

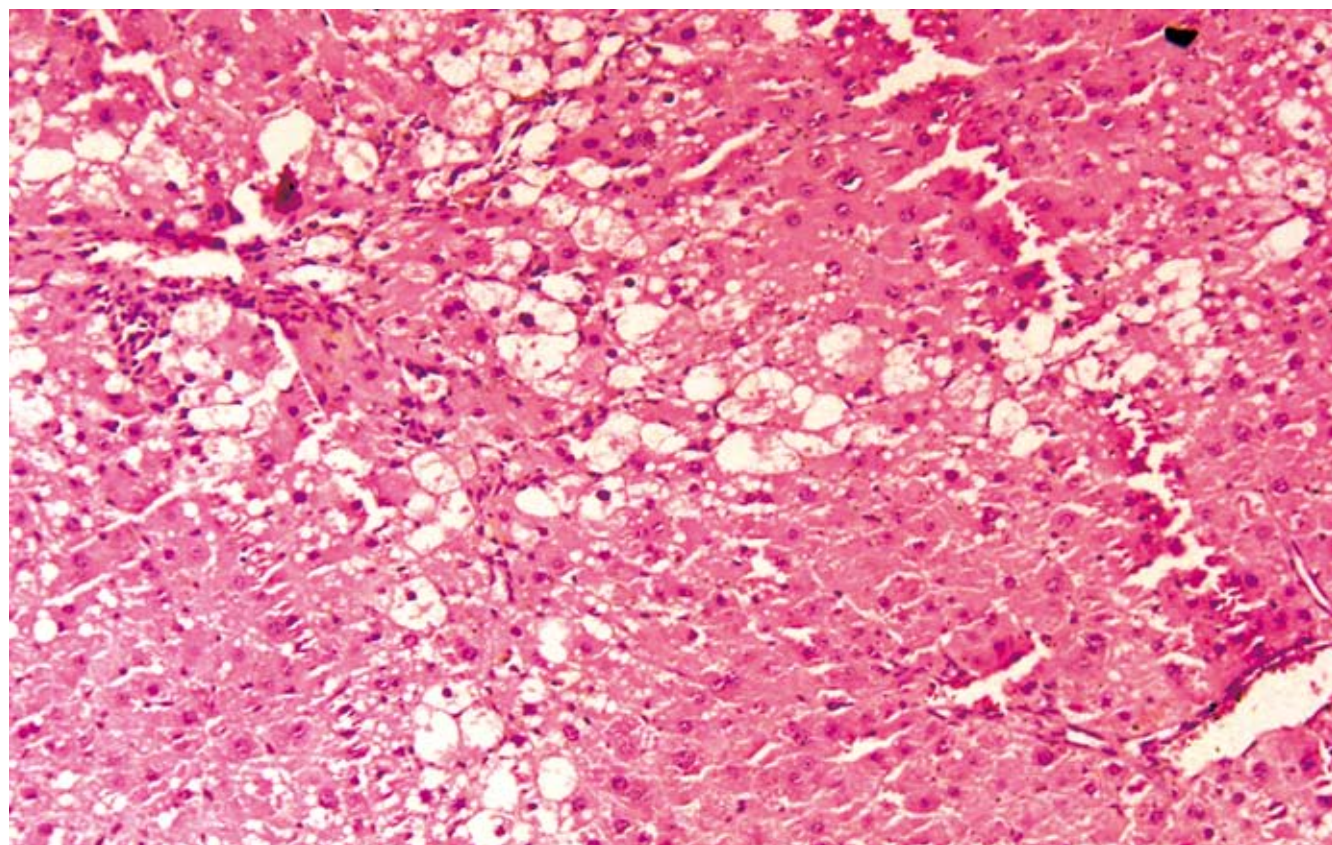
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011 年 1 月 8 日 第 19 卷 第 1 期 (Volume 19 Number 1)



1 / 2011

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
栾新明教授
陈国忠副主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授

崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
霍丽娟教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘莹副主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马红主任医师
马欣主任医师

毛高平教授
孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周晓东副教授
周宇教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
诸琦教授

消化外科学

白雪巍副主任医师
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
杜成友教授
杜顺达副主任医师
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
姜卫东教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
金山副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李杰教授

李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔主任医师
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超副教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
仇毓东副教授
裘正军教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
沈世强教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤恢焕教授
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨维良教授
杨银学教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张群华教授
张水军教授

张宗明教授
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
高志良主任医师
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
靳雪源副主任医师

林菊生教授
刘正稳教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武主任医师

庄林主任医师

消化中医学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
南极星教授
牛英才研究员
沈洪教授
司富春教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲副教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
陈克能教授
代智副研究员
华海清教授
李璦教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
秦叔逵教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授

韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐辉雄教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
曹师承教授
陈志龙教授
樊红教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
李东辉教授
李刚教授
李杰副教授
李君文研究员
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授

梅林教授
钱其军研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
王钦红教授
吴道澄教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
朱进霞教授

消化病理学

杜祥教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
孙伟副研究员
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年1月8日 第19卷 第1期 (总第333期)

述 评

- 1 肠易激综合征生活质量评价的研究现状及展望
陈明显, 蔡淦

基础 研究

- 7 转染GKLF基因对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤的抑制作用
严辉, 陈卫昌, 岑建农, 沈宏杰, 郭凌川, 顾冬梅, 谢学顺
- 13 鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的防治作用
艾志波, 张荣华, 闫国和
- 19 氧化苦参碱对SW1990细胞MMP-2表达的抑制作用及对细胞侵袭力的影响
冀润利, 邱瑶, 夏时海, 李飞

临 床 研 究

- 25 抑癌基因ARHI在人胃癌组织中的表达及意义
唐海灵, 胡益群, 杨奕轩, 秦兴平, 陈建民, 巴亚斯古楞, 任建林
- 31 血管内皮生长因子B及其变位剪切体在不同肝组织中的表达差异及意义
王瞿辉, 王毅军, 高英堂, 杜智, 杨斌, 张晔, 郭华, 景丽, 余俊, 许彦杰
- 38 胆盐输出泵基因V444A与特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的关系
邓亚楠, 王琳琳, 唐清, 陈秀奇, 陈萍, 单庆文, 连淑君, 云翔

文 献 综 述

- 44 可变剪接在胃癌发生和发展中的作用
翟静, 刘海峰, 张成岗
- 48 胃癌术前分期的研究现状
仲海, 严超, 燕敏, 朱正纲
- 57 白介素-10与炎症性肠病
顾秋平, 白爱平
- 62 结直肠癌*k-ras*基因检测及其靶向治疗的研究现状
王丽, 余英豪

研 究 快 报

- 68 复方中药安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠模型TFF mRNA表达的影响
林寿宁, 韦维, 黄贵华, 朱永革, 刘伟峰, 万小刚, 朱光辉, 张倩
- 74 JAM-C单抗对小鼠急性坏死性胰腺炎的抑制作用
胡端敏, 杨勇, 唐文
- 78 嗜酸乳杆菌胞壁粗提物及DNA对溃疡性结肠炎小鼠模型的作用
练光辉, 陈旻湖, 彭侠彪, 阮巍山

临 床 经 验

- 84 RASSF1A基因启动子区甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌组织中的变化及临床意义
樊宇靖, 刘宾, 王立东, 李莉, 蓝宇
- 89 BAFF及受体BAFF-R在 I 型自身免疫性肝炎中的表达及其临床意义
梁伊乐, 徐芸, 孙会潇
- 94 *k-ras*基因突变的定量检测在胰腺疾病诊断中的应用
顾俊骏, 高军, 路华, 李兆申
- 98 Karmali和Columbia培养基初次分离幽门螺杆菌效果的比较
何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中

病例报告	102 肝脏恶性血管外皮瘤误诊为肝转移癌1例 刘振宇, 王葵, 赵骞, 施乐华
附录	104 《世界华人消化杂志》投稿须知 109 2011年国内国际会议预告
志 谢	110 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	6 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 12 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 30 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 37 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 43 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 47 汤姆森-路透公布2009年WJG影响因子2.092 56 《世界华人消化杂志》出版流程 73 WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被PMC收录 83 2009年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 93 WJG成功通过评审被PMC收录 97 《世界华人消化杂志》栏目设置
封面故事	艾志波, 张荣华, 闫国和. 鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的防治作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 13-18 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/13.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-01-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.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.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年1616.00元 1401004000050</p> <p>www.wjgnet.com</p>		

World Chinese Journal of Digestology

January 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 1

EDITORIAL	1	Evaluation of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome: research status and prospects <i>Chen MX, Cai G</i>
BASIC RESEARCH	7	GKLF transfection inhibits the growth of xenograft tumors derived from human gastric carcinoma cell line SGC-7901 in nude mice <i>Yan H, Chen WC, Cen JN, Shen HJ, Guo LC, Gu DM, Xie XS</i>
	13	A modified recipe of Turtle Shell Decoction reduces experimental hepatic fibrosis in rats <i>Ai ZB, Zhang RH, Yan GH</i>
	19	Oxymatrine inhibits MMP-2 expression and reduces cell invasion in human pancreatic carcinoma cell line SW1990 <i>Ji RL, Di Y, Xia SH, Li F</i>
CLINICAL RESEARCH	25	Significance of ARHI protein expression in gastric carcinoma <i>Tang HL, Hu YQ, Yang YX, Qin XP, Chen JM, Guleng B, Ren JL</i>
	31	Significance of expression of vascular endothelial growth factor B and its splice isoforms in different types of liver lesions <i>Wang QH, Wang YJ, Gao YT, Du Z, Yang B, Zhang Y, Guo H, Jing L, Yu J, Xu YJ</i>
	38	Association between BSEP V444A polymorphism and risk of idiopathic neonatal hepatitis/cholestasis <i>Deng YN, Wang LL, Tang Q, Chen XQ, Chen P, Shan QW, Lian SJ, Yun X</i>
REVIEW	44	Role of alternative splicing events in gastric carcinogenesis <i>Zhai J, Liu HF, Zhang CG</i>
	48	Recent advances in preoperative staging of gastric cancer <i>Zhong H, Yan C, Yan M, Zhu ZG</i>
	57	Interleukin-10 and inflammatory bowel disease <i>Gu QP, Bai AP</i>
	62	Recent advances in detection of <i>k-ras</i> gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer <i>Wang L, Yu YH</i>
RAPID COMMUNICATION	68	Effect of treatment with Anwei Decoction on TFF mRNA expression in rats with chronic atrophic gastritis <i>Lin SN, Wei W, Huang GH, Zhu YP, Liu WF, Wan XG, Zhu GH, Zhang Q</i>
	74	Treatment with anti-JAM-C mAb attenuates pancreatic and systemic inflammation in mice with acute necrotizing pancreatitis <i>Hu DM, Yang Y, Tang W</i>
	78	Treatment with <i>Lactobacillus acidophilus</i> cell wall extract and DNA improves experimental acute colitis in mice <i>Lian GH, Chen MH, Peng XB, Ruan WS</i>
CLINICAL PRACTICE	84	Clinical significance of RASSF1A promoter methylation in gastric cardiac carcinoma and esophageal squamous cell carcinoma <i>Fan YJ, Liu B, Wang LD, Li L, Lan Y</i>
	89	Clinical significance of serum BAFF level and percentage of BAFF-R-positive B cells in patients with type I autoimmune hepatitis

	<p><i>Liang YL, Xu Y, Sun HX</i></p> <p>94 Quantitative detection of <i>k-ras</i> codon 12 mutation in pancreatic diseases <i>Gu JJ, Gao J, Lu H, Li ZS</i></p> <p>98 Comparison of Karmali agar medium and Columbia agar medium for isolation of <i>Helicobacter pylori</i> from gastric biopsy specimens <i>He LH, Zhang MJ, Liu GD, Zhang HF, Qiao B, Zhang JZ</i></p>
CASE REPORT	<p>102 Hepatic malignant hemangiopericytoma misdiagnosed as metastatic tumor: a report of one case <i>Liu ZY, Wang K, Zhao Q, Shi LH</i></p>
APPENDIX	<p>104 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>109 Meeting events calendar in 2011</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>110 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Ai ZB, Zhang RH, Yan GH.</i> A modified recipe of Turtle Shell Decoction reduces experimental hepatic fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(1): 13-18 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/13.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date January 8, 2011

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjgd@wjgnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjgd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

肠易激综合征生活质量评价的研究现状及展望

陈明显, 蔡淦

陈明显, 蔡淦, 上海中医药大学附属曙光医院消化科 上海市 200021

陈明显, 浙江省立同德医院 浙江省中医药研究院中医临床研究 浙江省杭州市 310007

蔡淦, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事胃肠病研究.

作者贡献分布: 本论文由陈明显完成; 蔡淦审校.

通讯作者: 蔡淦, 教授, 200021, 上海市卢湾区普安路185号, 上海中医药大学附属曙光医院消化科. chenmingxian2005@163.com

收稿日期: 2010-09-25 修回日期: 2010-12-07

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-08

Evaluation of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome: research status and prospects

Ming-Xian Chen, Gan Cai

Ming-Xian Chen, Gan Cai, Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital Affiliated with Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China
Ming-Xian Chen, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Institute of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Professor Gan Cai, Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital Affiliated with Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 185 Puan Road, Luwan District, Shanghai 200021, China. chenmingxian2005@163.com

Received: 2010-09-25 Revised: 2010-12-07

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-08

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is one of the most common functional gastrointestinal disorders. Quality of life measures/questionnaires provide an instrument to assess disease severity and treatment effects. In this paper, we review the research status and prospects of generic and specific instruments for evaluating the quality of life of IBS patients, including the advantages and disadvantages of currently used instruments, selection of reasonable instruments, intellectual property issues involved in instrument development and introduction, extension of research level to population, and exploitation of the advantages of Chinese medicine to improve the quality of life of IBS patients.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Health-related

ed quality of life; Quality of life measure

Chen MX, Cai G. Evaluation of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome: research status and prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 1-6

摘要

肠易激综合征是临床上最为常见的功能性胃肠道疾病之一, 生活质量量表提供了一个判断其病情严重性及治疗效果的测量工具. 本文综述了国内外常用的普适量表和专用量表在评价肠易激综合征生活质量的研究现状, 并对量表的优缺点及其合理选择、量表研制和引进的知识产权问题、扩大人群研究层次、发挥中医药改善生活质量的优势等方面进行展望.

关键词: 肠易激综合征; 健康相关生活质量; 生活质量量表

陈明显, 蔡淦. 肠易激综合征生活质量评价的研究现状及展望. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 1-6

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹部疼痛或不适, 伴有排便习惯改变和大便性状异常的一组临床症候群, 可持续存在或间歇发作, 但缺乏形态学和生化指标等异常的证据^[1]. IBS是临床上最为常见的功能性胃肠道疾病之一. 在英美等发达国家中, IBS患病率约为普通人群的10%-30%^[2-5], 因IBS而就诊的患者约占内科门诊人数的30%-50%^[6]; 在亚洲国家中IBS患病率约为5%-10%^[7], 我国的患病率约为5.6%-11.5%^[8-10], 约占消化科门诊人数的10.7%-34.3%^[9,11]. 虽然IBS是一个功能性疾病, 并不直接增加患者病死率和伤残率, 但会显著影响患者日常生活、学习、工作和社交等方面, 使患者生活质量明显下降^[12]. IBS患者每年因该病请假或影响工作的天数也更多, 如Drossman等^[13]在一份包括5 430人(其中IBS占9.2%)的随机人群调查中显示, IBS患者的旷工天数及就诊

■背景资料

随着医学模式的改变, 对IBS的治疗目标已从单纯缓解症状到同时重视症状指标和生活质量的改善. 对IBS生活质量进行测评能判断其病情严重程度及评价治疗效果, 而选择合适的、公认的生活质量量表, 能为临床实践提供更为可靠的依据.

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■ 研发前沿

国内外用于测评IBS生活质量的量表在不断被研制和开发,在选择合适的量表进行测评、加强量表的验证和推广、深入开展量表应用研究、发挥中医药改善生活质量优势等方面依然是研究的重点。

次数明显高于非IBS患者(13.4 d vs 4.9 d; 5.52 vs 1.86)。由于IBS发病率高,容易复发,患者就诊次数多,不仅造成医疗资源的大量消耗,而且给社会带来沉重的经济负担。随着人们对IBS的认识从单一的生物医学模式转变为生物-心理-社会医学模式,治疗目标也从单纯缓解症状到同时重视症状指标和生活质量的改善,而且由于IBS目前还没有客观的生物学、生理学方面的诊断和评价疗效的指标,因此对IBS生活质量进行测评能为判断病情严重程度及评价治疗效果提供依据。总结IBS生活质量评价的研究现状,有助于明确今后工作开展的方向。

1 量表的提出及意义

自FDA和罗马标准委员会建议将评价生活质量列为功能性胃肠病临床试验研究的次级指标以来,生活质量研究在IBS中的研究日益受到重视,普适量表得到不断推广,并且不少专用量表也相继编制和开发^[14]。通过对IBS患者进行生活质量评价研究,不仅可判断病情严重程度,评价健康状况,分析危险因素,验证治疗手段和干预措施的疗效,并可作为临床试验的研究终点以评价药物疗效,而且能为合理制定医疗决策和科学分配医疗资源提供依据。

2 普适量表

普适量表是为比较不同人群的健康状况而设计的,适用于各种人群和疾病的生活质量评价,既可用于同一疾病的不同群体进行比较,也可用于不同疾病与健康人群之间的比较,能综合评价疾病对患者生活质量的影响。通过反映受试者的总体生活质量,有助于宏观研究不同疾病对社会的影响,进而利于健康政策和医疗决策的制定。因此普适量表的使用最为广泛,目前应用于IBS的主要有^[15,16]:健康调查量表(the MOS item short from health survey, SF-36)、症状自评量表(symptom Checklist 90, SCL-90)、一般健康量表(general health questionnaire, GHQ)、疾病影响量表(sickness impact profile, SIP)、诺丁汉健康问卷(nottingham health profile, NHP)、世界卫生组织生活质量量表(WHO QOL-100、WHO QOL-BREF)等。在评价IBS的健康状况时,心理社会因素也经常考虑在内。SCL-90能较好地反映受检者的自觉症状和心理健康状态,常用于IBS患者心理因素的评价研究^[17]。又如汉密尔顿抑郁量表(hamilton depression scale, HAMD)、汉密尔顿焦虑量表(hamilton anxiety scale, HAMA)

这两个心理量表,常用于IBS患者精神影响因素的评价研究^[18]。此外,疾病控制和预防中心(centers for disease control and prevention, CDC)研制的CDC HRQOL-4,能对生活质量进行快速的评价^[19]。

目前国内外评价IBS最为常用的普适量表是SF-36。世界卫生组织推荐的SF-36^[20-22],包括36个项目,共8个维度,即躯体功能、躯体职能、躯体疼痛、总体健康、精力、社会功能、情感职能、精神健康,另外还有健康变化,用于评价过去1年内健康改变。SF-36的填写是调查对象自行或在调查人员的指导下完成。目前该量表已被译成多种语言,并进行跨文化调适研究。为便于临床应用, SF-36已进一步缩减为SF-20^[23]和SF-12^[24,25],完成量表所需时间减少,但可靠性降低。早在1989年Stewart等^[26]已将SF-36应用于消化道疾病的研究,并显示了评价IBS的良好前景。此后,Whitehead等^[27,28]研究发现, SF-36适用于IBS的生活质量评价,并能较好地反映IBS患者生活质量的下降,主要体现在躯体功能、躯体职能、总体健康、精力、社会功能等方面,且在研究时控制精神社会因素的影响后进行分析,IBS仍然对患者生活质量有影响,从而进一步验证了SF-36的效度和可靠性。研究同时指出,由于SF-36评估IBS的生活质量可能受到精神心理因素的干扰,因此有必要在研究分析时进行相应校正。Gralnek等^[29]用SF-36评价877例IBS患者的研究也显示,与正常人群相比IBS患者生活质量显著下降,并且明显低于如胃食管反流病、糖尿病、终末期肾病等慢性疾病患者,主要表现在多个方面,其中又以躯体疼痛、总体健康和由于身体健康问题引起的活力/疲劳、角色限制等方面的影响最为突出。熊理守等^[30]应用中文版SF-36在社区人群中231例IBS患者生活质量的研究显示,我国IBS患者生活质量各方面均明显降低,信度分析研究表明SF-36的重复性好,能适用我国IBS患者生活质量评价,但SF-36并不包括IBS患者常有的饮食限制、睡眠质量差等方面,因此在评价有必要结合IBS专用量表进行综合分析。

3 专用量表

疾病特有的本质决定了研究疾病对生活质量的最好影响最好采用专用量表。由于以特定疾病为中心,专用量表对干预效应和疾病变化的时间趋势更敏感,所以不但能了解某一疾病特有的生活质量影响因素,而且还可作为临床疗效研究的重

要指标. 目前在IBS中应用较为广泛的专用量表有: IBS生活质量问卷(IBS quality of life questionnaire, IBSQOL)、IBS生活质量量表(IBS-QOL)、功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)生活质量问卷(FDDQL)、IBS问卷(IBSQ)、IBS-36等. 我国学者也研制并开发了一些适合我国的量表, 如IBS中医证候量表、慢性病患者生命质量测定量表体系之肠易激综合征量表(quality of life for patients with chronic diseases-IBS, QLICD-IBS)等.

3.1 IBSQOL IBSQOL是Hahn等^[31]编制的IBS患者专用量表, 包括30个条目, 共9个维度, 即情绪、精神状态、睡眠、精力、躯体功能、饮食、社会角色、躯体角色、性生活. 条目形式为“在过去4周里肠易激综合征经常让你感到……?”采用5级或6级评分, 各项总积分越高则表示健康状况越佳. 该量表对评价IBS病情具有良好的信度、效度及反应度, 如Hahn等^[31]对500例IBS患者应用IBSQOL进行测评, 结果表明IBS病情严重程度与生活质量相关, 且比患有其他胃肠道疾病的非IBS患者得分要低. Hahn等^[32]还应用IBSQOL评价不同国度的IBS患者生活质量, 发现IBSQOL能反映IBS患者生活质量的下降, 而且相对于美国患者($n = 287$), IBS对英国患者($n = 343$)的影响程度更大. Amouretti等^[33]应用IBSQOL评价不同性别IBS患者的生活质量, 结果IBSQOL较好反映了女性比男性的生活质量要低. 在我国由于文化观念等因素, 需要一些针对性的调整, 如性生活等评价项目可以去掉, 可能会更适合国人的使用.

3.2 IBS-QOL IBS-QOL是Patrick等^[34]通过查阅综述文献及对临床IBS患者访谈编制的IBS患者专用量表, 包括34个条目(描述过去30 d内的状况), 共8个维度, 即焦虑不安、行为障碍、躯体意念、健康担忧、食物逃避、社会功能、性行为、人际关系. 用5个点的线段尺度测量反映患者的生活质量, 总积分从0-100, 较高积分反映较好的生活质量. 该量表对病情严重程度反映良好, 如Drossman等^[35]在对IBS-QOL纵向结构效度的评价研究表明, IBS-QOL应用于评价生活质量是敏感的, 可用于评价IBS的临床研究疗效. Schmulson等^[36]应用IBS-QOL对IBS生活质量的效度进行评价, 并发现墨西哥女性IBS患者生活质量比美国北卡罗来纳州女性IBS患者更低. 王伟岸等在1998年获得授权^[37], 将该量表进行汉化和文化调适, 发现该量表在我国也有很高的效度和可靠性, 对治疗的反应性较好^[38,39]. 李红缨

等^[40]将IBS-QOL应用于123例IBS患者的研究, 也认为该量表具有较好的稳定性, 可用于IBS患者的生活质量测量. 同时Patrick等^[34]发现IBS-QOL对腹泻型、便秘型、混合型的IBS分型缺乏判别力, 因此需要结合症状评价综合反映IBS病情严重性.

3.3 FDDQL FDDQL是Chassany等^[41]编制的专用于评价IBS和FD生活质量的量表, 含43个条目, 分8个维度, 即日常活动、忧虑、饮食、睡眠、不适、疾病处理、疾病控制和压力. 日常活动条目按5点分量表评分. 除应激外, 这些次级量表相加产生总的积分, 范围从0-100(较高积分代表较好的生活质量). 该量表已被翻译成多种语言, 适合对IBS和FD患者的生活质量进行评价. 由于目前IBS和FD被认为是两个独立的疾病, 然而1/3到2/3的IBS症状与FD重叠, 症状的分析并不能将二者分开, 因此对于这部分患者进行研究时采用该量表特别适合^[42]. 目前该量表已应用于临床药物随机对照试验, 其信度、效度已得到验证, 但同时发现该量表分数和腹痛严重程度相关性较差^[26].

3.4 IBSQ IBSQ是Wong等^[43]编制的IBS患者专用量表, 包括26个条目, 共4个维度, 即肠道症状、疲乏、活动受限和不良情绪. 条目的分数都是从1到7, 较高积分反映较好的生活质量. 可自评或由访谈者完成. 该量表在1-7分的区域中增加0.5分的刻度, 从而能更细微反映临床病情变化. 经临床应用显示适合于IBS生活质量的评价, 但由于缺乏足够验证和推广而应用并不多.

3.5 IBS-36 IBS-36是Groll等^[44]编制的IBS患者专用量表, 包括36个条目, 条目用7个点的尺度反应, 从0到6, 较低分数反映较好的生活质量. 专门为IBS患者自评设计. 通过与SF-36对比研究发现, 该量表具有较好的内部一致性和可靠性, 但目前应用也不多.

3.6 IBS中医证候量表 周福生等根据中医理论体系的特点, 将中医辨证分型与生活质量量表结合起来, 制定了IBS中医证候量表, 并应用于临床研究^[45-48]. 该量表以生存质量为观察指标, 从心理、社会、环境各方面对IBS患者进行综合评价, 并与SF-36、SCL-90相比较, 对其进行效度、信度及反应度进行检测. 该量表由肝郁脾虚证、脾胃虚弱证、脾肾阳虚证、脾胃阴虚证4个领域组成, 包括45个条目, 不同条目归属不同领域. 由于该量表具有西医辨病与中医辨证相结合的特点, 可同时评价IBS的中医证候变化

■ 相关报道

田建军等从我国人群背景出发, 研制与评价了慢性病患者生命质量测定量表体系之肠易激综合征量表(QLICD-IBS). 周福生等根据中医理论体系的特点, 将中医辨证分型与生活质量量表结合起来, 制定了IBS中医证候量表.

■应用要点

本文对常用的普适量表和专用量表的研究现状、优缺点及适用范围进行简要介绍,指出在拓展临床应用的同时,应合理选择和应用量表进行测评,以期促进生活质量评价在IBS中的深入研究,从而发挥其更大的作用。

和生活质量改变。该量表的不足是条目内容与中医辨证仍存在不符之处,加之IBS中医证候受地域、气候、体质、饮食、情志等诸多因素的影响,而且即使是同一患者的证型也是动态变化的,因此还有待改进。

3.7 QLICD-IBS 田建军等^[49]从我国人群背景出发,在系统开发QLICD的基础上,研制与评价了QLICD-IBS,该量表包括慢性病共性模块30个条目和IBS特异模块15个条目,其中特异模块包括为腹部胀痛、大便情况、心理生活影响等3个亚领域。各条目均采用5级评分法,等级越高生活质量越好。在对99例IBS患者住院前后进行生活质量测评研究表明,该量表能够反映出患者治疗前后生命质量的变化,具有较好的结构效度和信度,可适合我国IBS患者生活质量测评。

4 存在问题与展望

4.1 明确量表的优缺点及其合理选择 由于普适量表不针对特定疾病的影响,很难反映随时间或治疗过程中出现的较小但有意义的健康状况变化,所以缺乏反应度和敏感性是其主要缺点。如SF-36能较好反映IBS的总体生活质量,但不能很好地反映IBS的精神社会因素方面的特征,且可能会受到神经质、应对方式等混杂因素的干扰^[28,30]。专用量表是针对特定疾病制订的反映这类疾病特征的量表,灵敏度高,相关性好,但其所涵盖的内容侧重于与该疾病相关的领域,仅能比较同类患者的生活质量,不利于组间比较,如IBS-QOL对病情程度判别良好,但对腹泻为主、混合型、便秘为主的IBS患者没有判别力^[34]。因此,在临床应用中要严格把握量表的适用范围,如为比较IBS和其他慢性疾病对生活质量的影晌应选择SF-36等普适量表;如要观察某一治疗方法对IBS的疗效则宜选用IBSQOL、IBS-QOL等专用量表。临床应根据需要酌情选用,也可同时采用普适量表和专用量表进行测评,使得研究结果既有可比性又有针对性。

4.2 重视量表研制和引进的知识产权 生活质量研究已成为目前评价IBS相关疗效研究的重要内容,相应量表也得到不断开发和利用。为了推动生活质量评价工作在我国的开展,国内学者积极引进了国外经过多中心验证、跨文化适应好的量表,然后进行汉化和验证,甚至改良,以期更好地适应我国的文化特征和人群背景,如王伟岸等^[38,39]通过Drossman等引进的IBS-QOL应用于评价IBS生活质量及临床疗效。同时遵循

适应我国国情和文化的生活质量量表也得到开发研制,如田建军等^[49]研制的QLICD-IBS,官坤祥等^[48]研制的IBS中医证候量表。值得注意的是在借鉴、引用和引进量表研究的同时,必须强化知识产权意识,保护好量表的知识产权,从而能使量表的应用更为合理和广泛。

4.3 扩大人群研究层次 生活质量研究在我国起步相对较晚,还有许多问题有待解决。目前生活质量测量的IBS人群一般都以医院就诊的IBS患者作为研究对象,以疾病影响因素、健康状况评估、药效评价等为研究目的。而以社区、学校等更广泛人群中的IBS患者就诊率相对较低,开展的研究相对较少,因此针对社区等更广泛人群IBS生活质量的调查有待进一步深入研究。此外,IBS发病在各年龄人群有所不同,对生活质量的影晌也各不相同。老年IBS较其他年龄患者生活质量有不同程度下降,尤其在活力、总体健康、精神健康和躯体疼痛等方面更加明显^[50],小儿IBS患者则在生理机能、情感职能、社会功能等方面受到影晌较多^[51]。而以不同年龄IBS生活质量的研究开展相对较少,加强对不同年龄IBS患者生活质量的研究,可以发现其生活质量下降的突出领域,从而可以针对性更强地采取干预措施。

4.4 发挥中医药改善生活质量的优勢 由于IBS的发病机制涉及肠动力紊乱、内脏敏感性增高、脑-肠轴失调、肠道菌群失衡、肠道感染、社会-心理因素、炎症因子、胃肠道激素等多个方面^[52],因此在治疗上强调综合治疗和个体化治疗原则,采取包括饮食调整、心理干预和药物治疗在内的综合治疗方法。治疗的目标包括缓解症状和改善生活质量^[53]。对IBS的药物治疗,西医主要以对症治疗为主,能缓解患者的某个或某几个临床症状,提高生活质量,但缺乏长期疗效、耐受性和安全性的循证依据^[54]。近年来运用中医药治疗IBS取得了较大进展,总结出许多行之有效的治疗方法,显示了良好的应用前景。首先,运用中医学辨证论治和整体观念能做到治疗措施的个性化和综合性原则,既能针对IBS的躯体症状或心理反应,还能考虑到社会、心理、环境因素,做到全面分析,权衡缓急,心身同治;其次,中医学治病重视患者的个性特征和体质因素,通过指导饮食起居、劳逸结合、养生保健等,以进一步巩固疗效,减少IBS的复发;再次,运用中医七情致病理论指导中医药治疗情志病和中医学情志疗法的开展,既能通过

调理脏腑功能改善情志变化, 也能直接针对患者情志改变进行治疗; 最后, 在中医理论指导下进行中药复方和中药新药的研究, 既能通过调理脏腑(主要是肝、脾)改善症状及生活质量, 又能满足多靶点治疗的需要, 扩大临床应用。同时应开展设计良好的随机平行对照临床试验, 为中医治疗IBS提供高质量的临床证据, 从而有利于发挥中医药的优势。

5 结论

对IBS患者进行生活质量评价已经成为评判病情严重性以及治疗效果的重要指标, 普适量表和专用量表的研制开发为生活质量的评价提供了测评工具, 在实际工作中应根据需要选择合适的生活质量量表, 尽量使用一些经过多中心验证、跨文化适应好的量表, 以期为临床实践提供更为可靠的依据。

6 参考文献

- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR 3rd. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1910-1915
- Locke GR 3rd, Yawn BP, Wollan PC, Melton LJ 3rd, Lydick E, Talley NJ. Incidence of a clinical diagnosis of the irritable bowel syndrome in a United States population. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 1025-1031
- Schmulson M, Ortíz O, Santiago-Lomeli M, Gutiérrez-Reyes G, Gutiérrez-Ruiz MC, Robles-Díaz G, Morgan D. Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Dig Dis* 2006; 24: 342-347
- Vandvik PO, Lydersen S, Farup PG. Prevalence, comorbidity and impact of irritable bowel syndrome in Norway. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 650-656
- 陈世耀, 庄丽红. 肠易激综合征的流行病学. 现代消化及介入治疗 2007; 12: 91-93
- Chang FY, Lu CL. Irritable bowel syndrome in the 21st century: perspectives from Asia or South-east Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 4-12
- 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合征的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. 中华流行病学杂志 2000; 21: 26-29
- 尉秀清, 陈旻湖, 王锦辉, 胡品津. 广州市居民肠易激综合征及功能性便秘的流行病学调查. 中华内科杂志 2001; 40: 517-520
- 熊理守, 陈旻湖, 陈惠新, 许岸高, 王伟岸, 胡品津. 广东省社区人群肠易激综合征的流行病学研究. 中华医学杂志 2004; 84: 278-281
- 周建宁, 侯晓华, 刘南植, 朱尤庆, 罗和生, 许桦林. 武汉地区消化内科就诊患者肠易激综合征的发病情况. 胃肠病学 2006; 11: 356-358
- Dancey CP, Backhouse S. Towards a better understanding of patients with irritable bowel syndrome. *J Adv Nurs* 1993; 18: 1443-1450
- Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, Temple RD, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Janssens J, Funch-Jensen P, Corazzari E. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1569-1580
- Lea R, Whorwell PJ. Quality of life in irritable bowel syndrome. *Pharmacoeconomics* 2001; 19: 643-653
- 肖萍, 贾红. 生活质量评价在肠易激综合征中的运用. 西南军医 2009; 11: 107-109
- 高丽, 万崇华, 李晓梅. 慢性消化系统疾病生命质量测定量表研究概况. 国外医学·社会医学分册 2005; 22: 156-161
- 张沥, 李汀, 江梅, 余剑华, 左利平, 庄坤. 肠易激综合征患者SCL-90评定结果分析. 胃肠病学 2003; 8: A17
- 穆标, 王邦茂, 黄乃侠, 吴琳, 刘文天. 肠易激综合征患者的心理因素研究. 天津医科大学学报 2003; 9: 543-544
- Lackner JM, Gudleski GD, Zack MM, Katz LA, Powell C, Krasner S, Holmes E, Dorscheimer K. Measuring health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome: can less be more? *Psychosom Med* 2006; 68: 312-320
- Stewart AL, Hays RD, Ware JE Jr. The MOS short-form general health survey. Reliability and validity in a patient population. *Med Care* 1988; 26: 724-735
- Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 1992; 30: 473-483
- Ngo-Metzger Q, Sorkin DH, Mangione CM, Gandek B, Hays RD. Evaluating the SF-36 Health Survey (Version 2) in Older Vietnamese Americans. *J Aging Health* 2008; 20: 420-436
- Carver DJ, Chapman CA, Thomas VS, Stadnyk KJ, Rockwood K. Validity and reliability of the Medical Outcomes Study Short Form-20 questionnaire as a measure of quality of life in elderly people living at home. *Age Ageing* 1999; 28: 169-174
- Ware J Jr, Kosinski M, Keller SD. A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care* 1996; 34: 220-233
- Jenkinson C, Layte R, Jenkinson D, Lawrence K, Petersen S, Paice C, Stradling J. A shorter form health survey: can the SF-12 replicate results from the SF-36 in longitudinal studies? *J Public Health Med* 1997; 19: 179-186
- Stewart AL, Greenfield S, Hays RD, Wells K, Rogers WH, Berry SD, McGlynn EA, Ware JE Jr. Functional status and well-being of patients with chronic conditions. Results from the Medical Outcomes Study. *JAMA* 1989; 262: 907-913
- Whitehead WE, Crowell MD, Robinson JC, Heller BR, Schuster MM. Effects of stressful life events on bowel symptoms: subjects with irritable bowel syndrome compared with subjects without bowel dysfunction. *Gut* 1992; 33: 825-830
- Whitehead WE, Burnett CK, Cook EW 3rd, Taub E. Impact of irritable bowel syndrome on quality of life. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2248-2253
- Gralnek IM, Hays RD, Kilbourne A, Naliboff B, Mayer EA. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology* 2000; 119: 654-660
- 熊理守, 陈旻湖, 王伟岸, 陈惠新, 许岸高, 胡品津. 肠易激综合征患者生存质量的评价. 中华内科杂志 2004; 43: 356-359
- Hahn BA, Kirchdoerfer LJ, Fullerton S, Mayer E. Evaluation of a new quality of life questionnaire

■同行评价

本文选题较好, 对临床相关研究有一定的参考价值和指导意义。

- for patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 547-552
- 32 Hahn BA, Yan S, Strassels S. Impact of irritable bowel syndrome on quality of life and resource use in the United States and United Kingdom. *Digestion* 1999; 60: 77-81
 - 33 Amouretti M, Le Pen C, Gaudin AF, Bommelaer G, Frexinos J, Ruzsniowski P, Poynard T, Maurel F, Priol G, El Hasnaoui A. Impact of irritable bowel syndrome (IBS) on health-related quality of life (HRQOL). *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 241-246
 - 34 Patrick DL, Drossman DA, Frederick IO, DiCesare J, Puder KL. Quality of life in persons with irritable bowel syndrome: development and validation of a new measure. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 400-411
 - 35 Drossman DA, Patrick DL, Whitehead WE, Toner BB, Diamant NE, Hu Y, Jia H, Bangdiwala SI. Further validation of the IBS-QOL: a disease-specific quality-of-life questionnaire. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 999-1007
 - 36 Schmulson M, Ortiz O, Mejia-Arangure JM, Hu YB, Morris C, Arcila D, Gutierrez-Reyes G, Bangdiwala S, Drossman DA. Further validation of the IBS-QOL: female Mexican IBS patients have poorer quality of life than females from North Carolina. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2950-2955
 - 37 王伟岸, 胡品津. 生活质量评价与功能性胃肠病. *胃肠病学和肝病杂志* 2002; 11: 312-314
 - 38 王伟岸, 潘国宗, 钱家鸣. 难治性肠易激综合征的认知治疗. *中华内科杂志* 2002; 41: 156-159
 - 39 王伟岸, 潘国宗, 钱家鸣. 小剂量氟西汀治疗难治性肠易激综合征. *中华消化杂志* 2002; 22: 186-187
 - 40 李红缨, 高丽, 李宁秀. IBS-QOL专用量表在肠易激综合征患者中的运用. *中国循证医学杂志* 2004; 4: 875-877
 - 41 Chassany O, Marquis P, Scherrer B, Read NW, Finger T, Bergmann JF, Fraitag B, Geneve J, Caulin C. Validation of a specific quality of life questionnaire for functional digestive disorders. *Gut* 1999; 44: 527-533
 - 42 Cremonini F, Talley NJ. Review article: the overlap between functional dyspepsia and irritable bowel syndrome -- a tale of one or two disorders? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 7: 40-49
 - 43 Wong E, Guyatt GH, Cook DJ, Griffith LE, Irvine EJ. Development of a questionnaire to measure quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Surg Suppl* 1998; : 50-56
 - 44 Groll D, Vanner SJ, Depew WT, DaCosta LR, Simon JB, Groll A, Roblin N, Paterson WG. The IBS-36: a new quality of life measure for irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 962-971
 - 45 周福生, 张庆宏, 黄志新, 罗琦, 王建华. 胃肠功能性疾病中医疗效评价与生存质量关系初探. *中国中西医结合杂志* 2001; 21: 738
 - 46 周福生, 张庆宏, 黄志新. 顺激合剂治疗胃肠功能性疾病生存质量评价. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 10: 296-297
 - 47 周福生, 吴文江, 黄志新. 顺激合剂治疗肠易激综合征综合疗效观察. *广州中医药大学学报* 2002; 19: 269-271
 - 48 官坤祥, 吴文江, 周福生. 肠易激综合征中医证候量表的建立与评价. *吉林中医药* 2004; 24: 6-8
 - 49 田建军, 周曾芬, 万崇华, 段丽萍, 李红缨, 李晓梅, 张晓馨. 肠易激综合征患者生命质量测定量表研制及评价. *中国公共卫生* 2010; 26: 172-173
 - 50 陈新宇, 似健敏, 陈淑洁, 黄怀德, 戴一扬, 郑培奋, 郑和昕. 老年肠易激综合征患者临床流行病学特征及生活质量评价. *浙江医学* 2003; 25: 474-475
 - 51 Varni JW, Lane MM, Burwinkle TM, Fontaine EN, Youssef NN, Schwimmer JB, Pardee PE, Pohl JF, Easley DJ. Health-related quality of life in pediatric patients with irritable bowel syndrome: a comparative analysis. *J Dev Behav Pediatr* 2006; 27: 451-458
 - 52 张鸣鸣, 姜敏. 肠易激综合征发病机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2484-2490
 - 53 Brandt LJ, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, Schiller LR, Schoenfeld PS, Spiegel BM, Talley NJ, Quigley EM. An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009; 104 Suppl 1: S1-S5
 - 54 Heading R, Bardhan K, Hollerbach S, Lanias A, Fisher G. Systematic review: the safety and tolerability of pharmacological agents for treatment of irritable bowel syndrome--a European perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 207-236

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2011-01-08)

转染GKLF基因对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤的抑制作用

严辉, 陈卫昌, 岑建农, 沈宏杰, 郭凌川, 顾冬梅, 谢学顺

严辉, 陈卫昌, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006

岑建农, 沈宏杰, 江苏省血液研究所 江苏省苏州市 215006

郭凌川, 顾冬梅, 苏州大学附属第一医院病理科 江苏省苏州市 215006

谢学顺, 苏州大学脑神经研究所实验动物中心 江苏省苏州市 215006

严辉, 博士, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由严辉与陈卫昌设计; 研究操作过程由严辉、岑建农、沈宏杰、郭凌川、顾冬梅及谢学顺完成; 论文写作由严辉与陈卫昌完成。

通讯作者: 陈卫昌, 教授, 215006, 江苏省苏州市十梓街188号, 苏州大学附属第一医院消化科。weichangchen@126.com

电话: 0512-67780374

收稿日期: 2010-09-09 修回日期: 2010-10-25

接受日期: 2010-11-02 在线出版日期: 2011-01-08

GKLF transfection inhibits the growth of xenograft tumors derived from human gastric carcinoma cell line SGC-7901 in nude mice

Hui Yan, Wei-Chang Chen, Jian-Nong Cen, Hong-Jie Shen, Ling-Chuan Guo, Dong-Mei Gu, Xue-Shun Xie

Hui Yan, Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Jian-Nong Cen, Hong-Jie Shen, Jiangsu Institute of Hematology, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Ling-Chuan Guo, Dong-Mei Gu, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Xue-Shun Xie, Institute of Neurological Sciences, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, 188 Shizi Avenue, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. weichangchen@126.com

Received: 2010-09-09 Revised: 2010-10-25

Accepted: 2010-11-02 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of transfection of the gut-enriched Krüppel-like factor (GKLF) gene on the growth of xenograft tumors derived from human gastric carcinoma cell line SGC-7901 in nude mice and to explore the potential role of the GKLF gene in gastric carcinoma.

genesis.

METHODS: A recombinant plasmid carrying the GKLF gene (pcDNA3.1-GKLF) was transfected into SGC-7901 cells by lipofectin-mediated method. Cells stably expressing the GKLF gene were selected using G418. SGC-7901 cells untransfected and those transfected with empty pcDNA3.1 plasmid were used as controls. A xenograft tumor model was then established. Tumor growth was monitored. Tumor histopathological changes were determined by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of GKLF and Ki-67 proteins in xenograft tissue was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with the SGC7901-pcDNA3.1 and SGC-7901 groups, the period of latency was significantly lengthened in the SGC7901-pcDNA3.1-GKLF group (14.67 ± 3.08 d vs 8.33 ± 1.03 d, 8.67 ± 1.03 d, both $P < 0.05$). The weight of xenograft tumors in the SGC7901-pcDNA3.1-GKLF group was significantly lower than that in the SGC7901-pcDNA3.1 and SGC-7901 groups (4.46 ± 0.92 g vs 8.05 ± 1.66 g, 7.82 ± 1.14 g, both $P < 0.05$). The degree of tumor differentiation in the SGC7901-pcDNA3.1-GKLF group was better than that in the other two groups. Furthermore, the positive proportion of GKLF protein expression in xenograft tissue was increased while that of Ki-67 protein expression was decreased in the SGC7901-pcDNA3.1-GKLF group when compared with the other two groups ($4/6$ vs $2/6$, $2/6$; $1/6$ vs $4/6$, $4/6$).

CONCLUSION: Transfection of the GKLF gene inhibits the growth of subcutaneous xenograft tumors derived from SGC-7901 cell line in nude mice by down-regulating the expression of Ki-67. The GKLF gene is a potential target for gene therapy of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Gut-enriched Krüppel-like factor; SGC-7901; Transfection; Nude mouse

Yan H, Chen WC, Cen JN, Shen HJ, Guo LC, Gu DM, Xie

■背景资料

转录因子是一类具有重要功能的序列特异性DNA结合蛋白,他们通过激活或抑制其目标基因的转录来调控基因的时相性及细胞和组织特异性表达,而在细胞生长、分化、凋亡等生理过程的调节中担任重要角色。

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

■ 研究前沿

胃肠富集Krüppel样因子(GKLF)是Krüppel样转录因子家族的成员, GKLF与肿瘤间的关系是近年来研究的热点. 应用基因方法或以基因作为靶点来防治胃癌亦成为众多研究者关注的热点.

XS. GKLF transfection inhibits the growth of xenograft tumors derived from human gastric carcinoma cell line SGC-7901 in nude mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(1): 7-12

摘要

目的: 研究转染GKLF基因对人胃癌SGC-7901细胞裸鼠皮下移植瘤的作用, 探讨GKLF在胃癌中可能的作用机制.

方法: 将外源性重组真核质粒pcDNA3.1-GKLF转染到人胃癌细胞株SGC-7901内, 经G418筛选并建立高表达GKLF的稳定转染细胞株. 稳定表达该基因的细胞为SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组, 转染空质粒细胞及未处理细胞为对照组(SGC7901-pcDNA3.1组和SGC-7901组), 建立裸鼠荷瘤模型. 监测肿瘤生长状况、成瘤潜伏期, HE染色观察肿瘤病理学变化, 免疫组织化学法检测裸鼠皮下移植瘤组织内GKLF、Ki-67蛋白的表达.

结果: 与SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组相比, SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组成瘤潜伏期延长, 差异具有统计学意义($14.67 \pm 3.08 \text{ d}$ vs $8.33 \pm 1.03 \text{ d}$, $8.67 \pm 1.03 \text{ d}$, 均 $P < 0.05$). SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组皮下移植瘤质量低于SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组, 移植瘤生长受抑, 差异具有统计学意义($4.46 \pm 0.92 \text{ g}$ vs $8.05 \pm 1.66 \text{ g}$, $7.82 \pm 1.14 \text{ g}$, 均 $P < 0.05$). SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组中移植瘤细胞分化较SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组好, 皮下移植瘤组织内GKLF蛋白阳性表达比例升高($4/6$ vs $2/6$, $2/6$)、Ki-67蛋白阳性表达比例降低($1/6$ vs $4/6$, $4/6$).

结论: GKLF基因可能通过下调Ki-67的表达而抑制胃癌SGC-7901细胞裸鼠皮下移植瘤的生长, 以GKLF为靶点的基因治疗有潜在临床应用前景.

关键词: 胃癌; 胃肠富集Krüppel样因子; SGC-7901; 转染; 裸鼠

严辉, 陈卫昌, 岑建农, 沈宏杰, 郭凌川, 顾冬梅, 谢学顺. 转染GKLF基因对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 7-12
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/7.asp>

0 引言

转录因子是一类具有重要功能的序列特异性DNA结合蛋白, 他们通过激活或抑制其目标基因的转录来调控基因的时相性及细胞和组

织的特异性表达, 而在细胞生长、分化、凋亡等生理过程的调节中担任重要角色. 胃肠富集Krüppel样因子(gut-enriched Krüppel-like factor, GKLF)是Krüppel样转录因子家族的成员, GKLF与肿瘤间的关系是近年来研究的热点. 本研究将GKLF基因转染到人胃癌细胞株SGC-7901内, 建立了高表达GKLF蛋白的稳定转染细胞株, 然后将不同组的细胞接种于裸鼠皮下成瘤, 观察移植瘤生长状况和病理学变化, 检测移植瘤组织内GKLF、Ki-67蛋白表达, 初步探讨GKLF基因在胃癌中可能的作用机制, 为今后以GKLF为靶点的基因治疗提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901购于中科院上海细胞生物研究所, pcDNA3.1空质粒及pcDNA3.1-GKLF质粒由中国医学科学院肿瘤医院、分子肿瘤学国家重点实验室刘芝华教授惠赠. LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司, RPMI 1640购自美国Gibco BRL公司, GKLF一抗购自美国R&D公司, Ki-67一抗及SP试剂盒均购自福建迈新生物公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞转染与克隆化培养: 取对数生长期的SGC-7901细胞 2×10^5 重悬于含血清的RPMI 1640中, 转种于6孔板, 常规培养使细胞达80%-90%融合. 采用脂质体介导法将pcDNA3.1-GKLF质粒及pcDNA3.1空质粒各4 μg 分别转染SGC-7901细胞, 加入1.0 g/L的G418筛选, 同时用未转染的SGC-7901细胞作对照. 当对照细胞大部分死亡时, 再换0.6 g/L的G418筛选. 当对照细胞大部分死亡后, 挑取实验细胞的阳性克隆并扩大培养, 分别获得SGC7901-pcDNA3.1-GKLF和SGC7901-pcDNA3.1细胞.

1.2.2 荷瘤实验与分组: 健康纯种4-5周龄的BALB/C-nu/nu μ 裸鼠, 体质量16-20 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 在苏州大学无特定病原体级动物实验中心分笼饲养. 裸鼠18只, 各随机分成3组, 用安尔碘消毒裸鼠右肋腹前肢皮肤, 将3组细胞悬液(SGC-7901、SGC7901-pcDNA3.1和SGC7901-pcDNA3.1-GKLF)以每只 1×10^6 个/L接种于裸鼠, 每6只裸鼠接种同一组细胞.

1.2.3 裸鼠的一般情况和成瘤观察: 每天观察3组裸鼠的一般情况、摄食、活动能力. 每周用游标卡尺测量移植瘤的最大径(a)和最小径(b), 按公式 $V(\text{mm}^3) = a \times b^2/2$ 计算肿瘤的近似体积, 绘

制裸鼠的移植瘤生长曲线. 分别记录裸鼠皮下移植瘤结节达Φ2 mm的时间, 即成瘤潜伏期. 连续观察6 wk后, 采用颈椎脱位法处死裸鼠, 解剖并完整取出瘤块, 称瘤质量.

1.2.4 免疫组织化学法检测移植瘤组织中GKLF、Ki-67蛋白表达: 用40 g/L甲醛固定瘤块, 石蜡包埋、切片行HE染色. 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法步骤按说明书进行, PBS代替一抗作阴性对照, 胞核或胞质内有清晰棕色细颗粒为阳性细胞. 光镜下每例随机观察5个高倍视野, 每个视野计数100个细胞, 计数其中的阳性细胞. GKLF阳性判断标准采用半定量计分法^[1]: 依阳性细胞平均染色程度: 0分-无染色, 1分-淡黄色, 2分-棕色, 3分-深棕色; 依阳性细胞占总细胞的百分数: <10%为0分, 10%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; 两组评分相乘, ≤3分为阴性, ≥4分即为阳性. Ki-67染色阳性判断标准参照郑金锋等^[2]的方法, 依染色细胞数及强弱分类: (1)阴性(-): 阳性细胞数<25%, 染色较淡; (2)阳性(+~++): 阳性细胞数≥25%, 染色较强、清晰.

统计学处理 用医用SAS8.0统计软件进行分析、处理. 数据以mean±SD表示. 组间均数的比较采用单因素方差分析. 行*列表资料的率差别采用 χ^2 检验. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 裸鼠的一般情况和成瘤观察 SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组动物摄食少, 行动迟缓, 精神萎靡, 双眼微闭, 体型较瘦, 皮下脂肪减少; SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组动物上述症状较前两组轻. 本实验中, 无一只动物出现自然死亡.

在接种后的前2 wk, 皮下移植瘤的生长无明显差别; 2 wk以后差别逐渐明显, SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组皮下移植瘤生长较迅速, 肿瘤体积较大, SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组皮下移植瘤生长较缓慢, 肿瘤体积相对较小, SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组皮下移植瘤的体积增长明显滞后于SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图1).

SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组成瘤潜伏期较SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组长($14.67 \pm 3.08 \text{ d}$ vs $8.33 \pm 1.03 \text{ d}$, $8.67 \pm 1.03 \text{ d}$), SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组成瘤时间被明显推迟($F=10.78$, $P=0.0039$).

连续观察6 wk后处死裸鼠, 取出瘤块, 称瘤

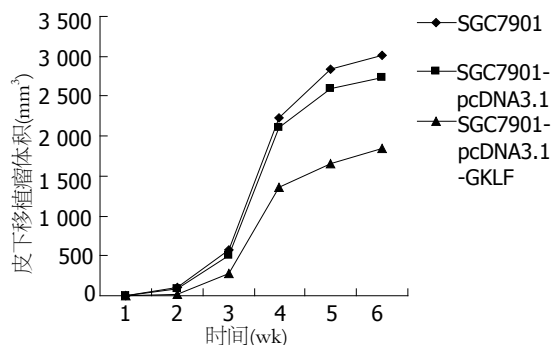


图1 3组裸鼠胃癌皮下移植瘤模型的生长曲线.

质量. SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组瘤质量较SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组轻, 差异有统计学意义($4.46 \text{ g} \pm 0.92 \text{ g}$ vs $8.05 \text{ g} \pm 1.66 \text{ g}$, $7.82 \text{ g} \pm 1.14 \text{ g}$, $F=19.14$, $P=0.0005$).

2.2 皮下移植瘤组织HE染色特点 SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组: 癌细胞呈巢状、弥漫分布、间质稀少、血窦丰富、极性丧失、分化差、胞质丰富、核分裂易见、核仁明显、可见1-2个中位核仁. SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组: 癌细胞呈岛状、腺泡样排列、间质丰富、血窦稀少、分化较好、胞质空淡、核分裂可见、小核仁或部分核仁不明显(图2).

2.3 皮下移植瘤组织中GKLF、Ki-67蛋白的表达 GKLF阳性染色定位于胞核或胞质, SGC-7901和SGC7901-pcDNA3.1组阳性细胞分布较稀且染色淡, SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组阳性细胞分布较密集, 染色深(图3). SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组GKLF阳性表达比例高于SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组(4/6、2/6、2/6).

Ki-67阳性染色定位于胞核, SGC-7901和SGC7901-pcDNA3.1组阳性细胞分布较广且染色较深, 而SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组阳性细胞分布相对比较散在, 且染色也比较淡(图4). SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组中Ki-67蛋白阳性表达比例低于SGC-7901组和SGC7901-pcDNA3.1组(1/6、4/6、4/6).

3 讨论

胃癌发病率占消化系统恶性肿瘤的首位, 传统的治疗方法有手术、化放疗等, 但由于放化疗不良反应大、肿瘤多药耐药等问题, 且这些疗法对患者的免疫系统产生不同程度的打击和损害, 疗效不理想. 随着分子遗传学和分子生物学的不断发展, 以及基因工程技术的不断进步, 应用基因方法或以基因作为靶点来防治胃癌亦成

■ 相关报道

国内外研究表明, 结直肠癌、肝癌、膀胱癌中GKLF的表达明显下调, GKLF蛋白的表达程度与肿瘤病理分级呈负相关.

■创新盘点

目前有关GKLF基因与胃癌间的研究报道少见,国内研究多局限于其与临床病理间的关系。本实验将重组质粒pcDNA3.1-GKLF转染到人胃癌细胞株SGC-7901中,并建立了高表达GKLF的稳定转染细胞株,同时观察GKLF基因转染对人胃癌裸鼠皮下移植瘤生长、转移的影响,国内未见报道。

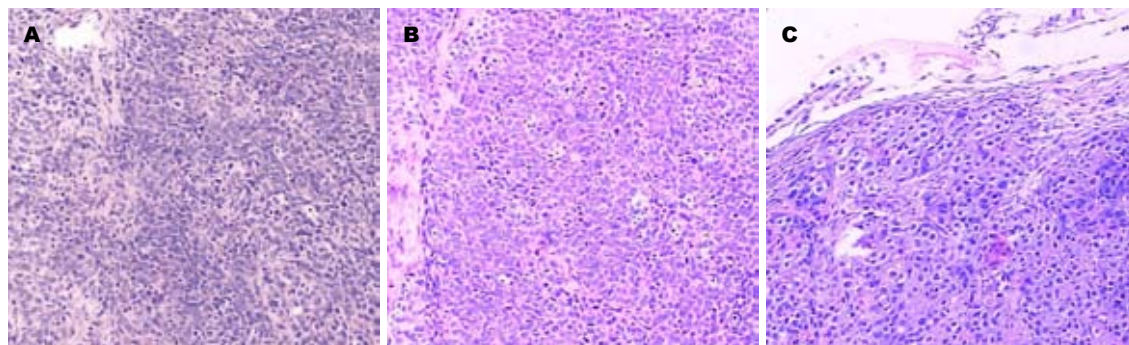


图2 HE示3组皮下移植瘤(×100). A: SGC-7901组; B: SGC7901-pcDNA3.1组; C: SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组.

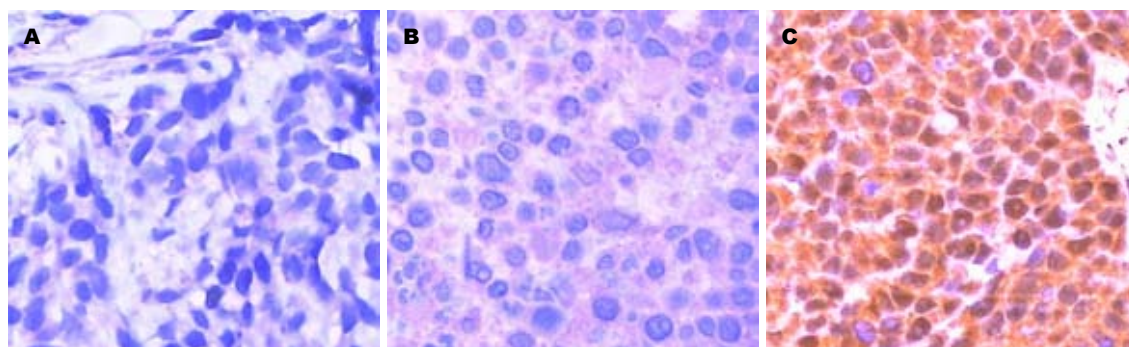


图3 IHC法示3组皮下移植瘤组织中GKLF蛋白的表达(×400). A: SGC-7901组; B: SGC7901-pcDNA3.1组; C: SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组.

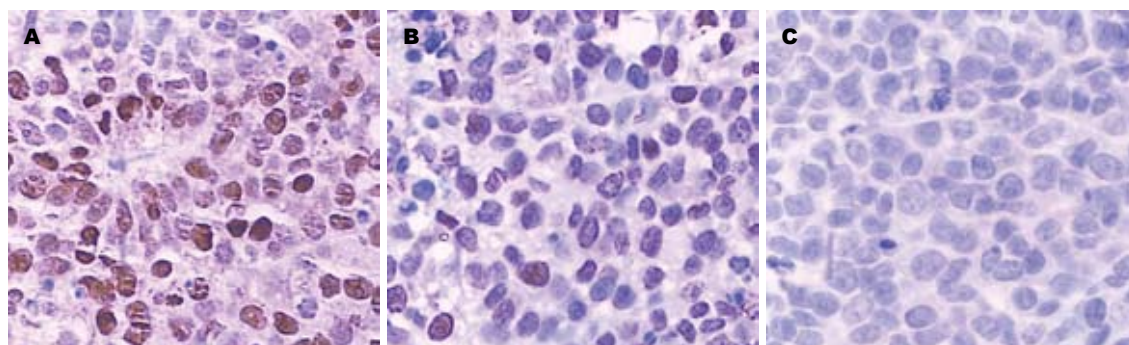


图4 IHC法示3组皮下移植瘤组织中Ki-67蛋白的表达(×400). A: SGC-7901组; B: SGC7901-pcDNA3.1组; C: SGC7901-pcDNA3.1-GKLF组.

为众多研究者关注的热点^[3]。

Krüppel样因子(Krüppel-like factor, KLF)是一类结合DNA的锌指转录因子,该家族蛋白的独特之处是含3个高度保守的锌指,每两个锌指之间含有残基, KLF识别并结合“GC”盒或“CACCC元素”,因此他们行为的特异性取决于不同的氨基末端和/或组织特异性表达。迄今已发现17种哺乳类KLF,按发现先后分别命名为KLF1-KLF17^[4]。KLF中各成员分布不同,结构存在一定的差异,功能也各异。

GKLF是KLF的成员之一,在其家族中亦被

称为KLF4,在细胞的正常生长分化和恶性肿瘤形成过程中具有重要作用。人类GKLF于1998年通过DNA探针,该探针含人胚胎红细胞Krüppel样因子(EKLF, KLF1)锌指区域,从人脐静脉内皮细胞cDNA文库中被发现。人GKLF基因定位于染色体9q31,涵盖6.3 kb的区域,含有5个外显子,对人脐静脉内皮细胞和其他细胞RNA行Northern blot分析显示GKLF转录区域长约3.5 kb^[5-9]。其cDNA编码区长度为1 413 bp,编码1个由470个氨基酸残基组成的多肽^[5]。GKLF主要表达在胃肠道和皮肤分化层中,故得名为GKLF^[10]。GKLF

在皮肤、肺、胃肠道等上皮性来源的组织中含量丰富, 尤其在正常上皮的上层分化细胞中表达高, 而在基底层快速生长的细胞中表达很低, 在上皮各层形成GKLF表达梯度, 表明其参与上皮细胞的分化^[11].

