滨市 150081

崔滨滨, 副教授, 硕士生导师, 主要从事大肠癌的基础研究和外科治疗。

通讯作者: 孙喜文, 150081, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所. xwsun2000@126.com

电话: 86298290

收稿日期: 2007-04-18 修回日期: 2007-07-11

Morbidity trends for colorectal carcinoma in the Nangang District of Harbin from 1992 to 2005

Bin-Bin Cui, Yan-Long Liu, Hui He, Shu-Ling Wu, Xi-Wen Sun, Ying-Ji Lin, Xu-Dong Dai

Bin-Bin Cui, Yan-Long Liu, Department of Abdominal Surgery, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China.

Hui-He, Shu-ling Wu, Center for Disease Control of Nangang District, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China.

Xi-Wen Sun, Ying-Ji Lin, Xu-Dong Dai, Institute of Cancer Research, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xi-Wen Sun, Institute of Cancer Research, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. xwsun2000@126.com

Received: 2007-04-18 Revised: 2007-07-11

Abstract

AIM: To determine the epidemiological characteristics of colorectal carcinoma (CRC) morbidity in the nangang district, Harbin, and to highlight the harmful effects of CRC on the community.

METHODS: Data on morbidity and mortality of CRC in the nangang district (1992-2001) were sorted and coded according to ICD-9 criteria. The crude morbidity and mortality, age-standardized morbidity (adjusted by the world population), truncated morbidity (35-64 years old), as well as cumulative rates (0-65 years old) were respectively calculated. Morbidity in the near future was predicted based on Gray Modeling (GM1, 1).

RESULTS: The CRC morbidity had been significantly increasing annually ($u = 2.87, P < 0.01$). Morbidity increased from 13.06/100 000 (1992-1993) to 23.54/100 000 (2004-2005), with an average of 5.73% for each year. The increasing average rates of morbidity were 6.94% and 4.46% for males and females, respectively. In the 60-79-year-old age group, morbidity for men was significantly higher than the incidence for women ($u = 5.47, P < 0.01$). The largest proportion of CRC patients were white-collar workers. The predicted morbidity for CRC in 2010 is 44.85/100 000 and 33.19/100 000 for males and females, respectively.

CONCLUSION: The morbidity rate for CRC will continue to increase in the future.

Key Words: Colorectal carcinoma; Morbidity

Cui BB, Liu YL, He H, Wu SL, Sun XW, Lin YJ, Dai XD. Morbidity trends for colorectal carcinoma in the Nangang District of Harbin from 1992 to 2005. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2442-2446

摘要

目的: 对哈尔滨市南岗区结直肠癌(CRC)发病流行分布特点进行统计分析, 探讨CRC对哈尔滨市南岗区人群的危害。

方法: CRC发病资料来源于哈尔滨市南岗区肿瘤发病死亡登记报告, 按ICD-9疾病分类进行编码, 性别计算初发病率、世界人口调整发病率, 35-64岁截缩发病率和0-64岁累积发病率, 对近期CRC发病率进行预测。

结果: CRC发病率呈显著的逐年增加趋势($u = 2.87, P < 0.05$), 由1992/1993年13.06/100 000增加到2004/2005年23.54/100 000, 平均每年以5.73%的速度增加。其中男性每年以6.94%的速度增加, 女性每年以4.46%的速度增加。60-79岁年龄组段男性发病率明显高于女性($u = 5.47, P < 0.01$)。CRC发病以非体力劳动者所占比重最大。预测2010年CRC发病率将达到33.19/100 000, 男女CRC发病率将分别达到44.85/100 000和31.89/100 000。

结论: 哈尔滨市南岗区居民CRC发病率呈逐年上升趋势。

关键词: 结直肠癌; 发病趋势

崔滨滨, 刘彦龙, 何慧, 吴树岭, 孙喜文, 林英姬, 戴旭东. 哈尔滨市南岗区1992/2005年结直肠癌发病趋势. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2442-2446
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2442.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer CRC)是常见的恶性肿瘤之一, 2000年全球有新发病例945 000例, 发病率仅次于肺癌、乳腺癌, 居恶性肿瘤发病的第3位^[1]. 过去CRC发病率一直以北美、大洋洲地区的国家最高, 而亚洲地区相对较低. 近年来, 随着人民生活水平的改善, 饮食结构的改变, 我国CRC发病率呈上升趋势^[2-4]. 流行病学研究表明, CRC主要与家族肿瘤史、饮食习惯和结直肠息肉史等因素有关^[5-13]. CRC病因和发病机制不明, 预后较差, 5 a生存率低^[1]. 对CRC发病进行变化趋势研究, 将有助于其病因因素的探索和防治策略的制定.

1 材料和方法

1.1 材料 CRC发病资料来源于哈尔滨市南岗区肿瘤发病死亡登记报告, 发病卡由哈尔滨市各大医院填写, 每月报登记处. 登记处由专人对卡片按ICD-9疾病分类进行编码并录入“恶性肿瘤发病、死亡登记统计系统”, 并作漏项和逻辑检查, 不合格者由登记处工作人员进行访问补填. 年终对该年度报告卡片进行查重、复核和剔重. 人口数据由南岗区公安分局户籍科提供每年年初和年终年龄组人口数据, 年人口数取年初和年终平均数.

1.2 方法 对发病数据分别计算粗发病率、世界人口调整发病率、35-64岁截缩率和0-64岁累积发病率, 截缩率和累积率的计算公式分别为: 截缩率($1/100\ 000$) = $\sum(\text{截缩年龄段各年龄组发病率} \times \text{各相应年龄组标准人口构成}) \div \sum \text{截缩年龄段各相应年龄组标准人口构成}$, 累及率(%) = $[\sum(\text{年龄组发病专率} \times \text{年龄组距})] \times 100\%$. 为了观察14 a间CRC发病变化情况, 将14 a资料分成7个黏端计算相应指标病进行1992/1993与2004/2005年的前后比较. 采用SPSS软件进行发病率的趋势检验, 其方法是: 求出各观察值序数, 即位于该观察值之前且小于该观察值的观察值个数, 用下式进行检验: $u = (r - R) \div \sigma_r = [4 \sum p \div$

$n(n-1) - 1 - R] \div [2(2n+5)/9n(n-1)]^2$, 式中, $\sum p$ 为合计序数; n 为样本含量; r 为样本趋势性系数, $r = +1$ 表示有稳定上升趋势, $r = -1$ 表示有稳定下降趋势; R 为总体趋势性系数, 据假设检验, $R = 0$; σ_r 为总体标准差, 用样本标准差 S 作为估计值. 取 $\alpha = 0.05$. 1992/1993年与2004/2005年发病率的显著性差异用 u 检验, $P < 0.05$ 人为差异有显著性. 采用灰色模型GM(1, 1)对近期CRC发病率进行预测.

2 结果

1992/1993年平均发病率为13.06/100 000, 2004/2005年为23.54/100 000, 发病率增加了80.25%. 1992-2005年CRC平均发病率男性为20.23/100 000, 女性为16.98/100 000. 经世界标准人口构成调整后, 男女发病率分别为25.23/100 000和19.72/100 000. 发病率性别之比为1.19:1. CRC发病数占恶性肿瘤发病总数的9.84%(男性为9.18%, 女性为10.96%), 男女分别居于恶性肿瘤发病的第4位和第3位. CRC发病呈显著的逐年增加趋势($u = 2.87$, $P < 0.01$), 由1992/1993年的13.06/100 000增加到2004/2005年的23.54/100 000, 发病率平均以每年5.73%的速度增加. 其中男性以平均每年6.94%的速度增加, 上升趋势显著($u = 3.01$, $P < 0.01$); 女性以平均每年4.46%的速度增加, 上升趋势显著($u = 2.56$, $P < 0.05$). 男女世界人口调整发病率分别以7.61%和5.06%的速度增加. CRC截缩率和0-64岁累积发病率均呈逐年增加趋势(表1).

CRC年龄组发病率随年龄增加而上升, 男女发病均于30岁年龄组开始明显上升. 男性75岁年龄组到高峰, 之后稍有下降, 而女性则80岁年龄组达发病率高峰. 30-59岁男女年龄组发病率没有显著差别($u = 0.76$, $P > 0.05$), 60-79岁年龄组段男性发病率明显高于女性($u = 5.47$, $P < 0.01$), 80岁以上年龄组段男女发病率没有明显差异($u = 0.52$, $P > 0.05$). 男性CRC诊断最小年龄为5岁组, 女性为15岁组. CRC平均诊断年龄为63.63岁, 其中男性平均诊断年龄为63.81岁, 女性为63.41岁(图1).

我们将职业劳动强度分为轻体力劳动(干部、知识分子和经商)和重体力劳动(体力劳动, 不包括轻体力技术工人). 我们可以看出, CRC发病主要以轻体力劳动者为主, 占CRC发病的55.06%. 在男性中, 干部(机关办公室工作者)的CRC发患者数占男性CRC发病总人数的近

研发前沿
目前大肠癌在手术、放疗、化疗、免疫治疗、热疗、中医中药治疗等方面取得了一定的成绩, 但大肠癌术后5 a生存率仍在50%左右. 因此单靠综合治疗不可能降低大肠癌的死亡率. 而通过早期发现、早期诊断, 可以提高早期大肠癌的检出率和癌前病变的发现率.

相关报道
目前关于大肠癌普查大部分仅限于小范围, 缺乏大规模普查报道。

表 1 结直肠癌不同年代、不同性别发病率(1/100 000)

年代	发病率		世调率		累积发病率		截缩发病率	
	男	女	男	女	男	女	男	女
1992-1993	13.22	12.90	14.28	13.15	0.84	0.53	23.98	15.94
1994-1995	17.24	15.05	17.63	14.71	0.88	0.72	24.28	26.22
1996-1997	19.26	13.80	18.16	12.48	1.05	0.72	30.26	20.55
1998-1999	19.63	15.77	17.39	13.61	0.99	0.79	27.61	21.26
2000-2001	20.92	17.78	18.91	14.71	0.96	0.83	27.82	24.97
2002-2003	22.89	20.50	26.86	21.28	1.08	1.01	33.11	32.18
2004-2005	26.06	20.96	29.50	22.49	1.03	0.81	32.18	25.08
合计	20.23	16.98	25.23	19.72	0.98	0.78	30.49	24.74

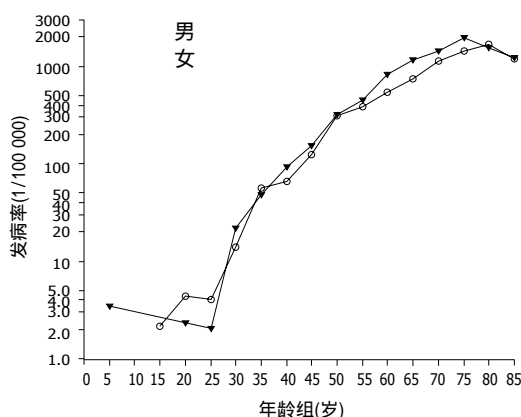


图 1 1992/2005年CRC年龄组发病率变化趋势。

1/3. 而在女性中, 则以经商者CRC发患者数最多, 占女性CRC总病例的近1/4(表2). 为了估计近期CRC发病率, 采用灰色模型GM(1, 1)预测近期CRC发病率. 1992/2005年的7个年代段男女CRC发病率经 u 检验均有明显差异(男性: $u = 15.42 > u(0.05) = 1.96$, 女性: $u = 12.05 > u(0.05) = 1.96$), 故认为男女CRC发病率均呈现一定的时间变化趋势. 该模型对原始资料的拟合效果很好, 说明如果没有其他因素的干扰, CRC发病率将保持持续上升的势头. 2010年CRC发病率将达到33.19/100 000, 男女CRC发病率将分别达到44.85/100 000和31.89/100 000(表3).

3 讨论

CRC是常见的消化道恶性肿瘤, 严重危及患者生命或降低患者生存质量. 世界各国CRC发病率差异较大, 发达国家发病率较高^[14-19]. 居于恶性肿瘤发病的第2位, 而发展中国家CRC发患者数不足全部CRC发患者数的1/3^[2]. 北美、西欧等是CRC高发地区, 东欧居中, 而非洲、亚洲和北美地区发病率相对较低^[20-21]. 我国CRC发病率同样存在区域差别. 近年来, 随着社会发展, 人

表 2 CRC发病主要职业分布(%)

性别	工人	干部	知识分子	经商	其他
男	20.84	32.76	4.01	21.08	21.31
女	17.56	22.05	5.48	24.19	30.72
合计	19.36	27.92	4.67	22.47	25.58

表 3 2006/2010年哈尔滨市南岗区CRC发病率(1/100 000)预测

性别	2006	2007	2008	2009	2010
男	29.67	32.78	36.46	41.79	44.85
女	22.08	24.79	27.07	29.12	31.89
合计	25.54	26.71	29.06	32.52	33.19

们生活水平的不断提高, CRC发病率上升明显^[2]. 这种不同地区CRC发病率有明显不同的状况提示CRC与环境、生活方式及遗传等因素有密切关系.

近年来, 亚洲、非洲和欧洲的一些国家CRC发病率与西方国家CRC发病率持续降低或保持稳定不变不同的是其CRC发病率呈上升趋势. 日本^[22]1950/1995年CRC发病率上升了8倍; 韩国每10 a上升2倍^[20]. 本资料显示, 哈尔滨市南岗区的CRC发病率由20世纪初的13.06/100 000上升到21世纪初的23.54/100 000, 增加了80.25%. 其中男性发病率增加了97.13%, 女性增加了62.48%. 国内外学者认为CRC发病率的这种变化趋势与西方化生活方式和饮食习惯有关^[5-7,9-13], 然而仍保持传统饮食习惯的埃及^[23]其CRC发病率近年也呈上升趋势, 而且40岁以下的青年人CRC约占CRC的1/3. 有人研究发现埃及CRC患者体内有机氯化物或其他杀虫剂水平较高, 认为这与针对CRC的预防措施同工业

化城市化进程不相适应有关。以往移民流行病学研究发现, 从日本、中国及非洲等CRC发病率低发国家移居至美国、澳大利亚等CRC高发率国家的第1代人群即出现发病率的显著上升, 而从南欧移居至澳大利亚但仍保持其原有烹调方式的人群, CRC发病率且无明显改变。移民流行病学研究结果提示生活方式在CRC发病中起重要作用。有研究提示, 大肠癌的发生可能与环境因素、生活习惯, 尤其是饮食结构和方式有关^[24-25], 高脂肪、低纤维素饮食是CRC发病的重要危险因素^[26-27]。高脂食谱的实验动物大肠癌的发生率增高, 武汉的研究结果证实大肠癌患者高脂肉类食物的比例明显高于非大肠癌患者^[28], 说明大肠癌的发生与饮食结构有一定的相关性。其机制可能为: 高脂饮食, 特别是含有饱和脂肪酸的饮食, 可使肝中胆固醇和胆酸的合成增多, 进而排入肠腔的胆固醇和胆酸增加, 在肠腔细菌的作用下, 胆固醇和胆酸转变为其代谢产物和次级胆酸等致癌物。嗜酒、吸烟与大肠癌发生也有相关性^[29-30]。以上研究结果提示, 环境、饮食习惯在CRC发生中起着比遗传更为重要的作用。

