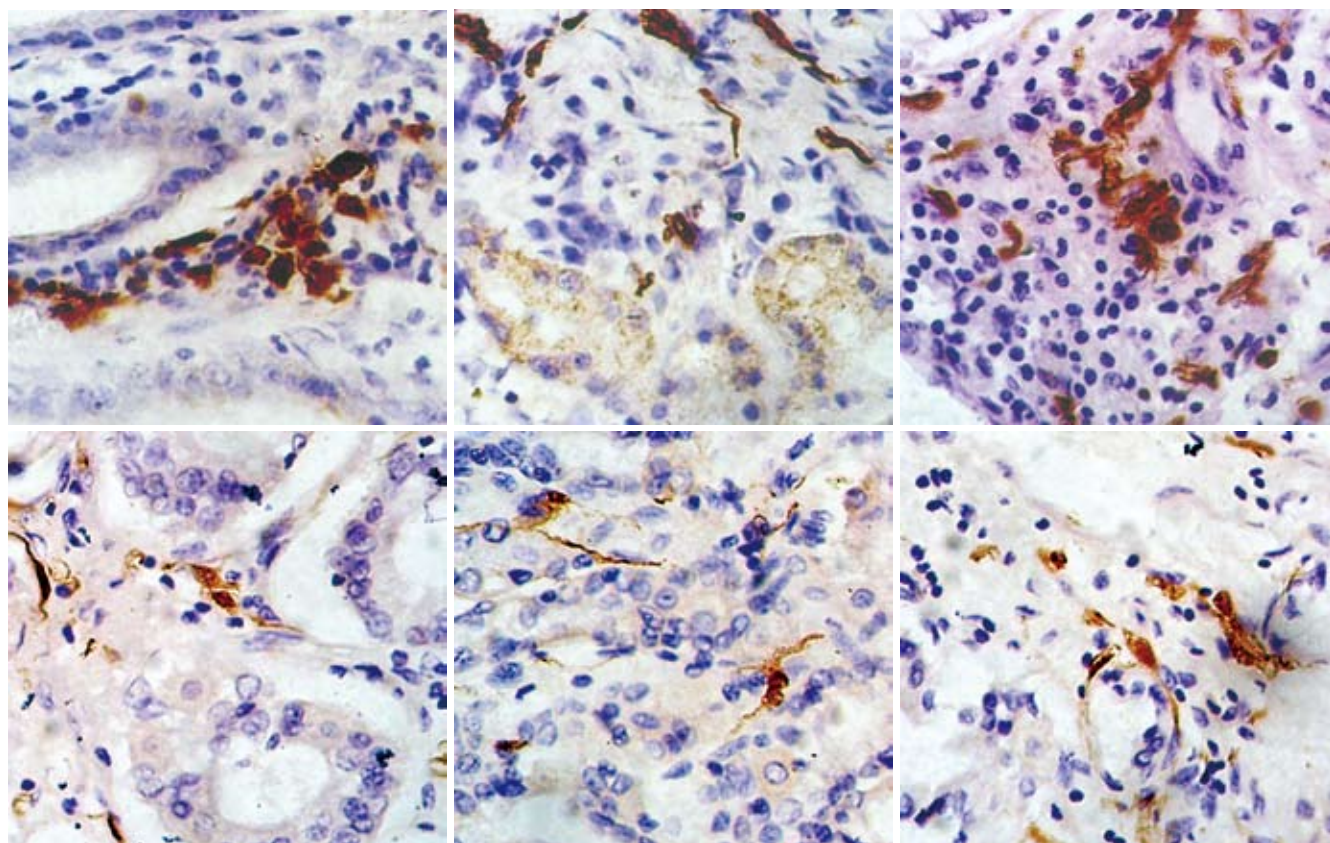


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 6 月 18 日 第 15 卷 第 17 期 (Volume 15 Number 17)



17 / 2007

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》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》，俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
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

陈士葆教授
房殿春教授
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
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升副教授
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
聂青和副教授
王小众教授

编委

白爱平主治医师

白文元教授
白玉贤教授
别平教授
蔡淦教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
曹洁副教授
曹志成院士
苕新明教授
陈国凤主任医师

陈公琰主任医师
陈海龙教授
陈红松副研究员

陈积圣教授
陈建杰教授
陈建荣副教授

陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授

陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈强谱教授

陈仕珠主任医师
陈卫昌教授
陈耀凯副教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
陈知水教授

陈治水主任医师
陈祖林副教授
程爱国教授

程爱群主任医师
程斌副教授
程红岩教授

程树群副教授
迟宝荣教授
迟强教授

崔乃强教授
崔彦教授
崔毅主任医师

崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授

戴冬秋教授
党双锁副教授

邓长生教授
丁士刚主任医师

丁义涛教授
丁佑铭教授
董蕾教授

董明主任医师
杜群副研究员
杜祥教授

樊红副教授
范建高教授
范小玲主任医师

范志宁主任医师
房静远教授
冯红主任医师

冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
傅红副教授

傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授

高春芳研究员
高峰教授
高润平教授

高英堂研究员
戈之铮教授
龚国忠教授

龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师

顾岩教授
关玉盘教授
管冬元副教授

郭克建教授
郭晓钟教授
郭新宁教授

韩天权教授
韩新巍教授
郝春秋副教授

郝俊鸣副主任医师
何超教授
何生教授

何生松教授
何裕隆教授
何振平教授

洪天配教授
侯晓华教授

胡伏莲教授
胡和平主任医师

黄恒青主任医师
黄金华副教授
黄文林教授

黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授

黄志勇副教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授

季加孚教授
姜波健教授
姜春萌教授

姜慧卿教授
江家骥教授
蒋龙元副教授

金懋林教授
金瑞教授
匡安仁教授

兰平教授
蓝宇教授
劳绍贤教授

黎乐群教授
李定国教授
李东辉教授

李方儒教授
李国威教授
李华山副主任医师

李继强教授
李健丁教授
李杰副教授

李靖副教授
李军祥教授
李奇林教授

李胜研究员
李淑德教授
李涛主治医师

李小荣教授
李晓宇主任医师
李旭副教授

李延青教授
李永哲副研究员
李玉民教授

李玉明教授
李瑜元教授

李瑗教授
李增山副教授

李兆申教授
李振华教授
李智伟教授

李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授

林胜璋副教授
林勇讲师
林志辉教授

刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘冰熔教授

刘成海研究员
刘海林主任医师
刘建教授

刘鲁明教授
刘平教授
刘杞教授

刘铁夫教授
刘颖斌副教授
刘勇钢副主任医师

刘云鹏教授
刘占举教授
刘志苏教授

刘正稳教授
刘作金副教授
龙致贤教授

卢榜裕教授
卢实春教授
鲁华玉研究员

陆才德教授
陆伦根教授
陆云飞教授

禄韶英主治医师
吕明德教授
吕宁主任医师

吕云福教授
吕志武教授
马大烈教授

马金城教授
马力文主任医师
马欣主任医师

茅爱武主任医师
毛高平主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

梅林教授	师英强博士	王鲁副教授	许文燮教授	张明辉副主任医师
梅铭惠教授	石统东副教授	王石林主任医师	许亚平副教授	张青云研究员
孟庆华教授	宋世兵主任医师	王晓艳副教授	宣世英教授	张群华教授
宁琴教授	宋于刚教授	王效民教授	闫惠平研究员	张水军教授
倪润洲教授	宋振顺教授	王新月教授	严律南教授	张小晋主任医师
牛建昭教授	孙诚谊教授	王学美研究员	严以群主任医师	张晓岚教授
牛俊奇教授	孙殿兴主任医师	王怡主任医师	阎晓初副教授	张绪清副教授
欧希龙副教授	孙富强副教授	王正康教授	杨冬华教授	张学教授
潘林娜教授	孙家邦教授	王志刚副主任医师	杨广顺教授	张肇达教授
潘兴华副主任医师	孙侃教授	王忠裕教授	杨建民教授	张占卿主任医师
潘秀珍教授	孙秀发教授	卫洪波教授	杨建勇教授	张志坚教授
彭波副教授	孙学英教授	魏经国教授	杨林副研究员	张宗明教授
彭吉润主任医师	孙延平副主任医师	魏来教授	杨维良教授	赵桂鸣主任医师
彭曦副研究员	邵升副教授	闻勤生教授	杨希山教授	赵桂珍教授
彭心宇教授	谭德明教授	吴德全教授	杨尹默教授	赵景民教授
彭志海教授	谭群友副教授	吴河水教授	杨幼林主任医师	赵连三教授
朴熙绪主任医师	谭学瑞教授	吴建国教授	杨云生教授	赵平副教授
朴云峰教授	汤恢煥教授	吴健雄教授	杨昭徐教授	赵晓晏教授
钱建民教授	汤展宏副教授	吴金术教授	姚登福教授	赵增仁副主任医师
钱林学主任医师	唐采白副教授	吴君主任医师	姚鹏副教授	郑加生主任医师
秦波教授	唐芙爱教授	吴萍主任医师	姚树坤教授	郑民华教授
秦成勇教授	唐霓副研究员	吴晴教授	叶红军主任医师	郑鹏远教授
秦春宏副主任医师	唐丽安教授	吴泰璜教授	伊力亚尔·夏合丁教授	智发朝教授
秦华东教授	唐世刚教授	吴晓东教授	阴赅宏研究员	钟德珩教授
秦环龙教授	唐文富主治医师	吴志勇教授	殷正丰教授	周伯平教授
秦仁义教授	唐文皓副主任医师	席启主任医师	于恩达教授	周丁华主任医师
邱宝安主任医师	唐晓鹏教授	夏建川研究员	于聪慧教授	周国雄主任医师
邱双健副教授	唐旭东主任医师	向德兵讲师	于红刚副教授	周士胜教授
邱伟华副主任医师	唐志鹏研究员	肖恩华教授	于健春教授	周伟平教授
仇毓东副教授	田德安主任医师	谢敏主任医师	于良副教授	周文兴教授
裘正军教授	田素礼教授	谢青教授	于晓峰主任医师	周霞秋教授
曲智威副主任医师	田晓峰教授	谢晓华副教授	于颖彦教授	周晓东研究员
任超世研究员	童强主任医师	邢光明教授	于则利教授	周晓武副主任医师
任粉玉副教授	屠红副研究员	熊斌教授	余宏宇教授	朱传武副主任医师
任建安教授	万军教授	徐爱民副教授	郁宝铭教授	朱春兰主任医师
任建林教授	汪波副主任医师	徐存拴教授	郁正亚副教授	朱立元教授
邵成浩讲师	汪思应教授	徐大华主任医师	喻荣彬副教授	朱人敏教授
邵先玉教授	王邦茂教授	徐德忠教授	袁伟建教授	庄林主任医师
邵永孚教授	王炳元教授	徐列明教授	曾勇教授	邹小明教授
沈洪教授	王承党副教授	徐宁志研究员	展玉涛副主任医师	左国营副主任药师
沈俊教授	王春友教授	徐小元教授	张柏和教授	
沈琳主任医师	王广义教授	徐秀英副教授	张方信主任医师	
沈世强教授	王济明教授	徐迎新研究员	张凤春教授	
沈守荣教授	王吉耀教授	徐智教授	张国梁主任医师	
沈薇教授	王健生副教授	许春舫主任医师	张集昌主任医师	
沈岩主任医师	王凯教授	许戈良教授	张吉翔教授	
施诚仁教授	王莉瑛教授	许乐主任医师	张锦生教授	
施瑞华教授	王烈主任医师	许玲副教授	张军教授	

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 6 月 18 日 第 15 卷 第 17 期 (总第205期)

述 评

1873 钙池操纵的Ca²⁺通道的激活机制研究进展 张子超, 张宗明

基础 研究

1881 IκB激酶β在非酒精性脂肪性肝炎发病机制中的作用

赵彩彦, 王亚东, 周俊英

1887 内毒素调节肝脏β-葡萄糖苷酸酶mRNA的表达

孙韶龙, 吴硕东, 戴显伟, 隋东明, 崔东旭

1893 L-精氨酸对胰腺炎相关性腹水诱导的肾细胞凋亡的疗效

程若川, 刘其雨, 苏艳军, 张建明, 刁畅, 罗华友

1899 结肠癌耐药细胞株LoVo/5-FU的建立及其差异表达基因的筛选

盛雅萍, 李建芳, 刘炳亚, 罗建明, 郑磊贞, 陈强, 郭伟剑

1905 HeLa细胞感染痢疾杆菌差异表达的新EST序列的电子延伸及验证

黄留玉, 史兆兴, 袁静, 胡福泉

临 床 研 究

1914 胃癌树突状细胞浸润的临床意义及与肿瘤血管生成的相关性

周业江, 梁建群, 蔡晓龙, 熊玉霞, 易国平, 李显蓉, 魏仁智

1921 大肠癌胃泌素、生长抑素的表达及比势与细胞周期调控基因的相关性

吴佩, 茆家定, 梁林虎, 闫竞一

1928 直肠癌术前磁共振水成像检查的意义

涂小煌, 黎成金, 马明, 王烈, 宋京翔

1934 中药痛泻要方治疗肠易激综合征疗效的荟萃分析

石珺, 汪崇文, 范可

文 献 综 述

1940 胃蛋白酶原和胃癌相关抗原与胃癌的研究进展

周红凤, 刘丹, 吴瑾, 王雯

1947 辣椒素对胃黏膜的作用及其机制

王锦, 彭燕

研 究 快 报

1952 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系PC-3凋亡及其抑制转移的作用

刘静冰, 秦叔逵, 李进

1956 乌司他丁联合三七总皂甙对急性胰腺炎大鼠氧自由基的影响

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华

临 床 经 验

1960 结直肠癌组织中ECM1基因水平的测定及临床意义

侯彦强, 姜加陶, 彭亮, 周琳, 倪健, 孔宪涛, 仲人前

1965 ERCP在胆总管结石患者胆汁细菌学研究中的价值

吴汉平, 康生朝, 张方信, 马强

1968 结直肠高级别上皮内瘤变的临床分析38例

钟晓刚, 黄顺荣, 殷舞, 麦威, 秦千子

	1972 T淋巴细胞亚群和DNA倍体检测在腹水鉴别诊断中的价值 张卫国, 童强, 王强, 王小虎, 李胜保
病例报告	1976 异丙酚静脉麻醉胃镜检查并发皮下坏死1例 雷巧玲, 孙盈盈
致 谢	1978 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	1886 功能性胃肠病诊治进展通知 1892 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 1913 2007年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知 1920 中国学术期刊综合引证报告(2006) 1927 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报 1933 中国中西医结合第十九次全国消化病学术会议最后通知 1946 世界华人消化杂志的同行评价 1951 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知 1959 中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于2005年世界华人消化杂志指标检索报告 1964 2007年国际会议 1967 世界华人消化杂志在线办公系统 1975 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 1977 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届消化介入新技术研讨会会议及征文通知
封面故事	周业江, 梁建群, 慕晓龙, 熊玉霞, 易国平, 李显蓉, 魏仁智. 胃癌树突状细胞浸润的临床意义及与肿瘤血管生成的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1914-1920 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1914.asp
国际会议	9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2007-06-18

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生

编辑部主任 张海宁 责任编辑 程剑侠

中文编辑 潘伯荣 张焕兰 王晓瑜 程剑侠

电子编辑 张敏 郭海丽 何基才

英文编辑 理文编辑

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

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>

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>

印刷 北京科信印刷厂

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)

订购 全国各地邮电局

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>

世界华人消化杂志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》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://wcjd.wjgnet.com>), 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。

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。

2007年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 国外代号 国内定价
82-262 M 4481 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

June 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 17

EDITORIAL	1873 Advances in understanding the activation mechanism of store-operated Ca^{2+} channels <i>Zhang ZC, Zhang ZM</i>
BASIC RESEARCH	<p>1881 Role of the kappa B kinase beta inhibitor in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis <i>Zhao CY, Wang YD, Zhou JY</i></p> <p>1887 Endotoxin regulates the expression of hepatocyte β-glucuronidase mRNA <i>Sun SL, Wu SD, Dai XW, Sui DM, Cui DX</i></p> <p>1893 Curative effects of L-arginine on apoptosis of renal cells induced by pancreatitis associated ascitic fluid <i>Cheng RC, Liu QY, Su YJ, Zhang JM, Diao C, Luo HY</i></p> <p>1899 Establishment and selection of genes expressing differently in a human colon carcinoma LoVo/5-FU cell line <i>Sheng YP, Li JF, Liu BY, Luo JM, Zheng LZ, Chen Q, Guo WJ</i></p> <p>1905 Electronic extension and identification of new HeLa cell ESTs differentially expressed after <i>Shigella flexneri</i> 2a infection <i>Huang LY, Shi ZX, Yuan J, Hu FQ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1914 Infiltrating dendritic cells in the development of gastric cancer and an association with tumor angiogenesis <i>Zhou YJ, Liang JQ, Qi XL, Xiong YX, Yi GP, Li XR, Wei RZ</i></p> <p>1921 Correlations among gastrin and somatostatin expressions and the cell cycle: controlling genes in large intestine carcinomas <i>Wu P, Mao JD, Liang LH, Yan JY</i></p> <p>1928 Value of rectal magnetic resonance hydrography for diagnosis and staging of rectal carcinoma <i>Tu XH, Li CJ, Ma M, Wang L, Song JX</i></p> <p>1934 Meta-analysis of the effectiveness of Tong Xie Yao Fang in treating irritable bowel syndrome <i>Shi J, Wang CW, Fan K</i></p>
REVIEW	<p>1940 A review of advances related to pepsinogen and MG7Ag in gastric cancer <i>Zhou HF, Liu D, Wu J, Wang W</i></p> <p>1947 Effects and mechanism of capsaicin on gastric mucosa <i>Wang J, Peng Y</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1952 Effects of arsenic trioxide on the pancreatic carcinoma cell line PC-3 and inhibitory migration <i>Liu JB, Qin SK, Li J</i></p> <p>1956 Effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis <i>Wang HZ, Liu J, Song H, Li L, Hou XH</i></p>
CLINICAL PRACTICE	1960 Detection and clinical significance of ECM1 gene expression in colorectal cancer tissue <i>Hou YQ, Lou JT, Peng L, Zhou L, Ni J, Kong XT, Zhong RQ</i>

	<p>1965 Clinical significance of endoscopic retrograde cholangiopancreatography for bacteriological study of bile in patients with choledocholithiasis <i>Wu HP, Kang SC, Zhang FX, Ma Qiang</i></p> <p>1968 Clinicopathologic characteristics of high-grade colorectal intraepithelial neoplasia: analysis of 38 cases <i>Zhong XG, Huang SR, Yin W, Mai W, Qin QZ</i></p> <p>1972 Value of T lymphocyte subset determination and DNA ploidy analysis for differential diagnosis of ascites <i>Zhang WG, Tong Q, Wang Q, Wang XH, Li SB</i></p>
CASE REPORT	<p>1976 Subcutaneous necrosis during gastroscopic examination under propofol-induced anesthesia via venous injection: one-case analysis <i>Lei QL, Sun YY</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>1978 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Zhou YJ, Liang JQ, Qi XL, Xiong YX, Yi GP, Li XR, Wei RZ.</i></p> <p>Infiltrating dendritic cells in the development of gastric cancer and an association with tumor angiogenesis.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(17):1914-1920 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1914.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com</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 June 18, 2007

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: wjcd@wcjdnet.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: wjcd@wcjdnet.com
<http://www.wcjdnet.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

Deputy Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue,
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2007 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 © 2007 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

钙池操纵的Ca²⁺通道的激活机制研究进展

张子超, 张宗明

张子超, 同济大学附属同济医院普外一科 上海市 200065
张宗明, 清华大学第一附属医院消化中心普外科 北京市 100016
张宗明, 教授, 博士生导师, 主要从事普通外科临床和基础研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30270532和No. 30670774
教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金资助项目, 教技函
No. 2002-48
清华-裕元医学科学研究基金资助项目, No. 20240000531
通讯作者: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化中心普外科. zhangzongming@mail.
tsinghua.edu.cn
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322
收稿日期: 2007-03-13 接受日期: 2007-03-31

Advances in understanding the activation mechanism of store-operated Ca²⁺ channels

Zi-Chao Zhang, Zong-Ming Zhang

Zi-Chao Zhang, the First Department of General Surgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China

Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30270532, 30670774; Trans-Century Training Programme Foundation for the Talents by the Ministry of Education of China, Official Letter No. 2002-48; and Tsinghua-Yue-Yuan Medical Science Fund, No. 20240000531

Correspondence to: Professor Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2007-03-13 Accepted: 2007-03-31

Abstract

As one of the major Ca²⁺ channels for Ca²⁺ influx in non-excitabile cells, the store-operated Ca²⁺ channel (SOC) is involved in a variety of pathological and physiological processes. The SOC has received much scientific attention regarding sub-types of the receptor-activated Ca²⁺ channel. The activation mechanisms of SOC have always been an important focus of research on Ca²⁺ signal pathways. However, a generally accepted theory has yet to be established. The Ca²⁺ influx factor (CIF) model and the conformational coupling model are two widely researched models. CIF has been extracted from various types of cells, and it has been proven that Ca²⁺-independent

phospholipase A₂ is a substrate of CIF, playing a crucial role in activating the SOC in certain cells. These findings led to the ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC pathway model hypothesis. The structural junction between the TRP channel protein and the inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor is the foundation of the conformational coupling model, and has wide acceptance. Future research into the roles of the inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor, the ryanodine receptor and actin in the Ca²⁺ signal pathway should reinforce the conformational coupling model. Deciphering the mechanism of SOC activation will represent a breakthrough in our understanding of the characteristics of this Ca²⁺ channel and its regulative mechanism.

Key Words: Store-operated Ca²⁺ channel; Ca²⁺ influx factor model; Conformational coupling model

Zhang ZC, Zhang ZM. Advances in understanding the activation mechanism of store-operated Ca²⁺ channels. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1873-1880

摘要

钙池操纵的Ca²⁺通道(store-operated Ca²⁺ channels, SOC)是非兴奋细胞Ca²⁺内流的主要通道之一, 参与多种病理和生理过程, 在钙信号通路的研究中, SOC的激活机制一直是人们关注的焦点之一, 迄今为止, 钙内流因子模型(Ca²⁺ influx factor model, CIF model)和构象耦联模型(conformational coupling model)受到广泛关注. 部分学者已经从很多不同类型的细胞中提取出CIF, 并证实钙非依赖性的磷脂酶A₂(Ca²⁺-independent phospholipase A₂, iPLA₂)作为CIF的底物, 在某些类型细胞的SOC激活过程中发挥重要作用, 并进一步提出了ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路模型. 瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道蛋白与1, 4, 5-磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor, IP₃R)的结构连接作为构象耦联模型的基础已被广泛证实, 随着对IP₃R, Ryanodine受体、肌动蛋白等在钙信号通路中所发挥作用的深入研究, 构象耦联模型将得到不断补充和完善. SOC激活机制的破

■背景资料

钙池操纵的Ca²⁺通道(SOC)广泛存在于诸如肝细胞、Kupffer细胞等非兴奋细胞和部分兴奋细胞上, 是至今研究最多也最受重视的一个受体激活的Ca²⁺通道亚群, 但其具体的激活机制尚不清楚. 由于SOC具有调节细胞多种重要功能的作用, 因此其激活机制的深入研究对于基础医学和临床医学均具有重大意义.

■ 研发前沿

在研究初期人们发现SOC与细胞内钙池耗竭存在密切联系,但在后续实验中证实三磷酸肌醇及其受体、磷脂酶、钙调蛋白、肌动蛋白等多种细胞内分子均能对SOC的开放产生影响,各国学者根据不同的研究结果分别提出了各自的假设模型, CIF模型和构象耦联模型如今得到了最多支持,但也存在最多争论.而且近1 a来随着orail、基质交感蛋白等相关分子的发现,人们在SOC激活机制的研究中得到了新的启示.

解,将对进一步完善非兴奋细胞的钙通道特性及其调节机制理论带来重大突破.

关键词: 钙池操纵的 Ca^{2+} 通道; 钙内流因子模型; 构象耦联模型

张子超, 张宗明. 钙池操纵的 Ca^{2+} 通道的激活机制研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1873-1880

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1873.asp>

0 引言

钙离子(Ca^{2+})作为重要的第二信使,参与调节细胞众多的生理和病理过程^[1-2].细胞内 Ca^{2+} 时间和空间的分布受离子通道、结合蛋白、钙泵和转运体等的调节.钙池操纵的 Ca^{2+} 通道(SOC)存在于大多数非兴奋细胞和部分兴奋细胞上. SOC激活介导的 Ca^{2+} 内流(SOCE)具有调节细胞多种重要功能的作用,如细胞分泌、酶的活性(从而调控如葡萄糖代谢、一氧化氮和环磷酸腺苷合成等)、基因转导、细胞周期以及细胞凋亡^[2].已知真核细胞内质网(endoplasmic reticulum, ER)等钙池释放及细胞膜上 Ca^{2+} 通道的开放可使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[3],但SOC激活的确切机制迄今尚不清楚.

1 SOC的定义和分子组成

SOC是一类由钙池排空 Ca^{2+} 后激活的、存在于细胞膜上的特殊 Ca^{2+} 通道.但细胞膜上有些 Ca^{2+} 通道的开放并不依赖于钙池充分耗竭,当钙池仅释放部分 Ca^{2+} 或某一区域释放 Ca^{2+} 时也能将其激活;有些通道不仅对 Ca^{2+} ,对其他如 Na^{+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子一样具有通透性,通道电导也存在明显差异.部分学者根据通道电导、离子选择性等将SOC分为主要的两大类,即: Ca^{2+} -SOC(CRAC)和多种阳离子(cation)-SOC^[4].随着orail、基质交感蛋白(stromal interaction protein, STIM)等相关分子的发现^[3,5-7],进一步的分型将通过SOC家族各个通道分子特征的鉴定来确定.

1989年Montell *et al*^[8]从果蝇复眼中分离出瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)基因及其表达蛋白,至今人们已经在哺乳动物中发现了7种TRP类型. TRP蛋白在分子结构上与哺乳动物电压依赖性 Ca^{2+} 通道(voltage-dependent Ca^{2+} channel, VDCC)非常类似,但没有电压敏感性位点,仅能构成非电压依赖的 Ca^{2+} 通道.由于TRP通道蛋白与SOC具有很多相似的通道特性和功能,

因此人们认为TRP基因很可能是编码SOC的基因,或者TRP蛋白是SOC的主要组成部分,甚至有学者将hTRP3通道(human TRP3 channel)当作典型的SOC^[9-11].由于缺乏高度特异性的SOC配体,也缺乏高度选择性的SOC抑制剂,因此目前尚未能分离纯化出构成SOC通道的蛋白.至今对于SOC分子组成的研究,主要围绕TRP通道开展^[12-15].

2 SOC的激活机制

钙池耗竭是如何与细胞膜上的通道相联系的?最初人们提出的4种假设模型是:(1)钙内流因子模型(Ca^{2+} influx factor model, CIF model);(2)构象耦联模型(conformational coupling model);(3)囊泡融合模型(vesicular fusion model);(4) Ca^{2+} 调节模型(Ca^{2+} regulation model).其中, CIF模型和构象耦联模型至今得到最多的支持和完善. CIF模型的原始构想是由Takemura *et al*^[16]于1989年首先提出,该模型假设在钙池耗竭后会产生一种信使分子,从钙池释放进入细胞质,然后扩散至细胞膜激活SOC. Irvine *et al*^[17]和Berridge *et al*^[18]于1990年提出了构象耦联模型,他们认为ER上的1, 4, 5-磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor, IP_3R)与细胞膜上的SOC之间存在结构上的连接,当钙池释放 Ca^{2+} 后, IP_3R 发生构象改变,通过“蛋白-蛋白”的直接相互作用将信号传递到细胞膜上的SOC并将其激活.

2.1 CIF模型 CIF模型也被称为弥散信使模型(diffusible messenger model). Randriamampita *et al*^[19]首先从钙池耗竭的Jurkat细胞中获得一种粗制提取物,将其作用于靶细胞上会引起相应的 Ca^{2+} 内流.这种特殊因子被称为钙内流因子(Ca^{2+} influx factor, CIF).

2.1.1 CIF及其活性鉴定 诸多学者在不同细胞中应用不同方法分别获得了相似的CIF提取物,并验证了CIF存在的真实性及其功能特征^[20-25]. Thomas *et al*^[20], Kim *et al*^[21]运用新的提纯方法从上述提取物中获得一种特殊成分,通过显微注射法将其注入靶细胞后激活了钙依赖性的氯离子电流(Ca^{2+} -dependent Cl^{-} current),这种电流通常被认为是由 Ca^{2+} 内流引发. Trepakova *et al*^[23]分别从酵母及人类血小板中获得了具有相同特性的CIF.部分学者将阴离子交换高效液相色谱分析技术(anion-exchange HPLC)引入到CIF的提纯方法中,分离出的一种特殊片段能够在不引发钙池释

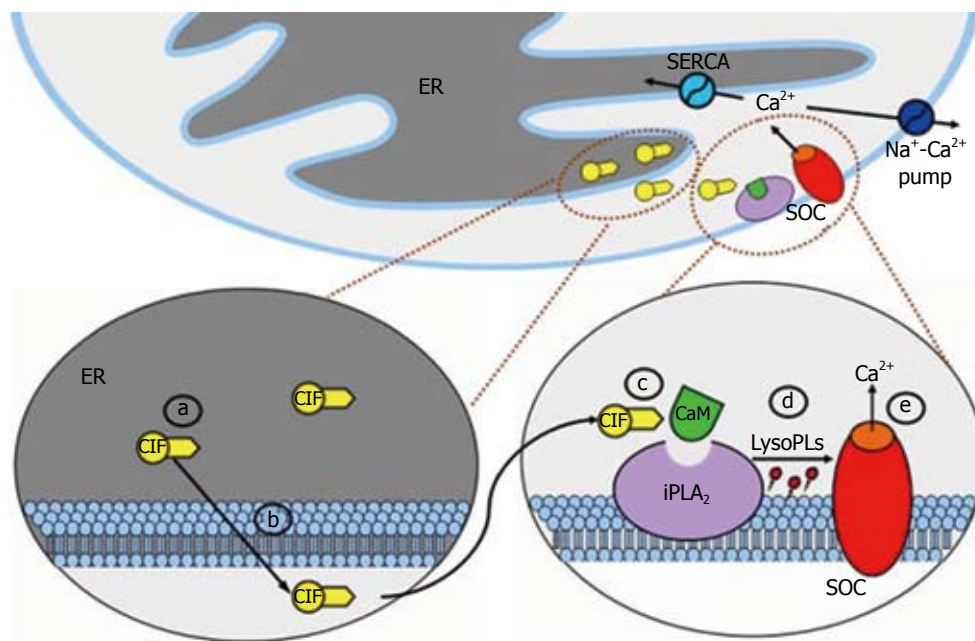


图 1 ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路模型. a: 钙池排空 Ca^{2+} 后, 在耗竭的钙池中产生CIF; b: CIF释放入细胞质后扩散至细胞膜; c: CIF从iPLA₂上移除CaM; d: iPLA₂被激活后产生LysoPLs; e: LysoPLs通过直接作用或者某种未知的间接过程激活SOC.

■ 相关报道

部分学者已从多种类型细胞中提取出具有相似特性的钙内流因子(CIF), ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路模型中的多数环节也已在近两年的实验中得到验证; 支持构象耦联模型的学者证实了TRP通道蛋白与三磷酸肌醇受体(IP₃R)确实存在结构连接, 并通过对内质网、Ryanodine受体、肌动蛋白等在钙信号通路中所发挥作用的分析, 解释了存在于该模型中的诸多问题.

放 Ca^{2+} 的情况下激活 Ca^{2+} 内流. Trepakova *et al*^[23]首次验证了CIF对单个SOC的作用. 他们在膜片钳内面向外(inside-out)的单通道记录模式下证明CIF(包括上述粗制提取物和CIF片段)能够充分激活单个的SOC. 通过目前的研究结果, 部分学者认为CIF是一种分子大小约为600 Da的弥散信使, 能够抗热、抗碱, 不会被蛋白酶破坏, 但能被磷酸酶以及对糖和核苷酸起作用的化学处理破坏, 这些特性说明他可能是某种磷酸化的糖或核苷酸之类的相关分子.

2.1.2 iPLA₂的相关作用 有研究显示, SOC被激活后即使将CIF冲洗掉, 通道仍然处于开放状态^[26]. 部分学者认为CIF是通过激活钙非依赖性的磷脂酶A₂(Ca^{2+} -independent phospholipase A₂, iPLA₂)影响SOC的. iPLA₂的主要作用是水解和重塑细胞内磷脂, 其在不同类型细胞和组织中具有多种重要功能^[27-30]. iPLA₂的β亚型(iPLA₂β)具有一种重要特性: 他的激活不依赖于 Ca^{2+} , 而是被钙调蛋白(calmodulin, CaM)所调节. 当iPLA₂β与CaM结合, 其功能将被抑制, 移除CaM会激活iPLA₂β, 并产生花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和溶血磷脂(lysophospholipids, LysoPLs). Smani *et al*^[31]的研究结果显示, 不同类型细胞SOC的激活过程必然会有iPLA₂参与. Smani *et al*^[24]进一步证明, 将CaM从iPLA₂移除会激活单个SOC; 外源性的应用LysoPLs, 能够激活整个靶细胞的

SOC. 更为重要的是, 实验证据显示CIF能够将CaM从iPLA₂移除^[24].

2.1.3 ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路模型 根据这些重要发现, 一个更为细化的CIF模型被提出, 即ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路模型^[24], 并于最近得到进一步验证^[25]. 如图1所示, ER排空 Ca^{2+} 后, 在耗竭的钙池中通过某种未知反应产生一种信使分子CIF, CIF释放入细胞质后扩散至细胞膜, 在细胞膜附近引发一系列级联反应: CIF从与细胞膜相结合的iPLA₂上移除具有抑制作用的CaM, iPLA₂被激活后产生LysoPLs, LysoPLs通过直接作用或者某种未知的间接过程激活SOC. 同时, 这个模型也能够解释SOCE是如何被终止的, 即 Ca^{2+} 重填钙池后停止产生CIF, CaM与iPLA₂重新结合, iPLA₂失活后停止产生LysoPLs, SOC活性和 Ca^{2+} 内流也相应被终止. iPLA₂在SOC激活中的关键作用已经在血小板、平滑肌细胞、Jurkat细胞、RBL细胞和前列腺癌上皮细胞中得到证实^[24,31].

虽然这种通路模型能够对之前的部分实验现象给出看似合理的解释, 但针对该通路中的未知部分, 很多学者又提出了新的问题: (1)SOC和CIF的分子组成究竟是怎样的? (2)CIF是在哪里、如何产生的? (3)CIF将CaM从iPLA₂移除的分子机制是什么? (4)iPLA₂在细胞膜附近是如何定位的, 与SOC存在何种关系? (5)LysoPLs激活

■创新盘点

国内针对SOC激活机制的综述尚未见报道, 本文较全面地总结了迄今关于SOC激活机制的观点及假设模型, 指出并分析了现存于各种观点中的问题及之间的矛盾。

SOC的分子机制是什么, 是否还存在某些中间反应? (6) Ca^{2+} 重填钙池后停止产生CIF, 在细胞质中的CIF以及后面产生的LysoPLs是如何代谢的? SOCE具体是怎样被终止的? (7) 如果该通路中的某些环节出现异常, 细胞会出现怎样的病理状态? 该假设模型每个步骤的具体细节, 仍然需要进一步的研究来验证。

2.1.4 CIF和其他信使分子 CIF并不是唯一能够激活SOC的弥散信使, 有些分子如 IP_3 、环二磷酸腺苷核糖(cADP-ribose)^[32]、鞘氨醇-1-磷酸盐(sphingosine-1-phosphate, Sp1P)^[33]、溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid)^[34]、5, 6-环氧二十碳三烯酸(5, 6-epoxyeicosatrienoic acid)^[35]甚至LysoPLs等, 也能够通过其他机制或SOCE级联反应下游阶段激活SOC。但不是所有激活SOC的信使分子都能被称为CIF。根据诸多学者对“CIF”的定义, 这个术语应该是专指那些在钙池耗竭后产生、通过特异地激活SOC而引发 Ca^{2+} 内流的弥散信使。虽然至今CIF的分子组成、所包含的亚型或究竟有多少种分子符合上述定义还不清楚, 但在之前的实验结果以及今后的研究中仍需对其严格加以区分, 谈及其他 Ca^{2+} 内流通路时, “CIF”应该被慎重使用。

2.2 构象耦联模型 构象耦联模型是由Irvine *et al*^[17]和Berridge *et al*^[18]于1990年先后提出, 之后又根据新的发现被多次修改^[36-37]。最初的假设模型认为: ER上的 IP_3R 与细胞膜上的SOC通过“蛋白-蛋白”的直接相互作用, 将信息传递给SOC, 从而将其激活并引发SOCE。这种假设与骨骼肌细胞的兴奋收缩耦联(excitation-contraction coupling)机制非常类似。

2.2.1 IP_3R 的结构和功能 IP_3R 是一种分子量约为240-260 kDa的糖蛋白, 主要分布于粗面内质网和外层核膜, 同时具有结合 IP_3 和 Ca^{2+} 通道的特性, 因此有人将其称为 IP_3 调控的 Ca^{2+} 通道。该受体朝向细胞质部分有一段较长的N末端和一段较短的靠近跨膜位点的C末端, N末端约有428-650个氨基酸残基高度保守, 是与 IP_3 结合的关键序列。 IP_3R 为同型四聚体结构, 每个亚单位有2734或2749个氨基酸, 均可结合一个 IP_3 分子, 从功能上区分为 IP_3 结合部位、调节部位和通道部分。该受体作为细胞内最大的受体之一, 存在3种亚型, 即 $\text{IP}_3\text{R1}$ 、 $\text{IP}_3\text{R2}$ 、 $\text{IP}_3\text{R3}$, 因组织和细胞类型不同而分布不同。

2.2.2 IP_3R 与TRP通道的连接 大量实验结果表明, IP_3R 确实能够和多种TRP通道结合^[15,38-41], 而

且在膜片钳单通道记录模式下, IP_3R 能够直接激活TRPC3通道^[9,39,42]。Kiselyov *et al*^[19,39]的研究显示, HEK293细胞中完整的 IP_3R 与hTRP3通道存在连接但并未发生相互作用, 钙池耗竭后hTRP3通道能被 IP_3R 激活, 在膜片钳实验中 IP_3 可恢复结合区对通道的调控, 作者因此认为 IP_3R 的N末端作为一个关键的调控区域能够充分激活SOC, IP_3R 中的感应和传导区对于维持SOC的失活状态是必需的。Boulay *et al*^[38]利用免疫共沉淀等方法证明 IP_3R 能够与TRP通道结合, 并鉴定出F2q和F2g作为 IP_3R 分子中的两个区域, 能够与TRP通道产生相互作用, F2q抑制了细胞膜上两种形式的 Ca^{2+} 内流, F2g的作用正好相反, 据此认为 IP_3R 具有双重作用, 细胞内 IP_3 水平升高时能够使钙池释放 Ca^{2+} , 钙池内 Ca^{2+} 浓度下降时又能激活 Ca^{2+} 内流。Rosado *et al*^[41]应用免疫共沉淀法, 证明人类血小板中内生性表达的hTRP1通道与 $\text{IP}_3\text{R2}$ (而不是 $\text{IP}_3\text{R1}$ 或 $\text{IP}_3\text{R3}$)存在结构上的连接。Tang *et al*^[40]证实, 当有 Ca^{2+} 存在时, IP_3R 与TRP通道间的作用能够被CaM抑制, 认为CaM和 IP_3R 对于调控TRP通道的活性都起着非常重要的作用, 但各种TRP通道对他们的敏感性存在差异。

2.2.3 构象耦联模型的补充和修改 尽管如此, 仍然有很多实验结果与构象耦联模型存在矛盾, 由此部分学者对原始模型进行了相应地补充和修改。

2.2.3.1 IP_3 激活两种形式的 Ca^{2+} 内流 van *et al*^[43]证实, 一种剪切了C末端的 IP_3R 突变体在细胞内表达后, 虽然不能引起钙池释放 Ca^{2+} , 却可以在 IP_3 的作用下发生构象改变激活 Ca^{2+} 内流。该研究结果符合Berridge *et al*^[37]的另外一种假设: 与 Ca^{2+} 内流通道连接的 IP_3R 不能使钙池释放 Ca^{2+} , 即丧失了本身作为 Ca^{2+} 通道的特性, 避免了从钙池释放出大量 Ca^{2+} 聚集在连接区附近反馈性地抑制通道开放。而且Huser *et al*^[44]在对内皮细胞的研究中证实, ER区域性地释放 Ca^{2+} , 能够激活100 μm 远某处的 Ca^{2+} 内流, 这体现了钙池与其调控的 Ca^{2+} 内流之间具有自我平衡功能, 即钙池无论以怎样的方式和程度释放 Ca^{2+} 都能够被重填。

在总结上述相关研究后, Berridge对ER和 IP_3R 的位置及结构做出了新的描述, 并提出 IP_3 能够通过两种形式激活 Ca^{2+} 内流的假设^[37]。如图2所示, 钙池ER靠近细胞膜区域形成周期性排列的指状突起, 突起上 IP_3R 的顶部朝向细胞膜形成构象耦联的结构单位, 分隔ER和细胞膜之间的10 nm空间内显示出周期性的密度变化, 这里

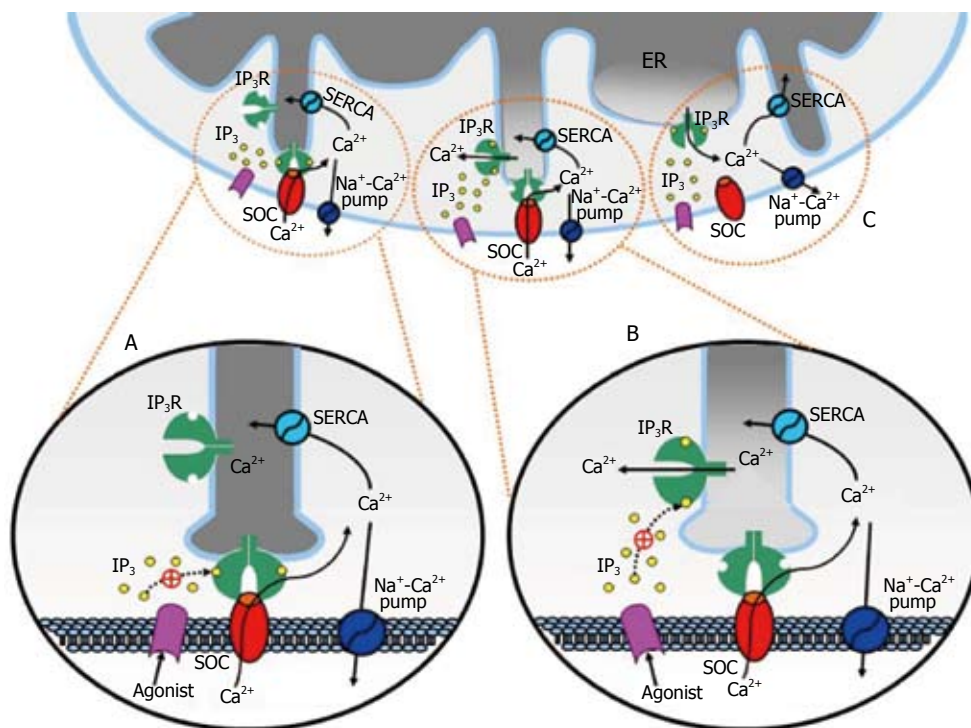


图 2 IP₃激活两种形式的Ca²⁺内流. A: IP₃直接激活与SOC连接的IP₃R, 后者发生构象改变, 将信息传递给与之连接的SOC引发Ca²⁺内流, 这种IP₃R不具备Ca²⁺通道特性; B: IP₃激活未与SOC连接的IP₃R并引起钙池区域性释放Ca²⁺, 这种区域性释放能够使与SOC连接的IP₃R发生构象改变以激活SOC; C: 如果该片状区域更接近钙池其他部分, 只能引起钙池释放Ca²⁺而不会激活SOC.

是IP₃R传递信息的区域. 当激动剂激活膜表面受体后, 在细胞内相应的某片状区域产生IP₃, 并通过两种形式激活Ca²⁺内流: 如果该片状区域覆盖IP₃R与SOC的连接区(图2A), IP₃直接激活IP₃R, 后者发生构象改变, 将信息传递给与之连接的SOC引发Ca²⁺内流, 这种IP₃R不具备Ca²⁺通道特性, 所以在该位点不会引发钙池释放Ca²⁺; 如果该片状区域在连接区附近(图2B), IP₃激活未与SOC连接的IP₃R并引起钙池区域性释放Ca²⁺, 这种区域性释放能够使与SOC连接的IP₃R发生构象改变以激活SOC; 如果该片状区域更接近钙池其他部分(图2C), 只能引起钙池释放Ca²⁺而不会激活SOC. IP₃的直接激活作用能够解释钙池耗竭前产生Ca²⁺内流的原因, 后一种激活作用解释了当钙池主体部分仍然含有大量Ca²⁺时, 钙池的区域性释放也能引发Ca²⁺内流. Berridge还指出, 两种激活方式可能同时存在于细胞中, 但他们的主要功能有所不同: 第一种方式主要引发受体激活的Ca²⁺内流, 后一种方式则体现了钙池的自我平衡功能.