近年研究发现GKLF与肿瘤的发生密切相关, 其在肿瘤中的表达具有类型特异性: 如在食道鳞癌、结直肠癌、肝癌、膀胱癌、肺癌中GKLF的表达明显下调^[12-16], 而在口腔鳞癌和乳腺癌中表达却是上升的^[17,18]. 在乳腺癌细胞生长抑制试验中, 发现GKLF的表达加强了原癌基因*c-myc*的转录表达, 这可能是乳腺癌细胞生长和进程的重要因素^[19]. GKLF的细胞核定位与乳腺癌早期侵袭性有关^[20]. GKLF在子宫内膜癌中表达下调, 子宫内膜癌的病理分期愈晚, 其GKLF表达强度愈低; 随着病理分级的增高, GKLF的表达强度逐渐下降, GKLF的表达与子宫内膜癌的侵袭转移和预后有关^[21]. GKLF在肝癌中的表达程度与其病理分级亦呈负相关^[14].

肿瘤组织中GKLF表达下调的具体机制尚不清楚. 有研究发现手术切除的结肠直肠癌标本和结肠直肠癌细胞株中, 部分标本GKLF的开放读码框有点突变及5'非翻译区甲基化导致GKLF的表达下降^[22]. 也有学者认为GKLF基因的甲基化并非引起GKLF下调的原因, 同源异型盒转录因子2(caudal type homeo box transcription factor 2, CDX2)的异常表达和腺瘤样结肠息肉易感基因(adenomatous polyposis coli, APC)可能参与GKLF的下调^[23]. APC诱导GKLF的表达, 这种诱导依赖于有功能的CDX2对GKLF启动子激活的能力, 而以前的研究已证实CDX2是受APC激活的. 因此, 推测这3个蛋白可能构成一个肠细胞特异的肿瘤抑制通路的一部分: APC→CDX2→GKLF→抑制DNA合成→细胞周期阻滞→生长抑制. GKLF通过激活或抑制其下游目的基因的转录表达, 参与细胞增殖、分化及生长周期的调控^[24-27], 该调控作用与肿瘤的发生和进展关系密切.

我们的前期实验研究显示: 胃癌组织和胃癌细胞株中存在GKLF基因的表达显著下调^[28,29]. 在此基础上, 我们采用阳离子脂质体LipofectamineTM2000将外源性重组真核质粒pcDNA3.1-GKLF转染到人胃癌细胞株SGC-7901内, 并建立了稳定转染的细胞株. 结果显示: 转染GKLF基因可延缓裸鼠皮下移植瘤的形成时间、降低移植瘤生长速度和规模、降

低肿瘤的恶性度. 通过进一步检测皮下移植瘤组织中GKLF、Ki-67蛋白表达水平发现: 转染GKLF基因使Ki-67的表达下调. 而Ki-67抗原是存在于增殖细胞核的一种非组蛋白性核蛋白, 是与细胞增殖相关的核抗原^[30]. 由此我们推测Ki-67可能是GKLF基因的下游基因, GKLF基因可能通过下调Ki-67的表达来抑制肿瘤生长. 但GKLF基因具体作用的分子生物学机制及信号传导途径尚有待深入研究. GKLF可以作为胃癌基因治疗的一种新靶向基因, 在将来的临床应用中发挥一定作用.

4 参考文献

- 1 Wang L, Wei D, Huang S, Peng Z, Le X, Wu TT, Yao J, Ajani J, Xie K. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6371-6380
- 2 郑金锋, 曹永成, 耿明, 刘莹. 钙粘素、Ki67和p16在人脑胶质瘤中的表达及意义. *中国临床神经外科杂志* 2006; 11: 473-475
- 3 Carneiro F, Oliveira C, Leite M, Seruca R. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Semin Diagn Pathol* 2008; 25: 274-287
- 4 van Vliet J, Crofts LA, Quinlan KG, Czolij R, Perkins AC, Crossley M. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics* 2006; 87: 474-482
- 5 Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME. Human EZF, a Krüppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* 1998; 273: 1026-1031
- 6 Jenkins TD, Opitz OG, Okano J, Rustgi AK. Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr virus ED-L2 promoters by gut-enriched Krüppel-like factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 10747-10754
- 7 Shie JL, Chen ZY, O'Brien MJ, Pestell RG, Lee ME, Tseng CC. Role of gut-enriched Krüppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G806-G814
- 8 Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 1996; 271: 20009-20017
- 9 Song A, Patel A, Thamtrakoln K, Liu C, Feng D, Clayberger C, Krensky AM. Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Krüppel-like transcription factor of activated T lymphocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 30055-30065
- 10 Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 31384-31390
- 11 Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC, Wu TT, Huang S, Xie K. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res* 2005; 65: 2746-2754
- 12 Luo A, Kong J, Hu G, Liew CC, Xiong M, Wang

■应用要点

GKLF基因可能通过下调Ki-67的表达而抑制胃癌SGC-7901细胞裸鼠皮下移植瘤的生长, 以GKLF为靶点的基因治疗有潜在临床应用前景.

■同行评价

本文设计合理, 为胃癌的基因治疗提供新思路, 具有潜在的临床应用前景。

- 13 Xu J, Lü B, Xu F, Gu H, Fang Y, Huang Q, Lai M. Dynamic down-regulation of Krüppel-like factor 4 in colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 891-898
- 14 房新辉, 杨玉秀, 韩双印, 白阳秋, 张立达, 田宏杰. 肝癌组织中KLF4的表达及意义. *山东医药* 2009; 49: 4-6
- 15 Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, Haga K, Asaka M, Ramirez F, Yoshida T. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 251-256
- 16 Bianchi F, Hu J, Pelosi G, Cirincione R, Ferguson M, Ratcliffe C, Di Fiore PP, Gatter K, Pezzella F, Pastorino U. Lung cancers detected by screening with spiral computed tomography have a malignant phenotype when analyzed by cDNA microarray. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6023-6028
- 17 Huang CC, Liu Z, Li X, Bailey SK, Nail CD, Foster KW, Frost AR, Ruppert JM, Lobo-Ruppert SM. KLF4 and PCNA identify stages of tumor initiation in a conditional model of cutaneous squamous epithelial neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1401-1408
- 18 Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE, Ruppert JM. Increase of GKLF messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 6488-6495
- 19 Zhang L, Wali A, Ramana CV, Rishi AK. Cell growth inhibition by okadaic acid involves gut-enriched Kruppel-like factor mediated enhanced expression of c-Myc. *Cancer Res* 2007; 67: 10198-10206
- 20 Pandya AY, Talley LI, Frost AR, Fitzgerald TJ, Trivedi V, Chakravarthy M, Chhieng DC, Grizzle WE, Engler JA, Krontiras H, Bland KI, LoBuglio AF, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2709-2719
- 21 刘红, 崔竹梅, 李玉军, 刘芝华. 子宫内膜癌组织锌指蛋白KLF4的表达及临床意义. *山东医药* 2005; 45: 29
- 22 Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbini BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004; 23: 395-402
- 23 Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, Katz JP, Kaestner KH, Yang VW. Haploinsufficiency of Krüppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 7147-7154
- 24 Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Krüppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 2969-2976
- 25 Brembeck FH, Rustgi AK. The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. *J Biol Chem* 2000; 275: 28230-28239
- 26 Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, Hirai H, Katz JP, Haspel RL, Gray S, Akashi K, Segre J, Kaestner KH, Tenen DG, Jain MK. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J* 2007; 26: 4138-4148
- 27 Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 1074-1082
- 28 吴晓英, 陈卫昌. 人胃腺癌组织中KLF4表达及临床意义. *苏州医学* 2008; 31: 71-75
- 29 严辉, 陈卫昌, 吴晓英, 顾冬梅, 郭凌川, 康苏娅. 胃癌细胞和胃癌组织中GKLF、IKLF表达及临床意义. *江苏医药* 2010; 36: 30-33
- 30 Okimura A, Hirano H, Nishigami T, Ueyama S, Tachibana S, Fukuda Y, Yamanegi K, Ohyama H, Terada N, Nakasho K. Immunohistochemical analyses of E-cadherin, beta-catenin, CD44s, and CD44v6 expressions, and Ki-67 labeling index in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and associated invasive carcinomas. *Med Mol Morphol* 2009; 42: 222-229

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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

鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的防治作用

艾志波, 张荣华, 闫国和

艾志波, 张荣华, 中国人民解放军第三军医大学西南医院中西医结合科 重庆市 400038

闫国和, 中国人民解放军第三军医大学军事预防医学院 全军复合伤研究所 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆市 400038

艾志波, 2008级硕士研究生, 主要从事中西医结合防治肝纤维化方面的研究。

重庆市中医药科研基金资助项目, No. 2008-2-73

作者贡献分布: 张荣华与艾志波对此文所作贡献均等; 此课题由张荣华、艾志波及闫国和设计; 研究过程及数据分析由艾志波与闫国和操作完成; 本论文写作由艾志波、张荣华及闫国和完成。

通讯作者: 张荣华, 主任医师, 400038, 重庆市高滩岩30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院中西医结合科。

zhrhlggg@163.com

电话: 023-68754136

收稿日期: 2010-09-28 修回日期: 2010-11-20

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2011-01-08

A modified recipe of Turtle Shell Decoction reduces experimental hepatic fibrosis in rats

Zhi-Bo Ai, Rong-Hua Zhang, Guo-He Yan

Zhi-Bo Ai, Rong-Hua Zhang, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Guo-He Yan, Institute of Combined Injury, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by: the Program of Scientific Research of Traditional Chinese Medicine of Chongqing, No. 2008-2-73

Correspondence to: Rong-Hua Zhang, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, 30 Gaotanyan Avenue, Chongqing 400038, China. zhrhlggg@163.com

Received: 2010-09-28 Revised: 2010-11-20

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of treatment with a modified recipe of Turtle Shell Decoction (MRTSD) on the expression of TGF- β 1 and Smad 3/7 in experimental hepatic fibrosis in rats, and to explore its anti-fibrotic mechanism.

METHODS: Ninety Sprague-Dawley adult rats were used in this study, 10 of which were randomly selected as normal controls (A), and the rest were used to induce hepatic fibrosis by

multiple subcutaneous injections of 40% carbon tetrachloride (CCl_4 , 3 mL/kg) for 8 wk. At week 2, five rats were executed to confirm the formation of liver fibrosis, and the rest of rats were randomly and equally divided into pathological model group (B), high-dose [28.4 g/(kg·d)] MRTSD group (C), medium-dose [14.2 g/(kg·d)] MRTSD group (D), low-dose [7.1 g/(kg·d)] MRTSD group, and Fufang Biejia Ruangan Tablet-treated group [F, 0.6 g/(kg·d)]. Drugs were intragastrically administrated at a volume of 10 mL/(kg·d) in groups C-E, whereas the rats of groups A and B were given the same volume of physiological saline. At week 8, serum levels of ALT, AST, albumin, and globulin were measured. The formation of hepatic fibrosis was confirmed by HE staining. The protein expression of TGF- β 1 and Smad 3/7 in liver tissue was detected by Western blot.

RESULTS: In groups C-F at week 8, the structure of liver lobules was almost restored to normal; HF score was obviously reduced; the contents of ALT and AST were significantly decreased ($P < 0.01$); the content of albumin was significantly increased ($37.85 \text{ g/L} \pm 3.08 \text{ g/L}$, $38.25 \text{ g/L} \pm 1.90 \text{ g/L}$, $38.13 \text{ g/L} \pm 1.50 \text{ g/L}$, $38.09 \text{ g/L} \pm 3.27 \text{ g/L}$ vs $27.05 \text{ g/L} \pm 4.81 \text{ g/L}$, all $P < 0.01$); the protein expression of TGF- β 1 and Smad 3 was remarkably down-regulated (TGF- β 1: 0.127 ± 0.014 , 0.122 ± 0.051 , 0.126 ± 0.027 , 0.119 ± 0.020 vs 0.332 ± 0.074 , all $P < 0.01$; Smad 3: 0.415 ± 0.057 , 0.427 ± 0.074 , 0.425 ± 0.080 , 0.432 ± 0.075 vs 0.527 ± 0.054 , all $P < 0.01$); and the expression of Smad 7 was significantly up-regulated (0.308 ± 0.077 , 0.326 ± 0.086 , 0.315 ± 0.071 , 0.348 ± 0.065 vs 0.185 ± 0.059 , all $P < 0.01$) when compared with group B. There were no significant differences in the above parameters between MRTSD- and Fufang Biejia Ruangan Tablet-treated groups.

CONCLUSION: MRTSD can reverse CCl_4 -induced liver fibrosis in rats possibly by regulating the protein expression of TGF- β 1 and Smad 3/7.

Key Words: Modified recipe of Turtle Shell Decoction; Hepatic fibrosis; Transforming growth factor

■背景资料

中医药治疗肝纤维化源远流长, 疗效显著。目前关于肝纤维化发生、发展及逆转的现代生物机制的研究取得了较大进展。用现代生物技术阐释中医药的治疗机制是中医药现代化的有效途径。

■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

■研发前沿

TGF- β 1/Smads信号传导途径是肝纤维化形成最重要的调控机制之一,其传导过程已基本明确,中药复方的治疗优势在于多靶点、多途径的整合作用,扶正祛邪,兼顾彼此,从中医药中寻求对该信号通路有干预作用的药物是当前重要的研究热点。

beta; Smad3; Smad7

Ai ZB, Zhang RH, Yan GH. A modified recipe of Turtle Shell Decoction reduces experimental hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 13-18

摘要

目的: 研究鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化(HF)的防治作用及对TGF- β 1和Smad3/7蛋白表达的影响,探讨其机制。

方法: SD δ 大鼠90只,随机取10只作为正常对照组(A组),其余大鼠用皮下注射40% CCl₄橄榄油油剂3 mL/kg诱导大鼠肝纤维化模型8 wk,于第2周时随机处死5只大鼠证实HF形成后,将剩下的大鼠随机分为肝纤维化模型组(B组)、鳖甲煎改良方高剂量组[C组, 28.4 g/(kg·d)]、中剂量组[D组, 14.2 g/(kg·d)]、低剂量组[E组, 7.1 g/(kg·d)]、复方鳖甲软肝片组[F组, 0.6 g/(kg·d)],每组15只。C、D、E、F组给予10 mL/(kg·d)相应药液灌胃治疗, A、B组同时给予等剂量的生理盐水灌胃处理。8 wk后采血测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、草氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白和球蛋白含量;取肝组织作HE染色观察肝纤维化程度变化;Western blot方法检测TGF- β 1、Smad3和Smad7蛋白的表达。

结果: 8 wk后,与B组比较, C、D、E组和F组肝小叶结构破坏明显减轻,肝纤维化程度分级较B组明显好转; ALT和AST含量显著降低($P<0.01$),白蛋白含量显著增加($37.85 \text{ g/L} \pm 3.08 \text{ g/L}$, $38.25 \text{ g/L} \pm 1.90 \text{ g/L}$, $38.13 \text{ g/L} \pm 1.50 \text{ g/L}$, $38.09 \text{ g/L} \pm 3.27 \text{ g/L}$ vs $27.05 \text{ g/L} \pm 4.81 \text{ g/L}$, 均 $P<0.01$); TGF- β 1、Smad3蛋白表达显著减少(TGF- β 1: 0.127 ± 0.014 , 0.122 ± 0.051 , 0.126 ± 0.027 , 0.119 ± 0.020 vs 0.332 ± 0.074 , 均 $P<0.01$; Smad3: 0.415 ± 0.057 , 0.427 ± 0.074 , 0.425 ± 0.080 , 0.432 ± 0.075 vs 0.527 ± 0.054 , 均 $P<0.01$), Smad7蛋白的表达明显增加(0.308 ± 0.077 , 0.326 ± 0.086 , 0.315 ± 0.071 , 0.348 ± 0.065 vs 0.185 ± 0.059 , 均 $P<0.01$),且C、D、E组和F组间疗效比较无明显差异。

结论: 鳖甲煎改良方能够显著减轻CCl₄导致的大鼠肝纤维化程度,其作用机制可能与鳖甲煎改良方调控TGF- β 1和Smad3/7信号转导蛋白表达有关。

关键词: 鳖甲煎改良方; 肝纤维化; 转化生长因子 β 1; Smad3; Smad7

艾志波, 张荣华, 闫国和. 鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的防治

作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 13-18

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/13.asp>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是多种慢性肝病向肝硬化发展的共同病理过程,是慢性肝病发展到肝硬化的必经病理阶段,防治HF是攻克肝硬化的突破口,从中医药中寻求有效的治疗方法具有重要意义。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)是一类调节细胞生长和分化的多肽,具有活化肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)^[1],促进肝脏胶原基因表达,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成等作用,是最重要的促HF因子之一^[2,3]。为探讨鳖甲煎改良方防治HF作用,我们采用CCl₄中毒诱导的大鼠HF模型,研究鳖甲煎改良方对大鼠HF的防治作用及对TGF- β 1和Smad3/7蛋白表达情况,探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 δ SD大鼠90只, SPF级, 体质量190-210 g, 由中国人民解放军第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。鳖甲煎改良方由土鳖虫10 g、鳖甲15 g、柴胡10 g、黄芩12 g、半夏15 g、茵陈15 g、桂枝10 g、桃仁10 g、茯苓15 g、黄芪15 g、白芍15 g等组成,用传统方法蒸馏水浸泡1 h、煎煮(先煎鳖甲、土鳖虫)、过滤、浓缩、制成煎剂,每毫升含生药2.84 g、1.42 g和0.71 g,由西南医院药剂科煎制提供,复方鳖甲软肝片为内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司产品,批号: 20090107,用蒸馏水配制成水溶剂,使每毫升含生药0.06 g; CCl₄, 分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号: 20090115; 橄榄油,化学纯,四川天源油橄榄有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模: CCl₄与橄榄油以4:6(V/V)配制成40%油剂,首剂5 mL/kg体质量大鼠背部皮下注射,以后按3 mL/kg体质量重复注射,每隔2 d重复注射1次,共8 wk。

1.2.2 分组及给药: 随机取10只作为正常对照组(A组),相同部位皮下注射等量橄榄油溶液,其余大鼠复制HF模型,与第2周时随机处死5只取肝组织作HE染色观察HF程度,证实HF中度形成,余下造模大鼠75只随机分5组,各15只,分别为HF模型组(B组)、鳖甲煎改良方高(C组)、中(D组)、低(E组)剂量组,灌胃剂量为28.4 g/(kg·d)、

表 1 各组大鼠肝功能变化 (mean ± SD)

分组	n	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	球蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)
A组	10	36.72 ± 7.63	36.53 ± 6.79	33.85 ± 1.85	42.68 ± 4.42
B组	15	611.21 ± 37.27 ^b	462.14 ± 28.05 ^b	33.90 ± 4.75	27.05 ± 4.81 ^b
C组	15	186.62 ± 23.82 ^{bdf}	156.57 ± 24.98 ^{bdf}	33.05 ± 3.75	37.85 ± 3.08 ^{bdf}
D组	15	174.73 ± 39.52 ^{bdf}	136.93 ± 14.08 ^{bdf}	30.45 ± 3.22	38.25 ± 1.90 ^{bdf}
E组	15	153.82 ± 18.44 ^{bdf}	167.80 ± 18.62 ^{bdf}	34.21 ± 5.92	38.13 ± 1.50 ^{bdf}
F组	15	130.82 ± 18.10 ^{bd}	180.30 ± 132.65 ^{bd}	31.30 ± 4.61	38.09 ± 3.27 ^{bd}

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

14.2 g/(kg·d)、7.1 g/(kg·d), 分别为临床成人用量的12倍、6倍和3倍, 各组剂量选择参考文献[4]的方法, 复方鳖甲软肝片组(F组), 灌胃剂量0.6 g/(kg·d), 相当于临床用量0.1 g/(kg·d)的6倍. 治疗6 wk, 各组灌胃体积皆为10 mL/(kg·d), A、B组同时给予等量生理盐水灌胃处理.

1.2.3 标本采集: 8 wk后, 大鼠禁食12 h, 称量体质量, 3%戊巴比妥钠腹腔注射1 mL/kg麻醉, 经股动脉放血, 分离血清, -20 °C保存, 取肝右叶同一部位组织, 一部分用100 mL/L甲醛溶液固定作常规组织病理学观察, 另一部分用锡箔纸包裹储存于液氮罐中, 用Western blot检测.

1.2.4 指标检测: 应用EX7全自动生化测定仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、草氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白(albumin)、球蛋白(globulin)含量.

1.2.5 组织纤维化检测: 取肝右叶同一部位组织用100 mL/L甲醛溶液固定, 常规(HE)染色制片, 镜检观察肝细胞变性、胶原纤维增生程度和组织形态学变化. 用定量及半定量法记分评价: 0分, 肝细胞无病变, 肝脏正常或无明显胶原纤维增生; 1分, 变性的肝细胞占全部肝细胞比例<25%, 胶原纤维增生, 中央静脉和汇管区有少量纤维延伸, 但无间隔形成; 2分, 变性的肝细胞占全部肝细胞比例25%-50%, 胶原纤维明显增生, 中央静脉和汇管区结缔组织变厚, 由此四周伸出纤维索, 形成不完全间隔; 3分, 变性的肝细胞占全部肝细胞比例50%-75%, 胶原纤维大量增生, 有个别完全间隔或较厚的不完全间隔形成假小叶; 4分, 变性的肝细胞占全部肝细胞比例>75%, 完全间隔较厚, 假小叶大量形成.

1.2.6 Western blot检测TGF-β1、Smad3、Smad7蛋白表达: 取液氮罐中保存肝组织各组50 mg分别用Western及IP细胞裂解液(货号: P0013, 碧云

天)按照说明书步骤提取各组总蛋白, 用BCA蛋白浓度测定盒(货号: P0010S, 碧云天)在酶标仪中测定各组浓度后, 计算加入5×SDS-PAGE上样缓冲液(货号: P0015, 碧云天)及蒸馏水比例, 使各组蛋白浓度调整一致, 均为5 kg/L, 95 °C变性5 min后4 °C保存, 等量上样进行SDS-PAGE, 电泳完毕, 将凝胶中的蛋白转移至PVDF膜上, PVDF膜以含5%脱脂奶粉的PBST溶液室温封闭2 h, 分别加入抗TGF-β1抗体1:100(Santa Cruz, sc-146)、抗Smad3抗体1:200(Santa Cruz, sc-101154)和抗Smad7抗体1:400(Abcam, ab90086), 4 °C孵育过夜, 二抗(1:1 000, 碧云天)37 °C孵育1 h, 将化学发光试剂盒(P0018, 碧云天)中A和B试剂等比例混匀加至膜上反应数分钟, 显影, 定影, 拍照. 条带图像用美国BioRad公司Quantity One 4.0图像分析软件分析吸光度值.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件, 数据以mean±SD表示, 进行组间方差分析, 以*P*<0.05为有统计学差异.

2 结果

2.1 鳖甲煎改良方对实验大鼠肝功能的影响 B、C、D、E和F组ALT和AST含量显著高于A组(*P*<0.01), 且B组最高, 显著高于其他各组(*P*<0.01), 白蛋白含量则明显低于A组(*P*<0.01), B组更低于其他各组(*P*<0.01); C、D、E组间比较无统计学意义, 但与F比较有显著差异(*P*<0.01); 各组球蛋白含量比较均无显著性差异(表1).

2.2 各组HF程度比较 光镜观察: A组肝小叶结构完整清晰, 呈条索状向四周放射排列, 无脂肪变性及坏死, 汇管区无明显纤维组织增生及炎症细胞浸润, 肝细胞正常, 核圆形, 核仁清晰可见, 中央静脉及汇管区结缔组织未见增生. B组大部分正常肝小叶结构破坏或消失, 肝组织大片脂肪变性、坏死, 呈空网状, 仅残存少量肝细胞,

■相关报道

有关文献报道HSC的激活主要与Smad3有关, 针对Smad3的靶向治疗也取得显著疗效.

■创新盘点

从胞内信号转导层面,运用分子生物学技术,研究鳖甲煎改良方对肝纤维化大鼠肝组织和细胞内信号转导的影响,探讨其抗肝纤维化作用机制,充分发挥了中医药和现代技术的各自优势.

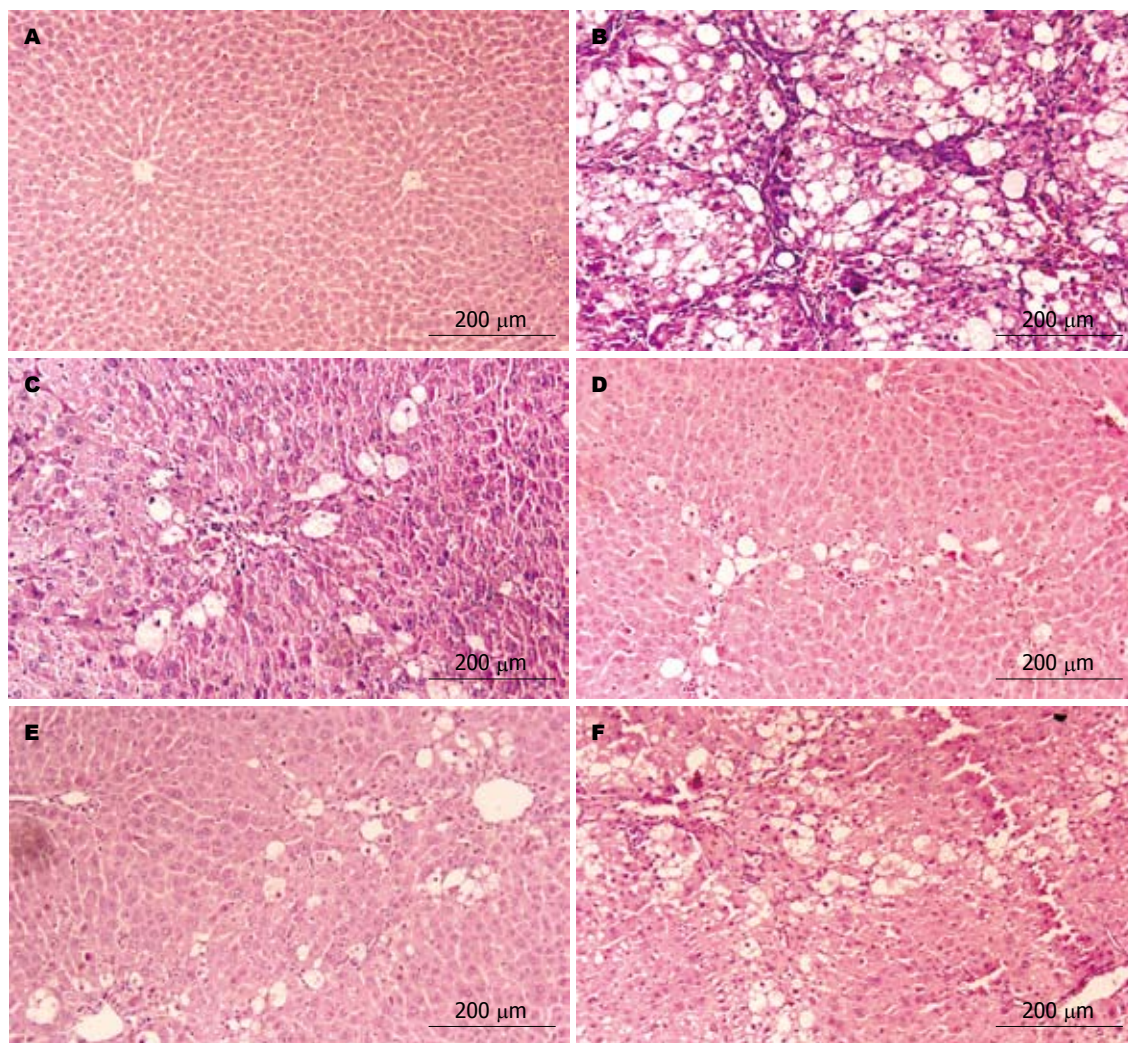


图1 各组大鼠肝组织病理学观察(HE×200). A: A组; B: B组; C: C组; D: D组; E: E组; F: F组.

汇管区和肝小叶坏死区可见大量纤维组织增生,形成较宽阔,厚薄不均且连接的纤维间隔,出现明显的HF.与B组相比,C、D、E、F组肝小叶破坏明显减轻,部分肝细胞脂肪变性,炎性细胞浸润较少,胶原纤维组织轻度增生,仅见细薄的纤维束,未见明显假小叶形成,其中C、D、E、F组HF评分明显较低(图1,表2).

2.3 各组TGF- β 1、Smad3和Smad7蛋白表达的变化与B组相比,C、D、E、F组TGF- β 1和Smad3表达则显著降低($P<0.01$),而Smad7的表达明显增加($P<0.01$).C、D、E、F组间TGF- β 1、Smad3、Smad7蛋白的表达无统计学意义(图2,表3).

3 讨论

HF是慢性肝病共有的病理改变,其本质是肝组织中ECM的合成与降解的动态平衡^[5,6],HF及肝硬化时,纤维结缔组织的形成是各种不同致病

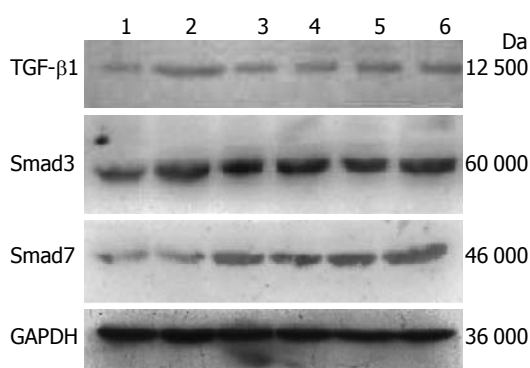
表2 各组HF评分比较

分组	HF程度评分				
	0	1	2	3	4
A组	10	0	0	0	0
B组	0	0	0	10	5
C组	0	8	6	1	0
D组	0	7	7	1	0
E组	0	8	5	2	0
F组	0	6	7	2	0

因子导致ECM合成增多与降解的相对减少^[7-9].TGF- β 1是一类调节细胞生长和分化的多肽,是目前公认的最重要的致HF的细胞因子之一^[9],其具体机制为活化HSC,使其转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),通过自分泌及旁分泌,使HSC增殖,由于TGF- β 自分泌作用,MFB进一步受到刺激,合成和分泌大量ECM,并抑制其降解^[10,11].肝脏MFB是HSC的激活形式,活化HSC是肝脏

表 3 TGF- β 1、Smad3及Smad7蛋白表达吸光度值 (mean \pm SD)

分组	n	TGF- β 1	Smad3	Smad7
A组	10	0.130 \pm 0.014	0.407 \pm 0.074	0.118 \pm 0.088
B组	15	0.332 \pm 0.074 ^b	0.527 \pm 0.054 ^b	0.185 \pm 0.059 ^b
C组	15	0.127 \pm 0.014 ^{bd}	0.415 \pm 0.057 ^{bd}	0.308 \pm 0.077 ^{bd}
D组	15	0.122 \pm 0.051 ^{bd}	0.427 \pm 0.074 ^{bd}	0.326 \pm 0.086 ^{bd}
E组	15	0.126 \pm 0.027 ^{bd}	0.425 \pm 0.080 ^{bd}	0.315 \pm 0.071 ^{bd}
F组	15	0.119 \pm 0.020 ^{bd}	0.432 \pm 0.075 ^{bd}	0.348 \pm 0.065 ^{bd}

^bP<0.01 vs A组; ^dP<0.01 vs B组.图 2 Western blot检测各组TGF- β 1、Smad3和Smad7蛋白表达的变化. 1: A组; 2: B组; 3: C组; 4: D组; 5: E组; 6: F组.

胶原产生和纤维化形成的中心环节^[12,13].

TGF- β 1生物效应的发挥必须通过特定的信号转导过程^[14]. TGF- β 1胞外激活后, 与其细胞膜上特异性受体 I 和受体 II (T β R I, T β R II) 结合, 继而主要由Smads蛋白介导胞内信号传导^[15]. Smads是 TGF- β 受体复合物下游信号调节蛋白, Smads蛋白目前已鉴定出8种同源序列, 即Smad1-8, 存在于胞质、胞核内, 由高度保守的N端的MH1区、C端的MH2区及中间富含脯氨酸的连接区组成, 主要参与调控细胞的增殖、转化、合成、分泌和凋亡^[16,17]. 根据Smads蛋白结构和功能特点, 主要分为3类^[18]: 调节性Smads, 主要有Smad1, 2, 3, 5, 8, 其中Smad2, 3主要介导TGF- β 和生物素的信号; 公用性Smad在哺乳动物发现的有Smad4, 与调节性Smads形成多聚体转位入核后调节靶基因转录; 抑制性Smads, 主要有Smad6, 7, 抑制其他二类Smads的活性, 可与调节性Smads竞争性结合受体, 阻止调节性Smads磷酸化而阻断TGF- β 的信号. TGF- β 1首先与细胞表面的T β R II结合形成复合物, 配体构型发生改变, 从而可被T β R I识别并结合, 活化的T β R I可使调节性Smads C末端SSXS结构中3个丝氨酸残基被磷酸化. 磷酸化的Smad2或Smad3可与

Smad4结合, 形成异二聚体或Smad2、Smad3、Smad4异三聚体, 由胞质移至胞核, 参与调节基因表达^[18,19]. 有关文献报道HSC的激活主要与Smad3有关^[20-22], 针对Smad3的靶向治疗也取得显著疗效^[23,24]. 这一超家族成员中, Smad6、7具有与其他信息分子不同的负性调节作用, Smad6在HF的负反馈调节作用的研究相对较少, 而Smad7在抑制HSC细胞活化, 调节TGF- β 1信号转导及减轻肝损伤方面起重要作用^[25]. 目前研究表明, 调控TGF- β 1信号途径是治疗HF的有效方法^[26].

HF归属于中医学的癥瘕、积聚、胁痛等病证范畴, 病机为“虚实夹杂”, 活血化癥、软坚散结与补益虚损是临床治疗的重要方法. 鳖甲煎改良方是我们长期临床实践中在鳖甲煎丸^[27]基础上总结的有效方, 能显著改善患者肝功能、肝纤谱, 提高患者生活质量, 其组成为鳖甲、土鳖虫、柴胡、黄芩、半夏、黄芪、茵陈、桂枝、白芍、桃仁、茯苓等, 脉络瘀血日久, 非一般活血药物所能及, 鳖甲、土鳖虫两位虫类药为君药, 活血逐瘀, 破积消癥, 有祛除肝脏瘀血, 通理血脉涩滞之功; 配以桃仁、白芍活血养血, 达祛瘀而不伤正之效; 加黄芪、茯苓健脾益气, 鼓舞正气; 柴胡、黄芩、半夏、茵陈入肝经, 软坚散结, 清热祛痰除湿; 辅以桂枝通络. 全方具有活血化癥、软坚散结兼益气健脾之效, 不仅对症治疗而且也体现了中医的“见肝之病, 知肝传脾”的未病先防、既病防变的治未病思想. 复方鳖甲软肝片是经国家药品监督管理局批准生产的目前国内专一用于预防、阻断和治疗HF及早期肝硬化的国家级新药, 具有明显的抗纤维化作用^[28,29]. 本实验证实, 通过C、D、E组治疗HF大鼠后, 肝功能及HF结构得到明显改善, TGF- β 1、Smad3表达显著降低, 而Smad7表达明显升高, 与复方鳖甲软肝片治疗效果比较虽无明显差异,

应用要点

鳖甲煎改良方能显著减轻CCl₄导致的大鼠肝纤维化程度, 其作用机制可能与鳖甲煎改良方调控TGF- β 1和Sman3/7信号转导蛋白表达有关.

■同行评价

本文科学性较好, 为防治肝纤维化的机制研究奠定基础。

但是在药物成分上复方鳖甲软肝片紫河车、冬虫夏草等稀少且价位高, 真品少等特点, 鳖甲煎改良方就很好地弥补了这方面的劣势, 具有很高的临床应用价值, 其抗大鼠HF可能机制为调控TGF- β /Smad信号转导通路。我们知道, HF的形成是多种细胞因子, 多种信号通路共同作用的结果, 彼此间存在着广泛的联系, 中药复方的治疗优势在于多途径、多靶点的整合作用, 扶正祛邪, 彼此兼顾, 以达ECM合成与降解的动态平衡, 然而TGF- β 1具有广泛的生物学效应^[30], 鳖甲煎改良方治疗后可使其表达显著降低, 是否影响其他生物学变化及鳖甲煎改良方是否对其他致HF的信号通路也有抑制作用, 都有待于进一步研究。总之, 本实验结果表明: 鳖甲煎改良方具有抗大鼠HF作用, 其机制可能与鳖甲煎改良方调控TGF- β /Smad这一信号通路有关。

志谢: 非常感谢何跃、赵长春、梁宇佳、周青及赵映兰等在本实验中给予的大力帮助和支持。

4 参考文献

- Lim MC, Maubach G, Zhuo L. TGF- β 1 down-regulates connexin 43 expression and gap junction intercellular communication in rat hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* 2009; 88: 719-730
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- Yasuda H, Imai E, Shiota A, Fujise N, Morinaga T, Higashio K. Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1996; 24: 636-642
- 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 实验药理学方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-204
- Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 231-242
- Jarcuska P, Janicko M, Veseliny E, Jarcuska P, Skladany L. Circulating markers of liver fibrosis progression. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1009-1017
- Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 265-280
- Rombouts K, Marra F. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* 2010; 28: 229-235
- Cui W, Jin HB, Li ZW. Mechanism of the transforming growth factor- β induction of fibronectin expression in hepatic stem-like cells. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 36-42
- Gaça MD, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale JP, Benyon RC. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol* 2003; 22: 229-239
- Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 759-768, viii
- Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010; 52: 949-950
- Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1639-1642
- Cheng JH, She H, Han YP, Wang J, Xiong S, Asahina K, Tsukamoto H. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G39-G49
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004; 35: 83-92
- Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 2000; 75: 115-157
- Seuntjens E, Umans L, Zwijsen A, Sampaiolesi M, Verfaillie CM, Huylebroeck D. Transforming Growth Factor type beta and Smad family signaling in stem cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 449-458
- Xu L. Regulation of Smad activities. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1759: 503-513
- Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physiopathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1161-1165
- Yokote K, Kobayashi K, Saito Y. The role of Smad3-dependent TGF- β signal in vascular response to injury. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16: 240-245
- Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, Flanders KC. Smad3 is key to TGF- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 19-27
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- Latella G, Vetuschi A, Sferra R, Catitti V, D'Angelo A, Zanninelli G, Flanders KC, Gaudio E. Targeted disruption of Smad3 confers resistance to the development of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in mice. *Liver Int* 2009; 29: 997-1009
- Moro T, Shimoyama Y, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, Sugioka Y, Inoue H, Okazaki I, Inagaki Y. Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis. *Life Sci* 2008; 83: 531-539
- Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41: 263-272
- Matsuzaki K. Modulation of TGF- β signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 2009; 14: 2923-2934
- 张秋英, 张再康, 金淑琴. 鳖甲煎丸的现代临床应用和实验研究进展. *河北中医医药学报* 2006; 21: 35-36
- 蔺武, 刘心娟, 魏南, 高炳霞, 姜国俊, 常岩芹. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化疗效的系统评价. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 69-72
- 苗韞晗. 复方鳖甲软肝片治疗40例肝纤维化临床观察. *当代医学* 2009; 15: 140
- Meyer C, Meindl-Beinker NM, Dooley S. TGF- β signaling in alcohol induced hepatic injury. *Front Biosci* 2010; 15: 740-749

编辑 李薇 电编 何基才

氧化苦参碱对SW1990细胞MMP-2表达的抑制作用及对细胞侵袭力的影响

冀润利, 邸瑶, 夏时海, 李飞

冀润利, 夏时海, 李飞, 中国人民武装警察部队医学院附属医院肝胆胰脾内科 天津市 300162

邸瑶, 中国人民武装警察部队医学院生理与病理生理学教研室 天津市 300162

冀润利, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤及消化疾病的临床、教学和科研工作。

武警部队科研基金资助项目, No. WKH2006-9

武警医学院科研基金资助项目, No. WY2008-13

作者贡献分布: 冀润利与夏时海对此文所作贡献均等; 此课题由冀润利与夏时海设计; 研究过程由冀润利与邸瑶操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由邸瑶提供; 数据分析由冀润利完成; 本论文写作由冀润利、夏时海及邸瑶完成。

通讯作者: 夏时海, 博士, 副教授, 副主任医师, 300162, 天津市, 中国人民武装警察部队医学院附属医院肝胆胰脾内科。

xshhcx@sina.com

电话: 022-60578765

收稿日期: 2010-10-31 修回日期: 2010-11-26

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-08

Oxymatrine inhibits MMP-2 expression and reduces cell invasion in human pancreatic carcinoma cell line SW1990

Run-Li Ji, Yao Di, Shi-Hai Xia, Fei Li

Run-Li Ji, Shi-Hai Xia, Fei Li, Department of Hepatopancreatobiliary and Splenic Medicine, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Yao Di, Department of Physiology, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Chinese People's Armed Police Force, No. WKH2006-9; and the Scientific Research Foundation of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, No. WY2008-13

Correspondence to: Associate Professor Shi-Hai Xia, Department of Hepatopancreatobiliary and Splenic Medicine, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China. xshhcx@sina.com

Received: 2010-10-31 Revised: 2010-11-26

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To examine the effects of treatment with oxymatrine (OM) on MMP-2 expression and cell invasion in human pancreatic carcinoma cell line SW1990.

METHODS: Cultured SW1990 cells were randomly divided into two groups: control group

and OM group. The OM group was further divided into three subgroups, which were treated with three different doses of OM (1, 2 and 4 g/L). MMP-2 expression in SW1990 cells was analyzed by real-time RT-PCR. Cell invasion, migration and proliferation were measured by scratch assay, transwell invasion assay and MTT assay, respectively.

RESULTS: The expression levels of MMP-2 mRNA in SW1990 cells in the three OM subgroups were significantly lower than that in the control group (0.53 ± 0.03 , 0.42 ± 0.02 , 0.29 ± 0.03 vs 0.70 ± 0.03 , all $P < 0.05$). The invasion of cells in the three OM subgroups was markedly lower than that in the control group (325 ± 64.43 , 206 ± 84.76 , 124 ± 46.78 vs 498 ± 78.54 , all $P < 0.05$). The mobility of cells in the three OM subgroups was also significantly lower than that in the control group (385.0 ± 58.9 , 287.0 ± 79.8 , 186.0 ± 60.9 vs 586.0 ± 85.8 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: OM reduces the invasion of SW1990 cells possibly by inhibiting the expression of MMP-2.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Tumor invasion; Oxymatrine; Matrix metalloproteinase

Ji RL, Di Y, Xia SH, Li F. Oxymatrine inhibits MMP-2 expression and reduces cell invasion in human pancreatic carcinoma cell line SW1990. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 19-24

摘要

目的: 探讨氧化苦参碱(OM)对SW1990细胞侵袭力的影响。

方法: 取人胰腺癌细胞SW1990为研究对象, 随机分为对照组和OM组, OM组再按照OM剂量不同, 分为1, 2, 4 g/L 3组。用RT-PCR检测MMP-2 mRNA表达变化, 以细胞划痕试验和Transwell小室法检测SW1990细胞侵袭力和迁移的变化, 用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测OM对SW1990细胞增殖的影响作用。

■背景资料

胰腺癌是恶性肿瘤中恶性程度较高、易转移且预后极差的消化系统肿瘤。其发病率呈逐年上升趋势。早期出现侵袭转移行为严重影响了胰腺癌患者生存率的提高, 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤死亡率的重要途径之一。

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■ 研发前沿

目前尚无针对胰腺癌侵袭转移的确切治疗措施,导致胰腺癌的治疗仍是一个世界级难题,积极寻找对抗胰腺癌侵袭转移行为的药物成为当务之急。

结果: RT-PCR显示MMP-2 mRNA在SW1990细胞中的表达, OM各组较对照组显著降低(0.53 ± 0.03 , 0.42 ± 0.02 , 0.29 ± 0.03 vs 0.70 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$)。细胞侵袭力测定显示, OM各组侵袭过Matrigel胶的细胞数显著低于对照组(325.00 ± 64.43 , 206.00 ± 84.76 , 124.00 ± 46.78 vs 498.00 ± 78.54 , 均 $P < 0.05$)。OM组细胞侵袭能力较对照组显著降低。细胞迁移实验结果显示, OM各组穿过滤膜的细胞数显著低于对照组(385.0 ± 58.9 , 287.0 ± 79.8 , 186.0 ± 60.9 vs 586.0 ± 85.8 , 均 $P < 0.05$)。

结论: OM可能通过下调MMP-2 mRNA的表达, 抑制胰腺癌细胞侵袭转移能力。

关键词: 胰腺癌; 肿瘤侵袭; 氧化苦参碱; 基质金属蛋白酶

冀润利, 邱瑶, 夏时海, 李飞. 氧化苦参碱对SW1990细胞MMP-2表达的抑制作用及对细胞侵袭力的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 19-24

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

0 引言

胰腺癌(pancreas carcinoma)是恶性肿瘤中恶性程度较高、易转移且预后极差的消化系统肿瘤, 在癌症死亡原因顺位中, 排在男性的第6-8位, 女性的9-10位^[1,2], 且其发病率呈逐年上升趋势。2008年的调查研究显示, 在美国恶性肿瘤死亡人数中, 胰腺癌在第4位^[3]。早期出现侵袭转移行为严重影响了胰腺癌患者生存率的提高^[4], 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤死亡率的重要途径之一。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜的降解被认为是肿瘤侵袭转移的首要步骤, 帮助癌细胞行使破坏作用的工具就是蛋白酶, 主要有纤维蛋白溶解酶(plasmin)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和肝素酶(heparanase), 其中以MMPs最为重要。MMPs通过降解改建ECM, 改变肿瘤细胞微环境, 提高肿瘤细胞侵袭力来发挥作用^[5,6]。目前尚无针对胰腺癌侵袭转移的确切治疗措施, 导致胰腺癌的治疗仍是一个世界级难题, 积极寻找对抗胰腺癌侵袭转移行为的药物的成为当务之急。本文以人胰腺癌细胞株SW1990为研究对象, 研究氧化苦参碱(oxymatrine, OM)对SW1990中MMP-2 mRNA表达的影响, 探讨OM对SW1990细胞体外侵袭转移能力的影响作用, 为中药OM治疗胰腺癌提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料 优质胎牛血清购自中科院天津血液学研究所; RPMI 1640培养基购自Gibson公司; OM购自正大天晴公司, MMP-2抗体购自Santa Cruz公司; TRIzol购自Invitrogen公司; PCR Marker、RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司; Matrigel胶购自BD Biosciences公司、Transwell小室购自Millipore公司、MMP-2引物合成自Invitrogen生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SW1990细胞由协和医科大学基础学院细胞中心提供, 细胞生长于含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中, 置于37 °C、50 mL/L CO₂的孵育箱(相对湿度为95%)中培养。

1.2.2 分组: 随机分为对照组和OM组, OM组再随机分为1, 2, 4 g/L组。选用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液, 待细胞长满培养瓶底部70%-80%时, 用0.25%胰蛋白酶与0.03% EDTA(1:1)混匀消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.3 RT-PCR: 采用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA, 检测RNA的含量和纯度($A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$)。以1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28S和18S RNA条带比值 ≥ 2.0)。用1 μ g细胞总RNA进行逆转录, 结果经凝胶自动成像系统扫描, 以 β -actin校正相对量, 数值以两者吸光度的比值表示。

1.2.4 细胞增殖实验: 按照1、2、4 g/L 3个浓度梯度设置OM处理组, 每组再按照培养时间分为0、24、48、72、96 h 5个时相点小组, 各小组均设置3个重复孔。将传代培养的SW1990细胞株用胰酶消化液消化后制备成 1×10^5 个/L的细胞悬液, 并接种于96孔细胞板, 每孔加入50 μ L, 培养24 h后, 分别加入50 μ L含OM的培养基, 使得每孔溶液中含药终浓度符合设计要求。以此记为0 h, 继续培养, 分别于相应时相点取出细胞板置于室温(27 °C), 每孔加入25 μ L Cell Titer Glo反应液, 静置10 min。每孔取出100 μ L溶液置于空白的96孔板中, 通过多标记微孔板检测仪测定各孔发光信号, 测定其发光值, 通过测得发光值计算OM处理各组的细胞增殖抑制率。

1.2.5 细胞划痕实验: 各组细胞接种于24孔培养板中, 细胞数约为每孔 2×10^4 个, 待长到完全融合时, 用10 μ L Tip头在每孔单层细胞上划痕, 造成培养细胞伤口模型。划痕后, 弃取培养基, PBS冲洗2次, 继续培养。每12 h于倒置显微镜下观察伤口愈合程度, 并拍照1次。

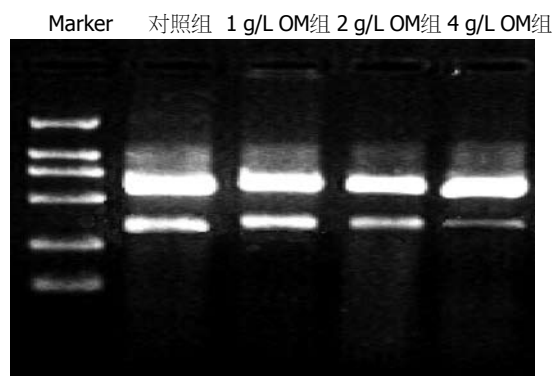


图 1 OM对SW1990细胞中MMP-2 mRNA的影响.

1.2.6 细胞侵袭实验: 采用Transwell法检测细胞体外侵袭能力, 收集对数生长期细胞, 分别用含有PBS(对照组)和1, 2, 4 g/L OM的DMEM培养基悬浮细胞, 制成 1×10^9 /L的单细胞悬液, 按照郭坤等^[7]方法操作. 细胞在小室内培养48 h后, 染色并拍照, 显微镜下观察穿过膜的细胞数, 计数中间及四周5个高倍($\times 400$)镜下视野细胞数, 计算平均数.

1.2.7 细胞迁移实验: 收集对数生长期细胞, 分别用含有PBS(对照组)和1, 2, 4 g/L OM的DMEM培养基悬浮细胞, 制成 1×10^9 /L的单细胞悬液, 利用Transwell小室进行测定. 细胞在小室内培养48 h后, 染色并拍照, 显微镜下计数迁移细胞数, 计算平均数, 按照以下公式计算抑制率. 抑制率 = (阴性对照组平均迁移细胞数 - 实验药物组平均迁移细胞数) / 阴性对照组平均迁移细胞数 $\times 100\%$.

统计学处理 实验数据经SPSS11.5软件分析. 样本均数的比较采用方差分析和 t 检验. 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 OM对SW1990细胞中MMP-2 mRNA的影响 结果显示不同浓度的OM(1, 2, 4 g/L)作用于胰腺癌细胞SW1990 24 h后, MMP-2 mRNA表达量与对照组相比显著降低(0.53 ± 0.03 , 0.42 ± 0.02 , 0.29 ± 0.03 vs 0.70 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$, 图1, 2).

2.2 氧化苦参碱对SW1990细胞增殖的影响 氧化苦参碱可抑制SW1990细胞增殖, 成时间-剂量依赖性. 随着氧化苦参碱药物浓度和时间的增加, 对细胞的增殖抑制率也显著提高(图3).

2.3 SW1990细胞划痕实验结果 对照组, 经24 h培养逐渐愈合, 划痕消失; 而2 g/L OM组, 4 g/L OM组细胞划痕, 经24 h培养仍未愈合, 划痕依然明显, 尤其以4 g/L OM更为明显(图4).

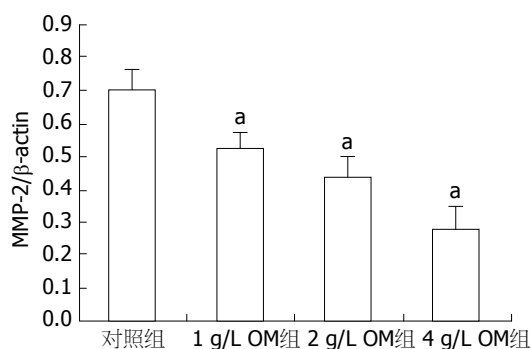


图 2 不同浓度OM对SW1990细胞中MMP-2 mRNA的影响.
* $P < 0.05$ vs 对照组.

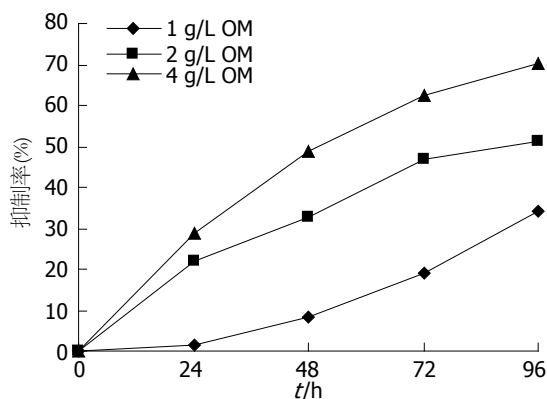


图 3 不同浓度OM对SW1990细胞增殖抑制率的影响.

2.4 Transwell法示OM对SW1990细胞侵袭力的影响 OM处理SW1990细胞48 h后, Transwell侵袭力测定显示1, 2, 4 g/L OM组侵袭过细胞Matrigel胶的细胞数显著低于对照组(325.00 ± 64.43 , 206.00 ± 84.76 , 124.00 ± 46.78 vs 498.00 ± 78.54), OM各组的细胞侵袭力均显著低于对照组(均 $P < 0.05$, 图5, 6).

2.5 细胞迁移实验结果 细胞迁移实验结果显示1, 2, 4 g/L OM组穿过滤膜的细胞数显著低于对照组(385.0 ± 58.9 , 287.0 ± 79.8 , 186.0 ± 60.9 vs 586.0 ± 85.8 , 均 $P < 0.05$, 图7).

3 讨论

肿瘤由原位增殖到侵袭转移, 依靠肿瘤细胞降解ECM来实现^[8], MMPs和基质金属蛋白酶抑制剂家族(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)是调节细胞基底膜和ECM完整性的重要因素, 与肿瘤的侵袭转移和预后密切相关^[9].

MMPs是一组锌离子依赖性内肽酶, 在胰腺癌组织和细胞株中存在着高表达, 几乎能降解ECM的所有成分^[10,11], MMPs的主要作用在于^[12-14]: (1)降解ECM, 包绕肿瘤的基质, 突破基质屏障,

■ 相关报道

Jones等免疫组织化学的结果表明MMP-2在66%的胰腺癌细胞中有表达, 且局限于癌细胞, 不表达于间质; 但他的实验同样在70%的胰腺组织发现了MMP-2的存在.

■创新盘点

本文以胰腺癌细胞株SW1990为研究对象,研究OM对SW1990中MMP-2 mRNA表达的影响,探讨OM对SW1990细胞体外侵袭转移能力的影响作用,为中药OM治疗胰腺癌提供实验数据。

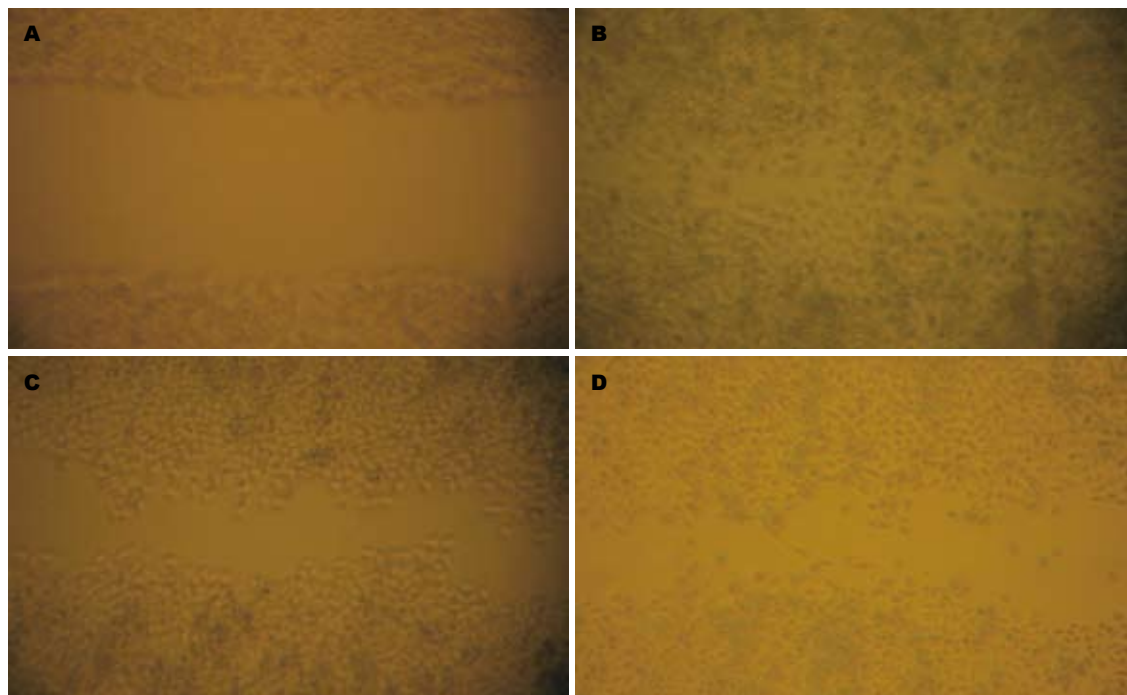


图4 各组细胞划痕实验结果(倒置显微镜 $\times 200$). A: 对照组0 h; B: 对照组24 h; C: 2 g/L OM组 24 h; D: 4 g/L OM组 24 h.

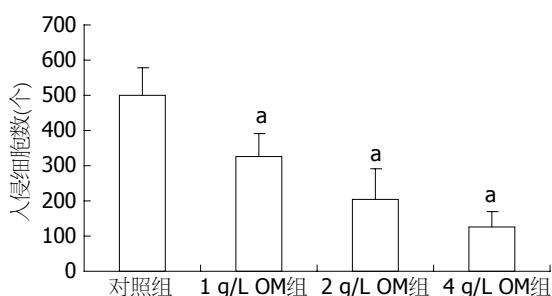


图5 不同浓度OM对SW1990细胞侵袭力的影响。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

促进肿瘤侵袭转移^[15]; (2)调节细胞黏附; (3)促进毛细血管内生、新生血管的形成,从而加速肿瘤的生长和扩散; (4)免疫功能,研究发现MT1-MMP可以裂解补体C3b片段,使乳腺癌细胞免受补体系统的^[16]; (5)调节肿瘤细胞凋亡。

IV型胶原酶包括MMP-2和MMP-9两个亚型,在正常胰腺组织及胰腺癌组织中均有MMP-9表达,而MMP-2对胰腺癌的特异性较高。Koshiba等^[17]认为正常胰腺则不存在MMP-2,而在所有胰腺癌组织及其转移结节中均有表达。Jones等^[18]免疫组织化学的结果表明MMP-2在66%的胰腺癌细胞中有表达,且局限于癌细胞,不表达于间质;但他的实验同样在70%的胰腺组织在发现了MMP-2的存在,目前有更多的研究证实在正常胰腺组织中存在少量的MMP-2。

Jones等^[18]的RT-PCR结果显示, MMP-2在胰

腺癌细胞中表达上调,免疫组织化学也得到了相同的结果。目前认为MMP-2的表达与胰腺癌的恶性表型相关^[19], MMP-2的过度表达与肿瘤的淋巴结转移和血行转移密切相关,也与胰腺癌的进展有关,是胰腺癌具有较强侵袭、转移潜能和患者预后差的重要标志^[20]。Liu等^[21]和Chandru等^[22]报道乳腺癌患者肿瘤组织中MMP-2明显升高,且在肿瘤组织和血浆中的表达与肿瘤的大小正相关;在肿瘤发展的不同阶段MMP-2的水平也有显著差别,此外MMP-2表达水平还与肿瘤是否转移相关。有研究表明, MMP-2、9在胃癌、非小细胞肺癌、肝癌等肿瘤中均升高^[23-26]。Giannopoulos等^[27]对胰腺壶腹腺癌组织中MMP-2的表达进行了检测,发现MMP-2的表达与微血管密度相关,支持MMP-2的表达与血管发生相关的假说。在我们的实验中发现,随着OM给药剂量的增加, MMP-2 mRNA在SW1990细胞中的表达量逐渐降低。

OM是从中药苦参、苦豆子、广豆根中提取的一种生物碱,有多方面的药理作用^[28,29],包括抗菌、抗炎、抗风湿、抗肿瘤、抗过敏、免疫及生物反应调节等作用^[30]。大量的文献表明OM可以抑制肿瘤细胞的增殖、转移,诱导其凋亡^[31]、向正常细胞分化,具有抗肿瘤的活性^[32-34]。

本研究测定了OM对SW1990细胞增殖的影响作用,发现随着OM用药浓度的加大和作用时间的延长,细胞存活率逐渐下降,增殖抑制率

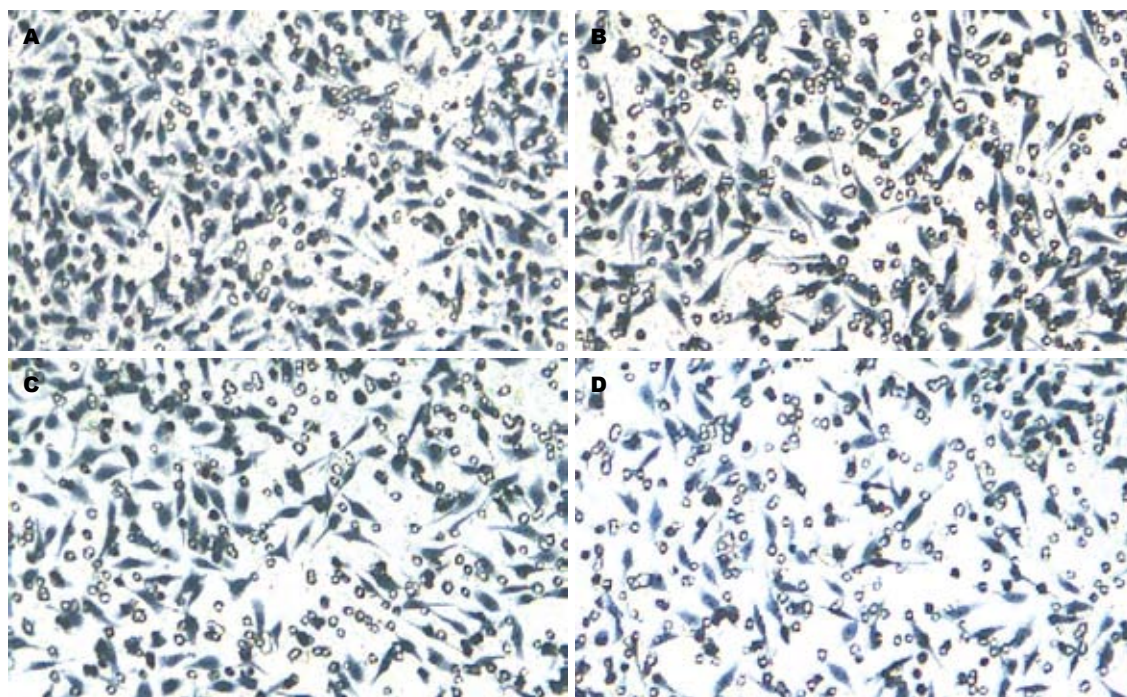


图 6 侵袭到微孔膜下表面的EC109细胞(倒置显微镜×200). A: 对照组; B: 1 g/L OM组; C: 2 g/L OM组; D: 4 g/L OM组.