Becker *et al*^[31]研究认为, 除家族肿瘤史外, 文化背景以及饮食紊乱容易导致肿瘤的发生。本资料与此研究结果一致。1992/2005年的全部新诊断CRC病例中, 从事脑力劳动者约占1/3, 而从事体力劳动者仅占1/5。改变不良饮食习惯, 提倡合理饮食, 多食用高纤维食物, 多食用新鲜蔬菜水果; 加强体育锻炼、戒除不良生活嗜好和积极治疗结直肠慢性疾病是预防大肠癌的基本措施。

4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
- 2 Marchand LL. Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1999; 101:105
- 3 张振书, 张亚丽. 中国大肠癌研究进展. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 489-494
- 4 孙喜文, 吴树岭, 林英姬, 王波, 韩慧丽, 戴旭东. 哈尔滨市南岗区1992/2001年结直肠癌发病死亡趋势. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2302-2306
- 5 Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496-1501
- 6 Hangen L, Bennink MR. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 2002; 44: 60-65
- 7 Senesse P, Boutron-Ruault MC, Faivre J, Chatelain N, Belghiti C, Meance S. Foods as risk factors for colorectal adenomas: a case-control study in Burgundy (France). *Nutr Cancer* 2002; 44: 7-15
- 8 Ye W, Romelsjo A, Augustsson K, Adami HO, Nyren O. No excess risk of colorectal cancer among alcoholics followed for up to 25 years. *Br J Cancer* 2003; 88: 1044-1046
- 9 Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S. Height, weight, and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. *Br J Cancer* 2003; 88: 1038-1043
- 10 Coates AO, Potter JD, Caan BJ, Edwards SL, Slattery ML. Eating frequency and the risk of colon cancer. *Nutr Cancer* 2002; 43: 121-126
- 11 Fung T, Hu FB, Fuchs C, Giovannucci E, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Major dietary patterns and the risk of colorectal cancer in women. *Arch Intern Med* 2003; 163: 309-314
- 12 Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1-17
- 13 Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up. *Cancer* 2004; 100: 288-293
- 14 Hawk ET, Limburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 905-941
- 15 Peng J, Ganry O, Tramier B, Dubreuil A, Raverdy N, Thulliez A. Incidence and prevalence estimations for breast and colorectal cancer in the Picardy region. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2002; 50: 427-432
- 16 Swan J, Edwards BK. Cancer rates among American Indians and Alaska Natives: is there a national perspective. *Cancer* 2003; 98: 1262-1272
- 17 Incidence and mortality of cancer in Navarra, 1993-1997. Tendencies in the last 25 years. *An Sist Sanit Navar* 2001; 24: 339-362
- 18 Marrett LD, Chaudhry M. Cancer incidence and mortality in Ontario First Nations, 1968-1991 (Canada). *Cancer Causes Control* 2003; 14: 259-268
- 19 Anderson WF, Umar A, Brawley OW. Colorectal carcinoma in black and white race. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 67-82
- 20 Kim DH, Shin MH, Ahn YO. Incidence pattern of colorectal cancer in Korea by subsite of origin. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 675-681
- 21 Bonithon-Kopp C, Benhamiche AM. Are there several colorectal cancers? Epidemiological data. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8 Suppl 1: S3-12
- 22 Takada H, Ohsawa T, Iwamoto S, Yoshida R, Nakano M, Imada S, Yoshioka K, Okuno M, Masuya Y, Hasegawa K, Kamano N, Hioki K, Muto T, Koyama Y. Changing site distribution of colorectal cancer in Japan. *Dis Colon Rectum* 2002;

创新盘点
本研究通过近13 a的观察了解大肠癌的发病趋势, 进一步分析了其与文化背景、职业以及饮食规律性等方面的关系, 进而可以指导筛查的人群范围。

同行评价

本文通过分析哈尔滨市南岗区1992-2005年结直肠癌发病趋势, 预计2010年CRC发病率将达到33.19/100 000。选题新颖, 设计科学, 研究方全, 有重要的参考价值和应用意义。

- 45: 1249-1254
- 23 Abou-Zeid AA, Khafagy W, Marzouk DM, Alaa A, Mostafa I, Ela MA. Colorectal cancer in Egypt. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1255-1260
- 24 Willett WC. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 3-8
- 25 Slattery ML, Edwards SL, Ma KN, Friedman GD. Colon cancer screening, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control* 2000; 11: 555-563
- 26 Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 55-66
- 27 Maynard M, Gunnell D, Emmett P, Frankel S, Davey Smith G. Fruit, vegetables, and antioxidants in childhood and risk of adult cancer: the Boyd Orr cohort. *J Epidemiol Community Health* 2003; 57: 218-225
- 28 陈婕, 李君, 徐三平, 宋军. 湖北地区结直肠癌与生活习性的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 105-107
- 29 Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Ballard L, Edwards S, Schaffer D, Potter J, Leppert M, Samowitz WS. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1831-1836
- 30 Slattery ML. Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2000; 11: 142-146
- 31 Becker AE. Culture and eating disorders classification. *Int J Eat Disord* 2007

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知

本刊讯 由中华医学会消化内镜学分会主办, 江西省医学会消化内镜专业委员会、南昌大学第一附属医院承办的中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学术研讨会将于2007-11-02/04日在江西南昌举行。届时将邀请美国、香港等地的国际著名消化内镜专家及国内知名消化内镜专家莅临大会。

1 会议内容

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会; 青年内镜医师培养讲座; 消化内镜新进展讲座; 青年委员专题讲座。

2 联系方式

330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科, 徐萍. 电话: 0791-8692506或0791-8692540, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn.

华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠脂质代谢和组织形态学的影响

张介眉, 郝建军, 时昭红, 常 青, 郝飞虹

张介眉, 郝建军, 时昭红, 武汉市中西医结合医院 湖北省武汉市 430022
常青, 郝飞虹, 湖北中医学院中药研究所 湖北省武汉市 430061
湖北省卫生科研基金项目, No. 2006-63
通讯作者: 张介眉, 430022, 湖北省武汉市中山大道215号, 武汉市中西医结合医院院长办公室. zhangjiemei88@126.com
电话: 027-85332516 传真: 027-85332516
收稿日期: 2007-02-07 修回日期: 2007-07-17

Effects of a preparation of Chinese *Allium fistulosum* L on the morphology and metabolism of lipids in fatty liver rats

Jie-Mei Zhang, Jian-Jun Hao, Shao-Hong Shi,
Qing Chang, Fei-Hong Bing

Jian-Jun Hao, Jie-Mei Zhang, Shao-Hong Shi, Wuhan Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Qing Chang, Fei-Hong Bing, Institute of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine in Hubei Province, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Supported by: the Research Foundation of Public Health of Hubei Province, No. 2006-63
Correspondence to: Jie-Mei Zhang, Wuhan Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, 215 Zhongshan Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zhangjiemei88@126.com
Received: 2007-02-07 Revised: 2007-07-17

Abstract

AIM: To study the preventive and therapeutic effects of a preparation of Chinese *Allium fistulosum* L (PCAL) on fatty liver rats.

METHODS: Sixty sprague-dawley rats were randomly divided into six groups; a blank control group ($n = 10$), model control group ($n = 10$), low-, medium- and high-dose PCAL (PCAL low, PCAL medium and PCAL high, respectively, $n = 10$ in each group), and a Dongbaogantai group ($n = 10$). The blank control group was given water and food. Other groups were fed with a high-fat diet, given water with 15% ethanol, and treated with a small dose of carbon tetrachloride (CCl_4) hypodermically once a week to establish the fatty liver model. All animals were sacrificed after 8 wk. Plasma total cholesterol (TC), triglyc-

eride (TG), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLO), and A/G (albumin/globulin) were determined by an automatic biochemistry analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) staining and electron microscopy were used to detect changes in the hepatic pathology of the fatty liver rats.

RESULTS: From HE staining and electron microscopy, we ascertained the phenomena of severe fatty degeneration and the multiplication of lipid droplets in the model control group. The extent of fatty degeneration and multiplication of lipid droplets in the PCAL low, middle and high groups, and the Dongbaogantai group was relatively mitigated. Compared with the blank control group, the level of TC, TG, LDL-C, ALT and AST in the model control group increased significantly (all $P < 0.01$); the level of HDL-C, TP and ALB in the model control group decreased significantly (all $P < 0.01$); the level of TC, TG and LDL-C in the PCAL low, middle and high groups and the Dongbaogantai group decreased significantly (TC, PCAL low, middle and high group, $P < 0.05$; Dongbaogantai group, $P < 0.01$; TG, PCAL low and middle groups and Dongbaogantai groups $P < 0.05$, PCAL high group, $P < 0.01$; LDL-C, all $P < 0.05$); the level of HDL-C in the PCAL low, middle and high groups and the Dongbaogantai group increased significantly (all $P < 0.05$); the level of ALT and AST in the PCAL low, middle and high groups and the Dongbaogantai group did not change significantly; while the level of ALB in the PCAL high group increased significantly ($P < 0.05$).

CONCLUSION: PCAL can improve the metabolism of lipids, and it has preventive and therapeutic effects on fatty liver rats.

Key Words: Preparation of Chinese *Allium fistulosum* L; Fatty Liver; Morphology; Lipid metabolism; Automatic biochemistry analyzer; Transmission electron microscopy

Zhang JM, Hao JJ, Shi SH, Chang Q, Bing FH. Effects

背景资料
华夏小葱制剂是武汉市中西医结合医院多年研究的一种中药口服液, 已获国家专利。据以往文献记载其性味辛温、具有通阳利尿之功效, 本文对其防治实验性脂肪肝大鼠的作用进行了探讨研究。

相关报道

以往研究表明:武汉市中西医结合医院生产的华夏小葱的不同剂型药物具有防治动脉粥样硬化、球囊损伤术后再狭窄,治疗冠心病心绞痛等作用,这是本文将华夏小葱制剂开发成脂肪肝新药的临床依据。

of a preparation of Chinese *Allium fistulosum* L on the morphology and metabolism of lipids in fatty liver rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2447-2452

摘要

目的: 观察华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠防治作用及其对组织形态学影响。

方法: 60只SD大鼠随机分为空白对照组($n = 10$), 模型对照组($n = 10$), 华夏小葱制剂低剂量组($n = 10$), 中剂量组($n = 10$), 高剂量组($n = 10$)以及东宝肝泰片组($n = 10$)。空白对照组用普通饲料及普通水喂养; 其他组用高脂饮食及酒精水喂养, 并结合每周一次行后肢sc小剂量四氯化碳色拉油溶液的方法建立大鼠脂肪肝模型。用光镜及电镜观察肝脏的形态学改变情况, 采用全自动生化分析仪测定总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), ALT(丙氨酸氨基转移酶), AST(天门冬氨酸氨基转移酶), TP(总蛋白), ALB(清蛋白)、GLO(球蛋白)及A/G(清蛋白/球蛋白)的含量。

结果: 光镜和电镜观察均见模型对照组有严重脂肪变性, 脂滴增多; 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组脂肪变性程度有所减轻, 脂滴不同程度的有所减少。和空白对照组的TC, TG, HDL-C, LDL-C, ALT, AST, TP, ALB相比, 模型对照组大鼠血浆TC, TG, LDL-C, ALT, AST值均显著升高($P < 0.01$), HDL-C, TP, ALB值均显著降低($P < 0.01$); 和模型对照组的TC, TG, HDL-C, LDL-C, ALT, AST, TP, ALB相比, 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组TC, TG, LDL-C值均显著降低(TC: 低、中、高剂量组 $P < 0.05$, 东方肝泰片组 $P < 0.01$; TG: 低、中剂量组和东方肝泰片组 $P < 0.05$, 高剂量组 $P < 0.01$; LDL-C: 均 $P < 0.05$), HDL-C值与模型对照组相比显著升高(均 $P < 0.05$), ALT, AST值与模型对照组相比无统计学差异, 华夏小葱高剂量组与模型对照组相比ALB值显著升高($P < 0.05$)。

结论: 华夏小葱制剂能改善脂肪肝大鼠体内的脂质代谢, 对脂肪肝有一定的防治作用。

关键词: 华夏小葱制剂; 脂肪肝; 形态学; 脂质代谢; 全自动生化分析仪; 透射电镜

张介眉, 郝建军, 时昭红, 常青, 郝飞虹. 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠脂质代谢和组织形态学的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(22):2447-2452

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2447.asp>

0 引言

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性改变^[1-2]。轻度的肝细胞脂肪变性在大体上可无明显变化, 当半数以上肝细胞有脂滴蓄积, 或者肝内蓄积脂肪含量超过肝湿重的5%, 即形成脂肪肝。因脂肪肝已成为一种常见病、多发病, 发病机制至今尚未明确^[3-4], 临床上仍未找到治疗脂肪肝的特效药^[5-8], 而中医药在防治此类疾病中体现出了良好的优势^[9-12]。华夏小葱制剂(PCAL)是武汉市中西医结合医院正在研究中的一种中药口服液(已获国家专利), 以往研究表明^[13-15]: 华夏小葱制剂具有性味辛温、通阳利尿、化解瘀血等功效, 本实验旨在研究华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠脂质代谢及其组织形态学的影响, 为其临床应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠60只, 体质量 150 ± 20 g, 雌雄各半, 购自华中科技大学同济医学院动物中心[合格证号: SCXK(鄂)2004-0007]。华夏小葱制剂是精选百合科植物葱(*Allium fistulosum* L.), 本实验用葱取自湖北黄陂近根部的鳞茎(葱白), 切去须根及叶, 剥去外膜, 利用现代的技术加工方法将其提取物精制而成的口服液, 由武汉市中西医结合医院制剂中心提供, 专利号: 200610125543.1, 批号: 20050326; 东宝肝泰片(复方蛋氨酸胆碱片), 通化东宝药业股份有限公司, 批号: 060106, 灌胃前用2 g/L羟甲基纤维素(CMC)配制成70 g/L的混悬液。两者均要在4℃冰箱保存备用。总胆固醇(TC)试剂盒、甘油三酯(TG)试剂盒、总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)试剂盒(上海中申-德赛诊断技术有限公司); 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(日本协和医药株式会社); 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒, (上海科华东菱诊断用品有限公司)。全自动生化分析仪(Olympus Au560, 日本); 光学显微镜(BX-60型, 日本); 透射电镜(H-600型, 日立)。

1.2 方法

1.2.1 分组与动物模型 大鼠适应性喂养1 wk后, 按体质量分层随机分为6组($n = 10$)。空白对照组, 模型对照组, 华夏小葱低、中、高剂量组, 东宝肝泰片组。空白对照组使用标准大鼠饲料和普通水喂养。其他组参考孙要武 *et al*^[16]报道的方法加以改进, 复制大鼠脂肪肝模型: 动物给予

表 1 PCAL对脂肪肝大鼠血浆TC、TG、HDL-C、LDL-C、ALT和AST的影响(mean ± SD, $n = 10$)

分组	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
空白对照组	1.39 ± 0.31	0.48 ± 0.08	1.03 ± 0.26	0.30 ± 0.09	18.40 ± 5.32	117.60 ± 8.38
模型对照组	2.03 ± 0.38 ^b	1.18 ± 1.34 ^b	0.92 ± 0.17 ^b	0.42 ± 0.10 ^b	28.67 ± 6.98 ^a	136.83 ± 16.94 ^a
PCAL低剂量组	1.67 ± 0.31 ^c	0.65 ± 0.23 ^c	1.27 ± 0.26 ^c	0.33 ± 0.11 ^c	34.10 ± 7.62	126.07 ± 42.65
PCAL中剂量组	1.65 ± 0.17 ^c	0.60 ± 0.29 ^c	1.22 ± 0.12 ^c	0.31 ± 0.09 ^c	24.27 ± 8.10	117.64 ± 37.38
PCAL高剂量组	1.69 ± 0.29 ^c	0.55 ± 0.17 ^d	1.28 ± 0.22 ^c	0.32 ± 0.13 ^c	25.13 ± 7.21	121.94 ± 43.43
东宝肝泰片组	1.52 ± 0.31 ^d	0.61 ± 0.27 ^c	1.12 ± 0.19 ^c	0.32 ± 0.11 ^c	28.33 ± 8.96	141.89 ± 74.23

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

高脂饲料(含100 g/L猪油)和酒精水(含150 mL/L乙醇), 每周1次后肢sc 400 g/L CCl₄色拉油溶液(首次剂量5 mg/kg, 以后为3 mg/kg).