2.2.3.2 SOC与IP₃ROC 虽然很多TRP通道能够与IP₃R结合, 其中有些也能与Ryanodine受体结

合; 诸多旨在说明IP₃R能够调控TRP通道的研究还牵涉到很多其他信号分子, 如SERCA、caveolin-1、磷脂酶C-β(phospholipase C-β, PLC-β)等, 人们怀疑IP₃R与TRP通道的连接区对于调控SOC是否具有足够高的特异性. 此外TRP蛋白与SOC之间的关系仍有待进一步探讨. 部分学者认为, IP₃R激活的Ca²⁺通道不同于SOC, 是一种新的阳离子通道家族, TRP蛋白可能属于这种通道之一. 有研究显示, 在人类前列腺癌上皮细胞^[45-46]、肿瘤A431细胞^[47]和HEK293细胞^[48]中, 不同类型的Ca²⁺通道具有不同的激活方式和分子起源, 并可共存于同一细胞内. 在前列腺癌上皮细胞中^[45], 一种阳离子通道能够在钙池耗竭后激活, 其开放依赖于iPLA₂的调控; 另一种能够被IP₃激活而对iPLA₂不敏感, 中断IP₃R和通道的连接能够使其失活. 前一种通道很可能是SOC, 依赖于TRP4的表达而不是TRP1, 后一种恰好相反.

Bolotina *et al*^[4,49]认为不同类型的Ca²⁺通道能够对不同信号作出反应, 并可能共存于同一细胞的细胞膜上. 他们在ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路和构象耦联模型的基础上提出了新的假设. 两种类型的Ca²⁺通道可通过不

■应用要点

由于SOC参与如细胞分泌、钙超载等诸多的生理和病理过程, 本文有助于加深并促进读者对部分与非兴奋细胞钙通道相关的生理学、病理生理学机制的了解.

■同行评价

本文具有较好的科学性, 创新性与可读性。

同机制激活, 一种是由钙池操纵的, 即SOC, 另一种是由IP₃R操纵的, 即IP₃R操纵的Ca²⁺通道(IP₃R-operated channel, IP₃ROC). SOC能够通过ER-CIF-iPLA₂-CaM-LysoPLs-SOC通路激活; IP₃ROC与相应的IP₃R连接, 钙池通过IP₃R释放Ca²⁺使后者发生构象改变, 从而激活IP₃ROC. 这两种Ca²⁺通道可能分别在不同类型细胞中起作用, 或在同一细胞的代谢过程中发挥不同作用. 这种模型与上述Berridge M的假设有相通之处.

2.2.3.3 分泌样耦联模型 构象耦联模型是基于“蛋白-蛋白”间的快速反应, 这与SOCE相对缓慢的激活过程不符, 为了解释这一矛盾, Patterson *et al*^[36]提出了“分泌样耦联模型”(secretion-like coupling model): 钙池耗竭后, ER的外围部分在细胞骨架的作用下移向细胞膜, 使IP₃R与SOC连接并调控SOCE, ER的迁移过程需要额外的时间, 这是SOCE激活过程相对缓慢的主要原因. 这个模型的主要依据是, 在部分细胞中稳定细胞骨架阻碍IP₃R与SOC形成连接, 反之则能促进连接^[36,50-51]. 但细胞骨架能够影响很多细胞膜上的离子通道致使细胞内外膜电位发生改变, 因此Ca²⁺内流很有可能是在电势驱动下产生. 在膜片钳全细胞(whole-cell)记录模式下钳制膜电位, RBL-1细胞中外围细胞骨架的状态变化并没有对SOC造成影响^[50], 但在其他几种类型细胞中情况则相反^[52]. 该模型成立的另外一个前提条件是IP₃R的作用应该贯穿于整个Ca²⁺内流过程的始终. 在以前的研究中, 部分学者将2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)作为IP₃R的直接抑制剂应用于细胞, 抑制了thapsigargin激活的SOC^[53]. 然而后面人们发现, 2-APB能够通过细胞外某一位点直接抑制SOC^[50,54-55]. 应用IP₃R的其他抑制剂, 如肝磷脂(heparin)等, SOC的激活不受影响^[50-56]. 在DT40细胞中^[54-55,57-58], 敲除3种表达IP₃R的基因后, 细胞对IP₃不再有反应, 但似乎仍然具有正常的SOCE. Kiselyov *et al*^[59]认为, 在这种情况下Ryanodine受体可代替IP₃R与SOC连接. 钌红(ruthenium red)作为Ryanodine受体的拮抗剂, 能够抑制上述DT40细胞的SOCE. 在RBL-1细胞中应用钌红和肝磷脂, SOCE也能正常激活^[60].

2.3 囊泡融合模型 该模型假设, 在静息状态下细胞膜上不存在SOC, 钙池耗竭后细胞通过一种分泌机制, 以囊泡融合的方式将SOC嵌入细胞膜. 其主要依据是, SNAP-25的突变体和能将其裂解的A型肉毒毒素(botulinum neurotoxin A)抑

制了爪蟾卵母细胞的SOCE, B、E型肉毒毒素及破伤风毒素没有类似作用^[61]. 在HEK293细胞中, A型肉毒毒素、布雷菲德菌素A(brefeldin A)和破伤风毒素也都能以相似的过程抑制SOCE^[62]. 上述发现使部分学者产生了疑惑: 梭菌毒素的抑制作用是影响了细胞分泌还是仅仅阻碍了囊泡的迁移? 另外, 人们普遍认为非兴奋细胞不表达SNAP-25, 而是表达对肉毒毒素不敏感SNAP-23, 这在Scott *et al*^[63]的实验中已得到证实. 更为重要的是, 过度表达的SNAP-23突变体、突变的NEM敏感型因子和重组的 α -SNAP蛋白能够分别抑制转铁蛋白受体循环、ER迁移和钙依赖性的细胞分泌, 但都对SOCE没有影响^[63-64]. 总之, 很多能够调节细胞分泌的因素都无法对SOC的激活造成影响, 至少在RBL细胞和HEK293细胞中, SOCE与细胞分泌没有必然联系.

经过近20 a的努力, 人们对SOC激活机制的研究已取得了实质性进展. 目前, 在最初的4种假设模型中, CIF模型和构象耦联模型得到最多的支持和完善. 不同实验小组证实了CIF的存在, 同时很多学者在构象耦联模型的基础上又提出很多新的观点. 虽然诸多学者在SOC激活机制的研究中取得了可喜进步, 但一些关键因素, 如CIF和SOC的分子组成等仍不清楚. 相信不久的将来, SOC激活机制研究的突破, 将对非兴奋细胞钙通道特性和调节的研究带来革命性变化, 进而促使与非兴奋细胞钙通道相关的生理学、病理生理学机制和临床防治研究取得重大进步.

3 参考文献

- 1 Jiang N, Zhang ZM, Liu L, Zhang C, Zhang YL, Zhang ZC. Effects of Ca²⁺ channel blockers on store-operated Ca²⁺ channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4694-4698
- 2 Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005; 85: 757-810
- 3 Gill DL, Spassova MA, Soboloff J. Signal transduction. Calcium entry signals--trickles and torrents. *Science* 2006; 313: 183-184
- 4 Bolotina VM, Csutora P. CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 378-387
- 5 Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* 2006; 312: 1220-1223
- 6 Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006; 281: 20661-20665
- 7 Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao

- A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; 441: 179-185
- 8 Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989; 2: 1313-1323
- 9 Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 1998; 396: 478-482
- 10 Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 1996; 85: 661-671
- 11 Hurst RS, Zhu X, Boulay G, Birnbaumer L, Stefani E. Ionic currents underlying HTRP3 mediated agonist-dependent Ca²⁺ influx in stably transfected HEK293 cells. *FEBS Lett* 1998; 422: 333-338
- 12 Woodard GE, Sage SO, Rosado JA. Transient receptor potential channels and intracellular signaling. *Int Rev Cytol* 2007; 256: 35-67
- 13 Kiselyov K, Shin DM, Kim JY, Yuan JP, Muallem S. TRPC channels: interacting proteins. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 559-574
- 14 Ambudkar IS, Bandyopadhyay BC, Liu X, Lockwich TP, Paria B, Ong HL. Functional organization of TRPC-Ca²⁺ channels and regulation of calcium microdomains. *Cell Calcium* 2006; 40: 495-504
- 15 Putney JW Jr. Inositol lipids and TRPC channel activation. *Biochem Soc Symp* 2007; 37-45
- 16 Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1989; 264: 12266-12271
- 17 Irvine RF. 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 1990; 263: 5-9
- 18 Berridge MJ. Calcium oscillations. *J Biol Chem* 1990; 265: 9583-9586
- 19 Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 1993; 364: 809-814
- 20 Thomas D, Hanley MR. Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 6429-6432
- 21 Kim HY, Thomas D, Hanley MR. Chromatographic resolution of an intracellular calcium influx factor from thapsigargin-activated Jurkat cells. Evidence for multiple activities influencing calcium elevation in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 9706-9708
- 22 Csutora P, Su Z, Kim HY, Bugrim A, Cunningham KW, Nuccitelli R, Keizer JE, Hanley MR, Blalock JE, Marchase RB. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 121-126
- 23 Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 26158-26163
- 24 Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 113-120
- 25 Csutora P, Zarayskiy V, Peter K, Monje F, Smani T, Zakharov SI, Litvinov D, Bolotina VM. Activation mechanism for CRAC current and store-operated Ca²⁺ entry: calcium influx factor and Ca²⁺-independent phospholipase A2beta-mediated pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 34926-34935
- 26 Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA, Bolotina VM. Properties of a native cation channel activated by Ca²⁺ store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 7782-7790
- 27 Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 28-39
- 28 Ramanadham S, Hsu FF, Zhang S, Jin C, Bohrer A, Song H, Bao S, Ma Z, Turk J. Apoptosis of insulin-secreting cells induced by endoplasmic reticulum stress is amplified by overexpression of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂ beta) and suppressed by inhibition of iPLA₂ beta. *Biochemistry* 2004; 43: 918-930
- 29 Wang Z, Ramanadham S, Ma ZA, Bao S, Mancuso DJ, Gross RW, Turk J. Group VIA phospholipase A₂ forms a signaling complex with the calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIbeta expressed in pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 6840-6849
- 30 Martinez J, Moreno JJ. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ and cytochrome P-450 in store-operated calcium entry in 3T6 fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 733-739
- 31 Smani T, Zakharov SI, Leno E, Csutora P, Trepakova ES, Bolotina VM. Ca²⁺-independent phospholipase A₂ is a novel determinant of store-operated Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* 2003; 278: 11909-11915
- 32 Thompson M, White T, Chini EN. Modulation of store-operated Ca²⁺ entry by cyclic-ADP-ribose. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 739-748
- 33 Itagaki K, Hauser CJ. Sphingosine 1-phosphate, a diffusible calcium influx factor mediating store-operated calcium entry. *J Biol Chem* 2003; 278: 27540-27547
- 34 Itagaki K, Kannan KB, Hauser CJ. Lysophosphatidic acid triggers calcium entry through a non-store-operated pathway in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005; 72: 181-189
- 35 Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 2003; 424: 434-438
- 36 Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL. Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 1999; 98: 487-499
- 37 Berridge M. Conformational coupling: a physiological calcium entry mechanism. *Sci STKE* 2004; (243): pe33
- 38 Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP₃R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A 1999; 96: 14955-14960
- 39 Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S. The N-terminal domain of the IP₃ receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 1999; 4: 423-429
- 40 Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX. Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 21303-21310
- 41 Rosado JA, Sage SO. Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca²⁺ stores are depleted. *Biochem J* 2000; 350 Pt 3: 631-635
- 42 Kaznacheyeva E, Zubov A, Nikolaev A, Alexeenko V, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN. Plasma membrane calcium channels in human carcinoma A431 cells are functionally coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate complexes. *J Biol Chem* 2000; 275: 4561-4564
- 43 van Rossum DB, Patterson RL, Kiselyov K, Boehning D, Barrow RK, Gill DL, Snyder SH. Agonist-induced Ca²⁺ entry determined by inositol 1,4,5-trisphosphate recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2323-2327
- 44 Huser J, Holda JR, Kockskamper J, Blatter LA. Focal agonist stimulation results in spatially restricted Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 1): 101-109
- 45 Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebault S, Lepage G, Parys JB, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 30326-30337
- 46 Pigozzi D, Ducret T, Tajeddine N, Gala JL, Tombal B, Gailly P. Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 proteins in LNCaP prostate cancer cell line. *Cell Calcium* 2006; 39: 401-415
- 47 Gusev K, Glouchankova L, Zubov A, Kaznacheyeva E, Wang Z, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN. The store-operated calcium entry pathways in human carcinoma A431 cells: functional properties and activation mechanisms. *J Gen Physiol* 2003; 122: 81-94
- 48 Bugaj V, Alexeenko V, Zubov A, Glushankova L, Nikolaev A, Wang Z, Kaznacheyeva E, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN. Functional properties of endogenous receptor- and store-operated calcium influx channels in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 16790-16797
- 49 Bolotina VM. Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE* 2004; 2004: pe34
- 50 Bakowski D, Glitsch MD, Parekh AB. An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current I(CRAC) in RBL-1 cells. *J Physiol* 2001; 532: 55-71
- 51 Rosado JA, Jenner S, Sage SO. A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformational coupling. *J Biol Chem* 2000; 275: 7527-7533
- 52 Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E263-E272
- 53 Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 2000; 287: 1647-1651
- 54 Prakriya M, Lewis RS. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 2001; 536: 3-19
- 55 Broad LM, Braun FJ, Lievreumont JP, Bird GS, Kurosaki T, Putney JW Jr. Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 2001; 276: 15945-15952
- 56 Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992; 355: 353-356
- 57 Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, Kurosaki T. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 1997; 16: 3078-3088
- 58 Ma HT, Venkatachalam K, Li HS, Montell C, Kurosaki T, Patterson RL, Gill DL. Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca²⁺ entry channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 18888-18896
- 59 Kiselyov K, Shin DM, Shcheynikov N, Kurosaki T, Muallem S. Regulation of Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current (Icrac) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells. *Biochem J* 2001; 360: 17-22
- 60 Fierro L, Parekh AB. On the characterisation of the mechanism underlying passive activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current ICRAC in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol* 1999; 520 Pt 2: 407-416
- 61 Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Tsien RY. Activation of store-operated Ca²⁺ current in Xenopus oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 1999; 98: 475-485
- 62 Alderton JM, Ahmed SA, Smith LA, Steinhardt RA. Evidence for a vesicle-mediated maintenance of store-operated calcium channels in a human embryonic kidney cell line. *Cell Calcium* 2000; 28: 161-169
- 63 Scott CC, Furuya W, Trimble WS, Grinstein S. Activation of store-operated calcium channels: assessment of the role of snare-mediated vesicular transport. *J Biol Chem* 2003; 278: 30534-30539
- 64 Bakowski D, Burgoyne RD, Parekh AB. Activation of the store-operated calcium current ICRAC can be dissociated from regulated exocytosis in rat basophilic leukaemia (RBL-1) cells. *J Physiol* 2003; 553: 387-393

I κ B激酶 β 在非酒精性脂肪性肝炎发病机制中的作用

赵彩彦, 王亚东, 周俊英

赵彩彦, 王亚东, 周俊英, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

赵彩彦, 2004年河北医科大学博士, 教授, 主要从事肝病的基础及临床研究。

河北省自然科学基金资助项目, No. C200500780

通讯作者: 赵彩彦, 050051, 河北省石家庄市自强路139号, 河北医科大学第三医院感染科. zhaoyy63811@vip.sohu.com

电话: 0311-87027951-2352

收稿日期: 2007-02-02 接受日期: 2007-03-23

Role of the kappa B kinase beta inhibitor in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis

Cai-Yan Zhao, Ya-Dong Wang, Jun-Ying Zhou

Cai-Yan Zhao, Ya-Dong Wang, Jun-Ying Zhou, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C200500780

Correspondence to: Cai-Yan Zhao, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, 139 Ziqiang Road, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. zhaoyy63811@vip.sohu.com

Received: 2007-02-02 Accepted: 2007-03-23

Abstract

AIM: To investigate the expression and significance of the inhibitor kappa B kinase beta (IKK β) in livers of rats with non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

METHODS: Forty healthy male Wistar rats were randomly divided into two equal groups. Rats in the normal control group were fed a standard diet, while the others in the model group were fed a fat-rich diet that consisted of 10% lard + 2% cholesterol + 5% corn oil + 83% standard diet. At the end of the 16th week of the experiment all rats were sacrificed and serum and hepatic tissue were collected. Concentrations of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were examined and the concentration of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in serum was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Histological characters were observed by HE, Sudan IV, and Masson

staining under microscopy. The expression of IKK β mRNA and the binding activity of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and electrophoretic mobility shift assay (EMSA), respectively.

RESULTS: Serum concentrations of ALT, AST and TNF- α in the model group were significantly increased (96.63 ± 14.2 U/L *vs* 39.50 ± 12.2 U/L, 156.13 ± 14.7 U/L *vs* 71.25 ± 14.4 U/L, 48.23 ± 3.4 U/L *vs* 6.74 ± 1.3 U/L, $P < 0.01$). The expression of IKK β mRNA and the binding activity of NF- κ B of rats in the NASH group were obviously higher than those in the normal control group (0.85 ± 0.03 *vs* 0.22 ± 0.02 , 10.12 ± 1.34 *vs* 1.58 ± 1.23 , $P < 0.01$). Steatosis, inflammation and fibrosis were present to different extents in the livers of rats with NASH (25.63 ± 7.21 *vs* 1.24 ± 3.24 , 3.21 ± 0.52 *vs* 0.49 ± 0.36 , 6.26 ± 1.86 *vs* 3.02 ± 1.17 , $P < 0.01$). Further, the expression of IKK β mRNA in hepatic tissue ($r = 0.681$) correlated positively with the binding activity of NF- κ B ($r = 0.864$), the extent of steatosis ($r = 0.930$), inflammation and TNF- α levels ($r = 0.762$) in serum of the model group.

CONCLUSION: Increasing expression of IKK β mRNA may have an important role in the pathogenesis of NASH by inducing activation of NF- κ B and promoting production of TNF- α , thus contributing to the development of NASH.

Key Words: Inhibit or kappa B kinase beta; Non-alcoholic steatohepatitis; Nuclear factor-kappa B

Zhao CY, Wang YD, Zhou JY. Role of the kappa B kinase beta inhibitor in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1881-1886

摘要

目的: 探讨I κ B激酶 β (inhibit kappa B kinase beta, IKK β)在非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)大鼠肝组织中的表达及意义。

■背景资料

目前认为, IKK β 为核因子- κ B抑制蛋白上游激酶, 为NF- κ B活化所必需的催化亚单位, 其通过活化NF- κ B, 诱导其核移位, 促进炎症介质基因的表达, 参与机体炎症反应。同时, 有学者研究表明, 过度活化的IKK β 参与机体胰岛素抵抗(IR), 故此, 可以推测IKK β 可以通过不同途径参与脂肪性肝炎的形成。但目前其在NASH炎症损伤中的作用机制国内尚无报道。

方法: 健康♂ Wistar大鼠40只, 随机分为正常对照组($n = 20$)和高脂模型组($n = 20$), 分别给予标准饲料喂养和高脂饲料喂养. 16 wk末空腹处死全部大鼠, 收集血清和肝组织标本. 检测血清中ALT、AST及ELISA法检测血清TNF- α 水平; 光镜下观察肝组织病理变化; RT-PCR和EMSA法分别检测肝组织IKK β mRNA表达和核因子- κ B(NF- κ B)活性改变.

结果: 模型组大鼠血清ALT、AST、TNF- α 水平、肝组织IKK β mRNA表达及NF- κ B活性均较正常对照组明显增强(96.63 ± 14.2 U/L vs 39.50 ± 12.2 U/L, 156.13 ± 14.7 U/L vs 71.25 ± 14.4 U/L, 48.23 ± 3.4 U/L vs 6.74 ± 1.3 U/L, 0.85 ± 0.03 vs 0.22 ± 0.02 , 10.12 ± 1.34 vs 1.58 ± 1.23 , $P < 0.01$); 病理则表现不同程度的脂肪变性、炎症、坏死及窦周纤维化与对照组相比有显著差异(25.63 ± 7.21 vs 1.24 ± 3.24 , 3.21 ± 0.52 vs 0.49 ± 0.36 , 6.26 ± 1.86 vs 3.02 ± 1.17 , $P < 0.01$). 相关分析显示: 肝组织IKK β mRNA的表达与NF- κ B活性($r = 0.930$)、脂肪变性($r = 0.681$)和炎症坏死程度($r = 0.864$)以及血清TNF- α 水平($r = 0.762$)正相关($P < 0.05$).

结论: IKK β mRNA表达增加在NASH发病机制中发挥重要作用, 其通过介导NF- κ B活化, 引起TNF- α 的大量生成、释放, 诱导加重NASH的发生发展.

关键词: I κ B激酶 β ; 非酒精性脂肪性肝炎; 核因子- κ B

赵彩彦, 王亚东, 周俊英. I κ B激酶 β 在非酒精性脂肪性肝炎发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1881-1886
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1881.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是以肝细胞脂肪沉积、小叶内炎症伴气球样变性为特征, 可伴Mallory小体和不同程度纤维化的一类遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 为单纯性脂肪肝进展到脂肪性肝硬化的中间病理过程, 常合并于肥胖、糖尿病、高脂血症患者. 随着生活水平的提高和生活方式的改变, NASH已成为严重威胁人们身心健康的常见疾病^[1-3].

I κ B激酶 β (inhibit kappa B kinase beta, IKK β)复合物属丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶超家族成员, 主要包括IKK α , IKK β 和IKK γ 3个亚单位^[4]. 其中IKK β 是促炎因子激活核因子

κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)所必需的催化亚单位, 参与抗凋亡及炎症相关基因的调控^[5-8]. 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)等可通过多种信号途径活化IKK β , 使下游NF- κ B抑制因子(inhibitor nuclear factor-kappa B, I κ B)特异位点丝氨酸磷酸化而降解, 继而NF- κ B与之解离活化, 易位核内, 启动相关炎症介质基因转录^[8-12]. 本文旨在探讨IKK β 和NF- κ B在NASH大鼠肝脏中的表达变化及其机制, 进一步明确其在NASH发病中的作用, 为阐明NASH的发病机制提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Wistar大鼠40只, 体质量 140 ± 10 g, 由河北医科大学动物实验中心提供; IKK β 基因扩增引物、 β -肌动蛋白(β -actin): 北京奥科生物工程有限公司; AMV反转录酶、Taq DNA聚合酶、NF- κ B寡核苷酸、EMSA试剂盒: 美国Promega公司; 丙稀酰胺、N, N亚甲基双丙稀酰胺、DTT、PMSF、Hepes、精胺、亚精胺、NP-40、Aprotinin: 美国Sigma公司; [γ -³²P] ATP: 北京福瑞生物工程公司; TNF- α ELISA试剂盒: 北京中山试剂公司; 过硫酸铵、EDTA、Tris等均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 动物分组与标本制备 40只Wistar大鼠, 标准饲料适应喂养1 wk后, 随机分为2组: 正常对照组20只, 标准饲料喂养; 模型组20只, 高脂饲料喂养, 即在标准饲料基础上2%胆固醇+10%猪油+5%玉米油^[13-14]. 16 wk末, 禁食12 h后, 股静脉放血处死全部大鼠, 4℃离心分离血清, 检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)和TNF- α 水平; 迅速分离肝脏并称质量, 计算肝脏湿质量/体质量 $\times 100\%$, 即为肝指数. 肝右叶中部快速切取两块肝组织, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 用于病理染色观察; 余肝组织置液氮速冻后, -80℃冰箱保存, 用于总RNA及核蛋白提取.

1.2.2 普通光镜下病理观察 HE染色观察肝组织炎症、坏死; SudanIV染色观察肝细胞脂肪变性, 以胞质中出现红色颗粒为阳性; Masson三重染色观察肝组织纤维化, 绿染部分为胶原纤维. 多功能病理图像分析仪测定脂变和胶原纤维面积, 每张切片选取四周及中央5个区域, 10倍物

表 1 IKKβ和β-actin引物序列及PCR反应条件

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)	退火温度(℃)	循环次数
IKKβ	上游 AGC TCT GGA ACC TCC TGA AGA	246	60℃	30
	下游 AGC TCC AGT CTA GGG TCG TGA			
β-actin	上游 TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C	348	55℃	29
	下游 TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G			

■同行评价

本文通过RT-PCR及EMSA方法观察NASH大鼠IKKβ及NF-κB表达变化,探讨其在NASH发病中的作用机制,为今后NASH的有效治疗提供理论基础,有重要学术价值。

镜下计算平均面积密度(阳性面积与统计场面积百分比)。炎症活动度积分标准分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)、桥接坏死(BN)4项,每项根据病变程度计分1-4分,按P+L+2PN+2BN公式计算总积分^[15]。以上均由富有经验的病理科医师双盲观察并评分。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测IKKβ mRNA的表达 采用TRIzol一步法试剂盒提取肝组织总RNA,逆转录合成cDNA模板,在Taq DNA聚合酶作用下扩增IKKβ基因片段,以β-actin为内参照。引物序列及PCR反应参数如下(表1)。

PCR产物在80 g/L聚丙烯酰胺凝胶上80 V恒压电泳2 h, 0.5 mg/L溴化乙锭溶液中染色10 min,应用BIO-PROFIF图像分析系统进行吸光度扫描,以IKKβ/β-actin的比值计算IKKβ mRNA相对表达量。

1.2.4 肝组织核蛋白的提取 参考文献^[16]稍加改变。肝组织匀浆、过滤,收集细胞悬液,4℃ 1850 g离心5 min,弃上清。快速将细胞沉淀重悬于5倍体积冷PBS缓冲液A中(mmol/L: Hepes-KOH 10, KCl 10, MgCl₂ 1.5, DTT 0.5, PMSF 0.5, 精胺 0.15, 亚精胺0.5, 6 mL/L NP-40, pH 7.9),混匀,4℃ 1850 g离心10 min,弃上清。将细胞沉淀重悬于3倍体积冷PBS缓冲液B中(mmol/L: Hepes-KOH 10, KCl 10, MgCl₂ 1.5, DTT 0.5, PMSF 0.5, 精胺 0.15, 亚精胺0.5, aprotinin 14 mg/L, pH 7.9),冰浴10 min,期间上下匀浆15次,4℃ 2500 g离心15 min,弃上清。用2/3体积的缓冲液C(mmol/L: Hepes-KOH 20, KCl 10, MgCl₂ 1.5, DTT 0.2, PMSF 0.5, EDTA 0.2, aprotinin 14 mg/L, 200 mL/L glycerol, pH 7.9)重悬细胞核沉淀,上下匀浆10次,同时加入缓冲液D(mmol/L: Hepes-KOH 20, NaCl 0.33, MgCl₂ 1.5, DTT 0.5, PMSF 0.5, EDTA 0.5, 14 mg/L aprotinin, 100 mL/L glycerol, pH 7.9)震荡冰浴1 h。4℃ 10 000 g离心30 min,收集上清,紫外分光光度法测定蛋白质浓度,分装-80℃保存。

1.2.5 电泳迁移率改变分析(EMSA)检测NF-κB活

性 方法参照试剂盒说明书进行:取1.75 μmol/L未标记的双链NF-κB寡核苷酸探针(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5')2 μL, T4多核苷酸激酶1 μL, [γ-³²P] ATP(0.37 GBq/mL)1 μL进行标记。然后将核蛋白提取物25 μg置于10 μL凝胶滞留结合缓冲液中,37℃孵育10 min,加入1 μL已标记的寡核苷酸探针,37℃孵育30 min,60 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶80 V电泳2 h。真空干燥后压片,-80℃放射自显影72 h,洗片后应用法国BIO-PROFIL图像分析系统进行扫描,测量显色阳性区及背景阴性区的平均灰度值。

统计学处理 计量资料以mean±SD表示,采用SPSS12.0统计软件处理所有数据,两样本均数比较采用成组设计t检验,方差不齐时采用t检验。直线相关分析法进行相关性分析,双侧P<0.05为有统计学差异,双侧P<0.01为有显著统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠一般表现及血清生化指标变化 各组大鼠起始体质量无差别,正常组大鼠活泼,皮毛光滑,体质量逐渐增加;而高脂饲料喂养大鼠体质量增长迅速,温顺,不喜动且皮毛发黄,蓬乱不顺滑。实验结束时,模型组大鼠体质量较正常组超质量20%以上,肝质量、肝指数以及血清中ALT, AST, TNF-α含量均显著升高(P<0.01),且TNF-α水平与肝脏炎症坏死程度呈正相关(r = 0.702, 表2)。

2.2 肝脏的病理观察 正常组大鼠肝色鲜红,边缘锐利,明亮光泽;模型组大鼠肝脏体积明显增大,颜色呈浅黄、土黄色或红黄相间,质软缘钝,切面油腻感明显。镜下正常组大鼠肝细胞正常,小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐;而模型组大鼠肝细胞浊肿、出现小泡性或小泡混合性脂肪变,偶见Mallory小体,点灶状或碎屑样坏死,肝窦狭窄,细胞病变以小叶三区为著,汇管区扩

表 2 各组大鼠肝指数及血清生化指标的变化(mean \pm SD, $n = 20$)

分组	体质量(g)	肝质量(g)	肝指数(%)	ALT(U/L)	AST (U/L)	TNF- α (ng/L)
正常对照组	259 \pm 4.7	9.43 \pm 1.4	39.8 \pm 3.6	39.50 \pm 12.2	71.25 \pm 14.4	6.74 \pm 1.3
高脂模型组	364 \pm 5.4 ^b	17.86 \pm 2.8 ^b	52.4 \pm 4.6 ^b	96.63 \pm 14.2 ^b	156.13 \pm 14.7 ^b	48.23 \pm 3.4 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.表 3 肝组织IKK β mRNA表达、NF- κ B活性及组织病理定量指标的变化(mean \pm SD, $n = 20$)

分组	IKK β mRNA	NF- κ B活性	脂肪变性	炎症与坏死	胶原纤维
正常对照组	0.22 \pm 0.02	1.58 \pm 1.23	1.24 \pm 3.24	0.49 \pm 0.36	3.02 \pm 1.17
高脂模型组	0.85 \pm 0.03 ^b	10.12 \pm 1.34 ^b	25.63 \pm 7.21 ^b	3.21 \pm 0.52 ^b	6.26 \pm 1.86 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

大、伴枯否细胞增生及大量炎性细胞浸润, 并可见窦周及中央静脉周围纤维化(表3).

2.3 肝组织IKK β mRNA表达及NF- κ B活性改变与正常组相比, 模型大鼠肝组织IKK β mRNA表达及NF- κ B活性显著增强($P < 0.01$); 进一步相关分析表明, IKK β mRNA在模型组肝组织的表达与肝组织的脂肪变性、炎症坏死程度、NF- κ B活性以及血清TNF- α 水平均呈正相关(r 值分别为0.681, 0.864, 0.930, 0.762)(表3, 图1-2).

3 讨论

目前, NASH确切发病机制尚未完全阐明, 最为成熟的“二次打击”学说^[17]认为, 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是NASH发病的中心环节^[18], 一方面使得胰岛素抑制脂解的作用减弱, 促进肝脏脂质积聚, 引发肝细胞脂肪变性; 另一方面, IR还可诱发氧化应激、促进活性氧生成, 诱导肝内炎症细胞因子的产生、释放, 引发肝脏炎症损伤^[19], 而抑制IR可显著降低肝组织脂肪变性及炎症损伤^[20]. 众所周知, NF- κ B是体内广泛存在的对氧化应激敏感的一种重要前炎症介质基因核转录因子, 在正常情况下, 其抑制蛋白I κ B结合成无活性的二聚体, 存在于胞质中, 参与维持细胞生长、抗凋亡等生理功能. 在病理状态下, 内毒素、氧化应激和脂质过氧化等因素可激活NF- κ B引发TNF- α , IL-1, IL-6等炎症细胞因子产生增加, 从而启动和扩大炎症反应, 最终导致脂肪性肝炎的形成^[21-22], 但具体信号转导机制尚未明确.

研究表明, I κ B激酶 β 存在于大多数细胞胞质中, 在肝细胞中亦有表达, 参与介导肝组织的

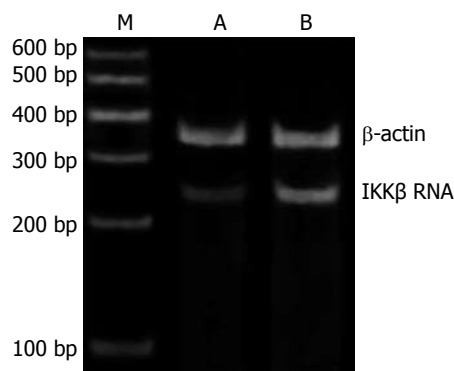


图 1 RT-PCR检测大鼠肝组织IKK β mRNA表达的变化. M: DNA分子量标准; A: 正常对照组; B: 高脂模型组.

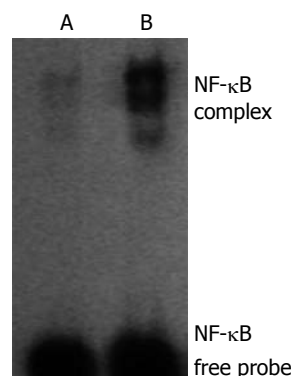


图 2 EMSA检测大鼠肝组织NF- κ B活性表达. A: 正常对照组; B: 高脂模型组.

炎症坏死, 同时IKK β 活化参与介导NASH中IR的形成^[23-25]. 氧化应激、LPS、TNF- α 等可通过G蛋白以及丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路激活IKK β , 使I κ B α 磷酸化降解, NF- κ B解离, 发生核易位^[26-28], 与DNA上的特异靶基因结合, 调控IL-1、TNF- α 等细胞因子、黏附分子和炎症相关的酶及蛋白质的表达, 启动和扩大炎症反应^[6,21,29]. TNF- α 的大量释放不仅直接诱导肝脏炎症损伤, 还可反馈加强IKK β 活化, 形

成IKK β -TNF- α 恶性循环, 这一自身放大的瀑布效应进一步促进胰岛素受体底物(IRS)信号转导障碍、脂质过氧化及活性氧增加、线粒体解耦联蛋白-2表达上调以及三磷酸腺苷储备减低等机制, 诱导IR发生^[30]。此外, IKK β 还可通过活化NF- κ B, 促进转位调节相关基因的表达而加重IR, 最终从不同环节促进脂肪性肝炎的发生发展^[31]。

本研究显示, 高脂饲料喂养可成功复制大鼠NASH模型, NASH大鼠肝组织IKK β mRNA表达、NF- κ B活性以及血清中TNF- α 、氨基转移酶水平均显著增高, 说明高脂饮食可以引发肝细胞脂质积聚, 通过氧化应激、活化IKK β 等途径导致IR, 为NASH的发生提供基础。同时活化的IKK β 还可通过I κ B/NF- κ B信号通路诱导TNF- α 等炎症介质的释放, 引发炎症瀑布效应, 这与王磊 *et al*^[32]在急性肝损伤中研究发现一致。这一实验结果证实了IKK β 作为NF- κ B上游始动信号, 通过活化NF- κ B介导NASH肝组织炎症损伤的病理生理过程, 为阐明NASH发病机制以及今后的有效治疗提供了理论基础。

4 参考文献

- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- Sugden MC, Bulmer K, Gibbons GF, Knight BL, Holness MJ. Peroxisome-proliferator-activated receptor- α (PPAR α) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *Biochem J* 2002; 364: 361-368
- Assy N, Bekirov I, Mejritsky Y, Solomon L, Szvalb S, Hussein O. Association between thrombotic risk factors and extent of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5834-5839
- Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I κ B kinase by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 1996; 84: 853-862
- Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science* 1999; 284: 321-325
- May MJ, Ghosh S. I κ B kinases: kinsmen with different crafts. *Science* 1999; 284: 271-273
- Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR. Distinct roles of the I κ B kinase α and β subunits in liberating nuclear factor κ B (NF- κ B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunit of NF- κ B. *J Biol Chem* 2002; 277: 3863-3869
- Huber MA, Denk A, Peter RU, Weber L, Kraut N, Wirth T. The IKK-2/I κ B kinase β /NF- κ B pathway plays a key role in the regulation of CCR3 and eotaxin-1 in fibroblasts. A critical link to dermatitis in I κ B kinase β -deficient mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 1268-1275
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94
- Lye E, Mirtsos C, Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 40653-40658
- 张宇, 蒋建新, 王正国, 朱佩芳, 吉善和, 单佑安, 周继红. ERK1/2信号通路在小鼠库普弗细胞-内毒素反应中的活化规律及其作用. *中华创伤杂志* 2002; 18: 364-366
- 刘兴, 冯文莉, 康格非. 脂多糖受体的研究进展. *国外医学(临床生物化学与检验学分册)* 2001; 22: 134-135, 137
- 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 392-396
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509
- 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. *中华肝脏病杂志* 1998; 6: 195-197
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Te Sligte K, Bourass I, Sels JP, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur J Intern Med* 2004; 15: 10-21
- 窦爱霞, 陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1197-1202
- Zhao CY, Jiang LL, Li L, Deng ZJ, Liang BL, Li JM. Peroxisome proliferator activated receptor- γ in pathogenesis of experimental fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1329-1332
- Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002; 60: 289-293
- 王永堂, 鲁秀敏, 李关荣, 伍亚民. 内毒素肝损伤过程中NF- κ B和AP-1活性变化及其对IL-6表达的调控. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 787-791
- Lentsch AB. Activation and function of hepatocyte NF- κ B in postischemic liver injury. *Hepatology* 2005; 42: 216-218
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B kinase. *Science* 2001; 293: 1673-1677
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl: S81-96
- Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation.

- Science* 1999; 284: 309-313
- 28 Fischer C, Page S, Weber M, Eisele T, Neumeier D, Brand K. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic IkappaB kinase signalsome activation and IkappaB proteolysis. *J Biol Chem* 1999; 274: 24625-24632
- 29 May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; 19: 80-88
- 30 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 575-594
- 31 Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 2002; 51: 1319-1336
- 32 王磊, 窦科峰, 于丽萍, 王江. IkappaB激酶在肝脏缺血再灌注中的作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1957-1959

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

功能性胃肠病诊治进展通知

本刊讯 经卫生部批准, 由甘肃省人民医院消化科主办的2007年国家级继续医学教育项目“功能性胃肠病诊治进展”(项目编号: 2007-0-0-02), 定于2007-09-01/05在甘肃兰州举行. 学习班期间将邀请国内及省内知名消化专家, 讲授功能性胃肠病诊治进展.

1 授课内容

功能性胃肠病罗马III分类及诊断标准的核心内容, 有消化道症状的抑郁及焦虑症状的判定评分标. 伴有抑郁及焦虑症状的功能性胃肠病患者的心理治疗, 便秘及腹泻型IBS、功能性腹胀、功能性便秘等, 功能性烧心、食管源性胸痛、功能性吞咽困难, 食管压力测定的临床意义; 糖尿病人食管压力测定结果与正常人群食管压力测定结果对比分析; 功能性消化不良、反刍综合征等; 胆囊及Oddi括约肌功能紊乱的诊断和治疗; 功能性大便失禁、功能性肛门直肠疼痛、功能性排便障碍; 功能性腹痛的诊断标准及治疗, 兰州地区50例健康成人食管PH测定结果分析; 食管PH监测的临床意义; 胃食管反流病人反流程度不同伴有不同的症状积分; 治疗功能性胃肠道疾病新方法疗效的临床试验设计; 学习班结业时授予国家级继续医学教育项目学分12学分. 学习班费用(含资料及证书费): 680元. 食宿统一安排. 费用自理.

2 联系方式

730000, 兰州市东岗西路160号, 甘肃省人民医院消化科. 联系人: 陈翔; 电话: 0931-8281140; 8281141

内毒素调节肝脏 β -葡萄糖苷酸酶mRNA的表达

孙韶龙, 吴硕东, 戴显伟, 隋东明, 崔东旭

孙韶龙, 吴硕东, 戴显伟, 崔东旭, 中国医科大学附属盛京医院普外科 辽宁省沈阳市 110004

隋东明, 盘锦市中医院外科 辽宁省盘锦市 124000

孙韶龙, 讲师, 主要从事肝胆疾病的研究。

通讯作者: 孙韶龙, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院普外科. doublegragons@yahoo.com.cn
电话: 024-83956436 传真: 024-86540367

收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-04-21

Endotoxin regulates the expression of hepatocyte β -glucuronidase mRNA

Shao-Long Sun, Shuo-Dong Wu, Xian-Wei Dai, Dong-Ming Sui, Dong-Xu Cui

Shao-Long Sun, Shuo-Dong Wu, Xian-Wei Dai, Dong-Xu Cui, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Dong-Ming Sui, Department of Surgery, Panjin Traditional Chinese Medical Hospital, Panjin 124000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Shao-Long Sun, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. doublegragons@yahoo.com.cn

Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To investigate the effect of endotoxin on the expression of hepatocyte GUSB mRNA and serum β -glucuronidase (β -GD) activity in mice.

METHODS: Twenty-three BALB/c mice were divided into two groups: control (injection of Saline without endotoxin) ($n = 5$) and LPS ($n = 18$). In the Lipopolysaccharide (LPS) group, after injection of endotoxin, mice were put to death at 1/2, 2, 4, and 24 hours by breaking cervical vertebra. Serum β -glucuronidase activity was detected by an enzyme kinetics method; and the expression of GUSB mRNA in hepatocytes was detected by semi-quantity reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: In the LPS 1/2, 2 and 4 h groups, the activity of β -GD levels (3.96 ± 0.88 , 4.40 ± 0.55 , 5.65 ± 0.58 Fishman Unit, respectively) was significantly higher than that of the controls

(2.14 ± 1.46 , $P < 0.05$). However, there was no significant difference between the LPS 24 h and the control group. By contrast, the expression of GUSB mRNA in the LPS group was significantly higher after being stimulated for 2 and 4 hours (1.10 ± 0.23 and 1.81 ± 0.04 , respectively) than that in the control group (0.57 ± 0.36 , $P < 0.05$). There were no significant differences between the LPS 1/2 h and LPS 24 h groups and the control group.

CONCLUSION: LPS not only increases the activity of serum β -glucuronidase in BALB/c mice, but also up-regulates the expression of GUSB mRNA in hepatocytes. This may be another mechanism by which endotoxin takes part in the pathogenesis of cholelithiasis.