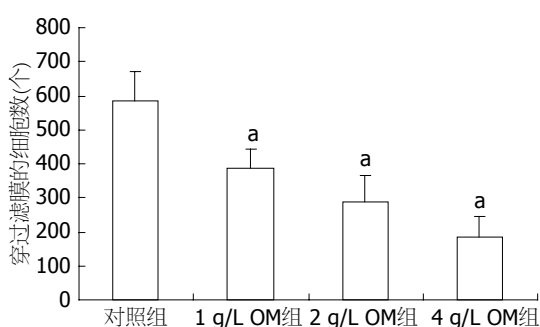


图 7 不同浓度OM对SW1990细胞迁移能力的影响. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

显著上升, 表明OM对SW1990细胞的增殖抑制作用呈时间和剂量依赖关系. 同时划痕试验、Transwell侵袭实验及细胞迁移实验也证实OM可以抑制SW1990细胞的侵袭力和迁移能力, 尤其以4 g/L OM组更为明显.

肿瘤的侵袭和转移是牵涉多个分子生物学事件的极其复杂过程, 他是决定肿瘤恶性度的最重要因素^[35]. 在胰腺癌的发生发展过程中, 肿瘤的包膜浸润、周围神经浸润、血管浸润和腹腔淋巴结转移是胰腺癌进展的特点. 我们的实验证实, OM可以通过下调MMP-2 mRNA在SW1990细胞中的表达量从而抑制SW1990细胞的增殖、迁移与侵袭, 从而延缓胰腺癌发展进程, 对胰腺癌的治疗产生了一定的积极作用, 是否能以MMP-2为靶点, 对早期胰腺癌患者施加

■应用要点

OM通过下调MMP-2 mRNA在SW1990细胞中的表达量, 抑制SW1990细胞的增殖、迁移与侵袭, 延缓胰腺癌发展进程, 对胰腺癌的治疗产生了一定的积极作用. 以MMP-2为靶点, 对早期胰腺癌患者施加中药OM来预防肿瘤转移, 为临床治疗肿瘤提出新的思路.

中药OM来预防肿瘤转移, 进行治疗, 还需进一步实验的证实.

4 参考文献

- 1 Wang L, Yang GH, Lu XH, Huang ZJ, Li H. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1819-1823
- 2 2005年上海市市区恶性肿瘤发病率. *肿瘤* 2008; 28: 726-727
- 3 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 4 孙燕, 周际昌. 临床肿瘤内科手册. 第3版. 人民卫生出版社, 1996: 218
- 5 Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 8581-8591
- 6 Chinni SR, Sivalogan S, Dong Z, Filho JC, Deng X, Bonfil RD, Cher ML. CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* 2006; 66: 32-48
- 7 郭坤, 沙焕臣, 马清涌, 王连才, 胡恒通. 去甲肾上腺素对胰腺癌细胞株MiaPaCa-2侵袭能力的影响. *西安交通大学学报(医学版)* 2010; 31: 265-268
- 8 Binker MG, Binker-Cosen AA, Richards D, Oliver B, Cosen-Binker LI. EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 445-450
- 9 Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010; 159: 443-450
- 10 Bloomston M, Zervos EE, Rosemurgy AS 2nd. Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic

■同行评价

本文学术价值较高,对胰腺癌的治疗产生了一定的积极作用,为中药氧化苦参碱治疗胰腺癌提供实验数据。

- cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 668-674
- 11 Leung E, McArthur D, Morris A, Williams N. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents migration of colorectal cancer cells to extracellular matrix by down-regulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 342-347
- 12 Ishizaki T, Katsumata K, Tsuchida A, Wada T, Mori Y, Hisada M, Kawakita H, Aoki T. Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits liver metastasis of colorectal cancer cells via the suppression of MMP-9 activity. *Int J Mol Med* 2006; 17: 357-362
- 13 Kurihara Y, Hatori M, Ando Y, Ito D, Toyoshima T, Tanaka M, Shintani S. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 425-432
- 14 Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, Mukhtar H. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis* 2009; 30: 300-307
- 15 Zervos EE, Norman JG, Gower WR, Franz MG, Rosemurgy AS. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates human pancreatic cancer growth in vitro and decreases mortality and tumorigenesis in vivo. *J Surg Res* 1997; 69: 367-371
- 16 Rozanov DV, Savinov AY, Golubkov VS, Postnova TI, Remacle A, Tomlinson S, Strongin AY. Cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves C3b, an essential component of the complement system. *J Biol Chem* 2004; 279: 46551-46557
- 17 Koshihara T, Hosotani R, Wada M, Fujimoto K, Lee JU, Doi R, Arii S, Imamura M. Detection of matrix metalloproteinase activity in human pancreatic cancer. *Surg Today* 1997; 27: 302-304
- 18 Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2832-2845
- 19 Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 1997; 182: 347-355
- 20 李霞, 孙玲玲, 李宏, 付伟伟, 邢晓明, 李玉军. 胰腺癌中CXCR-4和MMP-2的表达及其临床意义. *临床与实验病理学杂志* 2009; 25: 295-297
- 21 Liu SC, Yang SF, Yeh KT, Yeh CM, Chiou HL, Lee CY, Chou MC, Hsieh YS. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. *Clin Chim Acta* 2006; 371: 92-96
- 22 Chandru H, Sharada AC, Manjunath S. [Expression of matrix metalloproteinase (MMP-2) and extracellular matrix metalloproteinases inducer (EMMPRIN) in benign and advanced breast cancer tissue samples]. *Biomed Khim* 2007; 53: 461-467
- 23 Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, Xu XC. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122: 2050-2056
- 24 Frich L, Bjørnland K, Pettersen S, Clausen OP, Gladhaug IP. Increased activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 after hepatic radiofrequency ablation. *J Surg Res* 2006; 135: 297-304
- 25 Sillanpää S, Anttila M, Voutilainen K, Ropponen K, Turpeenniemi-Hujanen T, Puistola U, Tammi R, Tammi M, Sironen R, Saarikoski S, Kosma VM. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 296-303
- 26 Iniesta P, Morán A, De Juan C, Gómez A, Hernando F, García-Aranda C, Frías C, Díaz-López A, Rodríguez-Jiménez FJ, Balibrea JL, Benito M. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 217-223
- 27 Giannopoulos G, Pavlakis K, Parasi A, Kavatzas N, Tiniakos D, Karakosta A, Tzanakis N, Peros G. The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 2008; 28: 1875-1881
- 28 朱晓伟, 宝金荣, 布仁. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用机制研究进展. *化学试剂* 2010; 32: 82-84
- 29 Ho JW, Ngan Hon PL, Chim WO. Effects of oxymatrine from Ku Shen on cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 823-826
- 30 王俊学, 王国俊. 苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用. *肝脏* 2000; 5: 116-117
- 31 刘益均, 郑军, 肖文波, 周军. 氧化苦参碱对人胃癌SGC-7901细胞增殖及血管内皮生长因子表达的影响. *中国癌症杂志* 2010; 20: 22-26
- 32 李建国, 伍斌, 谢红付, 张江林, 易梅, 李吉. 氧化苦参碱对CD4+CD25+调节性T细胞(Tr)和淋巴细胞增殖的影响. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 993-999
- 33 万旭英, 罗明, 贺平, 吴孟超. 苦参碱和氧化苦参碱体外对人肝癌细胞的诱导分化作用. *中国药理学通报* 2009; 25: 977-999
- 34 于晓峰, 邹健, 冉志华. 氧化苦参碱对人胃癌细胞杀伤作用的机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1725-1730
- 35 赵毅, 王强, 邓鑫, 赵滢, 张天彪. 侵袭转移相关因子在胃肠道间质瘤中的检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 791-797

编辑 李军亮 电编 何基才

抑癌基因ARHI在人胃癌组织中的表达及意义

唐海灵, 胡益群, 杨奕轩, 秦兴平, 陈建民, 巴亚斯古楞, 任建林

唐海灵, 胡益群, 杨奕轩, 秦兴平, 陈建民, 巴亚斯古楞, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门市消化疾病中心 福建省厦门市 361004
唐海灵, 在读硕士, 主要从事早期消化系统肿瘤的诊治研究。
福建省厦门市卫生局重点基金资助项目, No. 3502z20077038
作者贡献分布: 此课题由陈建民与胡益群设计; 研究过程由唐海灵、胡益群、杨奕轩及秦兴平操作完成; 巴亚斯古楞与任建林协助指导课题的完成; 数据分析与论文书写由唐海灵与陈建民完成。
通讯作者: 陈建民, 主任医师, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病中心. sycjm@21cn.com
电话: 0592-2993170 传真: 0592-2212328
收稿日期: 2010-09-17 修回日期: 2010-11-04
接受日期: 2010-11-10 在线出版日期: 2011-01-08

Significance of ARHI protein expression in gastric carcinoma

Hai-Ling Tang, Yi-Qun Hu, Yi-Xuan Yang, Xing-Ping Qin, Jian-Min Chen, Bayasi Guleng, Jian-Lin Ren

Hai-Ling Tang, Yi-Qun Hu, Yi-Xuan Yang, Xing-Ping Qin, Jian-Min Chen, Bayasi Guleng, Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University; Institute of Digestive Diseases Affiliated to Xiamen University; Digestive Disease Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Supported by: the Key Project of Public Health Bureau of Xiamen, No. 3502z20077038
Correspondence to: Jian-Min Chen, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University; Institute of Digestive Diseases Affiliated to Xiamen University; Digestive Disease Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China. sycjm@21cn.com
Received: 2010-09-17 Revised: 2010-11-04
Accepted: 2010-11-10 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of aplasia ras homologue member I (ARHI), a tumor suppressor gene, in gastric cancer and to define the correlation between ARHI expression and the clinicopathological characteristics of gastric cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of ARHI protein in 62 gastric cancer specimens and 28 tumor-adjacent tissue specimens. The correlation between ARHI protein expression and clinicopathological characteristics of gastric cancer was then analyzed.

RESULTS: The percentage of gastric cancer specimens negative for ARHI staining was significantly higher than that of tumor-adjacent tissue specimens (56.45% vs 25.0%, $P < 0.01$). The expression of ARHI protein was not associated with age, gender, tumor location, tumor size, or metastasis in patients with gastric cancer. However, ARHI protein expression was correlated with tumor differentiation and TNM stage in patients with gastric cancer (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of ARHI protein is significantly reduced or absent in gastric cancer. ARHI protein expression is closely related with tumor differentiation and TNM stage in patients with gastric cancer.

Key Words: ARHI gene; Gastric carcinoma; Clinicopathological features; Immunohistochemistry

Tang HL, Hu YQ, Yang YX, Qin XP, Chen JM, Guleng B, Ren JL. Significance of ARHI protein expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 25-30

摘要

目的: 研究ARHI基因在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达差异及其与患者临床病理特征的相关性。

方法: 用免疫组织化学SP法检测胃癌组织与癌旁正常组织中ARHI基因编码蛋白的表达情况, 用SPSS13.0统计软件对ARHI蛋白的表达差异及其与患者的临床病理特征进行统计学分析。

结果: ARHI蛋白在试验组中阳性表达27例, 阴性表达35例, 表达缺失率56.45%; 对照组中阳性表达21例, 阴性表达7例, 表达缺失率25%, 组间比较有明显统计学差异($P < 0.01$)。在试验组中, ARHI蛋白表达与患者的年龄、性别、发生部位、肿瘤大小、大体类型、是否淋巴结转移及神经、脉管侵犯均无明显统计学差异, 而与肿瘤的分化程度及TNM分期有关($P < 0.05$)。

■背景资料

ARHI基因是1999年从人卵巢和乳腺上皮细胞及其癌细胞中克隆得出的母源性抑癌印迹基因。已有研究显示, 该基因与卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肝癌等恶性肿瘤的发生和发展密切相关。

■同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

■研究前沿

癌基因的激活和抑癌基因的失活是肿瘤研究的热点,抑癌基因的失活被认为是肿瘤发生的重要机制之一。另外,印迹基因作为表观遗传学的内容也是近年研究的热点。

结论: ARHI蛋白在胃癌组织中表达明显下调或缺失,而在胃正常组织中普遍表达。ARHI蛋白表达与患者肿瘤的分化程度及TNM分期有关。

关键词: ARHI抑癌基因;胃癌组织;临床病理特征;免疫组织化学

唐海灵, 胡益群, 杨奕轩, 秦兴平, 陈建民, 巴亚斯古楞, 任建林. 抑癌基因ARHI在人胃癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 25-30

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/25.asp>

0 引言

ARHI(aplasia ras homologue member 1)是1999年新发现的一个抑癌基因,其编码的蛋白在人类多种正常组织内表达。已有相关研究显示ARHI基因在卵巢癌^[1]、乳腺癌^[2]、胰腺癌^[3,4]等多种恶性肿瘤中存在表达下调或缺失。同时发现ARHI基因表达异常可能与印迹基因的突变^[5]、杂合性丢失、DNA甲基化和染色体乙酰化修饰等有关^[6-9]。ARHI基因与胃癌发生发展的相关性研究,目前国内外尚无报道。本研究通过免疫组织化学的方法研究ARHI基因在胃癌组织与癌旁正常胃组织之间的表达情况及其与患者临床病理特征之间的相关性,从而为胃癌的基因诊治及分子靶向治疗提供新的思路和依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集厦门大学附属中山医院2009-03/2009-12胃癌手术后标本62例作为试验组,其中男38例,女24例,年龄34-85(平均62.78)岁;收集癌旁正常胃组织(均距肿瘤边缘5 cm以上取材)28例作为对照组。记录整理所有患者相关临床病理资料。所有标本均经过病理诊断证实,患者术前均未接受放化疗。ARHI单克隆抗体(Mouse anti-ARHI, Catalog No. 39-0400)购自invitrogen公司;即用型免疫组织化学EliVision™ plus试剂盒(No. KIT-9902)、DAB显色剂(DAB-0031)、柠檬酸抗原修复液(MVS-0100)及PBS缓冲液粉剂(PBS-0060)等均购自福州迈新生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 制片及资料分类: 全部标本取材后经40 g/L多聚甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚度4 μm,首先经HE染色病理组织学证实后再采用免疫组织化学SP方法检测胃癌组织ARHI表达。严格按照试剂盒说明书所示步骤操作,经反复验证取ARHI一抗最佳稀释浓度为

1:65。用PBS代替一抗作为阴性对照,用乳腺正常组织切片作为阳性对照。试验组所有病例均根据国际抗癌联盟2002年修订的TNM分期标准进行分期,按性别、年龄、肿瘤发生部位、大体类型、组织分化程度、是否有淋巴结转移及神经、脉管浸润分类。

1.2.2 阅片及判定标准: 采用半定量分析,显微镜下随机选取5个视野观察,按阳性着色范围和阳性着色强度分别计分^[10]: 阳性范围无为0分, <25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; 阳性强度弱为1分, 中2分, 强3分, 极强4分。阳性范围和强度的评分相乘,即为阳性积分,取5个视野的平均阳性积分为该例的阳性积分;每例阳性积分<2分为阴性, ≥2分为阳性;每组阳性积分总和除以例数,为该组阳性强度平均分。

统计学处理 用SPSS13.0软件进行统计学分析,定性资料率的比较采用卡方检验;非参数检验用Wilcoxon秩和检验。

2 结果

2.1 ARHI蛋白在胃癌与癌旁正常组织的表达特点 ARHI蛋白在胃癌组织中表达明显下调或缺失,而在胃正常组织普遍表达。光学显微镜下可见淡黄至棕黄色着色者即为阳性表达,主要定位于细胞质、细胞膜(图1)。ARHI蛋白在试验组中阳性表达27例,阴性表达35例,表达缺失率56.45%;对照组中阳性表达21例,阴性表达7例,表达缺失率25%,组间比较有明显统计学差异($P<0.01$,表1,图2)。

2.2 ARHI蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的关系 在试验组ARHI蛋白表达与患者的年龄(≤60岁、>60岁)、性别、发生部位(胃底/贲门、胃体、胃窦)、肿瘤大小(<5 cm、≥5 cm)大体类型(溃疡型、浸润型、隆起型)、是否存在淋巴结转移及神经、脉管浸润与否均无明显统计学差异,与肿瘤的分化程度(高分化、中分化、低分化)及TNM分期(I A/B-II、IIIA/B-IV)有关($P<0.05$,表2)。ARHI蛋白在胃癌组织中随组织分化程度的降低而表达缺失率逐渐升高;TNM分期III-IV期的组织中较I-II期组织中的表达缺失率明显升高。

3 讨论

ARHI基因是1999年由美国德克萨斯大学Anderson癌症中心的Yu等^[1]从人卵巢和乳腺上皮细胞及其癌细胞中克隆得出的母源性印迹基

表 1 ARHI基因在试验组与对照组中的表达

分组	<i>n</i>	+ (<i>n</i>)	- (<i>n</i>)	阴性率(%)	阳性率(%)	平均阳性积分	<i>P</i> 值
试验组	62	27	35	56.45	43.55	1.68 ± 1.034	< 0.01
对照组	28	21	7	25.00	75.00	4.19 ± 3.431	

表 2 ARHI蛋白表达与胃癌患者临床病理特征之间的相关性

临床病理特征	<i>n</i>	+ (<i>n</i>)	- (<i>n</i>)	缺失率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)						
≤60	24	13	11	45.83	1.796	> 0.05
>60	38	14	24	63.16		
性别						
男	38	15	23	60.53	0.663	> 0.05
女	24	12	12	50.00		
发生部位						
胃底/贲门	28	13	15	53.57	0.892	> 0.05
胃体	24	11	13	54.17		
胃窦	10	3	7	70.00		
肿瘤大小(cm)						
<5	30	11	19	63.33	1.120	> 0.05
≥5	32	16	16	50.00		
大体类型						
隆起型	10	4	6	60.00	1.081	> 0.05
溃疡型	42	20	22	52.38		
浸润型	10	3	7	70.00		
分化程度						
低分化	37	12	25	67.57	6.027	< 0.05
中分化	23	13	10	43.48		
高分化	2	2	0	0.00		
TNM分期						
I A/B-II	39	25	14	35.89	4.996	< 0.05
III A/B-IV	23	8	15	65.22		
淋巴转移						
是	49	20	29	59.18	3.332	> 0.05
否	13	9	4	30.77		
神经脉管浸润						
是	57	25	32	56.14	0.484	> 0.05
否	5	3	2	40.00		

■创新盘点

本文首次研究并确定ARHI基因在胃癌的表达缺失率,初步探讨ARHI基因在胃癌组织的表达异常与胃癌患者临床病理特征之间的相关性,为胃癌发病机制的研究提供了新的思路。

因,定位于人染色体1p31。ARHI蛋白在结构上与ras/rap家族有50%-60%的同源性,是ras/rap家族第一个被报道的抑癌基因^[11,12]。

ARHI基因发现较晚,对其与肿瘤关系的研究相对较少。目前相关研究显示ARHI基因在卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、肝细胞癌^[13]、滤泡型甲状腺癌^[14]等恶性肿瘤中存在表达下调或缺失,并在这些肿瘤中发现了该基因的结构和功能变化。提示ARHI基因与上述肿瘤的发生、发展密切相关,进一步的研究认为ARHI基因表达异常

可能与印迹基因的突变^[5]、杂合性丢失、DNA甲基化和染色体乙酰化修饰等有关^[6-9]。另外,近年研究显示:在卵巢癌中ARHI在转录和转录后两个水平的调控促进其表达明显下调^[15];ARHI基因与信号转导蛋白和转录激活因子STAT3相互作用,并通过抑制STAT3的激活而发挥抑癌基因功能^[16,17],进一步研究发现该基因通过抑制核输入因子与STAT3的结合而阻碍STAT3蛋白的核定位,抑制其转录激活功能^[18];在胰腺内分泌肿瘤^[19]和上皮性卵巢癌^[20]患者中ARHI的低表

■应用要点

ARHI基因是母源性的抑癌印迹基因, 作为较特殊的抑癌基因, 其在胃癌中的研究将为胃癌发病机制、分子靶向治疗药物的开发和早期基因诊治方面提供新的思路和理论依据。

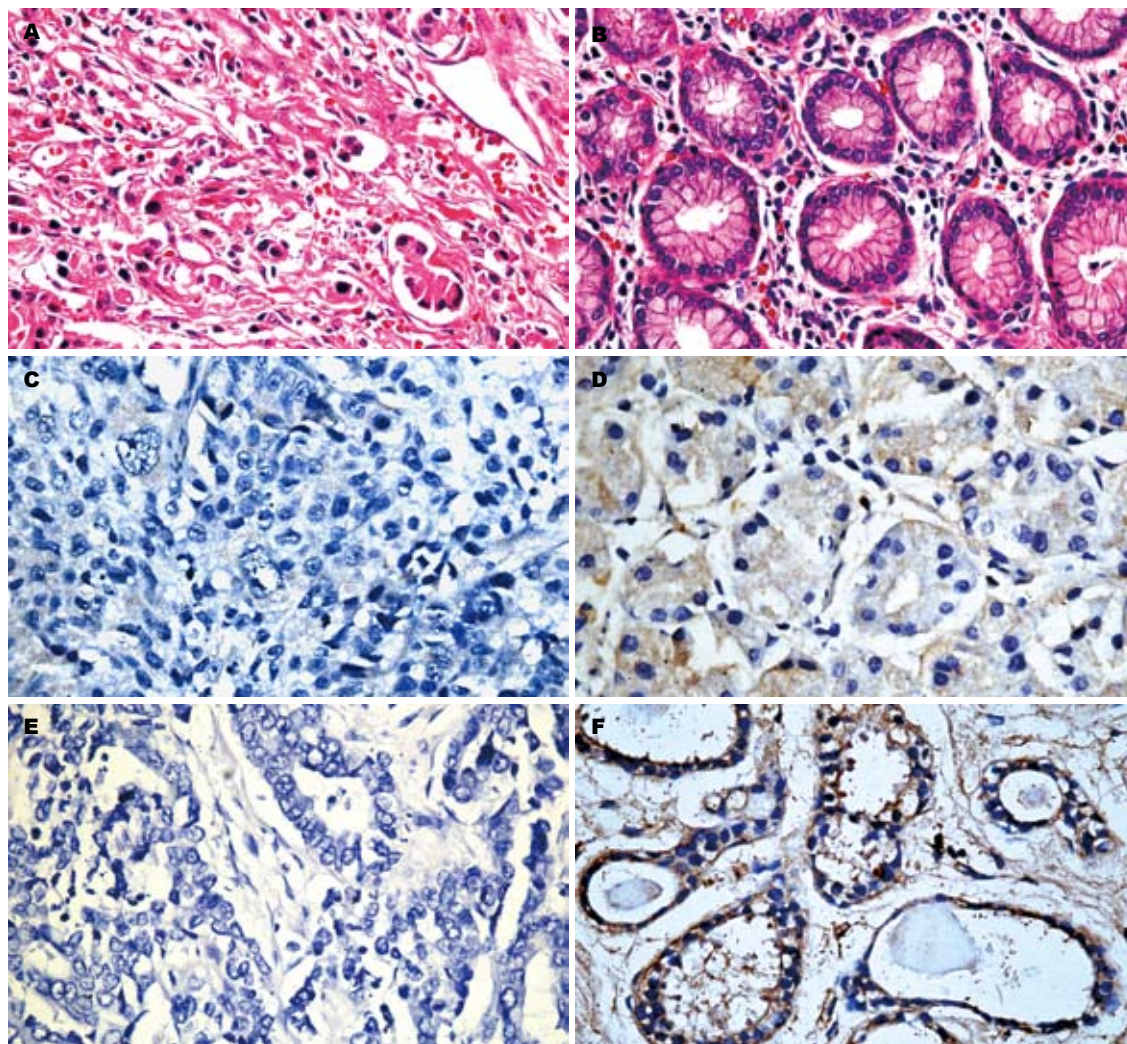


图1 ARHI蛋白在胃癌与癌旁正常组织的表达($\times 400$)。A: 胃癌组织(HE); B: 癌旁正常组织(HE); C: 胃癌组织(IHC); D: 癌旁正常组织(IHC); E: 阴性对照; F: 阳性对照。

达与较短的无进展生存期相关; 通过对卵巢癌细胞的研究提示ARHI基因可以诱导自体吞噬细胞的死亡, 促进肿瘤细胞休眠^[21,22]。可见, 随着对ARHI基因的不断研究, 其发挥生物学功能的诸多分子机制逐渐在被发现和认识。

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 但目前胃癌发病机制仍不清楚, 早期诊断和治疗比率仍很低。ARHI基因作为一个较特殊的抑癌基因, 其越来越多的生物学功能正在不断地被研究报道, 但这些研究大多集中于卵巢癌、乳腺癌及胰腺癌中。ARHI基因与人胃癌的发生、发展是否有相关性? 目前国内外尚无相关研究报道。本试验通过免疫组织化学的方法首次初步研究了ARHI蛋白在人胃癌组织与癌旁正常组织的表达差异。结果显示ARHI在胃癌组织(试验组)中的表达缺失率为56.45%, 而在癌旁正常组织(对照组)的表达缺失率为25%。切片通过半定量评分的方法以

平均阳性积分代表阳性强度, 用非参数秩和检验(Wilcoxon秩和检验)的方法统计比较后发现ARHI表达在两组间存在明显统计学差异($T = 2407.0$, $P < 0.01$); 同时采用卡方检验方法对两组间蛋白表达率统计分析后也提示存在明显统计学差异($\chi^2 = 7.666$, $P < 0.01$)。对62例胃癌组织实验结果统计分析发现ARHI蛋白表达与肿瘤的分化程度及TNM分期有关($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别、肿瘤发生部位、大小、大体类型、是否淋巴结转移及神经、脉管浸润均无明显统计学差异。同时我们的试验显示ARHI蛋白阳性着色主要集中于胞浆及胞膜, 但部分纤维结缔组织及肌层也有阳性分布, 这与Lu等^[3]研究一致, 提示在正常情况下ARHI是一种在多组织中均有表达的基因, 说明这种基因有着重要的生物学功能。

癌基因的激活和抑癌基因的失活是肿瘤研

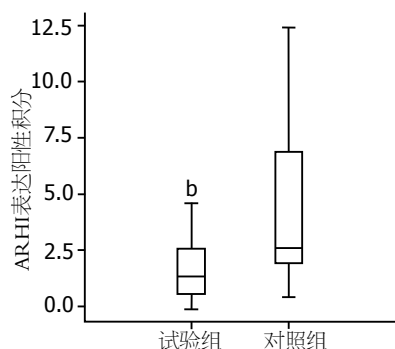


图2 两组间ARHI表达阳性积分比较. $P < 0.01$ vs 对照组.

研究的热点, 抑癌基因的失活被认为是肿瘤发生的重要机制之一. ARHI既是母源性的抑癌印迹基因又是ras/rap超家族成员, 而我们知道ras/rap超家族成员属于癌基因, ARHI基因是该家族第1个被报道的抑癌基因, 并且近年来研究提示其还与肿瘤细胞的信号转导、自体吞噬、休眠及患者的预后相关. 另外, 印迹基因作为表观遗传学的研究内容也是近年研究的热点, 这就极大的引起了我们研究的兴趣. 目前关于ARHI基因的研究还相对较少, 而其与胃癌的相关研究尚无报道. 肿瘤的发生是一个多因素作用, 多基因参与, 逐步发展的过程. ARHI基因属于ras/rap癌基因家族成员, 为何目前的研究显示其发挥抑癌功能? 其发挥抑癌功能的具体机制是什么? ARHI基因是否仅仅是肿瘤发展的某个阶段的抑癌基因? 是否在不同的条件下也与其他某些基因一起共同参与肿瘤的发生、发展? 这些问题尚不确定. 本研究旨在初步探讨ARHI在胃癌的表达情况, 为进一步深入地研究提供依据, 从而为胃癌的基因诊断、基因治疗以及分子靶向药物的治疗提供新的思路.

4 参考文献

- 1 Yu Y, Xu F, Peng H, Fang X, Zhao S, Li Y, Cuevas B, Kuo WL, Gray JW, Siciliano M, Mills GB, Bast RC Jr. NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 214-219
- 2 Hisatomi H, Nagao K, Wakita K, Kohno N. ARHI/NOEY2 inactivation may be important in breast tumor pathogenesis. *Oncology* 2002; 62: 136-140
- 3 Lu ZH, Chen J, Gu LJ, Luo YF, Gu CF. [ARHI mRNA and protein expression in pancreatic cancers]. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2001; 23: 324-327
- 4 杨红, 陈原媛, 蒋卫君, 陈元方, 徐峰极, 崔全才. 新的候选抑癌基因NOEY2在胰腺肿瘤中的表达. *胰腺病学* 2002; 2: 28-30
- 5 Yang J, Hu A, Wang L, Li B, Chen Y, Zhao W, Xu W, Li T. NOEY2 mutations in primary breast cancers and breast hyperplasia. *Breast* 2009; 18: 197-203
- 6 Yuan J, Luo RZ, Fujii S, Wang L, Hu W, Andreoff M, Pan Y, Kadota M, Oshimura M, Sahin AA, Issa JP, Bast RC Jr, Yu Y. Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers. *Cancer Res* 2003; 63: 4174-4180
- 7 Yu Y, Fujii S, Yuan J, Luo RZ, Wang L, Bao J, Kadota M, Oshimura M, Dent SR, Issa JP, Bast RC Jr. Epigenetic regulation of ARHI in breast and ovarian cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 268-277
- 8 Feng W, Marquez RT, Lu Z, Liu J, Lu KH, Issa JP, Fishman DM, Yu Y, Bast RC Jr. Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer* 2008; 112: 1489-1502
- 9 Janssen EA, Øvestad IT, Skaland I, Sjøland H, Gudlaugsson E, Kjellefjord KH, Nysted A, Søreide JA, Baak JP. LOH at 1p31 (ARHI) and proliferation in lymph node-negative breast cancer. *Cell Oncol* 2009; 31: 335-343
- 10 马宏, 王翠玲. 肾病幼鼠肾组织尿激酶型纤溶酶原激活物及其抑制物mRNA与蛋白表达的特点和ACEI干预的影响. *中华儿科杂志* 2002; 40: 292-295
- 11 Luo RZ, Peng H, Xu F, Bao J, Pang Y, Pershad R, Issa JP, Liao WS, Bast RC Jr, Yu Y. Genomic structure and promoter characterization of an imprinted tumor suppressor gene ARHI. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1519: 216-222
- 12 Yu Y, Luo R, Lu Z, Wei Feng W, Badgwell D, Issa JP, Rosen DG, Liu J, Bast RC Jr. Biochemistry and biology of ARHI (DIRAS3), an imprinted tumor suppressor gene whose expression is lost in ovarian and breast cancers. *Methods Enzymol* 2006; 407: 455-468
- 13 Huang J, Lin Y, Li L, Qing D, Teng XM, Zhang YL, Hu X, Hu Y, Yang P, Han ZG. ARHI, as a novel suppressor of cell growth and downregulated in human hepatocellular carcinoma, could contribute to hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog* 2009; 48: 130-140
- 14 Weber F, Aldred MA, Morrison CD, Plass C, Frilling A, Broelsch CE, Waite KA, Eng C. Silencing of the maternally imprinted tumor suppressor ARHI contributes to follicular thyroid carcinogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1149-1155
- 15 Lu Z, Luo RZ, Peng H, Rosen DG, Atkinson EN, Warneke C, Huang M, Nishimoto A, Liu J, Liao WS, Yu Y, Bast RC Jr. Transcriptional and posttranscriptional down-regulation of the imprinted tumor suppressor gene ARHI (DRAS3) in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2404-2413
- 16 Nishimoto A, Yu Y, Lu Z, Mao X, Ren Z, Watowich SS, Mills GB, Liao WS, Chen X, Bast RC Jr, Luo RZ. A Ras homologue member I directly inhibits signal transducers and activators of transcription 3 translocation and activity in human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6701-6710
- 17 Zhang J, Li YH, Cui AR, Wang JL, Cheng JX, Wang SJ. [Expression and clinical relevance of ARHI, STAT3 and E2F1 in ovarian serous carcinoma]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2008; 30: 905-909
- 18 Huang S, Chang IS, Lin W, Ye W, Luo RZ, Lu Z, Lu Y, Zhang K, Liao WS, Tao T, Bast RC Jr, Chen X, Yu Y. ARHI (DIRAS3), an imprinted tumour suppressor gene, binds to importins and blocks nuclear import of cargo proteins. *Biosci Rep* 2009; 30: 159-168
- 19 Dalai I, Missiaglia E, Barbi S, Butturini G, Doglioni C, Falconi M, Scarpa A. Low expression of ARHI is

同行评价

本文学术性较好, 具有一定的创新性和临床意义.

- associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors. *Neoplasia* 2007; 9: 181-183
- 20 Rosen DG, Wang L, Jain AN, Lu KH, Luo RZ, Yu Y, Liu J, Bast RC Jr. Expression of the tumor suppressor gene ARHI in epithelial ovarian cancer is associated with increased expression of p21WAF1/CIP1 and prolonged progression-free survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6559-6566
- 21 Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS, Bast RC Jr. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 2008; 118: 3917-3929
- 22 Amaravadi RK. Autophagy-induced tumor dormancy in ovarian cancer. *J Clin Invest* 2008; 118: 3837-3840

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

血管内皮生长因子B及其变位剪切体在不同肝组织中的表达差异及意义

王瞿辉, 王毅军, 高英堂, 杜智, 杨斌, 张晔, 郭华, 景丽, 余俊, 许彦杰

王瞿辉, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市 300170
王毅军, 天津市第三中心医院肝胆外科 天津市 300170
高英堂, 杜智, 张晔, 余俊, 许彦杰, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
杨斌, 南开大学生命科学学院 天津市 300071
郭华, 景丽, 天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所 天津市 300170
王瞿辉, 硕士, 主要从事肝胆疾病外科治疗的研究。
天津市重点科技攻关专项基金资助项目, No. 05YFSJSF02500
作者贡献分布: 此课题由王毅军与杜智设计; 荧光定量PCR检测及论文撰写由王瞿辉完成; 生物信息学分析由杨斌完成; 数据分析由高英堂、张晔及郭华完成; 实验标本收集与管理由王毅军、景丽、余俊及许彦杰完成。
通讯作者: 王毅军, 教授, 主任医师, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院. wangyijuncarl@yahoo.com.cn
电话: 022-84112205 传真: 022-84112205
收稿日期: 2010-10-26 修回日期: 2010-12-05
接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-08

Significance of expression of vascular endothelial growth factor B and its splice isoforms in different types of liver lesions

Qu-Hui Wang, Yi-Jun Wang, Ying-Tang Gao, Zhi Du, Bin Yang, Ye Zhang, Hua Guo, Li Jing, Jun Yu, Yan-Jie Xu

Qu-Hui Wang, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Yi-Jun Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Ying-Tang Gao, Zhi Du, Ye Zhang, Jun Yu, Yan-Jie Xu, Tianjin Key Lab of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Bin Yang, Department of Life Sciences, Nankai University, Tianjing 300071, China
Hua Guo, Li Jing, Tianjin Third Central Hospital, Institute for Hepatobiliary Diseases, Tianjin 300170, China
Supported by: the Key Project of Tianjin Science and Technology Commission, No. 05YFSJSF02500
Correspondence to: Professor Yi-Jun Wang, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. wangyijuncarl@yahoo.com.cn
Received: 2010-10-26 Revised: 2010-12-05
Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To detect the mRNA expression of vascular endothelial cell growth factor B (VEGF-B) and its splice isoforms VEGF-B167 and VEGF-B186 in different types of liver lesions and to assess their

clinical significance.

METHODS: The mRNA expression of VEGF-B, VEGF-B167 and VEGF-B186 in liver cancer, cancer-adjacent tissue, liver cirrhosis, chronic hepatitis B, and normal liver tissue was detected by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The correlation of VEGF-B, VEGF-B167, and VEGF-B186 expression with the clinical pathological data of patients was analyzed, and survival analysis was performed using follow-up data.

RESULTS: There were no statistical differences in the expression levels of total VEGF-B and VEGF-B186 among each group, while the expression level of VEGF-B167 mRNA was significantly different among each group, highest in the normal group but lowest in liver cirrhosis group (252.59 *vs* 168.00, $P = 0.005$). The expression level of VEGF-B167 mRNA was significantly higher in the liver cancer group than in the chronic hepatitis B group (234.13 *vs* 170.72, 168.00, both $P < 0.05$). The overall survival rate and tumor-free survival rate of patients with low VEGF-B167 expression tended to be higher than those of patients with high VEGF-B167 expression ($P = 0.097, 0.023$). The expression levels of total VEGF-B, VEGF-B167 and VEGF-B186 had no significant correlation with sex, age, virus infection, liver cirrhosis, Child-Pugh score, AFP score, tumor number or size, vascular invasion, TNM stage, or tumor differentiation.

CONCLUSION: VEGF-B is involved in hepatocarcinogenesis and VEGF-B167 plays a more important role than VEGF-B186 in this process. Patients with low VEGF-B167 expression have good prognosis since their postoperative overall survival rate and tumor-free survival rate are higher than those with high VEGF-B167 expression.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Vascular endothelial cell growth factor B; mRNA; RT-PCR

Wang QH, Wang YJ, Gao YT, Du Z, Yang B Zhang Y, Guo

■背景资料

肝细胞癌是一种高度恶性肿瘤, 严重威胁人类健康。丰富而又扭曲的血管是肝癌的重要特征, VEGF-B在血管生成中的作用已经成为目前肝癌研究的新方向。

■同行评议者

唐南洪, 教授, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

■研究前沿

肿瘤血管生成已成为目前研究肿瘤发生与发展的热点,通过调控促血管生成因子和抑制血管生成因子表达的分子靶向治疗可能成为控制肿瘤生长的有效途径。

H, Jing L, Yu J, Xu YJ. Significance of expression of vascular endothelial growth factor B and its splice isoforms in different types of liver lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 31-37

摘要

目的: 探讨不同肝组织中VEGF-B及其两个变位剪切体VEGF-B167、VEGF-B186 mRNA的表达,并评估其临床意义。

方法: 应用荧光定量PCR法检测肝癌、癌旁、乙型肝炎肝硬化、慢性乙型肝炎及正常肝组织中总VEGF-B、VEGFB167及VEGFB186 mRNA的表达量,与患者的临床病理资料做相关性分析,并结合随访资料做生存分析。

结果: 总VEGF-B及VEGF-B186 mRNA在各组组织中表达量无统计学差异; VEGF-B167 mRNA在各组间表达量有统计学差异,正常组表达最高,乙型肝炎肝硬化组最低(252.59 vs 168.00, $P = 0.005$),肝癌组中VEGF-B167的表达量明显高于慢性乙型肝炎组和乙型肝炎肝硬化组(234.13 vs 170.72, 168.00; $P = 0.043$, $P < 0.01$)。依据VEGF-B表达高低,将肝癌患者分组,VEGF-B167低表达组患者的总体生存率较高表达组和无差异组有升高趋势($P = 0.097$),而VEGF-B167低表达组患者术后无瘤生存率明显高于其他两组($P = 0.023$)。肝癌组织中总VEGF-B、VEGF-B167及VEGF-B186的表达与患者性别、年龄、病毒感染、肝硬化、Child-Pugh分级、AFP值、肿瘤数目、肿瘤大小、血管侵犯、TNM分期及肿瘤分化之间相关性无统计学意义。

结论: VEGF-B参与了肝癌的发生发展过程,VEGF-B167在此过程中的作用较VEGF-B186更重要。VEGF-B167低表达患者预后较好,术后总生存率和无瘤生存率较高。

关键词: 肝细胞癌; 血管内皮生长因子B; mRNA; 实时定量聚合酶链式反应

王瞿辉, 王毅军, 高英堂, 杜智, 杨斌, 张晔, 郭华, 景丽, 余俊, 许彦杰. 血管内皮生长因子B及其变位剪切体在不同肝组织中的表达差异及意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 31-37
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/31.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高度恶性肿瘤,严重威胁人类健康^[1]。肝癌为世界第6大常见恶性肿瘤,全球每年新增约63万病例,死亡人数约为60万,为癌症中第3号杀

手,我国年发病人数约为35万,每年约有32万人死于此病,发病率与死亡率均占恶性肿瘤的第2位^[2]。HCC是典型的多血管肿瘤,丰富而又扭曲的血管是肝癌的重要特征,血管生成已经成为目前肝癌研究的热点。血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)与肝癌血管形成密切相关,其家族包括: VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盘生长因子和VEGF-F等7个成员以及各自的变位剪切体^[3-5]。VEGF-A被公认为是体内最强的一种血管生成促进因子,其在HCC发生发展过程中的作用及意义已经受到各国学者的关注。VEGF-B是该家族的另一成员^[6],他在HCC组织中的表达和意义尚不明确。本试验采用实时荧光定量PCR技术检测VEGF-B、VEGF-B167及VEGF-B186 mRNA在HCC组织中的表达并研究其与临床资料的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 组织标本均取自2004-12/2009-08天津市第三中心医院肝胆外科住院并手术的患者,包括肝癌者98例: 获取肝癌组织(T)98份、癌旁<1 cm处组织(N0)21份、癌旁1 cm处组织(N1)21份、癌旁2 cm处组织(N2)98份、癌旁3 cm处组织(N3)85份; 乙型肝炎肝硬化组织(LC)32例; 慢性乙型肝炎组织(HV)5例; 正常肝组织(取自手术治疗的肝血管瘤瘤旁组织24例。标本在术后立即置于-70 °C低温冰箱冷冻保存备用。所有肝癌组织均经病理学检查证实,癌旁组织经病理检查未见肝癌细胞。试验方案经天津市第三中心医院伦理委员会审核通过,患者或家属均知情同意。98例肝癌患者中男81例,女17例,中位年龄53岁,患者来源以天津为主,余近1/3来自北方其他省市。术前血清学检查确定肝炎类型、肿瘤标记物水平,依据术前1 wk指标、Child-Pugh标准评估肝功能,以影像学及术中所见评估血管侵犯,根据临床及病理结果进行国际TNM分期。全部病例从手术日开始进入随访,随访内容包括术后复发时间、生存时间等。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和逆转录: 参照Promega公司RNAagents试剂盒操作说明提取总RNA,每50 mg组织的总RNA溶于50 μ L DEPC水中,琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,紫外分光光度计检测RNA含量。每个逆转录反应包含2 μ g RNA、3 μ L随机引物,补DEPC水至体系为21 μ L,70 °C热

表 1 各基因引物序列、产物片段长度及反应条件

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(°C)
VEGF-B	CAGAGGAAAGTGGTGTGCATGGA	CTGCATTACACTGGCTGTGT	281	55.0
VEGF-B167	CAGAGGAAAGTGGTGTGCATGGA	GGGGCCTGGGGCTGTCTGGC	338	64.0
VEGF-B186	CAGAGGAAAGTGGTGTGCATGGA	GAGTGGCAGCCCTGTCTGGC	328	62.5
GAPDH	GGGCATCCTGGGCTACACTGA	CAAATTCGTTGTCATACCAGGAAATG	143	62.5

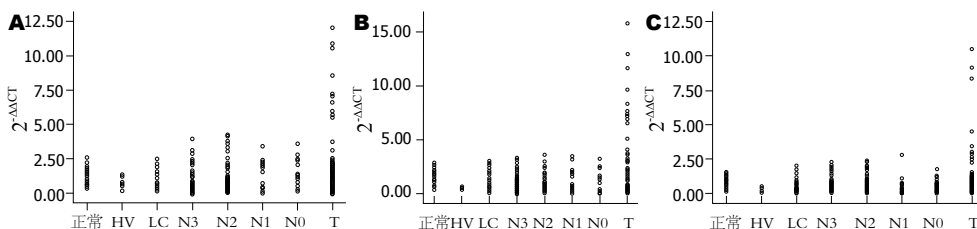


图 1 VEGF-B及其两个变位剪切体在不同组肝组织中的相对表达量。A: 总VEGF-B; B: VEGF-B167; C: VEGF-B186。HV: 慢性乙型肝炎组织; LC: 乙型肝炎肝硬化组织; N3: 癌旁3 cm处组织; N2: 癌旁2 cm处组织; N1: 癌旁1 cm处组织; N0: 癌旁<1 cm处组织; T: 肝癌组织。

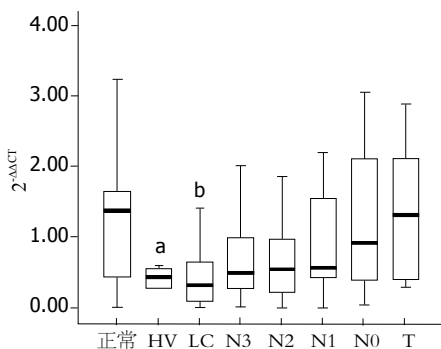


图 2 VEGF-B167在不同组肝组织之间的表达差异。* $P<0.05$, $^bP<0.01$ vs T组。HV: 慢性乙型肝炎组织; LC: 乙型肝炎肝硬化组织; N3: 癌旁3 cm处组织; N2: 癌旁2 cm处组织; N1: 癌旁1 cm处组织; N0: 癌旁<1 cm处组织; T: 肝癌组织。

变性15 min, 迅速冰浴3 min; 再依次加入4.8 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$ 、8 μ L 5 \times 逆转录缓冲液、2 μ L 10 mmol/L dNTP、1.5 μ L逆转录酶, 加DEPC水至终体积为40 μ L。37 $^{\circ}C$ 水浴90 min, 70 $^{\circ}C$ 10 min灭活逆转录酶。

1.2.2 引物设计: 依据GenBank中VEGF-B、VEGF-B167、VEGF-B186和管家基因GAPDH的mRNA序列设计引物, 采用Primer Express 2.0软件设计, 由上海生物工程技术服务有限公司合成, 引物序列及适宜退火温度见表1。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测: 采用ABI7000荧光定量PCR仪检测, 反应体系如下: cDNA模板2 μ L、上下游引物各0.5 μ L、1 U Taq聚合酶、2 μ L 2.5 mmol/L dNTP和2.5 μ L 10 \times PCR缓冲液, 加超纯水至总体积25 μ L。扩增条件为: 94 $^{\circ}C$ 预变性2 min; 94 $^{\circ}C$ 变性30 s, 适宜退火温度, 30 s, 72 $^{\circ}C$,

30 s; 反应45个循环。将参比基因和目的基因的CT值按 $2^{-\Delta\Delta CT[7-9]}$ 法计算目的基因相对表达量。

统计学处理 所有数据均用SPSS13.0统计软件处理分析, 基因表达差异组间分析采用秩和检验, 与临床病理资料的相关性分析采用卡方检验或Fisher精确概率检验, 采用Log-rank检验进行生存分析并绘制Kaplan-Meier生存曲线。采用Cox多因素风险比例模型分析肝癌预后的影响因素。所有结果均以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF-B及两个变位剪切体VEGF-B167、VEGF-B186 mRNA在各组肝组织中的表达 总VEGF-B、VEGF-B167及VEGF-B186 mRNA在各组组织中表达结果如图1、2所示, 总VEGF-B及VEGF-B186在各组组织中的表达无统计学差异, 而VEGF-B167在各组中的表达量差异有统计学意义($P=0.005$), LC组最低, 中位数为0.440, 正常组最高, 中位数为1.368; 肝癌组VEGF-B167表达水平明显高于HV和LC组(1.312 vs 0.526, 0.440), 并且从癌旁N3到肝癌T的表达量有递增趋势。总VEGF-B、VEGF-B167和VEGF-B186在肿瘤组(T)分别有10例、12例和9例的表达量明显高于其他标本($2^{-\Delta\Delta CT}>5$)。

2.2 VEGF-B表达水平与临床病理参数的相关性 比较98对肝癌组织(T)与相应的癌旁2 cm组织(N2)的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值, 前者高于或低于后者3倍定义为该基因在肝癌中高表达或低表达^[10], 差异<3倍的认为该基因在肝癌与癌旁间表达无差

■ 相关报道

Kanda等通过RT-PCR方法对48例肝癌组织以及无瘤肝组织进行VEGF-B因子的mRNA水平检测, 结果发现肝癌组中VEGF-B表达量与肝癌的病理分期、肿瘤的数量、血管侵犯以及是否存在包膜相关, 其两种亚型中VEGF-B167起着主导作用, 并且总VEGF-B和VEGF-B167低表达组的5年生存率高于高表达组。

■创新盘点

本研究主要探讨VEGF-B在我国乙型肝炎为主要发病因素的肝癌组织中的表达情况,为进一步研究肝癌发生的多因素提供了参考。

表 2 总VEGF-B、VEGF-B167及VEGF-B186表达水平与98例肝癌患者的临床病理特征的相关性 (n)

病理特征	总VEGF-B				VEGF-B167				VEGF-B186			
	高表达	低表达	无差异	P 值	高表达	低表达	无差异	P 值	高表达	低表达	无差异	P 值
性别				0.948				0.088				0.854
男	23	24	34		23	23	35		24	25	37	
女	4	5	8		1	6	10		4	5	8	
年龄(岁)				0.061				0.100				0.775
≤55	20	13	21		17	12	25		17	13	24	
>55	7	16	21		7	17	20		11	12	21	
HBSAg				0.188				0.846				0.304
+	21	22	38		20	23	38		22	19	40	
-	6	7	4		4	6	7		6	6	5	
肝硬化				0.765				0.230				0.914
有	24	27	37		22	28	38		25	22	41	
无	3	2	5		2	1	7		3	3	4	
Child-Pugh分级				0.123				0.748				0.554
A	25	26	29		19	25	36		23	22	35	
B	2	3	13		5	4	9		5	3	10	
AFP(ng/mL)				0.276				0.943				0.676
≥400	9	10	21		9	12	17		10	8	19	
<400	18	19	21		15	17	28		18	17	26	
肿块数目				0.515				0.734				0.493
单发	19	19	24		15	20	27		18	18	26	
多发	8	10	18		9	9	18		10	7	19	
肿块直径(cm)				0.149				0.590				0.425
≤5	10	6	18		7	9	18		11	6	17	
>5	17	23	24		17	20	27		17	19	28	
血管侵犯				0.938				0.482				0.837
有	9	11	15		11	9	15		9	10	16	
无	18	18	27		13	20	30		19	15	29	
TNM分期				0.382				0.609				0.981
I/II	14	10	20		11	15	18		13	11	20	
III/IV	13	19	22		13	14	27		15	14	25	
分化程度				0.397				0.073				0.636
高	8	9	18		6	8	21		9	8	18	
中	11	16	16		12	18	14		12	14	18	
低	8	4	8		6	3	10		7	3	9	

异。在98例肝癌组织,总VEGF-B、VEGF-B167和VEGF-B186高表达的分别为27例、24例和28例,低表达的分别有29例、29例和25例;差异<3倍的分别有42例、45例和45例。总VEGF-B、VEGF-B167及VEGF-B186的表达与患者性别、年龄、病毒感染、肝硬化、Child-Pugh分级、AFP值、肿瘤数目、肿瘤大小、TNM分期及肿瘤分化无相关性(表2)。

2.3 生存期分析 根据患者的术后随访资料计算该组患者的生存率,以研究VEGF-B与预后之间的关系。本组患者共98例,失访4例,全组患者的两年生存率为56.37%。通过绘制Kaplan-Meier曲线(图3),可以看出总VEGF-B167 mRNA低

表达组患者的术后总生存率较高表达组和无差异组有升高趋势($P = 0.097$),而总VEGF-B、VEGF-B186 mRNA表达与患者术后生存之间的关系不明显($P = 0.394, 0.393$)。根据患者术后是否复发以及复发时间作无瘤生存曲线(图4),VEGF-B167 mRNA低表达组患者术后无瘤生存率高于高表达组和无差异组,差异有统计学意义($P = 0.023$)。同样总VEGF-B、VEGF-B186 mRNA表达与患者术后生存之间的关系不明显($P = 0.083, 0.205$)。

应用COX回归模型对总VEGF-B、VEGF-B167、VEGF-B186及其他临床因素(性别、年龄、HBsAg、HCV、肝硬化、肝功能Child-Pugh分级、

表 3 肝癌预后COX回归单因素分析结果

项目	无瘤生存	
	Exp(B)(95%CI)	P值
总VEGF-B		
高表达 vs 无差异	0.779(0.308-1.967)	0.597
低表达 vs 无差异	0.430(0.059-3.153)	0.406
VEGF-B167		
高表达 vs 无差异	1.267(0.618-2.598)	0.519
低表达 vs 无差异	0.464(0.153-1.402)	0.173
VEGF-B186		
高表达 vs 无差异	1.098(0.472-2.551)	0.829
低表达 vs 无差异	0.850(0.387-1.870)	0.687
性别		
男 vs 女	0.739(0.355-1.542)	0.421
年龄(岁)		
≤55 vs >55	0.779(0.421-1.442)	0.427
乙型肝炎		
阳性 vs 阴性	0.606(0.288-1.278)	0.189
丙型肝炎		
阳性 vs 阴性	1.664(0.512-5.407)	0.397
肝硬化		
有 vs 无	1.096(0.389-3.086)	0.863
Child-Pugh分级		
B vs A	2.853(1.213-6.712)	0.016
AFP(μg/L)		
≥400 vs <400	1.769(0.973-3.217)	0.062
肿块数目		
多发 vs 单发	3.176(1.218-8.283)	0.009
肿块直径(cm)		
≥5 vs <5	2.518(1.302-4.870)	0.006
血管侵犯		
有 vs 无	3.170(1.215-8.271)	0.018
TNM分期		
Ⅲ+Ⅳ vs Ⅰ+Ⅱ	2.685(1.198-6.020)	0.016
肿瘤分化		
低 vs 中高	1.334(0.604-2.945)	0.476

表 4 肝癌预后COX回归多因素分析结果(基于Wald统计量的后退法)

项目	无瘤生存	
	Exp(B)(95%CI)	P值
肿块数目		
单发 vs 多发	2.518(1.302-4.870)	0.006
肿块直径(cm)		
≥5 vs <5	14.927(4.078-54.637)	<0.001

AFP、肿块数目、肿块直径、血管侵犯、TNM分期、肿瘤分化12个因素)进行分析后发现, Child-Pugh分级、肿瘤数目、肿瘤直径、血管侵犯、TNM分期是影响无瘤生存时间的危险因素(表3)。

在多因素分析中, 同样选取上述单因素分析中所采用的15个指标, 应用COX回归模型分析

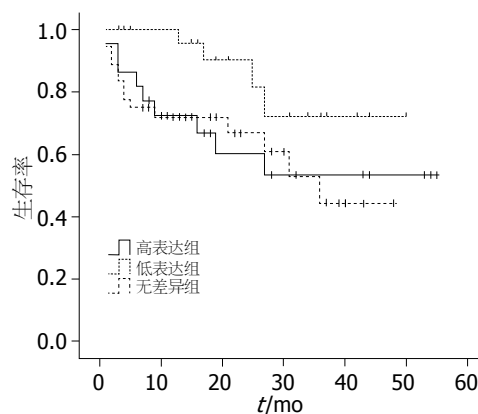


图 3 不同VEGF-B167 mRNA表达水平HCC患者总生存曲线。

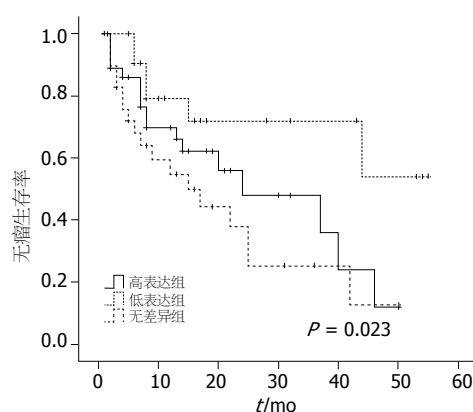


图 4 不同VEGF-B167 mRNA表达水平HCC患者无瘤生存曲线。

其对于无瘤生存时间的影响。采用基于Wald统计量的后退法进行分析, 仅有肿瘤数目和肿瘤直径为影响患者无瘤生存的危险因素(表4)。

3 讨论

VEGF-B位于11号染色体q13^[6], 含有8个外显子和6个内含子, 大约跨度4 000 bp, 转录时由于不同的剪切方式可形成两种形式的mRNA, 即VEGF-B167和VEGF-B186^[11], 编码的蛋白质分别含167和186个氨基酸。二者由于羟基末端的氨基酸序列不同而具有不同的生物学特点^[8]。VEGF-B以同源二聚体形式与内皮细胞表面的血管内皮生长因子受体1(vascular endothelia growth factor receptor 1, VEGFR1)结合而发挥促进血管生成的生物学作用^[12-21]。

成人肝脏的血管非常丰富, 血管的侧面是内皮细胞相连的肝窦与Disse间隙相隔开来; 而在肝癌组织中的肝窦与正常肝组织不同, 不再是由不连续的扁平内皮细胞覆盖, 而是由连续的内皮细胞围绕而成的常规毛细血管结构。因此, 血管生成作用在肝癌中较为典型。VEGF-B对

■应用要点

VEGF-B参与了肝癌的发生发展过程, VEGF-B167在此过程中的作用较VEGF-B186更重要。VEGF-B167低表达患者预后较好, 术后总生存率和无瘤生存率较高。

■同行评价

本文新颖性较好, 有一定的探索价值

血管生成存在正性上调作用, 其对于肝癌的血管生成也应存在一定的作用. 但目前有关VEGF-B在肝癌血管生成中作用的研究还很少. Mas等^[22]通过高密度寡核苷酸蛋白芯片技术检测发现VEGF-B在丙型肝炎引起的HCC患者血清中的表达量明显高于其在单纯丙型肝炎肝硬化患者血清中的表达水平. Kanda等^[23]通过RT-PCR方法对48例肝癌组织以及无瘤肝组织进行VEGF-B因子的mRNA水平检测, 结果发现肝癌组织中VEGF-B的总体表达水平低于癌旁正常肝组织, 而肝癌组中VEGF-B表达量与肝癌的病理分期、肿瘤的数量、血管侵犯以及是否存在包膜具有相关性, 其两种亚型中VEGF-B167起着主导作用. 但是两位学者所研究的HCC标本都有HCV感染基础, 而中国的肝癌患者多数由HBV感染引起, 其临床特点具有特殊性^[24], 迄今尚未发现研究VEGF-B在HBV引起的HCC中表达的报道, 因此本试验主要研究VEGF-B在我国乙型肝炎为主要发病因素的肝癌中表达及意义.

Mas等从蛋白水平研究发现HCC组VEGF-B表达量高于肝硬化组, 本实验从mRNA水平分别检测了总VEGF-B及其两个变位剪切体VEGF-B167、VEGF-B186在不同肝组织中表达量, 发现总VEGF-B及VEGF-B186在各组组织中的表达无统计学差异, 而肝癌组(T)中VEGF-B167表达量明显高于HV组和LC组, 表明VEGF-B167升高是导致肝癌组总VEGF-B高于肝硬化组的主要原因, 提示VEGF-B167在从肝硬化向肝癌的发展过程中可能起了重要作用. 另外, 本试验结果显示总VEGF-B、VEGF-B167和VEGF-B186在正常肝组织中的表达高于HV组和LC组, 可能跟患者HBV感染和肝脏功能情况有关.

关于VEGF-B在肝癌中表达的意义目前只有Kanda等报道, 本试验改进了实验方法, 对总VEGF-B及其两个变位剪切体VEGF-B167、VEGF-B186的检测都采用了荧光定量PCR方法, 并且将研究对象依据表达的高低分成了高表达、低表达和无差异3组, 减小了分组对实验结果的干扰, 未发现肝细胞癌组织中总VEGF-B、VEGF-B167和VEGF-B186 mRNA表达与患者的性别、年龄、病毒感染、是否合并肝硬化、Child-Pugh分级、血管侵犯及肿瘤的数目、大小、分化程度等相关.

Kanda等报道在肝癌患者中, 总VEGF-B和VEGF-B167低表达组的5年生存率高于高表达组($P = 0.19, 0.13$). 也有研究显示VEGF-B与其

他肿瘤患者预后存在相关性, Mylona等^[25]在免疫组织化学方法研究VEGF-B在侵袭性乳腺癌中表达及意义的试验中发现, VEGF-B是影响淋巴结阳性患者总生存率的一个重要因素($P = 0.029$), 说明VEGF-B可能成为检测淋巴结阳性乳腺癌患者预后的一个指标. Baty等^[26]结合寡核苷酸微阵列芯片技术结果和非小细胞肺癌患者的随访资料, 指出VEGF-B是影响非小细胞肺癌患者预后的一个关键因素. 本研究结果显示VEGF-B167与肝癌患者预后的关系较密切, VEGF-B167低表达组较高表达组和无差异组有较高的术后总生存率和无瘤生存率($P = 0.097, 0.023$). 此结果表明VEGF-B167低表达的肝癌患者术后复发风险较低, 但COX回归分析未发现VEGF-B167是影响患者无瘤生存的独立因素, 说明VEGF-B167可能和其他因素共同作用提高了患者的复发风险, 有待于进一步研究.