1.2.2 给药及取材方法 造模同时, 空白对照组, 模型对照组给予注射用生理盐水8 mL/(kg·d), ig; 华夏小葱低、中、高剂量组分别给予华夏小葱制剂0.06 g/(kg·d), 0.12 g/(kg·d), 0.24 g/(kg·d), ig; 东宝肝泰片组给予东宝肝泰混悬液0.70 g/(kg·d), ig. 连续给药 8 wk后, 大鼠禁食16 h, 称重, 以30 g/L戊巴比妥钠溶液40 mg/kg ip后, 心脏采血, 抽取血样置于含有抗凝液的离心管中, 离心后收集上清液, -20℃保存备用. 摘取大鼠肝脏并称重, 观察大体外观后, 取肝左叶作组织病理学检查; 取肝右叶, 制成100 g/L的肝组织匀浆. 甘油三酯(TG), 总胆固醇(TC), 总蛋白(TP), 清蛋白(ALB), 球蛋白(GLO), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)均用全自动生化分析仪测定.

1.2.3 HE标本的制备 取肝脏, 将肝组织用4℃生理盐水冲洗, 在肝脏最大叶距边缘5 mm处取小块肝组织, 40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜下观察.

1.2.4 透射电镜标本制备 取肝组织块切成约1 cm³后, 用25 mL/L戊二醛前固定, 10 mL/L锇酸后固定, 漂洗, 逐级脱水、浸透、固化, 制成超薄切片后, 电镜下观察肝脏细胞的脂肪变性情况.

统计学处理 各组数据以mean ± SD表示, 用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析(One way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有显著性意义.

2 结果

2.1 PCAL对脂肪肝大鼠血浆TC、TG、HDL-C、LDL-C的影响 模型对照组大鼠血浆TC, TG和LDL值显著高于空白对照组($P < 0.01$),

HDL值显著低于空白对照组($P < 0.01$), 各治疗组均可降低TC、TG和LDL的值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提高HDL的值($P < 0.05$, 表1).

2.2 PCAL对脂肪肝大鼠血浆ALT(GPT)及AST(GOT)的影响 模型对照组大鼠肝脏组织ALT、AST值与空白对照组相比显著升高($P < 0.05$); PCAL低、中、高剂量组及东宝肝泰片组与模型对照组相比, 无统计学差异(表1).

2.3 PCAL对脂肪肝大鼠血浆TP、ALB、GLO、A/G的影响 模型对照组大鼠血浆TP, ALB值与空白对照组相有显著差异($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 华夏小葱制剂高剂量组有升高白蛋白的作用($P < 0.05$, 表2).

2.4 HE结果 空白对照组肝小叶结构完整, 肝细胞未见明显变性(图1A); 模型对照组肝脏小叶结构消失, 中度至中度脂肪变, 肝细胞变大, 肿胀, 大小不均, 病变以中央静脉周围最为明显(图1B); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组肝脏病变有不同程度的改善, 轻度至重度脂肪变为主, 肝细胞形态大致正常, 大小较一致, 肝内脂肪滴减少, 炎性细胞浸润轻(图1C-F).

2.5 电镜结果 空白对照组肝小叶结构完整, 肝细胞未见明显变性(图2A); 模型对照组出现严重的脂肪变性, 脂滴大小不一, 有肝纤维化现象(图2B); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组脂滴有不同程度的减轻, 肝纤维化现象有减轻现象(图2C-F).

3 讨论

脂肪肝在中医学中无相应病名, 依临床表现可将其归于“痰浊”、“湿阻”、“胀满”、“积症”、“胁痛”等范畴. 多数医家认为脂肪肝是由于过食肥甘厚味或情志失调或久病体虚引起肝失疏泄、脾失健运、肾精亏损、湿邪、痰浊、瘀血等病理因素淤积于肝所致^[17-18].

创新盘点
本实验首次证明采用现代加工方法由鲜葱白精制而成的华夏小葱制剂对高脂、酒精及sc小剂量四氯化碳引起的脂肪肝具有防治作用, 并结合了祖国中医理论的宝贵经验, 充分体现了中草药在防治脂肪肝上的优势.

应用要点
本研究证实华夏小葱制剂可通过降低TC、TG和LDL-C,并升高HDL-C和ALB的含量来保护肝脏.由于已获国家专利具有较好的临床应用前景.

表 2 PCAL对脂肪肝大鼠血浆TP、ALB、GLO、A/G的影响(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	TP(g/L)	ALB(g/L)	GLO(g/L)	A/G
空白对照组	62.56 \pm 4.11	37.32 \pm 3.00	27.24 \pm 2.71	1.31 \pm 0.16
模型对照组	58.33 \pm 1.52 ^b	34.55 \pm 0.99 ^b	24.78 \pm 1.16	1.40 \pm 0.78
PCAL低剂量组	62.24 \pm 6.04	35.73 \pm 1.48	26.08 \pm 1.79	1.40 \pm 0.12
PCAL中剂量组	61.76 \pm 4.20	36.30 \pm 1.97	25.86 \pm 1.15	1.43 \pm 0.10
PCAL高剂量组	63.22 \pm 4.09	36.36 \pm 1.33 ^c	27.86 \pm 2.79	1.37 \pm 0.11
东宝肝泰片组	61.91 \pm 5.01	35.53 \pm 1.92	25.98 \pm 1.46	1.42 \pm 0.07

^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型对照组.

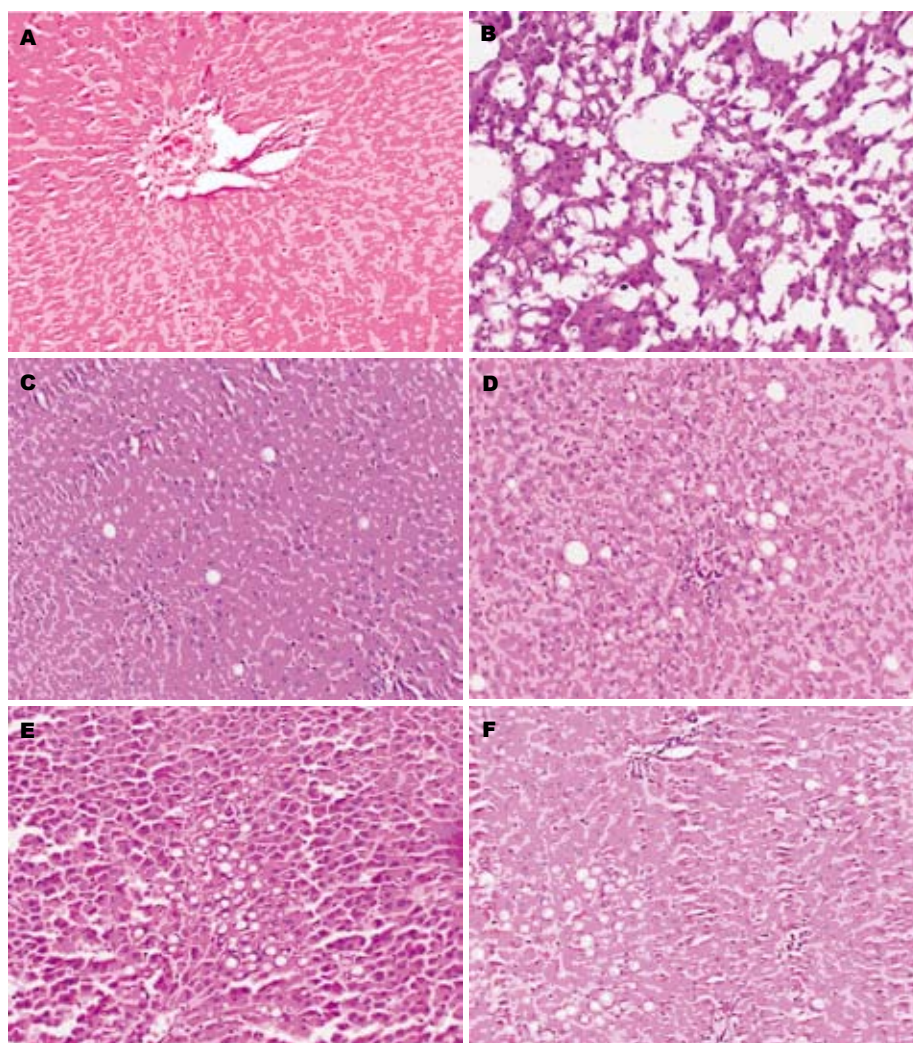


图 1 HE染色结果($\times 100$). A: 空白组: 正常肝组织; B: 模型组: 变性严重; C: 低剂量组: 少许脂滴; D: 中剂量组: 脂变程度减轻; E: 高剂量组: 脂变程度减轻; F: 阳性药物组: 少许空泡, 脂肪变性.

中医学认为, 辛包含芳香辟秽, 芳香化湿, 芳香开窍等作用, 有发散、行气、行血之功效. 因此我们选用具有性味辛温, 通阳利尿作用的华夏小葱制剂为研究对象, 旨在阳气一通、津液得化、瘀血得除, 进而找到一种有效的抗脂肪肝新药.

我们采用高脂饮食及酒精水喂养, 并结合每周1次行后肢sc小剂量四氯化碳色拉油溶液

的方法成功建立大鼠脂肪肝模型, 符合脂肪肝发病的一般规律. 从大鼠肝组织形态学方面进行观察, 结果表明: 模型对照组大鼠肝组织和空白对照组相比有炎性细胞浸润, 脂肪变性严重, 说明造模成功; 华夏小葱制剂低、中、高剂量组及东宝肝泰片组和模型对照组相比有不同程度的减轻炎性细胞浸润及减少脂滴现象, 由此可推测华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠具有良

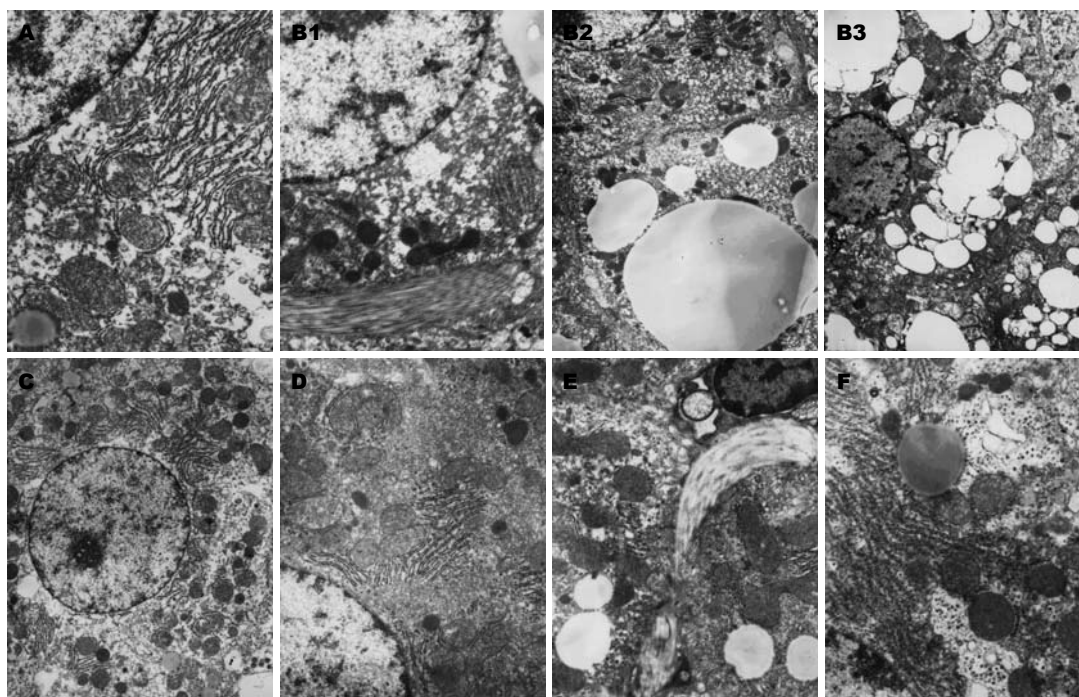


图 2 电镜结果. A: 空白对照组($\times 10\ 000$ 倍); B1: 模型组: 纤维($\times 10\ 000$ 倍); B2: 模型组: 脂滴($\times 4000$ 倍); B3: 模型组: 大小不一的脂滴特多, 脂肪肝非常严重($\times 4000$ 倍); C: 低剂量组: 基本恢复正常($\times 4000$ 倍); D: 中剂量组: 基本恢复正常($\times 4000$ 倍); E: 高剂量组: 肝细胞与肝细胞之间间质少量纤维, 但界限模糊($\times 10\ 000$ 倍); F: 阳性对照组: 带少许脂滴($\times 4000$ 倍).

同行评价
本文探讨了华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠脂质代谢和组织形态学的影响, 结果表明华夏小葱制剂在动物模型可防治脂肪肝, 研究方法有一定特色, 实验对照设计合理可靠, 统计学处理方法恰当, 结果较明确, 实验论据充足, 有一定的参考价值.

好的防治作用, 进而我们进行了脂质代谢的检测, 因为机体脂类代谢失调是诱发脂肪肝的重要因素. 肝脏作为能量代谢的中枢器官, 在脂类代谢中起着十分重要的作用. 肝细胞内的脂质总是处于动态平衡状态. 肝脏脂质代谢稳态的变化是构成各种形式脂肪肝的基础, 而肝脏脂质代谢又是受许多相关蛋白的调控和影响. 脂类代谢分为内源性和外源性两种途径, TC、TG的测定可直接反应血浆中脂质的水平, LDL-C是转运肝脏合成的内源性胆固醇的重要形式; HDL-C一方面使内源性TC进入LDL-C, 另一方面HDL-C在TG代谢中起着不可替代的作用. 有研究表明, 脂肪肝患者LDL明显升高, HDL明显下降, 因此, TC, TG, HDL-C, LDL-C的测定可作为脂肪肝的有效检测指标. 模型对照组大鼠血浆TC, TG, LDL-C与空白对照组相比均显著升高($P<0.01$), HDL-C值和空白对照组相比均显著降低($P<0.01$); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组与模型对照组相比TC, TG, LDL-C值均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), HDL-C和模型对照组相比显著升高($P<0.05$), 表明造模后脂肪肝大鼠体内脂质蓄积过多, 防治给药后, 华夏小葱制剂能显著降低大鼠体内血浆脂质水平.