Key Words: Endotoxin; Cholelithiasis; β -Glucuronidase; Pathogenesis mechanism; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Sun SL, Wu SD, Dai XW, Sui DM, Cui DX. Endotoxin regulates the expression of hepatocyte β -glucuronidase mRNA. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(17):1887-1892

摘要

目的: 研究内毒素对小鼠肝脏细胞 β -葡萄糖苷酸酶(GUSB)mRNA表达及其血清活性的影响。

方法: 选择23只BALB/c小鼠分为2组, 对照组5只, 腹腔注射不含内毒素的生理盐水; 其余小鼠为实验组, 腹腔注射LPS, 并于注射后的1/2、2、4、24 h采用酶促动力学方法检测内源性 β -葡萄糖苷酸酶(β -GD)活性; 取肝脏, 采用半定量RT-PCR方法检测GUSB mRNA的表达。

结果: 小鼠腹腔注射内毒素1/2、2和4 h后, 血清 β -GD活性(3.96 ± 0.88 , 4.40 ± 0.55 , 5.65 ± 0.58)显著高于对照组(2.14 ± 1.46 , $P < 0.05$), 而LPS 24 h组与对照组无显著性差异; 内毒素刺激BALB/c小鼠2 h和LPS 4 h, 其肝脏细胞GUSB mRNA表达(1.10 ± 0.23 , 1.81 ± 0.04)显著高于对照组(0.57 ± 0.36 , $P < 0.05$), LPS 1/2 h和LPS 24 h的GUSB mRNA表达与对照组相比无显著性差异。

■背景资料

内源性 β -葡萄糖苷酸酶可以分解胆红素双葡萄糖醛酸酯, 产物之一非结合胆红素与钙质及高分子物质结合, 生成非结合胆红素钙, 参与胆结石形成, 但人体内源性 β -葡萄糖苷酸酶在胆汁中活性很弱。内毒素可以激活人体白细胞, 释放多种细胞因子, 如肿瘤坏死因子、白细胞介素等, 他能否刺激细胞, 释放内源性 β -葡萄糖苷酸酶呢? 本文章即是为了验证上述假设。

■研究前沿

内毒素与细胞表面的CD14结合,再通过钟样受体4实现跨膜转导,使核因子- κ B从胞浆转移至核内,从而启动细胞内的基因转录更多的mRNA,增加蛋白的合成,此通路系本领域研究的热点问题。

结论: BALB/c小鼠经过腹腔注射LPS后,其血清中 β -GD的酶活性具有显著性增加。LPS还可以增加小鼠肝脏细胞GUSB mRNA的表达。LPS可能通过增加组织 β -GD活性的途径,参与了胆色素结石的发病。

关键词: 内毒素; 胆石症; β -葡萄糖苷酸酶; 发病机制; 逆转录聚合酶链反应

孙韶龙, 吴硕东, 戴显伟, 隋东明, 崔东旭. 内毒素调节肝脏 β -葡萄糖苷酸酶mRNA的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1887-1892

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1887.asp>

0 引言

胆石症是临床上比较常见的疾病,目前对其病因和发病机制尚不是很清楚,可能与胆道感染^[1]、胆汁淤积、黏蛋白聚集、成核作用(nucleation)^[2]、胆道动力异常、胆固醇、胆汁酸、胆红素代谢异常等因素有关。其中,胆汁中的钙离子与非结合胆红素形成沉淀是胆色素结石形成的主要原因^[3]。内源性或细菌源性 β -葡萄糖苷酸酶(β -Glucuronidase, 简称 β -GD, 其编码基因简写GUSB)都可以分解胆红素双葡萄糖醛酸酯^[4],产物之一非结合胆红素与钙质及高分子物质结合,生成非结合胆红素钙,他不仅是胆色素结石的主要成分,也是某些胆固醇结石的核心。由于正常肠道黏膜的屏障作用^[5]和Oddi括约肌的单向阀门作用^[6],肠道细菌不是很容易进入胆道,因而并非所有胆石症患者胆汁或结石中存在细菌,但是细菌的内毒素(LPS)却可以很容易进入肝胆系统^[7]。LPS可以激活人体白细胞^[8],释放多种细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL-8、IL-10)等。我们推测:通过各种途径进入肝胆系统的LPS,刺激肝脏细胞、胆囊及胆管上皮细胞、胆汁中白细胞,释放内源性 β -GD,参与胆石症的发病。我们为验证上述假设,以LPS刺激BALB/c小鼠,于不同时间点检测肝脏GUSB mRNA表达,以及血清中内源性 β -GD的活性,探讨内毒素与胆石成因之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择6-8周龄对内毒素比较敏感的BALB/c小鼠,雌雄不拘,体质量20-25 g左右,为中国医科大学动物中心提供。

1.1.2 药物及试剂 酚酞葡萄糖苷酸及内毒

素(来自*E.coli* O111: B4),购自Sigma公司;总RNA提取系统(II)Total RNA Extraction System(II)为华美生物工程公司产品;反转录PCR试剂盒BcaBESTTM RNA PCR Kit Ver.1.1及DNA Marker DL2000为宝生物工程(大连)有限公司产品。引物由上海博亚生物技术有限公司合成,其中: β -葡萄糖苷酸酶F: 5' TGTGGAGCAAGACATCGG3', R: 5' AACGGAGCAGGTTGAAAT3',肌动蛋白(β -actin)F:5' CACCCTGTGCTGCTACCGAGGCC 3'。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备与分组 5只小鼠ip不含内毒素的生理盐水作为对照组;其余小鼠为实验组,按5 mg/kg LPS腹腔注射,并于注射后的0.5, 2, 4, 24 h断颈椎处死小鼠,取血液抗凝离心,上清冻存待测;取肝脏置于DEPC水处理过的Eppendorf管中, -70℃保存备用。

1.2.2 酶促动力学方法检测血清内源性 β -GD活性 采用李宁 *et al*^[9]报道的方法,于pH4.5条件下测定内源性 β -GD活性。具体方法为:上清液100 μ L,加0.01 mol/L酚酞葡萄糖苷酸水溶液0.1 mL,加醋酸缓冲液100 μ L,调节pH值至4.5,置于38℃保温,反应24 h,然后流水冷却,加甘氨酸-十二烷基硫酸钠溶液(pH11.7)1.0 mL,加去离子水1.5 mL混匀,10 min后于波长540 nm比色,测定A值。以酚酞为标准品,0-100 mg/L浓度系列绘制酚酞标准曲线,1-5代表试管(表1)。

1.2.3 半定量RT-PCR检测肝脏GUSB mRNA的表达

1.2.3.1 引物设计 查询小鼠GUSB mRNA序列,利用Primer premier 5软件设计引物。引物由上海博亚生物技术有限公司合成:(1)GUSB. F: 5' AACGGAGCAGGTTGAAAT 3', R: 5' TGTGGAGCAAGACATCGG 3'; (2) β -actin. F: 5' CACCCTGTGCTGCTACCGAGGCC 3', R: 5' CCACACAGATGACTTGCCTCAGG 3'。

1.2.3.2 肝脏细胞中总RNA的提取^[10] 选取小鼠肝脏组织0.1 g,置于1.5 mL微量离心管(Eppendorf tube)中,剪碎研磨制成匀浆,向管内添加1 mL RNA裂解酶,用5 mL注射器在管内反复吹打均匀;添加200 μ L氯仿,混匀,于4℃ 13 000 r/min离心15 min,吸上层水相至一0.5 mL微量离心管中,加入50 μ L异丙醇,4℃放置30 min至1 h,于4℃ 13 000 r/min离心15 min,弃上清液,得RNA沉淀,加入750 mL/L乙醇300 μ L充分洗涤沉淀,于

4℃ 13 000 r/min离心15 min, 弃上清液, 室温下干燥RNA沉淀10 min, RNA产量及纯度用岛津UV2201型紫外分光光度计260/280 nm波长测定, 并用双蒸水溶解RNA过夜, -70℃保存。

1.2.3.3 反转录合成cDNA第一链 (1)按下列组成配制反转录反应液: 25 mmol/L MgSO_4 4 μL , 2×Bca 1st Buffer 10 μL , RNase Free dH_2O 1.5 μL , dNTP Mixture (各10 mmol/L)1 μL , RNase Inhibitor(4×10^7 U/L) 0.5 μL , BcaBEST Polymerase(2.2×10^7 U/L), Oligo dT Primer 1 μL . (2)按以下条件进行反转录反应: 65℃ 1 min, 30℃ 5 min, 65℃ 15-30 min(15-30 min内匀速升温), 98℃ 5 min, 5℃ 5 min. 反转录产物cDNA于-70℃冻存备用。

1.2.3.4 PCR反应 按下列组成配制PCR反应液: 25 mmol/L MgSO_4 6 μL , 5×Bca 2st Buffer 16 μL , 灭菌蒸馏水, 55.5 μL , Bca-Optimized Taq, 0.5 μL , 上游特异性PCR引物1 μL , 下游特异性PCR引物1 μL . 把反应液加入到反转录反应结束后的PCR反应管中, 轻轻混匀. 94℃ 30 s, 25-30℃ 循环, 37-65℃ 30 s, 72℃ 1-10 min, 72℃ 5 min. PCR反应产物以肌动蛋白(β -actin)作对照, 取反应液(5-10 μL)用20 g/L琼脂糖凝胶电泳(60 V, 1.5 h), 溴化乙锭染色显示, 凝胶成像仪观察, 使用10Kodak型号紫外、白透射仪成像分析系统分析成像, 以GUSB mRNA/ β -actin mRNA电泳带的荧光强度比值作为GUSB mRNA的表达量指标。

统计学处理 所有数据采用均数±标准差(mean±SD)表示, 应用SPSS11.5统计软件进行方差分析, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 BALB/c小鼠生存状况 共计对23只BALB/c小鼠ip内毒素(5 mg/kg), 作用时间最长24 h, 无死亡, 亦未发现小鼠发生腹腔感染。

2.2 ip内毒素对小鼠血清 β -葡萄糖苷酸酶活性的影响 各组BALB/c小鼠ip内毒素后, 血清 β -葡萄糖苷酸酶活性的情况, 经过统计分析, 注射LPS 0.5, 2和4 h后, 血清 β -葡萄糖苷酸酶活性显著高于对照组, 而24 h组与对照组无显著性差异(表2)。

2.3 LPS对小鼠肝细胞GUSB mRNA表达的影响 LPS 2 h组和LPS 4 h组显著高表达于对照组, LPS 0.5 h和LPS 24 h的GUSB mRNA表达, 与对

表 1 标准曲线制备(mL)

	空白管	1	2	3	4	5
醋酸缓冲液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酚酞标准液	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
甘氨酸SDS	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
蒸馏水	2.0	1.98	1.96	1.94	1.92	1.90

表 2 各组BALB/c小鼠血清 β -GD酶活性(Fishman Unit)

分组	β -GD活性	t值	P值
对照组	2.14 ± 1.46		
LPS 1/2 h	3.96 ± 0.88 ^a	2.548	0.031
LPS 2 h	4.40 ± 0.55 ^a	2.896	0.023
LPS 4 h	5.65 ± 0.58 ^a	4.474	0.03
LPS 24 h	3.85 ± 1.11	1.924	0.096

^a $P<0.05$ vs 对照组。

照组无显著性差异(表3)。LPS影响小鼠肝脏细胞GUSB mRNA表达的RT-PCR结果(图1)。

3 讨论

我们采用的检测组织 β -葡萄糖苷酸酶的方法原理为: 组织 β -葡萄糖苷酸酶在其最适pH4.5条件下, 可以水解酚酞葡萄糖苷酸, 生成酚酞和 β -葡萄糖苷酸钠盐, 随着反应进行, 反应混合物中酚酞量增加, 在碱性环境下显红色。其颜色的深浅与 β -GD的活性成正比^[11], 以100 mL血清每小时水解酚酞葡萄糖苷酸所释放酚酞的微克数表示 β -GD的活性单位(Fishman Unit)。人 β -葡萄糖苷酸酶(EC 3.2.1.31)是一种溶酶体酸性水解酶, 其系统名是 β -D-葡萄糖苷酸葡萄糖醛酸水解酶, (β -D-glucuronide glucuronosohydrolase), 能特异的催化葡萄糖酸 C_1 位上的 β -糖苷键水解, 释放出葡萄糖醛酸。 β -GD广泛分布于人体各组织^[12](如肝、肾、脾、肾上腺、甲状腺、胃肠黏膜、子宫和包皮腺), 细胞(如红细胞、白细胞、血小板、巨噬细胞、成纤维细胞)及体液(如血清、尿液、脑脊液、胆汁、阴道液、胃液和十二指肠液等)中, 其胞内定位主要在溶酶体、线粒体及微粒体内, 他是一类四聚体糖蛋白, 分子量275 000。 β -GD的活性于个体间差异较大, 在体内的真正生理功能迄今尚未完全阐明, 可能与胆红素代谢、类固醇激素的生物转化及各种葡萄糖苷酸的水解有关; 他还可能与其他溶酶体酶共同参与细胞器的溶解及细胞的

■创新盘点

首次发现内毒素可以增加小鼠血清中 β -葡萄糖苷酸酶活性, 向上调节该基因mRNA的表达, 为不伴有细菌感染的胆色素结石的发病原因提供间接的证据。

■应用要点

本研究对指导临床预防胆结石的发病提供实验依据,即通过使用肠黏膜保护剂等措施控制内毒素入血,对减少胆结石的产生有一定意义。

更新;从多型核白细胞(PMN)释放的 β -GD可以在炎症引起组织损伤及杀灭细菌方面具有重要作用。此酶的另一个作用是在溶酶体内通过去除硫酸软骨素和硫酸乙酰肝素末端 β -葡糖醛酰基残基降解糖胺聚糖。此酶缺乏^[13-14]可以造成非降解糖胺聚糖的贮积,导致黏多糖贮积症VII型(mucopolysaccharidosis type seven, MPS VII)。

棕色素结石含有约60%胆红素钙,黑色素结石含有约40%胆红素钙,而某些胆固醇结石亦含有胆红素钙的核心,这说明胆结石的病因与胆红素的代谢密切相关^[15]。Maki^[16]认为,细菌 β -GD水解胆汁中的结合胆红素,成为非结合胆红素(UCB)和葡萄糖醛酸,UCB再与钙结合,在硫酸糖蛋白的参与下,经聚合导致结石产生,此细菌酶解致石学说已得到公认,但是并非所有的胆结石患者的胆汁或结石中存在细菌,提示了一定有非细菌因素参与胆结石的成因。由于内源性 β -GD同样可以水解胆红素双葡萄糖醛酸酯,即水解结合胆红素,因而与胆色素结石的形成有关。Ostrow *et al*^[17]认为胆道及肝组织的内源性 β -GD水解结合胆红素导致色素沉淀进而形成结石;Ho *et al*^[18]通过研究发现,棕色素结石组胆汁中内源性 β -GD活性显著高于对照组,而且该酶活性与胆红素的分解率及分解程度有很强的正相关性,推测内源性 β -GD可能在胆色素结石的发病中起主要作用。杨波 *et al*^[19]通过免疫电镜胶体探针技术,对胆红素结石患者肝细胞溶酶体内源性 β -GD进行定量研究,发现内源性 β -GD与胆红素结石的形成密切相关。内源性 β -GD有多种形式,其作用的最适pH值为3.8, 4.5和5.2,与正常胆汁pH值相差大,且受胆汁中葡萄糖醛酸-1, 4-内酯及胆盐的抑制,故其在胆汁中活性甚弱^[20]。但是,如果发生胆道感染,肝、胆管上皮及胆汁中白细胞分泌的酶增多,且细胞膜的通透性增大,释放入细胞外的酶量就会增加。Osnes *et al*^[21]发现,胆总管胆汁中LPS的水平与结石的发病密切相关,推测其中的一个机制是:LPS通过细胞毒效应激活胆道黏膜细胞及位于胆汁中的白细胞,促进释放内源性 β -GD。如果胆汁中的 β -GD超出了抑制剂的作用,就会水解结合胆红素,导致结石的发生。

我们的研究发现,正常BALB/c小鼠血清内可以检测到一定活性的 β -GD,其肝脏细胞亦有一定的GUSB mRNA表达。ip LPS以后,无论是血清 β -GD活性,还是肝细胞GUSB mRNA表达,都有增加。对于 β -GD活性,这种增加开始

表 3 各组BALB/c小鼠肝细胞GUSB mRNA的表达(mean \pm SD)

分组	GUSB mRNA	t值	P值
对照组	0.57 \pm 0.36		
LPS 0.5 h	0.85 \pm 0.29	1.405	0.194
LPS 2 h	1.10 \pm 0.23 ^a	2.539	0.039
LPS 4 h	1.81 \pm 0.04 ^a	6.775	0.001
LPS 24 h	0.94 \pm 0.51	1.301	0.235

^aP<0.05 vs 对照组。

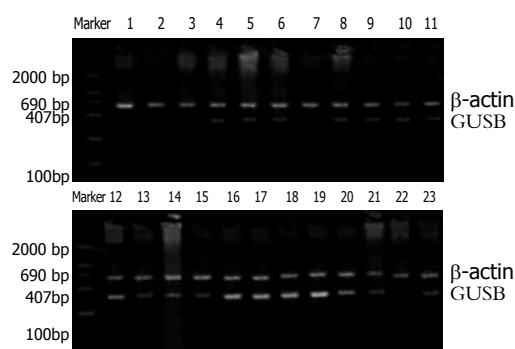


图 1 LPS对小鼠肝脏细胞GUSB mRNA表达的影响。1-5: 对照组; 6-11: LPS 0.5 h组; 12-15: LPS 2 h组; 16-19: LPS 4 h组; 20-23: LPS 24 h组。

于内毒素注射后0.5 h,在4 h增加到高峰,随后下降,在24 h已经和对照组的酶活性无显著性差异;对于肝细胞GUSB mRNA表达,这种增加也具有一定的时间依赖性,即在LPS刺激的24 h之内, β -GD活性随刺激时间的延长,呈现先升高,后下降的趋势,只不过这种增加直到LPS注射2 h后才和对照组有显著性差异,在24 h也下降到与对照组相差无几的水平。针对此处肝细胞GUSB mRNA表达的增加反而滞后于血清 β -GD活性增加的现象,我们认为有两种可能的原因:(1)实验误差造成的;(2)小鼠在ip LPS后,血清中 β -GD活性的增加机制,是独立于肝脏细胞GUSB mRNA表达,即血清 β -GD活性的增加很有可能是LPS作用于血细胞的结果。由于我们从体质量<30 g的BALB/c小鼠身上,总共取血不足0.5 mL,分离白细胞提取RNA比较困难,故LPS对BALB/c小鼠外周血单核细胞GUSB mRNA表达的影响情况,我们未知。

LPS增加血清中 β -GD活性的机制可能如下:LPS与肝脏细胞和外周血单核细胞表面的CD14结合后^[22-23],具有信号传导功能^[24-25],通过钟样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)实现跨膜转导^[26-27],使核因子- κ B(NF- κ B)从胞浆转移至核

内^[28], 从而启动细胞内控制 β -GD的基因(GUSB基因)转录更多的mRNA, 增加 β -GD蛋白的合成. 我们的研究发现, LPS刺激BALB/c小鼠后, 不但可以增加其血清 β -GD的活性, 还可以向上调节小鼠肝脏细胞表达GUSB mRNA, 这就从分子水平证明LPS可以增加组织源性 β -GD的合成和释放, 他也许可以解释那些不伴有细菌感染的胆色素结石的发病原因. 由于Oddi括约肌的单向阀门作用(non-return valve action)和肠道黏膜的屏障作用^[29-30], 多数细菌很难从肠道进入胆道, 但LPS却很容易. 进入肝胆系统的LPS有可能刺激肝脏细胞, 胆道上皮细胞, 胆汁中的白细胞, 增加GUSB mRNA表达进而增加了胆汁中的 β -GD活性, 在一定的环境下, β -GD分解结合胆红素, 成为非结合胆红素(UCB)和葡萄糖醛酸, UCB再与钙结合, 导致结石产生.

总之, BALB/c小鼠经过ip LPS后, 其血清中 β -GD的酶活性具有显著性增加. LPS还可以增加小鼠肝脏细胞GUSB mRNA的表达. LPS可能通过增加组织 β -GD活性的途径, 参与了胆色素结石的发病.

致谢: 感谢细胞培养实验室姜涛、张红老师提供的技术支持; 感谢中心实验室何魁休主任、潘莉莉老师提供的帮助.

4 参考文献

- Shaffer EA. Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 981-996
- Dhiman RK, Sarkar PK, Sharma A, Vasishta K, Kohli KK, Gupta S, Suri S, Chawla Y. Alterations in gallbladder emptying and bile retention in the absence of changes in bile lithogenicity in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1335-1341
- Sayers C, Wyatt J, Soloway RD, Taylor DR, Stringer MD. Gallbladder mucin production and calcium carbonate gallstones in children. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 219-223
- Osnes T, Sandstad O, Skar V, Osnes M. beta-Glucuronidase in common duct bile, methodological aspects, variation of pH optima and relation to gallstones. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 307-315
- Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Kishi S, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Protective effect of caspase inhibitor on intestinal integrity in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2007; 138: 300-307
- Ochi T, Nakazawa S, Naito Y, Tsukamoto Y. Endoscopic manometry of the sphincter of Oddi and pancreatic duct in patients with papillary stenosis. *Endoscopy* 1991; 23: 255-258
- Cullen JJ, Park H, Ephgrave KS, Conklin JL. Lipopolysaccharide temporarily impairs sphincter of Oddi motility. *Nitric Oxide* 2001; 5: 547-554
- Heagy W, Nieman K, Hansen C, Cohen M, Danielson D, West MA. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2003; 4: 171-180
- 李宁, 肖路加, 陈世玮, 肖邦良, 程微波. 胆红素钙结石兔模型 β -葡萄糖醛酸酶的变化. *华西医科大学学报* 1990; 21: 185-187
- Kasahara T, Miyazaki T, Nitta H, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. Evaluation of methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. *J Toxicol Sci* 2006; 31: 509-519
- Fishman WH, Kato K, Anstiss CL, Green S. Human serum beta-glucuronidase; its measurement and some of its properties. *Clin Chim Acta* 1967; 15: 435-447
- Lisiewicz J, Gierek T, Pilch J. Deficiency of beta-glucuronidase in neutrophils from patients with precancerous states of the larynx. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1978; 105: 194-199
- Donsante A, Levy B, Vogler C, Sands MS. Clinical response to persistent, low-level beta-glucuronidase expression in the murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 227-238
- Karolewski BA, Wolfe JH. Genetic correction of the fetal brain increases the lifespan of mice with the severe multisystemic disease mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* 2006; 14: 14-24
- Liu XT, Hu J. Relationship between bilirubin free radical and formation of pigment gallstone. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 413-417
- Maki T. Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: role of E. coli, beta-glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. *Ann Surg* 1966; 164: 90-100
- Ostrow JD, Murphy NH. Isolation and properties of conjugated bilirubin from bile. *Biochem J* 1970; 120: 311-327
- Ho KJ, Hsu SC, Chen JS, Ho LH. Human biliary beta-glucuronidase: correlation of its activity with deconjugation of bilirubin in the bile. *Eur J Clin Invest* 1986; 16: 361-367
- 杨波, 朱善德, 赵永光, 岳辉, 杜晓炬, 李荫山, 张弘, 于众, 于安民. 肝细胞内源性 β -葡萄糖醛酸酶与胆红素结石关系的免疫电泳研究. *中华肝胆外科杂志* 2000; 6: 123-125
- Cao HJ, Fang Y, Zhang X, Chen WJ, Zhou WP, Wang H, Wang LB, Wu JM. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear factor kappa B in human gastric carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 903-907
- Osnes T, Sandstad O, Skar V, Osnes M. Lipopolysaccharides and beta-glucuronidase activity in choledochal bile in relation to choledocholithiasis. *Digestion* 1997; 58: 437-443
- 黄宏, 蒋建新. LPS受体及其信号传导通路. *免疫学杂志* 2002; 18: 84-87
- Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Accelerated in vitro differentiation of blood monocytes into dendritic cells in human sepsis. *Clin Exp Immunol* 2007; 147:

■名词解释

1 内源性 β -葡萄糖苷酸酶: 又叫组织源性 β -葡萄糖苷酸酶, 是一种溶酶体酸性水解酶, 能特异的催化葡萄糖C₁位上的 β -糖苷键水解, 释放出葡萄糖醛酸, 他是一类四聚体糖蛋白, 分子量275 000, 在体内的真正生理功能迄今尚未完全阐明, 可能与胆红素代谢、类固醇激素的生物转化及各种葡萄糖苷酸的水解有关.

2 Fishman Unit: 是 β -葡萄糖苷酸酶的活性单位, 以100 mL血清每小时水解酚酞葡萄糖苷酸所释放酚酞的微克数表示.

■同行评价

本文研究了内毒素对小鼠肝脏GUSB mRNA表达及血清 β -葡萄糖苷酶活性的调节作用,立题新颖,论证有据,有一定的参考价值.

- 426-439
- 24 吴丽颖, 王兴鹏, Adler G. 核因子- κ B促使水肿型胰腺炎向坏死型胰腺炎转化. 中华急诊医学杂志 2004; 13: 82-85
- 25 Tyml K, Wang X, Lidington D, Ouellette Y. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1397-1406
- 26 Saitoh S, Miyake K. Mechanism regulating cell surface expression and activation of Toll-like receptor 4. *Chem Rec* 2006; 6: 311-319
- 27 Dai J, Liu B, Ngoi SM, Sun S, Vella AT, Li Z. TLR4 hyperresponsiveness via cell surface expression of heat shock protein gp96 potentiates suppressive function of regulatory T cells. *J Immunol* 2007; 178: 3219-3225
- 28 Sawaki J, Tsutsui H, Hayashi N, Yasuda K, Akira S, Tanizawa T, Nakanishi K. Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *Int Immunol* 2007; 19: 311-320
- 29 Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lu Y, Deng Q, Jiang XG, Sheng ZY. Relationship between plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 555-558
- 30 Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 2002; 17: 180-184

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8,18,28日,月价72.00,年价864元.欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅.联系地址:100023,北京市2345信箱,世界华人消化杂志.联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail: wcjd@wjgnet.com;网址: www.wjgnet.com.

L-精氨酸对胰腺炎相关性腹水诱导的肾细胞凋亡的疗效

程若川, 刘其雨, 苏艳军, 张建明, 刁畅, 罗华友

程若川, 刘其雨, 苏艳军, 张建明, 刁畅, 罗华友, 昆明医学院第一附属医院普通外科 云南省昆明市 650032
程若川, 教授, 主要从事普通外科疾病的临床及基础研究。
通讯作者: 刘其雨, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院普通外科. liuqiyu_12@hotmail.com
电话: 0871-5324888-2432
收稿日期: 2007-01-26 接受日期: 2007-03-17

Curative effects of L-arginine on apoptosis of renal cells induced by pancreatitis associated ascitic fluid

Ruo-Chuan Cheng, Qi-Yu Liu, Yan-Jun Su, Jian-Ming Zhang, Chang Diao, Hua-You Luo

Ruo-Chuan Cheng, Qi-Yu Liu, Yan-Jun Su, Jian-Ming Zhang, Chang Diao, Hua-You Luo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Correspondence to: Qi-yu Liu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. liuqiyu_12@hotmail.com
Received: 2007-01-26 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To explore the mechanism of acute renal injury in severe acute pancreatitis (SAP) and the effect of the conservative mechanism of L-arginine.

METHODS: Sixty SAP model rats were established by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the pancreatic duct and then the PAAF collected for reservation. Another 60 rats were established as perforative peritonitis (PP) models, and their perforative peritonitis associated ascitic fluid (PPAF) was collected. Another ninety SD rats were randomly divided into five groups: NS, PAAF, PPAF, PAAF + L-arg and PPAF + L-arg. Serum concentrations of amylase (Amyl), urea nitrogen (BUN), creatinine and nitric oxide were determined at 12 hours post-operation. The renal cell apoptosis rate and inducible nitric oxide synthase activity were examined. Histological observation was performed.

RESULTS: The amylase, blood urea nitrogen, and creatinine levels of serum in the PAAF +

L-arg and PPAF + L-arg groups were lower than those in the PAAF and PPAF groups (Amyl: 1925.8 ± 1024.2 vs 3328.3 ± 833.3 , 2128.0 ± 795.9 vs 3599.1 ± 1156.9 ; BUN: 9.1 ± 0.9 vs 12.4 ± 1.0 , 8.5 ± 0.8 vs 13.0 ± 1.1 ; Cr: 62.1 ± 7.5 vs 114.5 ± 8.6 , 60.0 ± 6.1 vs 115.8 ± 6.9 ; respectively, $P < 0.01$). The content of nitric oxide and the inducible nitric oxide synthase activity in the SAP group were higher than that in the PAAF group, while they were lower than those in the PAAF + L-arg group, while the NS group was the lowest. Similarly, the PP group was higher than the PPAF group, but lower than the PPAF + L-arg group, while the NS group was, again, the lowest.

CONCLUSION: Renal cell apoptosis and injury are induced by pancreatitis associated ascitic fluid and blocked by low doses of L-arginine. A stable renal injury model can be established by PAAF.

Key Words: L-arginine; Pancreatitis; Ascitic fluid; Renal injury; Apoptosis; Nitric oxide

Cheng RC, Liu QY, Su YJ, Zhang JM, Diao C, Luo HY. Curative effects of L-arginine on apoptosis of renal cells induced by pancreatitis associated ascitic fluid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1893-1898

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(SAP)时急性肾损伤的发病机制及L-精氨酸(L-arg)对其的保护机制。

方法: SD大鼠60只制成SAP模型并收集腹水(PAAF); 60只制成穿孔性腹膜炎(PP)模型并收集其腹水(PPAF); 另将90只随机分为5组: 空白组(NS组)、对照组(PAAF组)、模型组(PAAF组)及2个处理组(PAAF+L-arg组和PPAF+L-arg组)。观察各组术后12 h的血淀粉酶(Amyl)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、血清一氧化氮(NO)及病理学变化, 同时检测其肾细胞的凋亡及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达情况。

结果: PAAF+L-arg组和PPAF+L-arg组的Amyl、BUN、Cr均显著低于PAAF组和PPAF组(Amyl: 1925.8 ± 1024.2 vs 3328.3 ± 833.3 , 2128.0 ± 795.9 vs 3599.1 ± 1156.9 ; BUN: 9.1 ± 0.9 vs 12.4 ± 1.0 , 8.5 ± 0.8 vs 13.0 ± 1.1 ; Cr:

■背景资料

尽管近年来的重症监护水平得到很大提高, 但是重症急性胰腺炎的病死率仍比较高。早期的多器官功能衰竭(包括心衰、肺衰、肾衰、肝衰)和后期的脓毒血症(由坏死胰腺及胰周组织感染引起)均导致了SAP很高的病死率。因此, 阐述这些系统并发病的机制对提高SAP患者的临床预后尤为重要。

■研究前沿

本实验通过观察胰腺炎相关性腹水(PAAF)对正常肾细胞凋亡的影响、*L*-精氨酸(*L*-arg)对该损伤的影响,探讨重症急性胰腺炎时急性肾损伤的发病机制及*L*-精氨酸对其的保护机制,并进一步完善PAAF诱导胰外脏器官损伤的模型建立。

62.1±7.5 vs 114.5±8.6, 60.0±6.1 vs 115.8±6.9; $P<0.01$). 而NO及iNOS表达,使用*L*-arg组最强,依次高于模型组(SAP组及PP组),实验组(PAAF组及PPAF组),而NS组表达最弱. 肾细胞的凋亡率SAP组依次高于PAAF组PAAF+*L*-arg组及NS组; PP组依次高于PPAF组、PPAF+*L*-arg组及NS组($P<0.01$); 与肾脏的病理学改变一致。

结论: PAAF可以诱导健康大鼠的肾细胞凋亡引起肾损伤以建立稳定的PAAF诱导的健康大鼠肾损伤模型,但该作用可以被小剂量的*L*-arg阻断。

关键词: *L*-精氨酸; 胰腺炎; 腹水; 肾损伤; 细胞凋亡; 一氧化氮

程若川, 刘其雨, 苏艳军, 张建明, 刁畅, 罗华友. *L*-精氨酸对胰腺炎相关性腹水诱导的肾细胞凋亡的疗效. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1893-1898

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1893.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见急腹症,常并发多器官功能障碍综合征(MODS)^[1];其胰外器官损伤中肾功能障碍发生率仅次于肺功能障碍,大约在14%-43%^[2],且大多同时伴有其他器官系统的损害;发展至急性肾功能衰竭(ARF)后病死率高达80%,出现ARF后其他脏器衰竭发生率也明显上升;SAP引起ARF的机制尚未完全阐明. 一般认为有效循环血容量不足、肾血流动力学异常是SAP并发肾损伤的主要原因,尽管如此,最近越来越多的资料都表明SAP败血症时的肾衰是由于免疫或毒素的应急引起的急性肾小管凋亡导致的,而不是简单的血液动力学紊乱引起的^[3]. 本实验通过观察*L*-精氨酸(*L*-arg)对PAAF诱导的大鼠肾细胞凋亡的影响,探讨SAP时肾损伤的发病机制及*L*-arg对其的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠210只,雌雄不限,体重(250±25)g(购自昆明医学院动物实验研究中心). 牛磺胆酸钠(购自美国Sigma公司), NO的生成量(试剂盒购自南京建成生物工程研究所), 兔抗大鼠iNOS多克隆抗体、SABC试剂盒和DAB显色试剂盒(购自博士德生物有限公司), PI染色法(试剂盒购自美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 健康SD大鼠210只,雌雄不限,体

重(250±25) g. 60只制成SAP模型并收集PAAF备用,随机选取18只作为SAP组;60只制成PP模型7 h后收集其腹水(PPAF)备用,随即选取18只作为PP组;最后90只SD大鼠随机分5组. 空白组(NS组): ip生理盐水(NS)8 mL/只;穿孔性腹膜炎组(PPAF组): 参照2(2)建立消化道穿孔模型,7 h后无菌状态下开腹收集腹腔渗出液,4℃,2500 r/min离心15 min后取上清液,-80℃保存备用;实验时ip 8 mL/只. 模型组(PAAF组): 参照2(1)建立SAP模型,7 h后无菌状态下开腹收集腹腔渗出液(即PAAF),4℃,2500 r/min离心15 min后取上清液,-80℃保存备用;实验时ip 8 mL/只. 精氨酸组(*L*-arg组): 在模型组(PAAF组及PPAF组)基础上,注射腹水前10 min经股静脉给予*L*-arg(100 mg/kg). 即(PAAF+*L*-arg组及PPAF+*L*-arg组)。

1.2.2 动物模型的制作 (1)大鼠SAP模型的制作: 大鼠术前12 h禁食,自由饮水;30 g/L的戊巴比妥钠(30 mg/kg)ip麻醉后,正中切口入腹,以无损伤小动脉夹暂时阻断肝门侧胆总管,以套管针针头(尖端剪断并磨钝)由十二指肠前壁进针,经乳头插入胆总管内,以50 g/L牛磺胆酸钠1 mL/kg匀速注入,拔针后局部指压穿刺部位防止逆流. 5 min后开放胆总管阻断,胰腺在短时间内可见出血水肿,局部坏死,大鼠SAP诱导成功. (2)大鼠消化道穿孔模型的制作: 大鼠术前12 h禁食,自由饮水;30 g/L的戊巴比妥钠(30 mg/kg)ip麻醉后,作长约1.5 cm上腹正中切口开腹,横断十二指肠球部无血管区1/2周径,并将胃窦部下拉悬吊于中腹部腹壁. 以0号丝线结扎各出血点,无活动性出血后分层关腹. 术后自由饮水,于术后7 h留取腹水,PP模型建立成功。

1.2.3 指标的检测 (1)血清学指标: SAP组及PP组于模型成功建立后7 h、其余各组分别于实验设计12 h后,经腹主动脉采血5 mL,注入抗凝试管,离心(4℃,3000 r/min,10 min),取上清置于-20℃冰箱保存待测. NO含量(μmol/L),采用硝酸还原酶法测定血清NO₂⁻/NO₃⁻含量,间接反应NO的生成量;血清BUN、Cr和Amyl水平应用酶偶联测定法在全自动生化分析仪上测定. 采血完毕后,立即取胰腺左叶及左肾上腺组织分别用于以下指标的检测. (2)病理学指标检测: 按照标准步骤将胰腺及肾组织制成石蜡切片并行HE染色,光镜下观察组织病理学改变. (3)组织中iNOS表达的检测: iNOS抗体的工作浓度为1:200. 按说明书步骤操作;光镜下观察并照相,无着色为阴性,浅黄色为弱阳性,棕黄色为阳性,棕褐色为强阳

表 1 各组血清Amyl、BUN、Cr、NO含量变化(mean ± SD, n = 18)

分组	Amyl(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)	NO(μmol/L)
SAP组	6977.6 ± 2687.8 ^{ad}	15.1 ± 2.0 ^{ad}	137.6 ± 15.2 ^{ad}	63.05 ± 8.31 ^{ad}
PP组	6969 ± 1502.5 ^{af}	15.1 ± 1.8 ^{af}	138.2 ± 19.6 ^{af}	57.48 ± 6.93 ^{af}
NS组	734.3 ± 305.9	4.6 ± 0.7	33.8 ± 2.7	31.76 ± 3.63
PAAF组	3328.3 ± 833.3 ^a	12.4 ± 1.0 ^a	114.5 ± 8.6 ^a	71.84 ± 6.56 ^a
PPAF组	3599.1 ± 1156.9 ^a	13.0 ± 1.1 ^a	115.8 ± 6.9 ^a	67.98 ± 8.00 ^a
PAAF+L-arg组	1925.8 ± 1024.2 ^{ad}	9.1 ± 0.9 ^{ad}	62.1 ± 7.5 ^{ad}	121.70 ± 12.89 ^{ad}
PPAF+L-arg组	2128.0 ± 795.9 ^{af}	8.5 ± 0.8 ^{af}	60.0 ± 6.1 ^{af}	118.56 ± 12.64 ^{af}

^aP<0.05 vs NS组; ^dP<0.01 vs PAAF组; ^fP<0.01 vs PPAF组。

性。(4)细胞凋亡的检测: 采用PI染色法, 按照说明操作, 于流式细胞仪上检测肾细胞的凋亡率。

统计学处理 实验数据以mean ± SD表示, 采用t检验; P<0.05为差异显著。指标间联系的密切程度采用Pearson's相关分析。所有处理均采用SPSS12.0统计软件包。

2 结果

2.1 血清Amyl、BUN、Cr及NO水平 SAP组与PP组、PAAF组与PPAF组及PAAF+L-arg组与PPAF+L-arg组比较均无统计学差异。血清Amyl及血BUN、Cr, SAP组及PP组最高, 其余依次为PPAF组及PAAF组、PPAF+L-arg组及PAAF+L-arg组、NS组; 血清NO, 使用L-arg的两组最高, 依次高于PPAF组及PAAF组、SAP组及PP组, 而NS组反而最低(表1)。

2.2 胰腺的病理学变化 SAP组及PP组胰腺大片出血坏死, 呈暗红色, 表面及周围腹膜、系膜见皂化斑; 光镜下胰腺大部分坏死, 腺体结构消失, 大量炎性细胞浸润伴出血; PAAF组及PPAF组仅有部分腺体组织水肿, 组织间隙增宽, 少量炎性细胞浸润; PAAF+L-arg组与PPAF+L-arg组胰腺轻度水肿, 偶见炎性细胞浸润。

2.3 肾组织病理学变化及iNOS表达 SAP组及PP组病变最严重, 大鼠肾小球体积增大, 肾小管上皮细胞重度水肿, 管腔纹状缘消失, 少数肾小囊内可见红细胞渗出; 髓质内间质血管扩张、出血, 中等量炎性细胞浸润; 组织中iNOS均呈阳性染色。PAAF组及PPAF组病变次之, 主要表现为肾小管上皮细胞中度水肿, 髓质内间质血管扩张、淤血, 少量炎性细胞浸润; 组织中iNOS亦均为阳性染色。PAAF+L-arg组与PPAF+L-arg组病变较前4组明显变轻, 仅表现为肾小管上皮细胞轻度水肿, 未见炎细胞浸润; 但组织中iNOS为强阳性染色。iNOS染色主要集中在肾小管的上皮细

胞浆内, 而肾小球并不表达。正常肾组织iNOS呈弱阳性染色(图1)。

2.4 肾组织的细胞凋亡 正常肾组织存在较低水平的凋亡现象1.32%±0.12%; 而SAP组凋亡最严重, 高达23.8%±4.5%, PP组为22.7%±3.41%; 其次为PAAF组18.3%±2.11%、PPAF组17.3%±2.25%, 但PAAF+L-arg组与PPAF+L-arg组均明显减轻, 分别为8.3%±0.77%、8.1%±0.71%。SAP组、PAAF组、PAAF+L-arg组及NS组, PP组、PPAF组、PPAF+L-arg组及NS组组内两两比较均有统计学意义(P<0.05, 图2)。

3 讨论

SAP时可产生大量胰腺炎相关性腹水(PAAF), 含有多重毒性有害物质和炎性细胞因子介质, 他们被腹膜吸收后亦可能是引起多脏器损害的重要原因之一。但毫无疑问感染是影响SAP死亡率的关键性因素^[4], 下调炎症性过程可以明显降低SAP的死亡率。故临床上常通过腹腔灌洗、手术引流等方法来减少腹水中毒性物质吸收, 从而减轻SAP造成的全身性损害, 但这缺乏充足的实验依据。本实验通过将PAAF注射到正常大鼠腹腔内, 12 h后肾小管上皮细胞中度水肿, 髓质内间质血管扩张、淤血, 并少量炎细胞浸润, 与PPAF组肾损伤相当; 但均明显轻于SAP组。说明了PAAF可以屏蔽SAP时坏死胰腺对肾脏的影响, 单独诱导健康肾脏的损伤。从而为研究PAAF诱发的肾损伤以及L-arg对该损伤的疗效提供了较为单纯的研究背景。此外, 本实验SAP组与PP组、PAAF组和PPAF组中的淀粉酶、尿素氮及肌酐并无统计学差异, 且胰腺、肾脏的病变程度相当, 充分说明了PAAF腹腔内注射引起的腹膜炎为非特异性的炎症, 该模型更接近临床上的PAAF。

急性肾功能衰竭时肾小管上皮细胞出现凋亡早于肾功能的变化, 凋亡作为细胞丢失的途

■ 相关报道

新近研究表明, SAP时异常激活的胰酶在造成胰腺损伤的同时, 使粒细胞等炎症细胞过度激活, 大量释放多种炎性介质及细胞因子, 并通过扳机样作用, 形成瀑布样炎性损害, 不但使胰腺组织发生大量坏死, 而且还可导致SIRS和多器官衰竭; SAP时除了大量的胰酶释放入血, 还有大量有毒性细胞因子的腹水产生。

■ 创新盘点

以胰腺炎相关性腹水(PAAF)腹腔注射建立大鼠的肾损伤模型, 并且成功建立了该模型, 该模型可以“屏蔽”SAP时坏死胰腺对肾脏的影响, 从而可以在模拟临床的条件下为研究肾损伤的机制提供了比较单纯的研究背景。术前小剂量的L-arg可以通过抑制肾细胞的凋亡来减轻PAAF诱导的肾损伤。

应用要点

本实验为临床上通过腹腔灌洗、引流等治疗SAP时的腹水以减轻病变程度提供了一定的实验理论依据,模拟临床的条件下为研究肾损伤的机制提供了比较单纯的研究背景;更为SAP及其腹外脏器损伤的治疗提供了新的视点.

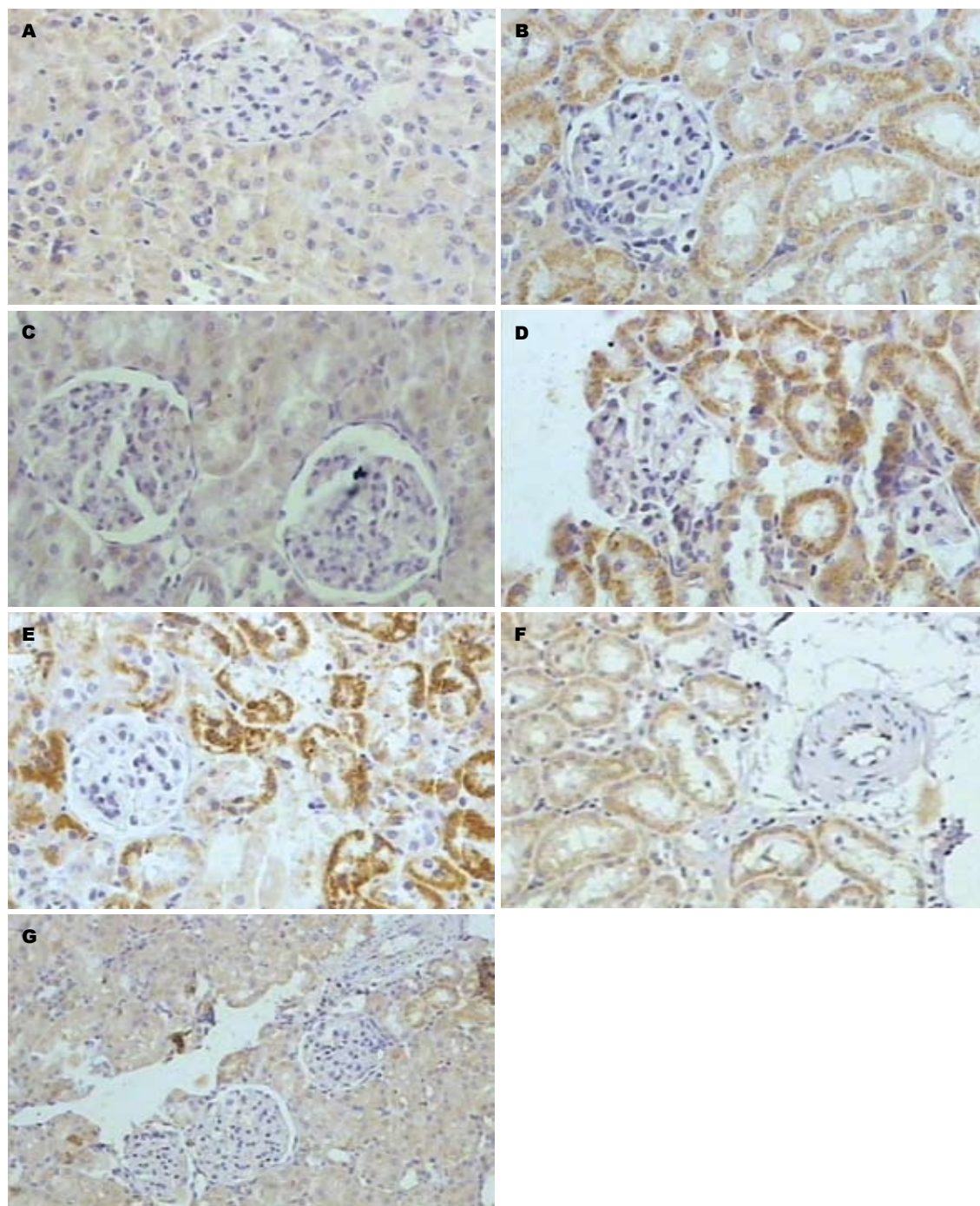


图1 各组肾组织中iNOS表达($\times 200$). A: NS组; B: PAAF组; C: PPAF组; D组: PAAF+L-arg组; E: PPAF+L-arg组; F组: SAP组; G组: PP组.