本实验结果表明VEGF-B参与了从肝硬化向肝癌的发展过程, VEGF-B167在此过程中发挥的作用比VEGF-B186更重要. VEGF-B167低表达的患者术后复发风险更低, 预后更好, 但机制尚不明确, 有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Lau WY, Lai EC. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 237-257
- 2 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 3 Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-660
- 4 Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35
- 5 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676
- 6 Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2576-2581
- 7 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- 8 Romanowski T, Markiewicz A, Bednars N, Bielawski KP. [Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 500-510
- 9 Shamanina Mlu, Vavilin VA, Mordvinov VA, Katokhin AV, Kuznetsova TN, Liakhovich VV. [Real-time polymerase chain reaction and its potential clinical application]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2007; 11: 37-46
- 10 王伟丽, 高英堂, 杜智, 王毅军, 景丽, 郭华, 杨斌, 白同. 应用实时荧光定量RT-PCR法建立肝癌分子诊断指数. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 985-991
- 11 Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D,

- Alitalo K, Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 1996; 271: 19310-19317
- 12 Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11709-11714
 - 13 Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 21217-21222
 - 14 Li Y, Zhang F, Nagai N, Tang Z, Zhang S, Scotney P, Lennartsson J, Zhu C, Qu Y, Fang C, Hua J, Matsuo O, Fong GH, Ding H, Cao Y, Becker KG, Nash A, Heldin CH, Li X. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J Clin Invest* 2008; 118: 913-923
 - 15 Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2513-2519
 - 16 Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997; 14: 2475-2483
 - 17 Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 103-108
 - 18 Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000; 86: E29-E35
 - 19 Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2660-2669
 - 20 Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2647-2653
 - 21 赵一鸣, 王鲁. 血管内皮生长因子受体与肝细胞癌血管生成关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 596-600
 - 22 Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek KC, Fisher RA. Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 1262-1271
 - 23 Kanda M, Nomoto S, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Correlations of the expression of vascular endothelial growth factor B and its isoforms in hepatocellular carcinoma with clinico-pathological parameters. *J Surg Oncol* 2008; 98: 190-196
 - 24 Ishikawa T. Clinical features of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2463-2467
 - 25 Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A, Nakopoulou L. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 557-563
 - 26 Baty F, Facompré M, Kaiser S, Schumacher M, Pless M, Bubendorf L, Savic S, Marrer E, Budach W, Buess M, Kehren J, Tamm M, Brutsche MH. Gene profiling of clinical routine biopsies and prediction of survival in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 181-188

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-08)

胆盐输出泵基因V444A与特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的关系

邓亚楠, 王琳琳, 唐清, 陈秀奇, 陈萍, 单庆文, 连淑君, 云翔

■背景资料

胆盐输出泵(BSEP)主要存在于肝脏中, 位于肝细胞的毛细胆管表面, 通过依赖ATP将肝细胞内的胆盐分泌到毛细胆管中, 是影响胆汁流量最重要的因素之一。BSEP基因多态性是胆汁淤积性疾病的易感因素, 目前研究表明BSEP基因与多种胆汁淤积性肝脏疾病有关。

邓亚楠, 王琳琳, 唐清, 陈秀奇, 陈萍, 单庆文, 连淑君, 云翔, 广西医科大学第一附属医院儿科 广西壮族自治区南宁市530021

邓亚楠, 在读硕士, 主要从事儿科消化系统疾病的研究。

广西科学研究与技术开发计划基金资助项目, No. 桂科攻0816004-6

作者贡献分布: 此课题由王琳琳、邓亚楠、唐清、陈秀奇、陈萍、单庆文、连淑君及云翔设计; 病历资料收集及把关由王琳琳、邓亚楠、唐清、陈秀奇、单庆文、连淑君及云翔完成; 研究过程由邓亚楠操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王琳琳、唐清、陈秀奇及陈萍提供; 数据分析由邓亚楠与王琳琳完成; 本论文写作由邓亚楠与王琳琳完成。

通讯作者: 王琳琳, 教授, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院儿科。wll276@yahoo.com.cn 电话: 0771-5356505

收稿日期: 2010-10-18 修回日期: 2010-11-18

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2011-01-08

Association between BSEP V444A polymorphism and risk of idiopathic neonatal hepatitis/cholestasis

Ya-Nan Deng, Lin-Lin Wang, Qing Tang, Xiu-Qi Chen, Ping Chen, Qing-Wen Shan, Shu-Jun Lian, Xiang Yun

Ya-Nan Deng, Lin-Lin Wang, Qing Tang, Xiu-Qi Chen, Ping Chen, Qing-Wen Shan, Shu-Jun Lian, Xiang Yun, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research and Technological Development Program of Guangxi, No. Gui Ke Gong 0816004-6

Correspondence to: Professor Lin-Lin Wang, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. wll276@yahoo.com.cn

Received: 2010-10-18 Revised: 2010-11-18

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To explore the association between the V444A polymorphism in the bile salt export pump (BSEP) gene and the risk of idiopathic neonatal hepatitis/cholestasis.

METHODS: Eighty-one infants with idiopathic hepatitis/cholestasis (case group) and 48 healthy infants without intrahepatic cholestasis (control group) were included in this study. The V444A polymorphism was genotyped by polymerase

chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

RESULTS: There are three V444A genotypes: AA homozygote, GA heterozygote, and GG homozygote. The frequencies of AA and AG and GG genotypes were 0.6%, 4.9% and 44.4% in the case group and 14.6%, 62.5% and 22.9% in the control group, respectively, with a significant difference between the two groups ($P = 0.019$). The distribution of GG genotype was significantly different between the two groups ($P < 0.05$, $OR = 2.691$, 95%CI: 1.205-6.008). The risk of suffering from idiopathic intrahepatic cholestasis in G allele carriers was 1.951 times higher than that in A allele carriers ($OR = 1.951$, 95%CI: 1.56-3.291).

CONCLUSION: The G allele of the BSEP V444A G polymorphism may be a risk factor for idiopathic intrahepatic cholestasis in infants.

Key Words: Bile salt export pump gene; Baby; Intrahepatic cholestasis; Single nucleotide polymorphism; Restriction fragment length polymorphism

Deng YN, Wang LL, Tang Q, Chen XQ, Chen P, Shan QW, Lian SJ, Yun X. Association between BSEP V444A polymorphism and risk of idiopathic neonatal hepatitis/cholestasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 38-43

摘要

目的: 探讨胆盐输出泵BSEP基因V444A(BSEP V444A)与特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的相关性。

方法: 以81例特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积患儿(病例组)和48例无肝内胆汁淤积婴儿(对照组)为研究对象, 应用聚合酶链-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对V444A片段行扩增及酶切分析。

结果: BSEPV444A有3种基因型: AA纯合子、GA杂合子、GG纯合子, AA, AG和GG 3种

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

基因型在病例组和对照组频率分别为4.9%, 50.6%, 44.4%和14.6%, 62.5%, 22.9%, 两组差异显著($P = 0.019$). 等位基因频率的相对风险分析发现, 其中GG基因型在两组人群中的分布差异有显著性($P < 0.05$, $OR = 2.691$, 95%CI: 1.205-6.008); G等位基因携带者患特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的风险是A等位基因的1.951倍($OR = 1.951$, 95% CI: 1.56-3.291).

结论: 在广西地区小儿当中发现BSEP V444A单链核苷酸的多态性位点, BSEP V444A G等位基因可能是特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的一个危险因素, G等位基因携带者可能增加特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的相对危险度.

关键词: 胆盐输出泵基因; 婴儿; 肝内胆汁淤积; 单核苷酸多态性; 限制性片段长度多态性

邓亚楠, 王琳琳, 唐清, 陈秀奇, 陈萍, 单庆文, 连淑君, 云翔. 胆盐输出泵基因V444A与特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 38-43
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/38.asp>

0 引言

随着分子生物学的发展, 有关基因多态性与疾病关系的探讨越来越受到人们的关注, ABCB11 又称胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)基因, 1995年, 猪的BSEP基因首先被克隆, 因其编码的蛋白与p糖蛋白170(由ABCB1基因编码)结构相似, 当时被命名为SpGP(the sister of pglycoprotein). 后来发现SpGP是肝脏主要的胆盐运载体, 改称为BSEP^[1,2]. 人类BSEP基因位于2q24.3, 含28个外显子^[3]编码的1 321个氨基酸^[4,5]. BSEP主要存在于肝脏中, 位于肝细胞的毛细胆管表面, 通过依赖ATP将肝细胞内的胆盐分泌到毛细胆管中, 是影响胆汁流量最重要的因素之一^[6,7]. BSEP基因多态性是胆汁淤积疾病的易感因素^[8], 目前研究表明BSEP基因与多种胆汁淤积性肝脏疾病有关, 如进行性家族性肝内胆汁淤积2型(progressive familial intrahepatic cholestasis, PFIC2)^[9-13], 良性复发性肝内胆汁淤积2型(benign recurrent intrahepatic cholestasis, BRIC2)^[14,15], 妊娠期肝内胆汁淤积(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)^[16,17], 药物诱导的肝内胆汁淤积^[17,18], 肝癌^[19-21]或其他部位癌症^[22]及原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)^[23]. 有报道称胆汁淤积疾病肝移

植预后不良与BSEP基因缺失有一定关系^[24-27], 但婴儿胆汁淤积是否存在BSEP基因的突变, 目前国内报道尚少. 本研究采用PCR技术对BSEP基因1个常见变异位点进行分析, 结合DNA直接序列测序与限制性核酸内切技术, 评价BSEPV444A基因在婴儿胆汁淤积发病机制中的遗传作用.

1 材料和方法

1.1 材料 征得患儿家长同意及医院伦理委员会批准, 收集 2008-10/2010-02广西医科大学第一附属医院儿科住院的特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的患儿81例, 其中男66例, 女15例, 男女比值为4:1, 病例组纳入标准: 婴儿期(包括新生儿期)起病; 黄疸属肝细胞性, 血清总胆红素(serum total bilirubin, TB)升高, 以直接胆红素(direct bilirubin, DB)增高为主, 可伴间接胆红素(indirect bilirubin, IB)升高; 肝大或肝脾肿大, 质地改变; 肝功能损害以血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)升高为主; 除外了肝炎病毒感染, 巨细胞病毒感染, 梅毒感染, 弓形虫感染, 人体免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染等. 对照组为随机选取无胆汁淤积的婴儿48例.

1.2 方法

1.2.1 PCR-RFLP分析: 所有研究对象分别抽取外周血2 mL, 用酚氯仿法提取外周血DNA, 引物F: 5'-GTTGGGAGAACAGTGAGTATTG-3', R: 5'-AGCTCTGTCTCACAGTTTGTGTT-3'(350 bp), PCR反应体系, Premix Tap(TaKaRa)25 μ L, DNA模板2.5 μ L, 引物1 1 μ mol/L, 引物2 1 μ mol/L, ddH₂O补充体积至50 μ L, PCR具体扩增条件 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 35 s, 59.3 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30循环(最后一个循环延伸5 min). PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定. 取扩增产物5 μ L, *Hae* III限制性内切酶(Fermentas)5 U, 10 \times Buffer R缓冲液1 μ L, 用无菌去离子水补足总体积至10 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C水浴4 h. 经2%琼脂糖凝胶电泳(120 mV)30 min, 在凝胶成像系统下观察结果.

1.2.2 DNA直接测序分析: PCR产物经上海生物工程技术有限公司纯化后直接测序. 所得序列结果与GenBank基因库上所提供的正常序列对比, 明确突变位点.

统计学处理 所有的数据用SPSS13.0处理, 以Hardy-Weinberg平衡法检验各组基因频率的群体代表性; 正态性分布的资料用mean \pm SD表示, 计量资料的统计推断采用 t 检验或单因素方

■ 相关报道

Kubitz等研究通过对1例诊断为BRIC-2的17岁男性患者进行BSEP基因分析, 发现了两种BSEP突变位点(E186G和V444A), 认为这种多位点联合突变导致BSEP蛋白表达不稳定或表达缺失, 是导致胆盐排泄减少, 引起高胆红素血症潜在影响因素.

■创新盘点

特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积是儿科常见病,其病因和发病机制尚不明确,国内有关婴儿胆汁淤积是否存在BSEP基因的突变报道较少,本研究采用PCR-SSCP技术探讨BSEP基因V444A在婴儿胆汁淤积发病机制中的遗传作用。

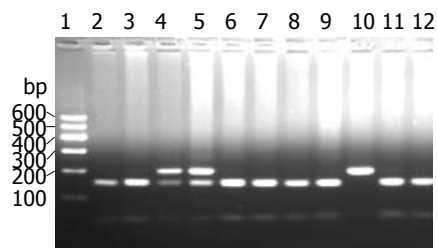


图1 BSEP V444A酶切图. 1: marker; 2, 3, 6, 7, 8, 9: GG基因型; 4, 5: AG基因型; 10: AA基因型。

差分析, 计数资料的统计学推断采用 χ^2 检验或Fisher's确切概率法。

2 结果

2.1 病例资料及临床特点 所有病例都有不同程度肝肿大, 临床肝功指标在病例组与对照组相比均有明显统计学差异, 而两组的年龄差异没有统计学意义。

2.2 PCR-RFLP PCR扩增产物片段大小为205 bp, BSEP基因1 331位点A被G置换后, 产生限制性内切酶HaeIII的酶切位点。根据酶切片段的情况, 基因型有3种: AA型(只出现205 bp 1条带), AG型(出现205、159、46 bp 3条带), GG型(出现159、46 bp 2条带)(图1)。

2.3 BSEP测序分析 对BSEP外显子13的一单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNP)位点进行基因测序显示, 在BSEP的外显子13第444编码位点上检测出单个碱基A>G的纯合突变和杂合突变均导致了单个氨基酸的替代, 在第444编码位点由原来编码的缬氨酸变成丙氨酸(V444A)(图2)。

2.4 BSEP V444A基因分布与临床生化检查分析 BSEP基因13号外显子上一SNP位点经电泳及测序结果显示3种基因型, 分别为GG、GA、AA 3种基因型。BSEP V444A各基因型在两组中分布符合遗传平衡, 表明抽样具有人群代表性。而两组基因型的差异性检验, 经Fisher确切概率法检验, 差异具有统计学意义($P = 0.004$); 其中GG基因型在两组人群中的分布差异有显著性($P < 0.05$, $OR = 2.691$, 95%CI: 1.205-6.008); G等位基因频率在两组人群中的分布差异有显著性($P < 0.05$, $OR = 1.951$, 95%CI: 1.56-3.291); 等位基因频率的相对风险分析发现, G等位基因携带者患特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的风险是A等位基因的1.951倍($OR = 1.951$)(表1)。

在病例组中, 对不同基因型的临床生化指标进行亚组分析, TB, DB, ALT, AST, γ -GT生化指标

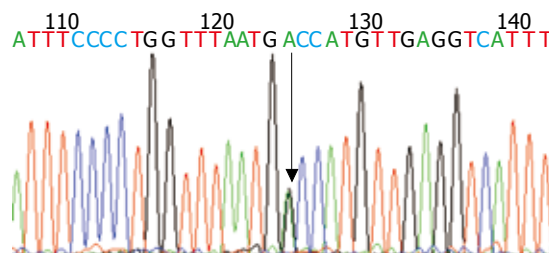


图2 BSEP V444A AG基因型SNP位点测序图。

的进行方差分析, 差异均无统计学意义(表2)。

3 讨论

在Lang进行的一项健康人BSEP基因的多中心研究中, 发现BSEP V444A可导致蛋白质替换而无致病性, 在不同国家、不同种族人群中有较高的基因频率, 在美国高加索人中占59.5%、在日本人中占80.4%、在非裔美国人中占65.6%^[28]。Pauli等^[23]通过对21例ICP患者和40例健康女性的研究发现, BSEP V444A在健康女性和ICP患者中所占比例分别为51.3%和83.3%^[29]。Kim等^[30]在日本正常人群研究也发现了V444A有较高的基因频率, 本研究结果, BSEP V444A在病例组和对照组出现比例分别为95%和85.5%, 结果与国外的一些研究结果不尽相同, 推测可能原因为: (1)样本的不均一性, 如种族、性别等; (2)研究对象设计不完全相同和样本量偏小。由上可知V444A在正常人群当中普遍存在, 推测该基因位点不稳定容易发生突变, 在健康人群也有较高突变率。

本实验结果显示, BSEP基因外显子13上游第1 331核苷酸由A突变为G, 产生限制性内切酶HaeIII的酶切位点, 内切酶HaeIII能识别的为G等位基因, 不能识别的为A等位基因, 因此, BSEP V444A有3种基因型: GG纯合子、GA杂合子、AA纯合子。BSEP V444A GG基因型在正常的婴儿和胆汁淤积患儿中总体所占比例存在差异, 差异具有统计学意义。其中GG基因型在两组人群中的分布差异有显著性($P < 0.05$, $OR = 2.691$); 等位基因频率的相对风险分析发现, G等位基因携带者患特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的风险是A等位基因的1.951倍($OR = 1.951$), 推测G等位基因可能是特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的一个危险因素, Dixon等^[31]研究证实了ICP患者和健康对照组研究存在GG, GA和AA 3种基因型, 研究认为携带G等位基因是ICP 1个重要的危险因素($OR = 1.70$, 95%CI: 1.4-2.1, $P < 0.0001$)。Meier等^[32]研究也证实了携带G等位基因是ICP 1个重要的危险因素($OR = 3.0$, 95%CI: 1.7-6.4),

表 1 BSEP V444A基因型及等位基因频率在病例组对照组中的比较 $n(\%)$

	病例组($n = 81$)	对照组($n = 48$)	P 值	OR	95%CI
基因型					
GG	36(44.4)	11(22.9)	0.014	2.691	1.205–6.008
GA	41(50.6)	30(62.5)			
AA	4(4.9)	7(14.6)			
等位基因					
G	113(69.8)	52(54.2)	0.012	1.951	1.56–3.291
A	49(30.2)	44(45.8)			

■应用要点

BSEP V444A G等位基因可能是特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的一个危险因素, G等位基因携带者可能增加特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的相对危险度。

表 2 病例组的不同基因型的血清生化指标亚组比较分析 (mean \pm SD)

血清生化指标	A/A 基因型	A/G基因型	G/G基因型
TB($\mu\text{mol/L}$)	158.42 \pm 13.39	156.52 \pm 45.71	213.95 \pm 31.9
DB($\mu\text{mol/L}$)	79.62 \pm 59.00	83.75 \pm 26.12	94.75 \pm 26.58
ALT(U/L)	110.25 \pm 26.98	107.21 \pm 27.88	77.25 \pm 23.54
AST(U/L)	234.25 \pm 28.28	232.24 \pm 25.06	164.25 \pm 15.02
γ -GT(U/L)	125.75 \pm 18.76	309.73 \pm 32.80	124.50 \pm 11.97

胆汁酸水平在V444A多态性者中较高。

BSEP V444A发病机制方面, V444A使444位点的缬氨酸变成丙氨酸, 从而引起胆BSEP功能的改变, 但Meier等的研究认为胆酸盐的运输特性在含丙氨酸和含缬氨酸之间并没有不同, 氨基酸444位点为丙氨酸肝细胞内BSEP的表达量的低于缬氨酸的, 以此推测氨基酸444位点为丙氨酸是进行性胆汁淤积一个敏感因素, 可能会在特定情况下, 如使用某些药物抑制BSEP功能^[33]。Keitel等^[34]研究认为BSEP V444A与MDR3多态性位点联合作用可导致严重ICP, V444A可能是ICP发病的诱发因素, 从功能方面推测V444A多态性可能使阻碍BSEP分泌作用增强或是降低细胞内可用BSEP。Kubitz等^[35]研究通过对1例诊断为BRIC-2的17岁男性患者进行BSEP基因分析, 发现了两种BSEP突变位点(E186G和V444A), 认为这种多位点联合突变导致BSEP蛋白表达不稳定或表达缺失, 是导致胆盐排泄减少引起高胆红素血症潜在影响因素。BSEPV444A可能影响BSEP的基因转录, 进而影响BSEP的功能, 从而导致不同人群对特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积易感性, 但不能排除BSEP V444A联合BSEP其他位点或其他基因如多药耐药蛋白3基因致病的可能性。

临床生化检查方面, 本研究对病例组中, 不同基因型的临床生化指标进行亚组分析, 基因型GG的TB, DB平均值高于基因型GA和AA, 但

差异不具有统计学意义, 尚不能认为GG基因型引起胆红素水平高于GG和GA基因型, 分析原因可能是样本例数少, 3种基因组间例数差异较大, 使组间生化指标比较差异没有统计学意义, 在以后的研究中我们还应进一步探讨BSEP V444A G等位基因与临床生化指标及预后的关系, 使研究和临床更加有效的结合。

总之, 本研究从一个角度说明, BSEP V444A G等位基因可能是特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的一个危险因素, G等位基因携带者可能增加特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的相对危险度。但BSEP的其他位点变异是否是特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的危险因素, 以及BSEPV444A是否联合BSEP其他位点或其他基因如MDR3(多药耐药蛋白3基因)共同致病, 尚需进一步的实验证实。

4 参考文献

- 1 Bouchard G, Nelson HM, Lammert F, Rowe LB, Carey MC, Paigen B. High-resolution maps of the murine Chromosome 2 region containing the cholesterol gallstone locus, Lith1. *Mamm Genome* 1999; 10: 1070-1074
- 2 Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 2001; 120: 221-238
- 3 Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerová D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, Antoniou A, Stieger B, Arnell H, Ozçay F, Al-Hussaini HF, Bassas AF, Verkade HJ, Fischler B, Németh A,

■同行评价

本文可读性较好, 为婴儿黄疸的研究奠定基础, 具有一定的临床意义。

- Kotalová R, Shneider BL, Cielecka-Kuszyk J, McClean P, Whittington PF, Sokal E, Jirsa M, Wali SH, Jankowska I, Pawłowska J, Mieli-Vergani G, Knisely AS, Bull LN, Thompson RJ. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008; 134: 1203-1214
- 4 Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002; 123: 1649-1658
- 5 Noé J, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1659-1666
- 6 Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. *Pflugers Arch* 2007; 453: 611-620
- 7 Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003; 49: 230-238
- 8 Stieger B. Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. *Drug Metab Rev* 2010; 42: 437-445
- 9 Treepongkaruna S, Gaensan A, Pienvichit P, Laksan O, Knisely AS, Sornmayura P, Jirsa M. Novel ABCB11 mutations in a Thai infant with progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4339-4342
- 10 Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, Jacquemin E. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010; 51: 1645-1655
- 11 Chen HL, Liu YJ, Su YN, Wang NY, Wu SH, Ni YH, Hsu HY, Wu TC, Chang MH. Diagnosis of BSEP/ABCB11 mutations in Asian patients with cholestasis using denaturing high performance liquid chromatography. *J Pediatr* 2008; 153: 825-832
- 12 Chen ST, Chen HL, Su YN, Liu YJ, Ni YH, Hsu HY, Chu CS, Wang NY, Chang MH. Prenatal diagnosis of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1390-1393
- 13 Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol* 2005; 43: 342-357
- 14 van Mil SW, van der Woerd WL, van der Brugge G, Sturm E, Jansen PL, Bull LN, van den Berg IE, Berger R, Houwen RH, Klomp LW. Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* 2004; 127: 379-384
- 15 Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K, Numari A, Ikeno Y, Itoh J, Tanaka H, Arias IM, Mine T. Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G58-G67
- 16 Eloranta ML, Häkli T, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Association of single nucleotide polymorphisms of the bile salt export pump gene with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 648-652
- 17 Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 125-133
- 18 Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Pauli-Magnus C. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 47-60
- 19 Knisely AS, Strautnieks SS, Meier Y, Stieger B, Byrne JA, Portmann BC, Bull LN, Pawlikowska L, Bilezikçi B, Özçay F, László A, Tiszlavicz L, Moore L, Raftos J, Arnell H, Fischler B, Németh A, Papadogiannakis N, Cielecka-Kuszyk J, Jankowska I, Pawłowska J, Melín-Aldana H, Emerick KM, Whittington PF, Mieli-Vergani G, Thompson RJ. Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology* 2006; 44: 478-486
- 20 Scheimann AO, Strautnieks SS, Knisely AS, Byrne JA, Thompson RJ, Finegold MJ. Mutations in bile salt export pump (ABCB11) in two children with progressive familial intrahepatic cholestasis and cholangiocarcinoma. *J Pediatr* 2007; 150: 556-559
- 21 Jansen PL. Endogenous bile acids as carcinogens. *J Hepatol* 2007; 47: 434-435
- 22 Bass LM, Patil D, Rao MS, Green RM, Whittington PF. Pancreatic adenocarcinoma in type 2 progressive familial intrahepatic cholestasis. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 30
- 23 Pauli-Magnus C, Kerb R, Fattinger K, Lang T, Anwald B, Kullak-Ublick GA, Beuers U, Meier PJ. BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004; 39: 779-791
- 24 Maggiore G, Gonzales E, Sciveres M, Redon MJ, Grosse B, Stieger B, Davit-Spraul A, Fabre M, Jacquemin E. Relapsing features of bile salt export pump deficiency after liver transplantation in two patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Hepatol* 2010; 53: 981-986
- 25 Siebold L, Dick AA, Thompson R, Maggiore G, Jacquemin E, Jaffe R, Strautnieks S, Grammatikopoulos T, Horslen S, Whittington PF, Shneider BL. Recurrent low gamma-glutamyl transpeptidase cholestasis following liver transplantation for bile salt export pump (BSEP) disease (posttransplant recurrent BSEP disease). *Liver Transpl* 2010; 16: 856-863
- 26 Jara P, Hierro L, Martínez-Fernández P, Alvarez-Doforno R, Yáñez F, Díaz MC, Camarena C, De la Vega A, Frauca E, Muñoz-Bartolo G, López-Santamaría M, Larrauri J, Alvarez L. Recurrence of bile salt export pump deficiency after liver transplantation. *N Engl J Med* 2009; 361: 1359-1367
- 27 Keitel V, Burdelski M, Vojnisek Z, Schmitt L, Häussinger D, Kubitz R. De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis. *Hepatology* 2009; 50: 510-517
- 28 Lang T, Haberl M, Jung D, Drescher A, Schlagenhauser R, Keil A, Mornhinweg E, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Kerb R. Genetic variability, haplotype structures, and ethnic diversity of hepatic transporters MDR3 (ABCB4) and bile salt export pump (ABCB11). *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 1582-1599
- 29 Pauli-Magnus C, Lang T, Meier Y, Zodan-Marin T, Jung D, Breymann C, Zimmermann R, Kenngott S, Beuers U, Reichel C, Kerb R, Penger A, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. Sequence analysis of bile salt

- export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 91-102
- 30 Kim SR, Saito Y, Itoda M, Maekawa K, Kawamoto M, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Genetic variations of the ABC transporter gene ABCB11 encoding the human bile salt export pump (BSEP) in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24: 277-281
- 31 Dixon PH, van Mil SW, Chambers J, Strautnieks S, Thompson RJ, Lammert F, Kubitz R, Keitel V, Glantz A, Mattsson LA, Marschall HU, Molokhia M, Moore GE, Linton KJ, Williamson C. Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* 2009; 58: 537-544
- 32 Meier Y, Zodan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Stieger B, Pauli-Magnus C. Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 38-45
- 33 Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, Nussler N, Eichelbaum M, Meier PJ, Stieger B. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006; 44: 62-74
- 34 Keitel V, Vogt C, Häussinger D, Kubitz R. Combined mutations of canalicular transporter proteins cause severe intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* 2006; 131: 624-629
- 35 Kubitz R, Keitel V, Scheuring S, Köhrer K, Häussinger D. Benign recurrent intrahepatic cholestasis associated with mutations of the bile salt export pump. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 171-175

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

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

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-08)

可变剪接在胃癌发生和发展中的作用

翟静, 刘海峰, 张成岗

■背景资料

胃癌是胃黏膜上皮细胞变异产生的恶性肿瘤, 是我国最常见的恶性肿瘤之一, 发病率居各类肿瘤之首。虽然胃癌已成为临床高发病例之一, 但其致病机制依然不明。

翟静, 辽宁医学院研究生院 辽宁省锦州市 121000
刘海峰, 武警总医院消化内科 北京市 100039
张成岗, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 北京市 100850
国家重点基础研究发展计划(973)基金资助项目, No. 2006CB504100
国家科技重大专项课题基金资助项目, Nos. 2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002, 2009ZX09103-616
国家自然科学基金资助项目, Nos. 30900830, 30771230
武警部队科研基金资助项目, No. WZ2009031
作者贡献分布: 本文综述由翟静完成; 刘海峰与张成岗审校。
通讯作者: 刘海峰, 教授, 主任医师, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 武警总医院消化内科. haifengliu333@163.com
电话: 010-88276547
收稿日期: 2010-08-18 修回日期: 2010-11-24
接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-08

Role of alternative splicing events in gastric carcinogenesis

Jing Zhai, Hai-Feng Liu, Cheng-Gang Zhang

Jing Zhai, Graduate School, Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China
Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Cheng-Gang Zhang, Beijing Institute of Radiation Medicine; State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 100850, China

Supported by: National Key Basic Research Program (973) Foundation, No. 2006CB504100; the Special issues of major national science and technology projects funded, Nos. 2009ZX09503-002, 2009ZX09301-002, 2009ZX09103-616; National Natural Science Foundation of China, Nos. 30771230, 30900830; and the Research Foundation of the Armed Police Force, No. WZ2009031

Correspondence to: Professor Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, 69 Yongding Road, Haidian District, Beijing 100039, China. haifengliu333@163.com

Received: 2010-08-18 Revised: 2010-11-24

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-08

Abstract

Alternative splicing affects many essential biologic processes and is the basis for a number of pathologic conditions, including cancer. Inherited and acquired changes in pre-mRNA splicing have been documented to play a significant role in human disease development. Many cancer-associated genes are regulated by alternative splicing. In this review, we will summarize the evidence supporting the association between

alternative splicing and gastric carcinogenesis. The potential significance of alternative splicing events as a target for the diagnosis and treatment of gastric cancer will also be discussed.

Key Words: Alternative splicing; Gastric cancer; Biomarker

Zhai J, Liu HF, Zhang CG. Role of alternative splicing events in gastric carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 44-47

摘要

胃癌已成为严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤之一。环境因素和遗传因素的协同作用是胃癌发生和发展的主要诱因, 其中环境因素居首要地位。在胃癌的发生和发展过程中常伴随多种肿瘤相关基因结构和表达水平的异常变化, 同时伴有多个异常剪接变体的出现。研究剪接变体在胃癌发生中的变化模式有可能为胃癌的早期诊断和病程跟踪提供重要的生物标志物, 进而为胃癌的临床诊断提供参考。本文从胃癌相关基因的剪接变体特征及其变化模式角度综述剪接调节在胃癌发生中的研究进展。

关键词: 可变剪接; 胃癌; 生物标志物

翟静, 刘海峰, 张成岗. 可变剪接在胃癌发生和发展中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 44-47

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/44.asp>

0 引言

胃癌是胃黏膜上皮细胞变异产生的恶性肿瘤, 是我国最常见的恶性肿瘤之一, 发病率居各类肿瘤之首^[1]。虽然胃癌已成为临床高发病例之一, 但其致病机制依然不明, 近年研究普遍认为胃癌的发生与幽门螺杆菌感染关系密切^[2]。随着研究的不断深入, 许多研究认为真核基因的剪接调节在胃癌的发生及发展过程中起重要作用, 目前已成为基于胃癌发病机制研究的重点和热点^[3,4]。基因分析显示在胃癌的发生中超过50%的基因发生异常剪接, 为胃癌发病机制的揭示提供了新的信息。本文通过针对Bax、CD44、

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、ING1、ING4、KAI1/CD82、Mcl-1、MUC1、PD-L1等相关基因, 从可变剪接在胃癌发生中的作用及其剪接变体的种类等方面综述研究进展, 旨在为胃癌的发生及其致病机制的研究提供重要参考。

1 Bax

Bax为抑癌基因, 属于Bcl-2基因家族中具有促进细胞凋亡作用的基因。Bax基因的突变经常出现在人类消化系肿瘤及某些白血病中。研究表明, Bax基因的阅读框移位突变是相关肿瘤细胞的主要突变方式, 60%的胃癌高度微卫星不稳定肿瘤中有Bax基因的阅读框移位突变, 由此看出Bax基因突变对于胃癌的发生有重要影响^[5]。

2 CD44

CD44是细胞表面的一种糖蛋白, 起着上皮细胞间的相互粘连功能, 广泛存在于白细胞、上皮细胞和内皮细胞上。CD44的20个外显子易被剪接而形成许多变异体^[6]。在许多人类肿瘤组织中CD44剪接变异体如v5、v6、v9的表达增高。Heider等发现v5主要在弥漫型胃癌中表达^[7], v5和v6在肠型胃癌和肠上皮化生中均有表达。CD44变异体的功能仍不很清楚, 有研究报道, CD44 v9与胃癌的远处转移、肿瘤复发和死亡率有关^[8]。

3 hTERT

人端粒酶RNA广泛表达于正常组织和异常组织中。端粒酶活性是由hTERT在转录水平调控的, hTERT是端粒酶活性高低的限速决定因子, 与端粒酶活性呈正相关^[9]。hTERT基因有16个外显子, 至少有13个选择性剪接位点。hTERT的表达在肿瘤发生中起重要作用, 研究发现, hTERT在大多数发生胃癌癌前病变组织中已经表达, 表明hTERT事件在早期胃癌中发生, 并可能在胃癌发展中持续起作用^[10]。

4 ING1

ING1是Arkavtsev等在1996年发现的一个候选抑癌基因, 位于13号染色体长臂。ING1 mRNA通过可变剪接可编码4种不同的蛋白质, 其中对于P47 ING1b的研究较多^[11]。ING1作为新的肿瘤抑制基因, 有调控细胞周期、增强细胞对化疗药物的敏感性、诱导细胞凋亡和DNA损伤修复的功能。许多研究表明ING1和P53有着功能方面的协同作用, ING1基因不能单独发挥对细胞生长

的抑制作用, 是通过提高P53依赖的P21/waf1启动子的活性来发挥作用。尽管对于ING1基因发生异常的失活机制仍不清楚, 但是随着研究的深入, ING1基因(主要是P33 ING1基因)谜团的揭开有望为恶性肿瘤的诊断和治疗提供新的线索。

5 ING4

ING4^[12]是抑癌基因ING家族的一个新成员, ING4基因由8个外显子和7个内含子组成, 通过可变剪接产生4种剪接变体, 并且ING4的剪接变体在正常组织和肿瘤组织中均有表达。ING4通过抑制肿瘤血管的生成从而抑制肿瘤细胞的生长, 并且可以抑制体外肿瘤细胞接触生长抑制功能的丧失。有研究发现ING4在胃癌、神经胶质瘤、乳癌及头面部和颈部的鳞状细胞癌中低表达^[13]。ING4的异常剪接进一步导致胃腺癌中基因的改变, 说明ING4的表达减低或异常很有可能在胃腺癌的发生发展中都起作用^[14]。

6 KAI1/CD82

KAI1/CD82是一类广泛分布于多种细胞膜的糖蛋白, 属于跨膜4超家族成员之一(TM4SF家族), 因其具有4个高度保守的跨膜结构域而得名。长期的研究揭示TM4SF超家族蛋白主要参与调控细胞增生, 而CD82对肿瘤的转移具有负调控作用。最近研究发现两者对多种肿瘤的转移具有抑制作用, KAI1在恶性肿瘤组织中的表达有助于判断疾病的进展与预后, 该家族对肿瘤细胞的运动能力和转移能力有抑制作用。有研究显示在胃癌患者术后的转移灶中发现了剪接变体KAI1。基因组分析显示此变体来源于外显子7的可变剪接。这表明野生型KAI1与spliced-KAI1在细胞运动能力、黏附能力、肿瘤生长和转移方面有功能区别, spliced-KAI1的表达有可能成为预后不良肿瘤患者的诊断标记^[14-17]。

7 Mcl-1

Mcl-1是Bcl-2凋亡调控基因家族中的一种抗凋亡基因, Mcl-1与Bcl-2基因有相似的序列和功能, 在细胞凋亡的过程中发挥重要作用。Mcl-1的mRNA前体经过可变剪接产生截短体Mcl-1S, 类似于BH3, 是一种凋亡控制蛋白, 可诱导细胞凋亡。Mcl-1反义寡核糖酸能特异地针对靶标Mcl-1 pre-mRNA起作用, 并且能够转换从Mcl-1L(Long)到Mcl-1S(Short)的mRNA和蛋白质剪接形式。这种转化增加了促使细胞凋亡的Mcl-1S的表达水平, 降低了抗细胞凋亡的Mcl-1L的

■ 研发前沿

真核基因的剪接调节在胃癌的发生及发展过程中起重要作用, 目前已成为基于胃癌发病机制研究的重点和热点。

■同行评价

本文可读性较好,具有一定的创新性和科学性。

表达水平. Mcl-1过表达的意义可能为肿瘤的诊治提供新的思路^[18-22]。

8 MUC1

MUC1黏蛋白为I型跨膜糖蛋白,在多种上皮来源的肿瘤组织中异常表达,在胃中是幽门螺杆菌的配基并且对于胃癌的发生起重要作用. MUC1是其家族中克隆最早的跨膜黏蛋白基因,定位于1q21,在正常人的胃肠道等腺上皮几乎呈阳性表达. MUC1有保护细胞表面结构、释放活性分子、参与信号转导及肿瘤侵袭转移等的功能^[23-26]. 研究认为,肿瘤细胞膜上的MUC黏蛋白的大量形成与肿瘤的侵袭和转移有关^[27]. 目前,国内外研究的热点集中于MUC1与肿瘤的淋巴结转移及预后的关系^[28]。

9 PD-L1

PD-L1是1999年发现的共刺激分子B7家族成员,能与T淋巴细胞和B淋巴细胞表面受体PD-1结合从而下调免疫反应^[29-31]. Dong等^[32]研究表明,肿瘤细胞相关性PD-L1表达能够加速肿瘤抗原特异性的T淋巴细胞的凋亡,促进肿瘤细胞的生长,介导肿瘤逃逸. 目前已有研究发现PD-L1的一种异常剪接变体PD-L1 II的存在,两者分布存在较大差异,PD-L1可能通过可变剪接方式对表达产物进行调节从而对免疫应答进行调控^[33]. 有研究证明胃癌的浸润性淋巴细胞高水平表达PD-L1 mRNA,而胃癌的肿瘤细胞只低表达PD-L1 mRNA^[34]。

10 结论

随着研究的不断深入,目前已认识到可变剪接在胃癌的发生及发展过程中起重要作用. 探索剪接变体在胃癌发生中的变化模式有望为胃癌发生及其诊断提供重要的检测生物标志物,继而为胃癌的临床诊断提供重要参考依据. 虽然我们仍然处于了解全部胃癌相关可变剪接的初级阶段,但通过可变剪接进行癌症诊断和治疗的尝试已日益受到人们的重视,有可能为胃癌和其他肿瘤的研究带来新的启示。

11 参考文献

- Ribeiro U Jr, Jorge UM, Safatle-Ribeiro AV, Yagi OK, Scapulatempo C, Perez RO, Corbett CE, Alves VA, Zilberstein B, Gama-Rodrigues J. Clinicopathologic and immunohistochemistry characterization of synchronous multiple primary gastric adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 233-239
- Mégraud F. [Helicobacter pylori infection: Review

- and practice]. *Presse Med* 2010; 39: 815-822
- Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, Heikau S, Gabbert HE, Ramp U. Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2007; 16: 1-8
- Skarda J, Amariglio N, Rechavi G. RNA editing in human cancer: review. *APMIS* 2009; 117: 551-557
- Cartron PF, Juin P, Oliver L, Meflah K, Vallette FM. Impact of proapoptotic proteins Bax and Bak in tumor progression and response to treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; 3: 563-570
- Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope* 2009; 119: 1518-1530
- Jung T, Castellana D, Klingbeil P, Cuesta Hernández I, Vitacolonna M, Orlicky DJ, Roffler SR, Brodt P, Zöller M. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* 2009; 11: 1093-1105
- Montgomery E, Abraham SC, Fisher C, Deasel MR, Amr SS, Sheikh SS, House M, Lilliemoe K, Choti M, Brock M, Ephron DT, Zahuruk M, Chadburn A. CD44 loss in gastric stromal tumors as a prognostic marker. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 168-177
- Chang JT, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3442-3450
- Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, Itabashi M, Watanabe T, Sawahata T, Nakahara A, Muto H, Tanaka N. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 744-751
- Unoki M, Kumamoto K, Takenoshita S, Harris CC. Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins. *Cancer Sci* 2009; 100: 1173-1179
- Kim S, Chin K, Gray JW, Bishop JM. A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16251-16256
- Li J, Martinka M, Li G. Role of ING4 in human melanoma cell migration, invasion and patient survival. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1373-1379
- Li M, Jin Y, Sun WJ, Yu Y, Bai J, Tong DD, Qi JP, Du JR, Geng JS, Huang Q, Huang XY, Huang Y, Han FF, Meng XN, Rosales JL, Lee KY, Fu SB. Reduced expression and novel splice variants of ING4 in human gastric adenocarcinoma. *J Pathol* 2009; 219: 87-95
- Zheng H, Tsuneyama K, Cheng C, Takahashi H, Cui Z, Nomoto K, Murai Y, Takano Y. Expression of KAI1 and tenascin, and microvessel density are closely correlated with liver metastasis of gastrointestinal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2007; 60: 50-66
- Dooley CP. Helicobacter pylori: review of research findings. *Aliment Pharmacol Ther* 1991; 5 Suppl 1: 129-143
- Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, Heikau S, Gabbert HE, Ramp U. Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2007; 16: 1-8
- Scholzová E, Malík R, Sevcík J, Kleibl Z. RNA regu-

- lation and cancer development. *Cancer Lett* 2007; 246: 12-23
- 19 Weng C, Li Y, Xu D, Shi Y, Tang H. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10491-10500
 - 20 Inoue S, Walewska R, Dyer MJ, Cohen GM. Down-regulation of Mcl-1 potentiates HDACi-mediated apoptosis in leukemic cells. *Leukemia* 2008; 22: 819-825
 - 21 Gélinas C, White E. BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev* 2005; 19: 1263-1268
 - 22 Chen S, Dai Y, Pei XY, Grant S. Bim upregulation by histone deacetylase inhibitors mediates interactions with the Bcl-2 antagonist ABT-737: evidence for distinct roles for Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 6149-6169
 - 23 Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2003; 17: 1475-1486
 - 24 Persson J, Bäckström M, Johansson H, Jirstrom K, Hansson GC, Ohlin M. Molecular evolution of specific human antibody against MUC1 mucin results in improved recognition of the antigen on tumor cells. *Tumour Biol* 2009; 30: 221-231
 - 25 Croce MV, Rabassa ME, Price MR, Segal-Eiras A. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 284-291
 - 26 Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 4
 - 27 Inagaki Y, Xu H, Nakata M, Seyama Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers. *Biosci Trends* 2009; 3: 220-232
 - 28 Brayman MJ, Dharmaraj N, Lagow E, Carson DD. MUC1 expression is repressed by protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-γ. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2725-2737
 - 29 Uen YH, Lin SR, Wu CH, Hsieh JS, Lu CY, Yu FJ, Huang TJ, Wang JY. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 55-61
 - 30 Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027-1034
 - 31 Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2: 261-268
 - 32 Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793-800
 - 33 Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood* 2009; 114: 1545-1552
 - 34 Chen XL, Cao XD, Kang AJ, Wang KM, Su BS, Wang YL. In situ expression and significance of B7 costimulatory molecules within tissues of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1370-1373

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology*(*WJG*)(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(WJG编辑部主任: 程剑侠 2010-06-20)

胃癌术前分期的研究现状

仲海, 严超, 燕敏, 朱正纲

■背景资料

胃癌术前分期是实施胃癌综合治疗方案的需要, 在胃癌术前评估的基础上, 不同分期可选择相应的治疗方案。研究精准、合理的胃癌术前分期方案则是目前胃癌研究领域的一个热点。

仲海, 上海市闸北区市北医院外科 上海市 200435
严超, 燕敏, 朱正纲, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海消化外科研究所 上海市 200025
上海市重点学科-外科学基金资助项目, No. S30204
作者贡献分布: 本文综述由仲海与严超完成; 燕敏与朱正纲审核。
通讯作者: 严超, 副主任医师, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科. yanchao.2005@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-10-25 修回日期: 2010-12-04
接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-01-08

Recent advances in preoperative staging of gastric cancer

Hai Zhong, Chao Yan, Min Yan, Zheng-Gang Zhu

Hai Zhong, Department of Surgery, Shanghai Shibei Hospital of Zhabei District, Shanghai 200435, China
Chao Yan, Min Yan, Zheng-Gang Zhu, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China
Supported by: the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. S30204
Correspondence to: Chao Yan, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China. yanchao.2005@yahoo.com.cn
Received: 2010-10-25 Revised: 2010-12-04
Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-01-08

Abstract

A more differentiated therapy regimen for gastric carcinoma requires more precise preoperative staging. In patients with early gastric cancer (EGC), especially in cases with carcinoma confined to mucosa, endoscopic resection (ER) is usually performed to avoid unnecessary surgical procedures. To achieve R0 resection for locally advanced gastric cancer (AGC), neoadjuvant treatments have been investigated. Clinical staging of gastric cancer has been greatly improved by advances in imaging techniques, such as endoscopic ultrasonography (EUS), transabdominal ultrasonography (TAUS), multi-slice spiral CT (MSCT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), combined PET-CT scans, and laparoscopic staging. This paper aims to summarize the recent advances in preoperative staging of gastric cancer.

Key Words: Stomach neoplasm; Neoplasm staging;

Surgery; Adjuvant therapy

Zhong H, Yan C, Yan M, Zhu ZG. Recent advances in pre-operative staging of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 48-56

摘要

准确的胃癌术前分期是胃癌综合治疗方案实施的需要。早期胃癌, 特别是黏膜内癌, 可以行内镜下切除以避免不必要的外科手术; 为了获得局部进展期胃癌R0切除, 新辅助治疗备受关注并已展开探索。随着内镜超声检查(endoscopic ultrasonography, EUS)、经腹超声检查(transabdominal ultrasonography, TAUS)、多层螺旋CT(multi-slice spiral CT, MSCT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、正电子发射型断层成像(positron emission tomography, PET)、PET-CT和腹腔镜探查分期等影像学技术的发展, 胃癌临床分期的准确率已得到明显改善。本文旨在对胃癌术前分期的研究现状作一综述。

关键词: 胃肿瘤; 肿瘤分期; 手术; 辅助治疗

仲海, 严超, 燕敏, 朱正纲. 胃癌术前分期的研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 48-56
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/48.asp>

0 引言

准确的胃癌术前分期对选择合理的治疗方案、评价预后等具有重要的指导意义, 特别是随着经内镜、腹腔镜治疗及术前辅助化疗等新技术的开展, 准确的术前分期显得尤为重要。传统的胃癌术前检查方法包括胃镜、X线对比检查等, 但其在术前分期方面存在明显的局限性, 而随着内镜超声检查(endoscopic ultrasonography, EUS)、经腹超声检查(transabdominal ultrasonography, TAUS)、多层螺旋CT(multi-slice spiral CT, MSCT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、正电子发射型断层成像(positron emission tomography, PET)、PET-CT、腹腔镜和腹腔镜超声检查(laparoscopic ultrasonogra-

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

phy, LUS)等影像学技术的发展及其检查方法的改进, 胃癌术前分期的准确率得到明显提高, 从而基本满足了胃癌综合治疗方案实施的需要. 本文将就胃癌术前分期的临床意义及各种检查方法的临床应用价值作一阐述.

1 胃癌术前分期的临床意义

胃癌术前分期是实施胃癌综合治疗方案的需要, 在胃癌术前评估的基础上, 不同分期可选择相应的治疗方案. 日本《胃癌治疗指南》(第3版)^[1]中根据胃癌的临床分期确定如下治疗方案: 部分胃黏膜癌因其淋巴结转移率极低可行局限性切除术, 如内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)或内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)等; 部分胃黏膜癌和黏膜下癌可行D1或D1+淋巴结清扫; 对于进展期胃癌或术前判断为有淋巴结转移的早期胃癌均需行D2淋巴结清扫; 对于临床分期为M1期(有远处转移)的胃癌仅行姑息性治疗(图1). 此外, 部分局部进展期胃癌, 单纯手术往往难以达到根治的目的, 常存在肉眼或镜下残留灶, 所以多为姑息性切除且不能明显改善预后, 对于这部分病例有必要行新辅助化疗等术前治疗, 待肿瘤体积或转移灶得以适当控制后再考虑手术^[2,3]. 新近一项由英国医学研究委员会主持的术前化疗III期临床研究(MAGIC研究)表明, 以ECF(表柔比星、顺铂和5-FU)方案进行围手术期化疗可以显著改善可切除胃癌的无进展生存和总生存, 从而奠定了围手术期化疗在可切除胃癌患者中的标准治疗地位^[4]. 2010年《NCCN胃癌临床实践指南(中国版)》中确定, 对于术前判断为进展期或伴有淋巴结转移(无远处转移)的可切除胃癌患者, 除行手术治疗外, 可考虑选择术前化疗或放化疗后再手术. 对于无远处转移、肿瘤无法切除的局部晚期胃癌可选择45.0-50.4 Gy放疗+同时予以氟尿嘧啶类(5-FU、卡培他滨)为基础的放疗增敏剂或化疗, 治疗后重新分期, 如达到完全缓解或明显缓解, 适当可行手术治疗. 从上述两个胃癌治疗指南不难看出, 准确的术前分期对选择合理的治疗方案至关重要, 研究精准、合理的胃癌术前分期方案将是目前胃癌研究领域的一个热点.

需要指出的是, 国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)/美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)新近发布了第7版胃癌TNM分期系统, 并

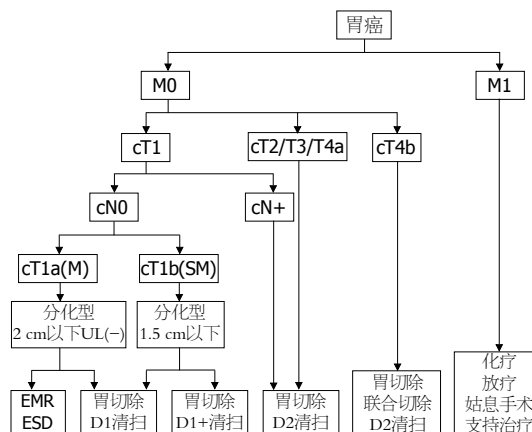


图1 日本《胃癌治疗指南》(第3版)中基于胃癌临床分期的治疗方案

正式应用于临床实践; 2010-03的新版日本《胃癌处理规约》(第14版)^[5]在胃癌N分期上放弃了第13版中按解剖学的群(站)分类法, 采用了UICC/AJCC的新版分期法, 从而在世界范围内首次实现了胃癌分期系统的统一, 为横向评价胃癌疗效提供了权威的标准, 对促进胃癌的临床研究具有不可估量的作用. 上述两个胃癌治疗指南中应用的即为新版胃癌TNM分期法. 但目前尚无基于胃癌新版分期系统的术前分期研究报道, 既往研究采用的多为UICC第4、5或6版TNM分期系统, 故下述胃癌术前分期方法中提及的分期准确率均基于旧版分期系统.

2 胃癌术前分期的方法

2.1 EUS EUS具备内镜和超声的双重功能, 一般正常胃壁在EUS图像上呈5层结构, 由内至外依次为: 高回声层(相应于黏膜界面层)、低回声层(相应于黏膜固有层)、高回声层(相应于黏膜下层)、低回声层(相应于固有肌层)、高回声层(相应于浆膜层和浆膜下层), EUS可根据最深破坏层次判断胃癌浸润深度; 同时EUS可以通过淋巴结的形状、回声密度等判断其有无转移, 文献报道EUS对胃癌术前T、N分期的准确率可分别达70%-88%和65%-77%^[6-8], 并且其是目前唯一能比较准确鉴别黏膜和黏膜下癌的检查方法. 我们研究显示EUS对胃癌T分期的判断准确率为80.3%, 其鉴别胃黏膜和黏膜下癌的准确率为63.6%, 并且EUS对临床病理特征符合EMR等微创手术指征的早期胃癌(隆起型、平坦型或不伴溃疡或溃疡疤痕的凹陷型; 组织学分化型; 直径<2 cm)浸润深度的判断准确率较高^[9]; EUS对胃癌N分期的判断准确率为65.1%, 其中N₀ 89.4%, N₁ 64.3%, N₂ 29.0%^[10].

■研究前沿

深入研究MSCT对胃癌术前分期的价值, 建立及优化适应我国国情的胃癌患者行腹腔镜探查分期的指征, 以及开展多中心大宗病例研究以明确PET或PET-CT对胃癌新辅助化疗等术前治疗疗效预测的价值是目前胃癌术前分期领域的研究热点.

■相关报道

Kwee等对胃癌术前T和N分期的影像学研究进展分别进行了荟萃分析, Dassen等对PET在胃癌术前分期中的应用价值进行了详尽的综述, 反应了目前该领域的国际研究现状。

但EUS对T₄期胃癌的判断准确率相对较低, 主要由于EUS受到探头主体扫描范围的限制, 有时对较大的T₄期肿瘤外边界显示欠清, 并无法明确胃周脏器的具体浸润情况. 新近, EUS对早期胃癌浸润深度判断的临床应用价值亦受到质疑, 比较研究显示EUS对胃黏膜癌和黏膜下癌的鉴别准确率与单纯运用胃镜相比并无优势(67.4%-78.9% vs 73.7%-81.4%)^[11,12]. 同时, EUS对胃癌转移淋巴结的检出率仍受其部位和大小的影响, 多数腹腔动脉周围的转移淋巴结离超声探头较远而难以被EUS检出. 此外, EUS受到超声束穿透距离的限制(7.5 MHz, 最大穿透距离为5-7 cm), 一般肝右叶大部, 腹腔内肠系膜上血管以下的后腹膜和肠系膜淋巴结等均不能被EUS探及, 所以EUS对于胃癌N和M分期存在一定的局限性, 特别是对M分期不能提供结论性诊断. 所以, 单独运用EUS不能满足实施胃癌综合治疗方案的需要, 有必要联合螺旋CT和腹腔镜等检查以进一步提高胃癌术前分期的准确率. 2010年《NCCN胃癌临床实践指南》^[13]中仅将EUS列为术前可选择检查项目.

2.2 TAUS TAUS操作简便、经济且无创, 近年来, 随着其仪器性能和检查方法的改进, 对胃癌术前分期的判断准确率亦有所提高. 经腹超声检查时正常胃壁亦可呈5层结构, 尽管其总体清晰度可能不及EUS, 但仍是其准确判断胃癌T分期的基础, 有研究显示其对胃癌术前T分期的判断准确率亦达78.6%-81.0%^[14-16], 而肿瘤与胰腺间“滑动征”阴性有助于判断胃癌胰腺浸润^[17]. 同时, 其对胃癌腹腔动脉周围淋巴结转移的敏感度和对该区域转移淋巴结的检出率分别达74%和73.9%^[18]. 此外, TAUS还有助于胃癌远处转移病灶的检出, 特别是肝脏转移. 有研究显示胃癌病灶的彩色多普勒血管指数(color doppler vascularity index, CDVI)与胃癌微血管密度(microvessel density, MVD)呈线性相关, 并且是胃癌患者的独立预后因素^[19].

但是, 由于受肋骨和胃底气体的干扰, 超声对胃底肿瘤的探测常不够理想, 并且, 胃体上部和胃底部癌由于其和胰尾在腹腔内特定的解剖位置关系, 滑动征的运用受到明显限制, 我们研究显示TAUS对胃癌术前T分期的准确率仅56%, 对胃癌N分期的判断准确率为57.1%, 其中N₀ 100%、N₁ 16.7%、N₂ 35.3%. 并且TAUS对胃癌综合TNM分期判断的临床应用价值相对有限. 所以, 尽管TAUS对胃癌术前T、N和M分期均具

一定的临床实用价值, 并且其通过彩色多普勒超声检测的胃癌CDVI能较好的反映肿瘤血管生成的情况, 2010年《NCCN胃癌临床实践指南》中并未将其列入术前检查项目. 但是, 根据我国国情, 我们认为TAUS可作为胃癌患者术前的一项常规检查, 特别是在经济欠发达地区^[20].

2.3 MSCT 长期以来, CT一直作为胃癌患者检出远处转移的主要检查方法. 随着CT扫描技术的改进, 特别是MSCT的临床应用, 由于其扫描速度快, 能完成对靶器官的多期扫描, 同时可对容积扫描数据进行多层面重建(multiplanar reconstruction, MPR), 甚至可实现CT仿真胃镜(CT virtual gastroscopy, CTVG), 使得CT对胃癌原发灶的检出率和TNM分期的准确率均得到明显提高. 在MSCT图像上, 正常胃壁厚度一般在5 mm以下, 在CT增强扫描图像上可呈1-3层结构. 其3层结构对应关系为: (1)明显增强的内层(相应于黏膜层和黏膜肌层); (2)中间低密度层(相应于黏膜下层, 包含脂肪和结缔组织); (3)外层轻微增强(相应于固有肌层和浆膜层). 胃癌则表现为胃壁增厚和(或)胃壁异常增强, MSCT判断其浸润深度的标准见表1. 早年(1997-2001年)的文献报道显示, 动态或螺旋CT对胃癌T分期的判断准确率可达60.6%-87%, 其中T₁ 40%-100%, T₂ 35.9%-88%, T₃ 50%-100%, T₄ 33.3%-100%^[21,22]; 综合各组的数据显示, CT对胃癌T分期的准确率为75.7%(376/497), 其中T₁ 84.4%(130/154), T₂ 65.9%(110/167), T₃ 76.3%(87/114), T₄ 79%(49/62). 近年(2004-2007年)的文献报道显示, MSCT对胃癌T分期的判断准确率达77.9%(380/488), 其中T₁ 72.7%(129/179), T₂ 83.5%(81/97), T₃ 82.4%(103/125), T₄ 76.5%(13/17); MSCT对胃癌淋巴结转移判断的敏感度、特异度和准确率分别为84.6%(132/156)、73.9%(119/161)和79.2%(251/317)^[23].