肝脏是人体含酶最丰富的器官, 酶蛋白含量约占肝总蛋白含量的2/3. 有些酶具有一定的

组织特异性, 根据酶活性的测定可用于诊断肝胆疾病, 如存于肝细胞内的ALT和AST. ALT和AST是非特异性细胞内功能酶, 正常时血清含量很低, 当肝脏细胞受损伤时, 肝细胞膜的通透性亢进时, 其活性迅速增加. ALT主要存在于肝细胞浆中, 只要有1%的肝细胞坏死, 即可使血清中的ALT增加1倍, 所以是最敏感的肝功能检测指标之一. AST在肝脏中含量较高, 他有两种同工酶: ASTs和ASTm. ASTs定位于肝细胞浆中, ASTm定位于肝细胞的线粒体中. 当大量肝细胞坏死时, 线粒体中的ASTm也释放出来, 血中AST明显升高, 他也可作为肝功能指标之一. ALT, AST增高情况可反映出肝脏组织损害和坏死程度^[19-20]. 在本实验测定中, 模型对照组大鼠血浆ALT(GPT)、AST(GOT)和空白对照组相比均显著升高($P<0.01$), 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组值与模型对照组相比, 无统计学差异, 说明华夏小葱制剂对肝脏无损伤作用. 对脂肪肝大鼠蛋白质代谢功能的检测是因为肝细胞的有无损伤及其损伤程度可以通过血浆蛋白含量检测而获知. 肝脏参与了蛋白质的合成代谢与分解代谢肝脏, 可合成除 γ 球蛋白外的大部分血浆蛋白如清蛋白、脂蛋白及各种转运蛋白, 当肝细胞受损时, 这些血浆蛋白质合成减少, 表现为多种临床疾病, 如低清蛋白血症. 经全自动

生化分析仪检测分析, 可得知: 模型对照组大鼠肝脏组织TP、ALB值与空白对照组相比显著降低($P<0.01$), 华夏小葱制剂高剂量组与模型对照组相比清蛋白值显著升高($P<0.05$), 说明造模后肝细胞损害影响总蛋白与清蛋白合成, 防治给药华夏小葱制剂高剂量组清蛋白含量上升, 推测华夏小葱制剂可能有免疫调节的作用。

华夏小葱制剂是我院用鲜葱白提取物精制而成的中药口服液, 已申请了国家专利。本实验探讨了华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠脂质代谢和组织形态学的影响实验研究, 不论是病理学表现, 还是生化检验结果, 都较模型对照组有显著改善, 表明华夏小葱制剂在防治脂肪肝的同时还具有降低血脂的作用, 尤为值得一提的是, 与华夏小葱制剂对肝脏无毒性, 可能具有免疫调节的作用, 这为华夏小葱制剂的进一步开发提供了新的思路。

4 参考文献

- 1 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. 世界华人消化杂志 1999; 7: 75-76
- 2 陆付耳, 董慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹欣. 中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1569-1599
- 3 Youssef W, McCullough AJ. Diabetes mellitus, obesity, and hepatic steatosis. *Semin Gastrointest Dis* 2002; 13: 17-30
- 4 曾民德. 脂肪肝. 中华消化杂志 1999; 19: 120-122
- 5 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 6 Tsutsumi And M, Takase S. Effect of fenofibrate on fatty liver in rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 75S-79S
- 7 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644
- 8 Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787
- 9 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001; 8: 6-103
- 10 陈文慧, 刘虹, 林青, 张超. 中医药治疗脂肪肝近况. 云南中医学院报 2000; 23: 31-34
- 11 杨少军, 郑昱, 陈开兵. 中医药治疗脂肪肝的现状分析. 甘肃中医学院学报 2002; 2: 106-107
- 12 白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利. 中药汤剂联合UDCA治疗非酒精性脂肪肝. 世界华人消化杂志 2005; 13: 682-685
- 13 张介眉, 时绍红, 郝建军, 郝飞虹. 博心通对饲高脂家兔抗氧化损伤、改善内皮功能作用的实验研究. 中医杂志 2006; 2: 142-143
- 14 郑琼莉, 喻荣辉, 祝伟, 李佐民, 戴榕, 吴晓芬, 张介眉. 射心通胶囊抗球囊损伤术后再狭窄作用的实验研究. 中西医结合心脑血管病杂志 2005; 6: 510-511
- 15 郑琼莉, 张介眉, 喻荣辉, 贺立群, 柯于鹤. 射心通胶囊治疗冠心病心绞痛临床研究. 中国医药学报 2003; 18: 149-151
- 16 孙要武, 何宝国, 吴嘉慧, 李省三. 大鼠脂肪肝实验模型的建立. 齐齐哈尔医学院学报 2005; 26: 361
- 17 潘金友, 张爽秋. 疏肝化瘀为主治疗脂肪肝. 辽宁中医杂志 2001; 28: 3
- 18 张元奎. 乙肝相关脂肪肝的诊断与治疗. 实用中西医结合杂志 1998; 11: 23
- 19 林小日, 王昱. 脂肪肝的诊治与食疗. 广州: 广东科技出版社, 2003: 25
- 20 叶传蕙. 诊断学基础. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 224-225

编辑 王晓瑜 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。

四氯化碳诱发大鼠肝纤维化自发逆转中库普弗细胞与星状细胞的分布

金英姬, 金仁顺, 朴东明

金英姬, 金仁顺, 朴东明, 延边大学附属医院病理科 吉林省延吉市 133000
通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院病理科. pdm1117@hotmail.com
电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610
收稿日期: 2007-02-02 修回日期: 2007-07-02

Distribution of kupffer and hepatic stellate cells during spontaneous reversible carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

Ying-Ji Jin, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao

Ying-Ji Jin, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, 1327 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm1117@hotmail.com
Received: 2007-02-02 Revised: 2007-07-02

Abstract

AIM: To investigate the distribution and significance of kupffer cells (KCs) and hepatic stellate cells (HSCs) during spontaneous reversible carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Rat liver fibrosis was induced by peritoneal injection of CCl₄ (500 mL/L) for 8 weeks. Serum activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), total protein (TP) content, ratio of liver/body weight, and area density of collagenous fiber were examined 8 and 12 weeks after injection. Meanwhile, the pathological changes in the liver were observed by light microscopy after Hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of ED1 and α -smooth muscle actin (α -SMA) was detected by immunohistochemical streptavidin-peroxidase-biotin (SP) method.

RESULTS: Compared with the control group,

the levels of ALT (2568.18 ± 630.46 nkat/L vs 472.26 ± 167.37 nkat/L, $P < 0.05$) and AST (5845.84 ± 1353.27 nkat/L vs 1698.51 ± 663.30 nkat/L, $P < 0.01$), ratio of liver/body weight (3.900 ± 0.850 vs 2.560 ± 0.240 , $P < 0.001$), and area of collagenous fiber (5.867 ± 1.127 vs 0.518 ± 0.2995 , $P < 0.001$) were significantly increased 8 wk after injection of CCl₄. Diffuse cirrhosis was observed in most rats, and ED1- and α -SMA-positive cells were prominently aggregated in the fibrotic tissue and septa. Compared with that at 8 wk, ALT (1020.70 ± 306.73 nkat/L vs 376.74 ± 304.06 nkat/L, $P < 0.05$) level was still higher 12 wk after injection, but the area of collagenous fiber had decreased, fibrous septa became thinner, discontinuous and understained, the number of ED1-positive cells was reduced, and α -SMA-positive cells had disappeared.

CONCLUSION: CCl₄ induced obvious liver dysfunction and diffuse cirrhosis in rats, and KCs are closely associated with the activation of HSCs. Rat liver fibrosis is reversible 4 wk after stopping CCl₄ injection.

Key Words: Carbon tetrachloride; Kupffer cells; Liver fibrosis; Reversible

Jin YJ, Jin RS, Piao DM. Distribution of kupffer and hepatic stellate cells during spontaneous reversible carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2453-2457

摘要

目的: 探讨四氯化碳(CCl₄)诱发大鼠肝纤维化自发逆转过程中肝库普弗细胞与星状细胞的分布和意义。

方法: 500 mL/L CCl₄腹腔注射8 wk诱发大鼠肝纤维化模型, 实验第8, 12周末检测血清生化指标, 观察肝组织的病理变化, 采用免疫组化SP法观察单核巨噬细胞抗原(ED1), α -平滑肌动蛋白(α -SMA)阳性表达的肝库普弗细胞(kupffer cell, KC)和肝星状细胞(hepatic stellate

背景资料

肝纤维化形成的中心环节是肝细胞损伤或坏死后激活KC, KC活化后分泌多种细胞因子再激活HSC, HSC转化为成纤维样细胞或肌纤维细胞, 活化的HSC是生成ECM的主要细胞。目前认为肝纤维化可发生逆转, 自发逆转现象在肝纤维化模型动物中具有较大的普遍性, 其中CCl₄诱发大鼠肝纤维化的自发逆转的研究较多, 但其自发逆转的机制尚不清楚, 因此进一步深入研究肝纤维化的自发逆转对防治肝纤维化有重要意义。

相关报道
一般认为早期肝硬化可能逆转,而晚期肝硬化逆转的可能性不大,目前认为自发逆转现象在肝纤维化模型中具有一定的普遍性。

cells, HSC)的分布。

结果:第8周末模型组大鼠与对照组比较,血清ALT和AST活性(568.18 ± 630.46 nkat/L vs 472.26 ± 167.37 nkat/L, $P < 0.05$; 5845.84 ± 1353.27 nkat/L vs 1698.51 ± 663.30 nkat/L, $P < 0.01$),肝/体质比(3.90 ± 0.85 vs 2.56 ± 0.24 , $P < 0.001$)及胶原纤维面密度(5.87 ± 1.13 vs 0.52 ± 0.30 , $P < 0.001$)明显增高;大量ED1和 α -SMA阳性的KC和HSC主要分布在汇管区增生的纤维组织及纤维间隔内。第12周末模型组与第8周比较大鼠血清ALT活性(1020.70 ± 306.73 nkat/L vs 376.74 ± 304.06 nkat/L, $P < 0.05$)仍较高外,胶原纤维面密度减少,汇管区增生的纤维组织及纤维间隔内ED1阳性的KC减少, α -SMA阳性的HSC消失。

结论:腹腔注射CCl₄ 8 wk后大鼠肝功能明显损伤,形成肝硬化, KCs激活和HSCs活化相关,停止注射CCl₄ 4 wk后大鼠肝纤维化发生自发逆转。

关键词:四氯化碳;库普弗细胞;肝纤维化;可逆性

金英姬, 金仁顺, 朴东明. 四氯化碳诱发大鼠肝纤维化自发逆转中库普弗细胞与星状细胞的分布. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2453-2457

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2453.asp>

0 引言

长期以来人们对肝纤维化、肝硬化能否发生逆转存在着争议,著名的肝病学家Rogking对肝纤维化、肝硬化进行了深入的研究后提出了典型发展的肝纤维化、肝硬化可以逆转的结论^[1].近年来随着肝纤维化研究的不断深入,对其可逆性的认识也进一步提高,肝纤维化可逆性的临床和动物实验研究日益增多.本实验利用四氯化碳(CCl₄)制备肝纤维化的动物模型,观察其在自发逆转过程中ED-1和 α -SMA的表达,探讨CCl₄诱发大鼠肝纤维化的可逆性。

1 材料和方法

1.1 材料 SD δ 大鼠(清洁级), 体质量160-180 g, 由延边大学医学院动物科提供; CCl₄、直接红(direct red 80)购自Sigma公司(Aldrich Chemical Co, USA); 血清ALT, AST及TP(总蛋白)检测试剂购自Eiken Chemical公司(Tokyo, Japan); 免疫组化ED1 mAb购自Serotec公司(Oxford, England), α -SMA mAb购自Dako公司(Glostrup, Denmark)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 实验1: 将16只动物随机分为2组, 正常组($n = 6$): 橄榄油1 mL/kg, 2次/wk, ip共8 wk; 模型组($n = 10$): 500 mL/L CCl₄(橄榄油稀释)1 mL/kg, 2次/wk, ip共8 wk, 第8周末用乙醚麻醉大鼠, 心脏采血离心处理, 处死动物后立即取肝脏. 实验2: 正常组($n = 6$): 橄榄油ip同实验1. 模型组($n = 10$): 500 mL/L CCl₄ ip同实验1, 第9周开始停止注射橄榄油和CCl₄, 第12周末用乙醚麻醉大鼠, 心脏采血离心处理, 处死动物后立即取肝脏。

1.2.2 血清生化检测 血清AST和ALT测定采用Reiman-Frankel氏方法, TP采用Biuret法, 严格按Kit说明书进行操作, 利用分光光度计(Ultaspec 4050, LKB, Switzerland)在490 nm测定光密度, 对照标准曲线得出结果。

1.2.3 病理学检查 大鼠肝/体质比: 处死前测量动物的体质量, 采血后立即取肝脏称质量, 计算肝/体质量百分比. 病理学观察: 称质量后于肝左叶相同部位取2块组织, 经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片作HE染色观察肝组织病理变化, 直接红染色(1 g/L直接红picric acid饱和液)观察纤维组织的增生程度. 胶原纤维的定量分析: 直接红染色后的切片, 利用CMIAS真彩色病理图象分析系统(北京航空航天大学)进行胶原纤维的定量分析. 观察条件: 物镜4倍, 每张切片随机选2个视野, 图象采集、分割处理, 参数统计分析, 得出目标总面积/统计场总面积之比值. 免疫组织化学染色: 切片厚4-5 μ m, 常规脱蜡至水, 采用SP法进行免疫组织化学染色, ED1工作浓度为1:100, α -SMA工作浓度为1:50。