径之一, 同样可造成肾小管基底膜裸露、转运功能丧失及小管液回漏等功能障碍, 成为少尿或无尿的病理生理基础, 说明凋亡在肾功能损害中发挥重要的作用^[5]. Nishikawa *et al*^[6]利用鼠的PAAF对Madin-Darby狗的远端肾小管细胞进行培养发现, PAAF可以导致培养细胞凋亡且具有剂量和时间依赖性. 同时细胞DNA片段的酶联免疫吸附试验发现培养4 h后DNA片段开始增加到12 h达高峰, 提示有细胞的凋亡. 国内朱明德

et al^[7]发现SAP大鼠肾脏的细胞凋亡数明显增多, 凋亡指数增高, 肾小管凋亡现象较肾小球严重, 肾脏细胞凋亡指数与肾功能的损害程度呈正相关. 本实验发现, SAP大鼠肾脏的细胞凋亡数明显增多, 凋亡指数增高, 肾小管凋亡现象较肾小球严重, 肾脏细胞凋亡指数与肾功能的损害程度呈正相关, 与肾脏的病理改变一致; 本实验又直接将PAAF注射到正常大鼠腹腔后, 肾脏呈急性肾损伤的II级病理改变, 肾细胞的凋亡率明显增

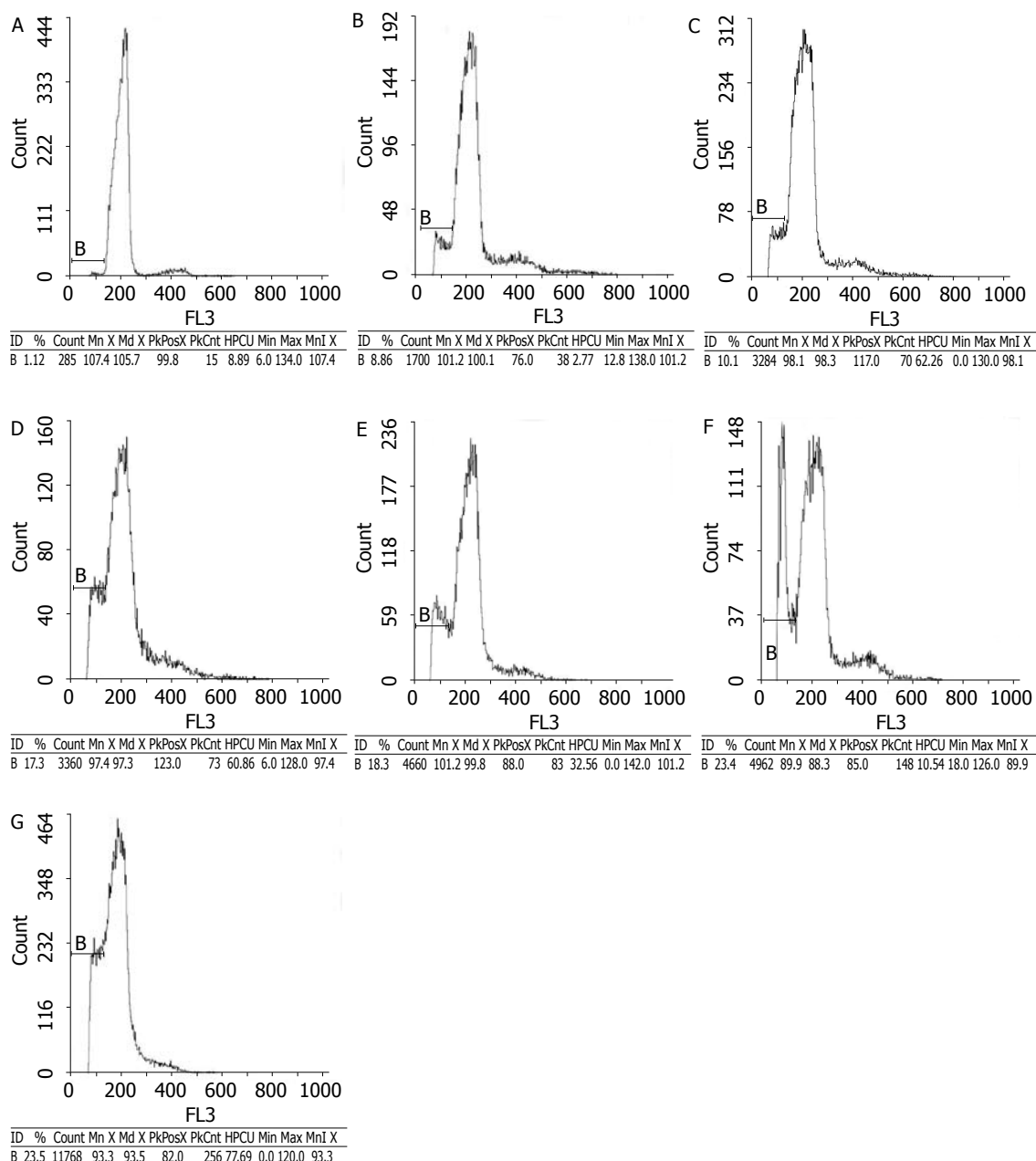


图 2 各组肾细胞的凋亡率. A: NS组; B: PAAF组; C: PPAF组; D: PAAF+*L*-arg组; E: PPAF+*L*-arg组; F: SAP组; G: PP组。

加, 均明显轻于SAP组。说明SAP肾脏损伤至少部分是通过细胞凋亡机制引起的, 而且细胞凋亡是造成肾功能进一步恶化的重要因素之一。

近年来大量实验研究表明, 以*L*-arg为底物在体内一氧化氮合成酶(NOS)催化生成的NO, 是一种很强生物活性物质, 具有广泛且重要的生物学功能, 其主要是传递信息、舒张血管和细胞毒作用, 参与了多种炎症性疾病的发生、发展过程。当某些疾病造成血管内皮细胞损伤时, 将导致NO生成减少, 因而补充外源性NO就成为一种必要的治疗措施^[8-12]。*L*-arg及其体内代谢产物一氧化氮(NO)能有效改善胰腺微循环, 抑制白细胞内皮细胞相互作用, 抑制血小板黏附和聚

集, 抗血栓形成, 而对急性胰腺炎(AP)具有一定的保护作用^[13]。但也有相反报道^[14-20], 焦点主要集中在*L*-arg给药的量及给药的时机。一般认为, 大剂量、高浓度的*L*-arg(20%, 2 g/kg)加重急性胰腺炎的损害, 而小剂量、低浓度的*L*-arg(1%, 100 mg/kg)起保护作用^[21]。本实验发现: SAP时大鼠存在显著血浆及胰组织NO增加, 胰腺血流量显著下降, 胰淀粉酶显著增加; 表明SAP大鼠早期存在NO合成相对不足, 随SAP大鼠病程发展, 胰酶、内毒素及炎症介质作用下, 内皮细胞合成NO过多, 反之过量NO生成通过直接抑制靶细胞的氧化呼吸链, 致胰腺细胞及胰血管内皮细胞损害; 与铜蛋白及其他氧自由基结合, 产生过量

同行评价

本文研究思路清楚,内容新颖,可读性强,有较强的临床指导意义。

ONOO⁻, 从而对胰组织有毒性作用。

本实验尚发现: SAP大鼠12 h时存在内毒素血症, 血BUN、Cr显著升高, 肾组织NO显著升高; 即时给予小剂量L-arg后明显降低血内毒素及肾组织NO, 肾功能明显改善, 显著延长死亡时间; 此外, 本实验通过免疫组化发现iNOS只在肾小管细胞中表达, 而肾小球无表达; 与肾小管的病变一致; 且SAP的表达最强, 应用小剂量的L-arg反而较弱。据此认为小剂量的L-arg通过增加组织中NO可以抑制肾细胞的凋亡以减轻肾损伤。其具体机制可能主要包括以下几个方面: (1) 抑制中性粒细胞活化及其表面CD11/CD18表达; (2) 拮抗细胞因子生成, 从而减少引发“白细胞-内皮细胞相互作用”的始动因素; (3) 灭活氧自由基, 已证实氧自由基可促进“白细胞-内皮细胞相互作用”, 外源性L-arg可灭活氧自由基, 减少氧自由基的生成而使此反应逆转; (4) 内皮细胞生成的NO在血管内皮表面形成保护层, 能降低血管阻力, 阻止中性粒细胞在血管内皮细胞表面的黏附。这为临床治疗SAP肾损伤又提供了新视角。

参考文献

- Kong L, Santiago N, Han TQ, Zhang SD. Clinical characteristics and prognostic factors of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3336-3338
- Uchikov A, Shopov A, Markova D. Renal complications in severe acute pancreatitis. *Khirurgiia (Sofia)* 2003; 59: 9-10
- Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1-10
- Sugimoto M, Takada T, Yasuda H, Nagashima I, Amano H, Yoshida M, Miura F, Uchida T, Isaka T, Toyota N, Wada K, Takagi K, Kato K. The lethal toxicity of pancreatic ascites fluid in severe acute necrotizing pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 442-446
- Ortiz A, Justo P, Sanz A, Melero R, Caramelo C, Guerrero MF, Strutz F, Muller G, Barat A, Egido J. Tubular cell apoptosis and cidofovir-induced acute renal failure. *Antivir Ther* 2005; 10: 185-190
- Nishikawa J, Takeyama Y, Ueda T, Hori Y, Ueno N, Yamamoto M, Saitoh Y. Induction of apoptotic cell death by pancreatitis-associated ascitic fluid in Madin-Darby canine kidney cells. *FEBS Lett* 1995; 373: 19-22
- 朱明德, 方驰华, 史学深. 重症胰腺炎肾脏损伤中细胞凋亡相关基因的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2103-2107
- Burra P, Chirizzi L, Cardin R, Cadrobbi R, Baldan N, Calabrese F, Pettenazzo E, Calo L, Plebani M, Rigotti P. Warm hepatic ischemia in pigs: effects of L-arginine and oligotide treatment. *J Invest Surg*

2001; 14: 303-312

- Chang WL, Chung CH, Wu YC, Su MJ. The vascular and cardioprotective effects of lirinodine in ischemia-reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric Oxide* 2004; 11: 307-315
- Sukhotnik I, Helou H, Mogilner J, Lurie M, Bernsteyn A, Coran AG, Shiloni E. Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 191-196
- Yeh CH, Lin YM, Wu YC, Wang YC, Lin PJ. Nitric oxide attenuates cardiomyocytic apoptosis via diminished mitochondrial complex I up-regulation from cardiac ischemia-reperfusion injury under cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 180-188
- Tsuchihashi S, Kaldas F, Chida N, Sudo Y, Tamura K, Zhai Y, Qiao B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2013-2022
- Sanchez-Bernal C, Garcia-Morales OH, Dominguez C, Martin-Gallan P, Calvo JJ, Ferreira L, Perez-Gonzalez N. Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e9-15
- Sugiyama Y, Kato S, Mitsufuji S, Okanoue T, Takeuchi K. Pathogenic role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS/NOS-III) in cerulein-induced rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1396-1403
- Shields CJ, Delaney CP, Winter DC, Young L, Gorey TF, Fitzpatrick JM. Induction of nitric oxide synthase is a key determinant of progression to pulmonary injury in experimental pancreatitis. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7: 501-511
- Sandstrom P, Brooke-Smith ME, Thomas AC, Grivell MB, Saccone GT, Toouli J, Svanvik J. Highly selective inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: e10-15
- Andican G, Gelisgen R, Unal E, Tortum OB, Dervisoglu S, Karahasanoglu T, Burcak G. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2340-2345
- Sugiyama Y, Kato S, Abe M, Mitsufuji S, Takeuchi K. Different effects of dexamethasone and the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on caerulein-induced rat acute pancreatitis, depending on the severity. *Inflammopharmacology* 2005; 13: 291-301
- Leindler L, Morschl E, Laszlo F, Mandi Y, Takacs T, Jarmai K, Farkas G. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004; 29: 157-161
- Saito M, Miyagawa I. N(G)-nitro-L-arginine methylester, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes apoptosis induced by ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Neurourol Urodyn* 2002; 21: 566-571
- Krivoruchko IA, Fedorovich AA. Role of nitric oxide and lipid peroxidation in pathogenesis of acute experimental pancreatitis. *Klin Khir* 2005; 58-62

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

结肠癌耐药细胞株LoVo/5-FU的建立及其差异表达基因的筛选

盛雅萍, 李建芳, 刘炳亚, 罗建明, 郑磊贞, 陈强, 郭伟剑

盛雅萍, 郑磊贞, 陈强, 郭伟剑, 上海交通大学医学院附属新华医院肿瘤科 上海市 200092

李建芳, 刘炳亚, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所 上海市 200025

罗建明, 上海复旦大学附属肿瘤医院中心实验室 上海市 200032

盛雅萍, 2002年南京医科大学本科毕业, 2004年至今就读于上海交通大学医学院, 肿瘤学硕士研究生。

通讯作者: 郭伟剑, 200092, 上海交通大学医学院附属新华医院肿瘤科, guoweijian1@sohu.com

电话: 021-65010796

收稿日期: 2007-02-06 接受日期: 2007-03-01

Establishment and selection of genes expressing differently in a human colon carcinoma LoVo/5-FU cell line

Ya-Ping Sheng, Jian-Fang Li, Bing-Ya Liu, Jian-Ming Luo, Lei-Zhen Zheng, Qiang Chen, Wei-Jian Guo

Ya-Ping Sheng, Lei-Zhen Zheng, Qiang Chen, Wei-Jian Guo, Department of Oncology, Xinhua Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200092, China

Jian-Fang Li, Bing-Ya Liu, Research Institute of Surgical Gastroenterology, Ruijing Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China

Jian-Ming Luo, Department of Center Laboratory, Tumor Hospital of Fudan University, Shanghai, 200032, China

Correspondence to: Wei-Jian Guo, Department of Oncology, Xinhua Hospital of Medical College of Jiaotong University, Shanghai 200092, China. guoweijian1@sohu.com

Received: 2007-02-06 Accepted: 2007-03-01

Abstract

AIM: To establish a Lovo/5-FU of human drug-resistance colon carcinoma cell line, and to screen possible drug resistance-associated genes.

METHODS: LoVo/5-FU of a human drug-resistance colon carcinoma cell line was induced by continuously exposing human colon carcinoma cells to gradually increasing concentrations of 5-FU. The growth law was observed and the growth curve protracted. The drug resistance of LoVo/5-FU was measured by MTT assay and the drug resistant index (RI) was calculated. Genes expressing differently between LoVo/5-

FU and its parent cell line Lovo were screened using a gene chip, and several selected associated drug resistance genes were confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with parental cells, the resistance cell line had a slower growth rate and larger morphology. The LoVo/5-FU cell line showed drug resistance to 5-FU, adriamycin (ADM), mitomycin (MMC), but not to cisplatin (CDDP) (RI: 7.69, 2.78, 1.43, and 0.96). There were 425 differently expressed genes associated with drug resistance by the gene chip screening method. The possible drug resistance-related genes included CYP1B1, NAT2, RNF20, SNAI2, and MAP3K2. The expression of CYP1B1 had a significant difference between the LoVo/5-FU cell line and the parent cell line (Cy5/Cy3 = 5.877). RT-PCR results were consistent with the gene chip results.

CONCLUSION: The altered biological properties of LoVo/5-FU may be related to its drug resistance phenotype. Several genes, such as CYP1B1, are possibly involved in the mechanism of drug resistance.

Key Words: Human colon carcinoma; Drug resistance-related genes; 5-fluorouracil; LoVo/5-FU cell lines; MTT assay; Gene chip; Reverse transcription polymerase chain reaction

Sheng YP, Li JF, Liu BY, Luo JM, Zheng LZ, Chen Q, Guo WJ. Establishment and selection of genes expressing differently in a human colon carcinoma LoVo/5-FU cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1899-1904

摘要

目的: 建立结肠癌细胞耐药模型LoVo/5-FU并初步筛选可能的耐药相关基因。

方法: 采用5-FU浓度递增法建立人结肠癌细胞耐药模型LoVo/5-FU, 观察其生长规律并绘

■背景资料

大肠癌是消化系统常见的肿瘤, 其治疗主要是手术, 化疗则可减少复发和提高生存率, 但以5-氟尿嘧啶(5-FU)为主的化疗疗效仍不能令人满意, 其主要原因是化疗过程中出现肿瘤细胞耐药。肿瘤细胞与抗癌药物接触后, 不仅能对所用药物产生耐药性, 对结构和功能不同的其他药物也能产生耐药性, 而肿瘤细胞对化疗药物的耐药性是化疗失败的主要原因。因此, 肿瘤耐药基因的研究可能在将来为选择决定化疗方案提供参考依据。

■ 研发前沿

基因芯片技术在肿瘤耐药研究中的应用对肿瘤耐药机制研究、新的耐药基因发现及耐药个体化诊断具极大促进作用。基因芯片的筛查不仅有助于确定与肠癌耐药细胞耐药相关的特殊基因, 阐明与诊断及预后相关的分子标志, 而且对肿瘤药物的开发也将产生深远影响。

制细胞生长曲线; 用MTT法鉴定耐药细胞株耐药性并计算耐药指数(RI); 用基因芯片技术检测耐药细胞株LoVo/5-FU与其亲本细胞株LoVo中的差异表达基因, 从中筛选出可能的耐药相关基因; 用半定量RT-PCR方法对筛选出的部分耐药相关基因在耐药细胞及其亲本细胞中的表达情况进行验证。

结果: LoVo/5-FU细胞与LoVo细胞相比, 生长缓慢, 细胞体积增大。LoVo/5-FU对5-FU、ADM、MMC耐药, 而对CDDP无耐药性(RI: 7.69, 2.78, 1.43和0.96)。通过基因芯片筛选出差异表达基因425个, 可能的耐药相关基因包括CYP1B1, NAT2, RNF20, SNAI2, MAP3K2, 其中CYP1B1在LoVo/5-FU与LoVo中的表达有明显差异($Cy5/Cy3 = 5.877$)。

结论: LoVo/5-FU细胞株耐药性稳定, 耐药机制可能与CYP1B1, NAT2等耐药相关基因有关。

关键词: 结肠癌; 耐药相关基因; 5-氟尿嘧啶; LoVo/5-FU细胞株; MTT法; 基因芯片; 逆转录-聚合酶链反应

盛雅萍, 李建芳, 刘炳亚, 罗建明, 郑磊贞, 陈强, 郭伟剑. 结肠癌耐药细胞株LoVo/5-FU的建立及其差异表达基因的筛选. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1899-1904

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1899.asp>

0 引言

大肠癌是消化系统常见的肿瘤, 其治疗主要是手术, 化疗则可减少复发和提高生存率。但以5-氟尿嘧啶(5-FU)为主的化疗疗效仍不能令人满意, 其主要原因是化疗过程中出现肿瘤细胞耐药。因此, 肿瘤耐药基因的研究可能在将来为选择决定化疗方案提供参考依据。而基因芯片技术在肿瘤耐药研究中的应用对肿瘤耐药机制研究, 新的耐药基因发现及耐药个体化诊断具极大促进作用。我们用5-FU对LoVo细胞进行长期诱导获得耐药模型LoVo/5-FU细胞株, 并对其生物学特性进行研究。同时, 通过基因芯片检测筛选可能的耐药相关基因, 并对筛选出的基因进行RT-PCR验证。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI1640(杭州吉诺生物医药技术有限公司); 小牛血清(杭州四季青生物公司); TRIzol溶液(Invitrogen公司); AMV逆转录酶, Rnase抑制剂, 逆转录试剂盒(A3500), Taq聚合酶, dNTP和

PCR标志(Promega公司); 基因芯片(上海博星基因芯片有限公司); 引物由上海英骏生物公司合成; 噻唑蓝(MTT, Sigma公司); 氟尿嘧啶(5-FU), 丝裂霉素(MMC), 阿霉素(ADM), 顺铂(CDDP)均为国产药物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及耐药细胞系的建立 结肠癌LoVo细胞在37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养, 培养液为含100 mL/L热灭活小牛血清, 青霉素100 kU/L和链霉素100 mg/L的RPMI1640培养液。采用药物(5-FU)持续接触浓度递增诱导法建立人结肠癌耐药细胞系LoVo/5-FU, 可在含5-FU浓度为5.0-6.0 mg/L的培养液中稳定生长。

1.2.2 生物学特性观察 细胞一般形态学观察: 在Olympus光学显微镜下观察其形态。生长曲线测定: 取对数生长期的LoVo和LoVo/5-FU细胞, 用2.5 g/L胰酶消化, RPMI1640培养液制成单细胞悬液, 接种到24孔板中(每孔 5×10^3 个, 各3复孔 $\times 7$ d), 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度下培养, 每日消化3孔进行计数, 连续7 d, 绘制生长曲线。

1.2.3 药敏实验 用MTT法检测LoVo和LoVo/5-FU细胞对5-FU, ADM, MMC, CDDP的敏感性。LoVo/5-FU细胞在不含5-FU的RPMI1640培养液中培养2 wk后备用。取对数生长期的LoVo和LoVo/5-FU细胞, 用2.5 g/L胰酶消化, RPMI1640培养液制成单细胞悬液, 接种到96孔板(100 μ L/孔, 5×10^3 /孔), 培养24 h, 加入不同浓度的上述药物(设4复孔和阴性对照), 再培养72 h, 每孔加入MTT液20 μ L培养4 h, 离心, 弃上清, 加入二甲亚砜100 μ L/孔, 震荡摇匀, 紫色颗粒溶解后上Quant酶标仪测定吸光度, 波长570 nm, 以药物浓度为横轴, 细胞存活率为纵轴, 绘制浓度-效应曲线, 确定半数抑制浓度(IC₅₀), 计算耐药指数(RI) = 耐药细胞IC₅₀/亲本细胞IC₅₀。

1.2.4 基因芯片检测 取生长良好的LoVo和LoVo/5-FU细胞提取RNA后进行基因芯片检测, 检测由上海博星基因芯片公司代为进行(芯片型号: Biostar H-40S)。该芯片共有人类cDNA克隆4000多个, 包括OTS(原癌基因和抑癌基因), ARP-SRP(细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因), CCCP(细胞周期蛋白相关基因), FMS(细胞骨架和运动蛋白相关基因), SRRP(DNA合成, 修复和重组蛋白相关基因), CR(细胞受体相关基因), ECSCP(细胞信号和传递蛋白相关基因), GC(发育相关基因)等。判断基因差异表达的筛选标

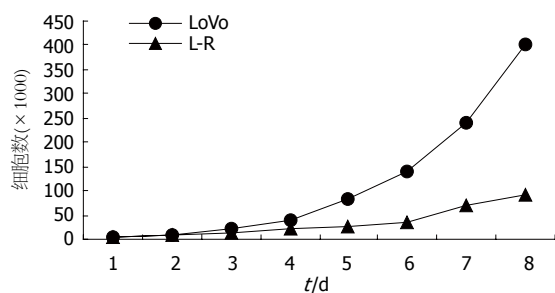


图1 细胞生长曲线。

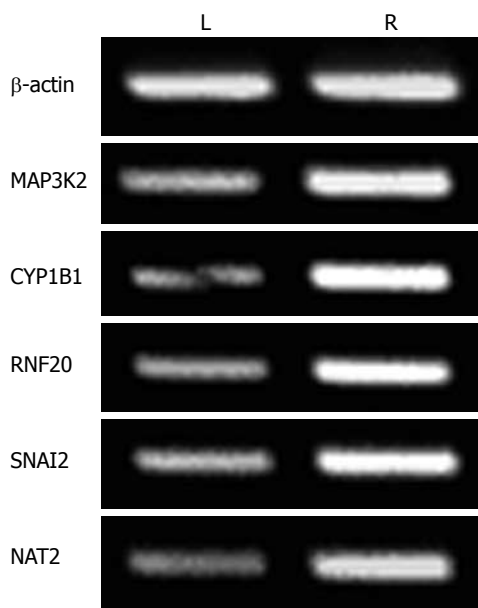


图2 LoVo和LoVo/5-FU细胞中CYP1B1, NAT2, RNF20, SNAI2, MAP3K2基因在转录水平的表达。

准: 耐药细胞组与亲本细胞组的检测结果比值 >2.0 (上调2倍) 或 <0.5 (下调2倍). 如比值 >5.0 或 <0.2 认为基因表达差异有极显著性。

1.2.5 半定量RT-PCR 采用TRIzol一步法提取LoVo和LoVo/5-FU细胞的RNA, 具体步骤见Invitrogen公司的操作法; 以1 μ g总RNA进行逆转录合成cDNA, 操作步骤见AMV逆转录体系(A3500)的方法, 分别进行不同循环数的PCR循环, 以确定最佳扩增循环数(26-28个), 并进行温度梯度PCR, 以确定各对引物的最佳退火温度. PCR引物的设计采用Primer3软件, 经BLAST验证后由上海英骏生物公司合成, 序列如下: β -actin正义链5'ccactggcatcgtgatggac3', β -actin反义链5'gcggatgtccacgtcacact3'(产物427 bp); CYP1B1正义链5'caggcagaattggatcaggt3', CYP1B1反义链5'tcatcactctgctgtcagg3'(产物315 bp); NAT2正义链5'accattgacggcaggaatta3', NAT2反义链5'gatgaagcccaccaaacagt3'(产物377 bp);

表1 LoVo/5-FU细胞的耐药谱

耐药倍数(RI) = 耐药细胞IC ₅₀ /亲本细胞IC ₅₀	
5-FU	7.69
ADM	2.78
MMC	1.43
CDDP	0.96

RNF20正义链5'gaactcttctcgcacagg3', RNF20反义链5'ccgaagtttcttcagctcac3'(产物388 bp); SNAI2正义链5'ctttttcttgcctcactgc3', SNAI2反义链5'ttgaaatgattggcagcaa3'(产物530 bp); MAP3K2正义链5'gaccagcttacggctcctg3', MAP3K2反义链5'tccttgctggtctcaggact3'(产物320 bp). 以 β -actin mRNA水平作为内参照, 每个PCR产物取10 μ L在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 用Alpha Innotech的凝胶成像系统(FluorChem IS-9900), Alpha Ease FC软件对电泳条带进行分析。

2 结果

2.1 LoVo/5-FU细胞系的建立 采用药物浓度递增法, 历经12 mo, 建立人结肠癌耐药细胞系LoVo/5-FU. 5-FU起始浓度为0.1 μ g/L, 最终细胞能在含5-FU浓度为5.0-6.0 mg/L的培养液中稳定生长。

2.2 LoVo和LoVo/5-FU细胞的生物学特性 LoVo细胞呈短梭形; LoVo/5-FU细胞呈长梭形, 且体积大于LoVo细胞. LoVo/5-FU细胞的增殖速度较LoVo细胞显著减缓(图1)。

2.3 耐药谱分析 耐药株不仅对5-FU耐药, 而且对ADM, MMC有交叉耐药, 但对CDDP无耐药性(表1)。

2.4 基因芯片检测结果 有差异表达的基因共425个, 其中表达上调的共203个, 表达下调的共222个, 从中选取5个基因用于RT-PCR验证(表2)。

2.5 对芯片筛查差异表达显著的代表性基因的验证结果 运用半定量RT-PCR方法分别检测LoVo和LoVo/5-FU细胞中CYP1B1, NAT2, RNF20, SNAI2, MAP3K2基因在转录水平的差异表达. 结果显示, 耐药细胞中CYP1B1 mRNA表达明显上调; NAT2, RNF20, SNAI2, MAP3K2 mRNA表达亦上调, 但不如前者明显(图2). CYP1B1, NAT2, RNF20, SNAI2, MAP3K2基因的RT-PCR验证结果基因表达差异情况与芯片筛查结果一致。

■应用要点

本研究用5-FU对LoVo细胞进行长期诱导获得耐药模型LoVo/5-FU细胞株, 并对其生物学特性进行研究; 同时, 通过基因芯片检测筛选可能的耐药相关基因, 并对筛选出的基因进行RT-PCR验证, 不仅有助于确定与肠癌耐药细胞耐药相关的特殊基因, 而且对逆转肿瘤耐药相关药物的寻找和开发也有一定的意义。

■同行评价

本文选择自己建立的结肠癌细胞耐药模型LoVo/5-FU为研究对象,采用基因芯片技术筛选差异基因的表达,做了较为详细的工作,也取得了阶段性结果,为后期机制的探讨奠定基础,具有较高的学术价值。

表 2 经验证的基因芯片筛选出的相关基因

基因序号	基因名称	Cy5/Cy3*
3855c02	Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1. (CYP1B1)	5.877
3854a04	Homo sapiens N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase, NAT2)	5.755
1256h07	Homo sapiens ring finger protein 20 (RNF20)	2.762
3599e01	Homo sapiens snail homolog 2 (Drosophila) (SNAI2)	2.272
1553a08	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 (MAP3K2)	2.126

Cy5(实验组), Cy3(对照组), Cy3信号值乘上均一化系数得出调整后的Cy3*, 计算每个基因点在本次实验中的表达差异值Ratio, Ratio = Cy5/Cy3*.

3 讨论

本实验建立了LoVo/5-FU耐药细胞株,对5-FU的相对耐受度较亲代细胞提高了7.69倍,与亲代细胞相比耐药细胞生长速度减慢,细胞体积增大。他是一种继发性耐药细胞株,具有多药耐药特性,对ADM, MMC等化疗药物存在交叉耐药现象。

肿瘤细胞与抗癌药物接触后,不仅能对所用药物产生耐药性,对结构和功能不同的其他药物也能产生耐药性,而肿瘤细胞对化疗药物的耐药性是化疗失败的主要原因。以往对5-FU耐药机制的研究主要涉及:5-FU靶酶胸苷酸合成酶(TS)活性改变^[1-2],5-FU代谢限速酶二氢嘧啶脱氢酶(DPD)活性改变^[3-4],胸腺嘧啶核苷激酶(TK)活性改变^[5],叶酸代谢相关酶活性改变^[5],DNA修复机制异常,信号传导异常等。在分子水平理解肿瘤耐药机制对制定化疗和耐药逆转方案,提高治疗效果是非常重要的,而基因芯片技术为分析基因组表达水平差异或变化提供了强有力的工具^[6]。本研究应用基因芯片技术对人结肠癌5-FU耐药细胞LoVo/5-FU及其亲本细胞LoVo进行筛查,结果表明,与亲本细胞LoVo相比,耐药细胞LoVo/5-FU的CYP1B1, NAT2, RNF20, SNAI2, MAP3K2均上调>2.0倍。对上述5种基因的RT-PCR验证结果与基因芯片的筛查结果一致,其中CYP1B1基因的表达差异尤其明显。基因芯片的筛查不仅有助于确定与肠癌耐药细胞耐药相关的特殊基因,阐明与诊断及预后相关的分子标志,而且对肿瘤药物的开发也将产生深远影响。

CYP1B1即cytochrome P450, subfamily1, polypeptide1, 属于混合功能单氧化酶这个多基因超家族的一员,后者是药物代谢过程中最重要的酶。关于CYP1B1与化疗药物耐药性的研究很多,一些研究证实CYP家族可活化或失活化

疗药物,由此影响肿瘤对抗癌药物治疗的敏感性^[7-9]。McFadyen *et al*^[7]在对CYP1B1作为新的抗肿瘤药物耐受机制的研究中发现CYP1B1可降低细胞对某些抗肿瘤药物的敏感性。一些P450酶,尤其是CYP1B1,在肿瘤细胞中过表达可能代表新型的抗肿瘤靶点,通过在肿瘤部位(即抗肿瘤药物作用部位)提供P450介导的代谢^[10]。Rochat *et al*^[11]通过研究认为CYP诱导活化可能与产生耐药有关,通过加速抗癌药物的降解,尤其是靶细胞中。最近一项关于芳香化合物代谢的研究发现CYP1B1*1/*2基因型赋予细胞对苯并芘的DNA损伤效应的耐受性^[12]。至今CYP1B1与5-FU耐药的关系尚未见报道,而本研究结果显示他与肠癌细胞的5-FU耐药高度相关。

NAT即N-acetyltransferase(N-乙酰转移酶),包括3个基因: NAT1, NAT2, NATP(为假基因)。芳香胺N-乙酰转移酶是II期异生化合物代谢酶,促进乙酰辅酶A依赖的N-和O-乙酰化反应,其中NAT2根据乙酰化活性分为快乙酰化(RA),中速乙酰化(IA)和慢乙酰化(SA)。最近一项关于药物代谢基因突变相关化学敏感性的研究发现,那些具有慢乙酰化(即SA)的个体更容易有高度化学敏感性^[13]。NAT2是许多化合物(包括潜在的致癌物质)代谢中的一个重要的酶,他与耐药性的相关研究很少。Husain *et al*^[14]提出人类NAT2基因多态性与药物毒性和/或不同组织的肿瘤发生有关。Bradshaw *et al*^[15]用CJM126诱导出乳腺癌细胞耐药株MCF-7(10 nmol/L CJM126)及MCF-7(10 mmol/L CJM126),分别对CJM126相应剂量耐受,同时对结构、作用机制类似药物交叉耐受。二者NAT1和NAT2蛋白均有表达,尤其是NAT2高表达与MCF-7(10 nmol/L CJM126)细胞增强的乙酰化能力有关。其他相关研究亦报道NAT2引起的乙酰化在药物反应中具有一定影响^[16-18]。

RNF20是Bre1的同源物之一, 另一个为RNF40. Hwang *et al*^[19]研究发现, *S cerevisiae* protein, Bre1, 作为一个进化上保守的环指蛋白, 是体内组蛋白H2B泛素化和H3在lys4上甲基化所必需的, 对突变的分析证实了其在控制细胞大小中的作用. Kim *et al*^[20]证实了人类RNF20是核蛋白, 他提高了H2B在lys120泛素化的整体水平, 并加强了激活物依赖性的转录. Zhu *et al*^[21]发现RNF20过表达导致H2B单泛素化增强, 随之引起H3lysines 4和79甲基化水平升高, 刺激HOX基因表达. 有关RNF20与耐药性的研究不多, Rao *et al*^[22]曾报道RNF2与耐药有关, 不知是否指同一蛋白. Rao *et al*^[22]在一项对RNF2与人类P-糖蛋白连接区相互作用的研究中发现RNF2调节细胞内P-糖蛋白数量, 通过其下游调节途径在肿瘤耐药形成中起重要作用.

SNAI2(SLUG)是Snail相关锌指蛋白转录因子, 对神经嵴起源细胞的正常发育很重要. Perez-Mancera *et al*^[23]发现, SLUG过表达可能导致先心病和肿瘤(主要是间叶细胞肿瘤)的发生. 关于SLUG与耐药性的研究亦不多见, Catalano *et al*^[24]在关于多药耐药恶性间皮瘤细胞中干细胞因子/c-Kit/slug信号传导的诱导的研究显示, 诱导SLUG在该耐药株的广谱耐药中起重要作用. 最近在对乳腺癌耐药细胞株中基因表达的研究发现, 在HER2阳性的乳腺癌trastuzumab耐药细胞株(JIMT-1)中有SLUG基因扩增^[25].

MAP3K2, 即MAP/ERK kinase kinase 2; MEKK2. MEKK2属于mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase基因家族, 与MAPK信号传导途径调节有关. 关于MAPK与耐药性的研究也很多, 认为其促进与抑制耐药形成的观点都有, 且曾有研究发现他与乳腺癌细胞的5-FU耐药有关. Hirose *et al*^[26]研究发现, p38 MAPK途径促使DNA错配修复系统至G2检查点, 并导致DNA甲基化药物的耐药. Ding *et al*^[27]对信号传导途径间相互关系与多药耐药蛋白MDR-1的研究表明ERK1/2 MAPK途径可能与耐药产生有关. Gutierrez *et al*^[28]通过研究发现ER, HER-2, p38及ERK间的相互联系可能与乳腺癌对他莫昔芬耐受有关. Wu *et al*^[29]在KT乳腺癌细胞的5-FU耐药株中发现MAPK活化增强. 另一项关于乳腺癌的研究发现持续的ERK激活与乳腺癌细胞株的获得性TRAIL耐受有关^[30]. 而一项关于胰腺癌的研究也发现MAPK与胰腺癌细胞的化学耐受性有关^[31]. Sun *et al*^[32]亦通过

研究发现DDB2过表达引起的p38信号传导减弱可能是获得性TNF- α 耐受的原因之一. 与此相反, Villedieu *et al*^[33]经研究发现顺铂治疗乳腺癌产生的耐药与ERK及p38 MAPK进行性活性丧失有关. 我们的研究结果则显示MAPK有促进耐药形成的作用. 由于信号传导途径中的蛋白激酶与肿瘤耐药相关, 这类蛋白激酶(包括p38 MAPK)的抑制剂作为靶向治疗的研究得到极大发展. 上述5种可能的耐药相关基因在耐药细胞LoVo/5-FU的具体耐药机制还有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423-443
- 2 Belvedere O, Puglisi F, Di Loreto C, Cataldi P, Guglielmi A, Aschele C, Sobrero A. Lack of correlation between immunohistochemical expression of E2F-1, thymidylate synthase expression and clinical response to 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 55-58
- 3 姜浩, 江骥, 胡蓓. 二氢嘧啶脱氢酶和胸腺嘧啶核苷激酶的研究进展. *中国临床药理学杂志* 2002; 18: 317-320
- 4 Donnelly JG. Pharmacogenetics in cancer chemotherapy: balancing toxicity and response. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 231-235
- 5 Sohn KJ, Smirnakis F, Moskovitz DN, Novakovic P, Yates Z, Lucock M, Croxford R, Kim YI. Effects of folylpolyglutamate synthetase modulation on chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Gut* 2004; 53: 1825-1831
- 6 刘诚明, 谌宏敏. 基因芯片技术在肿瘤耐药研究中的应用. *现代肿瘤医学* 2003; 11: 390-392
- 7 McFadyen MC, McLeod HL, Jackson FC, Melvin WT, Doehmer J, Murray GI. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 207-212
- 8 Rochat B, Morsman JM, Murray GI, Figg WD, McLeod HL. Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation? *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 537-541
- 9 Patterson LH, Murray GI. Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 1335-1347
- 10 McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 363-371
- 11 Rochat B. Role of cytochrome P450 activity in the fate of anticancer agents and in drug resistance: focus on tamoxifen, paclitaxel and imatinib metabolism. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 349-366
- 12 Garte S, Taioli E, Raimondi S, Paracchini V, Binkova B, Sram RJ, Kalina I, Popov TA, Singh R, Farmer PB. Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: results from the EXPAH study. *Mutat Res* 2007; 620: 7-15
- 13 Schnakenberg E, Fabig KR, Stanulla M, Strobl N,

- Lustig M, Fabig N, Schloot W. A cross-sectional study of self-reported chemical-related sensitivity is associated with gene variants of drug-metabolizing enzymes. *Environ Health* 2007; 6: 6
- 14 Husain A, Zhang X, Doll MA, States JC, Barker DF, Hein DW. Identification of N-acetyltransferase 2 (NAT2) transcription start sites and quantitation of NAT2-specific mRNA in human tissues. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 721-727
- 15 Bradshaw TD, Chua MS, Orr S, Matthews CS, Stevens MF. Mechanisms of acquired resistance to 2-(4-aminophenyl)benzothiazole (CJM 126, NSC 34445). *Br J Cancer* 2000; 83: 270-277
- 16 Weiner M, Burman W, Vernon A, Benator D, Peloquin CA, Khan A, Weis S, King B, Shah N, Hodge T. Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1341-1347
- 17 Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, Chang FY, Lee SD. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 883-889
- 18 Tanigawara Y, Kita T, Aoyama N, Gobara M, Komada F, Sakai T, Kasuga M, Hatanaka H, Sakaeda T, Okumura K. N-acetyltransferase 2 genotype-related sulfapyridine acetylation and its adverse events. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1058-1062
- 19 Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* 2003; 11: 261-266
- 20 Kim J, Hake SB, Roeder RG. The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Mol Cell* 2005; 20: 759-770
- 21 Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* 2005; 20: 601-611
- 22 Rao PS, Mallia KB, Srivenugopal KS, Balaji KC, Rao US. RNF2 interacts with the linker region of the human P-glycoprotein. *Int J Oncol* 2006; 29: 1413-1419
- 23 Perez-Mancera PA, Gonzalez-Herrero I, Maclean K, Turner AM, Yip MY, Sanchez-Martin M, Garcia JL, Robledo C, Flores T, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Sanchez-Garcia I. SLUG (SNAI2) overexpression in embryonic development. *Cytogenet Genome Res* 2006; 114: 24-29
- 24 Catalano A, Rodilossi S, Rippo MR, Caprari P, Procopio A. Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 46706-46714
- 25 Rennstam K, Jonsson G, Tanner M, Bendahl PO, Staaf J, Kapanen AI, Karhu R, Baldetorp B, Borg A, Isola J. Cytogenetic characterization and gene expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 172: 95-106
- 26 Hirose Y, Katayama M, Stokoe D, Haas-Kogan DA, Berger MS, Pieper RO. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8306-8315
- 27 Ding S, Chamberlain M, McLaren A, Goh L, Duncan I, Wolf CR. Cross-talk between signalling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1. *Br J Cancer* 2001; 85: 1175-1184
- 28 Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2469-2476
- 29 Wu Y, Hiwasa T, Isogai E, Sonoda T, Kita K, Chen Z, Sugaya S, Yamamori H, Tanzawa H, Suzuki N. Activation of MAP kinases by 5-fluorouracil in a 5-fluorouracil-resistant variant human cell line derived from a KT breast cancer cell line. *Int J Oncol* 1998; 13: 1241-1245
- 30 Lee TJ, Lee JT, Park JW, Kwon TK. Acquired TRAIL resistance in human breast cancer cells are caused by the sustained cFLIP(L) and XIAP protein levels and ERK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 1024-1030
- 31 Zhao Y, Shen S, Guo J, Chen H, Greenblatt DY, Kleeff J, Liao Q, Chen G, Friess H, Leung PS. Mitogen-activated protein kinases and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 2006; 136: 325-335
- 32 Sun CL, Chao CC. Potential attenuation of p38 signaling by DDB2 as a factor in acquired TNF resistance. *Int J Cancer* 2005; 115: 383-387
- 33 Villedieu M, Deslandes E, Duval M, Heron JF, Gauduchon P, Poulain L. Acquisition of chemoresistance following discontinuous exposures to cisplatin is associated in ovarian carcinoma cells with progressive alteration of FAK, ERK and p38 activation in response to treatment. *Gynecol Oncol* 2006; 101: 507-519

电编 张敏 编辑 王晓瑜

HeLa细胞感染痢疾杆菌前后差异表达的新EST序列的电子延伸及验证

黄留玉, 史兆兴, 袁静, 胡福泉

黄留玉, 史兆兴, 袁静, 军事医学科学院疾病预防控制中心 北京市 100071
胡福泉, 中国人民解放军第三军医大学基础医学部微生物学教研室 重庆市微生物工程实验室 重庆市 400038
黄留玉, 研究员, 博士生导师, 主要从事微生物功能基因组学研究.
通讯作者: 胡福泉, 400038, 中国人民解放军第三军医大学基础医学部微生物学教研室, 重庆市微生物工程实验室.
hooququan@yahoo.com.cn
电话: 023-68752240
收稿日期: 2007-03-26 接受日期: 2007-04-21

Electronic extension and identification of new HeLa cell ESTs differentially expressed after *Shigella flexneri* 2a infection

Liu-Yu Huang, Zhao-Xing Shi, Jing Yuan, Fu-Quan Hu

Liu-Yu Huang, Zhao-Xing Shi, Jing Yuan, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
Fu-Quan Hu, Department of Microbiology, College of Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Fu-Quan Hu, Department of Microbiology, College of Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China. hooququan@yahoo.com.cn
Received: 2007-03-26 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To investigate and test differential mRNA expression of new ESTs within HeLa epithelial cells following infection with *Shigella flexneri* 2457T.

METHODS: HeLa cells were incubated with *S. flexneri* 2a 2457T. A methylene blue assay was performed to examine the ratio of bacterial infection. Total RNA was extracted from HeLa cells and mRNA was isolated for use as probes. A cDNA microarray was assembled with about 3000 cDNA clones representing the same number of independent cDNA clusters, which were unknown-gene ESTs. Using 156 EST sequences obtained from cDNA microarray analysis as seed sequences, the Siclon software was applied for splicing, proofing, and extending EST sequences as long as possible. To validate the

correctness of sequences after extension and to confirm the accuracy of the differential expression of genes from the microarray analysis, three new genes were selected and their transcription levels in HeLa cells were analyzed before and after *Shigella* infection using semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Forty-five ESTs were determined as being differentially expressed, with ≥ 3 -fold or ≤ 0.33 -fold changes, and 25 of these were identified as known genes involved in several important intestinal functions. Interestingly, three strikingly different cDNA fragments from unknown ESTs, name NPCKKH12, ADBCBS0 and HTBAMG05, were cloned by RT-PCR, sequenced and their expression levels were confirmed by semi-quantitative RT-PCR. We confirmed that they were new human or pseudo genes.

CONCLUSION: Three new ESTs from HeLa cells, differentially expressed after *S. flexneri* 2a infection, were identified. This investigative strategy is useful for obtaining information to be applied as a basis for further study of the interactions between *Shigella* and epithelial cells.