我们的一项大宗病例研究显示, MSCT对胃癌术前T分期的总体判断准确率较高(73.8%), 特别是对T₃和T₄期胃癌的判断准确率分别达86.5%和85.8%^[23]. 同时, 尽管MSCT对早期胃癌的检出率偏低, 但被MSCT检出的早期胃癌由于其淋巴结转移率高、肿瘤较大以及黏膜下癌比例高, 不宜行EMR或ESD等治疗^[23]. 值得指出的是, 三期扫描对胃癌浸润深度的判断具有较大的价值, 因为部分胃癌具有从黏膜层到浆膜层渐进性强化的特点, Takao等^[24]的研究亦显示有28%的进

表 1 胃癌T分期的MSCT诊断标准

分期	MSCT诊断标准	
	正常胃壁呈单层结构	正常胃壁呈多层结构
T ₁	非透壁性明显增强并伴胃壁局灶性增厚, 或仅明显增强而无胃壁增厚, 或未检出病灶	胃壁增厚且明显增强, 但不伴中、外层的突然消失, 或未检出病灶
T ₂	胃壁透壁性增强并伴局灶性增厚, 并且其外边界光整和(或)病灶周围脂肪层清晰	胃壁异常增强并伴中、外层的突然消失, 并且其外边界光整和(或)病灶周围脂肪层清晰
T ₃	增厚胃壁外边界不规则或呈条索状高密度影, 和(或)病灶周围脂肪层模糊	增厚胃壁外边界不规则或呈条索状高密度影, 和(或)病灶周围脂肪层模糊
T ₄	胃癌与邻近脏器间的脂肪层消失, 同时伴有邻近脏器官内CT值的改变	胃癌与邻近脏器间的脂肪层消失, 同时伴有邻近脏器官内CT值的改变

■创新盘点

本文以新版日本《胃癌治疗指南》及《NCCN胃癌临床实践指南》为基础, 对胃癌术前分期的临床意义及各种检查方法的临床应用价值作了详尽的阐述, 展现了目前该领域的研究全貌及最新进展。

展期胃癌从动脉期到平衡期呈渐进性强化, 而此类胃癌多半为硬癌。MSCT对胃癌N分期的判断准确率为75.2%, 其中N₀ 76.2%, N₁ 68.8%, N₂ 80.6%^[23]。

早期的比较研究显示CT对胃癌术前T、N分期的准确率仅分别为42%-43%和49%-51%, 而EUS则分别达71%-86%和65%-74%^[25,26], 因此EUS被认为是胃癌术前分期的首选方法。但近期的比较研究亦显示MSCT对胃癌术前T、N分期的准确率(76%-83.3%, 62.8%-75%)与EUS(74.7%-87.5%, 66%-90%)无明显差别^[27-29]。我们的一项比较研究显示, MSCT较之EUS在N分期上有一定的优势, 且对胃周脏器浸润的判断准确率较高, 并鉴于MSCT目前为诊断胃癌远处转移的主要常用检查方法, 所以其作为一项“全合一”检查, 可以代替EUS成为胃癌术前分期的首选方法^[30-32]。2010年《NCCN胃癌临床实践指南》中已将腹部CT列为术前必须检查项目, 并将EUS列为可选择检查项目。

此外, CTVG对提高早期胃癌的检出率和进展期胃癌大体分型的鉴别准确率有一定的价值^[33]。术前通过MSCT行3D-CTA明确胃周血管的解剖关系有助于腹腔镜胃癌手术的实施^[34,35]。MSCT图像上胃癌强化程度和瘤周低密度带厚度有助于对胃癌组织学类型的判断, 且瘤周低密度带厚度还有助于对淋巴结转移的判断^[36]。MSCT灌注成像技术可获得反映胃癌血管通透性的量化值(表面通透性值), 并有助于对胃癌TNM分期和组织学类型等的预测^[37,38]。胃肝样腺癌、EB病毒相关性胃癌及胃黏液腺癌等均有其相对特异的MSCT征象^[39-41]。通过MSCT检测的胃癌患者腹部形态有助于判断其术后短期结局^[42]; 并且对于可切除性胃癌, MSCT评估的临床分期有助于对其预后的判断^[43]。另外, CT是目前评估

胃癌化疗等治疗方法疗效和随访的最为常用的影像学方法, 新近有研究利用MSCT后处理工作站提供的容积测量工具得到胃原发灶的体积数据, 通过计算得到体积退缩率, 发现其与胃癌新辅助化疗后病理缓解分级的相关性优于淋巴结及癌肿厚度退缩率, 甚至优于PET-CT检测的标准摄取值(standard uptake value, SUV)^[44]。所以, 随着影像技术的进展, CT对于胃癌患者已突破单一的“诊断+分期”模式, 逐步形成涵盖精确分期、疗效评价、预后评估和术后并发症检测及随访为一体的影像学评价体系^[45]。

尽管CT对胃癌术前TNM分期的判断准确率已得到明显提高, 且对术前T分期的研究结果已趋一致, 新近研究显示采用血管探针重建技术可进一步将T分期的准确率提高至94%^[46]; 但对于胃癌术前N分期还存在较多的分歧和不足。我们前期研究和文献报道均显示, MSCT对N分期的预测如采用新版分期系统(淋巴结转移数目)及现有以淋巴结大小为主的鉴别淋巴结转移与否的诊断标准将产生不足分期的趋势^[43,47,48]。目前亟待进一步建立和优化鉴别淋巴结转移与否的综合诊断标准以提高胃癌术前N分期的诊断准确率, 以满足新版分期在临床实践中的需求。有报道显示胃癌患者最大转移淋巴结直径与其淋巴结转移数目呈线性相关^[49], 我们研究显示MSCT检出的最大淋巴结的直径对胃癌淋巴结转移数目和N分期术前预测有一定的价值, 其准确率与采用检出转移淋巴结计数的方法基本一致, 并可避免不足分期的趋势, 有望作为该传统方法的有益补充^[47]。此外, 尽管MSCT对胃癌远处转移已具较高的诊断准确率, 但其对胃癌腹膜转移的敏感度仍较低, 仅为51%, 所以必须联合腹腔镜检查以提高对胃癌腹膜转移判断的准确率^[50]。2010年《NCCN胃癌临床实践指

■应用要点

随着影像学技术的发展,胃癌术前分期的准确率得到明显提高,基本满足了胃癌综合治疗方案实施的需要,但仍有待探讨更精确、合理的术前检查方案。

南》中推荐对每位MSCT等检查未检出远处转移的胃癌患者进行腹腔镜探查分期,但这将导致许多患者接受无谓的腹腔镜检查以及医疗费用的增加,所以目前亟待建立适应我国国情的胃癌患者行腹腔镜探查分期的指征。

2.4 MRI 目前由于快速MRI技术的发展,不仅提高了图像清晰度,而且由于成像速度快,可进行动态增强扫描,从而为胃癌术前分期提供了与CT相当的图像质量。MRI在扰相位梯度回波成像时,胃壁及胃周脂肪间由于化学位移和相位抵消伪影产生一低信号带,该低信号带对胃癌浆膜层浸润的判断具有较大的价值。文献报道MRI对胃癌T分期的判断准确率可达73.3%-88%,其中T₁ 75%-100%, T₂ 63%-80%, T₃ 78.6%-96%, T₄ 40%-100%^[22]。综合各组的数据显示, MRI对胃癌T分期的准确率为82.7%(182/220), 其中T₁ 84.6%(11/13), T₂ 72.4%(42/58), T₃ 89.5%(102/114), T₄ 77.1%(27/35)。并且其对淋巴结和肝脏转移的判断准确率亦较高。

Kim等^[51]研究显示, MRI对胃癌术前T分期的判断准确率显著高于螺旋CT(81% vs 73%); Sohn等^[52]研究亦显示, MRI胃癌T分期的判断准确率稍优于螺旋CT(73.3% vs 66.7%); 新近的一项比较研究显示MRI与MSCT对胃癌术前T分期的准确率基本一致(74.4% vs 76.7%)^[53]。两项比较研究显示, MRI对胃癌术前N分期的判断准确率稍低于螺旋CT(55%-65% vs 58.6%-73.0%), 但无统计学差异^[51,52]。我们研究显示MRI和MSCT对胃癌术前T分期的判断准确率基本相当, 但MRI对于胃癌术前N分期的判断准确率和对淋巴结转移的敏感度低于MSCT, 所以MRI目前尚不能完全取代MSCT在胃癌术前分期中的应用^[54]。2010年《NCCN胃癌临床实践指南》中未将MRI列入术前检查项目。

2.5 腹腔镜检查和LUS 目前普遍认为, 在非侵袭性影像学检查中, EUS、TAUS、MSCT和MRI等检查方法对腹膜转移的敏感度均较低, 而通过腹腔镜对腹腔的直视检查则可鉴别其他影像学方法难检出的较小的网膜及腹膜种植灶, 有望填补这一诊断间隙, 腹腔镜超声则为了传统腹腔镜检查提供了类似于EUS的图像质量。

腹腔镜检查对胃癌可切除性判断的准确率达91.6%-96%, 对腹膜转移的敏感度为69%-96%, 对肝脏转移的敏感度为60%-96%。Stell等^[55]研究发现腹腔镜、B超和CT对肝脏转移判断的准确

率分别为99%、76%和79%, 对腹膜转移的判断准确率分别为94%、84%和81%, 腹腔镜检查明显优于B超和CT。Lowy等^[56]认为虽然新型CT对胃癌肝转移的敏感度高, 假阴性率仅4%, 不失为一种有效的分期方法, 但对缺乏腹水的腹膜转移则敏感度较差, 假阴性率达25%, 而腹腔镜检查成功地检出了其中94%的病例。近年Muntean等^[57]研究显示, 诊断性腹腔镜检查对胃癌远处转移的敏感度、特异度和准确率分别为89%、100%和95.5%, 成功避免了37.8%患者行不必要的剖腹探查术, 研究者据此认为行新辅助化疗等术前治疗的患者应常规接受诊断性腹腔镜检查。

LUS则综合了腹腔镜和内镜超声检查的优点, 其对肿瘤的T分期接近于EUS, 准确率达92%, 并可检出直径仅3 mm的转移淋巴结, 能对所有16组淋巴结作出比较准确的评估, 其准确率达89%。LUS可检出腹腔镜检查漏诊的肝脏转移灶, 其对肿瘤的M分期准确率达92%。此外, LUS对肿瘤可切除性的评估准确率达96%, 有报道联合EUS和LUS对不可切除病例的检出率达100%。但是, LUS对胃癌临床分期评估的运用在世界范围内并未普及, 近年已少有文献报道。

与此同时, 就存在诊断性腹腔镜检查的指征问题, 2010年《NCCN胃癌临床实践指南》中推荐对每位MSCT等检查未检出远处转移的胃癌患者进行腹腔镜探查分期。既往有研究对CT检查排除明显远处转移的病例即行腹腔镜检查, 结果虽然提高了手术切除率, 但2/3以上的病例接受了无谓的腹腔镜检查。Lehnert等^[58]在对120例胃癌患者的前瞻性研究中, 仅对临床分期(CT、MRI和EUS等)可疑T₄期和可疑存在腹膜和肝脏转移的病例行腹腔镜检查, 结果既提高了手术切除率, 又避免了无谓的腹腔镜探查。Feussner等^[59]对111例CT和EUS判断为T₃或T₄期并排除了有明显远处转移的胃癌患者行术前诊断性腹腔镜及LUS, 结果修改了46%胃癌患者的术前分期, 改变了40.5%患者的治疗方案, 避免了不必要的术前化疗和剖腹探查术。该研究认为腹腔镜和LUS所增加的医疗费用完全可为避免不必要的手术、降低并发症等所减少的费用抵偿。近年Song等^[60]对符合上述条件的胃癌患者行诊断性腹腔镜检查, 亦取得了较好的临床效果。由于诊断性腹腔镜检查主要用于检出腹膜转移, Hur等^[61]研究显示, 如仅对临床分期为T₃或T₄期、无明显腹膜转移、大体分型为Borrmann III或IV型、肿瘤直径>4 cm的胃癌患者行诊断

性腹腔镜检查, 可以在Feussner等^[59]标准的基础上进一步降低腹腔镜探查率及提高结果阳性率. 我们近期的一项大宗病例研究显示, 对MSCT判断为T₀₋₂N_xM₀或T_xN₀M₀期, 或肿瘤较小的胃癌病例由于其腹膜转移的发生概率较小而无需行腹腔镜探查^[50].

2.6 PET和PET-CT PET针对肿瘤特殊的生物学特点, 通过选择不同的显像剂, 从分子水平显示肿瘤细胞的特征, 为临床提供肿瘤特征化和诊治相关的信息, 最常用的显像剂是¹⁸F-氟代脱氧葡萄糖(¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG). PET可以同时胃癌原发病灶、淋巴结转移、远处组织和器官转移作出判断, 对肿瘤的分期和治疗计划的制定有着重要的参考作用. PET较高的敏感度和特异度并不依赖于肿瘤的形态学改变, 他根据细胞的生理、生化功能的改变, 从¹⁸F-FDG摄取的角度发现恶变细胞, 并准确地作出定位和定性诊断.

国内一项研究显示PET对胃癌判断的敏感度和特异度分别为92%和71%, 对淋巴结转移的敏感度达80%, 对远处转移的敏感度为7/8^[62]. 国外多项研究显示PET对胃癌诊断的敏感度和特异度分别为58%-94%和78%-100%^[63]. PET对胃黏液腺癌、印戒细胞癌、低分化腺癌以及弥漫型胃癌(Lauren分型)的检出率较之管状腺癌、中分化腺癌及肠型胃癌为低^[63]. 各项结果间的差异与各组病例间上述病理类型所占的比例存在一定的相关性. PET对区域转移淋巴结的显示不佳, 无法将其与原发灶清楚鉴别开^[64]. PET对胃癌各站转移淋巴结的检出敏感度均较低, 特别是对N₁站, 显著低于CT(17.6%-46.4% vs 58%-89.3%)^[63]. PET对胃癌腹膜转移的敏感度和特异度分别为9%-50%和63%-99%^[63]. PET对胃癌肝脏转移判断的敏感度和特异度分别为85%和74%, 对肺转移的判断分别为67%和88%, 对骨转移的判断则为30%和82%^[63]. 此外, 尽管PET-CT较之PET有更多的优势, 其对进展期胃癌的检出率与CT基本一致, 但其对胃癌诊断的敏感度仍受病理类型的影响, 其对区域淋巴结转移检出的敏感度仍显著低于CT(41% vs 75%)^[65]. 同时, 近期两项比较研究显示, PET和PET-CT对腹膜转移的诊断敏感度显著低于CT(35.3%-57.1% vs 76.5%-82.1%)^[66,67]. 所以, 单用PET或PET-CT对胃癌进行检测和术前分期并不能提供充分的诊断信息.

尽管单用PET或PET-CT对胃癌术前分期的

价值并未获得广泛认可, 但其另一项功能却越来越受到关注. PET可作为肿瘤治疗效果检测和评估指标, ¹⁸F-FDG摄取率的下降是证明肿瘤对治疗出现反应的客观标准. 在细胞培养和动物试验中证明, 在放、化疗初期, 存活的细胞¹⁸F-FDG摄取是增高的, 但临床上的研究却恰恰相反, ¹⁸F-FDG的摄取率和肿瘤细胞的减少是平行的. 少数学者甚至认为¹⁸F-FDG是唯一可以检测肿瘤放、化疗有效性的方法. 肿瘤糖代谢的降低加速了肿瘤体积的缩小, 尤其是化疗后, ¹⁸F-FDG摄取率下降比肿瘤缩小出现更早, 也更敏感. 如治疗后SUV下降程度越高, 说明肿瘤对治疗越敏感, 肿瘤细胞坏死越多, 虽然形态学上没有太大的改变, 但PET却已经能预言患者良好的预后了. Ott等^[68,69]的前瞻性研究显示PET可以预测原发灶摄取FDG的胃癌病例对新辅助化疗的疗效及其预后. 通过比较初始治疗前及2 wk后胃癌原发灶SUV的变化准确地反映疗效, 从而在治疗早期使疗效不佳者避免无效治疗, 及时采用二线治疗以改善预后. 但是, 近期两项研究却显示, PET或PET-CT可能又无法准确反应新辅助化疗后的组织病理反应疗效^[44,70]. 所以, 有待深入开展多中心大宗病例研究以取得足够的循证医学依据, 以明确PET或PET-CT对胃癌新辅助化疗等术前治疗疗效预测的价值. 2010年《NCCN胃癌临床实践指南》中仅将PET或PET-CT列为术后可选择检查项目.

3 结论

准确的胃癌术前分期对选择合理的治疗方案、评价预后等具有重要的指导意义. 随着影像技术的发展, 胃癌术前分期的准确率得到明显提高, 基本满足了胃癌综合治疗方案实施的需要, 但仍有待探讨更精确、合理的术前检查方案, 并最终达到提高胃癌患者预后及生活质量的目的.

4 参考文献

- 1 胡祥. 日本《胃癌治疗指南》(第3版)解读. 中国实用外科杂志 2010; 30: 25-30
- 2 尹浩然, 朱正纲, 林言箴. 进展期胃癌外科综合治疗的方法与步骤. 外科理论与实践 2000; 5: 134-135
- 3 燕敏, 严超. 胃癌术前分期与外科综合治疗. 外科理论与实践 2006; 11: 481-485
- 4 Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Loftis FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer.

同行评价

本文内容全面, 观点新颖, 可帮助读者了解胃癌术前分期的研究现状.

- N Engl J Med* 2006; 355: 11-20
- 5 胡祥. 第14版日本《胃癌处理规约》的重要变更. 中国实用外科杂志 2010; 30: 241-246
 - 6 Willis S, Truong S, Gribnitz S, Fass J, Schumpelick V. Endoscopic ultrasonography in the preoperative staging of gastric cancer: accuracy and impact on surgical therapy. *Surg Endosc* 2000; 14: 951-954
 - 7 Wang JY, Hsieh JS, Huang YS, Huang CJ, Hou MF, Huang TJ. Endoscopic ultrasonography for pre-operative locoregional staging and assessment of resectability in gastric cancer. *Clin Imaging* 1998; 22: 355-359
 - 8 Hünnerbein M, Handke T, Ulmer C, Schlag PM. Impact of miniprobe ultrasonography on planning of minimally invasive surgery for gastric and colonic tumors. *Surg Endosc* 2004; 18: 601-605
 - 9 严超, 朱正纲, 诸琦, 燕敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查在早期胃癌术前分期的应用. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 390-393
 - 10 严超, 朱正纲, 燕敏, 诸琦, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查对胃癌术前评估淋巴结状况的价值. 诊断学理论与实践 2002; 1: 157-160
 - 11 Choi J, Kim SG, Im JP, Kim JS, Jung HC, Song IS. Comparison of endoscopic ultrasonography and conventional endoscopy for prediction of depth of tumor invasion in early gastric cancer. *Endoscopy* 2010; 42: 705-713
 - 12 Choi J, Kim SG, Im JP, Kim JS, Jung HC, Song IS. Is endoscopic ultrasonography indispensable in patients with early gastric cancer prior to endoscopic resection? *Surg Endosc* 2010; 24: 3177-3185
 - 13 Ajani JA, Barthel JS, Bekaii-Saab T, Bentrem DJ, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, Fuchs CS, Gerdes H, Hayman JA, Hazard L, Hofstetter WL, Ilson DH, Keswani RN, Kleinberg LR, Korn M, Meredith K, Mulcahy MF, Orringer MB, Osarogiagbon RU, Posey JA, Sasson AR, Scott WJ, Shibata S, Strong VE, Washington MK, Willett C, Wood DE, Wright CD, Yang G. Gastric cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8: 378-409
 - 14 Venkataraman I, Rao HK, Singh P, Elangovan S, Kate V. Efficacy of hydrogastric sonography and spiral Computed Tomography in staging of gastric carcinoma—a comparative study. *J Clin Ultrasound* 2010; 38: 480-485
 - 15 Segura JM, Oliveira A, Conde P, Erdozain JC, Suárez J. Hydrogastric sonography in the preoperative staging of gastric cancer. *J Clin Ultrasound* 1999; 27: 499-504
 - 16 张惠萍, 刘燕, 李影, 赵国萍, 陶永康, 方青流. 体表超声在胃癌定量诊断中的应用. 中国超声医学杂志 2002; 18: 25-28
 - 17 Lim HK, Kim S, Lim JH, Kim SH, Lee WJ, Chun H, Cho JW, Kim JJ. Assessment of pancreatic invasion in patients with advanced gastric carcinoma: usefulness of the sliding sign on sonograms. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 615-618
 - 18 Yoshinaka H, Nishi M, Kajisa T, Kuroshima K, Morifuji H. Ultrasonic detection of lymph node metastases in the region around the celiac axis in esophageal and gastric cancer. *J Clin Ultrasound* 1985; 13: 153-160
 - 19 Chen CN, Cheng YM, Lin MT, Hsieh FJ, Lee PH, Chang KJ. Association of color Doppler vascularity index and microvessel density with survival in patients with gastric cancer. *Ann Surg* 2002; 235: 512-518
 - 20 严超, 朱正纲, 詹维伟, 燕敏, 于颖彦, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 经腹超声检查对胃癌术前评估的价值. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 121-124
 - 21 严超, 朱正纲. 胃癌术前分期的CT研究进展. 中国医师杂志 2002; 4: 1288-1290
 - 22 严超, 朱正纲. CT和MRI检查应用于胃癌术前分期的研究进展. 实用癌症杂志 2003; 18: 327-329
 - 23 Yan C, Zhu ZG, Yan M, Zhang H, Pan ZL, Chen J, Xiang M, Chen MM, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Value of multidetector-row computed tomography in the preoperative T and N staging of gastric carcinoma: a large-scale Chinese study. *J Surg Oncol* 2009; 100: 205-214
 - 24 Takao M, Fukuda T, Iwanaga S, Hayashi K, Kusano H, Okudaira S. Gastric cancer: evaluation of triphasic spiral CT and radiologic-pathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 1998; 22: 288-294
 - 25 Ziegler K, Sanft C, Zimmer T, Zeitz M, Felsenberg D, Stein H, Germer C, Deutschmann C, Riecken EO. Comparison of computed tomography, endosonography, and intraoperative assessment in TN staging of gastric carcinoma. *Gut* 1993; 34: 604-610
 - 26 Perng DS, Jan CM, Wang WM, Chen LT, Su YC, Liu GC, Lin HJ, Huang TJ, Chen CY. Computed tomography, endoscopic ultrasonography and intraoperative assessment in TN staging of gastric carcinoma. *J Formos Med Assoc* 1996; 95: 378-385
 - 27 Bhandari S, Shim CS, Kim JH, Jung IS, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Kim BS. Usefulness of three-dimensional, multidetector row CT (virtual gastroscopy and multiplanar reconstruction) in the evaluation of gastric cancer: a comparison with conventional endoscopy, EUS, and histopathology. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 619-626
 - 28 Habermann CR, Weiss F, Riecken R, Honarpisheh H, Bohnacker S, Staedtler C, Dieckmann C, Schoder V, Adam G. Preoperative staging of gastric adenocarcinoma: comparison of helical CT and endoscopic US. *Radiology* 2004; 230: 465-471
 - 29 Hwang SW, Lee DH, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jung SH, Kim NY, Kim YH, Lee KH, Kim HH, Park do J, Lee HS, Jung HC, Song IS. Preoperative staging of gastric cancer by endoscopic ultrasonography and multidetector-row computed tomography. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 512-518
 - 30 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 诸琦, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查和多层螺旋CT对胃癌淋巴结转移状况的评估价值. 中华外科杂志 2005; 43: 174-176
 - 31 朱正纲, 严超, 陈克敏, 诸琦, 燕敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查与多层螺旋CT对胃癌术前分期的对比研究. 中华胃肠外科杂志 2002; 5: 99-103
 - 32 陈军, 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 诸琦, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查和多层螺旋CT对胃癌术前T、N分期的比较研究. 中国实用外科杂志 2005; 25: 278-281
 - 33 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 多层螺旋CT对胃癌术前临床分期的评估价值. 中国普通外科杂志 2003; 12: 15-18
 - 34 Matsuki M, Kani H, Tatsugami F, Yoshikawa S, Narabayashi I, Lee SW, Shinohara H, Nomura E, Tanigawa N. Preoperative assessment of vascular anatomy around the stomach by 3D imaging using MDCT before laparoscopy-assisted gastrectomy. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 145-151
 - 35 Kumano S, Tsuda T, Tanaka H, Hirata M, Kim T, Murakami T, Sugihara E, Abe H, Yamashita H, Kobayashi N, Mochizuki T. Preoperative evaluation of perigastric vascular anatomy by 3-dimensional

- computed tomographic angiography using 16-channel multidetector-row computed tomography for laparoscopic gastrectomy in patients with early gastric cancer. *J Comput Assist Tomogr* 2007; 31: 93-97
- 36 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 项明, 陈明敏, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 进展期胃癌CT征象与其临床病理特征的关系. *外科理论与实践* 2005; 10: 413-418
 - 37 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 多层螺旋CT灌注成像对胃癌血管通透性评估的价值. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 1796-1799
 - 38 Zhang H, Pan Z, Du L, Yan C, Ding B, Song Q, Ling H, Chen K. Advanced gastric cancer and perfusion imaging using a multidetector row computed tomography: correlation with prognostic determinants. *Korean J Radiol* 2008; 9: 119-127
 - 39 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 项明, 陈明敏, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 胃黏液腺癌的临床病理和CT特征. *外科理论与实践* 2007; 12: 362-366
 - 40 Maeda E, Akahane M, Uozaki H, Kato N, Hayashi N, Fukayama M, Ohtomo K. CT appearance of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Abdom Imaging* 2009; 34: 618-625
 - 41 Lee MW, Lee JY, Kim YJ, Park EA, Choi JY, Kim SH, Lee JM, Han JK, Choi BI. Gastric hepatoid adenocarcinoma: CT findings. *Abdom Imaging* 2007; 32: 293-298
 - 42 Lee JH, Paik YH, Lee JS, Ryu KW, Kim CG, Park SR, Kim YW, Kook MC, Nam BH, Bae JM. Abdominal shape of gastric cancer patients influences short-term surgical outcomes. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1288-1294
 - 43 Park SR, Kim MJ, Ryu KW, Lee JH, Lee JS, Nam BH, Choi IJ, Kim YW. Prognostic value of preoperative clinical staging assessed by computed tomography in resectable gastric cancer patients: a viewpoint in the era of preoperative treatment. *Ann Surg* 2010; 251: 428-435
 - 44 Lee SM, Kim SH, Lee JM, Im SA, Bang YJ, Kim WH, Kim MA, Yang HK, Lee HJ, Kang WJ, Han JK, Choi BI. Usefulness of CT volumetry for primary gastric lesions in predicting pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer. *Abdom Imaging* 2009; 34: 430-440
 - 45 张晓鹏, 唐磊. 胃癌CT影像学临床应用进展. *中华外科杂志* 2009; 47: 1298-1301
 - 46 Moschetta M, Stabile Ianora AA, Anglani A, Marzullo A, Scardapane A, Angelelli G. Preoperative T staging of gastric carcinoma obtained by MDCT vessel probe reconstructions and correlations with histological findings. *Eur Radiol* 2010; 20: 138-145
 - 47 Yan C, Zhu ZG, Yan M, Zhang H, Pan ZL, Chen J, Xiang M, Chen MM, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Size of the largest lymph node visualized on multidetector-row computed tomography (MDCT) is useful in predicting metastatic lymph node status of gastric cancer. *J Int Med Res* 2010; 38: 22-33
 - 48 贾海鹏, 张欢, 潘自来, 付天鹏, 宋琦, 丁蓓, 凌华威, 陈克敏. 胃癌术前淋巴结分期的MDCT研究. *中国医学计算机成像杂志* 2009; 15: 338-344
 - 49 Dhar DK, Kubota H, Kinukawa N, Maruyama R, Kyriazanos ID, Ohno S, Nagasue N. Prognostic significance of metastatic lymph node size in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 1522-1530
 - 50 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 项明, 陈明敏, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 多排CT对胃癌腹膜转移术前预测的单中心大宗病例研究. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 106-110
 - 51 Kim AY, Han JK, Seong CK, Kim TK, Choi BI. MRI in staging advanced gastric cancer: is it useful compared with spiral CT? *J Comput Assist Tomogr* 2000; 24: 389-394
 - 52 Sohn KM, Lee JM, Lee SY, Ahn BY, Park SM, Kim KM. Comparing MR imaging and CT in the staging of gastric carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174: 1551-1557
 - 53 Anzidei M, Napoli A, Zaccagna F, Di Paolo P, Zini C, Cavallo Marincola B, Geiger D, Catalano C, Pasariello R. Diagnostic performance of 64-MDCT and 1.5-T MRI with high-resolution sequences in the T staging of gastric cancer: a comparative analysis with histopathology. *Radiol Med* 2009; 114: 1065-1079
 - 54 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 磁共振成像和多层螺旋CT对胃癌术前分期的比较研究. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 2951-2955
 - 55 Stell DA, Carter CR, Stewart I, Anderson JR. Prospective comparison of laparoscopy, ultrasonography and computed tomography in the staging of gastric cancer. *Br J Surg* 1996; 83: 1260-1262
 - 56 Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Ajani J. Laparoscopic staging for gastric cancer. *Surgery* 1996; 119: 611-614
 - 57 Muntean V, Mihailov A, Iancu C, Toganel R, Fabian O, Domsa I, Muntean MV. Staging laparoscopy in gastric cancer. Accuracy and impact on therapy. *J Gastrointest Liver Dis* 2009; 18: 189-195
 - 58 Lehnert T, Rudek B, Kienle P, Buhl K, Herfarth C. Impact of diagnostic laparoscopy on the management of gastric cancer: prospective study of 120 consecutive patients with primary gastric adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 471-475
 - 59 Feussner H, Omote K, Fink U, Walker SJ, Siewert JR. Pretherapeutic laparoscopic staging in advanced gastric carcinoma. *Endoscopy* 1999; 31: 342-347
 - 60 Song KY, Kim JJ, Kim SN, Park CH. Staging laparoscopy for advanced gastric cancer: is it also useful for the group which has an aggressive surgical strategy? *World J Surg* 2007; 31: 1228-1223
 - 61 Hur H, Lee HH, Jung H, Song KY, Jeon HM, Park CH. Predicting factors of unexpected peritoneal seeding in locally advanced gastric cancer: indications for staging laparoscopy. *J Surg Oncol* 2010; 102: 753-757
 - 62 卫勃, 陈凇, 尹大一, 田嘉禾, 李荣. 正电子发射型断层扫描成像诊断胃恶性肿瘤的临床价值初探. *中华外科杂志* 2005; 43: 176-177
 - 63 Dassen AE, Lips DJ, Hoekstra CJ, Pruijt JF, Bosscha K. FDG-PET has no definite role in preoperative imaging in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35: 449-455
 - 64 McAteer D, Wallis F, Couper G, Norton M, Welch A, Bruce D, Park K, Nicolson M, Gilbert FJ, Sharp P. Evaluation of 18F-FDG positron emission tomography in gastric and oesophageal carcinoma. *Br J Radiol* 1999; 72: 525-529
 - 65 Kim EY, Lee WJ, Choi D, Lee SJ, Choi JY, Kim BT, Kim HS. The value of PET/CT for preoperative staging of advanced gastric cancer: Comparison with contrast-enhanced CT. *Eur J Radiol* 2010 Mar 10. [Epub ahead of print]
 - 66 Lim JS, Kim MJ, Yun MJ, Oh YT, Kim JH, Hwang HS, Park MS, Cha SW, Lee JD, Noh SH, Yoo HS, Kim KW. Comparison of CT and 18F-FDG pet for detecting peritoneal metastasis on the preoperative evaluation for gastric carcinoma. *Korean J Radiol* 2006; 7: 249-256
 - 67 Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, Goere D,

- Malka D, Lumbroso J, Schumberger M, Sigal R, Elias D. Staging of peritoneal carcinomatosis: enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging* 2008; 33: 87-93
- 68 Ott K, Fink U, Becker K, Stahl A, Dittler HJ, Busch R, Stein H, Lordick F, Link T, Schwaiger M, Siewert JR, Weber WA. Prediction of response to preoperative chemotherapy in gastric carcinoma by metabolic imaging: results of a prospective trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4604-4610
- 69 Ott K, Herrmann K, Lordick F, Wiedner H, Weber WA, Becker K, Buck AK, Dobritz M, Fink U, Ulm K, Schuster T, Schwaiger M, Siewert JR, Krause BJ. Early metabolic response evaluation by fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography allows in vivo testing of chemosensitivity in gastric cancer: long-term results of a prospective study. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2012-2018
- 70 Vallböhmer D, Hölscher AH, Schneider PM, Schmidt M, Dietlein M, Bollschweiler E, Baldus S, Alakus H, Brabender J, Metzger R, Mönig SP. [18F]-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography for the assessment of histopathologic response and prognosis after completion of neoadjuvant chemotherapy in gastric cancer. *J Surg Oncol* 2010; 102: 135-140

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2011-01-08)

白介素-10与炎症性肠病

顾秋平, 白爱平

顾秋平, 白爱平, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81070310, 30860108

江西省自然科学基金资助项目, No. 2007GZY1168

江西省青年科学家培养对象计划基金资助项目

作者贡献分布: 本文综述由顾秋平与白爱平共同完成; 白爱平审校。

通讯作者: 白爱平, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. baiap@163.com

收稿日期: 2010-09-27 修回日期: 2010-12-06

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-08

Interleukin-10 and inflammatory bowel disease

Qiu-Ping Gu, Ai-Ping Bai

Qiu-Ping Gu, Ai-Ping Bai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81070310, 30860108; the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, China, No. 2007GZY1168; and the Young Scientist Cultivation Program of Jiangxi Province

Correspondence to: Associate Professor Ai-Ping Bai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. baiap@163.com

Received: 2010-09-27 Revised: 2010-12-06

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-08

Abstract

The etiology of inflammatory bowel disease (IBD) has not been fully elucidated. Evidence indicates that dysregulation of intestinal mucosal immunity plays a critical role in the pathogenesis of IBD since it can cause overproduction of inflammatory cytokines and lead to uncontrolled intestinal inflammation. Cytokines play a pivotal role in modulating inflammation and may therefore be a good target for IBD therapy. Interleukin-10 (IL-10) is a regulatory cytokine which inhibits both antigen presentation and subsequent pro-inflammatory cytokine release and has been proposed as a potent anti-inflammatory biological therapy for chronic IBD. Many IL-10-based strategies have been developed for treatment of IBD, including recombinant IL-10, genetically modified bacteria expressing IL-10, adenoviral vectors encoding IL-10, and combination therapy with IL-10 and Treg cells. The use of IL-10-

based strategies will provide new insights into cell- and gene-based treatment for IBD.

Key Words: Interleukin-10; Inflammatory bowel disease; Gene therapy

Gu QP, Bai AP. Interleukin-10 and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 57-61

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性、复发性肠道炎症疾病,其明确病因目前仍不清楚。肠道免疫功能异常导致过量炎症因子释放损伤肠道黏膜在IBD发病中起着关键作用,应用免疫抑制剂减少炎症因子的释放也被应用于IBD的治疗。近年来利用细胞因子调节机体免疫功能以治疗IBD的研究日渐增多,大量的实验及前期临床研究表明IL-10作为一种免疫调节因子,其对IBD良好的治疗效应预示着他将有可能为未来IBD治疗提供新的方法。然而,IL-10在临床应用尚存在瓶颈,如何更好地利用他使其发挥最大的生物学效应是未来的研究重点。目前已经出现了一些新型的方法,如利用基因修饰细菌、腺病毒编码IL-10以及联合Treg细胞等。本文将对IL-10在炎症性肠病的发病以及治疗方面的研究进展作一综述。

关键词: 白介素10; 炎症性肠病; 基因治疗

顾秋平, 白爱平. 白介素-10与炎症性肠病. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 57-61

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/57.asp>

0 引言

白介素-10(interleukin-10, IL-10)是机体内重要的免疫调节因子,能抑制多种炎症因子的合成和生物活性,是一种重要的抗炎因子。IL-10可抑制抗原递呈反应以及炎症细胞因子的释放,其在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病中可能发挥着重要的作用。IL-10作为一种有效的炎症抑制因子,已被应用于IBD治疗的研究中,尽管目前临床前期研究显示其效果并

■背景资料

炎症性肠病(IBD)是一种慢性迁延性肠道免疫性疾病,其发病率有逐年增长的趋势。目前IBD的临床药物治疗并不理想,缓解率低,复发率高。近年来大量的基础及前期临床研究发现,IL-10在IBD发病中起着重要作用,并证实其对IBD的肠道炎症具有较好的缓解作用。IL-10有可能为IBD的治疗提供新方法,然而,要将IL-10应用至临床治疗中仍有许多困难,例如如何提高他的生物效应及避免不良反应等,要解决这些问题仍需大量的研究工作。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

■ 研发前沿

IL-10是未来IBD治疗研究的热点,如何提高肠道局部IL-10浓度发挥更好的生物学效应是研究的关键所在。

不理想,但其仍被认为在IBD的治疗具有广泛前景。本文将对IL-10的生物学特性以及其在IBD发病和治疗中的研究进展作一综述。

1 白介素的来源以及生物活性

IL-10最早由Fiorentino等研究发现,当时被命名为细胞因子合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF),具有很强的免疫调节作用,能有效抑制炎症细胞因子的合成,如干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ), IL-2等^[1,2]。尽管IL-10最早被定义为Th2细胞因子,但随着研究深入,发现Treg、Tr1、Th1和Th17也是IL-10主要的来源^[3,4]。

IL-10能抑制T淋巴细胞、单核细胞功能以及巨噬细胞的活化和效应作用,是一个对大多数造血细胞都有不同影响的细胞因子,其最主要的功能是限制和最终终止炎症反应^[5]。除此之外,IL-10还能调节B淋巴细胞, NK细胞,细胞毒性和辅助性T淋巴细胞,肥大细胞,粒细胞,树突状细胞,角质形成细胞和内皮细胞的生长和分化。抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)和淋巴细胞是IL-10的主要效应靶细胞,与这些细胞作用后可调节Th1和Th2细胞因子的平衡,这是其调节机体炎症反应的主要机制。IL-10可以有效抑制IL-1、IL-6、IL-12和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等一些主要的促炎症因子的产生。IL-10对Th17也有较强的抑制作用,他可以通过与IL-10受体结合促进Foxp3⁺ T淋巴细胞的增殖,而抑制IL-17产生细胞Th17的活化和增殖^[6],当Th17细胞发生极化时所分泌的IL-10可以抑制Th17细胞的致病效应; IL-10也是介导IL-27抑制Th17生物活性的途径中重要因子。

由于IL-10具有强有力的抗炎作用以及广泛的免疫调节的特性, IL-10与很多免疫性疾病的发生都有着密切的联系,如IBD, 风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA), 糖尿病, 肿瘤和银屑病等。研究IL-10在免疫调节中的作用及相关机制,对进一步了解免疫性疾病的发病并探索可能的治疗方法具有重要意义。

2 IL-10在IBD中的表达及功能

IBD主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 目前对于其明确的发病机制仍不是很清楚。近年来认为肠黏膜免疫紊乱在IBD发病机制中具有中心性地位, 其中一个极为重要的发病机制是炎症因子(如TNF、IL-1 β 、IL-6等)与抗炎因子(如IL-10、TGF β 等)平衡失调^[7,8]和机体组织Treg细

胞的数量及功能明显不足所致^[9]。

目前研究发现, IL-10参与了IBD发病。利用IL-10基因缺陷小鼠可建立结肠炎小鼠模型^[10], IL-10受体编码基因突变或者缺陷导致IBD的发病^[11], 说明其在IBD发病中的作用是值得重视的。基因的易感性也是IBD发病的一重要因素, 一项针对具有法国-加拿大血统儿童CD患者的基因变种研究中显示, IL-10启动子基因编码区发生变异可导致增加儿童患CD的风险^[12]。基因研究小组最近也将IL-10确定为UC的易感基因^[13,14], CD患者的发病与其IL-10的分泌能力缺陷有密切的关系^[15]。Schmit等^[16]将取自CD患者非炎症部分的活检组织与rhIL-10进行共培养, 结果显示rhIL-10能明显下调TNF- α 的分泌, 说明IL-10能抑制炎症因子的产生。IL-10在维持肠道黏膜屏障的完整性中起着关键作用, 当肠上皮细胞中IL-10发生缺失, 可导致IL-10的可诱导性和免疫抑制基因BCL3下调, 而IFN- γ , TNF- α 和IL-17的表达上调, 直接损伤肠道黏膜屏障^[17]; 而肠黏膜屏障的功能异常是IBD产生的关键因素之一^[18]。肠道异常免疫反应导致细胞因子产生失调, 大量的促炎症细胞因子可直接损害肠道上皮, 致使肠黏膜屏障受损、通透性增加, 肠道菌群移位激活了肠道异常免疫反应^[19,20], IL-10可以抑制炎症因子的产生, 保持肠道黏膜屏障的完整性, 防止IBD的发生和恶化。有研究显示预先补充IL-10或者增强IL-10的体内表达可以预防结肠炎的发生^[21,22]。

3 IL-10在IBD治疗中的应用

目前临床上IBD的治疗主要依靠糖皮质激素、水杨酸制剂、免疫抑制剂等药物, 但是这些药物不能有效控制IBD的病情, IBD临床缓解率仅为60%-80%, 并且复发率高。在近年对IBD的研究中, 随着人们对肠黏膜免疫以及肠道黏膜炎症因子在IBD发病机制中所起作用的进一步了解, 发展出一些具有选择性治疗效果的生物治疗方法。早期国外有研究发现IL-10缺陷小鼠易导致类似于人类IBD的表现, 如腹泻、体质量下降以及便血等^[10], 这使人们想到IL-10在IBD发病中的作用以及治疗的可能。

3.1 重组IL-10治疗IBD 起初有研究人员将重组人IL-10运用于治疗临床IBD患者(UC或者CD)取得了可喜的成果, 并证实这种给药方式是安全的、可耐受的^[23-25], 且可以一定程度上缓解患者的临床症状, 使得IL-10在治疗IBD的研究备受关注。一项多中心双盲安慰剂对照试验研究显

示, 95例活动性CD在每日接受不同剂量的重组人IL-10后有23%的缓解率, 对比安慰剂组有良好的疗效和耐受性^[26]。然而, 人们对这种治疗方式仍不是很满意, 主要是他未反映出IL-10对肠道局部损伤的影响。尽管有很多研究证实IL-10在治疗CD和UC方面有一定的效果, 但是总体效果不令人满意, 例如静脉或皮下注射给药途径治疗效果欠佳, 究其原因考虑为IL-10在血清中的半衰期有关。然而, 以增加用药的浓度并不能有效解决这个问题, Tilg等^[27]的研究表明CD患者在静脉应用大剂量IL-10, 效果反而不佳, 且会引发全身的不良反应, 如头痛、贫血、发热、血小板减少、周身不适等。研究人员设想利用一种方法将IL-10投放到肠道的局部病变处, 以避免系统用药的局限性和不良反应。

3.2 基因转导以及基因修饰治疗IBD 通过静脉或皮下途径的系统性给药, IL-10对治疗IBD疗效欠佳。因此, 寻找一种能够提高肠道IL-10浓度, 增加其生物利用度的治疗方法显得尤为重要。局部用药提高肠道的药物浓度也许可以提高药物的作用效应, 如通过灌肠或者口服的方式给药, 但是有前期临床研究发现, IL-10对胃酸较敏感, 口服后IL-10会被胃酸分解而大大降低了其生物效应; 而利用灌肠的方式给药, 药物在肠道中停留的时间较短, 难以充分发挥疗效, 且灌肠使肠道压力增加有损伤肠黏膜的可能。因此, 人们设想利用基因转导的方式在肠道局部表达IL-10来治疗肠道炎症。Kanbe等^[28]利用基因转导的方式将含肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的裸基因给DSS结肠炎小鼠灌肠, HGF在肠道局部表达调节凋亡相关基因的表达和分化而改善肠道局部炎症状态。这项研究说明通过基因转导的方式给药是可行的, 但是这种治疗方式仍然存在着种种不足, 转导基因要进入肠道隐窝和固有层的靶细胞中发挥作用是非常艰难的, 因为肠道中存在细胞外紧密连接和黏液层阻碍着外源基因的进入^[29]。为此, Lindsay等^[30]利用E1缺失的5型腺病毒作为载体, 构建了编码IL-10的基因工程病毒(advmuIL-10), 结果显示这种方法可以有效提高肠道局部的IL-10浓度, 缓解肠道炎症损伤。Steidler等^[31]构建了可产生IL-10的基因工程细菌-乳酸乳球菌(*L.Lactis*/IL-10)采用灌胃治疗DSS结肠炎和基因缺陷小鼠结肠炎, 可使黏膜炎症减轻, 并有50%的缓解率。他认为利用肠道共栖菌乳酸杆菌作为药物传送的载体进行基因治疗是一种安全、有效的方式,

他可以避免胃酸的分解而以具有生物活性的形态到达肠道黏膜^[32]。

4 IL-10介导的IBD生物治疗

4.1 IL-10加强Treg细胞在肠道炎症中的调节效应 研究显示, T淋巴细胞, 尤其是Treg细胞在控制肠道炎症中起着关键作用^[33], Treg细胞可通过抑制免疫细胞, 特别是效应T淋巴细胞的分化和细胞抑制的释放来介导免疫耐受, 但是Treg细胞在缺少IL-10的情况下并不能阻止IBD的发生^[34]。Treg细胞在诱导外周免疫细胞对自身或者外来致病原的免疫耐受同时也依赖于Foxp3转录因子的表达, IL-10可以通过旁分泌的形式维持Treg细胞Foxp3转录因子的表达, 发挥Treg的免疫调节作用^[35]。Van Montfrans等^[36]为我们展示了一项新型的传送方式来将IL-10释放到黏膜组织中, 他在研究中利用逆转录病毒转导T淋巴细胞, 使其具有高效表达IL-10的能力, 这种方法在治疗CD的研究中显示出非常好的疗效, 使的这种CD4+ T淋巴细胞IL-10表达量增高了6倍, 增强CD4+ T淋巴细胞的免疫调节作用, 有效阻止结肠炎的发展。由于这种方法可以使IL-10只在炎症损伤的局部由Treg细胞释放, 避免了高系统水平药物浓度带来的各种不良反应。因此, 修饰Treg细胞有可能为IBD的治疗提供新的方法。

4.2 IL-10在益生菌治疗IBD中的作用 目前已经证实, 益生菌对IBD具有良好的治疗效果, 他可以调节肠道菌群的失调、调节黏膜屏障功能和通透性、下调肠道炎症因子的释放^[37]。Smits等^[38]研究发现, 乳酸杆菌可以通过树突状细胞(dendritic cells, DC)介导Treg细胞的分化, 使Treg分泌较高水平的IL-10来发挥其对IBD的治疗效应。Di Giacinto等^[39]研究发现通过每天运用VSL#3治疗TNBS结肠炎小鼠可以缓和其结肠炎复发的严重性, 这种治疗效应是依赖于益生菌刺激IL-10的分泌, 从而调节CD4+细胞的功能, 但这些效应可以被抗IL-10R抗体所消除。体外实验研究也显示双歧杆菌可明显增加UC患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的IL-10分泌, 同时减少促炎症因子IL-8的释放而缓解UC患者的炎症程度^[40], 这说明, IL-10在介导益生菌调节肠道炎症中起着重要作用。

4.3 其他一些生物治疗药物 目前对于IBD的治疗尚无单一的有效用药, 临床上多以联合用药为主。一些生物治疗方法在临床上已广泛应用, 其

■ 相关报道

Bhavsar等利用纳米粒为载体包埋IL-10基因, 将其给结肠炎小鼠模型灌胃后, 可明显缓解小鼠急性结肠炎模型的肠道炎症反应, 如恢复结肠长度、抑制炎症因子的产生以及增加体质量等。

■同行评价

本文内容集中,观点明确,对炎症性肠病的理论研究和临床治疗有参考意义。

作用机制可能与调节IL-10的功能有一定关系。英夫利昔(infliximab)是首个应用于临床IBD治疗的生物制剂,其主要的机制是抑制TNF- α 的释放。但目前也有研究显示,英夫利昔的治疗效应一定程度上与其促进粒细胞、单核细胞以及T淋巴细胞产生IL-10从而发挥抗炎作用有关^[41]。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)也是一种应用于IBD治疗的生物制剂,属于一种生长因子,他可以通过影响造血细胞的增殖和分化发挥其疾病的治疗作用,尤其是自身免疫性疾病。M-CSF在DC的分化过程中起着作用,在M-CSF存在的情况下,树突细胞前体和T淋巴细胞受到外源性致病原时可以快速释放IL-10调节局部免疫反应^[42]。越来越多的研究显示,IL-10在介导IBD的治疗中发挥着重要作用,这些生物制剂主要通过调节机体免疫细胞的功能,如CD4+CD25+ Treg和FoxP3+ Treg细胞等,从而促进IL-10的分泌调节炎症因子的平衡,缓解肠道炎症反应。以促进机体IL-10分泌为手段的IBD生物治疗是未来研究的主要方向。

5 结论

目前,对于IL-10在免疫反应调节中的广泛影响是毋庸置疑的。大量的研究已经证实IL-10对IBD具有一定的保护作用。尽管目前IL-10在临床前期运用研究中的疗效不尽人意,且其是否可以良好的稳定免疫病理和免疫抑制平衡存在争议,但IL-10在IBD治疗中的应用前景仍是值得期待的。许多研究证实IL-10的确有免疫激活和免疫抑制的双重作用,如何有效使IL-10在临床中更好的发挥治疗作用,避免各种不良反应的出现,提高其疗效仍需要大量的实验及前期临床研究。应用基因工程技术结合IL-10有可能成为将来IBD治疗的新的方法,我们希望在未来的研究中我们可以通过联合用药来加强或者抑制IL-10的效应,以及让IL-10在肠道细胞定位局部表达,达到最佳的治疗目的。

6 参考文献

- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095
- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; 248: 1230-1234
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50
- Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 269-275
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765
- Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, Park MK, Heo YM, Cho ML, Kwok SK, Ju JH, Park KS, Cho SG, Park SH, Kim HY, Min JK. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett* 2010; 127: 150-156
- Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 895-904
- Hibi T, Ogata H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2006; 41: 10-16
- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-274
- Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361: 2033-2045
- Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnett D. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3776-3782
- Budarf ML, Labbé C, David G, Rioux JD. GWA studies: rewriting the story of IBD. *Trends Genet* 2009; 25: 137-146
- Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL10, ATPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 1319-1323
- Correa I, Veny M, Esteller M, Piqué JM, Yagüe J, Panés J, Salas A. Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 896-903
- Schmit A, Carol M, Robert F, Bontems P, Houben JJ, Van Gossum A, Goldman M, Mascart F. Dose-effect of interleukin-10 and its immunoregulatory role in Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 298-305
- Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG, Laboisie CL. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest* 2008; 118: 1132-1142
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Rad-

- ford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 100-113
- 19 Kennedy RJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Mucosal barrier function and the commensal flora. *Gut* 2002; 50: 441-442
 - 20 Dharmani P, Chadee K. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the key. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1: 195-212
 - 21 Sasaki M, Mathis JM, Jennings MH, Jordan P, Wang Y, Ando T, Joh T, Alexander JS. Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector. *J Inflamm (Lond)* 2005; 2: 13
 - 22 Lindsay JO, Hodgson HJ. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10—a therapy for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1709-1716
 - 23 Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1434-1444
 - 24 van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997; 113: 383-389
 - 25 Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 1461-1472
 - 26 Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 1473-1482
 - 27 Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJ, Schreiber S, Gregor M, Ludwiczek O, Rutgeerts P, Gasche C, Koningsberger JC, Abreu L, Kuhn I, Cohard M, LeBeaut A, Grint P, Weiss G. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002; 50: 191-195
 - 28 Kanbe T, Murai R, Mukoyama T, Murawaki Y, Hashiguchi K, Yoshida Y, Tsuchiya H, Kurimasa A, Harada K, Yashima K, Nishimuki E, Shabana N, Kishimoto Y, Kojyo H, Miura K, Murawaki Y, Kawasaki H, Shiota G. Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1517-1525
 - 29 Wirtz S, Neurath MF. Gene transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gene Ther* 2003; 10: 854-860
 - 30 Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Brennan FM, Hodgson HJ. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis. *Gut* 2003; 52: 363-369
 - 31 Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-1355
 - 32 Steidler L, Rottiers P, Coulie B. Actobiotics as a novel method for cytokine delivery. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1182: 135-145
 - 33 Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 68-79
 - 34 Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* 1999; 20: 442-445
 - 35 Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009; 10: 1178-1184
 - 36 Van Montfrans C, Hooijberg E, Rodriguez Pena MS, De Jong EC, Spits H, Te Velde AA, Van Deventer SJ. Generation of regulatory gut-homing human T lymphocytes using ex vivo interleukin 10 gene transfer. *Gastroenterology* 2002; 123: 1877-1888
 - 37 Bai AP, Ouyang Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgrad Med J* 2006; 82: 376-382
 - 38 Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1260-1267
 - 39 Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174: 3237-3246
 - 40 Imaoka A, Shima T, Kato K, Mizuno S, Uehara T, Matsumoto S, Setoyama H, Hara T, Umesaki Y. Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2511-2516
 - 41 Ebert EC. Infliximab and the TNF-alpha system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G612-G620
 - 42 Kwan WH, Boix C, Gougelet N, Fridman WH, Mueller CG. LPS induces rapid IL-10 release by M-CSF-conditioned tolerogenic dendritic cell precursors. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 133-141

编辑 李军亮 电编 何基才

结直肠癌*k-ras*基因检测及其靶向治疗的研究现状

王丽, 余英豪

■背景资料

在结直肠癌的靶向治疗中, 抗EGFR单抗类药物能特异地抑制具有野生型*k-ras*基因的结直肠癌细胞的生长, 使患者预后得到改善, 但对突变型*k-ras*基因的结直肠癌患者无效。

王丽, 余英豪, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025

作者贡献分布: 本文综述由王丽完成; 余英豪审校。

通讯作者: 余英豪, 主任医师, 教授, 350025, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科. yuyinghao0808@126.com
电话: 0591-83717703

收稿日期: 2010-09-28 修回日期: 2010-12-08

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-08

Recent advances in detection of *k-ras* gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer

Li Wang, Ying-Hao Yu

Li Wang, Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2010-09-28 Revised: 2010-12-08

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-08

Abstract

Numerous studies have shown that anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies are effective in the treatment of colorectal cancer patients with the wild-type *k-ras* gene. The *k-ras* gene encodes a G-protein that functions downstream of EGFR signaling. Since *k-ras* mutations result in abnormal activation of the EGFR signaling pathway, anti-EGFR monoclonal antibody treatment is ineffective for patients with *k-ras* mutations. Therefore, *k-ras* mutation analysis is very important for targeted therapy of patients with colorectal cancer. This paper gives an overview of the recent advances in detection of *k-ras* gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; *k-ras* gene; Mutation; Targeted therapy; Detection Method

Wang L, Yu YH. Recent advances in detection of *k-ras* gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 62-67

■同行评议者

颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

摘要

越来越多的研究表明, EGFR单抗对*k-ras*基因野生型结直肠癌患者治疗有效。*k-ras*基因编码的K-ras蛋白为EGFR信号通路下游区的一种小分子G蛋白, *k-ras*基因发生突变后, 导致该信号通路异常活化, 从而对EGFR单抗治疗无效。因此, 检测*k-ras*基因状态对指导结直肠癌患者靶向治疗十分重要。本文就*k-ras*基因检测方法及其与结直肠癌靶向治疗的研究现状进行综述。

关键词: 结直肠癌; *k-ras*基因; 突变; 靶向治疗; 检测方法

王丽, 余英豪. 结直肠癌*k-ras*基因检测及其靶向治疗的研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 62-67

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/62.asp>

0 引言

结直肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在美国, 结直肠癌的发病率和死亡率均居所有肿瘤的第3位, 其中男性发病率和死亡率分别为59.2/10万和22.7/10万, 女性发病率和死亡率分别为43.8/10万和15.9/10万^[1]。在我国结直肠癌的发病率和死亡率也日益上升, 目前居第4位^[2], 在大城市中每年以4%的增长速度上升^[3], 随着人们生活方式、饮食结构的改变, 平均寿命的提高, 结直肠癌的发病率可能还将进一步上升。有数据显示, 结直肠癌全世界每年新发120万例, 患者确诊后5年存活率仅为55%^[4], 且约有20%的患者在初诊时即发现有远处脏器的转移^[5]。近年来, 随着新的分子靶向药物的研发和个体化治疗的应用, 使转移性结直肠癌患者的存活率有了显著改善。人们逐渐认识到靶向药物治疗与相关基因检测之间的密切联系, 因此, 对结直肠癌的分子生物学及分子靶向治疗的研究已成为目前肿瘤治疗及预后判断的热点之一。越来越多的学者将目光投向了*k-ras*基因检测与结直肠癌关系方面并取得了一定进展。本文重点就*k-ras*基因与结直肠癌及其靶向治疗的关系以及*k-ras*基因检测方法学的研究现状进行综述。

1 *k-ras*基因概述

*ras*癌基因参与人类肿瘤的发生发展,最初是在急性转化性逆转录病毒实验中从Harvey、Kirsten两株大鼠肉瘤病毒中克隆出来的转化基因,自1982年有学者发现人膀胱癌细胞中有活化的*h-ras*基因后,引起了人们对*ras*癌基因在人类肿瘤发生发展过程中作用的极大关注^[6]。*ras*基因家族与人类肿瘤相关的基因有3种:*h-ras*、*k-ras*和*n-ras*,分别定位于11、12和1号染色体上。其中,*k-ras*突变率最高,为17%-25%^[7]。*k-ras*基因亦是所有肿瘤中突变频率最高的致癌基因,约有10%-20%的肿瘤与*k-ras*的异常激活有关,*k-ras*的突变激活是人类多种肿瘤细胞恶性转化的主要原因之一^[8],有如分子开关,正常时能控制调控细胞生长的路径;发生异常时则导致细胞持续生长。当*k-ras*基因突变时,该基因永久活化,不能产生正常的K-ras蛋白,使细胞内信号传导紊乱,细胞增殖失控而导致癌变的发生。

*k-ras*基因位于12号染色体上,含有4个编码的外显子和一个5'末端不表达的外显子,编码由189个氨基酸组成的结构相似,具有GTP酶活性,相对分子质量为21 000 Da的K-ras蛋白,又称为P21蛋白^[9]。P21蛋白以有活性的P21-GTP与无活性的P21-GDP两种形式存在于细胞膜内表面,*k-ras*基因突变后其编码的P21蛋白GTP酶活性降低,当细胞外配体与跨膜细胞受体结合后激活下游信号传导通路级联反应,P21蛋白与GTP结合,P21蛋白水解有活性的P21-GTP为无活性的P21-GDP能力下降,P21与GTP牢固结合,结果使得信号传导一直处于激活状态,持续刺激细胞生长、发育、增殖,并引起细胞恶变^[10]。

2 结直肠癌靶向治疗的理论基础

近几年靶向药物的出现为肿瘤的治疗带来了更多的希望,而表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是经临床验证的多种类型肿瘤的治疗靶点,例如结直肠癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞癌以及胰腺癌等^[11]。免疫组织化学检测显示,30%-45%的结直肠癌患者有EGFR的过表达^[12]。EGFR是ErbB受体家族成员,其配体(EGF、TGF- α 等)与EGFR胞外段结合使之二聚化,由此导致胞内段酪氨酸激酶活化以及一系列信号转导的级联反应,促进细胞增殖,血管生成,转移并抑制细胞凋亡^[13],从而导致肿瘤的发生。靶向药物与EGFR结合可抑制EGFR的活性及其介导的信号传导途径,进而减少肿

瘤细胞增殖扩散,而且还可抑制肿瘤细胞对化疗和放疗损害的自我修复能力以及肿瘤新生血管的生成,从而产生对肿瘤生长的整体抑制效应。K-ras蛋白是EGFR信号通路下游区的一种小分子G蛋白,是该信号通路的一个重要组成部分^[14]。在信号转导过程中,K-ras蛋白在GEFs的催化下磷酸化,进入活化状态,从而进行信号转导^[15]。而K-ras蛋白内在的GTP酶活性又能使GTP去磷酸化为GDP,使其回复到静息状态^[16],GAPs催化这个过程^[17]。*k-ras*基因发生突变后,抑制了自身的GTP酶活性,使其不易被GAPs激活,使得K-ras蛋白总是处于活化状态^[18],最终导致信号转导通路异常活化,不受EGFR上游信号指令的影响。这种状态下如果使用靶向药物EGFR单抗,EGFR单抗虽能与细胞膜表面EGFR结合,阻滞了信号通路的下传,但*k-ras*基因突变后可发生自身磷酸化,抗拒EGFR单抗的作用,从而对EGFR单抗治疗无效。由此可见,靶向药物治疗并非对所有EGFR过表达的结直肠癌患者都有效,事实上,相当一部分患者不能从靶向治疗中获益^[11,19,20]。

3 *k-ras*基因突变与结直肠癌靶向治疗

有研究表明,结直肠癌患者中*k-ras*基因的突变率约为35-40%^[21,22],而且90%的突变发生在12、13位密码子^[23]。其中约70%发生于第12位密码子,30%发生于13位密码子^[24],极少部分发生于第61、63位密码子^[10]。较常见的突变类型为G>A,其次是G>T和G>C^[25,26]。发生在12、13位密码子的突变提示预后不良^[27]。此外,发生在12位密码子上的突变被认为会降低患者的无进展生存期和总体生存期^[21]。最新的一项研究报道了95例结直肠癌患者*k-ras*基因突变检测情况,41例患者检出突变,其中33例发生在12、13、15、18位密码子,被归类为激活型*k-ras*突变^[28]。8例发生于20、30、31位密码子,被归类为非激活型*k-ras*突变,其中5例西妥昔单抗治疗有效。学者认为,激活型*k-ras*突变可以作为预测西妥昔单抗疗效的有效指标,对于非激活型*k-ras*突变的患者,EGFR可以作为无进展生存期和总体生存期的预测指标,EGFR表达上调的*k-ras*野生型及非激活型*k-ras*突变的患者,其无进展生存期和总体生存期明显优于激活型*k-ras*突变患者或EGFR阴性的患者^[29]。许多研究表明,*k-ras*基因突变发生在结直肠癌发生的早期阶段^[30],多项研究显示,原发灶和转移灶的*k-ras*基因保持高度一致^[31-33],提示在转移过程中*k-ras*基因突

■ 研发前沿

对结直肠癌的分子生物学及分子靶向治疗的研究已成为目前肿瘤治疗及预后判断的热点之一。越来越多的学者将目光投向了*k-ras*基因检测与结直肠癌关系方面并取得了一定进展。

■相关报道

结直肠癌组织中存在一定比例的 *k-ras* 基因突变。最新报道应用微流控温度梯度毛细管电泳法(Chip-based TGCE)能够检测最少2.51%的突变型 *k-ras* 基因, 是一种较为简便、灵敏的检测方法。

变维持稳定。一般认为, *k-ras* 基因状态也不会因治疗而发生变化。

有研究显示, *k-ras* 基因突变使结肠癌患者对放疗的敏感性下降, 而通过抑制结肠癌细胞 *k-ras* 基因突变表达可提高放疗的敏感性^[10]。体外研究显示存在 *k-ras* 基因突变的结肠癌细胞对5-FU的敏感性结论不一, 临床研究结果也各异^[10]。美国东部肿瘤协助组的EST2292试验显示, *k-ras* 基因突变与结直肠癌患者接受5-FU及干扰素治疗是否获益无相关性^[34]。美国西南肿瘤协作组的一项研究显示, 在III期的结肠癌患者中, *k-ras* 基因为野生型患者可以从5-FU联合左旋咪唑化疗中获益, 而 *k-ras* 基因突变者则否^[35]。有学者分析了 *k-ras* 基因突变的类型与化疗敏感相关性, 结果显示, *k-ras* 基因第12、13位密码子为非天冬氨酸突变患者较天冬氨酸突变患者可以从5-FU为基础的化疗中获得更长生存期^[36]。而Markowitz等^[37]研究认为 *k-ras* 基因状态与化疗敏感性无关。

2004-02, FDA批准了西妥昔单抗用于晚期转移性结直肠癌患者的治疗。西妥昔单抗是第一个被批准用于此类适应证的单克隆抗体, 经过了多个国际大规模II期和III期临床研究^[38]。三线治疗的临床研究有: NCIC CO.17^[20], BOND^[12]; 二线治疗的临床研究有: EPIC^[39], BOND^[12]; 一线治疗的临床研究有: CRYSTAL^[40], OPUS^[41]。目前西妥昔单抗已从晚期转移性结直肠癌患者三线治疗药物跃升成为一线治疗药物。随着研究的深入, 逐渐发现 *k-ras* 基因突变状态可能与西妥昔单抗疗效有关。如果 *k-ras* 基因12和13位密码子发生突变, 则西妥昔单抗治疗无效。因此, 运用EGFR靶向药物治疗之前必须进行靶向治疗疗效预测指标检测。到目前为止, 多项临床研究均认为 *k-ras* 基因突变可作为靶向治疗的疗效预测指标^[29,42]。

对于 *k-ras* 基因为野生型患者, 《美国国立综合癌症网络(NCCN)结直肠癌临床实践指南》推荐在FOLFOX、CapeOX或FOLFIRI方案基础上联合西妥昔单抗作为一线治疗。对一般状况差、不能接受化疗的患者, 也可考虑单药西妥昔单抗治疗^[43]。值得注意的是, 西妥昔单抗等靶向治疗也存在一些缺点, 除了费用昂贵外, 使用后有一些潜在的不良反应, 特别是皮肤毒性反应等。

4 *k-ras* 基因检测

4.1 *k-ras* 基因检测的意义 2008-10, *k-ras* 基因检

测被写入最新版《NCCN结直肠癌临床实践指南》。新指南传递给广大医师和患者两条重要信息: 一是所有转移性结直肠癌患者都应检测 *k-ras* 基因状态; 二是只有 *k-ras* 野生型患者才建议接受EGFR抑制剂如西妥昔单抗或帕尼单抗(包括单药或与化疗联合)治疗^[44]。

k-ras 基因突变检测对判断肿瘤的发生发展、预后以及了解肿瘤的治疗效果具有一定意义: (1)正常人血中检出 *k-ras* 基因异常, 提示存在肿瘤易感性; (2)良性肿瘤患者若检出 *k-ras* 基因突变, 提示有恶变的可能; (3)大量研究表明, *k-ras* 基因突变阳性, 即使病理组织学上淋巴结转移阴性, 癌症复发的可能性也很高; (4) *k-ras* 基因为野生型的结直肠癌患者, 经抗EGFR靶向药物治疗疗效明显。因此, 通过检测 *k-ras* 基因突变状态可以筛选用药人群, 实现肿瘤患者的个体化治疗, 延长患者生存期。