统计学处理 数据均用mean \pm SD表示, 两样本均数的比较用 t 检验。

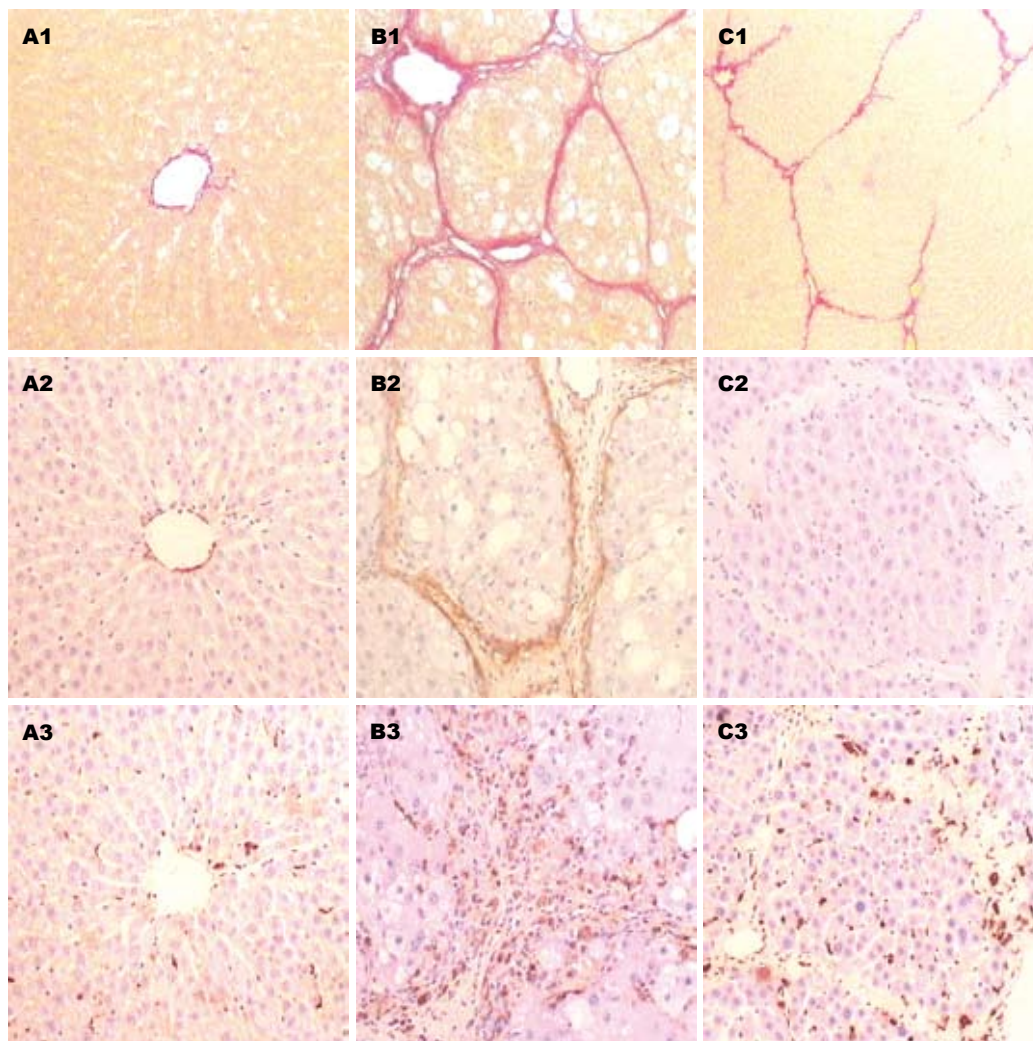
2 结果

实验过程实验1模型组大鼠死亡3只, 实验2模型组死亡2只。

2.1 大鼠肝/体质量比、胶原纤维面密度和血清生化指标的检测结果 实验1模型组因大鼠肝细胞弥漫性脂肪变性, 肝脏体积增大, 与正常组比较肝/体质量比和胶原纤维面密度明显增高($P < 0.001$), 血清ALT和AST明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), TP含量下降, 但无统计学意义. 实验2模型组大鼠肝细胞脂肪变性消失, 肝/体质量比与正常组相似, 胶原纤维面密度虽然增高($P < 0.05$), 但与实验1中毒组比较明显下降, 血清生化指标除ALT($P < 0.05$)仍较高外, 其他指标与正常组相

表 1 实验大鼠各项指标的检测结果

分组	<i>n</i>	肝/体质量比(%)	面密度(%)	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	TP(g/L)
实验1 正常组	6	2.56 ± 0.24	0.52 ± 0.30	472.26 ± 167.37	1698.51 ± 663.30	7.53 ± 0.56
实验1 模型组	10(3)	3.90 ± 0.85 ^b	5.87 ± 1.13 ^b	2568.18 ± 630.46 ^a	5845.84 ± 1353.27 ^b	6.49 ± 0.51
实验2 正常组	6	2.58 ± 0.21	0.65 ± 0.34	376.74 ± 304.06	2842.74 ± 1205.07	7.21 ± 1.19
实验2 模型组	10(2)	2.68 ± 0.66	3.58 ± 0.69 ^c	1020.70 ± 306.73 ^c	2890.24 ± 434.25	6.34 ± 0.42

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 实验1正常组; ^c*P*<0.05 vs 实验2正常组。图 1 肝组织染色结果(×100). A: 正常组; B: 实验1模型组; C: 实验2模型组. 1: 直接红染色; 2: α -SMA免疫组化染色; 3: EDI免疫组化染色。

似(表1)。

2.2 肝组织的病理学变化 正常组肝小叶结构正常, 肝细胞无变性、坏死, 无纤维组织增生(图1-A1)。实验1模型组肝小叶结构破坏, 肝细胞明显肿胀, 胞质内可见弥漫性、大小不等的脂肪空泡, 可见点状、灶状坏死, 伴大量炎症细胞浸润; 汇管区大量纤维组织增生, 粗大的纤维间隔伸入肝组织内, 形成弥漫性、大小不等的假小

叶(图1-B1)。实验2模型组肝小叶结构紊乱, 肝细胞脂肪变性消失, 偶见点状坏死, 炎症细胞明显减少; 汇管区纤维组织减少, 纤维间隔变细、不连续, 染色变淡, 与实验1模型组比较肝纤维化明显减轻(图1-C1)。

2.3 免疫组化染色结果 正常组 α -SMA在汇管区的各种血管壁上阳性表达, 肝小叶中央静脉壁有少量阳性表达, 肝实质内无阳性表达(图1-A2)。

创新盘点
利用ED-1和 α -SMA抗体观察CCl₄诱发大鼠肝纤维化自发逆转过程中KC和HSC表达和分布的研究尚少。本组结果表明ip CCl₄ 8 wk后模型组大鼠形成弥漫性肝硬化, KCs与激活和活化HSCs密切相关。停止CCl₄注射4 wk后模型组大鼠肝硬化自发逆转, ED阳性细胞数量明显减少, α -SMA阳性细胞消失。

同行评价
本文采用四氯化碳诱发大鼠肝纤维化模型,探讨了自发逆转过程中库普弗细胞与星状细胞的分布,为进一步认识肝纤维化的可逆性提供了实验基础,有一定的参考价值。

实验1模型组 α -SMA阳性表达的HSCs主要分布在汇管区增生的纤维组织及纤维间隔的边缘(图1-B2),实验2模型组汇管区增生的纤维组织及纤维间隔内 α -SMA阳性的HSC消失(图1-C2)。正常组ED1阳性表达的KC在汇管区、肝小叶中央静脉周围和肝实质内散在分布(图1-A3),实验1模型组ED1阳性的KC细胞在汇管区增生的纤维组织及间隔内大量分布(图1-B3),肝实质内较多散在分布,实验2模型组ED1阳性的KC数量明显减少(图1-C3),肝实质内少量散在分布。

3 讨论

肝纤维化及其终末期疾病肝硬化是主要的世界健康问题,迄今为止晚期肝硬化治疗的唯一有效方法是肝脏移植^[2]。在过去的几十年围绕着肝纤维化、肝硬化能否发生逆转一直有争议。近年来随着分子生物学技术的发展,国内外对肝纤维化的发生机制进行了广泛、深入的研究,逐步改变了肝纤维化不可逆转的观点,提出了肝纤维化可逆转和从肝硬化恢复也是可能的结论^[3]。CCl₄是诱导大鼠肝纤维化模型的最经典和广泛应用的肝毒性物质,该模型在肝纤维发生相关的组织学、生物化学、细胞和分子改变等方面具有最好的特性^[4-5],CCl₄ ip造模结果优于sc造模^[6],sc造模结果优于人血白蛋白造模结果^[7],该模型在形态学及病理生理学的某些方面与人的慢性肝病肝纤维化进展为肝硬化相似。

一般认为早期肝硬化可能逆转,而晚期肝硬化逆转的可能性不大^[8]。目前认为自发逆转现象在肝纤维化模型动物中具有较大的普遍性。Iredale *et al*^[9]报道,经ip CCl₄(2次/wk) 4 wk可诱发大鼠肝纤维化,停止毒剂注射后d 0, 3, 7, 28测定肝组织羟脯氨酸含量,同时作肝组织学检查,可见纤维间隔逐渐变细、不连续,d 28时几乎完全消退。本实验在停止CCl₄注射d 28后肝纤维化虽自发逆转,但尚未完全消退,主要是与造模时间长(8 wk),肝纤维化程度重有关。肝纤维化形成的中心通路是肝细胞损伤或坏死的刺激激活KC, KC活化后分泌多种细胞因子再激活HSC, HSC转化为成纤维样细胞或肌纤维细胞活化的HSC是ECM生成的主要细胞,他可表达 α -SMA和Desmin。Noyan *et al*^[10]认为免疫组织化学 α -SMA结果比Desmin提供更好的资料,目前 α -SMA抗体广泛用于肝纤维化的病理学研究中。研究表明在肝脏受损伤而发生肝纤维化的过程中HSC的分裂和凋亡都增加,在肝纤维化的进展

过程中HSC的增生占优势,而在恢复过程中其凋亡占优势。最近的研究证实,细胞外基质的降解导致了HSC的凋亡,而不是HSC的凋亡引起细胞外基质的降解。

本组结果表明ip CCl₄第8周末模型组大鼠肝功能明显受损伤,血清ALT, AST活性明显升高,肝/体质量比、胶原纤维面密度明显增加,汇管区大量纤维组织增生,较粗的纤维间隔伸入肝组织内,形成大小不等的假小叶,大部分动物形成弥漫性肝硬化。免疫组化结果表明模型组大量KC及HSC主要分布在汇管区增生的纤维组织及纤维间隔内,表明KC与活化HSC密切相关。停止CCl₄攻击4 wk后模型组大鼠肝功能除了血清ALT活性仍较高外其他生化指标和肝/体质比与正常组相似,胶原纤维面密度较实验1模型组明显下降,汇管区纤维组织减少,纤维间隔变细、不连续、染色淡,表明停止CCl₄攻击4 wk后大鼠肝纤维化自发逆转。ED1 mAb可识别全部单核巨噬细胞系统的细胞,ED1阳性细胞包括几乎全部的肝KC, KC主要位于门脉血管和中央静脉周围。实验研究已证实CCl₄和猪血清诱发的大鼠肝纤维化中ED1阳性细胞显著增加,主要位于增生的纤维间隔部位^[11-13]。本实验免疫组化结果表明,第8周末模型组大量ED1和 α -SMA阳性细胞主要在汇管区增生的纤维组织及纤维间隔内分布,两种阳性细胞分布部位相同,表明KC与HSC活化密切相关。停止CCl₄攻击4 wk后模型组增生的纤维组织及纤维间隔内ED阳性细胞数量明显减少, α -SMA阳性细胞消失,表明消除诱发性物质CCl₄后,经过4 wk后已形成的大鼠肝纤维化发生自发逆转。活化的 α -SMA阳性HSC主要通过凋亡机制,使其数量减少和消失是肝纤维化自发逆转的主要机制之一^[14]。肝纤维化的程度取决于HSC增生和活化,因此抑制HSC活化是阻断肝纤维化的一种主要的途径^[15]。近年的研究表明停止注射CCl₄后第7天TGF- β 1水平明显下降,其下降与逆转中HSC通过Fas依赖途径发生凋亡有关^[16],最近的研究表明Verapamil通过减少TGF- β 1表达,阻断HSC活化而延缓肝纤维化的形成^[17]。

4 参考文献

- 1 陈毓文, 陈重阳. 肝纤维化的可逆性与疾病的转归. 华夏医学 2005; 18: 144-145
- 2 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443-446
- 3 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939
- 4 Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW.

- Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 56-65
- 5 Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005; 117: 237-250
- 6 吕鹏. 四氯化碳腹腔注射制备肝纤维化模型的实验研究. *胃肠病学和肝脏病学杂志* 2003; 12: 339-340
- 7 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 陈晓斌, 陈陵. 人血蛋白及四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化模型对比分析. *四川医学* 2001; 22: 1108-1109
- 8 Lee HS, Huang GT, Chen CH, Chiou LL, Lee CC, Yang PM, Chen DS, Sheu JC. Less reversal of liver fibrosis after prolonged carbon tetrachloride injection. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1312-1315
- 9 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
- 10 Noyan S, Cavusoglu I, Minbay FZ. The effect of vitamin A on CCl₄-induced hepatic injuries in rats: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Histochem* 2006; 107: 421-434
- 11 Orfila C, Lepert JC, Alric L, Carrera G, Beraud M, Vinel JP, Pipy B. Expression of TNF-alpha and immunohistochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Histochem J* 1999; 31: 677-685
- 12 Armbrust T, Ramadori G. Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. *J Hepatol* 1996; 25: 518-528
- 13 Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 1996; 23: 811-817
- 14 王萍, 刘海林. 肝纤维化自发逆转过程中肝星状细胞上p75的表达. *中国临床保健杂志* 2005; 8: 148-149
- 15 Lee KS. Hepatic fibrogenesis. *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 297-305
- 16 朱纲, 刘海林, 黄欣. 实验性四氯化碳诱致的大鼠肝纤维化自发逆转的研究. *上海医学* 2006; 29: 741-743
- 17 Xu D, Wu Y, Liao ZX, Wang H. Protective effect of verapamil on multiple hepatotoxic factors-induced liver fibrosis in rats. *Pharmacol Res* 2007; 55: 280-286

编辑 张焕兰 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

本刊讯 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作, 为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持, 提高我国肝移植的技术水平, 推动肝移植的健康发展, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与《世界华人消化杂志》合作举办“原位肝肝移植新技术及进展”学习班, 由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持, 并邀请海内外肝移植知名专家授课, 就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座。

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位。目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平。本中心已举办3期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术。本项目为2007年国家级继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予 I 类学分14分。授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙肝病毒治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面。学习对象为省级、地市级医院的医护人员。收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

通讯地址: 510630, 广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心。联系人: 汪根树 电话: 020-87595523 传真: 020-87595523 E-mail: chengying_827@163.com。

内镜下高频电凝治疗胃窦粗大皱襞162例

程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波, 宋潇逸, 伏爱国, 杨云

背景资料
目前发现在进行胃镜检查时, 经常会发现胃窦部小弯侧存在一或数条纵行皱襞, 并发现这些患者较普遍存在进食后较长时间的上腹胀和/或隐痛, 经病理证实是一种与炎症有关的病变, 是慢性胃炎反复发作后形成的, 药物治疗难以奏效。所以本文尝试用内镜下高频电凝治疗这些病变。

程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波, 宋潇逸, 伏爱国, 杨云, 中国人民解放军251医院消化科 河北省张家口市 075000
通讯作者: 程秀莲, 075000, 河北省张家口市, 中国人民解放军251医院消化科. wangbx19560715@sina.com
收稿日期: 2006-12-15 修回日期: 2007-07-10

High frequency electric coagulation under endoscope for 162 cases of hypertrophic gastric folds in sinus ventriculi

Xiu-Lian Cheng, Bing-Xin Wang, Qing-Hua Ren, Bo Hao, Xiao-Yi Song, Ai-Guo Fu, Yun Yang

Xiu-Lian Cheng, Bing-Xin Wang, Qing-Hua Ren, Bo Hao, Xiao-Yi Song, Ai-Guo Fu, Yun Yang, Department of Digestion, Chinese PLA 251 Hospital, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Correspondence to: Xiu-Lian Cheng, Department of Digestion, Chinese PLA 251 Hospital Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China. wangbx19560715@sina.com
Received: 2006-12-15 Revised: 2007-07-10

Abstract

AIM: To explore the therapeutic effects of high-frequency electric coagulation under endoscope in patients with hypertrophic gastric folds (HGFs) in sinus ventriculi.

METHODS: HGFs were cauterized by electric coagulation hemostat or biopsy forceps.

RESULTS: In 162 patients treated one to three times with high-frequency electric coagulation, 139 (85.80%) showed clinical cure, 14 (8.64%) improvement, and 9 (5.48%) lack of efficacy; 119 (73.46%) showed HGF elimination, 23 (14.20%) HGF reduction, and 20 (12.35%) no improvement; 109 (67.28%) showed improvement of inflammation and 53 (32.72%) no improvement; 57 (35.63%) showed disappearance of heterophil granulocytes, 52 (32.10%) were ranked as first stage, 32 (19.75%) second stage, and 21 (12.96%) third stage.