Key Words: *Shigella flexneri* 2a; Expressed sequence tag; cDNA microarray; Electronic extension; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Gene identification

Huang LY, Shi ZX, Yuan J, Hu FQ. Electronic extension and identification of new HeLa cell ESTs differentially expressed after *Shigella flexneri* 2a infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1905-1913

摘要

目的: 研究痢疾杆菌福氏2a入侵前和入侵后3 h的人上皮细胞差异表达的新基因。

方法: 采用增毒的痢疾杆菌福氏2a 2457T侵袭HeLa细胞, 检查HeLa细胞中细菌的数量并用RT-PCR方法从HeLa细胞中提取总RNA, 制

■背景资料

痢疾是全世界广泛流行并高发的一种急性肠道传染病, 其在结肠上皮细胞中的繁殖和扩散是导致痢疾的重要环节之一。结肠上皮细胞作为痢疾杆菌的宿主细胞, 在受到痢疾杆菌的入侵之后为适应新的环境而会诱发产生新的生存或抵御机制。但目前对痢疾杆菌侵袭上皮细胞后, 宿主细胞基因发生的变化及宿主的免疫保护机制还不十分清楚。

■研究前沿

痢疾杆菌侵入肠上皮细胞引起细胞大量死亡是造成痢疾发生的关键环节。因此,要了解痢疾杆菌的致病机制,必须在基因水平研究宿主细胞在与痢疾杆菌相互作用过程中的应答,从而提高对痢疾杆菌致病机制的认识。

备探针。采用含有约3000个代表新基因的芯片进行芯片杂交,分析杂交结果。将所获得的新的156条EST序列为种子序列用cDNA微阵列实验,以人类EST数据库为基础库,应用SiClone软件进行EST拼接、校对并尽可能延长获得大片段或全长cDNA。选取基因组未注释的编码区序列作为新基因进行RT-PCR实验验证。

结果:共鉴定到 ≥ 3 倍或 ≤ 0.33 的差异表达的代表新基因的EST序列45条,其中25个延伸序列鉴定为与重要的肠道功能相关的已知基因,并有3个在痢疾杆菌侵袭期间高表达的存在显著差异的新EST序列,他们分别名为:NPCKKH12、ADBCSB02和HTBAMG05,这3个基因是新的人基因或假基因。

结论:鉴定出了在HeLa细胞感染痢疾杆菌前后差异表达的新EST序列,为进一步研究痢疾杆菌与寄主相互作用奠定了基础。

关键词:痢疾杆菌福氏2a; 表达序列标签; cDNA微阵列; 电子延伸; 反转录聚合酶链反应; 基因鉴定

黄留玉, 史兆兴, 袁静, 胡福泉. HeLa细胞感染痢疾杆菌差异表达的新EST序列的电子延伸及验证. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1905-1913

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1905.asp>

0 引言

病原菌致病是在与真核宿主细胞相互作用过程中实现的。痢疾杆菌在结肠上皮细胞中的繁殖和扩散是导致痢疾的重要环节之一^[1]。志贺氏菌感染引起痢疾发病机制为所有病原性痢疾杆菌都具有一个可以编码侵袭质粒抗原IpaACDB毒力大质粒^[2],通过Mxi-Spa-III型分泌系统(TTSS)将细菌蛋白注射到肠道上皮细胞内^[3],通过胃肠屏障到达结肠,侵入结肠上皮细胞开始增殖并向邻近细胞扩散,最终引起结肠炎症、上皮细胞死亡、溃疡及液体的增多产生脓血及黏液等^[4-5]。肠上皮细胞作为痢疾杆菌的宿主细胞,在受到痢疾杆菌的入侵之后为适应新的环境会诱发新的生存或抵御机制。在该过程中,基因表达将会发生明显的变化。以前的研究主要集中于通过免疫染色推断寄主的形态学的变化^[6-7],但目前对痢疾杆菌侵袭上皮细胞后,宿主细胞基因发生的变化及宿主的免疫保护机制还不十分清楚。

基因表达谱(转录组)是研究细胞表型和功

能的一个重要工具。与基因组不同,表达谱是高度动态的,细胞所处环境改变或受到病原微生物入侵时,其形态和生理状况都会发生改变,甚至当细胞处于复制、分裂等正常的生理活动时,基因的转录情况也会变化很大,而这些都是由于基因表达的不同引起的。因此,对这种基因表达差异的检测不仅会深入认识痢疾发生发展的机制,也会为预防和治疗痢疾带来新的思路。转录组学可能提供一些未知表达序列标签(EST)的信息,但如果这些重要的序列太短,那就很难把他们评判为差异基因。尽管利用传统的方法可能可以研究这些EST序列,通过从cDNA文库中筛选获得较长的序列,然而,这个方法是很复杂的而且仍处于试验阶段,尤其是大量的信息获得应该通过采用高通量的技术。在病原菌与寄主细胞相互作用的研究中经常会出现未知的EST序列,同时大量的生物信息资源为未知EST序列的分析提供了便利的方法。GenBank或EMBL等公开的数据库中存在大量的EST序列,他们许多序列相互重叠并可能代表了相同的cDNA序列,因此短的EST序列可以利用生物软件被延伸。根据这个原理,通过序列图谱和基因克隆^[6]可以设计电子PCR^[8]。我们采用新的策略快速鉴定未知EST序列进行定量转录组学分析,用于研究上皮细胞和痢疾杆菌相互作用,利用含有约3000个新基因的表达谱芯片检测了痢疾杆菌入侵诱导3 h的人上皮细胞新EST序列基因表达的差异,对差异表达的全新EST序列进行了电子延伸克隆和相应的验证,这些发现也为进一步进行寄主-病原菌相互作用的生化分析奠定了基础和框架。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5 α 和野生型痢疾杆菌福氏2a毒株2457T均为本室保存。实验前,痢疾杆菌福氏2a 2457T用豚鼠角膜实验鉴定其毒性并进一步增毒。人子宫上皮细胞株HeLa细胞为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 HeLa细胞侵袭实验^[9] 人子宫上皮细胞株HeLa细胞培养在含有100 mL/L FBS无支原体感染的RPMI 1640培养基中。进行感染实验时,将2457T福氏2a痢疾杆菌培养至指数生长期,取约 10^8 CFU的菌用PBS洗涤3次后,悬浮于不含血清的RPMI 1640培养液中,用来侵袭约 10^6 个的HeLa细胞,37℃作用3 h, PBS冲洗3次感染后的

细胞, 加入新鲜培养基(含20 mg/L的庆大霉素)以杀死细胞外的细菌, 再培养3或24 h. 收集细胞并用RNA稳定试剂RNAlater(Qiagen公司产品)保存样品. 另外, 感染实验时进行染色, 用甲醇:冰醋酸(3:1)固定15 min, 美蓝染色10 min, 检测HeLa细胞中细菌的数量.

1.2.2 cDNA微阵列的构建 含有约3000个代表新基因和对照基因的芯片克隆由上海中科开瑞公司提供. 利用通用引物PCR扩增所需片段, 并用琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物的质量. 将PCR产物异丙醇沉淀后溶于变性溶液(1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH), 利用芯片制作仪(BiorRobotics, Cambridge, UK)将100 μ L含PCR产物的溶液点到8 cm \times 12 cm的Hybond N尼龙膜上(Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK), 每个点的直径约为0.4 mm, 每个cDNA片段在同一张膜的不同位置点2次. 以 λ DNA和pUC18 DNA作为阴性对照. 每张8 cm \times 12 cm的尼龙膜上包含8个看家基因(分别编码核糖体蛋白S9、 β 肌丝蛋白、3磷酸甘油脱氢酶、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶、RPL13A蛋白、泛素C、磷脂酶A2和UCHL1蛋白)作为膜内对照基因, 每个基因均匀地点在每张膜的12个不同的位置. 如果杂交结果中某个基因的12个点的最大差异倍数大于1.5倍, 则认为杂交结果是无效的.

1.2.3 RNA的提取和检测 采用标准的TRIzol RNA提取方法抽提对照组和实验组(包括感染后3和24 h)的HeLa细胞总RNA, 利用poly(dT)resin(Qiagen, Hilden, Germany)分离纯化mRNA, 并检测mRNA的质量和纯度, 使其纯度符合要求($A_{260}/_{280} > 1.9$). 总RNA质量检测(Lab on chip检测)操作步骤参考人oligo基因表达谱芯片使用手册, Lab-on-chip参照Agilent 2100分析仪操作手册, 制备凝胶, 按照软件提示进行RNA电泳操作, 评价RNA质量.

1.2.4 探针的制备 取大约1-2 μ g mRNA用于反转录探针制备和纯化, 以200 μ Ci的 α - 33 P为标记物, 用MMLV反转录酶进行反转录, 取反转录反应产物的1/10进行PCR反应(94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35个循环).

1.2.5 杂交及洗涤 芯片用20 mL预杂交液(6 \times SSC, 5 g/L SDS, 5 \times Denhardt和100 mg/L变性鲑精DNA)在68 $^{\circ}$ C预杂交3 h, 随后用洗液(0.1 \times SSC, 5 g/L SDS)在65 $^{\circ}$ C下严格洗涤1 h, 与 33 P标记的cDNA在6 mL杂交液(6 \times SSC, 5 g/L SDS和100 mg/L鲑精DNA)中68 $^{\circ}$ C杂交过夜.

1.2.6 检测及分析 将杂交好的芯片置于Phosphor Screen上过夜, 扫描用FLA-3000A Plate/Fluorescent Image Analyzer (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan), 图像分析采用Array Gauge软件 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). 根据没有cDNA位置的背景灰度, 对芯片上cDNA点的灰度进行背景消减. 只有灰度值大于10的cDNA点才认为是有意义的信号, 足以保证与背景灰度有显著性差异(>99.9%).

1.2.7 电子延伸 首先对人的EST数据库进行预处理, 去除载体等混杂序列, 得到干净的人类EST序列数据库. 然后以cDNA微阵列实验所获得的156条新的EST序列为种子序列, 以人类EST数据库为基础库, 应用Siclone软件进行EST拼接、校对并尽可能延长获得大片段或全长cDNA(称为Contig). 用Sim4软件将延长并校对的Contig序列与人基因组序列对准, 检验拼接的正确程度, 并可与基因组注释结果进行比较. 用Estscan软件, 预测没有注释的新的Contig序列的真正阅读框, 重构编码区序列, 并进行启动子等调控序列的预测.

1.2.8 RT-PCR分析 选取基因组未注释的编码区序列作为新基因进行RT-PCR实验验证. 利用RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)提取细胞总RNA, 并用Oligo(dT)和MMLV反转录酶将约1 μ g的总RNA反转录为单链cDNA. 在50 μ L PCR扩增体系中加入1 μ L cDNA作为模板, 以不同基因的序列设计引物进行PCR(94 $^{\circ}$ C 30 s, 52-60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2-3 min, 30个循环). 得到的PCR产物纯化后连接到pMD18-T载体上测序, BLAST分析.

2 结果

2.1 cDNA微阵列体系的建立 从人类cDNA文库中随机挑取的克隆经过末端测序和与Unigene数据库比对, 鉴定该DNA序列为代表未知基因的新EST序列. 代表约3000个新基因的cDNA克隆构成了cDNA微阵列体系. 为了评估cDNA微阵列体系的重复性好坏, 独立地进行了重复性实验. 制作不同批次的cDNA芯片, 用相同的mRNA样品制作的cDNA探针进行杂交, 并通过数据分析计算相关系数 R^2 (用来表示基因表达模式的相似性), 经检测 R^2 值约为0.97(图1), 表明在3000个基因中只有0.2%的基因两次杂交的结果差异大于2倍. 由此表明, 本实验构建的cDNA微阵列系统具有很高的可重复性.

■相关报道

2003年, Pedron *et al* 利用affymetrix微阵列技术对*S. flexneri* 5a (M90T)侵袭上皮细胞的转录学反应进行了详细的研究^[9], 证明了上皮细胞的前感染过程. 这些结论都是检测了已知基因的表达变化, 但对于未知基因的作用尚不清楚. 然而, 痢疾杆菌侵袭上皮细胞新的保护或反应机制可能和一些未知功能基因密切相关.

■创新盘点

在本研究采用新的策略快速鉴定未知EST序列进行定量转录组学分析,用于研究上皮细胞和痢疾杆菌相互作用,利用含有约3000个新基因的表达谱芯片检测了痢疾杆菌入侵诱导3h的人上皮细胞新EST序列基因表达的差异,对其中3个差异表达的全新EST序列进行了电子延伸克隆和相应的验证,这些发现也为进一步进行寄主-病原菌相互作用的生化分析奠定了基础和框架。

2.2 痢疾杆菌入侵HeLa细胞产生的差异表达新基因 采用痢疾杆菌入侵HeLa细胞3 h后,进行美蓝染色,检测HeLa细胞中细菌的数量,结果见图2,镜检每个细胞内含有细菌数约10个,表明痢疾杆菌已完全侵袭上皮细胞内。我们对痢疾杆菌感染后3 h和未感染2个样品mRNA进行总RNA的质量控制,见图3。采用琼脂糖电泳和较高灵敏度的Lab-on-chip进一步对总RNA进行质量检测,通过对图谱的分析发现没有明显的RNA降解(图3),因此可以判定10个样品的总RNA完整性良好,可以进行探针标记。

严格按照方法中描述的质量控制标准筛选cDNA阵列中差异表达基因,部分扫描图的结果见图4。对数据进行分析比较后得到有3倍以上差异的EST序列进行了测序(结果未显示)。痢疾杆菌感染3 h后与对照相比,有11个代表新基因的EST序列表达上调,最高倍数达到14.60,只有2个EST序列表达下调,差异最大为0.146。

2.3 差异表达新EST序列的电子延伸和校对 为了能够获得差异表达新基因,对代表新基因的EST序列进行了电子延伸,其中痢疾杆菌感染3 h后的差异EST序列包含了3倍以上差异表达的代表新基因的EST序列45条,对这些EST序列进行电子延伸,延伸后的Contig序列长度由436-2993 bp。对这些Contig序列与人基因组序列对准,检验拼接的正确程度,并可与基因组注释结果进行比较,这些序列分布在多个染色体上,在6号和17号染色体上聚集有较多的序列,并且多数序列是在同一染色体上邻近的多个序列(2-9个)匹配,提示这些序列可能是经过mRNA剪接得到的。

通过GenBank BLAST分析,有25条序列与已知的基因或cDNA序列高度匹配,20个序列是未注释的,可能是这些基因的表达序列标签,也可能是这些基因的不同剪接体。因为未注释序列可能是新基因,我们对EST序列进行了结构域编码序列库搜索。25个序列具有正确的开放阅读框,分别是人 DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)多肽3, SNRPN, CLCN5, 黏附因子B2, FOXJ3, RPS2, actin β , cofilin, talin, gelsolin, cDNA FLJ46584 fis, cDNA DKFZp686N23124, TPD52, TPP2, C10orf9, ABCA8, COMMD3, COL4A5, Vof16, CLECSF2, Nedd4 结合蛋白 I, calpain5, 钙转运ATPase I, MOBKL2B, unc-84同源体A。鉴定到的差异表达的EST延伸序列主要的功能分类是与几个重要的肠道功能,包括痢疾杆菌

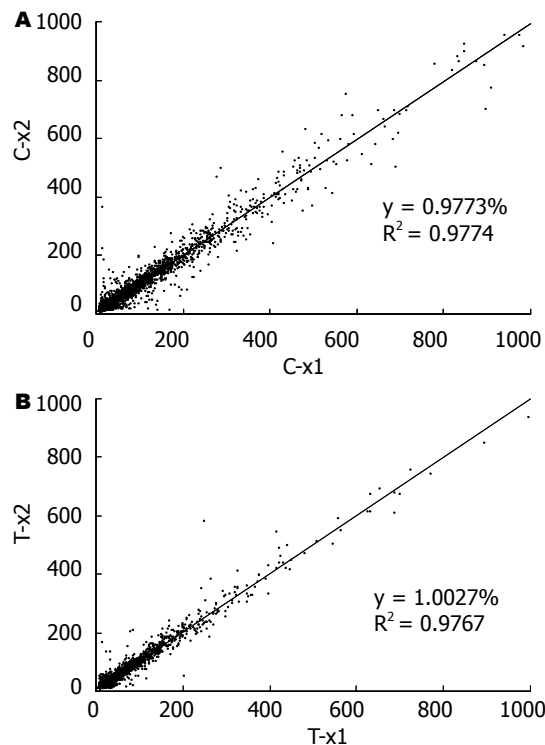


图1 不同批次的cDNA芯片杂交的double点的散点图。A: HeLa细胞; B: 侵袭3 h后的HeLa细胞。

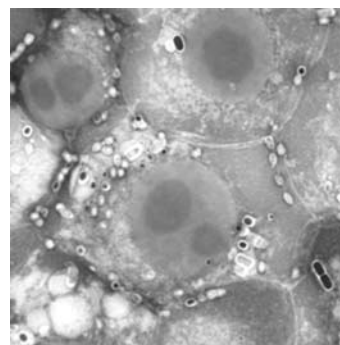


图2 HeLa细胞感染痢疾杆菌3 h后的美蓝染色结果。

诱导的凋亡、细胞骨架、离子转运、离子通道功能、黏膜屏障防御、异型生物物质代谢以及上皮细胞的保护机制。与离子转运、离子通道和细胞凋亡相关基因大多表达量上调,这可能是痢疾杆菌引起腹泻的原因。

鉴定到的差异基因在分类中大多属于细胞骨架相关蛋白,如actin, talin, cofilin和gelsolin,其次是离子转运蛋白如calpain-5, Nedd4结合蛋白 I 和钙转运蛋白ATPase I。在痢疾杆菌2457T侵袭反应中寄主上皮细胞最显著变化的是TPP II,表达量上调了7.01倍,其参与了由痢疾杆菌2457T触发的细胞凋亡途径。此外,另一个重要的功能基因包括CLECSF2和Vof16也显示了重要的基因水平变化,反应了上皮细胞的保护性机制。

用Estscan软件,预测没有注释的新的Contig

序列的真正阅读框, 重构编码区序列, 预测到存在正确阅读框的序列有3条序列, 分别命名为NPCCKH12、ADBCSB02和HTBAMG05. 然后对这3条序列进行RT-PCR的克隆验证分析, 经测序后得到的序列与电子延伸得到的序列相比稍有差异. 克隆NPCCKH12和克隆ADBCSB02没有已知的基因与之相匹配, 为新的基因序列; 克隆HTBAMG05的延伸序列与褐鼠局部缺血相关基因*Vol16*有90%的同源性.

2.4 RT-PCR的验证分析 为了验证cDNA微阵列分析中3个延伸后的序列差异表达的准确性,本研究进行了半定量RT-PCR的差异表达分析,结果见图5. 克隆ADBCSB02(感染后下调6.25倍)和克隆HTBAMG05(感染后上调2.17倍)代表的EST序列在RT-PCR实验中反映出了在cDNA微阵列分析中的表达差异; 克隆NPCCKH12(感染后下调2.38倍)代表的EST序列差异表达在RT-PCR实验中不能明显地反映出来. 由此可知, cDNA微阵列分析的大部分数据是可信的.

3 讨论

在肠道内,痢疾杆菌会引发急性感染而破坏组织,细菌进一步侵袭胞质或形成膜结合复合物,导致寄主免疫反应下降.目前对痢疾病原学的研究焦点是痢疾杆菌与上皮细胞的相互作用^[5].最近Pedron *et al*^[9]利用affymetrix微阵列技术对*S. flexneri* 5a(M90T)侵袭上皮细胞的转录学反应进行了详细的研究,证明了上皮细胞的前感染过程.这些结论都是检测了已知基因的表达变化,但对于未知基因的作用尚不清楚.然而,痢疾杆菌侵袭上皮细胞新的保护或反应机制可能和一些未知功能基因密切相关.

为了了解未知基因表达的改变, Eckmann *et al*^[10]对沙门氏菌侵袭肠上皮细胞的约4300个EST序列进行微阵列分析, 他们发现几个细胞因子、激酶、转录因子和HLA I表达上调, 认为微阵列技术是研究病原菌-寄主相互作用的有效方法^[10]. 因此, 我们也应用了cDNA微阵列技术检测短的痢疾杆菌侵袭上皮细胞HeLa后新EST序列的差异表达, 并使用Siclone软件进行了电子延伸. 结果显示: (1)大约50% EST 延伸序列是和已知基因直接相关; (2)强烈暗示了上皮细胞对痢疾杆菌的侵袭具有新的反应机制. 通过cDNA阵列分析和EST序列的电子延伸, 具有差异表达的ESTs中约一半为已知基因, 参与了富含肌动蛋白actin支架、离子运输、细胞凋亡和

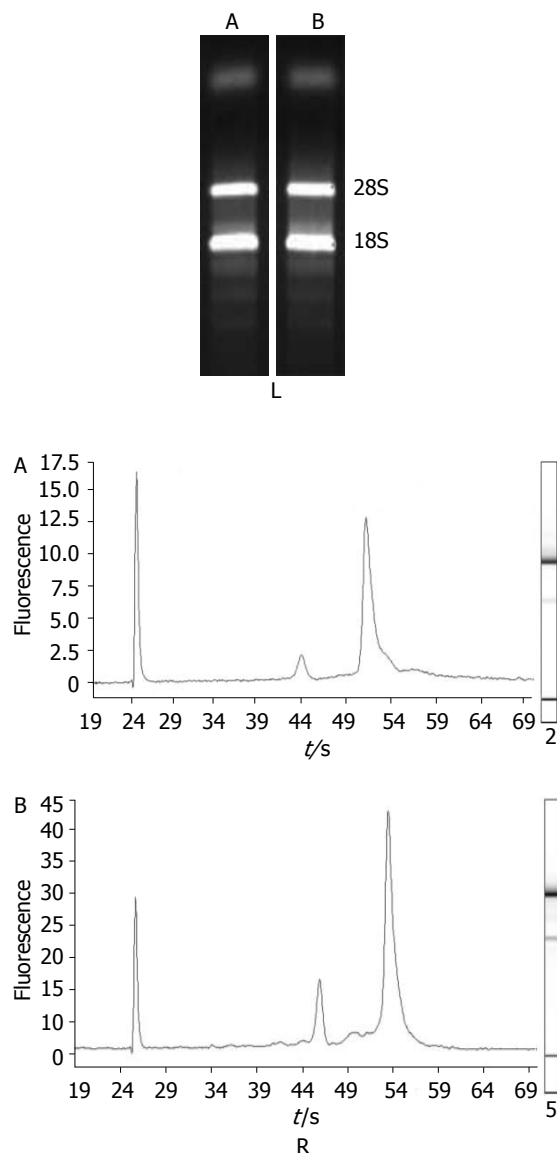


图 3 总RNA的质量检测. L: mRNA的琼脂糖凝胶电泳检测; R: lab-on-chip检测结果. A: HeLa细胞; B: 侵袭3 h后的HeLa细胞.

其他重要途径

最显著差异EST序列之一是编码tripeptidyl peptidase II (TPP II)的基因, 其表达量上调了7.01倍. TPP II是一个高分子量丝氨酸蛋白酶, 以同型寡聚体存在于细胞质或细胞膜中^[9], 起蛋白质降解的作用. 例如, 在淋巴瘤细胞中, 采用蛋白酶体抑制剂, TPP II替代了一些蛋白酶体的功能^[11], TPP II类蛋白水解系统发挥作用以补偿蛋白酶体的失活. 除了参与通常蛋白质降解的功能外, TPP II在凋亡途径中也扮演了特殊的作用. 在由*Shigella flexneri*触发巨噬细胞凋亡的过程中, TPP II参与到Caspase的上游, 促进了pro-caspase-1的成熟^[12]. 同时, 在我们的实验中, TPP II在痢疾杆菌侵袭细胞后表达量上调, 是否他也起到蛋白质降解或凋亡的作用还需要

■应用要点

研究结果为寻找上皮细胞新的生存或抵御通路提供了思路,也为进一步进行寄主-病原菌相互作用的生化分析奠定了基础和框架。

■同行评价

本文实验设计严谨、方法先进,实验证据较充实,统计学数据可靠,结果客观,有一定的学术和实际应用价值。

进一步研究. 如果TPP II参与细胞凋亡, 将与凋亡调控蛋白密切相连, 如Caspase-类凋亡调控蛋白CLARP 和两个生长因子, EGF受体的配体amphiregulin 和TGF- α , 他们在痢疾感染上皮细胞Caco-2中被强烈诱导表达^[9]. TPP II如何参与痢疾杆菌诱导的凋亡目前尚不清楚. 已知痢疾杆菌侵袭素IpaB可以诱导巨噬细胞凋亡, 并直接结合和激活Caspase-1, 因此, TPP II可能的作用是: (1)与IpaB和Caspase-1形成复合物, 直接促进Caspase的活性; (2)降解IpaB-caspase-1复合物引发细胞死亡的抑制子; (3)断裂作为细胞凋亡途径中一部分的Caspase-1底物. TPP II抑制子是Ala-Ala-Phe-chloromethylketone(AAF-cmk)和clasto-lactacystin b-lactone(lactacystin), 也是在侵袭时保护细胞的蛋白酶体的抑制子. 在本实验中, 我们鉴定到一些蛋白酶体如calpain-5明显上调, 因此, 我们认为TPP II可能通过降解AAF-cmk抑制子, 参与了痢疾杆菌诱导的凋亡途径, 对于确定TPP II在凋亡中的作用以及其凋亡前底物的鉴定还需要更详细的研究.

痢疾杆菌利用寄主细胞骨架蛋白进入到细胞内. 在痢疾杆菌侵袭上皮细胞后, 本研究发现了几个与肌动蛋白鞭毛翻转相关基因, 他们的表达是被特殊的方式调控的, 这是以前未报道过的. Actin、talins、cofilin和gelsolin在感染后的表达水平提高了, 而支架黏附因子B2的表达水平下降. 在痢疾杆菌黏附到中国鼠卵细胞时, 细胞骨架蛋白talins连接了肌动蛋白微纤丝与细胞质膜, 结合integrins形成肌动蛋白的核心聚集到F-actin, 并与细胞运动中负调控蛋白vinculins结合^[13]. 在本研究中, 我们鉴定到HeLa细胞的talins表达上调.

细胞骨架重排的连接, 对于HeLa细胞的趋向性和趋化性很重要^[14]. Cofilin和gelsolin属于痢疾杆菌切断肌动蛋白的组分, 在痢疾杆菌感染细胞中过表达. 已知Cofilin在吞噬菌作用中^[15], 与痢疾杆菌相互作用, 并提高Na⁺, K⁺-ATPase的活性, 促进离子转运作用^[16], 可以通过控制肌动蛋白聚合因子/cofilin过程, 快速连接和分裂肌动蛋白微纤丝. 肌动蛋白微纤丝的分裂可以释放肌动蛋白单体和cofilin, 并且在cofilin去磷酸化后2种组分都可以结合到新的微纤丝中^[17]. 在细胞骨架中肌动蛋白解聚物丰度的提高表明在寄主细胞和痢疾杆菌的能使具有解聚能力的蛋白失活的TTSS-效应子蛋白之间进行着复杂的分子竞争, 这与Philip *et al*^[18]采用蛋白

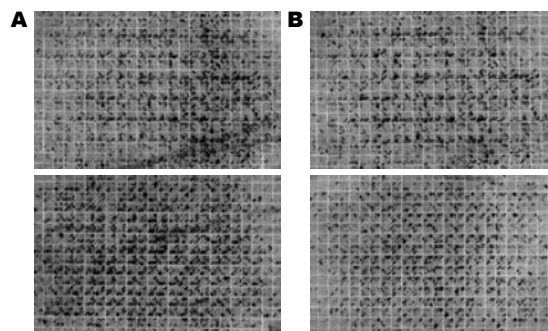


图4 芯片杂交结果扫描图. A: HeLa细胞; B: 侵袭3 h后的HeLa细胞.

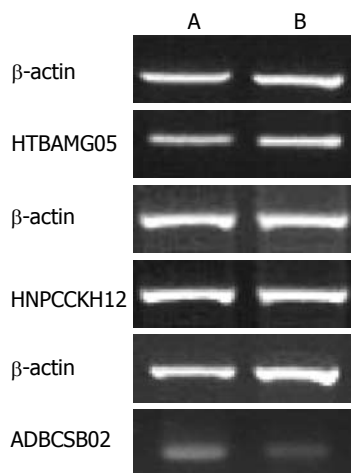


图5 3条电子延伸后的差异表达序列的半定量RT-PCR分析. A: HeLa细胞; B: 侵袭3 h后的HeLa细胞.

质组学方法分析人细胞对EPEC反应的结论是一致的.

鉴定到的另一个重要的EST序列是膜相关基因: ABCA8、UNC84A、MOBKL2B 和SAFB2. ABCA8是一个新的异质生物物质ATP-结合(ABC)转运子超家族的成员^[19], ABC转运蛋白可以将各种分子转运到细胞外和细胞内膜^[20], ABC基因被分为7个不同的亚家族, 包括: ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, 和White. ABCA8属于ABC1亚家族, 广泛存在于多细胞真核生物中, 其功能目前仍未确定, 但推测ABC转运子可能与细胞对痢疾杆菌存在的环境条件的适应性有关^[20]. 另一个膜相关基因-编码一个新的100 kD转膜蛋白UNC84A, 位于内部核膜上, 其基因序列与*Caenorhabditis elegans* Unc-84A高度相似^[21], 他可能与核层相互作用^[22]. MOBKL2B和SAFB2是2个细胞骨架相关蛋白, MOBKL2B蛋白与酵母菌Mob1蛋白具有相似性, Mob1是在极化纺锤体的复制和有丝分裂检测调控起关键作用的蛋白激酶^[23]. 另一个基因SAFB2, 推测编码953-氨基酸的蛋白, 与支架黏附因子B1(SAFB1)具

有75%的同源性。SAFB1和SAFB2包括一个高度保守的SAF框和RRM结构域, 他们都有一个核定位信号。这些蛋白在许多细胞加工中发挥作用, 包括染色质形成、转录调控、RNA剪拼以及应激反应^[24]。SAFB2通过与vinexin相互作用参与了细胞骨架的信号转导^[25]。我们认为, 在本实验中SAFB2的高表达与痢疾杆菌进入上皮细胞期间细胞骨架信号密切相关。

此外, 本研究还鉴定到calpain-5, Nedd4结合蛋白 I (Na^+ 通道), 氯化物通道5的表达上调, 控制肿瘤蛋白D52和钙-转运(Calcium-transporting)ATPase I 的转录水平下调。到目前为止, *Shigella*诱发腹泻的分子机制尚不清楚。我们鉴定到寄主蛋白酶calpain-5显著上调, 可能破坏了细胞紧密结合的完整性, 并降低细菌穿过上皮的抗性。当具有高 Ca^{2+} 储存能力的细胞器如内质网(endoplasmic reticulum, ER)和线粒体, 由于应激或受到损伤时, 造成 Ca^{2+} 外泄, 使细胞质中 Ca^{2+} 浓度提高。一些研究提出*Shigella*诱发的腹泻依赖于 HCO_3^- 分泌, 也就暗示了对钙流量的依赖^[18]。HeLa细胞受痢疾杆菌侵袭后, 胞内 Ca^{2+} 的浓度提高表明了 Ca^{2+} 从线粒体中的泄露。我们检测到钙激活的对粘液素调控^[26]的氯化物通道5的表达量提高。

Nedd4结合蛋白I在被痢疾杆菌侵袭后表达上调。Nedd4是一个泛素连接酶, 可以靶向到上皮细胞的钠通道, 调控盐和液体的动态平衡, 并且通过Nedd4的WW结构域与离子通道相互作用^[27]。因此, 由蛋白酶体介导的特异离子转运子的降解很可能在痢疾杆菌引发的腹泻中起关键作用。在ER上肿瘤蛋白D52P(TPD52)通过一个不同的基序结合 Ca^{2+} , ER中 Ca^{2+} 的积累引起TPD52表达水平的降低。我们发现质膜钙转运ATPase I 和肿瘤蛋白D52P下调, 可能也是引起发炎和腹泻的一个因素。

EST序列MDSDAH01鉴定为CLECSF2基因。这个基因编码的蛋白是C-型血凝素/C-型血凝素类结构域(CTL/CTLD)超家族成员, 位于染色体12p13天然致死基因复合区域^[28]。该家族成员具有一个共同的蛋白折叠和多种功能, 如细胞黏附, 细胞-细胞信号、糖蛋白翻转等, 普遍认为是参与对外源因子的防御机制, 识别健康和病原感染细胞, 对潜在的病原产生天然免疫反应^[29]。当淋巴细胞具有活性时, CLECSF2或AICL基因的表达水平是上调的。编码2型转

膜蛋白可能的功能是作为一个细胞被诱导激活的抗原^[30-31], 该诱导激活抗原在上皮细胞内将引起新的免疫反应。所以, CLECSF2基因在感染早期的上调预示他在上皮细胞的保护性机制中可能起重要的作用。这种保护机制的现象在Caco-2对*Shigella*的转录组学研究中也观察到了^[9]。此外, 在细胞解毒作用中的基因, 如CYP异构体和乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase), 我们鉴定到他们的表达量上调。我们的数据说明*S. flexneri* 2457T可能调节了一些重要的天然免疫蛋白的表达。

有趣的是, 对NPCCKH12、ADBCSB02和HTBAMG05 3个片段经测序后得到的序列与电子延伸得到的序列相比稍有差异。克隆NPCCKH12和克隆ADBCSB02没有已知的基因与之相匹配, 为新的基因序列; 克隆HTBAMG05的延伸序列与褐鼠局部缺血相关基因Vof16有90%的同源性。我们得到的这3个基因是新的人基因或假基因, 其相关信息已提交GenBank, 登录号为nos. UAY776160U, UAY776161U和UAY776162U。我们认为他们在细胞对痢疾杆菌2457T侵袭反应中起重要的作用。

本研究为了大规模获得新的功能基因, 利用cDNA微阵列技术和电子延伸技术进行了尝试性研究。从取得的结果可以看到, 我们不仅鉴定到了很多新基因, 也鉴定到了与已知基因高度同源的基因。这一结果说明我们的尝试性研究思路获得了初步的成功, 为全面深入开展痢疾杆菌和上皮细胞之间相互作用的研究奠定了基础。利用cDNA微阵列技术研究微生物和宿主之间的相互作用已经成为近期的研究热点之一^[6-8]。通过这样的研究, 可以得到大量的基因表达谱差异的信息。这些信息既有已知基因, 也有未知基因。对于已知基因的表达差异, 可以通过生物信息学手段(包括聚类分析、信号通路分析等)寻找总结规律。但要对未知的EST序列进行深入的分析, 就需要先获得较长的序列。通过筛选全长基因文库获得全长cDNA序列是早期的经典方法, 该方法的缺点是操作烦琐, 时间周期较长, 成功的几率也较低。目前拥有大量EST序列的数据库已经建立起来, 从生物信息学的原理出发, 利用数据库中的EST序列进行电子延伸, 可以使很多基因片段得以延伸, 这样可以迅速地对未知基因的功能进行研究。电子延伸技术已经在基因组研究方面发挥了重要作用。这些高度同源基因可能是已知基因的不同

剪接体,也可能是新的基因,这需要进一步的实验进行研究。

4 参考文献

- Andrews GP, Hromockyj AE, Coker C, Maurelli AT. Two novel virulence loci, mxiA and mxiB, in *Shigella flexneri* 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. *Infect Immun* 1991; 59: 1997-2005
- Grassl GA, Finlay BB. *Shigella* rewrites host transcriptional responses. *Nat Immunol* 2007; 8: 15-16
- Bach S, Makristathis A, Rotter M, Hirschl AM. Gene expression profiling in AGS cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains (cagA positive or cagA negative). *Infect Immun* 2002; 70: 988-992
- Ren Q, Robertson SJ, Howe D, Barrows LF, Heinzen RA. Comparative DNA microarray analysis of host cell transcriptional responses to infection by *Coxiella burnetii* or *Chlamydia trachomatis*. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990: 701-713
- Hess S, Peters J, Bartling G, Rheinheimer C, Hegde P, Magid-Slav M, Tal-Singer R, Klos A. More than just innate immunity: comparative analysis of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* effects on host-cell gene regulation. *Cell Microbiol* 2003; 5: 785-795
- Tran Van Nhieu G, Bourdet-Sicard R, Dumenil G, Blocker A, Sansonetti PJ. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* 2000; 2: 187-193
- Zhang Y, Lai M, Gu X, Luo M, Shao L. Reg IV, a differentially expressed gene in colorectal adenoma. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 918-922
- Schuler GD. Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res* 1997; 7: 541-550
- Pedron T, Thibault C, Sansonetti PJ. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J Biol Chem* 2003; 278: 33878-33886
- Eckmann L, Smith JR, Housley MP, Dwinell MB, Kagnoff MF. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. *J Biol Chem* 2000; 275: 14084-14094
- Hilbi H, Jozsa E, Tomkinson B. Identification of the catalytic triad in tripeptidyl-peptidase II through site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1601: 149-154
- Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, Niedermann G. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 1999; 283: 978-981
- Hilbi H, Puro RJ, Zychlinsky A. Tripeptidyl peptidase II promotes maturation of caspase-1 in *Shigella flexneri*-induced macrophage apoptosis. *Infect Immun* 2000; 68: 5502-5508
- Watarai M, Kamata Y, Kozaki S, Sasakawa C. rho, a small GTP-binding protein, is essential for *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Exp Med* 1997; 185: 281-292
- Melki R, Batelier G, Soulie S, Williams RC Jr. Cytoplasmic chaperonin containing TCP-1: structural and functional characterization. *Biochemistry* 1997; 36: 5817-5826
- Bierne H, Gouin E, Roux P, Caroni P, Yin HL, Cossart P. A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J Cell Biol* 2001; 155: 101-112
- Lee K, Jung J, Kim M, Guidotti G. Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin. *Biochem J* 2001; 353: 377-385
- Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR. Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 19-23
- Hardwidge PR, Rodriguez-Escudero I, Goode D, Donohoe S, Eng J, Goodlett DR, Aebersold R, Finlay BB. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2004; 279: 20127-20136
- Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M, Fujimura A. Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 41-45
- Antal M, Bordeau V, Douchin V, Felden B. A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. *J Biol Chem* 2005; 280: 7901-7908
- Bray JD, Chennathukuzhi VM, Hecht NB. Identification and characterization of cDNAs encoding four novel proteins that interact with translin associated factor-X. *Genomics* 2002; 79: 799-808
- Dreger M, Bengtsson L, Schoneberg T, Otto H, Hucho F. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11943-11948
- Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase TO, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wako H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human

- cDNAs. *Nat Genet* 2004; 36: 40-45
- 25 Oesterreich S. Scaffold attachment factors SAFB1 and SAFB2: Innocent bystanders or critical players in breast tumorigenesis? *J Cell Biochem* 2003; 90: 653-661
- 26 Townson SM, Dobrzycka KM, Lee AV, Air M, Deng W, Kang K, Jiang S, Kioka N, Michaelis K, Oesterreich S. SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *J Biol Chem* 2003; 278: 20059-20068
- 27 Bertrand CA, Danahay H, Poll CT, Laboisie C, Hopfer U, Bridges RJ. Niflumic acid inhibits ATP-stimulated exocytosis in a mucin-secreting epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C247-255
- 28 Henry PC, Kanelis V, O'Brien MC, Kim B, Gautschi I, Forman-Kay J, Schild L, Rotin D. Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 2003; 278: 20019-20028
- 29 Renedo M, Arce I, Montgomery K, Roda-Navarro P, Lee E, Kuchlerlapati R, Fernandez-Ruiz E. A sequence-ready physical map of the region containing the human natural killer gene complex on chromosome 12p12.3-p13.2. *Genomics* 2000; 65: 129-136
- 30 Ebner S, Sharon N, Ben-Tal N. Evolutionary analysis reveals collective properties and specificity in the C-type lectin and lectin-like domain superfamily. *Proteins* 2003; 53: 44-55
- 31 Eichler W, Ruschpler P, Wobus M, Drossler K. Differentially induced expression of C-type lectins in activated lymphocytes. *J Cell Biochem* 2001; 81: 201-208

电编 郭海丽 编辑 张海宁

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

• 消息 •

2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

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

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位。目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平。本中心已举办三期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术。本项目为2007年国家继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予 I 类学分14分。授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙型肝炎治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面。学习对象为省级、地市级医院的医护人员。

收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

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

胃癌树突状细胞浸润的临床意义及与肿瘤血管生成的相关性

周业江, 梁建群, 蔡晓龙, 熊玉霞, 易国平, 李显蓉, 魏仁智

■背景资料

胃癌是具有较强的侵袭和转移能力的恶性肿瘤, 其临床生物学行为及肿瘤血管生成活性与局部免疫状态是否具有关联性有待研究。淋巴转移和肿瘤血管生成能力是影响胃癌预后的重要因素, 但其与肿瘤局部树突状细胞浸润的关系尚不清楚。

周业江, 梁建群, 蔡晓龙, 易国平, 李显蓉, 魏仁智, 泸州医学院附属医院普外科 四川省泸州市 646000
熊玉霞, 泸州医学院药理教研室 四川省泸州市 646000
周业江, 泸州医学院附属医院普外科副教授, 医学博士, 硕士研究生导师, 主要从事胃肠肿瘤的基础与临床研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30672058
通讯作者: 周业江, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院普外科. zyj7525@163.com
电话: 0830-3165421
收稿日期: 2007-02-02 接受日期: 2007-03-17

Infiltrating dendritic cells in the development of gastric cancer and an association with tumor angiogenesis

Ye-Jiang Zhou, Jian-Qun Liang, Xiao-Long Qi, Yu-Xia Xiong, Guo-Ping Yi, Xian-Rong Li, Ren-Zhi Wei

Ye-Jiang Zhou, Jian-Qun Liang, Xiao-Long Qi, Guo-Ping Yi, Xian-Rong Li, Ren-Zhi Wei, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Yu-Xia Xiong, Department of Pharmacy, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation, No. 30672058
Correspondence to: Ye-Jiang Zhou, 646000, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. zyj7525@163.com
Received: 2007-02-02 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To investigate the potential role of infiltrating dendritic cells (DCs) in the biological behavior of gastric cancer and any association with tumor angiogenesis.

METHODS: Immunohistological identification of DCs in gastric cancer using monoclonal antibody recognizing S-100 protein was undertaken in 35 primary gastric cancers (PGC) and 23 lymphoid metastatic gastric cancers (LMGC). Antibodies recognizing vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD34 were employed to detect VEGF expression and microvascular density (MVD), respectively.

RESULTS: The density of S-100⁺DCs was obviously decreased along with progressive cancer invasion of the gastric wall; a statistically significant decrease was seen in gastric cancer with serosal invasion ($P = 0.04$). Further, a statistically negative correlation between the density of S-100⁺DCs and the degree of invasion was shown in gastric cancer ($P = 0.023$). The density of S-100⁺DCs in PGC with lymphatic metastasis was clearly lower than that in PGC with no lymphatic metastasis, though this difference was not statistically significant. However, the density of S-100⁺DCs in lymph nodes with carcinomatosis showed a marked decrease corresponding to the increase in the percentage of metastasis; a significantly negative correlation was shown between them ($r = -0.923$, $P < 0.01$). The density of S-100⁺DCs in VEGF-positive PGC was lower than that in VEGF-negative PGC ($P = 0.157$). There was a negative association of the density of S-100⁺DCs with VEGF expression in PGC, but it was not statistically significant ($r = -0.128$, $P = 0.464$). MVD in PGC with lower infiltration of S-100⁺DCs was significantly higher than that in PGC with higher infiltration ($P = 0.013$). Similarly, the density of S-100⁺DCs in PGC with higher MVD was also lower than that in PGC with lower MVD, thus showing a significantly negative association of the density of S-100⁺DCs with MVD ($r = -0.322$, $P = 0.059$).