4.2 *k-ras* 基因检测方法学 *k-ras* 基因突变检测最好在肿瘤组织中进行, 需要提供石蜡包埋组织块或已切好的蜡屑或几张挂胶白片或新鲜的手术、活检标本, 外周血多不能反映真实情况。结直肠癌原发灶及转移灶 *k-ras* 基因状态基本相同, 所以可以选择原发灶也可以选择转移灶的标本进行测定^[45]。

ASCO/CAP^[46]对于结直肠癌 *k-ras* 基因突变的检测提出了意见, 建议检测前所有的标本需经有经验的病理医师筛选, 确认有足够的肿瘤细胞, 并且没有坏死及尽可能少的炎性细胞浸润。可视情采用显微切割的方法提取DNA。

k-ras 基因检测的方法很多, 如直接测序法、实时荧光定量PCR、聚合酶链反应-单链构象多态性分析、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、等位基因特异性扩增法(allele specific amplification, ASA)、高分辨率熔解曲线分析法(high resolution melting curve analysis, HRM)、焦磷酸测序方法、变性高效液相色谱法等, 每种方法各有优缺点。

直接测序法是检测基因突变的经典方法, 能检测 *k-ras* 基因第2、3外显子所有可能发生突变的位点, 但与其他检测方法相比, 灵敏度较低^[47], 突变的 *k-ras* 基因占总 *k-ras* 基因比例需达到20%-25%^[48], 此外, 还有成本高, 操作步骤多、易交叉污染等缺点。

HRM是最新兴起的低成本和操作简便的高通量突变扫描和基因分型技术。该技术在PCR

表1 *k-ras*基因突变检测方法灵敏度比较^[53]

方法	灵敏度(%)
直接测序法	25
实时荧光定量PCR	3
PCR-RELP	5
焦磷酸测序	5
ASA	10
HRM	5
蝎形探针扩增阻滞突变系统	1

灵敏度: 能检出突变时, 突变*k-ras*基因占总*k-ras*基因所需的最低比例。

结束后直接运行高分辨率熔解, 通过饱和染料监控核酸的熔解过程, 得到特征的熔解曲线, 再根据熔解曲线的变化来判断核酸性质的差异^[49], 这种检测办法不受突变碱基位点与类型的限制, 灵敏度高达5%^[50], 需设计探针, 成本低, 操作简单, 较传统的突变分析法和定量探针法, 缩短了操作时间, 简化了操作步骤, 大大降低了使用成本, 并且实现了真正的闭管操作, 最大限度地避免了交叉污染, 在临床基因扩增实验室尤为重要。基于这些优势, HRM分析法未来可能会替代直接测序法成为一种常用的实验室检测手段^[50]。

实时荧光定量PCR以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点已成为分子生物学研究中的重要工具。常用于检测最常见的*k-ras*第12、13位密码子的突变。但目前荧光探针价格较昂贵, 且一对探针只能对应检测一种突变类型, 通用性不强, 导致使用成本较高。有文献报道, 将荧光定量PCR与ASA相结合, 即采用实时荧光ASA法对*k-ras*基因进行点突变分析, 可以检测出样品中含量极低的点突变, 其进一步发展有可能用于直接从粪便样品中检测结肠上皮组织所脱落的微量癌细胞, 从而实现结肠癌的早期无损伤检测。此外, 该方法快速、简便、灵敏、安全、高通量、低成本, 可望用于对大量临床样本进行点突变筛查^[51]。

英国DxS公司还生产了一种基于荧光实时定量PCR的*k-ras*检测方法(蝎形探针扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)), 该方法具有较高的特异性和敏感性, 灵敏度高达1%^[52], 在欧洲已被广泛应用于临床检测。ASCO/CAP^[46]亦主要推荐该方法检测*k-ras*基因突变。几种常用的*k-ras*基因突变检测方法

灵敏度的比较见表1。

4.3 免疫组织化学法检测K-ras蛋白 采用免疫组织化学法亦可检测结直肠病变组织中的K-ras蛋白的表达, K-ras阳性产物定位于胞质中。有研究发现, 其表达率在结直肠癌、结直肠腺瘤及正常黏膜组织中分别为51.2%、33.3%和0.0%^[54]。该研究结果提示K-ras蛋白在结直肠癌和结直肠腺瘤中的表达均显著高于正常组织, 但在结直肠癌和结直肠腺瘤之间无明显差异。因此可以认为, 如果从结直肠病变组织中检测到K-ras蛋白则有利于临床的早期诊断。多项研究表明, K-ras蛋白在结直肠癌组织中的高表达与组织类型、浸润深度、Dukes分期、淋巴结转移及远处转移均无相关性^[55,56]。至于K-ras蛋白的检测在结直肠癌预后研究中的意义, 各报道结论仍有争议^[57-59]。这可能与所用抗体克隆不同、检测分析及组织处理方法不同、随访时间不同及随访对象出现选择性偏倚等因素有关。因此K-ras蛋白的检测对结直肠癌患者预后判断仍有待研究。

5 结论

*k-ras*基因突变是结直肠癌发生、发展及预后的不良因素, 同时与靶向治疗疗效密切相关。在结直肠癌患者内科治疗前应常规检测*k-ras*基因状态。在*k-ras*基因检测的整个过程中, 包括肿瘤检测标本的选择, 标本固定及取材规范, 建立规范的实验操作程序和标准化的分子诊断实验室, 统一判读标准以及对检测结果进行正确分析, 病理学家将发挥十分重要的作用^[60]。

6 参考文献

- 1 李学鹏, 周军. 了解大肠癌治疗新进展, 改变大肠癌治疗观念. 中国全科医学 2009; 12: 48-49
- 2 方桦, 王兴元, 王金万, 张弘纲, 冯奉仪, 石远凯. 300例结直肠癌肝转移患者的临床预后分析. 中华肿瘤杂志 2009; 31: 220-222
- 3 刘云鹏. 2008年转移性结直肠癌个体化治疗进展回顾. 中国癌症杂志 2009; 19: 406-408
- 4 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010; 60: 277-300
- 5 曹文兰, 布洁, 白月奎, 周良玉, 张文政, 武东风, 卫亚希. IV期结直肠癌非手术治疗临床研究. 肿瘤研究与临床 2003; 15: 412-413
- 6 Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Pérez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD, Philips MR. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. Mol Cell 2006; 21: 481-493
- 7 Margaret P. Quinlan, Jeffrey Settleman. 癌症启动中Kras的特异性功能. 癌症 2008; 27: 673-674
- 8 沈琳. 转移性结直肠癌靶向治疗个体化选择. 肿瘤研

■创新盘点

本文全面综述了结直肠癌组织中*k-ras*基因或蛋白的表达状况, 检测方法学及其应用, 结直肠癌靶向治疗等最新进展, 使读者对结直肠癌*k-ras*基因研究现状有全面的认识。

■应用要点

- 结直肠癌患者中存在一定比例的 *k-ras* 基因突变, 在应用抗 EGFR 单抗类药物进行靶向治疗前, 均应常规检测 *k-ras* 基因状态。
- 9 究与临床 2008; 20: 507-508, 512
 - 10 单宝珍, 刘丽娜. K-ras 基因与结直肠癌关系研究进展. 医学与哲学(临床决策论坛版) 2010; 31: 42-44
 - 11 丁叔波, 朱远. Kras 基因与结直肠癌. 浙江临床医学 2009; 11: 1233-1235
 - 12 Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358: 1160-1174
 - 13 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
 - 14 梁后杰, 邹岚. EGFR 靶向药物治疗晚期结直肠癌最新进展. 中国处方药 2009; 84: 58-61
 - 15 Fukuyama T, Ogita H, Takai Y. [Small G proteins--their roles and functions on cell-cell junction]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2005; 42: 9-14
 - 16 Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 1993; 73: 611-620
 - 17 Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruijne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003; 24: 703-710
 - 18 Däbritz J, Hänfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes. *Br J Cancer* 2005; 92: 405-412
 - 19 Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 295-308
 - 20 Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-1664
 - 21 Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2040-2048
 - 22 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lövig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urošević N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696
 - 23 Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007; 67: 2643-2648
 - 24 陈慧娟, 李洪波, 李硕敏, 鲁碧稳, 程俊峰, 刘元力. K-ras 基因突变与结直肠癌的关系. 肿瘤研究与临床 2010; 22: 461-463
 - 25 Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-1145
 - 26 Sameer AS, Chowdhri NA, Abdullah S, Shah ZA, Siddiqi MA. Mutation pattern of K-ras gene in colorectal cancer patients of Kashmir: a report. *Indian J Cancer* 2009; 46: 219-225
 - 27 Brink M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Roemen GM, Lentjes MH, de Bruijne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Meat consumption and K-ras mutations in sporadic colon and rectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Br J Cancer* 2005; 92: 1310-1320
 - 28 Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germà JR, Herman JG, Capellà G, Peinado MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 299-304
 - 29 Wang JY, Hsieh JS, Chen FM, Yeh CS, Alexandersen K, Huang TJ, Chen D, Lin SR. High frequency of activated K-ras codon 15 mutant in colorectal carcinomas from Taiwanese patients. *Int J Cancer* 2003; 107: 387-393
 - 30 Yen LC, Uen YH, Wu DC, Lu CY, Yu FJ, Wu IC, Lin SR, Wang JY. Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann Surg* 2010; 251: 254-260
 - 31 Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-379
 - 32 Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, François E, Formento P, Renée N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Seitz JF, Milano G. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4830-4835
 - 33 Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4217-4219
 - 34 Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related

- metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008; 13: 1270-1275
- 34 Wadler S, Bajaj R, Neuberg D, Agarwal V, Haynes H, Benson AB 3rd. Prognostic implications of c-Ki-ras2 mutations in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and interferon: a study of the eastern cooperative oncology group (EST 2292). *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 284-288
 - 35 Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL Jr. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58: 1149-1158
 - 36 Gnanasampanthan G, Elsaleh H, McCaul K, Iacopetta B. Ki-ras mutation type and the survival benefit from adjuvant chemotherapy in Dukes' C colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 543-548
 - 37 Markowitz S, Hines JD, Lutterbaugh J, Myeroff L, Mackay W, Gordon N, Rustum Y, Luna E, Kleinerman J. Mutant K-ras oncogenes in colon cancers Do not predict Patient's chemotherapy response or survival. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 441-445
 - 38 白春梅, 黄凌. 西妥昔单抗治疗进展性结直肠癌的疗效与KRAS基因突变状态的关系. *循证医学* 2009; 9: 145-149
 - 39 Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, Middleton G, Kröning H, Luppi G, Kisker O, Zube A, Langer C, Kopit J, Burris HA 3rd. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2311-2319
 - 40 Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Duceux M, Hotko Y, André T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner KS, Rong A, Gansert J. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4706-4713
 - 41 Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Topham C, Tabernero J, André T, Sobrero AF, Mini E, Greil R, Di Costanzo F, Collette L, Cisar L, Zhang X, Khayat D, Bokemeyer C, Roth AD, Cunningham D. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3117-3125
 - 42 De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008; 19: 508-515
 - 43 杨林. 大肠癌诊治指南解读(晚期结、直肠癌治疗部分). *中国全科医学* 2009; 11: 8-9
 - 44 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634
 - 45 毕媛. K-RAS基因突变检测与大肠癌治疗的研究进展. *实用癌症杂志* 2010; 25: 435-437
 - 46 Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2091-2096
 - 47 Patil DT, Fraser CR, Plesec TP. KRAS testing and its importance in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 2010; 12: 160-167
 - 48 Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7: 413-421
 - 49 黄好, 黄国庆. 高分辨率熔解-SNP及突变研究的最新工具. *生命的化学* 2007; 27: 573-576
 - 50 傅新晖, 邓艳红, 范新娟, 骆衍新, 陈典克, 王磊, 兰平, 刘焕亮, 汪建平. 利用高分辨率熔解曲线分析法检测结直肠癌中KRAS基因突变. *中华普通外科学文献(电子版)* 2009; 3: 14-16
 - 51 朱德斌, 邢达, 李贤, 张岚. 实时荧光等位基因特异性扩增法快速检测K-ras癌基因点突变. *高等学校化学学报* 2007; 28: 1031-1034
 - 52 Bando H, Tsuchihara K, Yoshino T, Kojima M, Ogasawara N, Fukushima H, Ochiai A, Ohtsu A, Esumi H. Biased Discordance of KRAS Mutation Detection in Archived Colorectal Cancer Specimens Between the ARMS-Scorpion Method and Direct Sequencing. *Jpn J Clin Oncol* 2010 Nov 26. [Epub ahead of print]
 - 53 Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC, Chang JG. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 179
 - 54 李陈捷, 羊志辉, 陈森林, 周世权, 莫晔, 施小六. HER-2与K-RAS在结直肠癌中的表达及意义. *解放军医学杂志* 2007; 32: 598-600
 - 55 朱桂宝, 姚璇, 鲁翠荣, 聂绍发. 大肠癌组织P21蛋白的表达研究. *华中科技大学学报(医学版)* 2002; 31: 505
 - 56 González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27: 39-45
 - 57 Pan ZZ, Wan DS, Chen G, Li LR, Lu ZH, Huang BJ. Co-mutation of p53, K-ras genes and accumulation of p53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3688-3690
 - 58 Pajkos G, Kiss I, Sándor J, Ember I, Kisházi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1695-1701
 - 59 Hirvikoski P, Auvinen A, Servomaa K, Kiuru A, Rytömaa T, Makkonen K, Kosma VM. K-ras and p53 mutations and overexpressions as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 685-691
 - 60 梁智勇. 病理医师在消化道肿瘤靶向治疗中的作用. *中华病理学杂志* 2010; 39: 433-435

同行评价

本文内容全面, 具有较好的可读性和科学性。

复方中药安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠模型TFF mRNA表达的影响

林寿宁, 韦 维, 黄贵华, 朱永苹, 刘伟峰, 万小刚, 朱光辉, 张 倩

■背景资料

慢性萎缩性胃炎(CAG)是常见消化病,与胃癌的发生有着密切的关系,尤其是胃窦萎缩性胃炎与肠型胃癌的关系较为肯定,世界卫生组织已将CAG定为胃癌前状态。因此对CAG防治具有重要的意义。中药治疗可拓宽慢性胃炎的治疗途径,进一步探讨中医药对CAG防治作用具有重要的意义。

林寿宁, 朱永苹, 刘伟峰, 万小刚, 朱光辉, 张倩, 广西中医学院瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011
韦维, 广西中医学院 广西壮族自治区南宁市 530001
黄贵华, 广西中医学院一附院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530022
国家科技支撑计划(十一五)项目子课题基金资助项目, No. 2007BAIO7A17-02
广西自然科学基金资助项目, No. 桂科自0728187
作者贡献分布: 林寿宁、韦维及黄贵华对此文所作贡献均等; 此课题由林寿宁、韦维及黄贵华设计; 研究过程由韦维、朱永苹、万小刚、刘伟峰、朱光辉及张倩操作完成; 研究所用分析工具由林寿宁提供; 数据分析由林寿宁与韦维完成; 本论文写作由韦维、林寿宁及黄贵华完成。
通讯作者: 韦维, 副教授, 医学博士, 530011, 广西壮族自治区南宁市明秀东路179号, 广西中医学院, 511855223@qq.com
电话: 0771-3111493
收稿日期: 2010-10-23 修回日期: 2010-11-29
接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-08

Effect of treatment with Anwei Decoction on TFF mRNA expression in rats with chronic atrophic gastritis

Shou-Ning Lin, Wei Wei, Gui-Hua Huang,
Yong-Ping Zhu, Wei-Feng Liu, Xiao-Gang Wan,
Guang-Hui Zhu, Qian Zhang

Shou-Ning Lin, Yong-Ping Zhu, Wei-Feng Liu, Xiao-Gang Wan, Guang-Hui Zhu, Qian Zhang, Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wei Wei, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gui-Hua Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-year Plan Period, No. 2007BAIO7A17-02; and the Natural Science Foundation of Guangxi, No. Gui Ke Zi 0728187

Correspondence to: Associate Professor Wei Wei, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 511855223@qq.com

Received: 2010-10-23 Revised: 2010-11-29

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-08

■同行评议者

牛英才, 副研究员, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所

Abstract

AIM: To investigate the effect of treatment with Anwei Decoction (AD) on the expression of

trefoil factor (TFF) mRNAs in rats with chronic atrophic gastritis (CAG).

METHODS: Forty eight healthy rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, pathologic model group, Anwei Decoction group, and Weifuchun group. CAG was induced in rats with N-methyl-N-nitro-N-nitroguanidine (MNNG). The expression of TFF mRNAs in rat gastric mucosa was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS: Compared with the normal control group, the expression of TFF1 mRNA was significantly enhanced in the pathologic model group, Anwei Decoction and Weifuchun groups (0.53 ± 0.10 , 0.86 ± 0.13 , 0.83 ± 0.10 vs 0.39 ± 0.14 ; all $P < 0.05$). The expression level of TFF1 mRNA was significantly higher in the Anwei Decoction group than in the Weifuchun group ($P < 0.01$). Compared with the pathologic model group, the expression of TFF2 mRNA was also significantly enhanced in Anwei Decoction and Weifuchun groups (0.90 ± 0.06 , 0.72 ± 0.10 vs 0.35 ± 0.06 , both $P < 0.05$). The expression level of TFF2 mRNA was significantly higher in the Anwei Decoction group than in the Weifuchun group ($P < 0.05$). In contrast, compared with the pathologic model group, the expression of TFF3 mRNA was remarkably reduced in the normal control group, Anwei Decoction and Weifuchun groups (0.25 ± 0.10 , 0.43 ± 0.04 , 0.64 ± 0.04 vs 0.95 ± 0.23 , all $P < 0.05$). The expression level of TFF3 mRNA was significantly lower in the Anwei Decoction group than in the Weifuchun group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Anwei Decoction exerts a therapeutic effect against CAG possibly by enhancing the expression of TFF1 and TFF2mRNAs and reducing the expression of TFF3 mRNA in gastric mucosa.

Key Words: Anwei Decoction; Chronic atrophic gastritis; Trefoil factor family

Lin SN, Wei W, Huang GH, Zhu YP, Liu WF, Wan XG,

Zhu GH, Zhang Q. Effect of treatment with Anwei Decoction on TFF mRNA expression in rats with chronic atrophic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 68-73

摘要

目的: 探讨复方中药安胃汤对实验性慢性萎缩性胃炎大鼠模型的TFF mRNA表达的影响。

方法: 采用甲基硝基亚硝基胍(MNNG)慢性萎缩性胃炎大鼠模型, 48只清洁级健康♂Wistar大鼠随机分为空白组、病理模型组、复方中药安胃汤组、胃复春对照组共3组。实时荧光定量PCR方法观察复方中药安胃汤对实验性慢性萎缩性胃炎大鼠模型胃黏膜TFF1、TFF2、TFF3 mRNA表达的影响, 对后者进行图像分析及统计学处理。

结果: 与空白组相比, 病理模型组、复方中药安胃汤组和胃复春对照组TFF1 mRNA/ β -actin值均显著提高(A值: 0.53 ± 0.10 , 0.86 ± 0.13 , 0.83 ± 0.10 vs 0.39 ± 0.14 , 均 $P < 0.01$), 复方中药安胃汤组高于胃复春对照组($P < 0.01$)。与病理模型组相比, 复方中药安胃汤组和胃复春对照组TFF2 mRNA/ β -actin值均显著提高(A值: 0.90 ± 0.06 , 0.72 ± 0.10 vs 0.35 ± 0.06 , 均 $P < 0.01$), 复方中药安胃汤组高于胃复春对照组($P < 0.05$)。与病理模型组相比, 空白组、复方中药安胃汤组和胃复春对照组TFF3 mRNA/ β -actin值均显著降低(A值: 0.25 ± 0.10 , 0.43 ± 0.04 , 0.64 ± 0.04 vs 0.95 ± 0.23 , 均 $P < 0.01$), 复方中药安胃汤组低于胃复春对照组($P < 0.05$)。

结论: 复方中药安胃汤可能通过增加胃黏膜TFF1、TFF2 mRNA表达, 降低胃黏膜TFF3 mRNA表达而起到治疗慢性萎缩性胃炎作用。

关键词: 安胃汤; 慢性萎缩性胃炎; 三叶肽家族

林寿宁, 韦维, 黄贵华, 朱永苹, 刘伟峰, 万小刚, 朱光辉, 张倩. 复方中药安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠模型TFF mRNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 68-73
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/68.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是常见消化病, 与胃癌的发生密切相关, 尤其是胃窦萎缩性胃炎与肠型胃癌的关系较为肯定, 世界卫生组织已将CAG定为胃癌前状态, 因此对CAG的防治具有重要的意义。中药治疗可拓宽慢性胃炎的治疗途径^[1]。三叶肽家族(trefoil

factor family, TFF)是由胃肠道黏液分泌上皮合成和分泌的一组具有特定三叶结构域的小分子多肽, 在哺乳动物中包括3个因子: 乳腺癌相关肽(TFF1/PS2)、解痉多肽(TFF2/SP)和肠三叶因子(TFF3/ITF)。TFF具有很强的促进细胞增殖与移行的能力, 可促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度^[2]。复方中药安胃汤出自全国著名中医林沛湘教授治疗CAG的经验方, 临床上疗效显著^[3], 但其作用机制尚未完全阐明, 我们通过动物实验观察其对胃黏膜TFF mRNA表达的影响, 探讨其防治CAG的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康Wistar大鼠, ♂, 体质量140-170 g, 由广西食品药品检验所实验动物中心提供(动物合格证号SCXX桂2003-0001)。复方中药安胃汤为免煎中药颗粒, 主要成分: 半夏、黄连、干姜、乌药、丹参、百合、白芍、薏苡仁、炙甘草, 其构成比为13:5:5:7:15:20:20:10:5。TRIzol试剂购自Invitrogen公司; Taq酶、Rnasin、MMLV RT反转录酶购自Promega公司; SYBR Green购自美国ABI公司; DNA Marker购自广州东盛生物科技有限公司; N-甲基-N, -硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)为美国Fluka公司产品; Oligo dT序列, 引物序列由恒博和泰生物科技(北京)有限公司合成。Oligo dT序列: 5'-TTTTG-TACAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; β -actin(263 bp): 上游5'-GAGACCTTCAA-CACCCCAGCC-3', 下游5'-AATGTCACGCAC-GATTTCCC-3'; TFF1(169 bp)上游: 5'-CTG-GTCATTGAGAACCAGCAAGAA-3'; TFF1下游: 5'-TGTCACCAGGCCAGATCCAG-3'; TFF2(109 bp)上游: 5'-GCTTTAATCTTGAT-GCTGCTTTGA-3'; TFF2下游: 5'-CGGGCT-GACACTTCCATGAC-3'; TFF3(221 bp)上游: 5'-ATGGAGACCAGAGCCTTCTGGAC-3'. TFF3下游: 5'-AGAGGTTTGAAGCACCAGGGC-3'。7000型实时荧光定量PCR系统购自美国ABI公司; DU2640型紫外分光光度计购自Beckman公司; 3K220型低温高速离心机购自Sigma公司; DF2C型恒压恒流电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 48只实验大鼠随机分为4组($n = 12$): 空白组、病理模型组、安胃汤组和胃复春对照组, 参照文献[4]造模。空白组不作任何处

■ 相关报道

石淑青等观察到TFF1、TFF2的表达在慢性浅表性胃炎、胃溃疡、慢性萎缩性胃炎和胃癌4种病变中呈逐渐减弱趋势, 认为TFF1、TFF2可能是一种胃肿瘤抑制因子, 其表达减少也许是胃黏膜恶化的一个早期事件。

■创新盘点

本研究运用实时定量PCR方法观察在体动物CAG模型胃黏膜TFF1、TFF2、TFF3 mRNA的表达,探讨复方中药安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制,为抗慢性萎缩性胃炎中医药研究积累可以借鉴的研究思路与方法,同时从基因水平上阐释名老中医学术理论的科学性,为更好的研究和继承提供新的思路。

理,普通饲料饲养,其余3组均自由饮用170 mg/L的MNNG液,造模期间不再给予其他饮水,共8 wk,均普通饲料饲养。8 wk末,各组随机抽取2只大鼠处死,取胃,行病理检查,判断模型成功与否。造模成功后从第9周开始:病理模型组4 mL/d纯净水灌胃;安胃汤组按10 mL/kg体重质量取复方中药安胃汤混悬液(2.5 kg/L)灌胃;胃复春对照组取胃复春0.29 g配成液4 mL悬浊液灌胃,每天1次,至第12周结束。

1.2.2 光镜标本处理:动物处死后,取全胃,沿胃大弯剪开,取胃窦和胃体部。40 g/L多聚甲醛浸润固定12 h以上,冲水24 h,50%、75%、95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡后,石蜡包埋。切片厚5 μ m,常规苏木精-伊红染色病理学检查。

1.2.3 胃组织和RNA提取:各组于用药治疗4 wk后,禁食12 h,将大鼠用1%乌拉坦液,按体质量10 mL/kg麻醉,剖腹取胃,沿胃大弯剪开,并向胃窦近幽门口至胃大弯方向取1.0 cm \times 1.0 cm \times 0.5 cm胃黏膜组织,放入0.1% DEPC水处理过的冻存管中,并迅速加入1 mL TRIzol溶液。封口膜封口后,放入液氮中保存。

1.2.4 提取总RNA及反转录反应:TRIzol一步法提取总RNA。紫外-分光光度计测定所提取RNA浓度。反转录反应体系:总RNA 2 μ g, Oligo dT(0.5 kg/L)2 μ L, dNTP(10 mol/L)3 μ L, DTT(0.1 μ mol/L)2 μ L, Rnase inhibitor(40 U/ μ L)1 μ L, MMLV-RT(200 U/ μ L)1 μ L, 5 \times MMLV-RT Buffer 6 μ L, 加入DEPC处理过的无菌水至30 μ L;反应条件:45 $^{\circ}$ C反应1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min终止反应。

1.2.5 Real-time PCR反应:20 μ L的PCR反应体系含:10 μ L的2 \times SYBR Green PCR Master Mix, 5.4 μ L的RNase Free Water, 上、下游引物(0.05 g/L)各1.8 μ L和1 μ L的cDNA。反应条件:预变性, 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性, 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火, 58 $^{\circ}$ C, 30 s, 延伸, 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 共进行40个循环的扩增, 72 $^{\circ}$ C后延伸5 min。实验中同步进行内参基因 β -actin的定量检测,以目的基因与内参基因相对浓度比作为目的基因的相对表达量。扩增反应在ABI7000荧光定量PCR仪上进行,各样品的荧光信号值由荧光定量PCR仪的支持软件ABI Prism7000SDS software实时产生并自动计算定量数值。

统计学处理 各样品目标基因的相对表达水平通过内参基因进行校准后用mean \pm SD表示,用SPSS13.0 for Windows统计软件包对数据进行统计,采用单因素方差分析,进行SNK两两比较。

2 结果

2.1 大鼠胃组织观察 空白组胃黏膜呈粉红色,表面光滑有光泽,被覆较多黏液,皱襞面光滑,走向规则,胃壁弹性良好;病理模型组黏膜薄弱,色泽灰白,表面黏液少,皱襞低平、稀少甚至消失,走向紊乱,胃壁弹性减低,安胃汤组及胃复春组部分胃黏膜基本恢复正常,以安胃汤组为明显。

2.2 光学显微镜观察 空白组:胃黏膜厚,各层结构正常,胃黏膜上皮细胞排列整齐,固有腺体形状规则,排列整齐,未见萎缩、脱落或缺损,可见少许嗜酸性粒细胞(图1A)。病理模型组:胃黏膜全层明显变薄、局灶上脱落、糜烂,黏膜固有腺体数量明显减少、排列稀疏紊乱,腺体体积缩小,个别呈囊状扩张,黏膜固有层淋巴细胞浸润、部分有淋巴滤泡形成(图1B)。安胃汤组:黏膜各层结构基本正常,黏膜固有腺体丰富排列较规则,无明显数量减少,固有层见少许炎细胞浸润(图1C)。胃复春组:胃黏膜上皮稍变薄,黏膜上皮排列整齐,未见明显缺损,固有腺体排列稍紊乱,部分腺体体积缩小,个别扩张,固有层内见淋巴细胞浸润(图1D)。说明安胃汤与胃复春均能改善胃黏膜的病理形态,但以安胃汤效果为佳。

2.3 总RNA的浓度测定 紫外-分光光度计检测总RNA显示, A_{260}/A_{280} 值为1.7-1.9,总RNA的浓度符合实验要求。

2.4 标准曲线绘制 实验中,目的基因和内参基因的标准曲线均由荧光定量PCR仪附带软件绘制,其中TFF1、TFF2和TFF3 mRNA的相关系数分别为 $r = 0.978$ 、 0.988 和 0.989 ,线性关系良好,保证扩增结果的准确性。

2.5 复方中药安胃汤对CAG模型大鼠胃黏膜内TFF1、TFF2、TFF3 mRNA的表达的影响 荧光定量扩增曲线光滑,说明扩增反应呈指数扩增;样本从各组扩增产物中随机选取,1.5%琼脂糖凝胶电泳观察PCR扩增结果,各产物特异性条带明亮可见,扩增片段符合设计片段长度(图2);荧光定量PCR结果显示,与病理模型组相比,安胃汤组和胃复春组TFF1、TFF2 mRNA表达显著增加($P < 0.01$),复方中药安胃汤组高于胃复春组($P < 0.01$ 或 0.05),具有统计学意义。与病理模型组相比,安胃汤组和胃复春组TFF3 mRNA表达均显著降低($P < 0.01$),安胃汤组低于胃复春组($P < 0.05$,表1)。

3 讨论

CAG与中医的“痞满”、“胃脘痛”、“嘈

■应用要点
本研究验证全国名老中医的验方, 可进一步整理提高, 有利于继承与发展名老中医的学术理论。同时为安胃汤开发成治疗慢性萎缩性胃炎的中药新药提供理论和基础实验依据, 为研究高水准的中药新药提供基础研究。

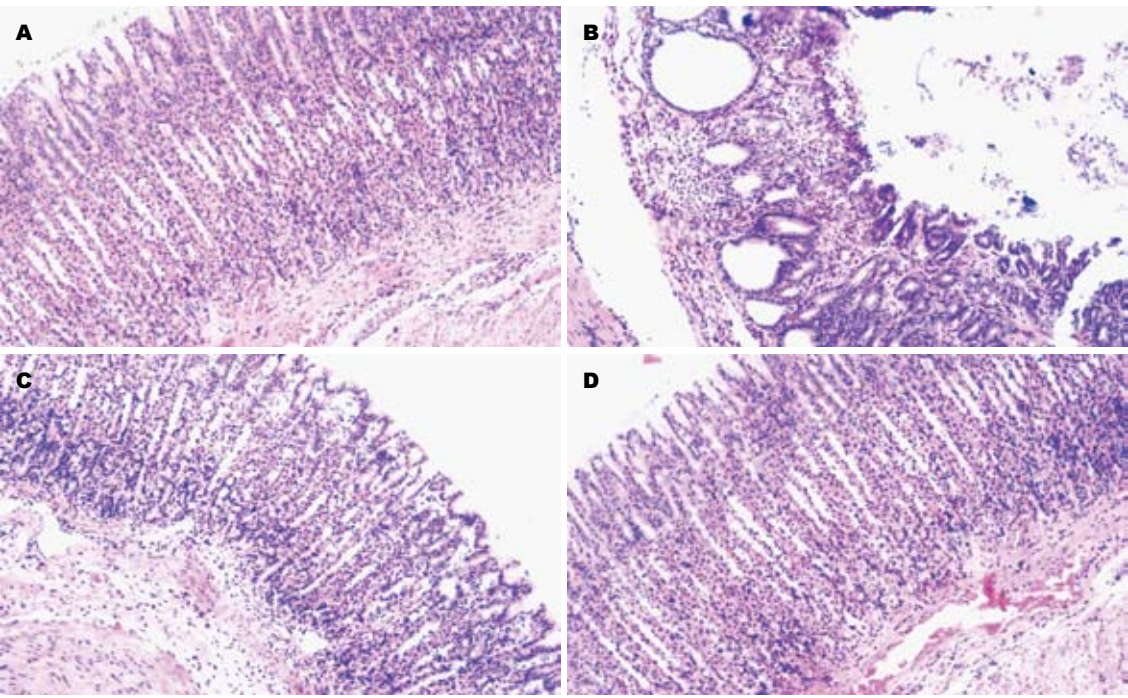


图 1 胃黏膜光学显微镜观(H&E × 10). A: 空白组; B: 病理模型组; C: 安胃汤组; D: 胃复春组.

表 1 各组大鼠胃黏膜TFF1、TFF2及TFF3 mRNA表达 (n = 10, 4值, mean ± SD)			
分组	TFF1 mRNA/β-actin	TFF2 mRNA/β-actin	TFF3 mRNA/β-actin
空白组	0.39 ± 0.14	0.38 ± 0.14	0.25 ± 0.10
病理模型组	0.53 ± 0.10 ^a	0.35 ± 0.06 ^a	0.95 ± 0.23 ^a
安胃汤组	0.86 ± 0.13 ^{ad}	0.90 ± 0.06 ^{ad}	0.43 ± 0.04 ^{ad}
胃复春组	0.83 ± 0.10 ^{adf}	0.72 ± 0.10 ^{ade}	0.64 ± 0.04 ^{ade}

^aP<0.05 vs 空白组; ^dP<0.01 vs 病理模型组; ^eP<0.05, ^fP<0.01 vs 安胃汤组.

杂”等病症的症状表现非常类似。其病机以脾胃虚弱、胃失和降为主, 气虚、阴虚及湿郁或湿热、血瘀并见, 临床多表现为虚实相兼, 寒热错杂。病变脏腑涉及脾胃肝。复方中药安胃汤, 是在全国名老中医、广西中医学院林沛湘教授治疗慢性胃病验方基础上组方而成^[3]。方中黄连泻火解毒; 干姜温中逐寒, 寒热同施, 辛开苦降; 半夏入胃, 更能和胃降逆, 燥湿开结, 通降气机; 百合味甘而性凉, 能清泻胃腑之邪热, 养护胃气; 乌药顺气开郁, 散寒止痛, 配合百合, 则养津护胃而无滋腻之虑, 行气散寒而无温燥之虞; 白芍、炙甘草酸甘化阴以生津液, 柔肝缓急而止疼痛; 丹参、木香行气滞而化血瘀。黄连、干姜, 寒热并用; 辛开苦降, 和半夏入胃, 能和胃降逆, 燥湿开结, 通降气机为君, 师法仲景《伤寒论》半夏泻心汤之辛开苦降之义; 百合、乌药养津护胃, 行气散寒为臣; 白芍、炙甘草酸甘化阴以生津液, 柔肝缓急而止疼痛为佐; 丹参、

木香行气滞而化血瘀为使。本组方严谨, 寒热并用, 活血行气, 畅通气机, 疗效独特, 并在临床上有显著疗效。胃复春片能够健脾益气、活血解毒, 主治胃癌的前期病变, 是经药品监督部门批准的、治疗胃癌前期病变的国家中药保护品种, 该药效果稳定, 主要由菱角、三七、枳壳及健脾益气类等药物组成, 具有改善病变部位血液循环、消除炎症、促进胃黏膜再生的作用^[5]。
本研究结果显示, 实验性CAG模型大鼠经安胃汤和胃复春治疗后, 胃黏膜变薄、黏膜固有腺体数量明显减少、腺体体积缩小等病理形态有明显改善, 安胃汤组治疗后大鼠胃黏膜各层结构基本正常, 黏膜固有腺体丰富排列较规则, 无明显数量减少, 固有层见少许炎细胞浸润。胃复春组治疗后大鼠胃黏膜上皮稍变薄, 黏膜上皮排列整齐, 未见明显缺损, 固有腺体排列稍紊乱, 部分腺体体积缩小, 个别扩张, 固有层可内见淋巴细胞浸润。说明安胃汤与胃复春均能

■同行评价

本文实验设计合理,具有一定的科学价值和研究意义。

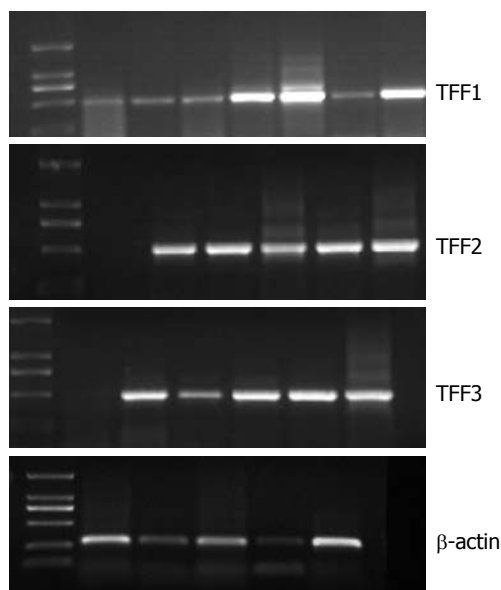


图2 TFF1, TFF2, TFF3 PCR扩增产物电泳图。

改善胃黏膜的病理形态,但以安胃汤效果为佳。

TFF是由胃肠道黏液分泌上皮合成和分泌的一组具有特定三叶结构域的小分子多肽,在哺乳动物中包括3个因子:乳腺癌相关肽(TFF1/PS2)、解痉多肽(TFF2/SP)和肠三叶因子(TFF3/ITF)。TFF具有很强的促进细胞增殖与移行的能力,可促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度^[2]。除保护作用外,一系列的实验已证明三叶肽也参与了损伤组织的上皮重建过程,即可能增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向损伤黏膜表面迁移覆盖,促进损伤黏膜的修复^[6]。TFF2对胃肠道有两个重要功能即上皮保护和促进黏膜愈合。他可以看作黏膜损伤的快速反应肽,在黏膜修复的早期阶段上调表达。国外有人发现^[7,8],在人胃黏膜从肠化、不典型增生到胃癌的病理变化过程中,TFF1的表达逐步降低。体外实验显示^[9],下调和恢复胃癌细胞的TFF2蛋白表达不影响胃癌细胞癌性,TFF2蛋白表达的丢失可能是胃癌形成过程中的早期事件,TFF2并对正常胃黏膜起到一定的保护作用。石淑青等^[10]观察到TFF1、TFF2的表达在慢性浅表性胃炎、胃溃疡、CAG和胃癌4种病变中呈逐渐减弱趋势,认为TFF1、TFF2可能是一种胃肿瘤抑制因子,其表达减少也许是胃黏膜恶化中的一个早期事件。莫耘松等^[11]发现在胃黏膜病变过程中浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠腺化生→异型增生→胃癌的TFF1表达逐渐减弱。研究发现^[12]TFF2预防胃黏膜损伤,但不抑制酸分泌及运动功能,三叶肽保护胃黏膜作用不是通过

抑制胃酸分泌或抑制运动功能而起保护作用的,但是TFF2刺激细胞移行。三叶肽与EGFR相互之间的关系在黏膜修复中起重要作用,其中有MAP蛋白激酶信号传导途径的参与^[13]。周学文等^[14]报道TFF2具有保护胃黏膜免受致病因素攻击的作用。本研究结果表明,安胃汤组和胃复春组与病理模型组相比,均显著提高TFF1、TFF2 mRNA/ β -actin相对表达量比值($P<0.01$),安胃汤组高于胃复春组($P<0.01$ 或 0.05)。

TFF3参与损伤黏膜的再生和修复,对胃肠黏膜起保护作用,胃黏膜的损伤越严重,TFF3的表达越明显。其机制在于TFF3能加速胃肠上皮愈合,TFF3通过与黏液糖蛋白的相互作用或交联,形成黏弹性的黏液凝胶层,阻止胃蛋白酶以及机械应力改变等因素造成的胃黏膜损伤,从而增强胃肠道黏膜防御屏障的保护能力^[15]。一旦修复完成,基底侧受体不再接触三叶肽,细胞移走停止。TFF3在胃肠黏膜的早期再生修复中扮演着重要的角色。国外研究显示在胃黏膜发生肠化、不典型增生到胃癌的发生过程中表达逐步增高^[7],国内^[16]研究结果也显示,TFF3表达随着浅表性胃炎、萎缩性胃炎、不典型增生而逐渐升高,胃癌TFF3表达反而低于萎缩性胃炎、不典型增生,3组之间差异不显著,却显著高于正常组和浅表性胃炎。黄亚平等^[17]亦有同样的报道。本研究结果表明,荧光定量PCR结果显示,与病理模型组相比,安胃汤治疗组、胃复春组TFF3 mRNA水平显著降低($P<0.01$),安胃汤大剂量组低于胃复春组($P<0.05$)。

总之,我们认为安胃汤可能一方面通过提高胃黏膜TFF1 mRNA表达,促进细胞增殖与移行的能力,促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度,另一方面通过提高CAG胃黏膜TFF2的表达,形成黏弹性的黏液凝胶层,从而增强胃肠道黏膜防御屏障的保护能力,达到防治CAG的目的。根据TFF3对胃黏膜的保护作用机制,我们推测安胃汤在治疗CAG的过程中,TFF3是过度表达的。随着疾病好转,TFF3表达也随之下降。TFF3此过程中起到了参与损伤黏膜的再生和修复的作用。至于在安胃汤治疗CAG的过程中TFF1、TFF2、TFF3之间的相互关系,有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(上)(2006,上海). 中华消化杂志 2007; 27: 45-49
- 2 de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner

- RD, Gnarr JR, Pause A, Lee S. Role of transforming growth factor- α in von Hippel-Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1387-1392
- 3 林寿宁. 中国百年百名中医临床丛书-林沛湘. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 99-117
- 4 王四旺, 施新猷, 黄传贵, 谢艳华. 中药药效学研究及评价. 第1版. 西安: 陕西科学技术出版社, 2001: 315-317
- 5 徐维维, 王闰全. 胃复春片治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察. 浙江中西医结合杂志 2003; 13: 505-506
- 6 Poulsen SS, Kissow H, Hare K, Hartmann B, Thim L. Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul Pept* 2005; 126: 163-171
- 7 Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-588
- 8 Suárez C, Vizoso F, Rodríguez JC, García I, Raigoso P, Allende MT, García-Muñoz JL, García-Morán M. Prognostic significance of cytosolic pS2 protein content in gastric cancer. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 37-44
- 9 Jung KH, Kim PJ, Kim JK, Noh JH, Bae HJ, Eun JW, Xie HJ, Shan JM, Ping WY, Park WS, Lee JY, Nam SW. Decreased expression of TFF2 and gastric carcinogenesis. *Mol Cell Toxicol* 2010; 6: 261-269
- 10 石淑青, 蔡建庭. 三叶因子 I 和 II 在胃癌和癌前状态中的表达. 中华内科杂志 2004; 43: 195-198
- 11 莫耘松, 张桂珍, 徐利军, 杨巧仙, 吕君. 胃粘膜病变组织环氧合酶-2和三叶因子1的表达及HP感染对其表达的影响. 江西医药 2007; 42: 405-407
- 12 McKenzie C, Marchbank T, Playford RJ, Otto W, Thim L, Parsons ME. Pancreatic spasmolytic polypeptide protects the gastric mucosa but does not inhibit acid secretion or motility. *Am J Physiol* 1997; 273: G112-G117
- 13 Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 1999; 103: R31-R38
- 14 周学文, 周天羽, 才丽萍, 林庶如, 张贵元, 周奇. 三叶因子2在胃黏膜病变中的表达. 中国中西医结合消化杂志 2010; 18: 95-98
- 15 Ogata H, Podolsky DK. Trefoil peptide expression and secretion is regulated by neuropeptides and acetylcholine. *Am J Physiol* 1997; 273: G348-G354
- 16 唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨. 胃黏膜病变过程中TFF3、survivin、CD147、CD34表达及其相关性. 山西医科大学学报 2009; 40: 202-206
- 17 黄亚平, 雷琳, 朱庆茹. 胃癌及癌前病变组织三叶因子3表达的相关性研究. 内科 2009; 4: 854-856

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2011-01-08)

JAM-C单抗对小鼠急性坏死性胰腺炎的抑制作用

胡端敏, 杨勇, 唐文

■背景资料

急性坏死性胰腺炎(ANP)时, 胰腺组织大量渗出的白细胞引发并加剧了胰腺的炎症和坏死, 而白细胞与内皮细胞的相互作用则是导致白细胞募集的中心环节, 各种黏附分子在这一环节中起着关键作用。

胡端敏, 杨勇, 唐文, 苏州大学第二附属医院消化科 江苏省苏州市 215004

苏州大学医学发展基金资助项目, No. EE123715

作者贡献分布: 唐文与胡端敏对此文所作贡献均等; 此课题由唐文设计; 研究过程和数据分析由胡端敏与杨勇完成; 本论文写作由唐文与胡端敏完成。

通讯作者: 唐文, 主任医师, 214004, 江苏省苏州市三香路1055号, 苏州大学第二附属医院消化科。

louisetangwen@yahoo.com.cn

电话: 0512-67784805 传真: 0512-68284303

收稿日期: 2010-10-25 修回日期: 2010-11-26

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-08

Treatment with anti-JAM-C mAb attenuates pancreatic and systemic inflammation in mice with acute necrotizing pancreatitis

Duan-Min Hu, Yong Yang, Wen Tang

Duan-Min Hu, Yong Yang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Supported by: the Medical Development Foundation of Soochow University, No EE123715

Correspondence to: Wen Tang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, 1055 Sanxiang Road, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. louisetangwen@yahoo.com.cn

Received: 2010-10-25 Revised: 2010-11-26

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate whether anti-JAM-C mAb exerts a protective effect against pancreatic and systemic inflammation in mice with acute necrotizing pancreatitis (ANP).

METHODS: A mouse model of ANP was induced by intraperitoneal injection of cerulein and lipopolysaccharide. ANP mice were divided into three groups: mice undergoing an intraperitoneal injection of anti-JAM-C mAb (anti-JAM-C mAb group), ANP group and those receiving normal saline (NS group). Blood samples were taken to determine serum amylase and TNF- α concentrations, and pancreatic samples were collected for morphological study and histological scoring.

RESULTS: Compared to the ANP group,

treatment with anti-JAM-C mAb significantly reduced the severity of pancreatic injury, including edema (1.9 ± 0.1 vs 2.4 ± 0.3 , $P < 0.05$), inflammatory cell infiltration (1.5 ± 0.2 vs 2.4 ± 0.2 , $P < 0.05$), necrosis (1.1 ± 0.2 vs 2.0 ± 0.2 , $P < 0.05$) and hemorrhage (1.0 ± 0.2 vs 1.8 ± 0.2 , $P < 0.05$). In addition, the wet weight, serum amylase and TNF- α concentrations in ANP group were markedly higher than NS group and anti-JAM-C mAb group ($348 \text{ mg} \pm 27 \text{ mg}$ vs $235 \text{ mg} \pm 24 \text{ mg}$, $286 \text{ mg} \pm 36 \text{ mg}$; $17\,985 \text{ U/L} \pm 1\,064 \text{ U/L}$ vs $1\,876 \text{ U/L} \pm 245 \text{ U/L}$, $13\,870 \text{ U/L} \pm 988 \text{ U/L}$; $628 \text{ ng/L} \pm 48 \text{ ng/L}$ vs $320 \text{ ng/L} \pm 23 \text{ ng/L}$, $58 \text{ ng/L} \pm 13 \text{ ng/L}$, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with anti-JAM-C mAb significantly reduces pancreatic and systemic inflammation in mice with ANP.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; Junctional adhesion molecule-C; Anti-JAM-C mAb

Hu DM, Yang Y, Tang W. Treatment with anti-JAM-C mAb attenuates pancreatic and systemic inflammation in mice with acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 74-77

摘要

目的: 观察JAM-C单克隆抗体对小鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)模型胰腺和全身炎症的抑制作用。

方法: 采用雨蛙素和脂多糖联合腹腔注射的方法建立小鼠重症急性胰腺炎模型。生理盐水对照组(NS组): 小鼠给予腹腔注射无菌生理盐水(10 mL/kg), 共注射6次, 间隔1 h; ANP模型组(ANP组): 小鼠给予腹腔注射雨蛙素($50 \mu\text{g/kg}$)6次, 间隔1 h, 末次注射后立即给予腹腔注射内毒素(10 mg/kg); 抗小鼠JAM-C单抗处理组(anti-JAM-C mAb组): 小鼠给予腹腔注射雨蛙素($50 \mu\text{g/kg}$)6次, 间隔1 h, 在首次注射30 min时, 予每只小鼠腹腔内注射anti-JAM-C mAb 0.3 mL ($300 \mu\text{g}$), 末次雨蛙素注射后予腹腔内注射内毒素(10 mg/kg)。在末次注射3 h后, 收集血液检测血清淀粉酶和血TNF- α 浓度, 并收集胰腺组织称胰腺湿质量和进行组织积分

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

分析.

结果: 与ANP组小鼠比较, anti-JAM-C mAb的使用明显减轻了小鼠胰腺的水肿, 炎症细胞浸润, 坏死和出血, 病理学评分明显降低(1.9 ± 0.1 vs 2.4 ± 0.3 ; 1.5 ± 0.2 vs 2.4 ± 0.2 ; 1.1 ± 0.2 vs 2.0 ± 0.2 ; 1.0 ± 0.2 vs 1.8 ± 0.2 , 均 $P < 0.05$). 此外, ANP组小鼠的胰腺湿质量、血清淀粉酶含量和血清TNF- α 浓度明显高于NS组和anti-JAM-C组($348 \text{ mg} \pm 27 \text{ mg}$ vs $235 \text{ mg} \pm 24 \text{ mg}$, $286 \text{ mg} \pm 36 \text{ mg}$; $17\,985 \text{ U/L} \pm 1\,064 \text{ U/L}$ vs $1\,876 \text{ U/L} \pm 245 \text{ U/L}$, $13\,870 \text{ U/L} \pm 988 \text{ U/L}$; $628 \text{ ng/L} \pm 48 \text{ ng/L}$ vs $320 \text{ ng/L} \pm 23 \text{ ng/L}$, $58 \text{ ng/L} \pm 13 \text{ ng/L}$, 均 $P < 0.05$).

结论: anti-JAM-C mAb能有效缓解小鼠ANP模型的胰腺炎症损伤和全身炎症反应.

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 连接黏附分子-C; 抗JAM-C单克隆抗体

胡端敏, 杨勇, 唐文. JAM-C单抗对小鼠急性坏死性胰腺炎的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 74-77
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/74.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)时, 胰腺组织大量渗出的白细胞引发并加剧了胰腺的炎症和坏死, 而白细胞与内皮细胞的相互作用则是导致白细胞募集的中心环节, 各种黏附分子在这一环节中起着关键作用^[1]. 连接黏附分子C(junctional adhesion molecule-C, JAM-C)是近年新发现的在血管内皮细胞上分布的细胞黏附分子, 他介导了中性粒细胞向炎症部位和组织损伤处的浸润和聚集^[2]. 我们的前期研究发现, 在小鼠ANP模型中, JAM-C在胰腺、肾脏和肺脏上的表达均明显增高, 这一结果提示JAM-C在ANP发病过程中起到重要的作用^[3]. 本研究通过小鼠JAM-C单克隆抗体干预治疗小鼠ANP模型, 旨在观察抑制JAM-C介导的黏附作用对ANP小鼠胰腺及全身炎症的保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级昆明小鼠18只, 雌雄不分, 体重 $20 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$, 购自苏州大学动物实验中心. 雨蛙素(cerulein)、内毒素(endotoxin)(*E.coli* O127:B8)购自美国Sigma公司; AF1213羊抗小鼠JAM-C mAb 购自美国RnD公司. 小鼠TNF- α ELISA Kit试剂盒购自武汉博士德生物有限公司.

1.2 方法

1.2.1 造模及给药: 动物随机被分成3组, 每组6只. 生理盐水对照组(NS组): 小鼠给予腹腔注射无菌生理盐水(10 mL/kg), 共注射6次, 间隔1 h; ANP模型组(ANP组): 小鼠给予腹腔注射雨蛙素($50 \text{ }\mu\text{g/kg}$)6次, 间隔1 h, 末次注射后立即给予腹腔注射内毒素(10 mg/kg). 抗小鼠JAM-C单抗处理组(anti-JAM-C mAb组): 小鼠给予腹腔注射雨蛙素($50 \text{ }\mu\text{g/kg}$)6次, 间隔1 h, 在首次注射30 min时予每只小鼠腹腔内注射anti-JAM-C mAb 0.3 mL ($300 \text{ }\mu\text{g}$), 末次雨蛙素注射后予腹腔内注射内毒素(10 mg/kg).

1.2.2 血清淀粉酶测定和TNF- α 浓度测定: 在末次注射完毕3 h后, 用股动脉取血法收集血液, 小鼠血清经过稀释后通过Olympus全自动生化仪进行血清淀粉酶检测, 同时用ELISA测定血清TNF- α 浓度, 操作步骤均严格按试剂盒说明书.

1.2.3 取材及光镜检查: 取血后用颈椎脱臼法处死小鼠, 剖腹, 肉眼观察胰腺及胰外各器官变化. 仔细分离胰腺, 称胰腺湿质量. 取胰组织置 40 g/L 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、切片, 苏木素和伊红(HE)染色, Olympus光镜下观察, 显微摄影.

1.2.4 病理学分析: 每只小鼠胰腺标本, 在光镜下选取10个高倍视野, 用双盲法按Schmidt's标准^[4]行胰腺组织病理学评分.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件, 所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 两组数据比较时采用Mann-Whitney检验. $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果

2.1 大体观察 NS组: 胰腺无明显外观异常; 胰外器官正常. ANP组: 2只小鼠腹腔内可见少量淡红色腹水; 胰腺腺体肿胀, 色暗红, 表面可见多处白色点状皂化斑及出血点, 胰腺与周围组织粘连; 小肠积气扩张明显; 肝脏暗红, 体积增大; 大网膜、肠系膜可见出血点; anti-JAM-C mAb组: 所有小鼠腹腔未见腹水, 腺体肿胀发红, 包膜紧张少量出血点但未见点状皂化斑; 胰外器官无异常变化.

2.2 胰腺组织病理变化 NS组, 胰腺组织正常(图1A). ANP组, 胰腺高度水肿, 腺泡呈孤岛状, 广泛腺细胞坏死, 细胞结构模糊不清, 胞质内空泡形成, 局部有融合性坏死灶; 坏死区有大量中性粒细胞和单核细胞浸润(图1B). 胰周脂肪有大量炎症细胞浸润, 血管扩张充血, 有脂肪坏死; 胰腺间质内动脉痉挛, 静脉明显扩张淤血, 炎症细胞

■ 研发前沿

目前的研究认为细胞黏附分子介导的白细胞过度激活对SAP的发生、发展及器官功能衰竭的发生有重要意义, 针对各种胰腺炎模型的抗黏附治疗一直是近年来研究的热点之一.

■ 相关报道

Bettina等使用细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的单克隆抗体预处理大鼠ANP模型后发现, anti-ICAM-1单抗能有效地减少大鼠ANP胰腺内的白细胞浸润、明显改善胰腺炎症的病理积分、抑制了胰腺的早期坏死和后期的胰腺细胞的凋亡. Hartwig等在他们研究中也发现, 阻断黏附分子L选择素的表达能明显降低白细胞渗出和肺损害.

■应用要点

临床上重症胰腺炎患者多在发病数小时后就诊,故针对全身炎症反应的上游细胞因子的干预很难保证其及时性和有效性,因此拮抗JAM-C这种参与ANP后期细胞事件的黏附分子可能成为治疗ANP及时有效的治疗方法。

表 1 各组胰腺组织病理学评分

分组	病理改变			
	间质水肿	炎症浸润	实质坏死	实质出血
NS组	0.0	0.0	0.0	0.0
ANP组	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1
anti-JAM-C mAb组	1.9 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.2 ^a

^a $P < 0.05$ vs ANP组.

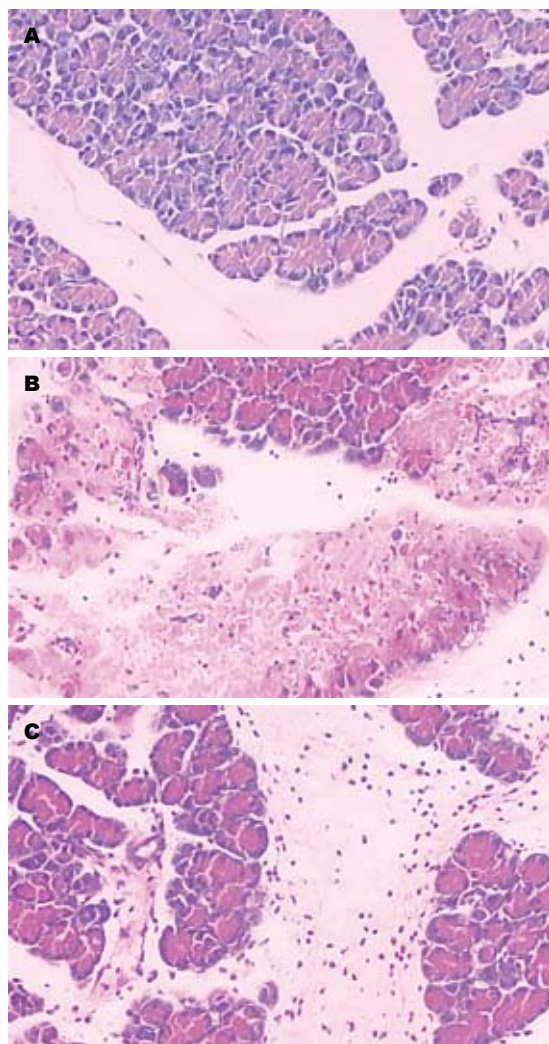


图 1 胰腺组织病理变化(H&E × 100). A: NS组; B: ANP组; C: anti-JAM-C mAb组.

周边,局部血管壁出血、坏死. anti-JAM-C mAb组,胰腺间质充血水肿,有中性粒细胞和单核细胞浸润,有少量局灶性腺泡坏死,血管病变不明显,无出血(图1C).

各组小鼠胰腺标本的Schmidt's胰腺病理评分显示, anti-JAM-C mAb组胰腺的水肿、炎症浸润、坏死及出血积分均明显低于ANP组(表1).

2.3 胰腺湿质量、血清淀粉酶含量和血清TNF- α

浓度测定 与NS组相比, ANP组和anti-JAM-C mAb组的胰腺湿质量、血清淀粉酶含量和血清TNF- α 浓度均明显升高($P < 0.05$), 但anti-JAM-C mAb组胰腺湿质量、血清淀粉酶含量和血清TNF- α 浓度均明显低于ANP组($P < 0.05$, 表2).

3 讨论

JAM-C是免疫球蛋白超家族成员之一, 他主要分布在白细胞、血小板、各种上皮, 及血管内皮细胞上. 在对腹膜炎^[5]、肺炎^[6]、皮肤炎症^[7]、关节炎^[8]等动物模型的研究中发现JAM-C增加了中性粒细胞的在炎症部位和组织损伤处的浸润和聚集.

目前的研究认为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时, 白细胞过度激活是引起胰腺病情加重、多器官功能衰竭以致死亡的重要原因^[9]. 其中细胞黏附分子主要作用于炎症细胞的黏附过程, 对白细胞过度激活以及SAP的发生、发展及器官功能衰竭的发生有重要意义, 因此以各种黏附分子为靶点的治疗手段被认为可能是治疗SAP的突破口, 针对各种胰腺炎模型的抗黏附治疗一直是近年来研究的热点之一. Rau等^[10]使用细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)的单克隆抗体预处理大鼠ANP模型后发现, anti-ICAM-1单抗能有效地减少大鼠ANP胰腺内的白细胞浸润、明显改善了胰腺炎症的病理积分、抑制了胰腺的早期坏死和后期的胰腺细胞的凋亡. Hartwig等^[11]在他们的研究中也发现, 阻断黏附分子L选择素的表达能明显降低白细胞渗出和肺损害. 但既往的这些抗黏附治疗研究的重点主要是针对介导白细胞趋边、滚动和初步黏附的分子, 而JAM-C主要分布在血管内皮细胞之间的紧密连接上, 他的配体主要是分布在各种白细胞上的整合素Mac-1(α L β 2, CD11b/CD18), 正是由于这种细胞膜分布上的特异性, JAM-C在白细胞激活向炎症区域募集的过程中主要作用于白细胞的跨壁穿越

表 2 各组胰腺湿重、淀粉酶含量及TNF- α 血清浓度 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	胰腺湿质量(mg)	淀粉酶含量(U/L)	TNF- α 浓度(ng/L)
NS组	235 \pm 24	1 876 \pm 245	58 \pm 13
ANP组	348 \pm 27 ^c	17 985 \pm 1 064 ^c	628 \pm 48 ^c
anti-JAM-C mAb组	286 \pm 36 ^{ac}	13 870 \pm 988 ^{ac}	320 \pm 23 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs ANP组; ^c $P < 0.05$ vs NS组.

过程. Vonlaufen等^[12]发现JAM-C高表达的小鼠ANP模型的胰腺炎症积分明显高于对照组. Chavakis等^[5]在他们的研究中使用JAM-C的可溶形式(sJAM-C)结合中性粒细胞上的整合素Mac-1后, 发现血管炎症明显减轻, 且白细胞渗出也明显减少. Scheiermann等^[13]发现拮抗JAM-C能使缺血再灌注损伤小鼠模型的中性粒细胞血管外渗出明显减少. 本研究同样发现JAM-C单抗处理后的ANP小鼠胰腺白细胞浸润显著减少, 胰腺炎症的病理积分得到明显改善. 我们同时还发现JAM-C单抗使ANP小鼠的淀粉酶和血清TNF- α 明显下降, 因TNF- α 是ANP合并全身炎症反应综合征的主要的炎症因子, 与急性胰腺炎的临床预后密切相关^[14], 故JAM-C不仅可以改善ANP小鼠胰腺的局部炎症还能有可能减轻ANP合并的全身炎症反应和预防肺、脑等远隔重要脏器的损害. 重症胰腺炎患者多在发病数小时后就诊, 故对针对全身炎症反应的上游细胞因子的干预很难保证其及时性和有效性, 因此拮抗JAM-C这种参与ANP后期细胞事件的黏附分子可能成为治疗ANP及时有效的治疗方法.