CONCLUSION: HGFs may completely disappear, and clinical symptoms and inflammation can be significantly improved by high-frequency electric coagulation under endoscopy.

Key Words: Hypertrophic gastric folds; Gastros-copy; High frequency electric coagulation; Chronic reactive gastritis

Cheng XL, Wang BX, Ren QH, Hao B, Song XY, Fu AG, Yang Y. High frequency electric coagulation under endoscope for 162 cases of hypertrophic gastric folds in sinus ventriculi. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(22): 2458-2460

摘要

目的: 探讨内镜下高频电凝治疗胃窦部粗大皱襞的疗效。

方法: 用电凝止血器或热活检钳, 烧灼皱襞。

结果: 患者经内镜下1-3次高频电凝治疗, 临床表现治愈139例(85.80%), 好转14例(8.64%), 无效9例(5.48%)。内镜下复查粗大皱襞消失119例(73.46%), 好转23例(14.20%), 无效20例(12.35%); 内镜下炎症改善情况, 治愈0例; 好转109例(67.28%), 无效53例(32.72%); 慢性活动性胃炎中性粒细胞消失57例(35.63%), 1级52例(32.10%), 2级32例(19.75%), 3级21例(12.96%)。

结论: 通过对胃窦部粗大皱襞的内镜下治疗, 可以使粗大皱襞完全消失, 临床症状改善, 炎症明显改善。

关键词: 粗大皱襞; 胃镜; 高频电凝; 慢性活动性胃炎

程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波, 宋潇逸, 伏爱国, 杨云. 内镜下高频电凝治疗胃窦粗大皱襞162例. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2458-2460
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2458.asp>

0 引言

在胃镜检查中我们经常观察到胃窦部或幽门区出现一些纵行的粗大皱襞, 并对其进行了组织学、内镜及临床的追踪观察, 经常规的药物治疗, 临床症状、皱襞的形态, 组织学等均无明显改善, 但在内镜下用高频电凝灼除粗大皱襞162例, 却取得了较好的临床治疗效果, 现报告如下。

相关报道
关于胃部的粗大皱襞, 国内报道较少, 能在检索系统查到的关于胃粗大皱襞诊断或病因分析的文献不过数篇。关于胃窦部粗大皱襞治疗的文献国内几乎没有。

1 材料和方法

1.1 材料 纳入治疗的患者临床症状: 进食后上腹饱胀及上腹隐痛, 或伴有反酸、烧心、嗝气。胃镜检查: 胃窦幽门前区的粗大皱襞, 纵行条状、弧形、类圆形, 其中122例(75.31%)为1条, 16例(9.88%)为2条, 15例(9.26%)为3条, 9例(5.56%)4条, 均通向幽门。皱襞松弛脱入十二指肠球部151例(93.21%), 不同程度堵塞幽门口, 导致幽门狭窄。炎症: 所有患者均有不同程度的胃炎, 病理检查提示不同程度浅表性胃炎或不典型增生, 其中64例(39.51%)皱襞表面黏膜糜烂、充血, 10例(6.17%)伴十二指肠球部溃疡, 粗大皱襞表面伴糜烂者不典型增生40例(24.69%), 53例(32.72%)伴肠上皮化生, 24例(14.81%)病理结果为腺体数量减少。¹³C尿素呼气试验检测126例, 107例阳性, 阳性率为84.92%。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 胃镜检查胃窦部发现有粗大皱襞者。术前了解患者全身各脏器功能, 尤其是凝血功能, 如有凝血功能障碍, 应纠正后施术。术前10 min im山莨菪碱10 mg, 其他按胃镜检查常规操作进行。

1.2.2 内镜下治疗 治疗前多条皱襞通向幽门并堵塞(图1A, C)用电凝止血器或热活检钳, 先行烧灼脱入幽门和十二指肠球部的皱襞, 治疗后堵塞的幽门即可显示通畅(图1B, D)。胃窦部较短的粗大皱襞, 给予连续烧灼。较长的粗大皱襞或多条皱襞, 给予间断烧灼, 以免创面过大过多。4 wk后复查胃镜时, 再把剩余部分进行烧灼。胃或十二指肠溃疡患者先行治疗, 待溃疡愈合后再行治疗粗大皱襞。所有患者4 wk后复查胃镜, 粗大皱襞完全消失者, 治疗结束, 未完全消失者, 补充治疗, 将残余粗大皱襞再次进行烧灼治疗, 直至粗大皱襞完全消失。

1.2.3 术后处理 术后口服奥美拉唑20 mg 1/d共1 wk。出现明显上腹痛者, 可予静脉点滴奥美拉唑40 mg 1次/d。云南白药1 g, 3次/d, po 5 d。

1.2.4 观察指标 临床表现分为治愈: 临床症状完全消失; 好转: 临床症状好转或大部分消失; 无效: 临床症状无改变或加重。内镜表现分为治愈: 复查胃镜粗大皱襞完全消失; 好转: 粗大皱襞大部分消失; 无效: 粗大皱襞无改善或加重。内镜下炎症改善情况分为治愈: 炎症完全消失; 好转: 炎症较前减轻; 无效: 炎症无改善或加重。参照慢性胃炎研讨会共识意见^[1], 以慢性胃炎活动性炎症分级, 0级: 未见中性粒细胞浸润; 1级: 少量散



图1 A: 多条粗大皱襞通向幽门, 并堵塞幽门; B: 高频电凝治疗后粗大皱襞; C: 多条粗大皱襞堵塞幽门; D: 治疗后幽门口显现通畅。

在中性粒细胞浸润; 2级: 弥漫性中性粒细胞浸润; 3级: 大量或成堆中性粒细胞浸润。

2 结果

2.1 临床表现 经过内镜下1-3次高频电凝治疗, 按临床表现分级, 治愈: 139例(85.80%), 好转: 14例(8.64%), 无效: 临床症状无改变或加重9例, 占5.4%。

2.2 内镜下表现 粗大皱襞治愈119例(73.46%),

创新盘点
胃窦部粗大皱襞的发病率较高, 药物治疗无明显改善, 本文所进行的内镜下对粗大皱襞的治疗, 效果显著, 操作方法简便, 解决了这类患者药物治疗效果差, 反复发作并顽固不愈的难题。

应用要点
本文进行胃窦部粗大皱襞的研究, 是为了进一步探讨其病因、病理变化和更好的治疗方法以期改变胃窦粗大皱襞病程, 解除患者的病痛。

同行评价
本文介绍了内镜下高频电凝治疗胃粗大皱襞的疗效。内容新颖,层次清楚,有一定的临床和应用价值。

好转23例(14.20%),无效20例(12.35%)。内镜下炎症改善情况,治愈0例;好转109(67.28%)例,无效53例(32.72%)。

2.3 病理诊断慢性活动性胃炎改善情况 以慢性活动性炎症分级,0级57例,占35.63%;1级52例,占32.10%;2级32例,占19.75%;3级21例,占12.96%。

3 讨论

在胃镜检查过程中经常可以观察到胃窦部所发现的粗大皱襞,大多经幽门脱入十二指肠球部,造成幽门的部分堵塞,当胃蠕动时食物通过困难。患者多伴有消化不良症状,如上腹饱胀不适、食欲不振、上腹隐痛等,大部分患者以上腹饱胀为主,药物治疗无改善。内镜下对粗大皱襞活检病理均为浅表性胃炎,其病理基础可能由于局部炎症,血管通透性增加,炎症细胞及红细胞渗出,另外,由于炎症反复发作,使大量胶原纤维增生和细胞增生,局部组织隆起形成了粗大皱襞,或纤维收缩使黏膜呈条索状变形,经长期观察,皱襞形成后将长期存在,难以消失。随着炎症反复发作,不断增生、肠上皮化生,皱襞将会增大增粗,腺瘤样变或恶变。

基于这种粗大皱襞的长期存在,药物治疗效果不满意,粗大皱襞不消失,临床症状不改善。我们尝试用高频电凝治疗这些粗大皱襞,取得了较好的治疗效果。通过病理检查,我们发现这些粗大皱襞的病理基础为慢性炎症,而以往临床治疗的部分慢性胃炎效果也很差,可能与这些慢性胃炎存在类似粗大皱襞这些改变情况未引起足够的重视,致使慢性胃炎治疗问题一直没有得到解决。据报道^[2],高频电凝治疗可使组织发热,蛋白质凝固变性,气化,使黏膜组织收缩变小,局部组织重新修复变平,固定黏膜组织不再松弛脱入幽门或十二指肠球部,消除了粗大皱襞对幽门的堵塞。加之辅助治疗,使胃窦部的炎症状况得以改善。同时也改善这些患者的消化不良症状。通过对胃窦部粗大皱襞的内镜下治疗,可以使粗大皱襞完全消失,临床症状改善,炎症明显改善。避免了病变进一步发展以致于癌变,取得了较好的疗效,不失为一种治疗慢性胃炎及粗大皱襞的有效方法。

4 参考文献

- 1 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
- 2 沈德威, 石峰. 高频电内镜下治疗胃黏膜脱垂79例临床观察. 中国医师杂志 2001; 3: 764-765

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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].

少见急性肠梗阻的临床分析与策略

孙早喜, 崔海宁, 黄海溶, 王正文, 余壮明

孙早喜, 崔海宁, 王正文, 余壮明, 海南医学院附属医院 海南省海口市 570102

黄海溶, 海南医学院流行病学教研室 海南省海口市 571101

通讯作者: 孙早喜, 570102, 海南省海口市龙华路31号, 海南医学院附属医院. zaoxisun@tom.com

电话: 86-898-36339683/66773248

收稿日期: 2007-05-02 修回日期: 2007-07-19

Clinical analysis and strategy for unusual types of acute intestinal obstructions

Zao-Xi Sun, Hai-Ning Cui, Hai-Rong Huang, Zheng-Wen Wang, Zhuang-Ming Yu

Zao-Xi Sun, Hai-Ning Cui, Zheng-Wen Wang, Zhuang-Ming Yu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan Province, China

Hai-Rong Huang, Department of Epidemiology, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan Province, China
Correspondence to: Zao-Xi Sun, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Hainan Medical College, 31 Longhua Road, Haikou 570102, Hainan Province, China. zaoxisun@tom.com

Received: 2007-05-02 Revised: 2007-07-19

Abstract

AIM: To explore the clinical characteristics of unusual acute intestinal obstructions, and to improve early diagnosis and treatment in such cases.

METHODS: Patients with unusual acute intestinal obstructions were divided into three groups: children ($n = 31$), adolescents or adults ($n = 13$), and elderly ($n = 29$). The incidence and conditions, acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) score, operative rate, mortality, and cure rates of patients with unusual acute intestinal obstructions were analyzed retrospectively using SPSS12.0 statistical software.

RESULTS: There were 122 (94 male, 28 female) unusual cases among 338 patients with acute intestinal obstruction. Among the 31 children, 62 adolescents or adults, and 29 elderly patients, there were 13, 26 and 14, unusual intestinal obstructions, respectively. The visiting time of patients (2.3 ± 1.5 h, 60.0 ± 43.2 h, 84.0 ± 67.2 h,

$P = 0.000$); APACHE score (2.5 ± 1.8 , 5.5 ± 3.6 , 17.8 ± 5.8 , $P = 0.000$); and cure rates (100%, 95%, 79.3%, $P = 0.000$) in the children, adolescents or adults, and elderly groups, respectively, showed significant differences. The surgery and mortality rates were 65.6% and 8.0%, respectively.

CONCLUSION: The mortality rate for unusual acute intestinal obstructions is high because of the difficulty of making an early diagnosis and the resulting delay in instituting effective treatment. It is important to correctly evaluate the state of an illness and effectively treat unusual acute intestinal obstructions.

Key Words: Acute intestinal obstruction; Etiology; Mortality; Therapy; Diagnosis

Sun ZX, Cui HN, Huang HR, Wang ZW, Yu ZM. Clinical analysis and strategy for unusual types of acute intestinal obstructions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2461-2464

摘要

目的: 了解少见急性肠梗阻的临床特征, 为制订诊疗对策提供参考依据。

方法: 利用SPSS12.0统计软件包, 回顾性分析我院2002-01/2006-08少见急性肠梗阻(病因构成比 $<3.0\%$)发病情况及诊治情况, 病例分成3组: 儿童组(0岁-, 组), 青少年与成年组(14岁-, 组)和老年组(60岁-, 组)。

结果: 在338例急性肠梗阻病例中, 少见急性肠梗阻是122例(36.1%)。在少见急性肠梗阻中: 男94例(77.0%), 女28例(23.0%), 病因36种(急性肠梗阻总病因数是41种), 组 31例患者, 13种病因; 组 62例, 26种病因; 组 29例, 14种病因。组, , 患者就诊时间分别为: 2.3 ± 1.5 h, 60.0 ± 43.2 h和 84.0 ± 67.2 h, 有显著性差异($P = 0.000$); 组, , 患者急性生理和慢性健康评分(APACHE)分别为: 2.5 ± 1.8 分, 5.5 ± 3.6 分和 17.8 ± 5.8 分, 有显著性差异($P = 0.000$), 3组患者的总手术治疗率为65.6%, 病死9例, 病死率为8.0%, 组, , 患者治愈率分别为100.0%, 95.0%和79.3%, 差异有显著

背景资料

急性肠梗阻是外科的常见急腹症之一, 病因多种多样, 误诊常有发生, 特别是少见急性肠梗阻, 术前病因诊断与术后诊断的符合率低, 术后并发症多, 病死率高。

研发前沿

如何降低少见病因急性肠梗阻的病死率是当前研究的热点和重点, 也是亟待研究的问题。

相关报道
目前少见病因急性肠梗阻的研究报道主要集中在如何提高其诊断,并且以病例报告为主。

性($P=0.000$).