CONCLUSION: Biological behaviors of gastric cancer cells such as invasive growth and lymphatic metastasis were closely associated with the level of infiltrating S-100⁺DCs. The infiltration of DCs might be affected by the ability of cancer cell-induced angiogenesis. Thus, pro-angiogenic factors such as VEGF released from tumor cells might be one of the molecular mechanisms of tumor orientated immune escape in gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Dendritic cells; Vascular endothelial growth factor; Microvascular density;

Immunohistochemistry

Zhou YJ, Liang JQ, Qi XL, Xiong YX, Yi GP, Li XR, Wei RZ. Infiltrating dendritic cells in the development of gastric cancer and an association with tumor angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1914-1920

摘要

目的: 探讨树突状细胞(dendritic cells, DCs)浸润对胃癌生物学行为的影响, 并探讨DCs浸润程度与肿瘤血管生成的相关性。

方法: 采用免疫组织化学染色SP法检测胃原发癌35例及其中淋巴转移癌23例组织中S-100⁺DCs的密度, 同法检测35例胃原发癌血管内皮生长因子(VEGF)的表达及CD34标记的微血管密度(MVD)。

结果: 随着胃癌浸润程度的增加, 间质S-100⁺DCs密度的下降, 浆膜浸润的胃癌S-100⁺DCs密度显著下降, S-100⁺DCs与肿瘤浸润深度呈显著负相关($P = 0.023$); 有淋巴转移胃癌S-100⁺DCs密度明显低于无淋巴转移者, 但无统计学意义; 在胃癌转移的淋巴结, 随着胃癌转移程度的增加, S-100⁺DCs密度显著下降, 两者呈显著负相关($r = -0.923, P < 0.01$); VEGF阳性表达的胃癌S-100⁺DCs密度明显低于VEGF阴性表达的胃癌($P = 0.157$), 两者呈负相关($r = -0.128, P = 0.464$), 但均无统计学意义; S-100⁺DCs低密度胃癌的MVD显著高于S-100⁺DCs高密度胃癌($P = 0.013$); 高MVD胃癌S-100⁺DCs密度明显低于低MVD胃癌, 胃癌MVD与S-100⁺DCs密度呈显著负相关($r = -0.322, P = 0.059$)。

结论: 胃癌组织的S-100⁺DCs浸润程度与胃癌侵袭和淋巴转移密切相关; 胃癌DCs浸润程度与肿瘤血管生成的活力密切相关, 胃癌细胞释放的VEGF等促血管生成因子可能是肿瘤源性免疫逃逸的重要分子机制之一。

关键词: 胃癌; 树突状细胞; 血管内皮生长因子; 微血管密度; 免疫组织化学

周业江, 梁建群, 慕晓龙, 熊玉霞, 易国平, 李显蓉, 魏仁智. 胃癌树突状细胞浸润的临床意义及与肿瘤血管生成的相关性. *世界华人消化杂志* 2007;15(17):1914-1920
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1914.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是目前发现的

功能最强、广泛分布于皮肤、消化道、呼吸道黏膜等机体防御第一线的专职抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)。DCs是肿瘤组织中主要的、也是最有效的抗原提呈细胞, 近年来已逐渐认识到DCs在机体抗肿瘤免疫中处于中心地位, 主要通过提呈肿瘤抗原介导特异性T细胞免疫应答而对肿瘤细胞产生抑制作用, 具有免疫监视的功能^[1-2]。目前, 有关DCs浸润与胃癌生物学行为, 以及与胃癌血管生成的相互关系仍不清楚。我们旨在探讨组织DCs浸润与胃癌侵袭及淋巴转移程度的相互关系, 以及与VEGF表达和MVD的关系, 初步探讨胃癌DCs局部浸润的生物学意义及其影响因素。

1 材料和方法

1.1 材料 35例胃癌和其中23例淋巴转移组织标本均来自1996-2000年在我院普外科手术治疗的患者。35例胃癌中, 男28例、女7例; 年龄31-66(平均45)岁; 早期胃癌4例(均为原位癌)、进展期胃癌31例; 肿瘤浸及浆膜者16例, 伴有淋巴转移者23例, 参照国际抗癌联盟(UICC)的TNM分期标准, I期10例、II期18例、III期15例、IV期2例。所有胃癌患者均接受了根治性或姑息手术切除, 但术前均未接受化疗、放疗及生物治疗。鼠抗CD34、S-100蛋白mAb、兔抗VEGF多克隆抗体, Ultrasensitive S-P Kit及DAB Kit均购自福州迈新生物技术开发公司的即用型产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 经40 g/L甲醛固定、石蜡包埋的胃炎、胃癌及淋巴转移癌组织标本, 5 μ m连续切片; 应用免疫组化染色SP法, 操作按试剂说明进行, 高温高压修复抗原, 用PBS替代一抗作阴性对照, 阳性对照为迈新公司提供的阳性切片。

1.2.2 结果判断 (1)S-100⁺DCs密度: S-100⁺DCs细胞在胃原发癌的计数局限于肿瘤及邻近的黏膜和癌周组织, 计数方法: 先在100倍光镜下确定10个密度最高的区域, 然后分别在400倍光镜下计数, 其平均值分别作为S-100⁺DCs密度; 在淋巴转移癌组织的计数同原发肿瘤, 也以平均值分别作为S-100⁺DCs密度; (2)VEGF的表达水平: VEGF在胃癌组织的表达水平均采用染色强度评分+阳性细胞面积评分的积分表示。染色强度分0-3级: 0 = 完全阴性, 与背景一致; 1 = 弱阳性染色信号(±), 淡黄色略高于背景; 2 = 阳性染

■创新盘点

本研究发现树突状细胞在胃癌的浸润水平与肿瘤侵袭和转移能力呈明显负相关; 且对认识其抗肿瘤作用的途径开辟了新视野: (1)树突状细胞除诱导抗肿瘤免疫应答外, 其直接诱导肿瘤细胞凋亡还可能是抑制胃癌侵袭转移的重要方式; (2)树突状细胞可能通过抗肿瘤血管生成的作用间接抑制胃癌的侵袭和转移潜力。

应用要点

树突状细胞抗肿瘤
的机制尚需进
一步认识,本研
究为此进行了初
步探索,对进一
步研究和临床应
用奠定了基础。

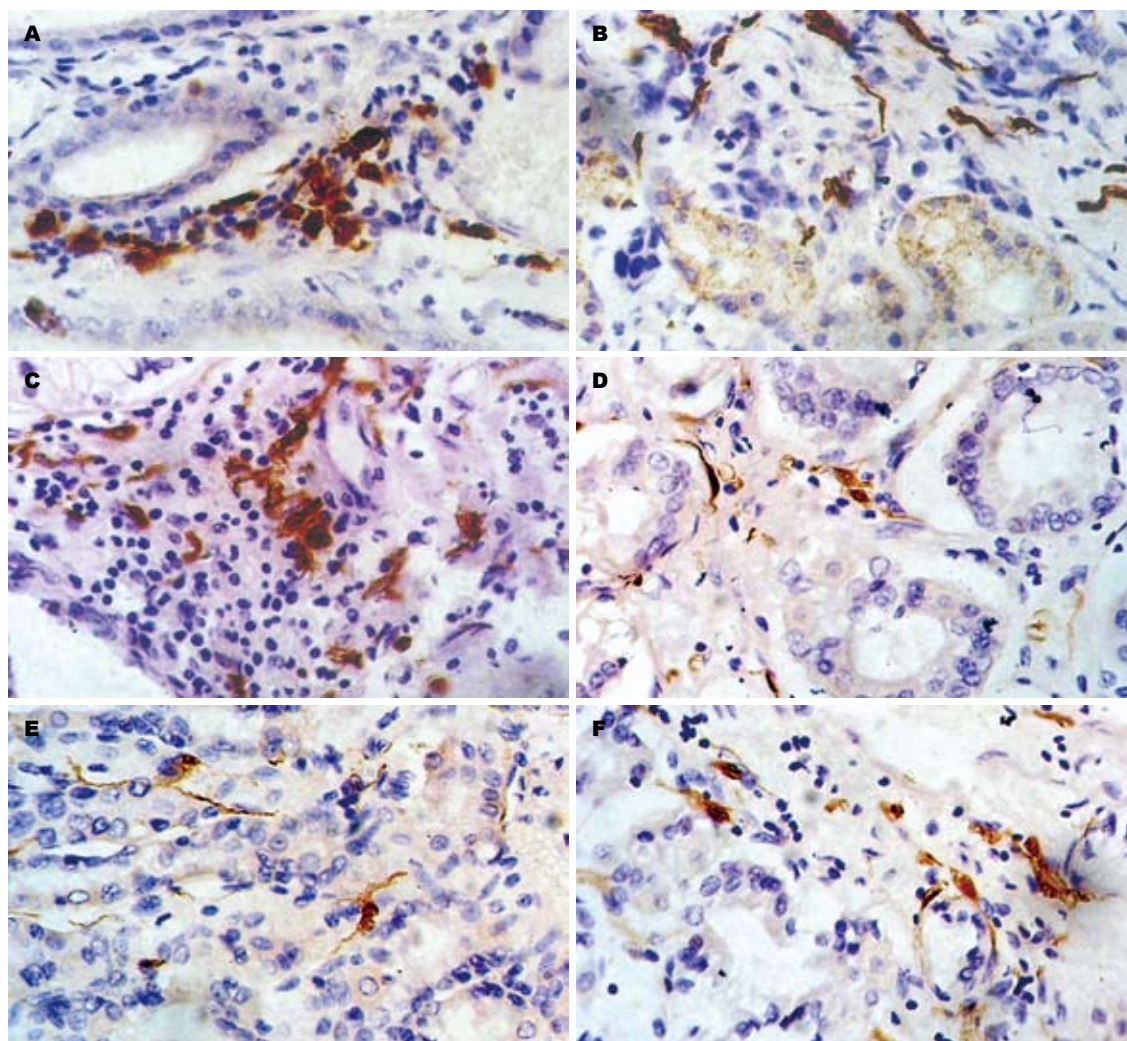


图1 S-100⁺DCs在胃癌组织及邻近的黏膜、淋巴组织的浸润(IHC, SP×400). A: 癌组织邻近黏膜腺体间S-100⁺DCs集聚成团; B: 癌周黏膜下S-100⁺DCs带状浸润; C: 癌周淋巴组织S-100⁺DCs密集浸润; D: 胃高分化腺癌细胞间S-100⁺DCs散在浸润; E: 胃低分化腺癌S-100⁺DCs低密度散在浸润; F: 胃低分化腺癌S-100⁺DCs高密度浸润。

色(+)黄色,明显高于背景;3=强阳性染色信号(++)呈棕褐色。阳性细胞面积也分4级:0=阳性细胞面积<10%,1=阳性细胞面积为10%-25%,2=阳性细胞面积为25%-50%,3=阳性细胞面积≥50%。两者表达定性以积分0-2为阴性,积分≥3为阳性表达;(3)MVD计数标准与方法:微血管计数标准参照Weidner *et al*^[3]介绍的方法,即:对任何相互独立的、直径8个红细胞直径的微血管、单个内皮细胞或细胞簇均视为一个微血管计数。MVD的确定参照我们先前报道的方法^[4],即:先在低倍镜(×100)下扫视整个切片,寻找出4个高血管密度区(热区),再在高倍镜(×200)下计数,其平均值作为MVD;(4)淋巴结内胃癌转移程度的确定:以转移癌组织占据淋巴结的面积为依据分为4级:I=转移癌面积<10%;II=转移癌面积10%-25%;III=转移癌面积

25%-50%;IV=转移癌面积≥50%。

统计学处理 计量资料以mean±SD表示,根据适用条件,组间差异比较采用One-way ANOVA或非参数检验及Pearson相关性分析;应用统计软件SPSS13.0处理,以 $P<0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 S-100⁺DCs在胃原发癌和淋巴转移癌浸润分布的特点 S-100⁺DCs在癌组织邻近的黏膜腺体间浸润较少,偶可见密集浸润,在黏膜下则呈带状浸润,形成“防御带”;在癌周围淋巴组织可见高密度的S-100⁺DCs聚集;在胃原发癌组织, S-100⁺DCs散在分布于肿瘤细胞间,在某些区域集聚成团(图1)。在淋巴转移癌组织, S-100⁺DCs主要聚集在转移癌细胞周围的淋巴组织,癌细

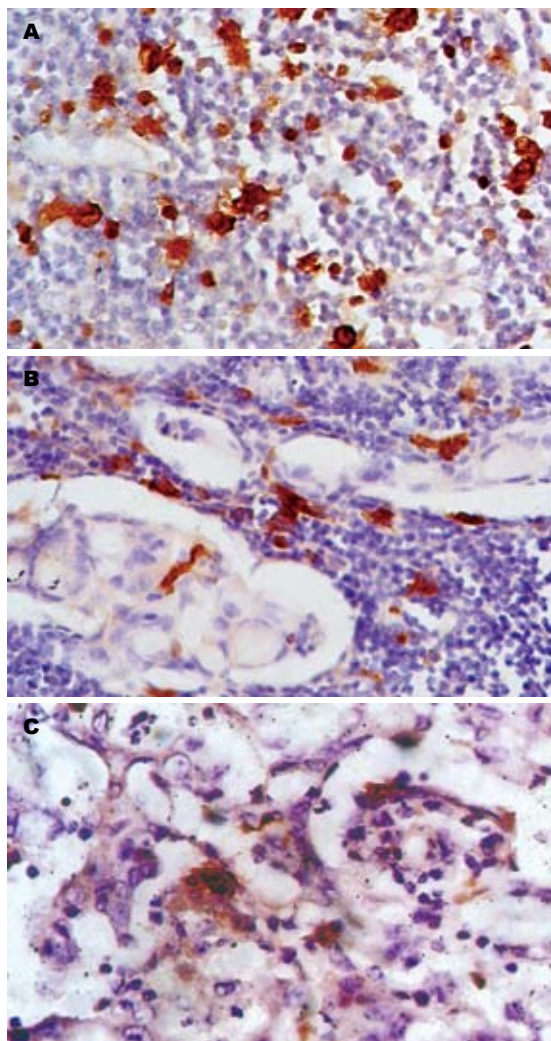


图 2 胃癌转移淋巴结内S-100⁺DCs的的浸润(IHC, SP × 400). A: 胃癌 I 级转移的淋巴结内大量S-100⁺DCs密集浸润; B: 胃癌 II 级转移的淋巴结内S-100⁺DCs已明显减少, 主要位于转移癌灶周围的淋巴组织中; C: 淋巴结完全被胃癌转移灶占据, 其间仅见散在稀少的S-100⁺DCs浸润.

胞间浸润的S-100⁺DCs稀少(图2).

2.2 S-100⁺DCs密度与胃癌侵袭、淋巴转移的相互关系 S-100⁺DC密度随胃癌浸润深度增加而下降, 浆膜浸润者S-100⁺DC浸润密度显著下降($P = 0.04$), S-100⁺DC密度在 ≤ 35 岁组、男性组、分化较好组、淋巴结转移组、临床晚期组的胃癌较低, 但均无统计学差异; 相关分析发现S-100⁺DC密度与胃癌浸润深度($r = -0.34$, $P = 0.023$)及TNM分期($r = -0.306$, $P = 0.037$)均呈明显负相关(表1). 本组中S-100⁺DCs密度值为0-28.5/HP400, 中位值为6.2/HP400, 以此为标准分为高S-100⁺DCs胃癌组(17例)及低S-100⁺DCs胃癌组(18例), 两组胃癌的淋巴转移率分别为55.56%(10/17)和76.47%(13/18), 两者的差异明显, 接近统计学意义(76.47% vs 55.56%, $P =$

表 1 S-100⁺DCs密度与胃癌临床病理因子的关系

临床病理指标	<i>n</i>	S-100 ⁺ DCs密度(个/HP400)	<i>P</i>
年龄			
≤35	11	6.90 ± 7.80	0.76
>35	24	7.60 ± 5.20	
性别			
男	28	6.78 ± 4.82	0.13
女	7	10.70 ± 9.12	
癌分化			
I + II	9	5.12 ± 2.69	0.20
III	26	8.14 ± 6.71	
浸润深度			
T1	4	11.84 ± 1.19	0.12
>T1	31	6.79 ± 5.10	
<T3	19	9.27 ± 7.24	0.04
≥T3	16	5.10 ± 3.17	
淋巴结			
N0	12	8.51 ± 7.93	0.43
N ₁ +N ₂	23	6.76 ± 4.91	
TNM分期			
I + II	19	8.90 ± 7.55	0.10
III + IV	16	5.54 ± 2.85	

表 2 胃癌转移淋巴结内S-100⁺DCs密度与胃癌转移程度的关系

淋巴结内胃癌转移程度分级	<i>n</i>	S-100 ⁺ DCs密度(个/HP400)
I	6	64.17 ± 11.51
II	7	34.43 ± 7.39
III	6	24.67 ± 7.23
IV	4	8.75 ± 2.50

任何组间两两比较, $P = 0.036$ ($F = 3.96$).

0.096). 在23例胃癌转移的淋巴结中, S-100⁺DC浸润密度与淋巴结内胃癌转移程度亦有明显关系: 随淋巴结内S-100⁺DC浸润密度下降, 淋巴结内胃癌转移程度明显增强, 各组间有显著性差异. 相关分析发现淋巴结内胃癌转移程度与结内S-100⁺DC浸润密度呈显著负相关($r = -0.923$, $P < 0.01$, 表2).

2.3 胃癌组织VEGF、MVD与间质浸润的S-100⁺DCs的关系 VEGF表达主要位于胃癌细胞, CD34位于肿瘤血管内皮细胞, 显示肿瘤新生血管(图3). 本组胃癌VEGF阳性表达者19例, VEGF阴性16例, VEGF阳性胃癌S-100⁺DCs密度明显低于VEGF阴性胃癌的S-100⁺DCs密度, 差异无统计学意义(5.89 ± 2.20 vs $9.11 \pm$

■同行评价

本文探讨了树突状细胞浸润对胃癌生物学行为的影响以及肿瘤血管生成的相关性, 对于揭示肿瘤免疫逃逸的分子机制有很重要的意义.

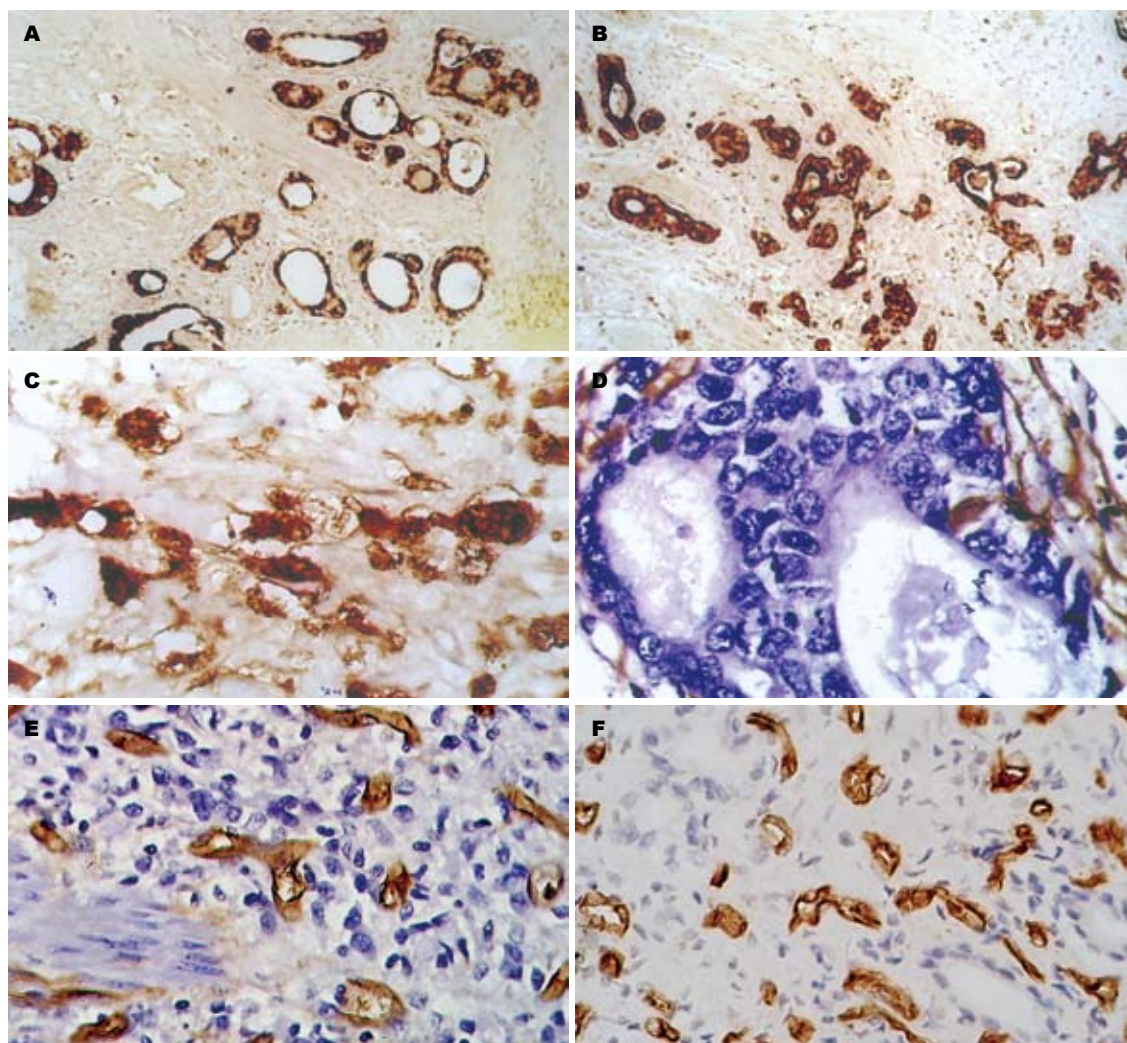


图3 胃癌组织VEGF表达和CD34标记的肿瘤新生血管(IHC). A-B: 侵袭肌层的胃黏液腺癌、中分化腺癌VEGF阳性表达(SP × 200); C: 侵袭浆膜的胃低分化腺癌VEGF强阳性表达(SP × 400); D-E: 胃高分化和低分化腺癌细胞与间质新生血管紧密接触, 管腔内可见癌细胞黏附(SP × 400); F: 侵袭浆膜的胃低分化腺癌MVD明显增加(SP × 400).

8.41, $P = 0.157$), Spearman等级相关性分析显示, S-100⁺DCs密度与VEGF表达呈负相关($r = -0.128$, $P = 0.464$), 但无统计学意义. 本组胃癌组织MVD为17.5-98条/HP200, 中位值为45条/HP200, 以此为标准, 分为高MVD胃癌组(18例)和低MVD胃癌组(17例), 前者的S-100⁺DCs密度明显低于后者, 但差异无统计学意义(6.21 ± 6.06 vs 8.59 ± 5.98 , $P = 0.251$); S-100⁺DCs低密度胃癌(18例)的MVD显著高于S-100⁺DCs高密度胃癌(17例)的MVD, 两者的差异具有统计学意义(39.82 ± 14.97 vs 56.26 ± 21.12 , $P = 0.013$); Spearman相关分析显示, S-100⁺DCs密度与胃癌MVD呈显著负相关($r = -0.322$, $P = 0.059$).

3 讨论

本研究显示, 胃癌侵袭深度和TNM分期与

S-100⁺DCs浸润程度有较密切的关系, 在早期胃癌-进展期胃癌的进展过程中, S-100⁺DCs密度均呈下降趋势, 特别是当浆膜浸润时下降最为明显; 相关分析揭示S-100⁺DCs密度与浸润深度和TNM分期均呈显著负相关, 提示S-100⁺DCs浸润程度对胃原发癌的侵袭性生长的能力有一定影响.

黄海力 *et al*^[5]的研究表明, 胃癌淋巴转移与S-100⁺DCs浸润程度下降显著相关, 本研究亦显示, 有淋巴转移的胃癌S-100⁺DCs浸润水平下降, 但无统计学意义, 这可能与我们的样本量较少有关. 为进一步探讨S-100⁺DCs在胃癌淋巴转移中的作用, 我们观察了转移淋巴结中S-100⁺DCs浸润密度与淋巴结内胃癌转移程度的关系, 结果显示, 淋巴结内胃癌转移程度与S-100⁺DCs浸润水平密切相关, 两者呈显著负相

关. 上述结果从临床和组织学表明, S-100⁺DCs在抑制原发和淋巴转移性胃癌的侵袭和扩散方面有着重要作用, 其作用机制可能与其直接或间接诱导胃癌细胞凋亡和抑制胃癌细胞的增殖活性有关^[5-6], 其作用途径有以下几方面: (1) 发挥抗原递呈功能, 激活细胞毒性T淋巴细胞(CTL)及自然杀伤细胞(NK), 通过穿孔素/颗粒酶及Fas/Fas-L途径诱导胃癌细胞凋亡; (2) 释放一氧化氮(NO)和/或直接表达肿瘤坏死因子(TNF)家族细胞因子, 如: TNF、Fas-L、TNF凋亡相关配体(TRAIL), 直接引起肿瘤细胞坏死或凋亡^[7]. 我们研究发现, 不管是原发癌还是淋巴转移癌, S-100⁺DCs在癌组织间的分布稀少, 而在癌周组织分布较多, 集簇成团, 呈“防御带”样分布的现象, 提示DCs对肿瘤抗原递呈的水平低下, 有利于肿瘤的免疫逃逸. 据此, 我们有理由推测, S-100⁺DCs在抑制胃癌侵袭和转移的作用中, 通过抗原递呈、激发免疫杀伤的途径可能并不是主要的, 而更主要的或许是通过其直接的抗癌机制发挥作用.

影响DCs在肿瘤组织中浸润密度的因素仍不明确, 成为肿瘤局部免疫研究的热点. 近年来的一些基础研究发现, VEGF是肿瘤细胞分泌的一种多功能的细胞因子, 他不但具有强大的诱导肿瘤新生血管的作用, 还可通过与CD34⁺的DCs前体细胞表达的VEGF受体的相互作用, 影响DCs的成熟^[8], 以及抑制人体已成熟DCs的功能^[9], 成为肿瘤源性免疫抑制/免疫逃逸的重要机制之一. 目前, 有关人体肿瘤组织中VEGF表达对DCs浸润影响的研究仍较少, Saito *et al*^[10]在日本人胃癌的研究中发现, 胃癌组织中S-100⁺DCs的浸润密度与VEGF表达水平呈显著负相关. 近年来, 国内的研究者在原发性肝癌^[11], 食管癌^[12], 非小细胞性肺癌^[13]等肿瘤组织的研究中也有类似报道. 本研究结果表明, 胃癌S-100⁺DCs浸润密度与肿瘤细胞VEGF的表达状态亦有一定关系: VEGF阴性者S-100⁺DCs密度明显高于VEGF阳性者, 且两者呈负相关, 但无统计学意义, 其原因可能与观察的样本含量偏小有关, 但其趋势与Saito *et al*的研究结果有一致性, 进一步证实VEGF高表达可影响S-100⁺DCs在胃癌组织中的浸润, 使局部免疫力下降. 近年研究发现, 除VEGF外, 还有其他促/抑血管因子对肿瘤组织中DCs的分化和功能产生影响^[14], 如最近有文献报告胃

癌S-100⁺DCs浸润水平与COX-2表达水平亦有密切关系^[15]; 因此, 肿瘤组织局部免疫状态是肿瘤细胞产生的多种细胞因子作用的结果, 对其深入探讨有助于揭示肿瘤免疫逃逸的分子机制.

肿瘤血管生成是肿瘤微环境产生的多种促/抑血管因子共同作用的结果, 在肿瘤生长、侵袭和转移等临床生物学行为中起着不可或缺的作用, 抑制肿瘤血管生成已成为有效的抗肿瘤策略之一. 肿瘤血管形成与DCs浸润之间关系的研究目前尚不多见, 本研究结果显示, 胃癌S-100⁺DCs低浸润组的MVD显著高于S-100⁺DCs高浸润组; 与之相似, 高MVD胃癌组的S-100⁺DCs浸润明显低于低MVD胃癌组; 相关性分析显示胃癌S-100⁺DCs浸润水平与MVD呈显著负相关, 提示胃癌新生血管生成活性与S-100⁺DCs浸润程度的关系较之与VEGF表达更为密切, S-100⁺DCs浸润对胃癌新生血管生成活性可能具有一定的抑制作用. Yoneyama *et al*^[16]最近的研究发现, 应用同种或异基因的内皮细胞裂解物脉冲DCs, 能显著抑制结肠癌小鼠移植瘤的生长和肺部转移的发生, 免疫组化发现移植瘤微血管密度明显下降; 体外研究进一步发现内皮细胞裂解物刺激的DCs能有效地活化细胞毒T淋巴细胞和NK细胞, 这些免疫效应细胞对肿瘤细胞无细胞毒作用, 而对激活的血管内皮细胞具有细胞毒作用, 同时在血清中可检测到抗血管内皮细胞的抗体, 而检测不到抗肿瘤细胞的抗体. 这些结果可较好地解释我们在人体胃癌组织中观察到的现象, 提示树突状细胞尚可可通过递呈内皮细胞抗原诱导抗肿瘤血管生成的途径发挥抗肿瘤作用.

4 参考文献

- 1 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- 2 Gunzer M, Janich S, Varga G, Grabbe S. Dendritic cells and tumor immunity. *Semin Immunol* 2001; 13: 291-302
- 3 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887
- 4 周业江, 熊玉霞, 范伟, 伍晓汀, 时德, 周彤, 黄雄, 李月春. 抑癌基因PTEN/MMAC1/TEP1编码蛋白和血管内皮生长因子在胃癌组织表达的相关性及其意义. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 954-956
- 5 黄海力, 吴本俨, 尤纬绵, 申明识, 王文菊. 树突状细胞浸润对进展期胃癌生物学行为和预后的影响. *中华肿*

- 瘤杂志 2003; 25: 486-471
- 6 Chapoval AI, Tamada K, Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 2346-2351
- 7 Lu G, Janjic BM, Janjic J, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Immunol* 2002; 168: 1831-1839
- 8 Takahashi A, Kono K, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 543-550
- 9 Mimura K, Kono K, Takahashi A, Kawaguchi Y, Fujii H. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 761-770
- 10 Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 1998; 78: 1573-1577
- 11 张明威, 王欣, 张静, 徐敏, 多吉次仁. 肝细胞肝癌中血管内皮生长因子与浸润树突状细胞表达的相关性研究. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 288-289
- 12 Yang WF, Li DT, Li J, Chen XX, Wagn SZ. The effects of vascular endothelial growth factor on dendritic cells in esophageal tumor tissue. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2007; 23: 46-47, 55
- 13 Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, Izumi M, Takayama K, Yoshino I, Hara N. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3480-3486
- 14 Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 451-461
- 15 万美珍, 徐建忠, 史永娟, 陈玉芳, 汪美华, 潘耀东. 进展期胃癌组织中COX-2表达与树突状细胞浸润的相关性研究. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 1005-1007
- 16 Yoneyama S, Okaji Y, Tsuno NH, Kawai K, Yamashita H, Tsuchiya T, Yamada J, Sunami E, Osada T, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H. A study of dendritic and endothelial cell interactions in colon cancer in a cell line and small mammal model. *Eur J Surg Oncol* 2007

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

大肠癌胃泌素、生长抑素的表达及比势与细胞周期调控基因的相关性

吴佩, 茆家定, 梁林虎, 闫竞一

吴佩, 茆家定, 梁林虎, 闫竞一, 皖南医学院弋矶山医院普外科 安徽省芜湖市 241001

吴佩, 硕士研究生导师, 教授, 主任医师, 研究方向为胃肠激素与消化道肿瘤。

安徽省自然科学基金资助项目, No. 03043740

安徽省教育厅自然科学基金资助项目, No. 2006Kj115c

通讯作者: 茆家定, 241001, 安徽省芜湖市赭山西路93号, 皖南医学院弋矶山医院普外科. maojiading0205@sina.com

电话: 0553-5739343

收稿日期: 2007-03-30 接受日期: 2007-04-13

Correlations among gastrin and somatostatin expressions and the cell cycle: controlling genes in large intestine carcinomas

Pei Wu, Jia-Ding Mao, Lin-Hu Liang, Jing-Yi Yan

Pei Wu, Jia-Ding Mao, Lin-Hu Liang, Jing-Yi Yan, Department of General Surgery, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 03043704 and the Natural Science Foundation of Education Bureau of Anhui Province, No. 2006Kj115c

Correspondence to: Jia-Ding Mao, Department of General Surgery, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. maojiading0205@sina.com

Received: 2007-03-30 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To explore correlations among the expression of gastrin (GAS), somatostatin (SS), P16^{INK4a}, P21^{CIP1}, Cyclins, and Cyclin-dependent-kinases (CDKs) in large intestine carcinomas.

METHODS: Seventy-nine resected large intestine carcinomatous specimens were randomly selected. GAS, SS, p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A, Cyclin B1, CDK2, and CDK4 were detected by immunohistochemistry (Streptavidin-Peroxidase, SP).

RESULTS: Positive expression rates of Cyclin D1, CDK2, CDK4, and Cyclin A were significantly higher in cases showing high or medium expression levels of GAS than in cases with low GAS expression. The positive expression rates of

P16^{INK4a} and P21^{CIP1} were the reverse. The positive expression rate of Cyclin E was significantly lower in the high and middle SS expression groups than in the low SS expression group. The positive expression rate of P21^{CIP1} was significantly higher, and that of CDK2 was significantly lower, in the high and middle SS expression groups compared with the low SS expression group. The integral GAS/SS was positively correlated with Cyclin D1 ($r = 0.252$), Cyclin E ($r = 0.387$), Cyclin A ($r = 0.466$), CDK2 ($r = 0.519$), and CDK4 ($r = 0.434$, $P < 0.01$), but negatively correlated with P16^{INK4a} ($r = -0.385$) and P21^{CIP1} ($r = -0.454$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The regulation and control of GAS and SS in large intestine carcinoma cell growth may be directly related to the abnormal expression of p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, Cyclin D1, Cyclin A, CDK2, CDK4, and Cyclin E. The integral GAS/SS may be considered an important evaluating target for clinical determinations of the biological behavior of large intestine carcinomas.

Key Words: Carcinoma of Large intestine; Gastrin; Somatostatin; P16^{INK4a}; P21^{CIP1}; Cyclins; Cyclin-dependent-kinase

Wu P, Mao JD, Liang LH, Yan JY. Correlations among gastrin and somatostatin expressions and the cell cycle: controlling genes in large intestine carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1921-1927

摘要

目的: 探讨大肠癌组织中胃泌素(GAS)、生长抑素(SS)的表达及其比势与细胞周期调控蛋白P16^{INK4a}、P21^{CIP1}及细胞周期素(Cyclins)、细胞周期依赖性蛋白激酶(CDKs)表达的关系。

方法: 随机选择79例大肠癌患者的手术切除标本, 采用免疫组化SP法检测GAS、SS、P16^{INK4a}、P21^{CIP1}、Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、Cyclin B1、CDK2、CDK4的表达情况。

结果: Cyclin D1、CDK2、CDK4、Cyclin A

■背景资料

大肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 发病率、死亡率均较高, 而早期诊断和根治办法尚未有突破性的进展, 10 a生存率徘徊在50%左右。随着生活水平的不断提高, 饮食习惯的改变, 我国大肠癌的发病率日渐增高, 已跃居第3-5位。据预测, 我国大肠癌的发病率与死亡率在今后很长一段时期内将稳步上升, 成为我国最常见的、发病率上升的恶性肿瘤之一。然而, 大肠癌治疗效果却不尽理想, 约有半数患者治疗失败。因此, 如何更好地干预、阻断大肠癌的发生发展是当前应迫切解决的问题, 对他开展深入的研究具有深刻的临床意义和社会意义。

■相关报道

人们近年来研究发现许多组织的生长受激素调节, 这些组织发生的肿瘤依然受激素控制. 胃肠激素可调节胃肠黏膜细胞的增殖与分化, 同时也能促进或抑制部分胃肠肿瘤的生长, 如胃泌素对胃肠黏膜细胞有营养作用, 其对大肠癌细胞的增殖具有促进作用; 而生长抑素具有广泛的抑制作用, 可抑制大肠癌的生长. 因此可以推断胃泌素、生长抑素可能会直接或间接的影响到细胞周期的调控, 从而促进或抑制大肠癌细胞的增殖.

在GAS高表达组、中表达组的阳性表达率明显高于低表达组; 而P16^{INK4a}、P21^{CIP1}阳性表达率与此相反. Cyclin E在SS低表达组的阳性表达率明显高于中表达组、高表达组; P21^{CIP1}在SS高表达组、中表达组的阳性表达率明显高于低表达组; CDK2在SS低表达组的阳性表达率明显高于SS高表达组. 大肠癌组织中GAS、SS表达的积分比值(GAS/SS)与Cyclin D1($r = 0.252$)、Cyclin E($r = 0.387$)、Cyclin A($r = 0.466$)、CDK2($r = 0.519$)、CDK4($r = 0.434$)呈正相关($P < 0.01$)与P16^{INK4a}($r = -0.385$)、P21^{CIP1}($r = -0.454$)蛋白的表达积分呈负相关($P < 0.01$).

结论: GAS、SS对大肠癌细胞生长的调控可能与P16^{INK4a}、P21^{CIP1}、Cyclin D1、Cyclin A、CDK2、CDK4、Cyclin E基因异常表达有关. GAS对大肠癌细胞周期的调控位点可能在G1、S、G2期, SS对大肠癌细胞周期的调控位点可能在G1/S、G2/M期的交界点, 即S、M期的入口. 对大肠癌GAS/SS积分比值分析, 可作为临床大肠癌生物学行为的重要评估指标.

关键词: 大肠癌; 胃泌素; 生长抑素; P16^{INK4a}; P21^{CIP1}; 细胞周期素; 细胞周期依赖性蛋白激酶

吴佩, 茆家定, 梁林虎, 闫竞一. 大肠癌胃泌素、生长抑素的表达及比势与细胞周期调控基因的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1921-1927
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1921.asp>

0 引言

胃泌素(gastrin, GAS)、生长抑素(somatostatin, SS)分别通过其受体对胃肠道黏膜起着十分重要的生理调节作用, GAS、SS蛋白表达的异常与肿瘤发生有关^[1-5]. 近来研究已发现大肠癌的发生与胃肠激素的异常表达有密切的关系. 如生长激素能够诱导大肠癌细胞的凋亡而促进大肠癌的生长, 胃泌素的作用与其相反^[6-12]. 然而胃肠激素的大肠癌生长的调节的具体分子机制仍不清楚. 我们采用免疫组化SP法检测79例大肠癌(结肠癌、直肠癌)组织中GAS、SS、P16^{INK4a}、P21^{CIP1}、Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、Cyclin B1、CDK2、CDK4的表达情况, 探讨大肠癌组织中GAS、SS的表达及其比势与细胞周期调控蛋白P16^{INK4a}、P21^{CIP1}及Cyclins、CDKs表达的相关性, 了解胃肠激素对大肠癌细胞增殖的具体调控位点.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001-08/2005-10我院大肠癌手术

切除新鲜标本共79例, 均经病理确诊. 其中直肠癌39例, 结肠癌40例, 女33例, 男46例, 年龄20-78(平均50.9±13.2)岁. 大体类型为溃疡型46例, 隆起型30例, 浸润型3例. 组织学类型按全国大肠癌协作组标准: 高分化癌(乳头状腺癌、管状腺癌 I)18例, 中分化癌(管状腺癌 II、黏液腺癌)41例, 低分化癌(管状腺癌 III、印戒细胞癌)13例, 未分化癌7例; Dukes分期: A期10例, B期28例, C期31例, D期10例. 组织学类型: 乳头状腺癌7例, 管状腺癌40例, 黏液腺癌14例, 印戒细胞癌11例和未分化癌7例; Dukes分期: A、B期38例, C、D期41例.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化(SP法) 生物试剂均由北京中山生物技术有限公司提供, 具体步骤按试剂盒说明书操作. 检测79例大肠癌(结肠癌、直肠癌)组织中GAS、SS、P16^{INK4a}、P21^{CIP1}、Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、Cyclin B1、CDK2、CDK4的表达情况. 以正常胃窦黏膜作GAS阳性对照, 以正常的胰腺组织作SS阳性对照, 以胰腺组织作P16^{INK4a}的阳性对照, 以乳腺癌组织作P21^{CIP1}阳性对照, 以正常扁桃体组织作Cyclin A、Cyclin B1阳性对照, 以乳腺癌组织作Cyclin D1、Cyclin E阳性对照, 以反应性淋巴结作CDK2阳性对照, 以正常皮肤组织作CDK4阳性对照, 用PBS替代一抗作阴性对照.

1.2.2 结果判断标准 GAS、SS表达积分的计算先根据切片中的细胞质染色深浅, 细胞质无染色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 再按切片中阳性细胞数占整个肿瘤细胞的百分数比例(取10个高倍视野, 每个高倍视野计数100个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 计算其平均数)<5%为1分, 5%-10%为2分, 11%-20%为3分, >20%为4分. GAS、SS半定量积分按其二项积分的乘积数来表示, 其1-3分为低表达组, 4-8分为中表达组, >8分为高表达组. 表达积分的计算参照Fromowitz方法对组织中棕黄色反应产物根据其染色强度, 阳性细胞数的百分比作半定量处理. 无着色计0分, 浅黄色计1分, 棕黄色计2分, 棕褐色计3分. 阳性细胞数占整个肿瘤细胞的百分数比例(取10个高倍视野, 每个高倍视野计数100个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 计算其平均数), 0%-5%计0分, 6%-25%计1分, 26%-50%计2分, 51%-75%计3分, >75%计4分. 以上两项相加, ≤2分为阴性(-), 3分为阳性(+), 4分为中度阳性(++), ≥5分为强阳性(+++).

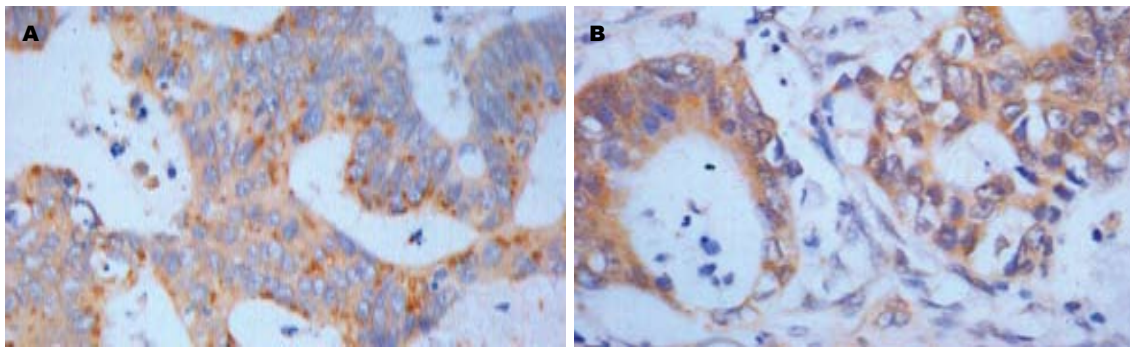


图1 GAS、SS在大肠癌中分化腺癌中的阳性表达, 棕褐色颗粒在胞质(SP染色×400). A: GAS; B: SS.

同行评价

本文层次分明, 数据可信, 图片清晰, 对基础研究与临床研究都有重要的参考价值与指导意义.

表1 大肠癌GAS、SS各表达组之间Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、Cyclin B1、CDK2、CDK4、P16^{INK4a}、P21^{CIP1}的阳性表达率比较

分组	n	Cyclin D1		Cyclin E		Cyclin A		Cyclin B1		CDK2		CDK4		P16 ^{INK4}		P21 ^{CIP1}	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
GAS																	
High	14	3	11 ^a	6	8	0	14 ^b	1	13	1	13 ^b	3	11 ^a	10	4 ^a	9	5 ^a
Middle	23	6	17 ^a	12	11	4	19 ^a	6	17	3	20 ^b	5	18 ^b	15	8 ^a	13	10 ^a
Low	42	23	19	31	11	19	23	14	28	21	21	24	18	16	27	13	29
SS																	
High	11	6	5	10	1 ^c	3	8	2	9	8	3	7	4 ^d	4	7	2	9 ^c
Middle	23	9	14	18	5 ^c	7	16	6	17	7	16	9	14	12	11	6	17 ^c
Low	45	17	28	21	24	13	32	13	32	10	35	16	29	24	21	25	20

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 本组低表达组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 本组低表达组.

统计学处理 采用 χ^2 检验和Spearman等级相关经验. $P<0.05$ 为差异有显著性. 所有数据均使用专业统计软件包SPSS11.0进行统计分析处理.

2 结果

GAS、SS主要定位于细胞质, 部分定位于细胞膜上(图1). P16^{INK4a}、P21^{CIP1}、Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、Cyclin B1、CDK2、CDK4中Cyclin B1主要定位于细胞质, P16^{INK4a}、P21^{CIP1}、Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、CDK2、CDK4主要定位于细胞核(图2), 核内可见黄色颗粒者为阳性, 单纯细胞质着色或细胞核细胞质均无着色为阴性.

2.1 大肠癌GAS各组相关指标的表达 P16^{INK4a}、P21^{CIP1}在GAS高表达组(28.6%, 35.7%)、中表达组(34.8%, 43.5%)的阳性表达率明显低于低表达组(62.8%, 69.0%), 之间差异有显著性($\chi^2_{P16高与低} = 4.985$, $\chi^2_{P16中与低} = 4.719$, $\chi^2_{P21高与低} = 4.891$, $\chi^2_{P21中与低} = 4.048$, 均 $P<0.05$); Cyclin D1在GAS高表达组(78.6%)、中表达组(73.9%)的阳性表达率明显高于低表达组(45.2%), 之间差异有显著性(χ^2

高与低 = 4.691, $\chi^2_{中与低} = 4.945$, 均 $P<0.05$); Cyclin A在GAS高表达组(100.0%)、中表达组(82.6%)的阳性表达率明显高于低表达组(54.8%)($\chi^2_{高与低} = 9.586$, $P<0.01$; $\chi^2_{中与低} = 5.040$, $P<0.05$); CDK2在GAS高表达组(92.9%)、中表达组(87.0%)的阳性表达率明显高于低表达组(50.0%), 之间差异有显著性($\chi^2_{高与低} = 8.086$, $\chi^2_{中与低} = 8.715$, 均 $P<0.01$); CDK4在GAS高表达组(78.6%)、中表达组(78.3%)的阳性表达率明显高于低表达组(42.9%)($\chi^2_{高与低} = 5.364$, $P<0.05$, $\chi^2_{中与低} = 7.539$, $P<0.01$). Cyclin E、Cyclin B1在GAS高表达组(57.1%、47.8%)、中表达组的阳性表达率(92.9%、73.9%)均高于低表达组(26.2%、66.9%), 但三组间相比较差异无显著性($\chi^2 = 5.608$, $\chi^2 = 4.417$, $P>0.05$, 表1).