4 参考文献

- 1 Raraty MG, Connor S, Criddle DN, Sutton R, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 99-103
- 2 Ody C, Jungblut-Ruault S, Cossali D, Barnet M, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Matthes T. Junctional adhesion molecule C (JAM-C) distinguishes CD27+ germinal center B lymphocytes from non-germinal center cells and constitutes a new diagnostic tool for B-cell malignancies. *Leukemia* 2007; 21: 1285-1293
- 3 胡端敏, 杨勇, 唐文. JAM-C在小鼠急性坏死性胰腺炎模型不同组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 81-83
- 4 Shimizu T, Shiratori K, Sawada T, Kobayashi M, Hayashi N, Saotome H, Keith JC. Recombinant human interleukin-11 decreases severity of acute necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas* 2000; 21: 134-140
- 5 Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeyer K, Sachs UJ, Nawroth PP, Preissner KT, Santoso S. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279: 55602-55608
- 6 Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, Wang S, Herrera P, Nourshargh S, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation. *J Immunol* 2005; 174: 6406-6415
- 7 Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, Johann PS, Pfeffer J, Radeke HH, Schön MP, Kaufmann R, Boehncke WH, Podda M. Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 969-976
- 8 Palmer G, Busso N, Aurrand-Lions M, Talabot-Ayer D, Chobaz-Péclat V, Zimmerli C, Hammel P, Imhof BA, Gabay C. Expression and function of junctional adhesion molecule-C in human and experimental arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R65
- 9 Babu BI, Siriwardena AK. Functional protein C levels during the early phase of clinical acute pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39: 1077-1081
- 10 Rau B, Paszkowski A, Esber S, Gansauge F, Poch B, Beger HG, Möller P. Anti-ICAM-1 antibody modulates late onset of acinar cell apoptosis and early necrosis in taurocholate-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23: 80-88
- 11 Hartwig W, Jimenez RE, Fernandez-del Castillo C, Kelliher A, Jones R, Warshaw AL. Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Ann Surg* 2001; 233: 371-378
- 12 Vonlaufen A, Aurrand-Lions M, Pastor CM, Lamagna C, Hadengue A, Imhof BA, Frossard JL. The role of junctional adhesion molecule C (JAM-C) in acute pancreatitis. *J Pathol* 2006; 209: 540-548
- 13 Scheiermann C, Colom B, Meda P, Patel NS, Voisin MB, Marrelli A, Woodfin A, Pitzalis C, Thiernemann C, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Nourshargh S. Junctional adhesion molecule-C mediates leukocyte infiltration in response to ischemia reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1509-1515
- 14 李荣洲, 任宗海, 林纳, 蔡积武. 急性胰腺炎患者血清ICAM-1、TNF- α 和P选择素浓度与病情严重程度的关系. *胰腺病学* 2005; 5: 170-171

■同行评价
本文选题较好, 有一定的临床参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

嗜酸乳杆菌胞壁粗提物及DNA对溃疡性结肠炎小鼠模型的作用

练光辉, 陈旻湖, 彭侠彪, 阮巍山

■背景资料

嗜酸乳杆菌等益生菌是肠道内的正常菌群, 可以维护肠道正常的结构及功能, 其胞壁部分及核酸认为具有免疫调节、抗感染、抗衰老、抗肿瘤等作用, 应用益生菌的胞壁及核酸进行肠道疾病的治疗的研究已经在日本等国家逐渐开展, 而溃疡性结肠炎是一种包括免疫异常、感染等因素在内的多因素疾病, 研究嗜酸乳杆菌胞壁及核酸对溃疡性结肠炎的作用可以开发出成分较为单一、毒不良反应更小、能更快进入临床的药物。

练光辉, 陈旻湖, 中山大学附一医院消化内科 广东省广州市 510080

练光辉, 彭侠彪, 阮巍山, 中山市人民医院消化内科 广东省 中山市 528403

中山市科技局基金资助项目, No. 20091A060

作者贡献分布: 此课题由练光辉与陈旻湖设计; 研究过程由练光辉与阮巍山操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由彭侠彪提供; 数据分析由练光辉与彭侠彪完成; 本论文写作由练光辉与陈旻湖完成。

通讯作者: 陈旻湖, 教授, 510080, 广东省广州市中山二路58号, 中山大学附属一医院消化内科. chenminhu@vip.163.com

收稿日期: 2010-10-20 修回日期: 2010-11-13

接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2011-01-08

Treatment with *Lactobacillus acidophilus* cell wall extract and DNA improves experimental acute colitis in mice

Guang-Hui Lian, Min-Hu Chen, Xia-Biao Peng, Wei-Shan Ruan

Guang-Hui Lian, Min-Hu Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Guang-Hui Lian, Xia-Biao Peng, Wei-Shan Ruan, Department of Gastroenterology, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan 528403, Guangdong Province, China
Supported by: the Foundation of Zhongshan Science and Technology Bureau, No. 20091A060

Correspondence to: Professor Min-Hu Chen, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, 58 Zhongshan Road, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. chenminhu@vip.163.com

Received: 2010-10-20 Revised: 2010-11-13

Accepted: 2010-11-17 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of treatment with *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) cell wall extract (BCW) and DNA on experimental colitis in mice.

METHODS: Forty 6-8-wk-old specific pathogen-free female BALB/c mice were randomly divided into four groups: normal group, *L.acidophilus* BCW-treated group, *L.acidophilus* DNA-treated group, and control group. Except the normal group, other groups of mice were subjected to

induction of experimental colitis with 1.5% DSS in drinking water for 7 d and then treated with *L.acidophilus* BCW (20 μ g/10 g), *L.acidophilus* DNA (0.2 μ g/10 g), and physiological saline (0.2 mL/10 g), respectively. The changes in body weight, fecal traits, and faecal occult bleeding were recorded each day. All animals were killed on day 8 to isolate the whole colon for examination of length and wet weight. Hematoxylin and eosin staining of colonic sections was performed. The effect of treatment with *L.acidophilus* BCW and DNA on experimental colitis was then evaluated.

RESULTS: Compared with the control group, weight loss was significantly improved (2.94 ± 0.78 g, 3.37 ± 1.08 g vs 6.96 ± 1.39 g, both $P < 0.05$) and DAI score was significantly decreased (4.27 ± 0.41 , 4.62 ± 0.56 vs 6.85 ± 0.94 , both $P < 0.05$) in mice treated with both *L.acidophilus* BCW and DNA. Treatment with *L.acidophilus* BCW and DNA prevented the shortening of colon length (8.62 ± 1.31 cm, 8.15 ± 0.97 cm vs 6.63 ± 1.38 cm, both $P < 0.05$), increased the colon/body weight index ($1.63\% \pm 0.27\%$, $1.68\% \pm 0.29\%$ vs $2.12\% \pm 0.22\%$, both $P < 0.05$), improved mucosal damage and inflammatory infiltration, and protected mucosal glands and villi.

CONCLUSION: Treatment with *L.acidophilus* cell wall extract and DNA can improve DSS-induced experimental colitis in mice.

Key Words: Ulcerative colitis; *Lactobacillus acidophilus*; Bacterial cell wall; DNA; Therapy

Lian GH, Chen MH, Peng XB, Ruan WS. Treatment with *Lactobacillus acidophilus* cell wall extract and DNA improves experimental acute colitis in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 78-83

摘要

目的: 观察嗜酸乳杆菌BCW和DNA对实验性结肠炎的治疗作用。

方法: 40只♀BALB/c小鼠随机分为正常组、

■同行评议者

任晓峰, 教授, 东北农业大学动物医学学院微生物室

嗜酸乳杆菌BCW组、嗜酸乳杆菌DNA组和生理盐水组, 除正常组小鼠外, 其余各组自由饮用1.5% DSS 7 d建立小鼠结肠炎模型, 从实验第1天开始, 给予嗜酸乳杆菌BCW(20 μ g/10 g)、嗜酸乳杆菌DNA(0.2 μ g/10 g)和生理盐水(0.2 mL/10 g)灌肠7 d, 观察小鼠每天的体质量变化/粪便性状和粪便隐血情况; 实验结束时处死动物, 观察结肠大体观, 测量全段结肠长度并称其质量; HE染色观测结肠炎症情况, 评价嗜酸乳杆菌BCW和DNA对小鼠急性结肠炎的影响。

结果: 饮用DSS小鼠体质量逐渐下降, DAI积分增高, 结肠黏膜出现糜烂或溃疡, 腺体破坏, 大量炎性细胞浸润。与生理盐水组比较, 嗜酸乳杆菌BCW和DNA能减缓小鼠体质量的下降(2.94 g \pm 0.78 g, 3.37 g \pm 1.08 g vs 6.96 g \pm 1.39 g, $P<0.05$), 降低小鼠DAI积分(4.27 \pm 0.41, 4.62 \pm 0.56 vs 6.85 \pm 0.94, $P<0.05$), 在组织学方面能阻止DSS导致的结肠缩短(8.62 cm \pm 1.31 cm, 8.15 cm \pm 0.97 cm vs 6.63 cm \pm 1.38 cm, $P<0.05$)及肠质量指数的增加(1.63% \pm 0.27%, 1.68% \pm 0.29% vs 2.12% \pm 0.22%, $P<0.05$), 减轻黏膜损伤, 恢复腺体及绒毛的排列, 减轻炎性细胞的浸润。

结论: 嗜酸乳杆菌BCW和DNA能有效地缓解小鼠急性结肠炎炎症, 减轻组织损伤。

关键词: 溃疡性结肠炎; 乳酸杆菌; 细菌胞壁; DNA; 治疗

练光辉, 陈旻湖, 彭侠彪, 阮巍山. 嗜酸乳杆菌胞壁粗提物及DNA对溃疡性结肠炎小鼠模型的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 78-83
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/78.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种多因素的慢性疾病, 具有慢性、反复、迁延的特点。随着我国人们生活环境及饮食结构的变化, 该病的发病在我国特别是发达地区呈上升态势。近年来对UC病因研究的深入, 人们发现肠道微生物系统的失衡是结肠炎发病及迁延的重要一环。

据此研究人员给予补充外源性的益生菌, 如双歧杆菌属、乳酸杆菌属、非致病性大肠杆菌、枯草杆菌等均获得了良好的效果。其作用机制普遍认为与益生菌黏附肠黏膜细胞、竞争性抑制、代谢物作用、直接抑杀致病菌及刺激机体产生 β -防御素等^[1-3], 这些口服的益生菌在通过胃酸及胆汁的作用后, 只有极少的部位能

到达回结肠, 部分使用的益生菌亦非肠道固有菌群, 在肠黏膜上不能定植生长, 所以通过活菌产生的作用大打折扣。而且所谓的“益生菌”在某些情况下进入血液引起的菌血症、感染性心内膜炎及肺脓肿在全球也有散发报道^[4-6], 这使得人们在应用益生菌活菌进行治疗的时候也变得小心翼翼。近年来, 研究发现除了益生菌活菌外, 其菌体成分如胞壁成分、DNA等均有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老甚至有直接抑杀致病菌的作用, 因此这些益生菌的菌体成分能否因免疫调节、抗炎等作用而成为下一个UC治疗的研究重点值得期待。

本研究通过7 d DSS饮用诱导出急性期UC模型, 综合观察疾病活动、结肠组织损伤等情况, 分析嗜酸乳杆菌DNA以及细菌胞壁提取物(bacterial cell wall, BCW)对小鼠模型疾病发展和转归的影响, 评价嗜酸乳杆菌细菌成分对DSS诱导的UC急性期动物模型的治疗价值。

1 材料和方法

1.1 材料 DSS分子量36 000-50 000 Da, 购自Sigma公司, 用生理盐水配制成1.5%浓度, 嗜酸乳杆菌为湖南康哲中南医药研究有限公司提供, ♀Balb/c小鼠40只, 6-8 wk龄, 体质量20.0 g \pm 2.0 g, 购于湖南农业大学东创实验动物科技服务部, 饲养于清洁级动物房。

1.2 方法

1.2.1 分组: 40只Balb/c小鼠, 随机分成4组, 每组10只。生理盐水组: DSS造模+无菌生理盐水灌肠; BCW组: DSS造模+BCW (100 mg/L)灌肠; DNA组: DSS造模+DNA(1 mg/L)灌肠; 正常组: 正常饮食; 采用自由饮水7 d造模。

1.2.2 抽提细菌DNA: 通过常规的苯酚-氯仿抽提法对嗜酸乳杆菌基因组DNA进行抽提。

1.2.3 BCW提取: 常规超声离心法提取嗜酸乳杆菌BCW, 冷冻干燥后保存备用。

1.2.4 动物的处理: 实验期间每日观察小鼠进食、饮水、活动等一般情况, 称量体质量, 观察粪便性状及粪便隐血、便血情况, 计算疾病活力指数积分(disease active index, DAI), 评估结肠炎严重程度。实验动物第8天颈椎脱臼处死小鼠, 游离结肠和远端回肠, 取出肛门至盲肠末端的整个结肠和直肠段, 观察各组小鼠结肠的大体改变、测量整个结肠长度及湿质量, 并根据如下公式计算肠质量指数, 肠质量指数 = 结肠质量/体质量 \times 100%。用预冷无菌生理盐水将结肠

■ 相关报道

Miyazaki等检测了乳杆菌属、双歧杆菌属、肠球菌属等9种益生菌代谢物对凝聚性大肠杆菌的抑杀作用发现, 双歧杆菌属及粪肠球菌培养上清对凝聚性大肠杆菌没有作用, 而干酪乳杆菌干酪亚种和鼠李糖亚种的抑杀作用通过中和上清以后消失。

■创新盘点

使用嗜酸乳杆菌胞壁及核酸对溃疡性结肠炎进行治疗,既保存了益生菌的有效性,又避免细菌易位的发生,而且成分更加单一,容易分析。

表 1 各组小鼠结肠长度、湿质量及肠质量指数 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	结肠长度(cm)	结肠湿质量(g)	肠质量指数(%)
正常组	11.47 \pm 1.93 ^a	1.34 \pm 0.11	1.46 \pm 0.13 ^a
BCW组	8.62 \pm 1.31 ^a	1.23 \pm 0.13	1.63 \pm 0.27 ^a
DNA组	8.15 \pm 0.97 ^a	1.26 \pm 0.10	1.68 \pm 0.29 ^a
生理盐水组	6.63 \pm 1.38	1.22 \pm 0.17	2.12 \pm 0.22

^a $P < 0.05$ vs 生理盐水对照组。

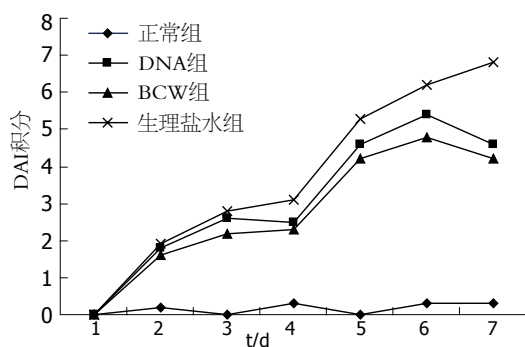


图 1 嗜酸乳杆菌DNA、BCW对小鼠DAI积分的影响。

冲洗干净,分别于结肠末端(距肛门1 cm)处剪取0.5 cm长结肠,甲醛浸泡,石蜡包埋、切片,做病理检查。

2 结果

2.1 小鼠体质量变化: 饮用DSS使小鼠精神萎靡,活动及进食减少,并出现大便松散不成形、肛周血迹甚至血水便,从第2天开始出现体质量下降,至实验结束时生理盐水组小鼠体质量减轻累积达到6.96 g \pm 1.39 g; DNA组体质量减轻也达到3.37 g \pm 1.08 g, BCW组体质量下降最少(2.94 g \pm 0.78 g),较生理盐水组有显著差异($P < 0.05$)。而正常小鼠在实验期间体质量缓慢增加,至实验结束时体质量增加了1.21 g \pm 0.46 g。

2.2 小鼠的DAI积分 正常组DAI始终稳定在零水平附近:小鼠饮用DSS后DAI呈逐渐上升趋势,第7天生理盐水组的DAI高达6.85 \pm 0.94。用嗜酸乳杆菌DNA、BCW干扰饮用DSS的小鼠后,DAI的变化趋势在前6 d均呈上升趋势,与生理盐水组无明显差异,至第7天接受BCW和细菌DNA灌肠小鼠由于大便基本成型,粪便隐血大部分消失,DAI积分较生理盐水组小鼠明显降低(4.27 \pm 0.41, 4.62 \pm 0.56),与生理盐水组比较有明显差异($P < 0.05$, 图1)。图中结果表明,饮用DSS的小鼠DAI逐渐增加,用生理盐水不能阻止病情的发展。随着实验进程,嗜酸乳杆菌DNA、BCW能有

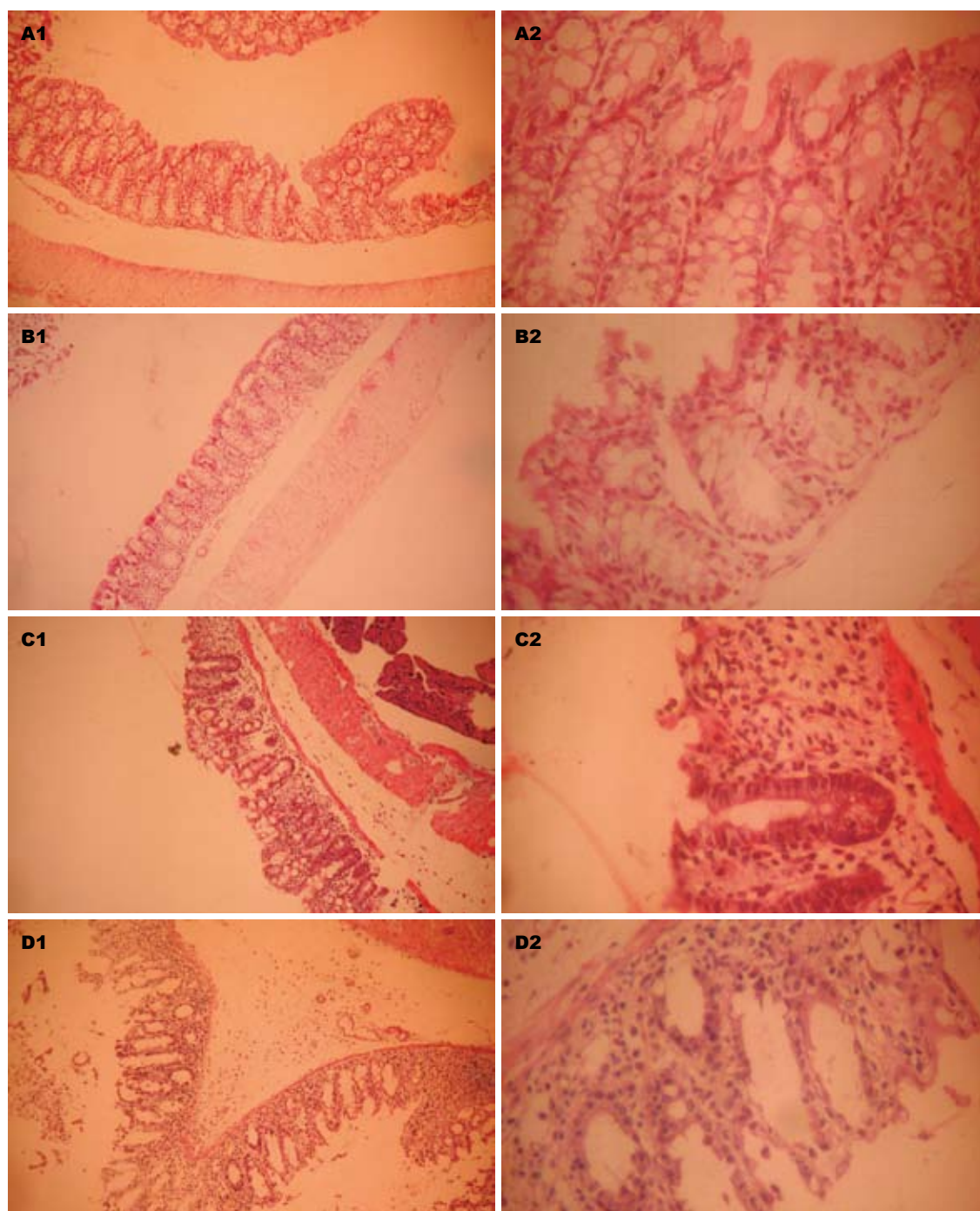
效阻止症状加重。

2.3 小鼠结肠质量及长度变化: DSS造模小鼠结肠长度均有不同程度的缩短,嗜酸乳杆菌DNA、BCW组小鼠结肠缩短均小于生理盐水组小鼠($P < 0.05$),肠质量指数在饮用DSS后有不同程度的增加,说明小鼠结肠发生炎症水肿、充血、局部有所增厚,生理盐水不能阻止这种变化,嗜酸乳杆菌DNA、BCW能减少肠质量指数的增加,与生理盐水组比较差异有显著意义($P < 0.05$, 表1)。

2.4 小鼠结肠病理组织学: 正常组小鼠直结肠组织黏膜结构及绒毛完整,腺体排列整齐,隐窝正常,杯状细胞无减少,未见黏膜糜烂,出血,无炎性细胞浸润(图2A), BCW组小鼠结肠黏膜轻度破坏,呈糜烂状,可见局部充血,腺体减少,隐窝部有炎性细胞的浸润(图2B), DNA组小鼠结肠有溃疡形成,局部黏膜缺失,腺体减少,绒毛基本消失,底部有较多的炎性细胞浸润(图2C); 生理盐水组小鼠结肠黏膜可见大片溃疡,绒毛及腺体消失,炎症累及全层,大量炎性细胞浸润(图2D)。以上结果可以看出,嗜酸乳杆菌BCW、DNA均能减轻DSS造成的黏膜损伤,恢复腺体及绒毛排列,减轻炎性细胞浸润,而生理盐水并无此效果。在组织学评分方面,正常小鼠分值为零,生理盐水组分值远远高于嗜酸乳杆菌BCW、DNA处理组,说明嗜酸乳杆菌BCW、DNA能改善小鼠组织学损伤。

3 讨论

UC是一种难治性、复发性疾病,其病因还不甚清楚,研究普遍认为与肠道微生物的基因易感性、黏膜免疫及肠道菌群有很重要的关系。UC好发的结肠是肠道菌群最为集中的部位,此前的研究发现艰难梭菌、致病性大肠杆菌、沙门氏菌和弯曲杆菌等多种细菌感染与UC有关,其治疗研究从传统的氨基水杨酸、激素甚至免疫抑制剂到近年来的生物疗法,其中通过口服长

**■名词解释**

胞壁粗提物: 采用超声波将细菌菌体破碎以后, 去除胞质、胞核及大部分蛋白质后所保留的细菌细胞壁成分。

图 2 HE染色示各组小鼠的结肠组织. A: 正常组; B: BCW组; C: DNA组; D: 生理盐水组. A1, B1, C1, D1($\times 100$); A2, B2, C2, D2($\times 400$).

双歧杆菌、乳酸杆菌、VSL#3及*E.coli* Nissle 1917等多种益生菌均报道获得了满意的效果^[7-9], 而且通过其依从性好, 不良反应小, 经济等优点获得了临床工作人员的青睐. 然而Elmer等^[10]发现口服乳酸杆菌和双歧杆菌大部分都被胃酸和胆汁灭活, 只有所服用的1.5%乳酸杆菌和37.5%双歧杆菌能到达回肠末端, 如此少的益生菌达到回结肠部, 能够黏附定植下来的数量可能就更少, 而这些益生菌的治疗UC的机制普遍认为

与活菌黏附、竞争性抑制及其分泌的代谢产物有密切关系.

研究人员比较了被认为是与UC发病有很强相关性的几种细菌变形梭杆菌、梭形梭杆菌、拟杆菌、大肠埃希氏菌和保级利亚乳杆菌、德氏乳杆菌对SW-480和HT-29细胞的黏附作用却发现两种乳杆菌对肠黏膜的黏附作用似乎没有预想的好, 远低于这些致病菌对细胞的黏附^[11], 这就更加使得外源性补充的益生菌可能不能在

■同行评价

本文选题恰当,具有一定的临床参考意义和实用价值。

相应部位定植而成为过路菌。如此少量的益生菌到达病灶部位定植是否能与数量庞大的致病菌产生竞争性抑制或者产生足够的代谢产物抑制致病菌的生长值得一定的怀疑。甚至在刑咏梅等^[12]的研究认为德氏乳杆菌和肠球菌的灭活状态较活菌状态对肠黏膜上皮细胞的黏附性显著增高。对于益生菌的代谢产物,有些研究认为益生菌代谢物可以通过丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等途径调节机体的免疫^[13],有些研究认为细菌的代谢物根本没有免疫调节功能,可能只是所产生的酸性物质起作用^[14], Miyazaki等^[15]检测了乳杆菌属、双歧杆菌属、肠球菌属等9种益生菌代谢物对凝聚性大肠杆菌的抑杀作用发现,双歧杆菌属及粪肠球菌培养上清对凝聚性大肠杆菌没有作用,而干酪乳杆菌干酪亚种和鼠李糖亚种的抑杀作用通过中和上清以后消失。因此我们认为在益生菌替代疗法中其作用机理可能不完全是由于活菌黏附定植,而益生菌被消化破碎以后的菌体成分也可能是起效的重要因素。

本研究使用的嗜酸乳杆菌是从健康人体分离出来的,在之前的研究中发现口服活菌对于轻、中度UC小鼠有一定的治疗作用。采用超声破碎嗜酸乳杆菌提取BCW、常规苯酚-氯仿抽提法提取嗜酸乳杆菌DNA,通过灌肠干预DSS诱导的结肠炎小鼠,观察这两种成分是否对急性活动性结肠炎小鼠有治疗效果。结果显示,无论是嗜酸乳杆菌的BCW还是DNA均可以缓解结肠炎的症状,虽然饮用DSS后各组小鼠的体质量均逐渐下降,然而嗜酸乳杆菌BCW及DNA对体质量下降的保护明显好于生理盐水;从DAI积分来说亦是如此,予以嗜酸乳杆菌BCW及DNA以后,小鼠的大便性状、隐血/血便情况明显好转,加之体质量减轻较少,使得反映结肠炎临床症状的DAI积分明显较生理盐水组小鼠低。通过结肠组织学来看,饮用DSS后小鼠结肠缩短、肠质量指数增加,说明结肠不单有充血、水肿质量的相对增加,还有结肠糜烂、溃疡所致长度缩短,而嗜酸乳杆菌BCW及DNA能缓解结肠炎症,降低肠质量指数,从显微镜下观察,结肠上皮的损伤及炎性细胞浸润也较生理盐水组小鼠轻,但嗜酸乳杆菌两种菌体成分在这些作用中没有差异。

通过本研究可以发现,嗜酸乳杆菌BCW及DNA可以缓解小鼠急性UC,但这些益生菌的细菌成分与活菌之间作用是否有差别、联用是否

有叠加效果及其作用机制尚需深入研究。

4 参考文献

- 1 Liu C, Zhang ZY, Dong K, Guo XK. Adhesion and immunomodulatory effects of Bifidobacterium lactis HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2283-2290
- 2 Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Higuchi K, Takeuchi K, Arakawa T. Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G506-G513
- 3 Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 2007; 75: 2399-2407
- 4 Alberte A, de La Fuente R, Avellaneda C, Pascual PP. [Post-ERCP bacteremia due to Lactobacillus casei: a case history]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 215
- 5 Salvana EM, Frank M. Lactobacillus endocarditis: case report and review of cases reported since 1992. *J Infect* 2006; 53: e5-e10
- 6 Koch S, Hufnagel M, Huebner J. Treatment and prevention of enterococcal infections--alternative and experimental approaches. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1519-1531
- 7 Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242-249
- 8 Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, Caramelli E, Gionchetti P, Schrezenmeier J, Foelsch UR, Schreiber S, Campieri M. Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5978-5986
- 9 Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1539-1546
- 10 Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* 1996; 275: 870-876
- 11 Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 2009; 58: 535-545
- 12 刑咏梅, 贾继辉, 王红艳, 陈春燕, 周亚滨, 阎世坤, 于修平. 两种生物状态肠道益生菌的粘附和粘附拮抗效应的对比研究. *中国微生态学杂志* 2004; 16: 69-72
- 13 Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquin C, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS One* 2008; 3: e2753
- 14 Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probi-

otic Lactobacilli Interfere with Streptococcus mutants Biofilm Formation In Vitro. *Curr Microbiol* 2010 [Epub ahead of print]
15 Miyazaki Y, Kamiya S, Hanawa T, Fukuda M, Kawaka-

mi H, Takahashi H, Yokota H. Effect of probiotic bacterial strains of Lactobacillus, Bifidobacterium, and Enterococcus on enteroaggregative Escherichia coli. *J Infect Chemother* 2010 [Epub ahead of print]

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

2009 年内科科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
I170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	—	—	—	—	—	—
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	6013	1	3.70	0.789	3	0.59
G803	肝脏	710	25	-0.45	0.545	21	0.10
G938	国际呼吸杂志	796	22	-0.38	0.218	46	-0.56
G415	国际内分泌代谢杂志	786	23	-0.39	0.243	44	-0.51
G940	国际心血管病杂志	331	41	-0.74	0.231	45	-0.53
Q908	临床肺科杂志	1600	12	0.25	0.437	26	-0.12
G501	临床肝胆病杂志	671	28	-0.48	0.385	33	-0.22
G658	临床荟萃	1913	9	0.49	0.363	36	-0.27
G257	临床内科杂志	968	19	-0.24	0.403	30	-0.19
G855	临床消化病杂志	393	37	-0.69	0.443	25	-0.11
G261	临床心血管病杂志	998	18	-0.22	0.444	24	-0.10
G293	临床血液学杂志	462	35	-0.64	0.633	8	0.28
G491	岭南心血管病杂志	214	44	-0.83	0.205	47	-0.59
G662	内科急危重症杂志	365	40	-0.71	0.389	31	-0.22
G523	内科理论与实践	85	46	-0.93	0.260	41	-0.48
G746	实用肝脏病杂志	431	36	-0.66	0.483	22	-0.03
G190	世界华人消化杂志	3009	6	1.35	0.625	9	0.26
G800	胃肠病学	703	27	-0.45	0.602	11	0.21
G326	胃肠病学和肝病学杂志	706	26	-0.45	0.412	29	-0.17
G451	现代消化及介入诊疗	233	43	-0.82	0.567	14	0.14
G083	心肺血管病杂志	392	38	-0.69	0.575	13	0.16
G419	心血管病学进展	713	24	-0.44	0.436	27	-0.12
G578	心血管康复医学杂志	590	33	-0.54	0.385	33	-0.22
G260	心脏杂志	654	29	-0.49	0.387	32	-0.22
G234	中国动脉硬化杂志	1042	17	-0.19	0.555	19	0.12
G973	中国呼吸与危重监护杂志	625	32	-0.51	0.677	7	0.36
G267	中国实用内科杂志	2693	7	1.10	0.578	12	0.17
G211	中国糖尿病杂志	1855	11	0.45	0.567	14	0.14
G380	中国心血管杂志	367	39	-0.71	0.384	35	-0.23
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	652	30	-0.49	0.614	10	0.24
G633	中国血液净化	815	20	-0.36	0.559	17	0.13
G119	中国循环杂志	650	31	-0.49	0.290	40	-0.42
G231	中华肝脏病杂志	3363	5	1.63	0.733	4	0.48
G235	中华高血压杂志	1259	16	-0.02	0.715	5	0.44
G147	中华结核和呼吸杂志	5293	2	3.14	1.492	1	2.01
G639	中华老年多器官疾病杂志	203	45	-0.84	0.248	43	-0.50
G876	中华老年心脑血管病杂志	812	21	-0.37	0.561	16	0.13
G155	中华内分泌代谢杂志	1891	10	0.48	0.713	6	0.44
G156	中华内科杂志	3674	4	1.87	0.550	20	0.11
G505	中华乳腺病杂志电子版	84	47	-0.93	0.302	39	-0.39
G161	中华肾脏病杂志	1562	13	0.22	0.558	18	0.13
G285	中华消化内镜杂志	1497	14	0.17	0.431	28	-0.13
G168	中华消化杂志	2460	8	0.92	0.451	23	-0.09
G892	中华心律失常学杂志	496	34	-0.61	0.306	38	-0.38
G170	中华心血管病杂志	4623	3	2.61	1.391	2	1.80
G172	中华血液学杂志	1482	15	0.16	0.356	37	-0.28
G610	中华胰腺病杂志	303	42	-0.76	0.256	42	-0.48
	48种期刊平均值	1280			0.496		

以上数据摘自2010年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 184-185.

RASSF1A基因启动子区甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌组织中的变化及临床意义

樊宇靖, 刘 宾, 王立东, 李 莉, 蓝 宇

■背景资料

河南林州是食管癌和贲门癌的高发地区, 该地区贲门腺癌的发病特征与远端胃癌明显不同, 却与食管下段鳞癌存在诸多相似之处。

樊宇靖, 蓝宇, 北京积水潭医院消化科 北京市 100035
刘宾, 李莉, 首都医科大学附属北京同仁医院消化科 北京市 100730
王立东, 郑州大学基础医学院 河南省食管癌重点开放试验室 河南郑州市 450052
作者贡献分布: 本课题由樊宇靖与刘宾共同设计; 实验过程由樊宇靖与李莉完成; 王立东提供技术指导; 数据整理统计由樊宇靖完成; 论文撰写由樊宇靖与蓝宇完成。
通讯作者: 樊宇靖, 100035, 北京市西城区新街口东街31号, 北京积水潭医院消化科. elyn_fan@sohu.com
电话: 010-58516688
收稿日期: 2010-12-07 修回日期: 2010-12-07
接受日期: 2010-12-17 在线出版日期: 2011-01-08

Clinical significance of RASSF1A promoter methylation in gastric cardiac carcinoma and esophageal squamous cell carcinoma

Yu-Jing Fan, Bin Liu, Li-Dong Wang, Li Li, Yu Lan

Yu-Jing Fan, Yu Lan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Bin Liu, Li Li, Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China
Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer Research, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yu-Jing Fan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, 31 East Xijiekou Avenue, Xicheng District, Beijing 100035, China. elyn_fan@sohu.com

Received: 2010-12-07 Revised: 2010-12-07

Accepted: 2010-12-17 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate the methylation status of the promoter region of the RASSF1A gene in gastric cardiac adenocarcinoma (GCA) and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in the distal esophagus and to analyze their clinical significance.

METHODS: Thirty-three GCA patients and 36 ESCC patients who came from a high-incidence region of ESCC in Linzhou, Henan and were treated at Yaocun Esophageal Cancer Hospital and Linzhou Center Hospital were enrolled in

this study. No statistical differences were found in sex, age, and tumor differentiation between GCA and ESCC patients. No patients received chemotherapy or radiotherapy before operation. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to investigate the methylation status of the promoter region of the RASSF1A gene in the two groups of patients.

RESULTS: For GCA patients, the frequencies of RASSF1A promoter methylation in cancer tissue (CA), matched dysplasia tissue (DYS) and normal tissue (NOR) were 63.6%, 20% and 4.2%, respectively. For ESCC patients, the frequencies of RASSF1A promoter methylation in tumor tissue, matched dysplasia tissue and normal tissue were 66.7%, 25% and 16.7%, respectively. High methylation frequency was found in both types of cancer tissue. With the evolution of lesions (NOR-DYS-CA), the frequency of RASSF1A promoter methylation showed an increasing tendency in both GCA ($\chi^2 = 22.173$, $P < 0.001$) and ESCC patients ($\chi^2 = 19.324$, $P < 0.001$). The frequency of RASSF1A promoter methylation in normal tissue from GCA patients was lower than that from ESCC patients.

CONCLUSION: RASSF1A promoter hypermethylation is a molecular event that occurs in both GCA and ESCC patients. RASSF1A is a potential candidate biomarker for early detection of carcinoma of the esophagogastric junction.

Key Words: Gastric cardiac adenocarcinoma; Esophageal squamous cell carcinoma; RASSF1A; Methylation

Fan YJ, Liu B, Wang LD, Li L, Lan Y. Clinical significance of RASSF1A promoter methylation in gastric cardiac carcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 84-88

摘要

目的: 比较RASSF1A基因甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌不同病理阶段组织中的共性和差异。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

方法: 33例贲门腺癌和36例食管下段鳞癌手术切除标本纳入本研究, 每例标本选取癌组织, 癌旁不典型增生组织(距癌3-5 cm), 癌旁正常组织(距癌>5 cm)组织各1块, 采用甲基化特异性PCR检测RASSF1A基因启动子区的甲基化情况。

结果: 贲门腺癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分别为63.6%, 20%, 4.2%; 食管下段鳞癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分别为66.7%, 25%, 16.7%。随着病变程度的加重(癌旁正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), 贲门腺癌患者RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率呈上升趋势($\chi^2 = 22.173, P < 0.001$), 食管下段鳞癌患者RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率亦呈上升趋势($\chi^2 = 19.324, P < 0.001$), 但两者的升高幅度不同。贲门腺癌癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率明显低于食管下段鳞癌癌旁正常组织。

结论: RASSF1A基因启动子区高甲基化是贲门腺癌和食管下段鳞癌发生的共同分子事件, RASSF1A基因可作为胃食管交界部癌患者早期诊治和监测的候选指标。

关键词: 贲门腺癌; 食管下段鳞癌; Ras相关区域家族1A基因; 甲基化

樊宇靖, 刘宾, 王立东, 李莉, 蓝宇. RASSF1A基因启动子区甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌组织中的变化及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 84-88
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/84.asp>

0 引言

河南林州是世界上食管癌发病率和死亡率最高的地区, 同时贲门癌也是此地区最常见的恶性肿瘤, 食管癌和贲门癌的发病率之比为2.4-4.1:1^[1]。贲门腺癌的发病特征与远端胃癌明显不同, 却与食管下段鳞癌存在诸多相似和联系, 主要表现在: (1)均具有显著的地区分布特征, 且高发地域与食管癌高发地域一致; (2)部分患者同时患有食管下段鳞癌和贲门腺癌; (3)部分患者具有一致的蛋白表达异常^[2]。鉴于该地区人群具有相同的遗传背景和环境因素, 我们推测其贲门腺癌和食管下段鳞癌的发病可能具有相同的危险因素和分子基础。在本研究中, 我们拟检测Ras相关区域家族1A(Ras association domain family

1A, RASSF1A)基因甲基化改变在贲门腺癌、食管下段鳞癌不同病理阶段组织中的共性和差异, 筛选肿瘤发生的易感基因, 为临床早期诊治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 33例贲门腺癌和36例食管下段鳞癌手术切除大体标本取自河南省食管癌重点开放实验室标本库, 来源于林州市姚村镇食管癌医院和林州市中心医院。两组患者在性别、年龄、分化程度上无统计学差异。所有患者术前均未接受任何放疗或化疗。食管下段鳞癌的纳入标准是: (1)肿瘤位置界于齿状线口侧且位于齿状线上15 cm以内; (2)齿状线清晰可见, 未累及; (3)经病理证实为食管鳞癌。贲门腺癌的纳入标准是: (1)肿瘤位置界于齿状线肛侧且位于齿状线下5 cm以内; (2)齿状线清晰可见, 未累及; (3)经病理证实为贲门腺癌。大体标本均在手术切除后2 h内收集, 于液氮保存, 转运到实验室标本库后, 放入-80 °C冰箱冻存备用。所选标本在冰上, 分别取正常组织块(距癌>5 cm)、癌旁组织块(距癌3-5 cm)、癌组织块进行连续冰冻切片数张, 厚度10 μm , 首先取1张进行组织病理学诊断, 然后采用显微刮片技术刮取所需病变组织提取DNA。组织获取均征得患者及家属知情同意。基因DNA修饰试剂盒购于美国Promega公司, Hot Start Taq酶, dNTP, DNA Marker均购于大连宝生物工程有限公司, 琼脂糖粉购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取: 采用酚-氯仿抽提法提取DNA。

1.2.2 基因组DNA的亚硫酸氢盐修饰: 采用Wizard DNA Clean-up System试剂盒, 操作步骤按试剂盒说明进行。

1.2.3 设计引物: 根据GenBank序列及参考文献[3]合成甲基化和非甲基化引物, 具体引物序列、退火温度及扩增片段大小见表1。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 甲基化特异性PCR: 按照Herman等^[4]提出的甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)方法, 每份经亚硫酸氢盐修饰后的标本都分别用甲基化与非甲基化引物扩增。PCR采用25 μL 反应体系: 10 \times PCR缓冲液(Mg²⁺ Plus)2.7 μL , dNTP(2.5 $\mu\text{mol/L}$)3 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)2 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)2 μL , 模板DNA 4 μL ,

■ 相关报道

林海等研究发现胃癌组织中RASSF1A基因mRNA表达较正常组织明显降低, 同时甲基化率显著高于正常组织, 推测RASSF1A基因启动子高甲基化可能是导致其表达减低的原因, 并与胃癌进展演变相关。

■ 创新盘点

本研究对同一高发区人群贲门腺癌和食管下段鳞癌甲基化情况进行了对比分析, 提出RASSF1A基因启动子区高甲基化是上述两种肿瘤发生的共同分子事件, 并且发生在肿瘤早期, 可作为胃食管交界部癌患者早期诊治和监测的候选指标。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)	退火温度(°C)	参考文献
RASSF1A M	F: GTGTTAACGCGTTGCGTATC R: AACCCCGCGAACTAAAAACGA	94	60	[4]
RASSF1A U	F: TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG R: CAAACCCACAACTAAAAACAA	108	60	[4]

MF: 甲基化上游引物; MR: 甲基化下游引物; UF: 非甲基化上游引物; UR: 非甲基化下游引物。

Taq DNA聚合酶0.3 μ L, 去离子水加至25 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 进入循环, 95 $^{\circ}$ C 40 s, 退火温度复性60 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共循环40次, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 产物4 $^{\circ}$ C保存。

1.2.5 结果判定: 取6 μ L MSP扩增产物与2 μ L上样缓冲液充分混匀后, 加样至含有溴化乙啶的2%琼脂糖凝胶上电泳30 min, 以凝胶成像分析仪观察分析电泳结果。如甲基化特异引物扩增出目的条带, 而非甲基化特异引物无条带扩出, 视为纯合型甲基化; 如两对引物均扩增出目的条带, 视为杂合型甲基化; 以上两种类型均视为甲基化阳性; 如非甲基化特异性引物扩增出目的条带, 而甲基化引物无条带扩出, 视为非甲基化。如两对引物均未扩增出特异性条带, 则认为实验失败, 需重复实验。同时我们取新鲜胎盘组织, 按前述方法进行DNA的提取, 用CpG甲基化酶M.SssI(New England BioLabs[®] Inc.)修饰胎盘DNA, 利用已知甲基化的特性作为本研究的阳性对照。

统计学处理 采用SPSS15.0软件进行统计分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况 33例贲门腺癌患者中男性26例, 女性7例, 平均年龄 59.6 ± 7.7 岁, 其中高分化癌8例, 中分化癌12例, 低分化癌13例, 经病理证实后共选取72块组织, 其中癌组织33例, 癌旁不典型增生组织15例, 癌旁正常组织24例。36例食管下段鳞癌患者中男25例, 女11例, 平均年龄 59.3 ± 8.4 岁, 其中高分化癌6例, 中分化癌17例, 低分化癌13例, 经病理证实后共选取108块组织, 其中癌组织36例, 癌旁不典型增生组织36例, 正常组织36例。

2.2 贲门腺癌不同病理阶段组织中RASSF1A基因启动子区甲基化结果分析 贲门腺癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分

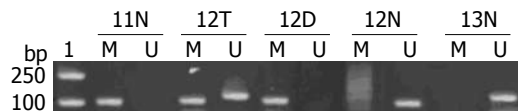


图 1 MSP检测RASSF1A甲基化电泳结果。1: Marker; M: 甲基化引物扩增后产物(94 bp), U: 非甲基化引物扩增后产物(108 bp); N: 癌旁正常组织; T: 癌组织; D: 癌旁不典型增生组织。

别为63.6%, 20%, 4.2%。随着贲门黏膜病变逐渐加重(正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率呈上升趋势($\chi^2 = 22.173$, $P < 0.001$)。其中癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比有统计学差异(63.6% vs 4.2%, $P < 0.05$); 癌旁不典型增生组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比无统计学差异(20% vs 4.2%, $P > 0.05$); 癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁不典型增生组织相比无统计学差异(63.6% vs 20%, $P > 0.05$, 图1)。

2.3 食管下段鳞癌不同病理阶段组织中RASSF1A基因启动子区甲基化结果分析 食管下段鳞癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分别为66.7%, 25%, 16.7%; 随着食管黏膜病变逐渐加重(正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率呈上升趋势($\chi^2 = 19.324$, $P < 0.001$)。其中癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比具有统计学差异(66.7% vs 16.7%, $P < 0.01$); 癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁不典型增生组织相比具有显著统计学差异(66.7% vs 25%, $P < 0.01$); 癌旁不典型增生组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比无统计学差异(25% vs 16.7%, $P > 0.05$, 图1)。

2.3 贲门腺癌/食管下段鳞癌组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的对比分析 贲门腺癌癌组

表 2 贲门腺癌/食管下段鳞癌组织RASSF1A基因启动子区的甲基化

	贲门腺癌组		食管下段鳞癌组		χ^2 值	P值
	n	n(%)	n	n(%)		
癌旁正常组织	24	1(4.2)	36	6(16.7)	2.183	0.143
癌旁不典型增生组织	15	3(20.0)	36	9(25.0)	2.147	0.503
癌组织	33	21(63.6)	36	24(66.7)	0.070	0.792

组织和食管下段鳞癌组织RASSF1A基因启动子区的甲基化发生率均高, 两者比较无统计学差异(63.6% vs 66.7%, $P>0.05$)。随着病变程度的加重(正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率在两组肿瘤中均呈上升趋势, 但两者的升高幅度不同。RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率在贲门腺癌癌旁正常组织中低于食管下段鳞癌癌旁正常组织, 但无统计学差异(4.2% vs 16.7%, $P>0.05$, 表2)。

3 讨论

由于贲门癌和食管下段癌的早期症状不典型, 诊断指标欠敏感, 大部分患者就诊时已为中晚期^[5], 病变常常累及齿状线, 很难界定肿瘤究竟来源于食管或贲门, 近年来常将两者统称为胃食管交界部癌。胃食管交界部癌患者的5年生存率非常低, 如何实现早期诊治是目前临床上迫切需要解决的问题。

RASSF1A基因是位于人染色体3p21.3区位点的抑癌基因, 含340个氨基酸的开放读框, 编码相对分子质量38 800 Da的蛋白多肽, 通过参与抑制Ras/RASSF1/ERK通路的信号传导调控细胞的增殖和凋亡、维持微管稳定性^[6]。研究表明, RASSF1A基因在多种恶性肿瘤组织(如肺癌、乳腺癌、膀胱癌、食管癌、结肠癌等)中存在表达缺失或减低, 启动子CpG岛异常甲基化和杂合性丢失是其沉默的主要原因^[7-9]。如Lo等^[10]发现, 在食管鳞状细胞癌和鼻咽癌组织中存在RASSF1A基因的表达减低, 表达减低程度与肿瘤的分级、分型、有无淋巴结转移等密切相关。林海等^[11]研究发现胃癌组织中RASSF1A基因mRNA表达较正常组织明显降低, 同时甲基化率显著高于正常组织, 推测RASSF1A基因启动子高甲基化可能是导致其表达减低的原因, 并与胃癌进展演变相关。但目前关于胃食管交界部癌RASSF1A基因甲基化的研究尚少, 同一高发区胃食管交界部癌主要病理类型肿瘤甲基化

的对比研究更少。河南食管贲门癌高发区胃食管交界部癌主要由贲门腺癌和食管下段鳞癌构成^[12,13]。在本研究中, 我们对贲门腺癌和食管下段鳞癌的纳入标准进行了明确的规定, 保证了所选样本的准确性。我们发现贲门腺癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率显著高于癌旁正常组织(63.6% vs 4.2%), 食管下段鳞癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率显著高于癌旁正常组织(66.7% vs 16.7%), 提示RASSF1A基因启动子区的高甲基化与贲门腺癌和食管下段鳞癌的发生密切相关, 是两者发生的共同分子事件。鉴于两组人群具有相似的环境因素和遗传背景, 并且在流行病学上有诸多相似之处, 推测RASSF1A基因可能在共同的致癌因素作用下出现异常甲基化。

DNA的甲基化具有非常重要的临床意义和应用前景。研究发现DNA甲基化可以在血清等临床非常容易获得的标本中检测^[14], 并且这种甲基化状态具有可逆性, 应用甲基化抑制剂5-氮-2脱氧胞苷(5-aza-dC)处理后可重新活化^[15], 为临床早期诊治提供新的方向。本研究中, 随着病变程度的逐渐加重, 两组患者RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率均呈升高趋势, 推测RASSF1A基因启动子区甲基化异常可能发生在肿瘤的早期阶段、并贯穿肿瘤发展的整个过程; RASSF1A基因有可能作为胃食管交界部癌患者早期诊治和监测的候选指标。随着病变程度的加重, RASSF1A基因甲基化发生率的变化幅度在贲门腺癌和食管下段鳞癌组织中存在差异, 贲门腺癌组织RASSF1A基因甲基化的发生率与食管下段鳞癌组织(63.6% vs 66.7%)近似; 而贲门腺癌癌旁正常组织RASSF1A基因甲基化的发生率明显低于食管下段鳞癌癌旁正常组织(4.2% vs 16.7%), 我们推测可能与RASSF1A基因在不同组织类型肿瘤的癌变过程中参与的方式和所起作用的大小不同有关。通过建立不同肿瘤组织和同一肿瘤组织不同病理阶段中形成的特异性甲基化谱, 可用于区别不同类型的肿

■应用要点

本研究发现RASSF1A基因启动子区高甲基化在肿瘤早期即出现, 可用于临床早期诊断。不同类型肿瘤甲基化改变的趋势存在差异, 推测通过建立特异性甲基化谱, 可用于区别不同类型的肿瘤或肿瘤的不同亚型。

■同行评价

本文学术性较好,具有一定的临床价值。

瘤或肿瘤的不同亚型。贲门腺癌旁正常组织 RASSF1A 基因甲基化的发生率与食管下段鳞癌旁正常组织比较无显著性差异,可能与样本量偏少有关,有待进一步扩大样本量。

目前贲门癌的发病机制尚不清楚,有文献报道42%-68%的贲门癌与Barrett's食管有关^[16],Barrett's食管可能是贲门癌的危险因素之一。还有学者认为,贲门黏膜是真正的化生黏膜,是肠化生形成的一个动态过程,是Barrett's食管的前体^[17]。众所周知,Barrett's食管是食管腺癌的癌前病变,贲门癌和食管腺癌的发病机制是否相同尚不清楚。有研究认为食管腺癌和贲门腺癌的危险因素,如饮酒,吸烟,体质量指数,遗传因素,低抗氧化剂膳食,服用食管下括约肌松弛药物等并不相同,因此应将两者作为不同的疾病分别对待^[1]。近年来西方国家Barrett's食管和食管腺癌的发病率明显升高,部分地区食管腺癌已成为食管癌发病的主要病理类型^[18]。随着我国经济水平的提高和生活模式的西化,反流性食管炎和Barrett's食管的发病率也呈上升趋势^[19],但食管腺癌发病率偏低,食管鳞癌仍是食管癌发病的主要病理类型,同时贲门腺癌发病率呈明显的升高趋势。我国国家胃食管交界部癌的主要病理类型(食管下段鳞癌和贲门癌)与西方国家(食管下段腺癌和食管下段鳞癌)明显不同。在本研究中,我们发现同一高发区人群贲门腺癌和食管下段鳞癌之间存在相同的流行病学特征和共同分子事件,有可能是一种相关性疾病;推测我国胃食管交界部癌的发病机制与西方国家可能存在不同,但有待进一步的研究。

4 参考文献

- 1 张军,程妍. Barrett食管与贲门癌. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2665-2668
- 2 吴会芳,王立东,范宗民,高珊珊,任景丽,王俊宽,李吉林,焦新英,刘小莉,邵珊,李琮宇,李苹娟,张彦霞,郭花芹,尹艳春,李江曼,何欣,邢国兰,刘保池. 青年食管鳞癌和贲门腺癌组织中Ras相关区域家族1A蛋白的表达. 郑州大学学报(医学版) 2007; 42: 409-411
- 3 Zöschbauer-Müller S, Lam S, Toyooka S, Virmani AK, Toyooka KO, Seidl S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *Int J Cancer* 2003; 107: 612-616
- 4 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 5 Fan YJ, Song X, Li JL, Li XM, Liu B, Wang R, Fan ZM, Wang LD. Esophageal and gastric cardia can-

- cers on 4238 Chinese patients residing in municipal and rural regions: a histopathological comparison during 24-year period. *World J Surg* 2008; 32: 1980-1988
- 6 Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007; 120: 3163-3172
- 7 Yazici H, Terry MB, Cho YH, Senie RT, Liao Y, Andrulis I, Santella RM. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2723-2725
- 8 Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Kanauchi N, Endoh M, Sadahiro M, Motoyama T. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2007; 58: 131-138
- 9 Oliveira C, Velho S, Domingo E, Preto A, Hofstra RM, Hamelin R, Yamamoto H, Seruca R, Schwartz S Jr. Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 2005; 24: 7630-7634
- 10 Lo PH, Xie D, Chan KC, Xu FP, Kuzmin I, Lerman MI, Law S, Chua D, Sham J, Lung ML. Reduced expression of RASSF1A in esophageal and nasopharyngeal carcinomas significantly correlates with tumor stage. *Cancer Lett* 2007; 257: 199-205
- 11 林海,曹俊,张斌,吴育美,邹晓平. RUNX3、RASSF1A启动子高甲基化与胃癌进展转移的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18: 889-896
- 12 王立东,李吉林,张彦霞,焦新英,王俊宽,杜娟娟,吴会芳,范宗民,何欣,宋昕,申秋,樊慧,高珊珊,常扶保,常智慧,吴爱群,邢国兰. 河南贲门癌高发区贲门癌发生部位分析. 郑州大学学报(医学版) 2007; 42: 389-392
- 13 李秀敏,赵志敏,常廷民,张渊智,周福有,王建坡,王立东,常扶保,郭涛,孔国强,张连群,侯晓华. 食管癌高发区1259例食管癌患者临床病理与遗传易感性. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2367-2373
- 14 Brooks JD, Cairns P, Shore RE, Klein CB, Wirgin I, Afanasyeva Y, Zeleniuch-Jacquotte A. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: results of a nested case-control study. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 717-723
- 15 Deng T, Zhang Y. 5-Aza-2'-deoxycytidine reactivates expression of RUNX3 by deletion of DNA methyltransferases leading to caspase independent apoptosis in colorectal cancer Lovo cells. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 492-500
- 16 Underwood JA, Williams JW, Keate RF. Clinical findings and risk factors for Candida esophagitis in outpatients. *Dis Esophagus* 2003; 16: 66-69
- 17 Marsman WA, van Sandick JW, Tytgat GN, ten Kate FJ, van Lanschot JJ. The presence and mucin histochemistry of cardiac type mucosa at the esophagogastric junction. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 212-217
- 18 Walther C, Zilling T, Perfekt R, Möller T. [Strongly increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia]. *Lakartidningen* 2004; 101: 180-183
- 19 李兆申,徐晓蓉,许国铭,邹多武,孙振兴,王雯,叶萍,陆建萍. 反流性食管炎的临床特征分析. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 315-318

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

BAFF及受体BAFF-R在 I 型自身免疫性肝炎中的表达及其临床意义

梁伊乐, 徐芸, 孙会潇

梁伊乐, 徐芸, 孙会潇, 郑州大学第一附属医院消化内科1病区 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 本文文献检索、实验设计、标本收集、实验操作、资料分析及论文撰写由梁伊乐完成; 孙会潇协助标本收集; 选题、指导及审校由徐芸完成。

通讯作者: 徐芸, 教授, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科. xuyun@medmail.com.cn

电话: 0371-66295922

收稿日期: 2010-09-14 修回日期: 2010-10-18

接受日期: 2010-10-26 在线出版日期: 2011-01-08

Clinical significance of serum BAFF level and percentage of BAFF-R-positive B cells in patients with type I autoimmune hepatitis

Yi-Le Liang, Yun Xu, Hui-Xiao Sun

Yi-Le Liang, Yun Xu, Hui-Xiao Sun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Yun Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn

Received: 2010-09-14 Revised: 2010-10-18

Accepted: 2010-10-26 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To detect serum level of B-lymphocyte activating factor (BAFF) and percentage of B cells positive for B-cell activating factor receptor (BAFF-R) on B cells in patients with type I autoimmune hepatitis (AIH-I) and to analyze their relations to the clinical features of AIH-I.

METHODS: Thirty patients with AIH-I and 30 healthy subjects were included in the study. Serum BAFF was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the percentage of BAFF-R-positive B cells was measured by flow cytometry. Meanwhile, serum levels of ALT, AST, GLO, CRP and IgG were measured.

RESULTS: There were significant differences in mean serum BAFF level and percentage of BAFF-R-positive B cells between AIH-I patients

and healthy subjects ($747.83 \text{ ng/L} \pm 66.96 \text{ ng/L}$ vs $203.50 \text{ ng/L} \pm 43.99 \text{ ng/L}$; $18.78\% \pm 5.08\%$ vs $1.98\% \pm 0.89\%$, both $P < 0.05$). There is a positive correlation between serum BAFF level and percentage of BAFF-R-positive B cells in AIH-I patients ($P < 0.05$). Significant differences were noted in mean serum BAFF and percentage of BAFF-R-positive B cells in AIH-I patients between before and after treatment (BAFF: $747.83 \text{ ng/L} \pm 66.96 \text{ ng/L}$ vs $582.83 \text{ ng/L} \pm 51.89 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$; BAFF-R: $18.78\% \pm 5.08\%$ vs $9.93\% \pm 3.53\%$, $P < 0.05$). Serum BAFF level and percentage of BAFF-R-positive B cells showed no correlation with serum ALT, AST, GLO, CRP, or IgG in AIH-I patients (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The level of serum BAFF and percentage of BAFF-R-positive B cells are significantly increased in AIH-I patients but significantly descended after treatment.