结论: 少见急性肠梗阻诊断困难, 易延误治疗时机而造成高病死率; 病情(局部病变与全身状况)的准确判断和有效的治疗(手术治疗与非手术治疗)是少见急性肠梗阻诊治的关键。

关键词: 少见急性肠梗阻; 病因学; 病死率; 治疗; 诊断

孙早喜, 崔海宁, 黄海溶, 王正文, 余壮明. 少见急性肠梗阻的临床分析与策略. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2461-2464
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2461.asp>

0 引言

急性肠梗阻是外科的常见急腹症之一, 病因多种多样, 误诊常有发生, 特别是少见急性肠梗阻, 术前病因诊断与术后诊断的符合率低, 术后并发症多, 病死率高^[1-4]. 现报告2002-01/2006-08少见病因型急性肠梗阻的发病情况及处理情况, 并综合文献, 以分析少见型急性肠梗阻的临床特征, 为制订诊疗对策提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 338例患者均为海南医学院附属医院2002-01/2006-08连续收治的急性肠梗阻患者。

1.2 方法 应用回顾性调查方式对338例患者的诊断与收治资料按性别、年龄、病因、病情及治疗结果登记、建库, 用SPSS12.0统计软件包分析, 少见急性肠梗阻患者分为3组: 儿童组(0岁-, 组 I)、青少年与成年组(14岁-, 组 II)和老年组(60岁-, 组 III)。

统计学处理 数据以mean±SD表示, 用SPSS12.0进行统计学分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 患者年龄、性别、病因构成情况 338例急性肠梗阻患者, 男222例(65.7%), 女116例(34.3%), 平均年龄 47.6 ± 26.4 岁. 其中少见急性肠梗阻122例, 男性94例(77.0%), 女性28例(23.0%), 平均年龄 37.8 ± 26.1 岁, 治愈率为92.0%; 常见病因急性肠梗阻216例, 男128例(59.3%), 女88例(40.7%), 年龄 53.1 ± 25.0 岁. 急性肠梗阻病因种类41种(表1), 其中少见病因36种, 组 I 31例患者, 13种病因; 组 II 62例, 26种病因; 组 III 29例, 14种病因(表2)。

2.2 少见急性肠梗阻患者122例救治结果及影响因素分析 手术治疗率为65.6%, 非手术治疗率为34.4%; 病死9例, 病死率为8.0%, 其死因为高血

表 1 急性肠梗阻病因构成情况(%)

急性肠梗阻原因	n	构成比(%)
肿瘤	96	28.4
手术后黏连	65	19.2
便秘	22	6.5
产后	19	5.6
食物紊乱	14	4.1
巨结肠	1	0.3
肠闭锁	1	0.3
肠旋转不良	2	0.6
胆总管囊肿	2	0.6
十二指肠压迫	2	0.6
黏连系膜化	3	0.9
肠憩室	4	1.2
Peutz-Jeghers Syndrom	1	0.3
克隆病	1	0.3
多发性息肉	2	0.6
胎粪	5	1.5
饱食后剧烈活动	1	0.3
不明原因	1	0.1
肿瘤性小肠扭转	1	0.3
肠道慢性炎	1	0.3
心内膜炎	1	0.3
风心病	3	0.9
腹膜血肿	2	0.6
高脂血症	1	0.3
蛔虫	2	0.6
脊椎骨折	2	0.6
情绪紊乱	2	0.6
胆结石	3	0.9
多发伤	3	0.9
茧腹症	3	0.9
低钾	4	1.2
食物中毒	4	1.2
药物	4	1.2
输尿管结石	6	1.8
胃肠紊乱	7	2.1
疝	7	2.1
腹膜炎与脓肿	7	2.1
胰腺炎	7	2.1
肠系膜炎	8	2.4
孕妇	9	2.7
结核	9	2.7
总数	338	100.0

脂、风心病与心内膜炎所产生的血栓栓子、血液动力型肠梗阻术后用药、饱食后剧烈活动、多发伤、肿瘤性小肠扭转, 其疾病诊断为绞窄性肠梗阻、多发伤麻痹性肠梗阻、术后再绞窄(表3)。不同年龄组患者就诊时间、病情、治疗效果: 组 I, II, III患者就诊时间分别为: 2.3 ± 1.5 h, 60.0 ± 43.2 h, 84.0 ± 67.2 h, 具有显著性差

创新盘点
本文是比较大宗的少见病因急性肠梗阻的流行病学分析, 由于少见病因急性肠梗阻的病因诊断十分困难, 所以本文的切入点从肠梗阻的病情(APACHE及肠道的局部病变)及治疗结果入手阐明少见病因急性肠梗阻的诊治对策。

表 2 少见急性肠梗阻不同年龄组患者病种、就诊时间、病情与治疗结果(mean ± SD)					
分组	病种	n	就诊时间(h) ^b	APACHE II (分) ^b	治愈率(%) ^b
	13	31	2.3 ± 1.5	2.5 ± 1.8	100.0
	26	62	60.0 ± 43.2	4.5 ± 3.6	95.0
	14	29	84.0 ± 67.2	17.8 ± 5.8	79.3

^bP<0.01.

表 3 9例少见急性肠梗阻病死分析				
病因	n	年龄(岁)	梗阻类型	n
饱食后剧烈活动	1	19	多发伤后肠麻痹	1
多发伤	1	47	绞窄性肠梗阻	6
风心病	1	57	术后再绞窄	2
心内膜炎	1	60		
风心病肠梗术后	1	61		
绞窄术后用药	1	62		
高血脂	1	66		
风心病	1	79		
肿瘤性小肠扭转	1	80		
总数	9			9

异($P = 0.000$); 组 I、II、III 患者急性生理和慢性健康评分 (APACHE II) 分别为: 2.5 ± 1.8 分, 4.5 ± 3.6 分, 17.8 ± 5.8 分, 在统计学, 差异有显著性($P = 0.000$); 组 I, II, III 患者治愈率分别为 100.0%, 95.0%, 79.3%, 有统计学意义($P = 0.000$) (表2).

3 讨论

急性肠梗阻病因常归为机械因素和非机械因素两大类, 338 例急性肠梗阻中, 常见的 216 例病因为肿瘤 96 例 (28.4%)、术后肠粘连 65 例 (19.2%)、便秘 22 例 (6.5%)、剖宫产后 19 例 (5.6%) 及食物紊乱 14 例 (4.1%), 而临床少见的 122 例病因有 36 种: 与先天性发育异常有关的 22 例 (以疝、肠旋转不良、胆总管囊肿、十二指肠压迫、粘连系膜化、肠憩室为主), 与遗传有关的 4 例 (如 Peutz-Jeghers 病、克隆病、多发性息肉), 各种炎性病变 37 例 (如胎粪、腹膜炎与脓肿、胰腺炎、肠系膜炎、结核), 外伤 7 例 (腹膜后血肿、脊椎骨折和多发伤), 引起肠道血液循环障碍的 5 例 (心内膜炎、风心病和高脂血症), 食物中毒与胃肠紊乱共 11 例, 输尿管结石与胆结

应用要点
少见病因急性肠梗阻的诊治要重视病情的准确判断(包括 APACHE 及肠道的局部病变)和多数学者专家所倡导的诊治方法, 这将有利于提高治愈率, 降低病死率.

石共 9 例, 药物和低钾各 4 例, 虫腹症 3 例, 情绪紊乱与蛔虫各 2 例, 饱食后剧烈活动、不明原因、肿瘤性小肠扭转各 1 例, 从而导致诊断上的困难, 易延误治疗时机而发展为绞窄性肠梗阻, 9 例病死患者中, 8 例为绞窄性肠梗阻, 其死因为高血脂、风心病与心内膜炎所产生的血栓栓子、血液动力型肠梗阻术后用药、饱食后小肠扭转与肿瘤性小肠扭转, 年龄集中于 60 岁以上. 因此, 当临床上遇到不明原因的肠梗阻时, 不应苛求于明确梗阻的病因, 而要及时判断判断全身病情及局部梗阻肠道是否出现肠绞窄, 适时实施有效治疗(手术治疗和非手术治疗)^[1-13].

29 例老年人少见急性肠梗阻病因为 14 种, 主要病因是炎性病变 12 例 (腹膜炎与脓肿、肠系膜炎), 其次是胃肠紊乱 4 例、肠道血液循环障碍 4 例 (高脂血症、风心病), 这些造成了老年患者少见急性肠梗阻病因诊断上的困难和治疗上的延误; 老年人生理功能、免疫功能的下降, 各种老年性并存病增多, 如胆石症、胰腺炎、腹腔各部位肿瘤、腹膜炎、肺感染、部分老年病的药物治疗, 慢性结肠炎等构成了老年人急性肠梗阻病因诊断上的复杂性; 老年人肠梗阻因机体反应性差, 往往缺乏典型的主诉和体征, 而老年肠梗阻的病理变化很迅速, 尤其是结肠容易发生闭袢性梗阻, 导致肠绞窄、坏死、穿孔, 后果严重, 老年人肠梗阻即使绞窄, 其自觉症状也常模糊不清, 临床体征不明显, 常不能及时确诊而延误病情, 致使出现许多严重并发症; 老年人因组织结构退化以致器官功能低下, 反应迟钝, 对疼痛不敏感, 就诊时大多已属中晚期 (就诊时间为 84.0 ± 67.2 h); 急性肠梗阻引起的病理变化因老龄免疫机能降低而进展迅速, 不少患者入院时已存在肠坏死, 甚至出现感染性休克和心肺功能衰竭; 上述种种, 致使老人病情危重 (APACHE II 17.8 ± 5.8 分), 病死率高 (20.7%). 所以, 在处理老年少见病因急性肠梗阻时应注意以下几点: (1) 重视病情评估; (2) 重视体征的变化; (3) 重视围手术期处理; (4) 适时

同行评价
本文是一个关于少见急性肠梗阻的比较大宗的病例分析, 视角独特, 思路清晰, 有临床指导意义。

实施手术治疗^[1-3,6,7,9]。

31例儿童组, 病因有13种, 主要病因是先天性发育异常15例(肠闭锁、胆总管囊肿、巨结肠、肠憩室、疝和肠扭转不良), 其次是胎粪5例、食物中毒4例, 治愈率为100.0%。尽管儿童生理功能、免疫功能较低下和缺乏有效的主诉和明显的体征, 但是, 儿童的并存病少于老年人, 如腹腔各部位肿瘤、胆石症、胰腺炎等; 再有, 儿童就诊及时(发病到就诊的时间为 2.3 ± 1.5 h), 病程常在中早期、病情轻(APACHE II 2.5 ± 1.8 分), 能得到有效治疗(包括手术治疗和非手术治疗), 治愈率高(本组为100.0%)^[1,5,8,10]。

62例青少年与成年组, 病因有26种, 主要病因是炎性病变21例(腹膜炎与脓肿、胰腺炎、结核、克隆病、心内膜炎和肠道慢性炎), 其次是先天性发育异常12例(肠憩室、小肠旋转不良、黏连系膜化、十二指肠压迫、疝)、各种结石8例(胆结石、输尿管结石)、孕妇9例、外伤7例。病死3例(均行手术治疗), 病死率为5.0%, 病死病因为饱食后剧烈活动、心内膜炎、多发伤。本组人的生理功能、免疫功能较为旺盛, 抗病力强; 主诉和体征比较明确; 就诊时间介于儿童和老年人之间(从发病到就诊的时间为 60.0 ± 43.2 h)。所以, 尽管本组患者病程常在中晚期、病情相对较重, 但治疗结果较好, 治愈率为95.0%^[1,5-6,8-9,11-13]。

通过对122例少见急性肠梗阻患者的流行病学特征分析, 我们体会到对少见病因急性肠梗阻的诊治要重视病情的准确判断(包括APACHE及肠道的局部病变的判断)。如本组1例80岁的高龄患者因肿瘤性小肠扭转发病60 h入院, 因小肠梗阻原因不明及腹胀不明显而观察治疗24 h行手术治疗, 术前APACHE为30分, 术后第2天患者病死。获取客观证据: 如X线、CT、B型超声波、纤维结肠镜检查、血生化检查、血气分析、腹腔液的检查和血管造影等, 特别是腹腔液的检查和血管造影, 在判断局部

病变尤其重要^[1-4]。另如本组1例47岁的多发伤患者入院治疗10 d后, 腹胀逐渐加重, 肠鸣音减弱并消失, 腹部X线、CT检查见肠道广泛液平面, 入院治疗16 d后腹腔穿刺见混浊血性液, 并行剖腹手术治疗, 术后第3天患者病死。

4 参考文献

- 1 江来, 孟荣贵, 王颢, 郝立强, 金国祥, 喻德洪. 肠梗阻的病因及诊治探讨. 中华胃肠外科杂志 2001; 4: 34-36
- 2 张家友, 林景泰. 老年人肠梗阻的病因分析和手术时机的探讨. 中国老年学杂志 2000; 20: 316-317
- 3 遇红, 高玉民, 张新艳. 腹茧症4例. 中国误诊学杂志 2002; 2: 685
- 4 刘建, 谷俊朝, 张忠涛, 王宇. 500例肠梗阻病因分析及诊断探讨. 北京医学 2006; 28: 162-164
- 5 Molvarec A, Babinszki A, Kovacs K, Toth F, Szalay J. Intrauterine intestinal obstruction due to fetal midgut volvulus: a report of two cases. *Fetal Diagn Ther* 2007; 22: 38-40
- 6 Kaushik R, Punia RP, Mohan H, Attari AK. Tuberculous abdominal cocoon--a report of 6 cases and review of the Literature. *World J Emerg Surg* 2006; 1: 18
- 7 Whittingham-Jones PM, Riaz AA, Clayton G, Thompson HH. Annular pancreas - a rare cause of gastric obstruction in an 82-year-old patient. *Ann R Coll Surg Engl* 2005; 87: W13-W15
- 8 Latif F, Glenn GM, Geil L, Schmidt L, Delisio J, Hampsch K, Orcutt ML, Zbar B, Lerman MI. A new polymorphic probe on chromosome 3p:lambda LIB4A-52'(D3S732). *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 2802
- 9 Chung NS, Kim YS, Park CH, Kim SY, Lee MR, Kwon KA, Chung MG, Park DK, Kim SS, Kwon SY, Koo YS, Kim YK, Choi DJ, Kim JH. A case of colon obstruction developed during the recovery period of acute pancreatitis. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45: 206-209
- 10 Baeza-Herrera C, Garcia-Cabello LM, Najera-Garduno HM, Sanchez-Fernandez LA, Mora-Hernandez F, Ortiz-Zuniga AI. Surgical aspects of intussusception secondary to Peutz-Jeghers syndrome. *Cir Cir* 2005; 73: 91-95
- 11 Jani PG. Acute colonic pseudo obstruction (Ogilvie's syndrome): case report. *East Afr Med J* 2005; 82: 325-328
- 12 Twite N, Jacquet C, Hollemaert S, El FI, Dumont G, Nasr A, De Guchteneere E, Busine A. Intestinal obstruction in pregnancy. *Rev Med Brux* 2006; 27: 104-109
- 13 Alshawi JS. Recurrent sigmoid volvulus in pregnancy: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1811-1813

编辑 何燕 电编 张强

人源M2二联体靶抗原BO-E2融合蛋白的克隆表达与鉴定

周 晔, 姚定康, 陈 燕, 蒋天舒, 陈 波, 仲人前, 邓安梅

周晔, 姚定康, 陈燕, 蒋天舒, 陈波, 仲人前, 邓安梅, 上海长征医院实验诊断科 上海市 200003
国家自然科学基金项目, No. 30471616
通讯作者: 邓安梅, 200003, 上海市凤阳路415号, 长征医院检验科. amdeng@yahoo.com
电话: 021-63583108
收稿日期: 2007-03-01 修回日期: 2007-07-22

CDNA cloning and expression of autoantigen BO-E2

Ye Zhou, Ding-Kang Yao, Yan Chen, Tian-Shu Jiang, Bo Chen, Ren-Qian Zhong, An-Mei Deng

Ye Zhou, Ding-Kang Yao, Yan Chen, Tian-Shu Jiang, Bo Chen, Ren-Qian Zhong, An-Mei Deng, Laboratory of Diagnostics, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471616

Correspondence to: An-Mei Deng, Laboratory of Diagnostics, Shanghai Changzheng Hospital, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. amdeng@yahoo.com

Received: 2007-03-01 Revised: 2007-07-22

Abstract

AIM: To express BO-E2 recombinant fusion protein in *Escherichia coli* for use in early diagnosis of primary biliary cirrhosis (PBC).

METHODS: CDNA encoding BCOADC-E2 and OGDC-E2 were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), confirmed by DNA sequencing, subcloned non-directionally into the bacterial expression plasmid pET28a(+), and then transformed into *E. coli* BL21(DE3) to express the recombinant fusion protein, which was identified by SDS-PAGE and western blotting.