2.2 大肠癌SS各组相关指标的表达 P21^{CIP1}在SS高表达组(81.8%)、中表达组(73.9%)的阳性表达率明显高于低表达组(44.4%), 之间差异有显著性($\chi^2_{高与低} = 4.945$, $\chi^2_{中与低} = 5.328$, 均 $P<0.05$); Cyclin E在SS低表达组的阳性表达率(53.3%)明显高于中表达组(21.7%)、高表达组(9.1%), 之

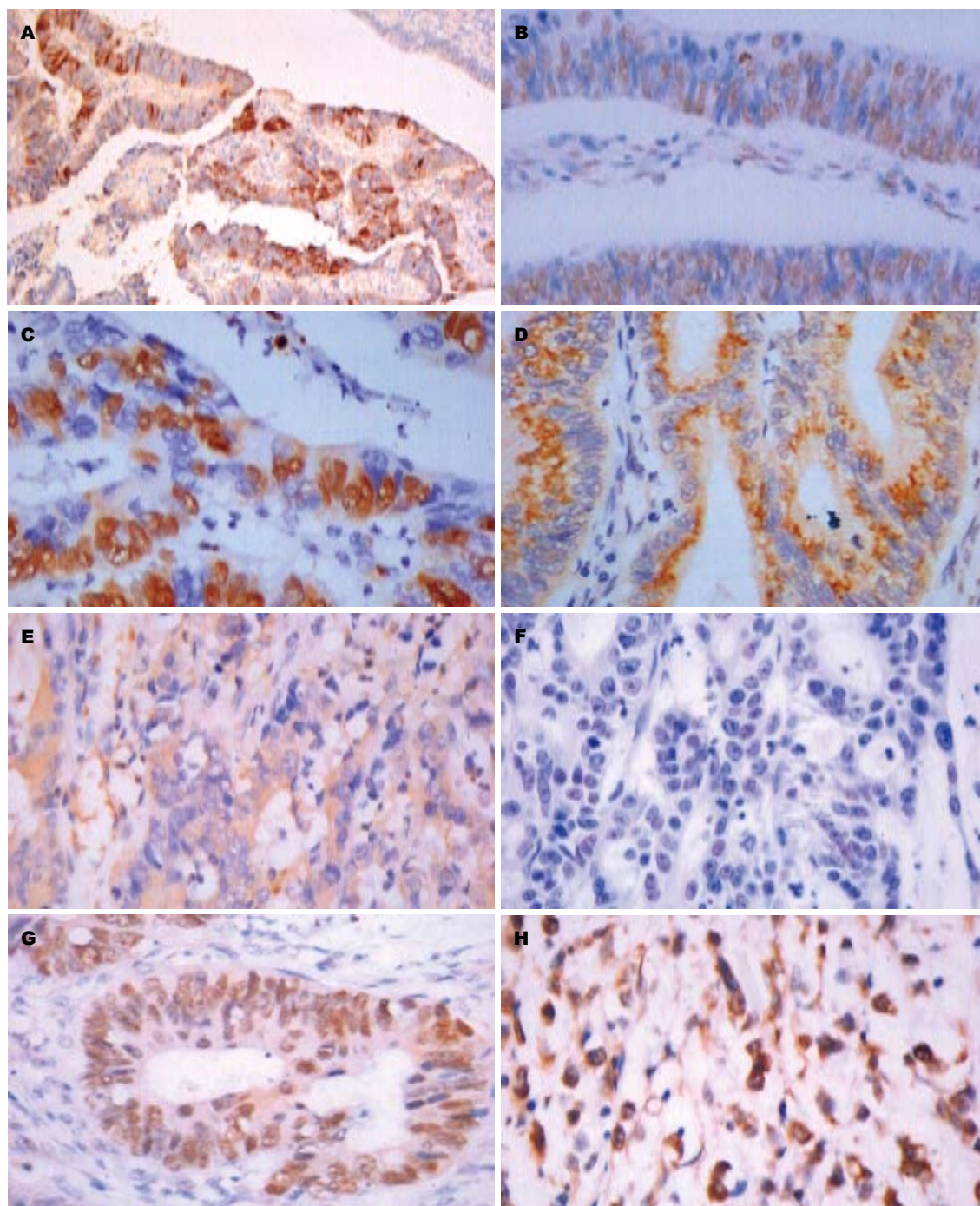


图 2 P16、P21、Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E、CDK2、CDK4在大肠癌中的阳性表达, 棕褐色颗粒在细胞核(S-P染色 $\times 400$)。A: P16; B: P21; C: Cyclin A; D: Cyclin B1; E: Cyclin D1; F: Cyclin E; G: CDK2; H: CDK4。

间差异有显著性($\chi^2_{\text{中与低}} = 6.212$, $\chi^2_{\text{高与低}} = 5.325$, 均 $P < 0.05$); CDK2在SS低表达组的阳性表达率(77.8%)明显高于SS高表达组(27.3%), 差异有显著($\chi^2 = 8.151$, $P < 0.01$)。P16^{INK4a}在SS高表达组(63.6%)、中表达组(47.8%)的阳性表达率明显高于低表达组(46.7%), 但3组间相比较差异无显著性($\chi^2 = 1.049$, $P > 0.05$); Cyclin D1、CDK4在SS低表达组的阳性表达率(62.2%、64.4%)高于SS高表达组(45.5%、36.4%), 但3组间相比较

差异无显著性($\chi^2 = 1.038$, $\chi^2 = 2.868$, 均 $P > 0.05$); Cyclin A、Cyclin B1在SS高表达组(72.7%、81.8%)、中表达组(69.6%、73.9%)、低表达组(71.7%、71.1%)阳性率比较差异无显著性($\chi^2 = 0.039$, $\chi^2 = 0.554$, 均 $P > 0.05$, 表1)。

2.3 大肠癌GAS/SS和相关指标变化的相关性
GAS/SS变化与Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、CDK2、CDK4半定量积分呈明显正相关($r_s^{\text{D1}} = 0.252$, $P < 0.05$; $r_s^{\text{E}} = 0.387$, $r_s^{\text{A}} = 0.466$, $r_s^{\text{K2}} = 0.519$,

$K^4r_s = 0.434$, 均 $P < 0.01$), 与P16^{INK4a}、P21^{CIP1}蛋白的表达积分呈负相关($P16r_s = -0.385$, $P21r_s = -0.454$, 均 $P < 0.01$); 而Cyclin B1与的积分变化无明显相关($B1r_s = -0.108$, $P > 0.05$).

3 讨论

大肠癌的发生涉及到多个因素、多个步骤、多个阶段、多个基因突变的复杂的病理过程, 最后汇集到一个共同的环节-细胞周期机制的破坏, 故众多学者把肿瘤称为细胞周期性疾病^[13-16]. 细胞周期分为G1、S、G2、M期4个连续阶段, 细胞周期的运行与否, 能否按序完成细胞周期, 受控于精密的细胞周期调控机制^[17-20]. 其分子调控机制涉及细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)以及细胞周期蛋白激酶抑制物(cyclin kinase inhibitor, CKI)3种分子的相互作用, 其中CKI分为锚蛋白家族(INK4)和双重特异性家族(CIP/KIP)两类, P16^{INK4a}、P21^{CIP1}分别为INK4和CIP/KIP家族的代表, 在细胞周期的调控中起负调节作用^[21-26]. CDK的时相性激活是细胞周期调控机制的核心, 他主要依赖于cyclin的细胞周期特异性或时相性表达、积累与分解^[27]. 人类细胞主要CDK有CDK1(CDC2)、CDK2、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7(CAK)^[28]. 细胞周期素有Cyclin B1、Cyclin A、Cyclin E、Cyclin D1、D2、D3. 而CDK与cyclin的特异性结合是细胞周期事件启动和进行的必要条件^[29-32].

近年来, GAS、SS对细胞周期调控的研究有了一定的进展. 我们前期研究发现, 大肠癌组织GAS、SS的表达积分与其细胞增殖密切相关, GAS表达水平越高, 其细胞增殖活性愈高, 而SS的作用与其相反, 对细胞增殖有抑制作用^[33]. Shen *et al*发现, GAS能促进大肠癌细胞的DNA及蛋白的合成, 而GAS的拮抗剂丙谷胺能抑制胃泌素的这一功能, 抑制大肠癌细胞从G0/G1期过渡到S期和G2, M期. Torrisani *et al*^[34]认为胃泌素受体过表达促进肿瘤细胞增殖与P16^{INK4a}基因突变导致对细胞周期负调节功能丧失有关. Celinski *et al*^[35]研究发现, SS可能通过上调P16^{INK4a}蛋白以诱导细胞周期阻滞, 抑制细胞由G1期进入S期, 从而发挥抑制肿瘤细胞生长的作用. Song *et al*^[36]发现, G-17能诱导胃癌细胞Cyclin D1的过表达, 加快细胞从G1进入S期, 从而导致细胞失控性生长. Charland *et al*^[37]发现, 在胰腺细胞中生长抑素能通过上调P21^{CIP1}蛋白

强烈的抑制Cyclin E的表达和CDK2的活性, 同时对Prb的磷酸化有抑制作用, 此将抑制细胞从G1期到S期的转化, 从而抑制细胞增殖. Zhao *et al*^[38]发现, 生长抑素的类似物奥曲肽可抑制胆管癌的增殖, 他主要通过肿瘤细胞周期中G0/G1期的抑制, 而不是通过促进肿瘤细胞的凋亡来实现的, 这一细胞周期抑制效应是部分地通过上调p27^{kpl}(CKIs机制)的表达, 下调Cyclin E-CDK2复合物的表达来实现的. 由此可见GAS、SS对消化道肿瘤细胞周期的调控位点可能与肿瘤细胞的组织来源有关. 我们的实验结果显示, GAS表达的水平越高, Cyclin D1、Cyclin A、CDK2、CDK4的阳性表达率越高, 而P16^{INK4a}、P21^{CIP1}越低. 此结果说明, GAS促进大肠癌细胞增殖可能是通过促进大肠癌细胞Cyclin D1、Cyclin A、CDK2、CDK4基因的过表达, 使Cyclin D1-CDK4、Cyclin A-CDK2复合物的水平增高, 进而使达到G1、S、G2期的细胞数增多, 影响细胞周期的进程, 促进细胞增殖. 此外GAS还可通过抑制大肠癌细胞P16^{INK4a}、P21^{CIP1}蛋白表达, 从而消弱了P16^{INK4a}、P21^{CIP1}基因在细胞周期G1期对CDK4的抑制作用和在G1/S、S、G2/M期对CDK2的抑制作用, 导致CDK2、CDK4过表达, 加速细胞周期G1期、S期的进程及G1/S、G2/M期转换, 促进大肠癌细胞增殖. 因此我们认为, GAS对大肠癌细胞周期的调控位点可能在G1、S、G2期. 而SS表达的水平越高, P21^{CIP1}阳性表达率越高, Cyclin E、CDK2的阳性表达率越低. 说明SS对大肠癌细胞周期的调控一方面可能是通过促进了大肠癌细胞P21^{CIP1}蛋白过表达, 从而增强了P21^{CIP1}基因在细胞周期G1/S、S、G2/M期对CDK2的抑制作用, 导致CDK2呈低表达, 使细胞周期G1/S、G2/M期转换延迟及S期阻滞, 抑制细胞增殖. 另一方面可通过抑制大肠细胞Cyclin E、CDK2基因的表达, 使Cyclin E-CDK2复合物的水平降低, 进而抑制细胞从G1期到S期的转化, 使进入S期的细胞数减少, 以诱导细胞周期阻滞, 抑制细胞增殖. 因此, SS对大肠癌细胞周期的调控位点可能在G1/S、G2/M期的交界点, 即S、M期的入口.

大肠癌组织中GAS、SS比势研究发现GAS/SS比值的变化能够反映大肠癌的部分生物学特性, 如大肠癌的发生、发展及其恶性表型、分化程度、临床分期等, 其GAS/SS积分比值的升高在肿瘤发生、发展上具有更重要的意义. 本实验结果显示: GAS/SS表达积分的比值变化与

Cyclin D1、Cyclin E、Cyclin A、CDK2、CDK4 半定量积分呈明显正相关, 与P16^{INK4a}、P21^{CIP1}呈显著负相关; 提示大肠癌组织GAS、SS的异常表达, 导致大肠癌细胞周期调控因子表达失常, 可能是胃肠激素对大肠癌生长的调控机制之一。对大肠癌GAS/SS积分比值的分析, 可作为临床大肠癌生物学行为的重要评估指标。

4 参考文献

- Gurevich L, Kazantseva I, Isakov VA, Korsakova N, Egorov A, Kubishkin V, Bulgakov G. The analysis of immunophenotype of gastrin-producing tumors of the pancreas and gastrointestinal tract. *Cancer* 2003; 98: 1967-1976
- Cho KH, Lee HS, Ku SK. Changes in gastric endocrine cells in Balb/c mice bearing CT-26 carcinoma cells: an immunohistochemical study. *Eur J Histochem* 2006; 50: 293-300
- Saga T, Tamaki N, Itoi K, Yamazaki T, Endo K, Watanabe G, Maruno H, Machinami R, Koizumi K, Ichikawa T, Takami H, Ishibashi M, Kubo A, Kusakabe K, Hirata Y, Murata Y, Miyachi Y, Tsubuku M, Sakahara H, Katada K, Tonami N, Yamamoto K, Konishi J, Imamura M, Doi R, Shimatsu A, Noguchi S, Hasegawa Y, Ishikawa O, Watanabe Y, Nakajo M. Phase III additional clinical study of 111In-pentetreotide (MP-1727): diagnosis of gastrointestinal hormone producing tumors based on the presence of somatostatin receptors. *Kaku Igaku* 2003; 40: 185-203
- Schally AV, Szepeshazi K, Nagy A, Comaru-Schally AM, Halmos G. New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1042-1068
- Tejeda M, Gaal D, Hullan L, Hegymegi-Barakonyi B, Keri G. Evaluation of the antitumor efficacy of the somatostatin structural derivative TT-232 on different tumor models. *Anticancer Res* 2006; 26: 3477-3483
- Cao J, Yu JP, Liu CH, Zhou L, Yu HG. Effects of gastrin 17 on beta-catenin/Tcf-4 pathway in Colo320WT colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7482-7487
- Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Pannequin J, Bertrand C, Fourmy D, Dufresne M, Seva C. Glycine-extended gastrin activates two independent tyrosine-kinases in upstream of p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase in human colonic tumour cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1859-1864
- Ogunwobi OO, Beales IL. Glycine-extended gastrin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cells via cyclo-oxygenase-independent pathways. *Regul Pept* 2006; 134: 1-8
- Triantafillidis JK, Merikas E, Govosdis V, Konstandellou E, Cheracakis P, Barbatzas C, Tzourmakliotis D, Peros G. Increased fasting serum levels of growth hormone and gastrin in patients with gastric and large bowel cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 Suppl 2: cclvi-cclx
- Sadji-Ouatas Z, Lasfer M, Julien S, Feldmann G, Reyl-Desmars F. Doxorubicin and octreotide induce a 40 kDa breakdown product of p53 in human hepatoma and tumoral colon cell lines. *Biochem J* 2002; 364: 881-885
- Watson SA, Morris TM, McWilliams DF, Harris J, Evans S, Smith A, Clarke PA. Potential role of endocrine gastrin in the colonic adenoma carcinoma sequence. *Br J Cancer* 2002; 87: 567-573
- Mao JD, Wu P, Xia XH, Hu JQ, Huang WB, Xu GQ. Correlation between expression of gastrin, somatostatin and cell apoptosis regulation gene bcl-2/bax in large intestine carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 721-725
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828
- Arisi E, Pruneri G, Carboni N, Sambataro G, Pignataro L. Prognostic significance of P27 and cyclin D1 co-expression in laryngeal squamous cell carcinoma: possible target for novel therapeutic strategies. *J Chemother* 2004; 16 Suppl 5: 3-6
- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41: 105-116
- Bosco EE, Knudsen ES. RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* 2007; 6: 667-671
- Tvegard T, Soltani H, Skjölberg HC, Krohn M, Nilssen EA, Kearsey SE, Grallert B, Boye E. A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes Dev* 2007; 21: 649-654
- Joshi KS, Rathos MJ, Mahajan P, Wagh V, Shenoy S, Bhatia D, Chile S, Sivakumar M, Maier A, Fiebig HH, Sharma S. P276-00, a novel cyclin-dependent inhibitor induces G1-G2 arrest, shows antitumor activity on cisplatin-resistant cells and significant in vivo efficacy in tumor models. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 926-934
- Yang SH, Chien CM, Chang LS, Lin SR. Involvement of c-jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by cardiotoxin III (Naja naja atra) in K562 leukemia cells. *Toxicon* 2007; 49: 966-974
- Huang X, Di Liberto M, Cunningham AF, Kang L, Cheng S, Ely S, Liou HC, MacLennan IC, Chen-Kiang S. Homeostatic cell-cycle control by BlyS: Induction of cell-cycle entry but not G1/S transition in opposition to p18INK4c and p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17789-17794
- Gibson SL, Dai CY, Lee HW, DePinho RA, Gee MS, Lee WM, Furth EE, Brensinger C, Enders GH. Inhibition of colon tumor progression and angiogenesis by the Ink4a/Arf locus. *Cancer Res* 2003; 63: 742-746
- Chai J, Charboneau AL, Betz BL, Weissman BE. Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates P21CIP1/WAF1 and P16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10192-10198
- Allal AS, Gervaz P, Brundler MA. Cyclin D1, cyclin E, and P21 have no apparent prognostic value in anal carcinomas treated by radiotherapy with or without chemotherapy. *Br J Cancer* 2004; 91: 1239-1244
- Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of P16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2202-2206
- Wong NA, Mayer NJ, Anderson CE, McKenzie HC,

- Morris RG, Diebold J, Mayr D, Brock IW, Royds JA, Gilmour HM, Harrison DJ. Cyclin D1 and P21 in ulcerative colitis-related inflammation and epithelial neoplasia: a study of aberrant expression and underlying mechanisms. *Hum Pathol* 2003; 34: 580-588
- 26 Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of the CIP/KIP cell-cycle control pathway in acute leukemias. *Am J Hematol* 2005; 80: 282-287
- 27 Kim KT, Han SY, Jeong JS. Expression of G1 cell cycle regulators in rat liver upon repeated exposure to thioacetamide. *Korean J Hepatol* 2007; 13: 81-90
- 28 Lolli G, Johnson LN. Recognition of Cdk2 by Cdk7. *Proteins* 2007; 67: 1048-1059
- 29 Upadhyay D, Chang W, Wei K, Gao M, Rosen GD. Fibroblast growth factor-10 prevents H2O2-induced cell cycle arrest by regulation of G1 cyclins and cyclin dependent kinases. *FEBS Lett* 2007; 581: 248-252
- 30 Ferrer JL, Dupuy J, Borel F, Jacquamet L, Noel JP, Dulic V. Structural basis for the modulation of CDK-dependent/independent activity of cyclin D1. *Cell Cycle* 2006; 5: 2760-2768
- 31 Hsiao YC, Hsieh YS, Kuo WH, Chiou HL, Yang SF, Chiang WL, Chu SC. The tumor-growth inhibitory activity of flavanone and 2'-OH flavanone in vitro and in vivo through induction of cell cycle arrest and suppression of cyclins and CDKs. *J Biomed Sci* 2007; 14: 107-119
- 32 Ely S, Di Liberto M, Niesvizky R, Baughn LB, Cho HJ, Hatada EN, Knowles DM, Lane J, Chen-Kiang S. Mutually exclusive cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 6/cyclin D2 pairing inactivates retinoblastoma protein and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma. *Cancer Res* 2005; 65: 11345-11353
- 33 吴佩, 涂久生, 芮景, 黄鹤, 黄文斌, 袁平. 大肠癌胃泌素、生长抑素表达与细胞增殖和凋亡的关系. *中华实验外科杂志* 2003; 20: 947
- 34 Torrisani J, Buscail L. Molecular pathways of pancreatic carcinogenesis. *Ann Pathol* 2002; 22: 349-355
- 35 Celinski SA, Fisher WE, Amaya F, Wu YQ, Yao Q, Youker KA, Li M. Somatostatin receptor gene transfer inhibits established pancreatic cancer xenografts. *J Surg Res* 2003; 115: 41-47
- 36 Song DH, Rana B, Wolfe JR, Crimmins G, Choi C, Albanese C, Wang TC, Pestell RG, Wolfe MM. Gastrin-induced gastric adenocarcinoma growth is mediated through cyclin D1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G217-222
- 37 Charland S, Boucher MJ, Houde M, Rivard N. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 2001; 142: 121-128
- 38 Zhao B, Zhao H, Zhao N, Zhu XG. Cholangiocarcinoma cells express somatostatin receptor subtype 2 and respond to octreotide treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 497-502

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

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

直肠癌术前磁共振水成像检查的意义

涂小煌, 黎成金, 马明, 王烈, 宋京翔

■背景资料

直肠癌准确的术前诊断并分期直接关系到治疗方案的选择和评估预后。为了提高磁共振成像在术前诊断和分期的准确率, 目前主要采用不同的对比剂、mAb技术、高分辨磁共振技术等。

涂小煌, 黎成金, 王烈, 宋京翔, 中国人民解放军南京军区福州总医院普通外科 福建省福州市 350025

马明, 中国人民解放军南京军区福州总医院放射科 福建省福州市 350025

涂小煌, 中国人民解放军第四军医大学博士生, 主任医师, 主要从事消化道肿瘤防治研究。

福建省自然科学基金资助项目, No. C0410044

通讯作者: 黎成金, 350025, 福建省福州市, 中国人民解放军南京军区福州总医院普通外科, licheng_jin@yahoo.com.cn

电话: 0591-22859415 传真: 0591-8379685

收稿日期: 2007-02-25 接受日期: 2007-03-17

Value of rectal magnetic resonance hydrography for diagnosis and staging of rectal carcinoma

Xiao-Huang Tu, Cheng-Jin Li, Ming Ma, Lie Wang, Jing-Xiang Song

Xiao-Huang Tu, Cheng-Jin Li, Lie Wang, Jing-Xiang Song, Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Ming Ma, Department of Radiology, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. C0410044

Correspondence to: Cheng-Jin Li, Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. licheng_jin@yahoo.com.cn

Received: 2007-02-25 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To explore the value of rectal magnetic resonance hydrography (MRH) in rectal carcinoma.

METHODS: Thirty-four patients with rectal carcinoma were included in the study. All underwent plain scan, three-planar enhanced scan and hydrography.

RESULTS: All foci were correctly detected by rectal MRH, which showed that there were irregular intraluminal filling defects ($n = 32$), and that "cuff" or "sawn-off" signs were seen at the distal end of the tumor ($n = 19$). Main MRH findings were: intraluminal soft tissue mass ($n = 30$), irregular thickening of the rectal wall and

partial or circumferential stenosis of the rectal lumen ($n = 26$). The accuracy of rectal MRH for T staging was 82.4% (28/34). The accuracy for T1, T2, T3, and T4 staging was 66.7% (2/3), 76.9% (10/13), 86.7% (13/15) and 100% (3/3), respectively. The sensitivity, specificity, and accuracy for lymph node metastases were 69.2% (18/26), 62.5% (5/8) and 67.6% (23/34), respectively. The accuracy for adjacent organ invasion and liver metastasis was 94.1% (32/34) and 97.1% (33/34), respectively.

CONCLUSION: The combination of MRI plain scan, three-planar enhanced scan and hydrography could accurately stage rectal carcinomas and determine the invasive depth of local lesions. This method has direct applicability for clinical treatment.

Key Words: Rectal carcinoma; Staging; Magnetic resonance hydrography

Tu XH, Li CJ, Ma M, Wang L, Song JX. Value of rectal magnetic resonance hydrography for diagnosis and staging of rectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1928-1933

摘要

目的: 探讨磁共振(MRI)水成像(MRH)对直肠癌术前诊断和分期的价值。

方法: 对临床确诊为直肠癌的患者34例进行MRI水成像检查, 检查前经直肠注入生理盐水300 mL左右, 先作盆腔常规轴位平扫, 再作磁共振直肠水成像扫描, 扫描完后再作轴位、矢状位和冠状位增强扫描。

结果: 34例直肠癌均能显示原发病灶, 三维成像病变部位肠腔内不规则充盈缺损32例, 19例病变远侧端呈“袖口征”及“截断征”。轴位30例表现为腔内软组织肿块, 26例表现为肠壁不规则增厚, 肠腔环形狭窄。MRI水成像检查对T1, T2, T3, T4期肿瘤的准确度分别为66.7%(2/3), 76.9%(10/13), 86.7%(13/15), 100%(3/3), 总准确性为82.4%(28/34); 判断淋巴结转移的敏感性、特异性和准确性分别为

69.2%(18/26), 62.5%(5/8), 67.6%(23/34); 对邻近组织脏器浸润、远处转移判断的准确度分别为94.1%(32/34)、97.1%(33/34)。

结论: MRI水成像加常规平扫加增强扫描对直肠癌的诊断和分期有较大价值, 可以较准确地判断肿瘤在肠壁的浸润深度及盆腔内淋巴结的转移。

关键词: 直肠癌; 分期; 磁共振水成像

涂小煌, 黎成金, 马明, 王烈, 宋京翔. 直肠癌术前磁共振水成像检查的意义. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1928-1933
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1928.asp

0 引言

直肠癌为消化道常见恶性肿瘤, 在我国发病率呈上升趋势, 准确的术前诊断并分期直接关系到治疗方案的制订、术式的选择和评估预后。传统的诊断方法如指诊、内镜、钡灌肠等, 用于直肠癌分期的准确性较低, 随着近年影像学的发展, 开始较多地运用经直肠超声检查(TRUS)、CT、MRI等对其进行诊断, MRI检查不仅对直肠癌患者的预后有参考意义, 对术前分期方面也有重要价值, 但单一的MRI检查对肿瘤的侵犯及淋巴结转移的判断其敏感性较低^[1-13]。用水使直肠充盈后, 可提高肿瘤的诊断率^[14]。为了探讨磁共振水成像在直肠癌术前分期的意义, 我们对34例确诊为直肠癌的患者于术前行MRI水成像检查, 分析其表现并分期, 与术后病理分期进行对比, 结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组共34例, 其中男21例, 女13例, 年龄27-72(平均54.6±12.8)岁, 均为病理诊断为直肠癌的患者, 术前未行放疗或化疗, 术前1 wk内行MRI水成像检查。根据肛门指诊及内窥镜检查, 肿瘤距肛门口的距离小于3 cm的5例, 距肛门口3-6 cm的肿瘤16例, 距肛门口6-12 cm的肿瘤13例。病理显示: 黏液腺癌11例, 低分化腺癌6例, 中分化腺癌9例, 高分化腺癌8例。

1.2 方法 检查前禁食, 禁水, 清洁灌肠, 扫描前患者右侧卧于扫描床, 用双腔气囊导尿管经肛门插入, 先将所囊管注空气20 mL, 让气囊充气, 以防导尿管脱出; 再经导尿管注入生理盐水300 mL左右, 以患者能耐受为度, 扩张直肠; 注水结束后, 患者取仰卧位, 脚先进; 先作常规盆腔轴位平扫, 再作MRI直肠水成像扫描, T2WI采

表 1 直肠癌TNM分期

分期	肿瘤侵犯范围
Tis	原位癌
T1期	肿瘤侵犯黏膜下层
T2期	肿瘤侵犯直肠壁的环形或纵型肌层
T3期	肿瘤侵犯浆膜或纤维外直肠周围脂肪组织
T4期	肿瘤直接侵犯周围组织器官
N0期	无区域淋巴结转移
N1期	直肠周围有1-3个淋巴结转移
N2期	直肠周围有4个以上淋巴结转移
M0期	无远处转移
M1期	有远处转移

用FSE序列, T1WI采用SE序列, 水成像扫描参数: TR5000-9000 ms, TE352 ms, Nex: 1次, Etl: 48, TA 180°, FOV: 36×36, 距阵192×256, 层厚3 mm, 层间隔0 mm, 平扫完后作增强扫描, 增强扫描前经肘静脉推注顺磁性对比剂Gd-DTPA(钆-二乙烯三胺五乙酸)15 mL, 以带脂肪抑制T1WI序列行轴位、矢状位、冠状位扫描, 以清楚显示直肠壁, 平扫及增强扫描观察直肠周围组织浸润与淋巴结转移情况。图像后处理: 对直肠水成像扫描的原始图像用最大信号强度投影法, 作任意方向重建, 获得直肠水成像的图像, 利用Navigator软件对扫描数据进行三维重建进行仿真内窥镜检查, 应用Fly-through Sequence软件沿直结肠腔中轴方向进行观察病变在肠腔内的形态及邻近肠段的腔内表面情况。

MRI诊断标准^[1]: 直肠癌MRI诊断标准如下: 肠壁局限性或弥漫性增厚(>6 mm), 肠腔内偏心性软组织肿块, 平扫呈等T1、长T2信号, 增强扫描明显强化, 肠腔不规则狭窄; MR水成像肠腔内不规则充盈缺损, 病变远侧端呈“袖口征”或“截断征”。MRI分期标准: MRI上T1期指肿瘤浸润至黏膜层, 不论黏膜是否受累, 但肌层完整; T2期指肿瘤破坏黏膜下层, 肌层部分中断, 但肌层的外缘和周围脂肪完整; T3期指肌层完全中断, 与周围脂肪界限不清; T4期指肿瘤侵犯周围脏器和盆壁结构。鉴别T1、T2期的关键是看环形肌有无受累, 鉴别T2和T3期的关键是看直肠周围脂肪有无浸润。病理分期采用国际TNM分期方法(表1)。

2 结果

34例直肠癌均能显示原发病灶, 三维成像病变部位肠腔内不规则充盈缺损32例(图1A), 19例病

■名词解释

磁共振水成像是利用体内的液体-水作为天然对比剂, 在重度T2加权序列的MR图像上, 静态或缓慢流动的液体呈高信号, 而实质脏器或快速流动的血液呈低或无信号, 白色高信号的液体在黑色低信号背景的衬托下清晰显示, 因此称为MR水成像。如: MR胰胆管造影(MRCP)、MR尿路造影(MRU)、MR脊髓造影(MRM)、肠梗阻MR水成像、MR输卵管成像等。

同行评价

本文以人为的方法使肠腔充水,再采用磁共振水成像技术,使含水的肠腔以明显的高信号显示出来,肠腔的狭窄特征显示更清楚,并与临床病理结果做对比分析,对提高磁共振成像术前分期的准确率有指导意义,有一定的学术价值和现实指导意义。

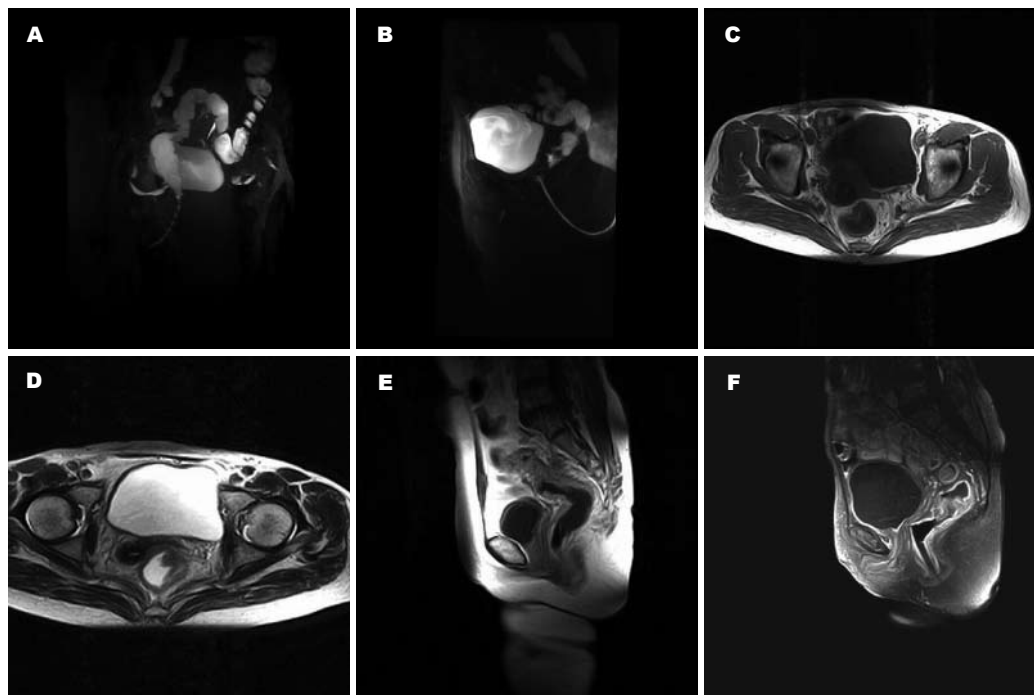


图1 磁共振水成像检查直肠癌原发病灶表现: A: 充盈缺损; B: 截断征; C: 腔内软组织肿块; D: 肠壁不规则增厚, 肠腔环形狭窄; E: 肠壁外缘光滑; F: 肠壁外缘有结节影向外突出。

变远侧端呈“袖口征”及“截断征”(图1B)。轴位像30例表现为腔内软组织肿块(图1C), 26例表现为肠壁不规则增厚, 肠腔环形狭窄(图1D)。平扫T1WI上呈等信号, 31例T2WI上呈略高信号, 3例呈明显高信号; 增强扫描病灶均明显强化。7例平扫SE序列T1WI上病灶周围脂肪间隙内见斑片状低信号。病变段肠壁外缘光滑20例(图1E), 不光滑或有结节影向外突出14例(图1F)。

本组34例手术病理诊断T1, T2, T3, T4期肿瘤中, MRI检查的准确性分别为66.7%, 76.9%, 86.7%, 100%, 总准确性为82.4%。低估4例, 高估2例(表2)。3例肝转移, 正确诊断2例(表3)。

3 讨论

基因治疗等综合疗法是直肠癌治疗的方向^[15-16], 手术切除是治疗直肠癌效果最明确的方法, 而手术方式的选择必须基于术前对肿瘤浸润深度与范围的准确判断。直肠属空腔器官, 由于直肠解剖位置特殊, 被盆腔内脂肪固定, 蠕动较弱, 使之成为消化道MRI检查最成功的器官^[17-18]。MR水成像是利用长TR加长TE获得重T2WI的效果, 使含水器官显影^[19], 我们体会, 采用人为的方法使肠腔充水, 增厚的肠壁或腔内肿块及周围结构发生信号的减弱, 含水的肠腔以明显的高信号显示出来, 再对其进行MIP重建, 肠腔的狭窄特征显示更清楚。肠道灌水量主要取决

表2 MRI与组织学分期符合率

MRI水成像	组织学				准确度[% (n/M)]
	T1	T2	T3	T4	
T1	2	1			66.7(2/3)
T2	1	10	2		76.9(10/13)
T3		1	13	1	86.7(13/15)
T4				3	100(3/3)
总准确度					82.4(28/34)

于患者的承受能力, 本组平均灌水量300 mL, 34例原发病灶均能显影, 我们分析除检查前应作充分的肠道准备外, 与检查前已确诊, 病变较晚有关。T1WI轴位平扫采用SE序列, SE序列不进行脂肪抑制, 可以显示肠管周围脂肪, 有助于对T1, T2, T3, T4期肿瘤进行鉴别。Gd-DTPA增强扫描可以清楚显示病变段肠壁的外缘, 有助于判断肿瘤的浸润深度, 提高T分期的准确率^[20-24]。目前常用的对结直肠肿瘤术前分期的方法包括TRUS、CT及MRI, TRUS和MRI可显示肠壁的分层, MRI判断肠壁侵犯程度的能力和直肠内超声基本相当, 均优于盆腔CT。直肠狭窄与上段直肠病变是直肠超声的主要局限因素, 对瘤边缘的炎性浸润与肿瘤侵犯难以区分, 肌层收缩导致肌层外缘形态改变也可误诊为肿瘤已突破肌层^[25-33]。本组T分期的总准确度为82.4%, 从

表 3 MRI水成像测定肿瘤浸润、转移与组织学的符合率

MRI	组织学		敏感性[% (n/M)]	特异性[% (n/M)]	准确性[% (n/M)]
	阳性	阴性			
淋巴结					
阳性	18	3	69.2(18/26)	62.5(5/8)	67.6(23/34)
阴性	8	5			
周围脂肪浸润					
阳性	13	2	76.5(13/17)	88.2(15/17)	82.4(28/34)
阴性	4	15			
临近器官及骨盆浸润					
阳性	3	0	60.0(3/5)	100.0(29/29)	94.1(32/34)
阴性	2	29			
远处转移					
阳性	2	0	66.7(2/3)	100.0(31/31)	97.1(33/34)
阴性	1	31			

T1到T4期分期的准确度呈上升趋势,表明MRI水成像对中外晚期直肠癌T分期更有价值。本组对肠壁和直肠周围脂肪组织中大于0.5 cm的淋巴结设定为有转移,但敏感性、特异性和准确性均较低,分别为69.2%(18/26)、62.5%(5/8)、67.6%(23/34),部分病例可见淋巴结,但没有转移,部分病例则未见淋巴结,病理显示已有转移,小于5 mm的淋巴结假阴性率高,位于直肠上段病变的淋巴结转移常因超越病变水平而造成假阴性。MRI和CT、超声检查一样,均无法对淋巴结有无转移作出准确判断,对淋巴结转移的判断仅仅是通过大小、形态以及他和原发肿瘤的分离性来定性的,因而常常不能发现淋巴结内部结构与微小转移,或区别增大的炎性淋巴结与转移,从而对淋巴结分期过高或过低^[34-36]。

钡灌肠和纤维内窥镜是检查直肠癌的主要方法,但两者对肿瘤分期价值有限。与钡灌肠相比较,MRI水成像可以解决钡灌肠梗阻近侧段及腔外情况不能显示的问题,MRI水成像由于具有多参数成像的特点及良好的软组织分辨率,且扫描范围广,因而并不存在空间限制的约束,不仅能显示肠壁病灶、邻近器官的浸润及较大范围淋巴结转移外,还能显示肝、骨等远处转移的种种优点,本组邻近组织脏器浸润、远处转移判断的准确度分别为94.1%(32/34)、97.1%(33/34)。MRI检查也克服了钡灌肠检查的不适和操作者依赖性,以及CT检查的较大辐射量和碘过敏反应的不足,随着检查技术的进展,将成为对直肠癌术前诊断并分期的一种十分有效的手段^[37-40]。

4 参考文献

- 1 Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study. *BMJ* 2006; 333: 779
- 2 Panzironi G, De Vargas Macciucca M, Manganaro L, Ballesio L, Ricci F, Casale A, Campagnano D. Preoperative locoregional staging of rectal carcinoma: comparison of MR, TRUS and Multislice CT. Personal experience. *Radiol Med (Torino)* 2004; 107: 344-355
- 3 Brown G, Davies S, Williams GT, Bourne MW, Newcombe RG, Radcliffe AG, Blethyn J, Dallimore NS, Rees BI, Phillips CJ, Maughan TS. Effectiveness of preoperative staging in rectal cancer: digital rectal examination, endoluminal ultrasound or magnetic resonance imaging? *Br J Cancer* 2004; 91: 23-29
- 4 Bianchi PP, Ceriani C, Rottoli M, Torzilli G, Pompili G, Malesci A, Ferraroni M, Montorsi M. Endoscopic ultrasonography and magnetic resonance in preoperative staging of rectal cancer: comparison with histologic findings. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1222-1227; discussion 1227-1228
- 5 Bianchi P, Ceriani C, Palmisano A, Pompili G, Passoni GR, Rottoli M, Cappellani A, Montorsi M. A prospective comparison of endorectal ultrasound and pelvic magnetic resonance in the preoperative staging of rectal cancer. *Ann Ital Chir* 2006; 77: 41-46
- 6 Chun HK, Choi D, Kim MJ, Lee J, Yun SH, Kim SH, Lee SJ, Kim CK. Preoperative staging of rectal cancer: comparison of 3-T high-field MRI and endorectal sonography. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 1557-1562
- 7 Sinha R, Verma R, Rajesh A, Richards CJ. Diagnostic value of multidetector row CT in rectal cancer staging: comparison of multiplanar and axial images with histopathology. *Clin Radiol* 2006; 61: 924-931
- 8 Hoeffel C, Arrive L, Mourra N, Azizi L, Lewin M, Tubiana JM. Anatomic and pathologic findings at external phased-array pelvic MR imaging after surgery for anorectal disease. *Radiographics* 2006; 26: 1391-1407
- 9 Stollfuss JC, Becker K, Sendler A, Seidl S, Settles M,

- Auer F, Beer A, Rummeny EJ, Woertler K. Rectal carcinoma: high-spatial-resolution MR imaging and T2 quantification in rectal cancer specimens. *Radiology* 2006; 241: 132-141
- 10 Hama Y, Makita K, Yamana T, Dodanuki K. Mucinous adenocarcinoma arising from fistula in ano: MRI findings. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 517-521
- 11 Kuriu Y, Otsuji E, Kin S, Nakase Y, Fukuda K, Okamoto K, Hagiwara A, Yamagishi H. Monoclonal antibody conjugated to gadolinium as a contrast agent for magnetic resonance imaging of human rectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2006; 94: 144-148
- 12 Salerno G, Daniels IR, Brown G. Magnetic resonance imaging of the low rectum: defining the radiological anatomy. *Colorectal Dis* 2006; 8 Suppl 3: 10-13
- 13 Skandarajah AR, Tjandra JJ. Preoperative loco-regional imaging in rectal cancer. *ANZ J Surg* 2006; 76: 497-504
- 14 Kim MJ, Lim JS, Oh YT, Kim JH, Chung JJ, Joo SH, Kim NK, Lee KY, Kim WH, Kim KW. Preoperative MRI of rectal cancer with and without rectal water filling: an intraindividual comparison. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 1469-1476
- 15 黎成金, 马庆久, 赖大年, 鲁建国, 王小军, 王青, 潘伯荣, 武永忠, 李金茂. CD/5-FC系统对结肠癌细胞的杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 535-539
- 16 黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔. 前药热化疗对转CD基因结肠癌细胞SW480的作用机制. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2307-2311
- 17 Slater A, Halligan S, Taylor SA, Marshall M. Distance between the rectal wall and mesorectal fascia measured by MRI: Effect of rectal distension and implications for preoperative prediction of a tumour-free circumferential resection margin. *Clin Radiol* 2006; 61: 65-70
- 18 Brown G, Kirkham A, Williams GT, Bourne M, Radcliffe AG, Sayman J, Newell R, Sinnatamby C, Heald RJ. High-resolution MRI of the anatomy important in total mesorectal excision of the rectum. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 431-439
- 19 Poon FW, McDonald A, Anderson JH, Duthie F, Rodger C, McCurrach G, McKee RF, Horgan PG, Foulis AK, Chong D, Finlay IG. Accuracy of thin section magnetic resonance using phased-array pelvic coil in predicting the T-staging of rectal cancer. *Eur J Radiol* 2005; 53: 256-262
- 20 Brown G. Thin section MRI in multidisciplinary pre-operative decision making for patients with rectal cancer. *Br J Radiol* 2005; 78 Spec No 2: S117-127
- 21 Kim CK, Kim SH, Chun HK, Lee WY, Yun SH, Song SY, Choi D, Lim HK, Kim MJ, Lee J, Lee SJ. Preoperative staging of rectal cancer: accuracy of 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 2006; 16: 972-980
- 22 Tatli S, Mortelet KJ, Breen EL, Bleday R, Silverman SG. Local staging of rectal cancer using combined pelvic phased-array and endorectal coil MRI. *J Magn Reson Imaging* 2006; 23: 534-540
- 23 Iafrate F, Laghi A, Paolantonio P, Rengo M, Mercantini P, Ferri M, Ziparo V, Passariello R. Preoperative staging of rectal cancer with MR Imaging: correlation with surgical and histopathologic findings. *Radiographics* 2006; 26: 701-714
- 24 Burton S, Brown G, Daniels I, Norman A, Swift I, Abulafi M, Wotherspoon A, Tait D. MRI identified prognostic features of tumors in distal sigmoid, rectosigmoid, and upper rectum: treatment with radiotherapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 445-451
- 25 Koh DM, Brown G, Temple L, Raja A, Toomey P, Bett N, Norman AR, Husband JE. Rectal cancer: mesorectal lymph nodes at MR imaging with USPIO versus histopathologic findings--initial observations. *Radiology* 2004; 231: 91-99
- 26 Brown G, Radcliffe AG, Newcombe RG, Dallimore NS, Bourne MW, Williams GT. Preoperative assessment of prognostic factors in rectal cancer using high-resolution magnetic resonance imaging. *Br J Surg* 2003; 90: 355-364
- 27 Kim MJ, Park JS, Park SI, Kim NK, Kim JH, Moon HJ, Park YN, Kim WH. Accuracy in differentiation of mucinous and nonmucinous rectal carcinoma on MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27: 48-55
- 28 Roach SC, Hulse PA, Moulding FJ, Wilson R, Carrington BM. Magnetic resonance imaging of anal cancer. *Clin Radiol* 2005; 60: 1111-1119
- 29 Lahaye MJ, Engelen SM, Nelemans PJ, Beets GL, van de Velde CJ, van Engelshoven JM, Beets-Tan RG. Imaging for predicting the risk factors--the circumferential resection margin and nodal disease--of local recurrence in rectal cancer: a meta-analysis. *Semin Ultrasound CT MR* 2005; 26: 259-268
- 30 Beets-Tan RG, Lettinga T, Beets GL. Pre-operative imaging of rectal cancer and its impact on surgical performance and treatment outcome. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 681-688
- 31 Oberholzer K, Junginger T, Kreitner KF, Krummenauer F, Simiantonaki N, Trouet S, Thelen M. Local staging of rectal carcinoma and assessment of the circumferential resection margin with high-resolution MRI using an integrated parallel acquisition technique. *J Magn Reson Imaging* 2005; 22: 101-108
- 32 Ferri M, Laghi A, Mingazzini P, Iafrate F, Meli L, Ricci F, Passariello R, Ziparo V. Pre-operative assessment of extramural invasion and sphincteral involvement in rectal cancer by magnetic resonance imaging with phased-array coil. *Colorectal Dis* 2005; 7: 387-393
- 33 Taylor A, Sheridan M, McGee S, Halligan S. Preoperative staging of rectal cancer by MRI: results of a UK survey. *Clin Radiol* 2005; 60: 579-586
- 34 Koh DM, Brown G, Temple L, Blake H, Raja A, Toomey P, Bett N, Farhat S, Norman AR, Daniels I, Husband JE. Distribution of mesorectal lymph nodes in rectal cancer: in vivo MR imaging compared with histopathological examination. Initial observations. *Eur Radiol* 2005; 15: 1650-1657
- 35 Kim DW, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Sohn DK, Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Park JG. Is T classification still correlated with lymph node status after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? *Cancer* 2006; 106: 1694-1700
- 36 Matsuoka H, Nakamura A, Sugiyama M, Hachiya J, Atomi Y, Masaki T. MRI diagnosis of mesorectal lymph node metastasis in patients with rectal carcinoma. what is the optimal criterion? *Anticancer Res* 2004; 24: 4097-4101
- 37 Burton S, Brown G, Daniels IR, Norman AR, Mason B, Cunningham D. MRI directed multidisciplinary team preoperative treatment strategy: the way to eliminate positive circumferential margins? *Br J*

- Cancer 2006; 94: 351-357
- 38 Kim YH, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Jeong SY, Sohn DK, Choi HS, Ahn JB, Kim DH, Lim SB, Lee JS, Park JG. Usefulness of magnetic resonance volumetric evaluation in predicting response to preoperative concurrent chemoradiotherapy in patients with resectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 761-768
- 39 Oh YT, Kim MJ, Lim JS, Kim JH, Lee KY, Kim NK, Kim WH, Kim KW. Assessment of the prognostic factors for a local recurrence of rectal cancer: the utility of preoperative MR imaging. *Korean J Radiol* 2005; 6: 8-16
- 40 Atkin G, Taylor NJ, Daley FM, Stirling JJ, Richman P, Glynne-Jones R, d'Arcy JA, Collins DJ, Padhani AR. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging is a poor measure of rectal cancer angiogenesis. *Br J Surg* 2006; 93: 992-1000

电编 何基才 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

中国中西医结合第十九次全国消化病学术会议最后通知

本刊讯 由中国中西医结合学会消化专业委员会主办、河北医科大学第二医院承办的中国中西医结合第十九次消化学术会议, 定于2007-07-27/29日将在河北省石家庄市中山宾馆召开. 2007-27全天报道, 2007-28/29日为大会专题报告与学术交流. 大会将邀请多位国内外知名专家作专题学术报告, 并进行学术论文交流. 参加会议的正式代表将授予国家I类继续教育学分7分[2007-3-3-027(国)]. 参加会议的每位代表收取会务费700元(包括餐费和资料费等)欢迎广大从事中西医结合基础与临床工作者、消化内、外科、胃肠、肝胆科、消化内镜的医务人员以及研究生等踊跃投稿积极参加. 现将本次学术会议征文的有关事项通知如下.