Key Words: Autoimmune hepatitis; B-lymphocyte activating factor; B-cell activating factor receptor; Flow cytometry; Enzyme-linked immunosorbent assay

Liang YL, Xu Y, Sun HX. Clinical significance of serum BAFF level and percentage of BAFF-R-positive B cells in patients with type I autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 89-93

摘要

目的: 探讨外周血B淋巴细胞活化因子(BAFF)和B淋巴细胞活化因子受体(BAFF-R)之间的相关性以及两者与I型自身免疫性肝炎(AIH-I)患者临床特征的关系。

方法: 检测30例AIH-I患者治疗前后外周血BAFF(酶联免疫吸附法)及BAFF-R(流式细胞仪)的表达水平和30名健康志愿者外周血中二者的表达水平, 同时收集实验对象相应的IgG、ALT、AST、GLO、CRP检查结果, 通过SPSS统计软件进行分析。

结果: AIH-I患者外周血BAFF及BAFF-R水平较正常对照组有统计学差异(747.83 ng/L

■背景资料

自身免疫性肝病是一组免疫介导的肝脏损伤, 以AIH-I最为常见。该病的临床表现不具有明显的特异性, 早期的诊断和治疗有利于延缓疾病的进展和提高患者的生存质量。因此, 探讨AIH-I的发病机制、寻找特异性强并且能够评价疾病治疗效果的生化指标就成为当今对AIH-I临床和基础研究的主要方向。

■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市立医院肝病内科

■创新盘点

本实验应用ELISA和流式细胞仪分别检测BAFF和BAFF-R在AIH-I中的表达及其在临床治疗前后的变化,在一定程度上为AIH-I的早期诊断以及评价临床治疗效果提供了新的的重要参考指标。

$\pm 66.96 \text{ ng/L}$ vs $203.50 \text{ ng/L} \pm 43.99 \text{ ng/L}$; $18.78\% \pm 5.08\%$ vs $1.98\% \pm 0.89\%$, 均 $P < 0.05$); AIH-I患者外周血BAFF与BAFF-R水平呈正相关($P < 0.05$); AIH-I患者外周血BAFF及BAFF-R水平在治疗前后有统计学差异($747.83 \text{ ng/L} \pm 66.96 \text{ ng/L}$ vs $582.83 \text{ ng/L} \pm 51.89 \text{ ng/L}$; $18.78\% \pm 5.08\%$ vs $9.93\% \pm 3.53\%$, 均 $P < 0.05$); AIH-I患者外周血BAFF及BAFF-R水平与疾病活动指标(IgG、ALT、AST、GLO、CRP)水平无明显相关(均 $P > 0.05$)。

结论: AIH-I患者外周血BAFF与BAFF-R水平明显升高, 激素治疗前后差异显著, 二者与疾病的发展过程相关, 对评价疾病的治疗具有一定的指导意义。

关键词: 自身免疫性肝炎; B淋巴细胞活化因子; B细胞活化因子受体; 流式细胞; 酶联免疫吸附法

梁伊乐, 徐芸, 孙会潇. BAFF及受体BAFF-R在I型自身免疫性肝炎中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 89-93

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/89.asp>

0 引言

B淋巴细胞活化因子(B lymphocyte activating factor, BAFF)于1999年被发现, 属于肿瘤坏死因子超家族的成员^[1]. 相关研究发现, BAFF在B淋巴细胞的生存和成熟过程中发挥着重要的作用. BAFF通过与其受体结合发挥作用, 其受体分别为B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)、穿膜蛋白活化物(transmembrane activator and CAML interactor, TACI)、B细胞活化因子受体(BA FF receptor, BAFF-R)^[2], 3个受体中BAFF-R与BAFF的结合具有特异性, 在BAFF发挥作用的过程中扮演着十分重要的角色. 越来越多的研究发现, BAFF的异常与自身免疫性疾病的发生、发展有着密切的关系^[3,4]. 本研究主要探讨BAFF及B淋巴细胞活化因子受体(B cell activating factor receptor, BAFF-R)在I型自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis type-I, AIH-I)中的表达以及二者与AIH-I临床特点之间的关系, 以进一步明确二者在AIH-I发病和治疗过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 郑州大学第一附属医院消化内科2009-07/2010-07住院部AIH-I患者30例, 均为女性, 年龄32-63岁, 均符合1998年国际AIH小组制

定的AIH诊断评分标准^[5], 满足激素治疗标准, 入组前均未进行免疫治疗, 除外遗传性疾病(Wilson病、 $\alpha 1$ -胰蛋白酶缺乏症和遗传性血色病)、感染性疾病(甲型肝炎、乙型肝炎及丙型肝炎等)和药物性肝脏损害(米诺霉素、呋喃坦啶、异烟肼、丙硫氧嘧啶和 α 甲基多巴等所致)、酒精性肝损伤、肿瘤性疾病. 郑州大学第一附属医院体检中心30例健康志愿者, 均为女性, 年龄30-60岁, 体检结果均无明显异常, 近3 mo来未患感染性疾病。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 根据标准治疗方案符合单一应用糖皮质激素治疗. 选用甲泼尼龙48 mg/d, 1 wk; 40 mg/d, 1 wk; 32 mg/d, 1 wk; 24 mg/d, 2 wk; 16 mg/d维持治疗。

1.2.2 BAFF的检测: (1)通过静脉穿刺的方法收集研究对象外周血2 mL, 置于EDTA-K2抗凝试管中, 静置20 min后离心, 以3 000 r/min离心20 min, 收集上清编号后保存于-20℃的冰箱中待测; (2)将标本收集完毕后, 按照ELISA试剂盒(RD公司)说明逐步进行操作, 测出样本的A值, 制作标准曲线, 根据酶标仪显示的结果得出样本的浓度。

1.2.3 BAFF-R的检测: (1)通过静脉穿刺的方法收集研究对象外周血2 mL, 置于EDTA-K2抗凝试管中, 从样本中取100 μL 全血置于检测管中, 在检测管中分别加入10 μL PE标记CD19单抗(CR5019, 广州长瑞生物公司)、10 μL FITC标记BAFF-R单抗(11-9117, eBioscience公司), 避光室温静置20 min后, 加入2 mL溶血素(BD公司), 混匀室温避光静置10 min后, 离心、弃上清, 加缓冲液3 mL洗涤, 再次离心、弃上清, 加多聚甲醛固定待测; (2)将待测标本置于流式细胞仪上, 通过软件自动分析获得BAFF-R的表达率。

1.2.4 其他指标的检测: HITACHI7600-020 Automatic Analyzer检测血清丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、球蛋白(globin, GLO)水平, Nephstar™ Nephelometric Kit(国赛GOL SITE深圳市国赛生物技术有限公司产品编号: DK022)检测血清C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平, Nephstar™ Nephelometric Kit(国赛GOL SITE深圳市国赛生物技术有限公司产品编号: DK022)检测血清IgG水平。

统计学处理 相关数据采用SPSS17.0进行统计分析. 计量数据采用mean \pm SD表示; 组间差异比较采用两组独立样本资料t检验; 治疗前后

比较采用配对设计资料 t 检验; 两变量之间相关性采用Pearson(双变量正态分布)、Spearman(非正态分布)直线回归分析法, 并求相关系数 r ; 显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 BAFF AIH-I组与健康对照组外周血BAFF表达水平具有明显的差异性($747.83 \text{ ng/L} \pm 66.96 \text{ ng/L}$ vs $203.50 \text{ ng/L} \pm 43.99 \text{ ng/L}$, $t = 37.21$, $P < 0.05$)。AIH-I组治疗前后外周血BAFF表达水平具有明显的差异性($747.83 \text{ ng/L} \pm 66.96 \text{ ng/L}$ vs $582.83 \text{ ng/L} \pm 51.89 \text{ ng/L}$, $t = 10.67$, $P < 0.05$)。实验结果显示, AIH-I患者外周血BAFF表达水平与生化及炎症指标(ALT、AST、GLO、CRP、IgG)表达水平无明显相关性($P > 0.05$, 表1)。

2.2 BAFF-R 应用流式细胞仪检测外周血CD19⁺B细胞表面BAFF-R(%)表达水平(单抗为CD268)结果如图1所示。AIH-I组与健康对照组外周血BAFF-R(%)表达水平具有明显的差异性(18.78 ± 5.08 vs 1.98 ± 0.89 , $t = 17.86$, $P < 0.05$)。AIH-I组治疗前后外周血BAFF-R(%)表达水平具有明显的差异性(18.78 ± 5.08 vs 9.93 ± 3.53 , $t = 7.85$, $P < 0.05$)。实验结果显示, AIH-I患者外周血BAFF-R(%)表达水平与生化及炎症指标(ALT、AST、GLO、CRP、IgG)表达水平无明显相关性($P > 0.05$, 表2)。

2.3 AIH-I患者外周血BAFF与BAFF-R(%)表达水平的相关性 AIH-I患者外周血BAFF与BAFF-R(%)表达呈中等强度相关($r = 0.49$, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究探讨的是I型AIH。AIH以女性多见, 在我国以中老年女性多见。临床特点为高丙种球蛋白血症、血清自身抗体和对免疫抑制治疗应答^[6]。无特异性的症状和体征, 常出现疲劳、食欲减退、恶心、腹痛、瘙痒及小关节疼痛等症状。体格检查常无异常, 但也可有肝脾肿大、黄疸以及慢性肝炎的症状和体征。约10%的患者可表现为急性肝炎甚至暴发性肝炎, 并可快速进展至肝硬化^[7]。根据自身抗体谱将其分为2个血清学亚型^[8]。I型AIH最为常见, 约占AIH的60%-80%, 抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗可溶性肝抗原/肝胰抗原抗体阳性或核周型抗中性粒细胞胞浆抗体阳性为其特征。

BAFF是B淋巴细胞存活与成熟的必需因子, 也被称为肿瘤坏死因子和凋亡配体相关的白细

表 1 AIH-I患者BAFF与生化及炎症指标相关性分析

生化及炎症指标	BAFF	
	r 值	P 值
ALT	0.158	0.403
AST	0.243	0.195
GLO	0.186	0.325
CRP	-0.202	0.284
IgG	0.223	0.236

表 2 AIH-I患者BAFF-R(%)与生化及炎症指标相关性分析

生化及炎症指标	BAFF-R(%)	
	r 值	P 值
ALT	0.185	0.328
AST	0.142	0.455
GLO	0.008	0.968
CRP	0.260	0.891
IgG	0.239	0.204

■应用要点

本实验证实了BAFF和BAFF-R与AIH-I的发生及进展具有明显的相关性, 为进一步揭示AIH-I的发病机制提供了新的线索和思路。二者在治疗前后表现出的明显差异性, 又为评价AIH-I的治疗效果提供了新的参考指标。

胞表达配体, 为肿瘤坏死因子家族成员。BAFF有膜结合蛋白和可溶性配体(human soluble BAFF, hsBAFF)两种形式存在。本研究研究指标为hsBAFF。它能够增强B淋巴细胞、CD4 T淋巴细胞、NK细胞的活性, 使机体的免疫应答增强。BAFF受体有3种: BCMA、TACI和BAFF-R, 主要表达在B淋巴细胞上, 3个受体中, 唯有BAFF-R与BAFF的结合具有特异性, 主要表达在CD19 B淋巴细胞上, 在BAFF的生化作用中起着最重要的作用。

本文关于BAFF及其受体BAFF-R在AIH-I中的研究在国内外尚属首例。相关研究表明, B淋巴细胞在自身免疫疾病中起到了重要作用, 而BAFF与BAFF-R结合使B淋巴细胞活化为浆细胞, 分泌大量免疫球蛋白, 包括自身抗体, 使机体出现炎症反应和免疫性损伤^[9]。

本研究检测了30例AIH-I患者治疗前后和30例健康志愿者外周血BAFF及BAFF-R的表达水平, 结果表明AIH-I组与健康组相比较^[10]、AIH-I组治疗前后相比较, BAFF及BAFF-R的表达均具有明显差异性($P < 0.05$), 提示可将BAFF及BAFF-R的检测作为AIH-I诊断和治疗的辅助指标。这与国内在其他自身免疫性疾病如类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)中的研究具有一致性^[11], 国内关于原发性胆汁肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)的研究中BAFF水

■同行评价

本文新颖性较好,对评价疾病的治疗具有一定的指导意义。

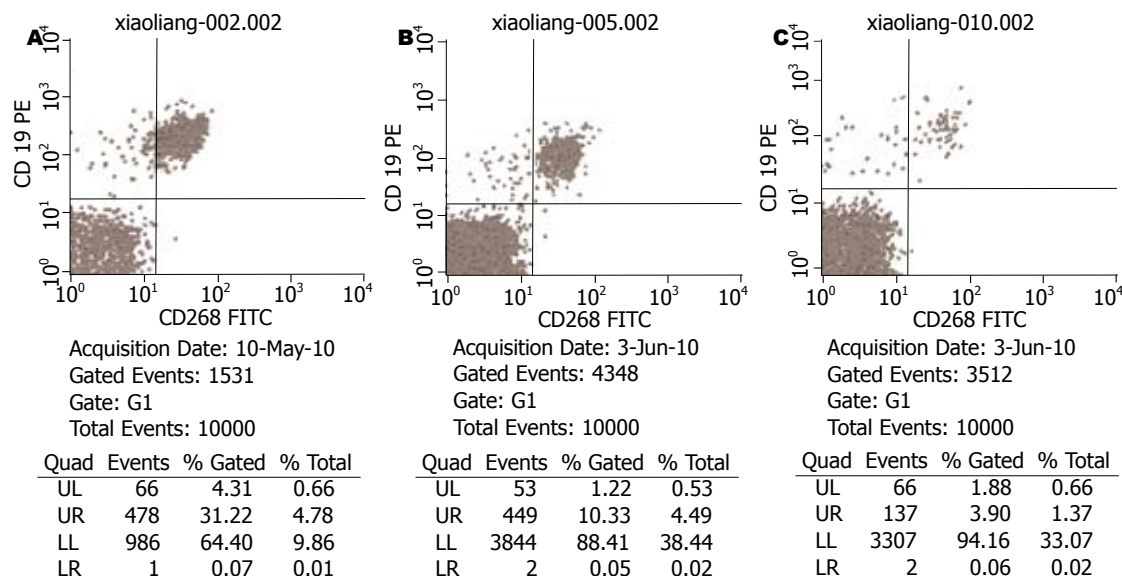


图1 流式细胞仪检测外周血CD19⁺B细胞表面BAFF-R(%)表达水平(单抗为CD268). A: AIH-I患者治疗前; B: AIH-I患者治疗8 wk后; C: 健康志愿者对照组。

平显著升高^[12], 亚洲其他国家也有类似的研究报道^[13], 但在国外白人的PBC研究中BAFF水平并不显著升高^[14]。

实验中关于BAFF及BAFF-R与临床生化及炎症指标(ALT、AST、GLO、CRP、IgG)相关性的研究表明, 现有的数据不能说明前者与后者存在相关性($P>0.05$), 提示BAFF还不能作为AIH-I活动与否的指标, BAFF对B淋巴细胞的激活可能不是通过产生抗体而是通过其他途径导致机体免疫紊乱, 这与Becker-Merok等关于BAFF在RF中的表达的研究结果相一致^[15]。

研究结果还显示AIH-I中BAFF与BAFF-R的表达具有中等强度的相关性($r = 0.49$, $P<0.05$), 并且经过激素的治疗后, 二者的水平均显著降低, 提示二者的表达参与了AIH-I的病理发展过程, 从一定程度上说明抑制BAFF与BAFF-R的相互作用将干扰AIH-I的病理过程, 从而阻碍或延缓疾病的发展过程。这与当前在其他自身免疫性疾病中如SLE、RF中以BAFF为目标的单抗治疗的研究相符合。BAFF能够有效参与并促进T、B淋巴细胞的活化, 他的过量表达与自身免疫疾病密切相关^[16]。因此, BAFF及其受体作为治疗自身免疫疾病的新靶标, 目前受到广泛的关注。

本实验初步探讨了AIH-I中BAFF及BAFF-R的表达, 研究了二者与临床相关检查指标之间的相关性, 属于小样本小范围的研究, 但相关研究在国内外未见报道, 欲进一步探讨二者与临床特征之间的关系及机制, 还需要大样本、多

中心的研究。

4 参考文献

- Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 1999; 285: 260-263
- 杜建芳, 王嘉玺, 徐东刚. B细胞激活因子在免疫调节中的作用. *中国实验血液学杂志* 2006; 14: 631-634
- Moisini I, Davidson A. BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 2009; 158: 155-163
- 李晓琳, 侯宗柳. BAFF信号的免疫调节作用. *国际免疫学杂志* 2006; 29: 368-372
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938
- Granito A, Muratori P, Ferri S, Pappas G, Quarneri C, Lenzi M, Bianchi FB, Muratori L. Diagnosis and therapy of autoimmune hepatitis. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 847-860
- Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354: 54-66
- Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002; 13: 293-303
- 文爱清, 王军, 杨运森, 陈伟, 张志成, 刘重阳. 抗环瓜氨酸肽抗体及相关自身抗体对类风湿关节炎诊断的应用评价. *重庆医学* 2008; 37: 262-263, 265
- Migita K, Abiru S, Maeda Y, Nakamura M, Komori

- A, Ito M, Fujiwara S, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Elevated serum BAFF levels in patients with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2007; 68: 586-591
- 11 王燕, 窦恒利, 耿红荣, 钱琤, 梁艳, 陆慧琦, 朱焱, 仲人前. 增殖诱导配体在自身免疫病患者外周血中的表达. *现代免疫学* 2006; 26: 408-412
- 12 Liang Y, Yang ZX, Zhu Y, Wang Y, Zeng XM, Deng AM, Zhong RQ. [Study on association of BAFF receptors gene expression and primary biliary cirrhosis] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 128-130
- 13 Migita K, Ilyassova B, Kovzel EF, Nersesov A, Abiru S, Maeda Y, Komori A, Ito M, Yano K, Yatsushashi H, Shimoda S, Ishibashi H, Nakamura M. Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC. *Clin Immunol* 2010; 134: 217-225
- 14 Mackay IR, Groom J, Mackay CR. Levels of BAFF in serum in primary biliary cirrhosis and autoimmune diabetes. *Autoimmunity* 2002; 35: 551-553
- 15 Becker-Merok A, Nikolaisen C, Nossent HC. B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time. *Lupus* 2006; 15: 570-576
- 16 郑召岭, 蔡辉. BAFF在自身免疫性疾病中的作用. *重庆医学* 2009; 38: 359-361

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

*k-ras*基因突变的定量检测在胰腺疾病诊断中的应用

顾俊俊, 高军, 路华, 李兆申

■背景资料

单纯的*k-ras*基因突变定性检测对于胰腺疾病的诊断并不是十分准确, 而*k-ras*基因突变的定量检测的结果可能揭示即使同时存在*k-ras*基因突变, 其突变比例的高低不同, 可能更加有利于对胰腺疾病的鉴别诊断。

顾俊俊, 高军, 路华, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

作者贡献分布: 此课题主要由高军与李兆申设计; 研究过程由顾俊俊操作完成; 临床病理资料由顾俊俊与路华完成; 数据分析与论文写作由顾俊俊完成。

通讯作者: 李兆申, 教授, 200433, 上海市长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科。

zhsclchxh@163.com

电话: 021-55620081

收稿日期: 2010-10-13 修回日期: 2010-11-18

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2011-01-08

Quantitative detection of *k-ras* codon 12 mutation in pancreatic diseases

Jun-Jun Gu, Jun Gao, Hua Lu, Zhao-Shen Li

Jun-Jun Gu, Jun Gao, Hua Lu, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Professor Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 168 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zhsclchxh@163.com

Received: 2010-10-13 Revised: 2010-11-18

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To evaluate the value of quantitative detection of a *k-ras* gene mutation at codon 12 in the diagnosis of pancreatic diseases.

METHODS: *k-ras* codon 12 mutation was quantitatively detected by peptide nucleic acid-mediated real-time PCR clamping in blood samples from 143 patients with pancreatic cancer, 110 patients with chronic pancreatitis, and 28 disease-free people. The results were analyzed using SPSS 18.0.

RESULTS: The positive rates of *k-ras* codon 12 mutation in patients with pancreatic cancer, those with chronic pancreatitis and normal disease-free people were 51.75%, 37.27% and 7.14%, respectively. The percentages of *k-ras* gene mutation in the above three groups of patients were $0.821\% \pm 0.287\%$, $0.200\% \pm 0.064\%$ and $0.080\% \pm 0.056\%$, respectively. *k-ras* codon 12 mutation had no significant correlation with gender, age,

smoking, alcohol, TNM stage, and clinical stage in patients with pancreatic cancer.

CONCLUSION: Quantitative detection of *k-ras* codon 12 mutation can be used to distinguish different pancreatic diseases.

Key Words: Pancreatic disease; *k-ras* gene; Mutation; Quantitative detection

Gu JJ, Gao J, Lu H, Li ZS. Quantitative detection of *k-ras* codon 12 mutation in pancreatic diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 94-97

摘要

目的: 探讨*k-ras*基因第12密码子突变的定量检测在胰腺疾病鉴别诊断中的价值及其意义。

方法: 应用肽核酸钳制实时荧光定量PCR方法检测143例胰腺癌、110例慢性胰腺炎以及28名正常人的血液中*k-ras*基因第12密码子的突变, 并分析其与相关临床指标的关系。

结果: 胰腺癌、慢性胰腺炎和正常人血液中*k-ras*基因的突变阳性率分别为51.75%、37.27%和7.14%。*k-ras*基因的突变比例分别为 $0.821\% \pm 0.287\%$ 、 $0.200\% \pm 0.064\%$ 和 $0.080\% \pm 0.056\%$ 。慢性胰腺炎和正常人即使存在*k-ras*突变, 其突变比例通常也较胰腺癌低。胰腺癌患者血液的*k-ras*突变情况与性别、年龄、吸烟、饮酒、肿瘤TNM分期与临床分期无明显相关。

结论: 肽核酸钳制实时荧光定量PCR方法可用于胰腺疾病的鉴别诊断。

关键词: 胰腺疾病; *k-ras*基因; 突变; 定量检测

顾俊俊, 高军, 路华, 李兆申. *k-ras*基因突变的定量检测在胰腺疾病诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 94-97
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/94.asp>

0 引言

*k-ras*作为一种癌基因是目前人类研究最为关注的肿瘤相关基因之一。*k-ras*基因突变常见于胰

■同行评议者

韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

腺癌、结直肠癌和肺癌等疾病,其通常发生于第12、13和61密码子。在胰腺癌中*k-ras*基因的突变>90%^[1-3],并且集中于第12密码子,突变类型中GAT、GTT和CGT 3种突变类型更是占有第12密码子突变的99%以上。而*k-ras*基因的突变通常被认为是胰腺癌发生的早期事件^[4],并且*k-ras*基因的突变率从正常胰腺导管细胞、慢性胰腺炎的扁平或者乳头状异性增生到胰腺癌,其突变率逐步升高^[5,6]。因此,单纯的*k-ras*基因突变定性检测对于胰腺疾病的诊断并不是十分准确,而*k-ras*基因突变的定量检测的结果可能揭示即使同时存在*k-ras*基因突变,其突变比例的高低不同,可能更加有利于对胰腺疾病的鉴别诊断。

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科2008-07/2010-08有完整病例资料的胰腺癌患者143例、慢性胰腺炎110例以及正常志愿者28例的外周血。所有病例均经病史、临床表现、实验室及影像学检查确诊。

1.2 方法

1.2.1 血液样本DNA的抽提:抗凝全血1 mL加入500-700 μ L TT缓冲液,剧烈振荡后,低温离心机12 000 r/min,离心5 min;收集沉淀加入200 μ L PCR裂解液A;37 $^{\circ}$ C水浴过夜。抽取PCR裂解物(约200 μ L),加入200 μ L酚氯仿,充分混匀后,12 000 r/min,离心20 min;取上清,加入200 μ L氯仿充分混匀,12 000 r/min,离心10 min;取上清,加入100 μ L乙酸铵及2倍体积无水乙醇(约700 μ L)充分混匀,静置1 min后,12 000 r/min,离心10 min。弃上清加入1 mL 70%乙醇洗涤,12 000 r/min,离心5 min;弃上清,自然风干,用100 μ L TE液溶解沉淀,应用NanoDrop ND-1000全波长紫外/可见光扫描分光光度计测出浓度。分装于-80 $^{\circ}$ C保存。

1.2.2 *k-ras*基因第12密码子突变的检测:肽核酸钳制实时荧光定量PCR法检测突变。PNA是针对野生型*k-ras*基因第12、13密码子设计的PNA,由韩国Panagene公司合成,其组成为:NH₂-CCTACGCCACCAGCTCC-COOH。*k-ras*-FAM TagMan MGB探针由美国Applied Biosystems公司合成,其组成分别为野生型*k-ras*探针GGT: FAM-CTACGCCACCAGCTCCAAC-TMGB;突变型*k-ras*探针GAT: FAM-CTACGCCATCAGCTCCAAC-TMGB;GTT: FAM-CTACGCCAACAGCTCCAAC-TMGB;

CGT: FAM-CTACGCCACGAGCTCCAAC-TMGB。PCR引物由美国Applied Biosystems公司合成。上游引物F: 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAAT-3';下游引物R: 5'-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'。TaqMan Gene Expression Master Mix购买于美国Applied Biosystems公司。*k-ras*基因野生型标准品GGT和*k-ras*基因突变型标准品GAT、GCT、GTT、AGT、CGT、TGT由上海Invitrogen公司合成,将模板倍比稀释为10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、0拷贝,作为标准品模板。仪器选用ABI公司的7500型实时定量PCR仪。反应体系包括: TaqMan Gene Expression Master Mix 12.5 μ L,上下游引物各0.5 μ L(5 μ mol/L), PNA 1 μ L(10 μ mol/L), MGB探针各0.3 μ L(10 μ mol/L), DNA标准品模板为10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、0拷贝,用无菌双蒸水定容至25 μ L。PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性10 min,之后95 $^{\circ}$ C变性15 s, 76 $^{\circ}$ C PNA结合15 s, 60 $^{\circ}$ C退火60 s,共50个循环。

1.2.3 *k-ras*基因第12密码子突变定量的分析:采用标准品绝对定量PCR的方法得到每个样本的*k-ras*野生型和*k-ras*突变型的量。*k-ras*基因突变比例定义为*k-ras*突变型/(*k-ras*野生型+*k-ras*突变型)。通过数据转化可以得到每个样本所对应的*k-ras*基因突变比例,以用于统计学分析。

统计学处理 采用SPSS18.0医学统计软件进行统计分析。计量资料用mean \pm SD表示。各组目的基因的突变量的比较采用Mann-Whitney U检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *k-ras*基因在胰腺癌、慢性胰腺炎和正常人血液中的突变情况 胰腺癌、慢性胰腺炎和正常人血液中*k-ras*基因的突变阳性率分别为51.75%、37.27%和7.14%。*k-ras*基因的突变比例分别为0.821% \pm 0.287%、0.200% \pm 0.064%和0.080% \pm 0.056%(表1)。胰腺癌的*k-ras*基因的突变比例明显高于慢性胰腺炎和正常人,其各组之间均有显著差异($P<0.05$,图1)。慢性胰腺炎和正常人即使存在*k-ras*突变,其突变比例也较胰腺癌低。

2.2 *k-ras*基因突变比例与胰腺癌患者临床病理指标的关系 胰腺癌患者血液的*k-ras*突变比例与性别、年龄、吸烟、饮酒、肿瘤TNM分期与临床分期无明显相关(表2)。

3 讨论

近年来,许多研究表明恶性肿瘤细胞内的DNA

■相关报道

Shi等在研究胰腺癌和慢性胰腺炎胰液中的*k-ras*基因的定量检测中,发现*k-ras*的突变比例在胰腺癌组中明显高于慢性胰腺炎组,并且所有胰腺癌组中胰液的*k-ras*突变类型与原发肿瘤相一致。

■创新盘点

本研究揭示了即使以往的定性检测实验提示*k-ras*基因突变的存在,其突变比例的也存在高低不同,可能更加适用于对胰腺疾病的鉴别诊断、治疗和预后。

■应用要点

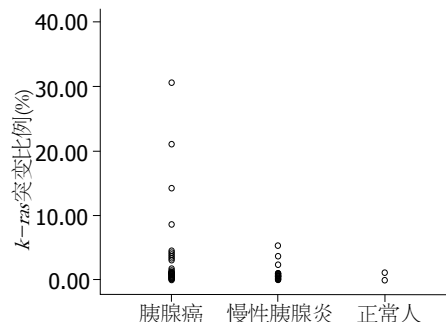
本实验研究结果提示*k-ras*基因在胰腺癌和慢性胰腺炎患者的血液中的突变比例不同,其结果可能有助于通过不同的突变量来区分胰腺疾病,并且可能对于胰腺癌的预后有提示。

表 1 胰腺癌、慢性胰腺炎和正常人群的*k-ras*基因突变阳性率和突变比例

疾病分类	<i>n</i>	<i>k-ras</i> 基因突变阳性率 <i>n</i> (%)	<i>k-ras</i> 基因突变比例(%)
胰腺癌	143	74(51.75)	0.821 ± 0.287
慢性胰腺炎	110	41(37.27)	0.200 ± 0.064
正常人群	28	2(7.14)	0.080 ± 0.056

表 2 *k-ras*基因突变比例与临床病理参数间的相关性

临床病理参数	突变比例(%)	<i>P</i> 值
性别		0.480
男性	1.000 ± 0.411	
女性	0.430 ± 0.205	
年龄(岁)		0.828
≥60	0.696 ± 0.369	
<60	0.850 ± 0.564	
吸烟		0.908
是	1.696 ± 0.991	
否	0.334 ± 0.095	
饮酒		0.614
是	3.186 ± 2.759	
否	0.504 ± 0.203	
肿瘤大小(cm)		0.484
≥2	0.117 ± 0.050	
<2	0.837 ± 0.035	
淋巴管侵犯		0.313
是	1.102 ± 0.656	
否	0.444 ± 0.137	
临床分期		0.248
I + II 期	0.278 ± 0.117	
III + IV 期	0.901 ± 0.409	

图 1 胰腺癌、慢性胰腺炎和正常人血液中*k-ras*突变比例。

GTT以及CGT 3种最为常见的突变类型。既往研究证实^[10], *k-ras*基因第12密码子突变类型多, 同一肿瘤标本或者不同的肿瘤标本中也可能同时存在多种的*k-ras*第12密码子的突变, 不可避免的减少了检测的敏感性。

Tada等^[11]用采用*k-ras*基因定量检测胰腺疾病EUS-FNA标本提示胰腺癌的*k-ras*基因突变高于慢性胰腺炎, 而其在良性胰腺病变中, *k-ras*基因即使存在突变, 其突变比例也较低。并且, 通过联合*k-ras*基因突变和细胞学检查有助于提高胰腺癌的准确诊断率。

Shi等^[12]在研究胰腺癌和慢性胰腺炎胰液中的*k-ras*基因的定量检测中, 发现*k-ras*的突变比例在胰腺癌组中明显高于慢性胰腺炎组, 并且所有胰腺癌组中胰液的*k-ras*突变类型与原发肿瘤相一致。在胰腺组中*k-ras*突变比例比慢性胰腺炎组中*k-ras*突变比例要高出很多(0.05%-82.00% vs 0.00%-0.70%)。因此, *k-ras*基因突变的定量检测, 尤其是对于通过血液、胰液、粪便等非创伤检测有望成为胰腺癌筛查的有效手段。

当然, 在临床上以单一的分子生物学指标来确诊胰腺癌是不够的。除了*k-ras*基因, *p53*、*p16*、*DPC4*等基因也常用于胰腺癌的诊断^[13,14]。近年来, 基因甲基化和microRNA的众多研究为胰腺癌的联合诊断提供了有利条件。虽然本实验研究结果提示*k-ras*基因在胰腺癌和慢性胰腺炎患者的血液中的突变比例不同, 其结果可能

会出现在血清或者血浆之中。Leon^[7]及Shapiro等^[8]检测了正常人及消化系良、恶性疾病患者的血浆游离DNA水平, 正常人血浆DNA含量平均是13 μg/L, 良、恶性疾病患者分别是118 μg/L和412 μg/L, 胰腺癌患者可高达650 μg/L。血浆中突变的基因多与原发灶的突变类型一致, 猜测可能是血循环中破碎的肿瘤细胞释放的DNA^[9]。因此, 通过检测外周血DNA的基因型或者突变来诊断肿瘤是一个值得探讨的领域。

在本研究中, 我们联合应用了肽核酸钳制技术和实时定量荧光PCR技术来定量检测胰腺癌、慢性胰腺炎和正常人的*k-ras*第12密码子突变量及其突变比例。在进行肽核酸钳制实时定量PCR时, 选用了针对*k-ras*基因第12密码子的TaqMan探针作为荧光显示物。它具有高特异性的特点, 每一种探针只能检测第12密码子的一种类型突变。我们在实验中设计了针对于GAT、

■名词解释

*k-ras*基因突变比例: 为*k-ras*突变型/(*k-ras*野生型+*k-ras*突变型)。肽核酸(PNA)是一种DNA类似物, 其将正常DNA的磷酸二酯骨架由2-氨基-甘氨酸所取代。PNA较之传统的探针具有许多优点, 且可运用于实时定量PCR检测。

有助于通过不同的突变量来区分胰腺疾病, 并且可能对于胰腺癌的预后提示。但是由于本实验的样本量较少, 胰腺癌患者的临床资料缺乏有效的生存时间。因此, 我们需要更多的样本和临床资料来完善这一结果。

4 参考文献

- 1 Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-554
- 2 Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143: 545-554
- 3 Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 2000; 156: 1821-1825
- 4 Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2004; 28: 257-262
- 5 van Laethem JL. Ki-ras oncogene mutations in chronic pancreatitis: which discriminating ability for malignant potential? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 210-218
- 6 Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cléau D, Heyd B, Manton G, Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 700-704
- 7 Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650
- 8 Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-2120
- 9 Castells A, Puig P, Móra J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Solé M, Capellà G, Lluís F, Fernández-Cruz L, Navarro S, Farré A. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17: 578-584
- 10 Däbritz J, Hänfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes. *Br J Cancer* 2005; 92: 405-412
- 11 Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, Shiratori Y, Omata M. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263-2270
- 12 Shi C, Fukushima N, Abe T, Bian Y, Hua L, Wendelburg BJ, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins MG, Eshleman JR. Sensitive and quantitative detection of KRAS2 gene mutations in pancreatic duct juice differentiates patients with pancreatic cancer from chronic pancreatitis, potential for early detection. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 353-360
- 13 Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1731-1734
- 14 Eskelinen MJ, Haglund UH. Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods. *Eur J Surg* 1999; 165: 292-306

■同行评价

本文选题较好, 具有一定的学术价值, 对胰腺疾病的鉴别诊断有重要的临床意义。

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

Karmali和Columbia培养基初次分离幽门螺杆菌效果的比较

何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中

■背景资料

分离培养是 *H.pylori* 感染诊断的金标准之一, 也是获得 *H.pylori* 培养物的必须途径。但由于 *H.pylori* 体外生长条件苛刻, 营养要求高, 所以分离培养比较困难。目前世界范围内 *H.pylori* 的分离培养成功率为 50%-70%, 因此选用能够提高培养阳性率、缩短培养时间的培养基非常重要。

何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室 北京市 102206 国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BAI04B02
作者贡献分布: 张建中负责本课题的总体设计和实施; 何利华负责标本收集, 细菌培养和数据分析并起草论文; 张茂俊、刘国栋及乔博参与数据整理与文章撰写; 张慧芳参与细菌分离培养。
通讯作者: 张建中, 102206, 北京市昌平区流村路5号, 中国疾病预防控制中心传染病所。 helico99@sina.com
电话: 010-58900707 传真: 010-58900700
收稿日期: 2010-10-21 修回日期: 2010-12-02
接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-01-08

Comparison of Karmali agar medium and Columbia agar medium for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens

Li-Hua He, Mao-Jun Zhang, Guo-Dong Liu, Hui-Fang Zhang, Bo Qiao, Jian-Zhong Zhang

Li-Hua He, Mao-Jun Zhang, Guo-Dong Liu, Hui-Fang Zhang, Bo Qiao, Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2007BAID4B02

Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 5 Liuzi, Changping District, Beijing 102206, China. zhangjianzhong@icdc.cn

Received: 2010-10-21 Revised: 2010-12-02

Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To compare the isolation rates of the *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) from gastric biopsy specimens achieved using Karmali and Columbia agar media.

METHODS: Gastric biopsy specimens were collected from 168 *H.pylori*-positive patients and cultivated on Karmali and Columbia agar plates under microaerophilic conditions (5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂). Single colonies of *H.pylori* were identified by biochemical test and PCR. The isolation rates of *H.pylori* achieved using the two types of media at 24, 48, 72, and 96 h were

compared.

RESULTS: There was no significant difference in the isolation rate between Karmali and Columbia agar at 24 h ($P = 0.125$). In contrast, the isolation rates achieved using Karmali agar at 48, 72 and 96 h were significantly higher than those using Columbia agar (82.1% vs 45.8%, 94.6% vs 79.2%, 97.0% vs 88.7%, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Higher isolation rate of *H.pylori* from gastric biopsy specimens was achieved with Karmali agar than with Columbia agar. Karmali agar can be used as an effective medium for isolation of *H.pylori* from gastric biopsy specimens.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Solid medium; Gastric biopsy; Isolation culture

He LH, Zhang MJ, Liu GD, Zhang HF, Qiao B, Zhang JZ. Comparison of Karmali agar medium and Columbia agar medium for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 98-101

摘要

目的: 比较两种基础培养基对幽门螺杆菌 (*H.pylori*) 感染者的胃黏膜标本初次分离率的差异。

方法: 将168份¹³C呼气试验阳性患者的胃黏膜标本研磨后, 等量接种于Karmali和Columbia血琼脂培养基, 置于37℃微需氧环境(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂和850 mL/L N₂), 分别培养24、48、72、96 h, 观察细菌的生长情况、进行菌落鉴定并比较*H.pylori*阳性率的差异。

结果: 培养24 h, Karmali和Columbia培养基上*H.pylori*阳性检出率分别为9.5%和7.1%, 两者之间没有显著差异($P = 0.125$); 培养48、72和96 h后, Karmali培养基的检出率显著高于Columbia培养基(82.1% vs 45.8%, 94.6% vs 79.2%, 97.0% vs 88.7%, $P < 0.05$)。

结论: Karmali培养基对*H.pylori*初次分离的效

■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

果明显优于Columbia培养基. Karmali培养基是一种有效的*H.pylori*初次分离培养的培养基.

关键词: 幽门螺杆菌; 固体培养基; 胃黏膜标本; 分离培养

何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中. Karmali和Columbia培养基初次分离幽门螺杆菌效果的比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 98-101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/98.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)是一种定居在人胃黏膜, 能引起慢性胃炎、消化性溃疡等疾病的革兰氏阴性菌, 1994年*H.pylori*被WHO列为I类致癌因子^[1,2]. 细菌的分离培养是*H.pylori*感染诊断的金标准之一. 获得*H.pylori*菌株是对其致病机制以及菌株的遗传特征分析具有重要意义. 随着抗生素的大量使用, 目前出现了越来越多的临床耐药菌株感染, 导致*H.pylori*的根治率明显下降, 因此从患者胃黏膜标本中分离培养*H.pylori*, 进行药物敏感性试验变得尤为重要.

目前常用*H.pylori*的培养基为Columbia血琼脂、脑心浸液血琼脂(brain heart infusion agar, BHIA)等. 应用Columbia和BHIA血平皿进行初次分离培养一般需要3-5 d才可以看到针尖状菌落^[3], 有的甚至需要10-20 d才可长出单菌落^[4], 且各地由于培养条件差异, 培养阳性率存在很大差异. 因此, 寻找一种更为快速高效的*H.pylori*分离培养基, 对于*H.pylori*感染研究及相关疾病的防治具有重要意义.

Karmali培养基是用于分离培养弯曲菌属细菌的基础培养基, 在实践中我们发现Karmali培养基对*H.pylori*的分离培养有较好效果, 为进一步验证Karmali培养基在*H.pylori*分离培养中的真实效果, 本研究拟采用相同的培养条件, 对于相同的标本分别应用Karmali和Columbia培养基对*H.pylori*的初次分离效果进行评价.

1 材料和方法

1.1 材料 168份¹³C尿素呼气试验阳性的胃黏膜标本, 来自上海、北京、江西、西安和广州合作医院胃镜室, 样品采集后保存于-80℃, 并经干冰快递运输到中国疾病预防控制中心传染病预防控制所进行分离培养实验. Karmali琼脂培养基(OXOID公司产品, No. CM0935); Columbia

琼脂培养基(OXOID公司产品, No. CM0331). 脱纤维绵羊血购自北京蓝博瑞生物科技有限公司. 混合抗生素: TMP(磺胺增效剂)、盐酸万古霉素、两性霉素B、多粘菌素B购自中国生物制品鉴定所. 3 mL研磨器(江苏海门产品); NUAIR三气培养箱(英国NUAIR公司产品); 一次性平皿、巴氏吸管、接种环等(BD公司产品).

1.2 方法

1.2.1 Karmali培养基的制备: 称取17.2 g Karmali琼脂置于400 mL蒸馏水中混匀, 121℃高压20 min备用. 将高压灭菌后的Karmali培养基冷却至50℃左右, 加入5%脱纤维羊血和1%的混合抗生素(终浓度分别为: TMP 150 mg/L、万古霉素125 mg/L、两性霉素B和多粘菌素B均为100 mg/L)充分混匀后倾注平皿, 经无菌检测后备用.

1.2.2 Columbia培养基的制备: 称取15.6 g Columbia琼脂置于400 mL蒸馏水中混匀后, 121℃高压20 min备用. 将高压灭菌后的Columbia基础培养基冷却至50℃左右, 加入5%脱纤维羊血和1%的混合抗生素(同上)充分混匀后倾注平皿, 经无菌检测后备用.

1.2.3 标本接种与培养: 用巴氏吸管将带有约400 μL BHI保存液的胃黏膜组织吸到组织研磨器中, 充分研磨后, 分别等量接种于Karmali和Columbia血平板上并均匀涂开. 将接种好的平皿置于37℃混合气体培养箱中(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 和850 mL/L N₂), 分别培养于24、48、72、96 h观察菌落的生长情况.

1.2.4 鉴定: 对两种培养基上长出的疑似菌落进行涂片镜检、三酶实验(尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶试验)鉴定, 同时提取菌株核酸, 用*H.pylori*特异性基因ureA、cagA和vacA进行PCR扩增鉴定(引物序列为ureA: 上游5'-GCCAATGGTAAATTAGTTCC-3', 下游5'-CTCCTTAATTGTTTTTACAT-3'; cagA: 上游5'-ACCCTAGTCGGTAATGGG-3', 下游5'-GCAATTTTGTTAATCCGGTC-3'; vacA: 上游5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3', 下游5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'). 标准菌株*H.pylori*26695为阳性对照.

统计学处理 两种培养基培养效果的比较采用配对 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 有组间统计学差异.

2 结果

2.1 部分菌株PCR鉴定结果 本实验中经过生化试验鉴定为*H.pylori*的菌株用PCR扩增鉴定结果

■ 相关报道

高瑞红等研究了
几种培养基对
*H.pylori*生长状态
及细菌数量的比较,
结果表明改良
卵黄布氏琼脂适合
*H.pylori*的生长.

■应用要点

*H. pylori*感染阳性患者的胃黏膜标本在Karmali培养基上初次分离培养96 h, 细菌培养阳性率可以达到97.0%, Karmali培养基可作为幽门螺杆菌初次分离培养的培养基。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

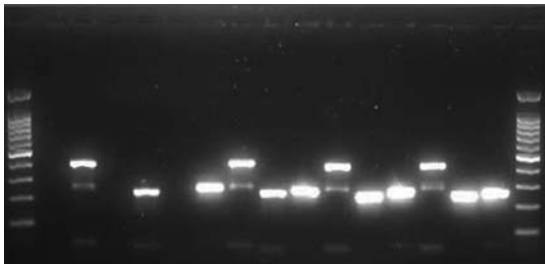


图1 部分*H. pylori*菌株PCR鉴定结果. M: Marker 100 bp; 1-15: ureA阴性对照, ureA *H. pylori*26695, cagA阴性对照, cagA *H. pylori*26695, vacA阴性对照, vacA *H. pylori*26695, ureA *H. pylori*03, cagA *H. pylori*03, vacA *H. pylori*03, ureA *H. pylori*07, cagA *H. pylori*07, vacA *H. pylori*07, ureA *H. pylori*09, cagA *H. pylori*09, vacA *H. pylori*09.

表1 两种培养基在不同时间段*H. pylori*生长状况的比较

培养时间	<i>H. pylori</i> 生长状况	
	Karmali	Columbia
24 h	细小针尖状均>20个	细小针尖状均<10个
48 h	已融合生长为薄菌苔 (<i>n</i> = 138)	针尖状的单菌落 (<i>n</i> = 77)
72 h	厚菌苔(<i>n</i> = 156)	融合生长为薄菌苔 (<i>n</i> = 133)
96 h	厚菌苔(<i>n</i> = 163) ¹	厚菌苔(<i>n</i> = 149)
120 h	厚菌苔(<i>n</i> = 163) ¹	厚菌苔(<i>n</i> = 149)

两种培养基上均为*H. pylori*分离培养阳性的标本, 生长96 h后, 区别不明显, *H. pylori*菌落均生长为厚菌苔。

均为阳性(图1)。

2.2 两种培养基分离率的比较 Karmali培养基在24 h的阳性率为9.5%(16/168), Columbia培养基的阳性率为7.1%(12/168), 经 χ^2 分析, 两者阳性率差异无显著统计学意义($P = 0.125$)。但在Karmali琼脂上的单菌落数量多于Columbia琼脂培养基, 分别为 $>20 \pm 3$ 个克隆和 $<10 \pm 2$ 个克隆(表1)。在培养48、72、96 h时, Karmali培养基上的阳性检出率分别为82.1%(138/168)、94.7%(156/168)和97%(163/168), Columbia血琼脂培养基上的检出率为45.8%(77/168)、79.2%(133/168)和88.7%(149/168), 上述时间点两者之间差异有显著统计学意义(表2-4, $P < 0.05$)。从菌落的多少及菌苔厚度观察, Karmali培养基也明显优于Columbia培养基(表1)。Karmali培养基在48 h的检出率高于Columbia培养基72 h的检出率(82.1%, 138/168 vs 79.1%, 133/168), 并且Karmali培养基72 h的检出率高于Columbia培养基96 h的检出率(94.7%, 156/168 vs 88.7%, 149/168), 其96 h检出

表2 Columbia和Karmali培养基*H. pylori*组织标本48 h培养结果

Columbia	Karmali		合计
	阳性	阴性	
阳性	77	0	77
阴性	61	30	91
合计	138	30	168

$P < 0.05$ 。

表3 Columbia和Karmali培养基*H. pylori*组织标本72 h培养结果

Columbia	Karmali		合计
	阳性	阴性	
阳性	133	0	133
阴性	23	12	35
合计	156	12	168

$P < 0.05$ 。

表4 Columbia和Karmali培养基*H. pylori*组织标本96 h培养结果

Columbia	Karmali		合计
	阳性	阴性	
阳性	149	0	149
阴性	14	5	19
合计	163	5	168

$P < 0.05$ 。

率也高于后者(97%, 163/168 vs 88.7%, 149/168)。Columbia培养基分离阳性的标本, Karmali培养基分离也都为阳性(图2)。

3 讨论

分离培养是*H. pylori*感染诊断的金标准之一^[5,6], 也是评价新的诊断方法的重要参考。分离培养得到的*H. pylori*菌株是*H. pylori*药物根除效果分析、体外筛选抗菌药物敏感性实验、菌株致病性分析、流行病学分型等许多*H. pylori*相关研究的基础。因此, *H. pylori*分离培养技术对*H. pylori*的治疗和研究非常关键。但是, 由于*H. pylori*体外生长条件苛刻, 营养要求较高, 所以分离培养比较困难。目前常用培养基多为加5%-10%脱纤维羊血(兔血或者马血)的Columbia培养基, 需培养3-7 d甚至更长时间^[7]。随着我国*H. pylori*研究水平的整体提高, 分离培养作为*H. pylori*研究工作

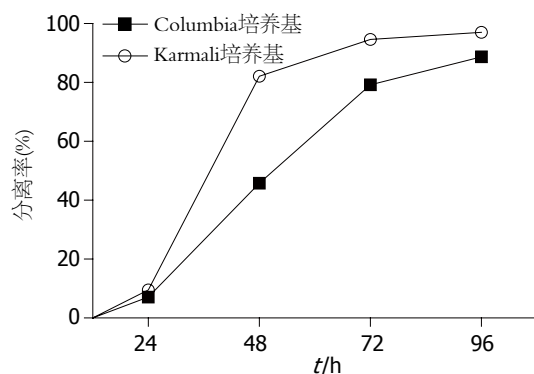


图 2 不同时间点Karmali和Columbia培养基上*H.pylori*的分离率比较.

的基础越来越多的在各省份开展^[8]. 目前世界范围内的阳性*H.pylori*标本的分离培养成功率为50%-70%^[9], 因此寻找能够提高培养阳性率、缩短培养时间的培养基非常重要.

Karmali培养基是Karmali等^[10]于1986年在弯曲菌分离培养中初次使用, 后被推荐用于弯曲菌的分离培养, 一直沿用至今. 其主要成分为在Columbia琼脂的基础上加入活性炭等其他成分. Karmali在弯曲菌选择培养中得到肯定. 我们在工作中发现, 用于弯曲菌属细菌培养的Karmali培养基对*H.pylori*的初代分离效果较好, 为进一步研究其在*H.pylori*分离培养中的效果, 本文对168份临床采集的¹³C尿素呼气试验阳性的胃黏膜标本同时采用Karmali和Columbia培养基进行了初代分离培养比较. 结果显示, 两种培养基在培养24-96 h后*H.pylori*的检出率逐渐增高, 但96 h后, 二者的检出率没有变化. 虽然24 h后, 两种培养基的检出率无明显差异(均<10%), 但Karmali培养基上可出现更多的菌落, 由于此时间点分离阳性率过低, 因此24 h培养不能作为*H.pylori*培养阳性的时间判断节点. 而经过48、72、96 h的培养, Karmali培养基无论在阳性率、

菌落数量及大小方面都明显优于Columbia培养基, 尤其在48 h时差异显著(82.1% vs 45.8%), 其96 h分离阳性率远大于Columbia培养基(97.0% vs 88.6%). 96 h后两种培养基的检出率不再有改变, 达到最高检出率, 同时Columbia培养基分离阳性的标本, Karmali培养基分离也都为阳性. Karmali培养基分离率高于Columbia培养基. 因此Karmali培养基不仅可以显著缩短*H.pylori*分离培养时间, 同时也提高了*H.pylori*的检出率.

同行评价

本文新颖性较好, 具有较好的学术价值. 能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平

参考文献

- 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床(修订版). 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 28-46
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France. 1994: 177-241
- Chomvarin C, Kulsantiwong P, Chantarasuk Y, Chantrakooptungool S, Kanjanahareutai S. Comparison of media and antibiotic supplements for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 1163-1169
- Yin Y, He LH, Zhang JZ. Successful isolation of *Helicobacter pylori* after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1528-1529
- Jaup BH, Stenquist B, Brandberg A. *Helicobacter pylori* culture from a positive, liquid-based urease test for routine clinical use: a cost-effective approach. *Helicobacter* 2000; 5: 22-23
- 闫伟, 曹建彪. 幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1527-1533
- 陈忠余. 幽门螺杆菌分离培养研究现状. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 1996; 17: 28-30
- 胡林, 刘苓, 谭庆华, 周力, 陈峥宏, 刘娅琳. 贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2830-2834
- Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 6-11
- Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 456-459

编辑 李军亮 电编 何基才

肝脏恶性血管外皮瘤误诊为肝转移癌1例

刘振宇, 王葵, 赵 骞, 施乐华

■背景资料

血管外皮瘤是由血管外皮发生的肿瘤, 可分为先天性和后天性, 多见于四肢、躯干、盆腔、后腹膜等处, 临床表现不一, 常呈浸润性生长, 发生于肝脏的恶性血管外皮瘤甚为罕见, 迄今文献报道仅约10例。

刘振宇, 王葵, 施乐华, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗一科 上海市 200438

赵骞, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病理科 上海市 200438

作者贡献分布: 本文写作由刘振宇完成; 王葵与赵骞提供相关资料; 施乐华进行修改指导。

通讯作者: 施乐华, 教授, 200438, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗一科. shilehua@ehbh.cn
电话: 021-81875241

收稿日期: 2010-10-17 修回日期: 2010-11-21

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-08

Hepatic malignant hemangiopericytoma misdiagnosed as metastatic tumor: a report of one case

Zhen-Yu Liu, Kui Wang, Qian Zhao, Le-Hua Shi

Zhen-Yu Liu, Kui Wang, Le-Hua Shi, Department of Comprehensive Care (Division I), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Qian Zhao, Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Correspondence to: Professor Le-Hua Shi, Department of Comprehensive Care (Division I), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China. shilehua@ehbh.cn

Received: 2010-10-17 Revised: 2010-11-21

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-08

Abstract

Here we report a case of hepatic malignant hemangiopericytoma, an uncommon soft tissue sarcoma. A 57-year-old male patient presented with upper abdominal pain and a two-year history of esophageal cancer. Computed tomography revealed a large mass in the left lobe of the liver. A left hepatic lobectomy and cholecystectomy was performed for a suspected hepatic metastatic tumor. However, the tumor was histologically diagnosed as a hepatic malignant hemangiopericytoma.

Key Words: Liver; Malignant hemangiopericytoma; Misdiagnosis

Liu ZY, Wang K, Zhao Q, Shi LH. Hepatic malignant hemangiopericytoma misdiagnosed as metastatic tumor: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 102-103

摘要

肝脏恶性血管外皮瘤是一种罕见的肿瘤, 本例患者为男性, 57岁, 有中上腹胀痛不适, CT发现左肝占位, 2年前曾因食管癌行手术治疗。术前被误诊为转移性肝癌, 经手术行左肝肿瘤切除及胆囊切除术后行病理检查, 最终确诊为肝脏恶性血管外皮瘤。

关键词: 肝脏; 恶性血管外皮瘤; 误诊

刘振宇, 王葵, 赵骞, 施乐华. 肝脏恶性血管外皮瘤误诊为肝转移癌1例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(1): 102-103

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/102.asp>

0 引言

肝脏恶性血管外皮瘤甚为罕见, 迄今文献报道仅约10例^[1], 现将中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院1例肝脏恶性血管外皮瘤病例报道如下。

1 病例报告

男, 57岁, 因“中上腹胀痛不适1 wk, CT发现左肝占位7 d”入院。既往于2006-06因食管癌行手术治疗。查体: 呈消瘦貌, 右肋缘下可触及肿大包块, 质硬, 范围约5 cm×6 cm, 可随呼吸上下移动, 左侧肋缘下陈旧性手术瘢痕长约25 cm, 余无特殊。血常规: 白细胞 $13.3 \times 10^9/L$; 肝功能: 球蛋白33 g/L、白球比1.3、门冬氨酸氨基转移酶41 U/L、乳酸脱氢酶741 U/L; 血生化: 钙1.84 mmol/L; 免疫学指标: HbsAb(+), HbcAb(+), CA-125: 177.2 kU/L, AFP、CEA、CA-199等均在正常范围内。外院CT提示: 肝左叶见一巨大不规则肿块影, 大小约9.4 cm×8.3 cm, 边缘欠清晰, 肿块内部密度不均, 增强后呈轻度强化, 内见大片水样密度影, 似“牛眼征”改变, 门脉期及延迟期病灶密度低于周围正常肝实质, 考虑左肝占位性病变(图1A, B)。胃镜示: 食管癌术后, 吻合口距门齿约24 cm, 约0.5 cm×0.8 cm, 表面及周边黏膜充血明显, 碰触易出血, 未见溃疡及新生物, 诊断食管癌术后, 吻合口炎。根据病史及检查结果汇报, 术前诊断: 左肝占位, 转移

■同行评议者

许戈良, 教授, 安徽省立医院肝胆外科

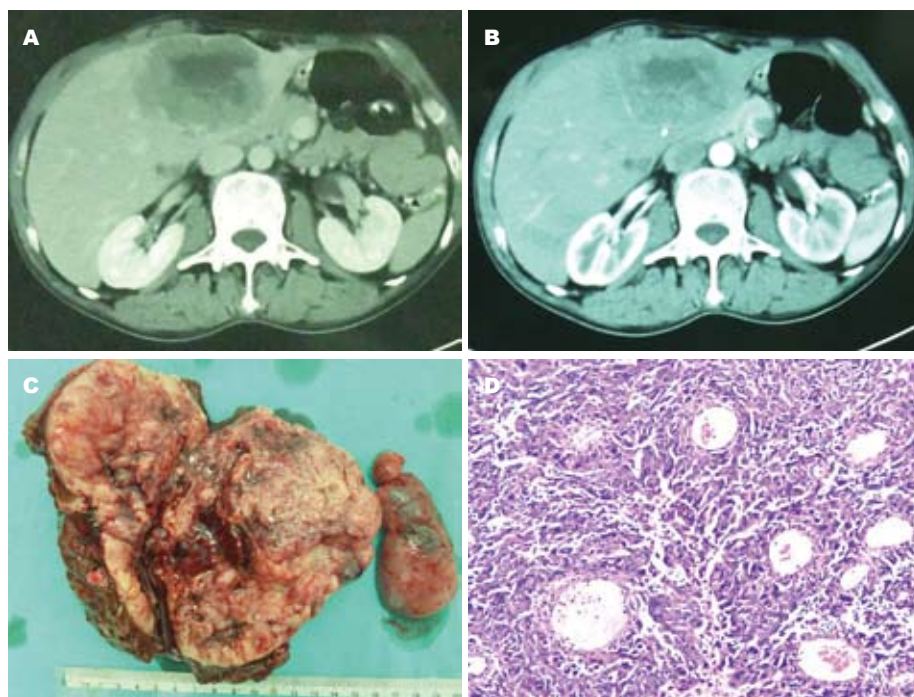


图1 肝脏恶性血管外皮瘤患者影像检查资料及病理资料。A: CT平扫见肝左叶占位性病变; B: CT动脉增强扫描期见病灶轻度强化, 内有水样低密度影; C: 病理标本; D: 病理切片(HE×200)。

■同行评价
本文学术性较好, 具有很好的临床借鉴作用。

性肝癌可能。患者于2010-06-11于全麻下开腹手术, 右肋缘下斜行切口, 术中见腹腔内无腹水, 肝脏质地较韧, 色暗红, 边缘钝, 肝脏表面尚光滑。肿瘤位于肝左内叶脏面, 大小约12 cm×11 cm, 包膜完整, 质硬, 余肝未及异常。遂行左肝肿瘤切除+胆囊切除术, 手术顺利。患者术后给予保肝、抑酸、抗感染及血管内皮素抑制素治疗, 于术后第7天出院, 术后1 mo随访, 患者恢复良好, 无特殊不适。

术后病理检查: 巨检标本14 cm×9.7 cm×7.2 cm, 切面呈灰白色, 周边有部分包膜, 有较多出血坏死, 余肝较少, 无明显肝硬化; 胆囊8.6×3.1 cm, 壁厚0.2 cm, 黏膜粗糙(图1C)。镜检见瘤组织内血管丰富, 瘤细胞围绕血管腔呈放射状排列, 血管腔隙内有乳头状生长, 瘤细胞呈梭形或短梭形, 核大深染, 异型明显, 可见核分裂象, 间质疏松, 伴黏液变, 瘤组织内有出血坏死, 肿瘤周边无包膜, 余肝无假小叶结构(图1D); 胆囊慢性炎症。特染: Masson(+), AB(-), 网染(+). 免疫病理: CD34(+++), D2-40(+), P-Cad(+). 病理诊断: (1)符合(肝左叶)恶性血管外皮瘤; (2)慢性胆囊炎。

2 讨论

血管外皮瘤是由血管外皮发生的肿瘤, 可分为先天性和后天性, 多见于四肢、躯干、盆腔、后腹膜等处^[2], 临床表现不一, 常呈浸润性生长, 发生于肝脏的恶性血管外皮瘤甚为罕见, 迄今文献报道仅约10例, 综合分析以往的资料, 患者

一般无明显的性别差异, 多数为中老年人, 但也有儿童病例的报道^[1]。绝大部分患者早期无明显症状, 后因肝脏被巨大的肿块占据而引起局部不适或于体检中发现。本例资料中, 患者既往有食管癌病史, 而无肝炎及甲胎蛋白异常增高等病史, 初步诊断时倾向于转移性肝癌, 但转移性肝癌的影像检查多提示肝内多个散在、大小相仿的占位性病变, 又与本例不符。手术切除为治疗本病的首选^[3], 本例中肿瘤与周围肝实质边界清楚, 与周围脏器粘连疏松, 操作中选择左肝肿瘤局部切除, 距肿瘤边缘2 cm切除肿瘤后将其剖开, 可见切面呈灰白色, 肿瘤内部有较多出血坏死。经术后病理诊断确诊为恶性血管外皮瘤。可见, 肝脏恶性血管外皮瘤的术前诊断尚缺乏特异性的依据, 容易误诊为原发性或转移性肝癌, 而恶性血管外皮瘤的术后治疗尚无特殊药物。本例尝试使用了血管内皮素抑制素以期拮抗肿瘤血管的生成, 远期疗效尚待进一步证实。同时, 将其与肝癌进行鉴别尤为重要, 故在临床工作中要提高对本病的认识, 尽早获得病理学资料也是对本病最为确切的诊断方法。

3 参考文献

- 1 丛文铭, 朱世能. 肝脏肿瘤诊断外科病理学. 第1版, 上海: 上海科技教育出版社, 2002: 189-190
- 2 Enzinger FM, Smith BH. Hemangiopericytoma. An analysis of 106 cases. *Hum Pathol* 1976; 7: 61-82
- 3 Kim BW, Wang HJ, Jeong IH, Ahn SI, Kim MW. Metastatic liver cancer: a rare case. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4281-4284

编辑 李薇 电编 何基才

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《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. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2011年国内国际会议预告

2011-01-14/16

第一届全国结直肠癌多学科治疗中青年专家学术大会
会议地点: 哈尔滨市
联系方式: 0451-86298096

2011-01-20/22

2011年胃肠道癌症研讨会-胃肠道肿瘤的科学和多学科管理
会议地点: 美国旧金山
联系方式: giregistration@jspargo.com

2011-03

中华医学会第四次全国感染性疾病中青年学术会议
会议地点: 长沙市
联系方式: medcon@126.com

2011-03-01/31

湖北省医学会结直肠肛门外科学分会2011年学术会议
会议地点: 十堰市
联系方式: chqjiang@hotmail.com

2011-03-25

第六届中国消化外科学术会议暨第七届全军肝胆外科学术会议
会议地点: 北京市
联系方式: 010-67534765-8888

2011-03-25/27

首届中国腹膜后肿瘤论坛
会议地点: 北京市
联系方式: sjtcolorectalsurgery@gmail.com

2011-04-01/30

第九届全国儿童感染性疾病暨第十届全国儿童肝脏疾病学术会议
会议地点: 扬州市
联系方式: fuxiaoxia@cma.org.cn

2011-04-08

2011第五届中华消化病学年度讲坛
会议地点: 北京市
联系方式: cma_spd@yahoo.com

2011-04-09/10

第四届NCCN亚洲学术会议暨2011NCCN指南中国版修订会
会议地点: 上海市
联系方式: nccn-asia@emdchina.com

2011-04-14/17

第四届全国消化内科危重疑难少见病学术大会
会议地点: 桂林市
联系方式: xiaohuayinan2011@yahoo.com.cn

2011-04-15/17

第二届中国肿瘤介入与微创治疗大会
会议地点: 上海市
联系方式: 010-84288944

2011-04-22/24

第九届全国内镜外科学术研讨会
会议地点: 济南市
联系方式: gandannejing@163.com

2011-05-01/31

2011年安徽省消化、消化内镜学术年会暨肝脏疾病诊治难点与对策学习班
会议地点: 合肥市
联系方式: meiqiaomq@yahoo.com.cn

2011-05-27/29

第十四届中西医结合学会大肠肛门病专业委员会学术研讨会
会议地点: 沈阳市
联系方式: gcyy88@163.com

2011-06-11/12

2011国际消化疾病论坛
会议地点: 香港
联系方式: www.iddforum.com

2011-06-16/20

第二十三次全国中西医结合消化学术会议
会议地点: 太原市
联系方式: 0351-4174328

2011-06-23/26

第十五次全国病毒性肝炎及肝病学术会议
会议地点: 沈阳市
联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2011-07-07

第八届全国大肠癌学术会议暨2011哈尔滨国际结直肠癌外科周
会议地点: 哈尔滨市
联系方式: rainy_gg@yeah.net

2011-08-04/07

第五届中国肿瘤内科大会
会议地点: 北京市
联系方式: 010-87788701

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会
会议地点: 福州市
联系方式: 010-67726451

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
南昌大学第一附属医院消化内科

曹鹏 副研究员
江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈洪 主任医师
东南大学附属中大医院消化科

丁惠国 主任医师
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

高英堂 研究员
天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

江米足 教授
浙江大学医学院附属儿童医院儿科

李革 副教授
延边大学附属医院普外1科

李康 副教授
广东药学院药科学院药物分析教研室

刘成海 研究员
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

马红 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心

牛英才 副研究员
齐齐哈尔医学院医药科学研究所

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

齐清会 教授
大连医科大学附属第一医院普通外科

任晓峰 教授
东北农业大学动物医学学院微生物室

施诚仁 教授
上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

王晓艳 副教授
湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

王娅兰 教授
重庆医科大学基础医学院病理教研室

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐宁志 研究员
中国医学科学院肿瘤医院细胞生物与分子生物学实验室

颜宏利 教授
中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

张俊 副教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科

张小晋 主任医师
北京积水潭医院消化内科

赵春玲 讲师
潍坊医学院细胞生物学教研室

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科