RESULTS: Results of nucleotide sequencing and restriction analysis showed that the recombinant plasmid successfully constructed three species. Three types of fusion protein were expressed by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. The recombinant fusion protein exhibited the antigenicity of AMA-M2 by western blotting.

CONCLUSION: BO-E2 recombinant fusion protein can be used for *in vitro* diagnosis of PBC.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; BCOADC-E2; OGDC-E2; BO-E2 recombinant fusion protein; Western blotting

Zhou Y, Yao DK, Chen Y, Jiang TS, Chen B, Zhong RQ, Deng AM. CDNA cloning and expression of autoantigen BO-E2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2465-2467

摘要

目的: 表达二联体BO-E2重组融合蛋白, 以用于人原发性胆汁性肝硬化(PBC)的早期发现和临床诊断。

方法: 通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法扩增得到抗线粒体抗体二亚型(AMA-M2)的二个靶抗原侧链: 二氧酸脱氢酶复合体E2(BCOADC-E2)、2-氧戊二酸脱氢酶复合体E2(OGDC-E2)相应的基因片段, 经测定序列验证后插入表达载体pET28a(+), 构建重组表达载体pET28a(+)-BCOADC-E2, pET28a(+)-OGDC-E2, pET28a(+)-BO-E2, 转化大肠杆菌BL21(DE3)后诱导表达蛋白质。表达蛋白经SDS-PAGE、Western blot等鉴定。

结果: 经核苷酸序列测定和酶切鉴定结果表明, 成功地构建了3种重组质粒。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达后, 获得3种融合蛋白。经免疫学鉴定, 重组抗原片段具有AMA-M2的免疫原性。

结论: 重组表达的BO-E2融合蛋白将有利于PBC的实验室诊断。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 二氧酸脱氢酶复合体E2; 2-氧戊二酸脱氢酶复合体E2; BO-E2融合蛋白; 蛋白印迹

周晔, 姚定康, 陈燕, 蒋天舒, 陈波, 仲人前, 邓安梅. 人源M2二联体靶抗原BO-E2融合蛋白的克隆表达与鉴定. *世界华人消化杂志* 2007;15(22):2465-2467
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2465.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,

背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)的主要特征为肝内中小胆管的非化脓性进行性炎症, 最终可以导致肝硬化和肝衰竭, 是一种自身免疫性疾病。近年来, 该病的发病率不断增加, 对PBC的早期发现和临床诊断显得尤为重要。本文用基因工程的方法表达BO-E2融合蛋白, 为PBC的早期发现和特异性诊断提供了有效手段。

相关报道

姜小华 *et al* 用人源M2三联体靶抗原检测抗体诊断原发性胆汁性肝硬化, 在20例原发性胆汁性肝硬化中均检出M2抗体, 28例不明原因肝病6例M2抗体阳性。

创新盘点

本文检测的22例M2阳性的患者血清中,全部可以与BO-E2融合蛋白反应,M2抗原在细胞内含量较少.传统生物化学方法提纯和制备抗原有很大的局限性,而利用本方法可大量获得所需抗原,用于PBC的免疫学诊断.

PBC)是一种以肝内中小胆管的非化脓性进行性炎性损伤为特征、最终导致肝硬化和肝衰竭的典型自身免疫性疾病(AID)^[1-4].在PBC患者体内可检出多种自身抗体,如抗核抗体(ANA)、抗线粒体抗体(AMA)、抗平滑肌抗体(SMA)、抗肝肾微粒体抗体(LKM)等,其中最主要的抗体是AMA^[5-7].AMA分为M1-M9共9个亚型,而只有M2为PBC特异抗体.AMA-M2抗体对PBC检测的敏感性达93%以上,特异性几乎达100%^[8].M2抗体的靶抗原为线粒体上的2-氧酸脱氢酶复合体(2-OADC)的一些组分:丙酮酸脱氢酶复合体E2(PDC-E2)、2-氧酸脱氢酶复合体E2(BCOADC-E2)、2-氧戊二酸脱氢酶复合体E2(OGDC-E2)等.我们用基因工程的方法表达BO-E2融合蛋白,为PBC的早期发现和特异性诊断提供有效手段.

1 材料和方法

1.1 材料 22例患者血清经德国Euroimmun公司免疫印迹试剂盒测定,M2抗体为阳性.反转录酶,PCR扩增试剂盒,RNA提取试剂盒为Qiagen公司产品.各种限制性内切酶、T4DNA连接酶购自TaKaRa公司.pET-28a(+)质粒及大肠杆菌BL21(DE3)购自Novagen公司.间接免疫荧光法测定AMA试剂盒购自Euroimmun公司.参照人BCOADC-E2、OGDC-E2全序列,设计引物.BCOADC-E2正向引物:5'-ATCGCATCCGCACAGGTTGTTTCAGTTCAT-3';BCOADC-E2反向引物:5'-TAATTTTTGCATGCACGGCGAAC TGCAGGAGT-3'.OGDC-E2正向引物:5'-CAGATTTAGAGCTCACAGCTGTATGCAAGGATGA-3';OGDC-E2反向引物:5'-ATCGCGTCGACAGGAGCAGCACCATGTTTCC-3'.

1.2 方法

1.2.1 基因克隆操作 用淋巴细胞分离液从健康人外周血中分离单个核细胞,从白细胞中抽提RNA,反转录得到cDNA.pET-28a(+)质粒分别用BamH1和Sph1、Sac1和Sal1、BamH1和Sal1双酶切后,经T4DNA连接酶的作用将BCOADC-E2、OGDC-E2、BO-E2的cDNA对应定向插入其中.送上海生工生物工程技术公司测定序列进行鉴定.PCR扩增反应条件为94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环后再进行72℃延伸5 min.

1.2.2 重组质粒的转化和鉴定 将重组质粒用氯化钙转化法导入宿主菌BL21(DE3),加入LB培养液37℃震荡培养45 min后涂布于LB平板上(含终浓度100 mg/L卡那霉素)培养过夜.抽提质粒,

用10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察重组质粒和酶切后的产物.

1.2.3 重组融合蛋白的收集和纯化 次日挑取转化皿上的菌落,接种于含卡那霉素的LB培养液中,37℃摇床培养扩增至A₆₀₀为0.4左右加入终浓度为0.1 g/L的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG),诱导表达4 h,4℃离心收集菌液.将菌液反复冻融4次,经超声破碎仪以300 W,15 s,破碎4次,以上操作在冰浴中进行.而后在4℃,10 000 g离心15 min,收集沉淀,以含5 g/L TritonX-100,10 mmol/L EDTA的缓冲液洗涤后,用100 μL裂解缓冲液(含0.1 mmol/L PMSF,8 mol/L尿素,10 mmol/L DTT)溶解包涵体,室温放置1 h.再加入900 μL氧化还原缓冲液,最后离心取上清.将上清液流经PBS平衡后的GST亲和层析柱,经20 mL PBS洗涤后,用5 mmol/L还原型谷胱甘肽溶液洗脱,收集洗脱液进行150 g/L十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺胶电泳(SDS-PAGE)分析.

1.2.4 重组蛋白抗原性的鉴定 BCOADC-E2、OGDC-E2、BO-E2重组蛋白经SDS-PAGE电泳后进行转印,200 mA,40 V,2 h.将转印后的NC膜剪成条带,用含50 g/L BSA的PBS封闭1 h,与1:1000稀释的人M2阳性血清反应2 h,充分洗涤后与1:1000稀释的HRP标记的兔抗人IgG二抗反应2 h,再次洗涤后加入3,3'-二氨基联苯胺底物及双氧水反应显色.

2 结果

2.1 PCR扩增结果 按上述条件扩增出379 bp和279 bp的片段,经DNA测序表明他们是BCOADC-E2、OGDC-E2基因的精确拷贝.

2.2 表达质粒的构建及鉴定 通过反转录将PCR扩增的相应基因片段,克隆入表达载体pET28a(+),构建重组表达载体pET28a(+)-BCOADC-E2,pET28a(+)-OGDC-E2和pET28a(+)-BO-E2,重组载体用限制性内切酶酶切鉴定,结果(图1),序列经测定完全正确.

2.3 重组蛋白的诱导表达 重组质粒的工程菌经IPTG诱导后进行120 g/L SDS-PAGE电泳,在细菌裂解液(上清液)中可见有1条明显的额外蛋白带,相对分子量为14×10³ Da(BCOADC),10×10³ Da(OGDC)和24×10³ Da(BO)(图2).

2.4 重组蛋白抗原性的鉴定 选取22例M2阳性的患者血清,采用Western-blot方法进行检测,抗BCOADC-E2抗体阳性19例,阳性率为86.4%;抗OGDC-E2抗体阳性18例,阳性率为81.8%;抗

应用要点

本文纯化得到的BO-E2融合蛋白可通过大量发酵而制备,在临床上用来早期诊断原发性胆汁性肝硬化,并可申请专利,用于开发PBC诊断试剂盒.

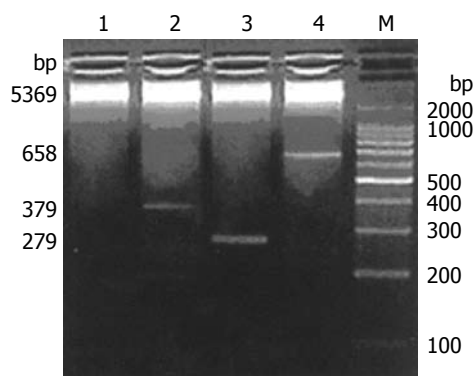


图 1 重组质粒双酶切鉴定电泳图. 1: pET28a(+)质粒; 2: *Bam*H1和*Sph*1酶切后的pET28a(+)-BCOADC-E2质粒; 3: *Sac*1和*Sal*1酶切后的pET28a(+)-OGDC-E2质粒; 4: *Bam*H1+*Sal*1酶切后的pET28a(+)-BO-E2质粒; M: DNA Marker DL2000.

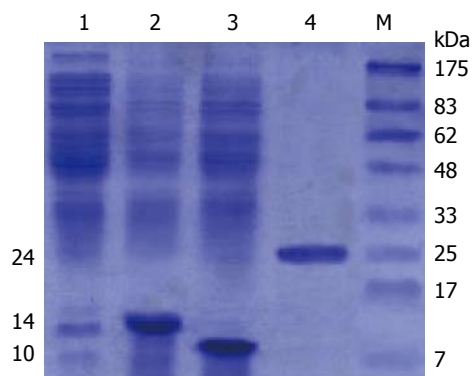


图 2 融合蛋白的120 g/L SDS-PAGE电泳图. 1: 含pET28a(+)质粒的细菌裂解液; 2: 含BCOADC重组质粒的细菌裂解液; 3: 含OGDC重组质粒的细菌裂解液; 4: 含BO重组质粒的细菌裂解液; M: Protein Marker.

BO-E2抗体全部为阳性, 阳性率为100%.

3 讨论

PBC好发于中老年妇女, 男女发病比率约为1:10, 起病隐匿, 病程缓慢, 病程中可有瘙痒、黄疸、脂肪代谢紊乱、肝脾肿大和贫血, 晚期出现肝硬化和肝功能衰竭的各种临床表现. 肝功能检查ALP和 γ -谷酰转氨酶显升高, 血清胆红素升高, 以直接胆红素升高为主^[9-12]. 据国外研究报道, PBC发病率约为2-24人/10万, 年发病率为0.4-3.0人/10万, 且该数值有逐年递长趋势^[13]. 近年来国内PBC发病率亦不断增加^[14], 中国PBC人群的易感基因是HLA-DRB1*07^[15]. 因此, 对PBC的早期发现和临床诊断显得尤为重要. AMA中只有M2抗体为PBC特异性抗体, 其他亚型可见于很多疾病如药物损害、心肌病、类风湿性关节炎及一些感染如结核、梅毒等. 间接免疫荧光法无法对AMA分型, 用于诊断

PBC的特异性差. 本实验检测的22例M2阳性的患者血清中, 全部与BO-E2融合蛋白反应. M2抗原在细胞内含量较少, 传统生物化学方法提纯和制备抗原有很大的局限性, 操作复杂, 成本高, 很难获得纯化的线粒体抗原, 影响检测结果. 而利用本方法可大量获得所需抗原, 用于PBC的免疫学诊断, 为PBC的早期发现和临床诊断提供有力工具.

4 参考文献

- Charatcharoenwitthaya P, Lindor KD. Current concepts in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Hepatol* 2005; 4: 161-175
- Yoneyama K, Yamazaki M, Kogo M, Kiuchi Y, Shibata M, Imawari M. Prognostic factors of primary biliary cirrhosis detected by health screening. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006; 52: 97-105
- Yap I, Wee A, Tay HH, Guan R, Kang JY. Primary biliary cirrhosis--an uncommon disease in Singapore. *Singapore Med J* 1996; 37: 48-50
- Speiciene D, Irnius A, Leuschner U, Liakina V, Semuchiniene T, Barakauskiene A. Primary biliary cirrhosis in Lithuania: diagnosis and clinical picture. *Med Sci Monit* 2007; 13: CR299-306
- Ishibashi H, Shimoda S, Gershwin ME. The immune response to mitochondrial autoantigens. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 337-346
- Abdul-Aziz K, Faizal AA. Serological diagnosis of autoimmune hepatobiliary diseases. *Saudi Med J* 2005; 26: 1875-1881
- Rigopoulou EI, Bogdanos DP, Liaskos C, Koutsoumpas A, Baum H, Vergani D, Dalekos GN. Anti-mitochondrial antibody immunofluorescent titres correlate with the number and intensity of immunoblot-detected mitochondrial bands in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 118-121
- Bargou I, Mankai A, Jamaa A, Ben Jazia I, Skandrani K, Sfar H, Baccouche A, Ajmi S, Letaief A, Fabien N, Jeddi M, Ghedira I. Detection of M2 antimitochondrial antibodies by dot blot assay is more specific than by enzyme linked immunosorbent assay. *Pathol Biol (Paris)* 2007
- Chon CY, Park JY. Primary biliary cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2006; 12: 364-372
- Sarin SK, Monga R, Sandhu BS, Sharma BC, Sakhuja P, Malhotra V. Primary biliary cirrhosis in India. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 105-109
- Giorgini A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Zuin M, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis: solving the enigma. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 185-193
- Vierling JM. Primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangiopathy. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 177-194
- Metcalfe JV, Mitchison HC, Palmer JM, Jones DE, Bassendine MF, James OF. Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1996; 348: 1399-1402
- Jiang J, He M. Clinical features of primary biliary cirrhosis and treatment of it by integrated traditional Chinese and western medicine. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2003; 1: 99-102
- Liu HY, Deng AM, Zhou Y, Yao DK, Xu DX, Zhong RQ. Analysis of HLA alleles polymorphism in Chinese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 129-132

名词解释

M2抗体: 抗线粒体抗体(AMA)是原发性胆汁性肝硬化患者体内的主要自身抗体, AMA分为M1-M9 9个亚型, 而只有M2为PBC特异抗体. AMA-M2抗体对PBC检测的敏感性达93%以上, 特异性几乎达100%.

同行评价

本文论述了人源M2二联靶抗原BO-E2融合蛋白的克隆表达与鉴定的方法以及其将有利于原发性胆汁性肝硬化(PBC)的实验诊断, 立题新颖, 方法成熟, 图片清晰, 有一定的理论意义.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