1 征文内容

(1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肠、肝、胆、胰等中西医结合诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对脾胃学说与脾虚证研究进展; (5)当前消化疾病的最新诊断与治疗技术的临床应用与进展.

2 征文要求

论文应具有科学性、先进性、实用性和真实性. 文字表达准确、精练、通顺. 大会论文摘要800-1000字左右, 具有目的、方法、结果、结论. 来稿最好以Email形式发送; 或以A4纸5号字打印并附软盘或光盘一份, 寄送至下列单位: (1)哈尔滨市南岗区学府路45号解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化疾病专业委员会)邮编: 150080 收件人: 李春雷 贾云 电话: 0451-57752440或86632450 传真: 0451-86603878; Email: czs.xiaohua@163.com或211zyke@163.com; (2)石家庄市和平西路215号河北医科大学第二医院消化内科 蒋树林 孙玉凤副教授, 邮政编码: 050000, 联系电话: 0311-87222301; 87222951; Email: zxyjhxh@yahoo.com.cn(特别提醒: 此为新注册信箱, 原信箱因故不可使用), 截稿日期2007-06-30.

来稿请注明“中西医结合消化会征文”字样, 并用楷体写清楚作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码、便捷联系电话和E-mail信箱. 欢迎采用Word格式E-mail投稿. 入选论文将编入《中国中西医结合消化学术会议论文汇编》. 优秀论文将推荐至《中国中西医结合消化杂志》、《世界华人消化杂志》等杂志.

中药痛泻要方治疗肠易激综合征疗效的荟萃分析

石 珺, 汪崇文, 范 可

■背景资料

肠易激综合征是影响人们生活质量的一种常见的功能性肠疾病。治疗该病尚无十分满意的药物。痛泻要方是中国古代流传下来的经验方, 现在, 用它来治疗肠易激综合征相当普遍, 其临床应用的确切疗效和安全性还需要用循证医学的手段加以证实。

石珺, 范可, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院中西医结合科 湖北省武汉市 430077

汪崇文, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院老年病研究所社会医学和行为医学研究室 湖北省武汉市 430077

石珺, 2001年华中科技大学同济医学院硕士, 副主任医师, 目前主要从事中西医结合、循证医学方面的研究。

通讯作者: 石珺, 430077, 湖北省武汉市东湖梨园新村, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院中西医结合科。sj060606@126.com

电话: 027-86777672

收稿日期: 2007-03-05 接受日期: 2007-03-31

Meta-analysis of the effectiveness of Tong Xie Yao Fang in treating irritable bowel syndrome

Jun Shi, Chong-Wen Wang, Ke Fan

Jun Shi, Ke Fan, Department of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China

Chong-Wen Wang, Social and Behavioral Section, Institute of Geriatrics, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Shi, Department of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China. sj060606@126.com

Received: 2007-03-05 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To conduct a review to explore the efficacy of Tong Xie Yao Fang (TXYF) in treating irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Computer-based and manual literature searches from Internet databases and registers of clinical trial databases and references, as well as related meetings were performed. Search strategy: randomized or quasi-randomized controlled trials for treating IBS patients with TXYF or TXYF with the addition of other traditional Chinese medicines (TXYFa), and controls treated with conventional medicines or a placebo, or with no treatment were included.

RESULTS: A total of 31 studies with 32 arms met the inclusion criteria. Meta-analysis of these

studies showed that TXYFa had beneficial effects for relieving IBS symptoms (RR: 1.30, 95% CI: 1.22-1.38, $P < 0.01$). Compared with the controls, 23 (72%) showed that TXYFa had significant benefit for IBS treatment ($P < 0.05$). Combining data from 11 studies showed a global improvement of symptoms in IBS (RR: 1.31, 95% CI: 1.23-1.40, $P < 0.01$). Combining data from 20 studies showed that TXYFa was advantageous in diarrhea-predominant IBS (RR: 1.33, 95% CI: 1.21-1.45, $P < 0.01$). However, all these studies were of low quality. Further, a funnel plot was asymmetric, indicating the presence of a publication bias.

CONCLUSION: Although TXYFa had therapeutic benefit in IBS in the studies evaluated, the evidence is not strong enough for it to be recommended as a treatment for IBS because of the low quality of the studies and the publication bias. It will be necessary to conduct rigorous well-designed clinical trials to evaluate the efficacy and safety of TXYFa as a treatment for IBS.

Key Words: Tong Xie Yao Fang; Irritable bowel syndrome; Meta-analysis

Shi J, Wang CW, Fan K. Meta-analysis of the effectiveness of Tong Xie Yao Fang in treating irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1934-1939

摘要

目的: 评价以痛泻要方(TXYF)为基础方的中药方剂(TXYFa)治疗肠易激综合征(IBS)的疗效。

方法: 通过对网上电子数据库、临床试验注册数据库、参考文献以及手工对相关会议检索的TXYF和TXYFa治疗IBS随机或半随机对照试验, 对照组用西药、安慰剂或不治疗者的对象和数据进行荟萃分析。

结果: 31个临床试验涉及32个TXYFa符合入选条件而纳入研究。对所有纳入试验的数据分析显示TXYFa具有显著疗效(RR:1.30, 95% CI: 1.22-1.38, $P < 0.01$)。其中23个TXYFa(72%)分别与西药或安慰剂比较有显著疗效($P < 0.05$);

11个和20个试验数据分别显示TXYFa显著改善IBS总体症状($RR: 1.31$, 95% CI: 1.23-1.40, $P < 0.01$)和腹泻型IBS的相关症状($RR: 1.33$, 95% CI: 1.21-1.45, $P < 0.01$). 纳入试验的方法质量学评估均为低质量试验, 倒漏斗图形显示不对称, 提示存在发表偏倚。

结论: 痛泻要方的潜在疗效和安全性有待严格设计的随机、双盲、安慰剂对照试验加以证实。

关键词: 痛泻要方; 肠易激综合征; 荟萃分析

石琚, 汪崇文, 范可. 中药痛泻要方治疗肠易激综合征疗效的荟萃分析. 世界华人消化杂志. 2007;15(17):1934-1939
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1934.asp>

0 引言

IBS是常见的影响人们生活质量的一种功能性紊乱性肠疾病, 其典型症状包括腹痛、腹胀和排便习惯的改变. 在西欧和北美约有20%的成年人患此病^[1], 在亚洲国家该病的发病率约为0.8%-11%^[2]. 目前对该病的治疗还缺乏十分满意的药物. 痛泻要方(TXYF)为中国古代流传下来的一经验方, 他在现代医学还没有出现前就已经在民间广为应用. 在中国, 该方用于治疗IBS仍然非常普遍, 很多医生和患者认为其由天然中草药组成, 无毒副作用, 而且中草药比西药也相对便宜. 但其疗效是否能得到有力的证据支持, 毒副作用到底如何还不十分清楚, 故本文拟针对这一问题对TXYFa治疗IBS的疗效进行荟萃分析。

1 材料和方法

1.1 检索策略 我们从MEDLINE(1966-2006)、EMBASE(1980-2006)、Cochrane Database(1992-2006)、中国期刊网(1994-2006)、万方数据库(1998-2006)、重庆维普数据库(1989-2006)以及中国中医药期刊文献数据库(1984-2006), 用“肠易激综合征、痛泻要方、功能性肠疾病、中医药”等关键词进行检索, 同时对参考文献和相关会议进行网上和/或手工检索. 所有检索和数据抽取均由几个研究者独立进行(石琚、汪崇文和范可), 不同见解经过协商达成一致。

1.2 研究纳入及排除标准 纳入标准: (1)IBS诊断采用ROME I^[3]或ROME II^[4], 或1986年成都会议拟定标准^[5]. (2)TXYF或TXYFa治疗IBS的随机对照或半随机对照试验, 无论是否采用盲法. (3)对照组采用西药、安慰剂或不治疗者. 排除

标准: (1)治疗组TXYFa与西药联用. (2)对照组与治疗组为同种、不同剂量的药物。

纳入研究的方法学质量采用Jadad评分法^[6]和Cochrane手册^[7]进行评估。

统计学处理 我们利用各研究中的原始数据计算相对危险度(RR), 以95%可信区间(95% CI)表示. 荟萃分析根据是否存在异质性用固定效应模型或随机效应模型表达. 尽可能对原始数据进行意向性分析. 潜在的发表偏倚采用倒漏斗图形分析. 统计软件用Cochrane协作网提供的RevMan 4.2软件包。

2 结果

文献检索到76条相关题录, 查看标题及摘要后得到66个相关痛泻要方临床试验, 仔细阅读全文后, 确定31个临床试验符合入选标准纳入本研究^[8-38]. 35个试验由于以下原因排除本研究: (1)无确定的诊断标准, (2)缺乏可用的原始数据, (3)非随机或非半随机临床对照试验, (4)对照组与治疗组为同种、不同剂量的药物. (5)治疗组TXYFa与西药合用。

最终31个试验使用32个TXYFa(试验^[17]涉及两个不同的TXYFa)包括1724名试验者, 1300名对照者纳入本研究. 所有试验均在中国进行, 纳入的均为中国患者。

所有试验用Jadad评分均为2分及以下分数, 为低质量试验, 其中2个试验^[19,29]说明产生随机的方法为使用随机数字表, 故评为2分, 其余未提及随机产生的方法为1分^[8-18,20-24,26-28,30-32,34-38]或按就诊顺序安排患者分组为0分^[25,33]. 无一篇报告随机分配方案隐藏; 无报告使用盲法; 也无报告样本含量的计算或使用了意愿性分析. 对照药物的使用: 每一试验均选用西药作对照药物, 其中2个试验^[10,26]在选用西药作对照的同时也选用了一组安慰剂作对照. 有13个试验^[8,12-13,15,18,22,25,27-28,33,35-37]进行了1 mo至2 a(平均7.5 mo)的治疗后随访. TXYFa治疗IBS临床试验的设计特征(表1). 治疗效果: 74%(23/31)的试验^[9-12,14,16-18,20-21,24-28,30,32-38]显示TXYFa与西药^[9-12,14,16-18,20-21,24-25,27-28,30,32-38]或安慰剂^[10,26]比较有治疗效果($P < 0.05$). 将31个试验中32个TXYFa数据进行荟萃分析, 结果显示TXYFa与对照药物比较具有明显效果($RR = 1.30$ 95% CI 1.22-1.38, $P < 0.01$).

总体症状的改善: 31个试验中9个试验^[9,11,14,16,20,24-25,32,34]显示TXYFa改善IBS的腹痛、腹胀、

■ 研发前沿

循证医学是遵循循证证据的临床医学, 可指导医师为病人的诊治作出最佳的决策. 中医药的应用在中国已有几千年的历史, 其主要为一门经验医学, 如要走向世界, 得到国际社会的认可, 其循证医学研究亟待加强。

■应用要点

本文通过对检索到的痛泻要方治疗肠易激综合征的随机对照试验的评估,发现普遍存在方法学质量低下的问题,尤其缺乏严格的临床试验设计。如果在以后的临床试验中注意到这点,将可提供证实中医药治疗疾病潜在疗效的具有说服力的、可靠的证据。

表 1 TXYFa治疗IBS随机对照试验的设计特征

试验名称	n	年龄(岁)	性别(%男)	Jadad评分	对照药物	治疗时间(wk)	随访(a)
卓 ⁸ (1996)	50	37.5	60	1	苯乙哌啶	2	1
殷 ⁹ (1998)	57	19-76	46	1	硝苯地平、谷维素	4	
赵 ¹⁰ (2000)	233	39	34	1	柳氮磺胺吡啶、苯乙哌啶	2	
					山莨菪碱、阿米替林		
叶 ¹¹ (2000)	126	38.5	57	1	西沙比利	2	
杨 ¹² (2001)	116	40	58	1	苯乙哌啶、硝苯地平	4	0.6
龚 ¹³ (2001)	96	44	52	1	西沙比利、洛哌丁胺	4	1
文 ¹⁴ (2002)	96	34.5	60	1	硝苯地平、谷维素	4	
芮 ¹⁵ (2002)	50	64.5	44	1	苯乙哌啶、西沙比利	4	0.6
侯 ¹⁶ (2002)	120	25-52(治疗组)	58(治疗组)	1	谷维素	5	
陈 ¹⁷ (2002)	110	固定TXYF 43.27 ± 8.4 辩证TXYF 42.11 ± 8.2 对照组 40.55 ± 9.2		1	匹维溴铵	8	
唐 ¹⁸ (2003)	62	38.5	27	1	思密达	4	0.6-1
沈 ¹⁹ (2003)	45	治疗组 41.63 ± 12.79 对照组 42.27 ± 14.65	58	2	匹维溴铵	8	
费 ²⁰ (2003)	189	治疗组 37.6 ± 11.4 对照组 38.2 ± 13.5	42	1	谷参肠安、谷维素、 思密达、麻仁丸	2-4	
王 ²¹ (2004)	150	45.5	74	1	匹维溴铵	4-5	
黄 ²² (2004)	60	治疗组 35.7 ± 13.8 对照组 32.6 ± 15.3	43	1	谷参肠安、思密达、 麻仁丸	1-4	1
吴 ²³ (2004)	60	37.9	52	1	匹维溴铵	5	
杨 ²⁴ (2004)	104	43 ± 8.26	28	1	匹维溴铵	3	
许 ²⁵ (2004)	66	40.2	45	0	培菲康、匹维溴铵	6	0.1
肖 ²⁶ (2004)	167	37	41	1	曲美布汀、柳氮磺胺吡啶、 苯乙哌啶	2	
黄 ²⁷ (2004)	136	35.7 ± 13.8	47	1	山莨菪碱、阿米替林	4	0.6
王 ²⁸ (2005)	73	41.4	65	1	洛哌丁胺	4	2
叶 ²⁹ (2005)	68	41.65	0	2	洛哌丁胺	4	
张 ³⁰ (2005)	68	40.5	68	1	曲美布汀	4	
余 ³¹ (2005)	124	35.5	45	1	培菲康		
马 ³² (2005)	145	30.5	39	1	诺为、肠复康、果导	8	
张 ³³ (2006)	159	40.3	44	0	多潘立酮、洛哌丁胺	4	0.5
苏 ³⁴ (2006)	148	22-61(治疗组) 20-65(对照组)	61	1	曲美布汀、米雅MB匹维溴铵	4	
兰 ³⁵ (2006)	89	33.5	34	1	苯乙哌啶、硝苯地平	4	0.6
程 ³⁶ (2006)	58	41.8	51	1	谷维素	4	0.3
杨 ³⁷ (2006)	110	35.5	47	1	苯乙哌啶、硝苯地平	4	0.6
陈 ³⁸ (2006)	93	42.00 ± 14.67	55	1	固肠止泻丸	4	

腹泻、便秘及排便习惯改变等总体症状优于对照西药($P < 0.05$)。2个试验^[15,31]显示TXYFa与西药比较IBS总体症状的改善效果不明显($P > 0.05$)。这11个试验荟萃结果显示TXYFa对IBS总体症状的改善明显优于对照西药($RR = 1.31$ 95% CI 1.23-1.40, $P < 0.01$, 表2)。腹泻型IBS症状的改善: 13个试验^[10,12,17-18,21,27-28,30,33,35-38]和2个试验^[10,26]分别与西药或安慰剂比较能明显改善腹泻型IBS相关症状($P < 0.05$)。7个试验^[8,13,17,19,22,23,26,29]显示TXYFa与西药比较,治疗腹泻型IBS的相关症

状无明显效果($P > 0.05$)。荟萃这20个试验数据分析显示TXYFa效果显著($RR = 1.33$ 95% CI 1.21-1.45, $P < 0.01$)(表3)。不良反应: 31个试验中, 6个试验^[10-11,19,24-25,33]提及了不良反应, 结果6个试验使用TXYFa均未发现不良反应。倒漏斗图分析: 经Meta View与Funnel Plot分析, 倒漏斗图形分析显著不对称(图1)。

3 讨论

中医认为IBS的病机是肝旺脾虚所致的腹痛泄泻。痛泻要方又名白术芍药散, 出自《景岳全

表 2 TXYFa治疗IBS总体症状的疗效分析

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	RR(fixed) (95% CI)	Weight %	RR(fixed) (95% CI)
殷1998	28/33	14/24		4.57	1.45 [1.01, 2.10]
叶2000	75/85	24/41		9.13	1.51 [1.15, 1.97]
侯2002	58/60	25/30		9.40	1.16 [0.98, 1.37]
文2002	59/65	19/32		7.18	1.53 [1.14, 2.06]
芮2002	25/28	15/22		4.74	1.31 [0.96, 1.79]
费2003	155/157	21/32		9.83	1.50 [1.17, 1.93]
许2004	35/38	20/28		6.49	1.29 [1.00, 1.66]
杨2004	32/32	36/42		8.78	1.17 [1.03, 1.32]
马2005	85/87	44/58		14.98	1.29 [1.11, 1.49]
余2005	35/40	33/40		9.30	1.06 [0.88, 1.28]
苏2006	72/75	55/73		15.71	1.27 [1.11, 1.46]
Total (95% CI)	700	422		100.00	1.31 [1.23, 1.40]
Total events: 659 (Treatment), 306 (Control)					
Test for heterogeneity: Chi-Square = 14.17, df = 10 ($P = 0.17$)					
Test for overall effect: $Z = 8.12$ ($P < 0.00001$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10 Favours control Favours treatment		

■名词解释

荟萃分析: 又称Meta-分析(Meta-analysis), 是通过将多个研究资料合并进行统计学再分析, 提供一个量化的平均效果或联系, 从而回答研究问题。

书》引刘草窗方, 由白术、白芍、陈皮、防风组成。其中白术健脾燥湿和中; 白芍养血柔肝, 缓急止痛; 陈皮和中化湿、理气醒脾、防风散肝舒脾, 诸药合用可起到补中寓疏, 泻肝补脾, 调和气机, 则痛泻可止^[39]。药理实验证实该方具有调节胃肠道平滑肌、解痉止痛的作用^[40]。

本研究提示TXYFa对IBS有一定的疗效。但经过评估我们发现这些试验存在以下方面问题:

(1)方法学质量低下: 所有试验按Jadad评分表及Cochrane手册评估均为低质量试验。仅有2个试验正确采用随机数字表进行随机分组; 2个半随机试验按就诊顺序分组; 其他试验仅提及随机分组, 但未描述随机分组的方法。所有试验均未提及分配隐藏、未使用盲法。绝大多数试验用水煎中药汤剂与西药片剂或胶囊进行对照。只有2个试验使用安慰剂, 且不恰当的应用中药汤剂与安慰剂胶囊进行对照, 很明显安慰剂无法起到其应有的作用。IBS患者应用安慰剂作对照物所致安慰剂效应越来越引起关注, 一项治疗IBS的随机临床试验的系统综述报道安慰剂的症状改善率平均为40.2%^[41]。安慰剂反应率的大小被发现与干预药物使用频率、方法学质量的高低、试验持续时间的长短以及医患交流频率等因素有关^[42-44]。由于我们纳入的试验极少或者说欠缺使用安慰剂的资料, 因此无法从中得出安慰剂效应的结论。另外, 试验用药时间较短:

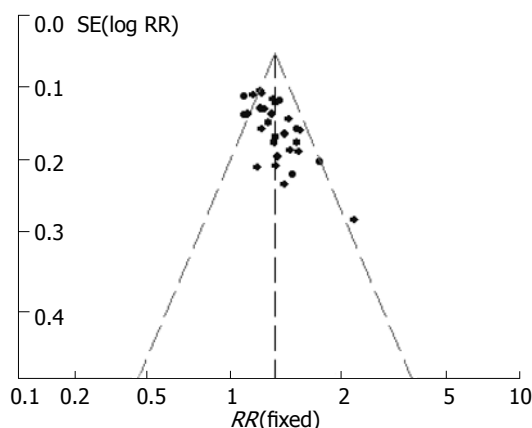


图 1 TXYFa治疗IBS的倒漏斗图示。

最长8 wk, 最短2 wk, 大多数为4 wk的用药观察时间。此外, 除了13个试验外, 大部分试验无治疗后的随访。对IBS这种慢性疾病来说, 药物治疗时间和治疗后的观察时间都相应较长, 否则, 对TXYFa确切效果的了解很有可能会受到影响。经TXYFa治疗后疗效可维持多长时间, 远期效应如何, 停止TXYFa治疗后IBS的复发情况、随着时间的推移, 是否出现迟发性的毒副作用或器官损害, 都需要比较长期的随访观察。(2)发表偏倚: 本研究中倒漏斗图形显示明显的不对称, 可用存在发表偏倚进行解释, 而方法学质量低下以及试验样本量较小等也是导致这种不对称的原因之一。(3)不良反应的观察: 31个试验仅有6个试验提及了不良反应的观察, 但很少说明观

■同行评价

本文收集了大量的资料来分析中药方剂治疗IBS, 分析细致方法全面, 对所存在的问题也进行了探讨, 对预防学与中医药临床学都有重要的借鉴意义.

表 3 TXYFa治疗腹泻型IBS相关症状的疗效分析

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	RR(random) (95% CI)	Weight %	RR(random) (95% CI)
卓1996	23/25	18/25		4.20	1.28 [0.98, 1.67]
赵2000(西药对照)	67/68	50/59		6.28	1.16 [1.04, 1.30]
赵2000(安慰剂对照)	67/68	10/30		2.10	2.96 [1.78, 4.91]
龚2001	46/50	41/46		6.06	1.03 [0.91, 1.18]
杨2001	56/60	38/58		5.15	1.42 [1.17, 1.74]
陈2002(辨证TXYF)	40/45	16/26		3.61	1.44 [1.05, 1.99]
陈2002(固定TXYF)	32/40	16/26		3.40	1.30 [0.92, 1.83]
沈2003	25/30	11/15		3.36	1.14 [0.81, 1.60]
唐2003	29/32	19/30		3.91	1.43 [1.07, 1.92]
黄(22)2004	22/30	16/30		2.87	1.38 [0.92, 2.05]
黄(27)2004	80/86	30/50		4.67	1.55 [1.23, 1.96]
王2004	73/85	37/65		4.74	1.51 [1.20, 1.90]
吴2004	27/30	23/30		4.71	1.17 [0.93, 1.48]
肖2004(西药对照)	44/46	40/46		6.09	1.10 [0.97, 1.25]
肖2004(安慰剂对照)	44/46	6/20		1.37	3.19 [1.63, 6.25]
王2005	39/41	22/32		4.54	1.38 [1.08, 1.77]
叶2005	30/34	29/34		5.32	1.03 [0.86, 1.25]
张2005	32/34	18/34		3.54	1.78 [1.28, 2.47]
陈2006	47/50	34/43		5.55	1.19 [1.00, 1.41]
程2006	28/32	10/26		2.12	2.28 [1.37, 3.76]
兰2006	43/48	30/41		5.01	1.22 [0.99, 1.51]
杨2006	47/50	33/42		5.50	1.20 [1.01, 1.42]
张2006	77/80	57/79		5.89	1.33 [1.16, 1.54]
Total (95% CI)	1110	887		100.00	1.33 [1.21, 1.45]
Total events: 1018 (Treatment), 604 (Control)					
Test for heterogeneity: Chi-Square = 77.51, df = 22 (P < 0.00001)					
Test for overall effect: Z = 6.31 (P < 0.00001)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours control Favours treatment		

察方法、观察项目和使用调查量表; 很少试验检测应用TXYFa后组织器官功能影响的实验数据. 因为较少甚至缺乏对试验药物的严密监控, 故不能很好的提供TXYFa用于治疗IBS安全性的可靠资料.

虽然我们的研究结果显示TXYFa治疗IBS有效, 也未发现明显的不良反应, 但由于所纳入试验均为低质量的试验, 以及存在发表偏倚等缺陷, 因此认为推荐TXYFa治疗IBS的证据力度不够. 我们的研究结果与Bian *et al*^[45]的结论基本一致. 然而, 缺乏有力证据的支持并不代表完全否定TXYFa的临床效果, 正如刘建平 *et al*^[46]的观点: 中草药的潜在疗效有待于严格设计的随机双盲安慰剂对照试验加以证实.

4 参考文献

- Hussain Z, Quigley EM. Systematic review: Complementary and alternative medicine in the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*

2006; 23: 465-471

- Cremonini F, Talley NJ. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 189-204
- Thompson WG, Greed FH, Drossman DA, Heaton KW, Mazzacca G. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gastroenterology International* 1992; 5: 75-91
- Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II43-II47
- 全国慢性腹泻学术讨论会. 肠易激综合症的诊断标准. *中华消化病杂志* 1987; 7: 封三
- Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12
- Higgins JPT, Green S, editors. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of interventions* 4.2.5 [updated May 2005]. In: The Cochrane Library, Issue 3, 2005. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd
- 卓玉翠. 痛泻要方加减治疗肠易激综合征25例. *湖南*

- 中医杂志 1996; 12: 27-28
- 9 殷卫东, 吴桂熙, 于华珍, 史传来. 痛泻要方治疗肠易激综合征33例. 新中医 1998; 30: 49
- 10 赵留记, 李森林, 宋松炎, 徐道钦, 秦永帅. 中西药治疗腹泻型肠易激综合征233例对比观察. 河南中医 2000; 20: 35
- 11 叶林军. 痛泻要方灌肠治疗肠道易激综合征85例-附西沙比利口服治疗41例对照. 浙江中医杂志 2000; 35: 60
- 12 杨银良. 痛泻要方合香连汤加减治疗肠易激综合征. 实用中医内科杂志 2001; 15: 42
- 13 龚时贤. 痛泻要方加味治疗肠易激综合征50例-附西药治疗46例对照. 浙江中医杂志 2001; 36: 60
- 14 文汉英. 痛泻要方治疗肠易激综合征64例. 陕西中医学院学报 2002; 25: 35
- 15 芮以融. 痛泻要方治疗老年肠易激综合征疗效观察. 山西中医 2002; 18: 17-18
- 16 侯卫, 吴格升, 陈秀丽. 工企医刊 2002; 15: 53-54
- 17 陈苑玲, 张正利. 痛泻要方加味治疗腹泻型肠易激综合征的临床观察. 河北中医 2002; 24: 408-410
- 18 唐清珠, 于志勇. 痛泻要方加味治疗腹泻型肠易激综合征的临床观察. 郴州医学高等专科学校学报 2003; 5: 23-24
- 19 沈芸, 蔡淦, 孙旭, 赵昊龙. 中药复方肠吉泰治疗腹泻型肠易激综合征的临床随机对照观察. 中国中西医结合杂志 2003; 23: 823-825
- 20 费玉明, 徐文姬. 痛泻要方加味治疗肠易激综合征157例体会. 中国中医基础医学杂志 2003; 9: 44-45
- 21 王秀珍. 痛泻要方治疗肠易激综合征85例. 天津中医药 2004; 21: 298
- 22 黄小雄, 龙娟. 痛泻要方合乌梅丸治疗肠易激综合征30例体会. 现代中医药 2004; 5: 14
- 23 吴志强, 欧阳晓明, 何永恒. 痛泻要方加减治疗肝郁脾虚型肠易激综合征30例临床观察. 湖南中医药导报 2004; 10: 25-26
- 24 杨伟明. 中药痛泻合剂治疗肠易激综合征32例临床观察. 中医杂志 2004; 45: 199-200
- 25 许海峰. 逍遥散合痛泻要方治疗肠易激综合征38例. 实用中医药杂志 2004; 20: 620
- 26 肖琳. 中西医结合治疗腹泻型肠易激综合征167例. 河南职工医学院学报 2004; 16: 386-387
- 27 黄坚, 潘金辉. 加味痛泻药方治疗腹泻型肠易激综合征86例. 新中医 2004; 36: 60-61
- 28 王玉保. 痛泻要方半夏泻心汤并用治疗腹泻型肠易激综合征41例. 实用中医内科杂志 2005; 19: 78
- 29 叶芬, 程宏辉. 痛泻要方加减治疗女性腹泻型肠易激综合征34例疗效观察. 新中医 2005; 37: 24-25
- 30 张树洁, 于来荣. 痛泻要方治疗肠易激综合征34例疗效观察. 中国社区医师 2005; 21: 39
- 31 余德军. 中西医结合治疗肠易激综合征. 河南中医 2005; 25: 57
- 32 马卫平. 痛泻要方加味治疗肠易激综合征87例. 实用中医内科杂志 2005; 19: 561-562
- 33 张健勇. 痛泻要方加味治疗肝郁脾虚型肠易激综合征. 浙江中西医结合杂志 2006; 16: 562-563
- 34 苏佩清, 冀绪. 加味痛泻要方治疗肠易激综合征临床观察. 中国中医药信息杂志 2006; 13: 73-74
- 35 兰迪翔, 陈根梅, 吴剑英. 痛泻要方加味治疗肠易激综合征48例疗效观察. 浙江中西医结合杂志 2006; 16: 425-426
- 36 程连新, 金国栋. 痛泻要方联合四磨汤治疗肠易激综合征疗效观察. 现代中西医结合杂志 2006; 15: 742
- 37 杨利军, 傅玛丽, 刘东升. 加味痛泻要方治疗肠易激综合征疗效观察. 现代中西医结合杂志 2005; 14: 2142
- 38 陈雪清, 高记华, 孙士然. 痛泻苓术饮治疗肠易激综合征50例临床观察. 江苏中医药 2006; 27: 34
- 39 广州中医学院. 方剂学. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社 1981: 50
- 40 劳绍贤. 痛泻要方治疗肠易激综合征的体会. 新中医 2000; 32: 3-4
- 41 Patel SM, Stason WB, Legedza A, Ock SM, Kaptchuk TJ, Conboy L, Canenguez K, Park JK, Kelly E, Jacobson E, Kerr CE, Lembo AJ. The placebo effect in irritable bowel syndrome trials: a meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 332-340
- 42 Bernstein CN. The placebo effect for gastroenterology: tool or torment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1302-1308
- 43 Pitz M, Cheang M, Bernstein CN. Defining the predictors of the placebo response in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 237-247
- 44 Walach H, Sadaghiani C, Dehm C, Bierman D. The therapeutic effect of clinical trials: understanding placebo response rates in clinical trials--a secondary analysis. *BMC Med Res Methodol* 2005; 5: 26
- 45 Bian Z, Wu T, Liu L, Miao J, Wong H, Song L, Sung JJ. Effectiveness of the Chinese herbal formula TongXieYaoFang for irritable bowel syndrome: a systematic review. *J Altern Complement Med* 2006; 12: 401-407
- 46 王吉耀. 循证医学与临床实践. 第1版. 北京: 科学出版社, 2002: 81

电编 何基才 编辑 王晓瑜

胃蛋白酶原和胃癌相关抗原与胃癌的研究进展

周红凤, 刘丹, 吴瑾, 王雯

■背景资料

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其病死率居各种恶性肿瘤之首。早期诊断对胃癌的预后具有重要意义。PG, MG-7是目前得到研究最多也是最重要的与胃癌早期诊断相关的肿瘤标志物。

周红凤, 刘丹, 吴瑾, 王雯, 黑龙江省哈医大附属肿瘤医院内七科 黑龙江省哈尔滨市 150081
黑龙江省科技攻关项目课题, No. GB05C402-02
通讯作者: 吴瑾, 150081, 黑龙江省哈尔滨市, 哈医大附属肿瘤医院内七科. xianliu@public.hr.hl.cn
电话: 0451-88637888 传真: 0451-86298730
收稿日期: 2007-01-02 接受日期: 2007-03-17

A review of advances related to pepsinogen and MG7Ag in gastric cancer

Hong-Feng Zhou, Dan Liu, Jin Wu, Wen Wang

Hong-Feng Zhou, Dan Liu, Jin Wu, Wen Wang, the Seventh Department of Internal Medicine, the Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Supported by: Ministry of Science and Technology of Heilongjiang, No. GB05C402-02

Correspondence to: Jin Wu, the Seventh Department of Internal Medicine, the Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. xianliu@public.hr.hl.cn

Received: 2007-01-02 Accepted: 2007-03-17

Abstract

Gastric cancer is a common malignant tumor in China and has a high mortality rate. Early diagnosis is important for prognosis in gastric cancer. Developments in the fields of immunology, biochemistry, molecular biology, cell engineering and euphenics have resulted in the determination of many tumor markers with clinical value. In this report, we review the molecular constitution, disposition, and bionomics of pepsinogen (PG) and MG-7 and their relationships with gastric cancer to evaluate the respective clinical values for early diagnosis.

Key Words: Pepsinogen; MG7Ag; Tumor markers; Gastric cancer

Zhou HF, Liu D, Wu J, Wang W. A review of advances related to pepsinogen and MG7Ag in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1940-1946

摘要

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其病死率居

各种恶性肿瘤之首, 早期诊断对胃癌的预后具有重要意义。近年来随着免疫学、生物化学、分子生物学、细胞工程学和遗传工程学及其相应新技术的发展, 发现了许多具有一定临床价值的肿瘤标志物。本文综述胃蛋白酶原(PG), 胃癌相关抗原(MG-7 Ag)的分子结构、分布、生物学特性及其与胃癌的关系, 并评价其对早期胃癌诊断的临床价值。

关键词: 胃蛋白酶原; 胃癌相关抗原; 肿瘤标志物; 胃癌

周红凤, 刘丹, 吴瑾, 王雯. 胃蛋白酶原和胃癌相关抗原与胃癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(17):1940-1946

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1940.asp>

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其病死率居各种恶性肿瘤之首^[1], 严重地威胁着人民生命健康。国内各医院胃癌手术后的5 a生存率为30%-50%, 其中进展期约为40%, 早期约为90%, 早期诊断和治疗胃癌成为提高患者生存质量、降低其死亡率的唯一途径。目前诊断胃癌的主要方法是纤维胃镜和上消化道造影检查, 其中胃镜被称为是确诊胃癌的“金标准”。由于这两种检查方法必须要求具备先进的仪器设备和专门的操作人员, 技术要求高, 费用较贵, 而且下胃镜又令患者很痛苦, 结果使不少患者望而却步, 对亚临床症状患者尚不能作为普查手段。而且, 早期胃癌缺乏一定的特异性症状与体征, 一般的消化道症状经对症治疗后会暂时好转, 当出现明显的临床症状而来就诊时, 往往病情已属中、晚期, 使胃癌难以早期发现, 失去最佳的治疗时机, 影响胃癌的预后。这使得人们希望能有一种简便、快速、重复性好、非介入性、便于动态监测等优点的检查方法, 能筛选出胃癌的高危人群, 最好对胃癌能进行早期诊断。

近年来, 肿瘤标志物的研究与应用在肿瘤学中已成为一个引人注目的新领域。肿瘤标志物

(tumor markers, TM)是指肿瘤组织和肿瘤细胞由于癌基因或抑癌基因和其他肿瘤相关基因及其产物异常表达所产生的抗原,而在正常组织或良性疾病时不表达或表达甚微,他反映了癌的发生和发展过程及肿瘤相关基因的激活或失活程度,可在肿瘤患者组织、体液和排泄物中检出。此外,由于肿瘤组织浸润正常组织,引起机体免疫功能和代谢异常,产生一些生物活性物质和因子,虽然这些物质和因子特异性低,但与肿瘤发生和发展有关,也可用于肿瘤的检测,因此也将其称为肿瘤标志物。理想的肿瘤标志物应符合以下条件: (1)敏感性高; (2)特异性高; (3)肿瘤标志物浓度和肿瘤大小、转移、恶性程度有关,能协助肿瘤分期和预后判断; (4)半衰期短,有效治疗后浓度很快下降,较快反映体内肿瘤的实际状况; (5)存在于体液特别是血液中易于检测^[2]。应用肿瘤标志物早期诊断目前面临诸多难题,尚未找到一种高灵敏度、高特异性的指标^[3]。因为,同一肿瘤可含有一种或多种肿瘤标志物,而不同或同种肿瘤的不同组织类型既可具有共同、也可有不同的肿瘤标志物。已有的研究表明,选择一些特异性较高的肿瘤标志物联合测定某一肿瘤优于单一指标,有利于提高检出的阳性率^[4]。而且,合理选用肿瘤标志物,常可在临床症状出现之前数月鉴别出复发和转移。因此多种肿瘤标志物的联合检测是胃癌研究的一个发展方向。目前,人们对肿瘤标志物PG, MG-7研究较多,认为他们对诊断胃癌的诊断价值较高,本文予以综述。

1 胃蛋白酶原(PG)

1.1 PG的结构、分布与生物学特性 PG是一种门冬氨酸蛋白酶前体,是分子质量为42 kDa的单链多肽,包括3个二硫键,等电点为3.7。人类PG依其电泳迁移率可以分为7个组分,较快移向阳性的1-5组分的免疫原性近似,称为胃蛋白酶原I (PG I 或PGA),主要由胃腺的主细胞和黏液颈细胞分泌;组分6-7被称为胃蛋白酶原II (PG II 或PGC),除由胃体和胃底黏膜的泌酸腺的主细胞分泌外,泌酸腺的黏液颈细胞、贲门腺和胃窦的幽门腺的黏液细胞以及十二指肠上段的Brunner腺也能产生PG II。胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的基因位点、免疫反应性及生化特性上均存在一定差异。不同种的PG的产生似乎与以下几种因素相关:结构基因的数量、个体等位基因的差异以及翻译后的修饰^[5]。胃蛋白酶原

无活性,在胃内盐酸作用下,或在酸性条件下,通过自身催化,从N端水解42个氨基酸残基后而转变为有活性的胃蛋白酶。胃蛋白酶为内切酶,可分解大部分蛋白质为肽和胨,产生的多肽或氨基酸较少。在PG转变成胃蛋白酶的过程中,分子量由42 kDa降为35 kDa,等电点由3.7降为-1。主细胞中的PG贮存在细胞顶部的分泌颗粒中,当细胞受到刺激时,通过胞吐作用大部分释入腺腔,只有1%进入血液循环。在正常人血清中的PG I 浓度是PG II 的6倍。在不同物种间,PG的激活机制有很大的差异,至今还没有完全阐明^[6]。其信号转导途径的刺激-分泌耦合机制至少包括两条途径:一条途径是以CAMP为介质,另一条途径似乎与细胞内的CA浓度变化相关。

因为胃几乎是PG的唯一来源,并且在分泌阶段的分泌量会发生变化,血清PG I 和PG II 反映了胃黏膜腺体和细胞的数量,也间接反映了胃黏膜不同部位的分泌功能。胃酸分泌过多的浅表性胃炎和*H pylori*感染的胃炎,PG I 和PG II 的分泌会增加;而在慢性严重萎缩性胃炎当主细胞减少时PG I 含量下降;当萎缩性胃炎伴有肠化、胃窦腺假幽门腺化生,PG II 含量会随之增高。当肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)、不典型增生(displasia, DYS)和胃癌时,PG I 分泌会减少,PG I /PG II 也会发生变化,血清PG可作为监测胃癌的一个可靠的标志物^[7-9]。高浓度的PG I 还作为十二指肠溃疡及其并发症的危险性的一个亚临床指征,也可以作为观察*H pylori*感染根除治疗疗效的一个指标。

1.2 PG与胃癌 胃癌是由癌前病变逐渐发展而致的,凡与胃癌发病有关因素也均与癌前病变进展有关。在这方面很多学者都做了大量的流行病学研究。1998年Yashihara对10 966例健康居民实施SPG和胃镜检查。在PG I 和PG I /PG II 的比值下降的人群中,胃癌发生率远高于PG不下降者,检出的胃癌有90%属于早期,远高于常规临床56.9%的早期诊断率。1999年日本学者Kitahara *et al*^[10]以PG加胃镜活检普查了5113人,以血清PG I <70 μg/L及PGR<3为界值,对胃癌诊断的敏感度为84.6%,特异度为73.5%。张祥宏 *et al*^[11]通过对1504名受检居民随访发现,PG异常组居民胃黏膜腺体萎缩和腺上皮不典型增生的发生率达70.0%,肠化生的发生率也超过50.0%,明显高于SPG正常居民($P<0.01$),并认为SPG异常居民胃黏膜多有明显的癌前病变,是胃癌高危人群。据报道有80%以上的胃癌伴有萎缩性胃

■研究前沿

就目前的检测技术而言,肿瘤直径在2-3 mm左右甚至更小时,即有可能通过检测这些标志物测出,但因为胃癌mAb与其他肿瘤及胃黏膜的非癌性病变都存在不同程度的交叉反应,能作为诊断胃癌金标准的肿瘤标志物尚未真正发现。本研究发现MG7抗原,胃蛋白酶原作为一种新的肿瘤标志物,对于胃癌的早期诊断和筛选,以及胃癌术后复发与转移的检测都有重要的意义。

■创新盘点

近年来,肿瘤标志物的研究与应用在肿瘤学中已成为一个引人注目的新领域。多种肿瘤标志物的联合检测是胃癌研究的一个发展方向。由于MG7Ag、PG在产生和分泌的机制上有不同之处,在胃癌的侵袭转移中发挥着不同的作用,联合检测在诊断胃癌的敏感度和特异度方面可实现互补,应用于临床,有望提高胃癌总的诊断水平。

炎,而大约10%的萎缩性胃炎可发展成胃癌。许多学者认为^[12-16]萎缩性胃炎可导致黏膜主细胞的丧失,从而影响分泌功能,引起血清PG I, PG I/PG II比值逐渐下降,通过SPG检测来判断胃黏膜的萎缩程度,与正常健康者相比,胃癌患者PG I, PG I/PG II比值下降是属于有意义的降低。蒋孟军 *et al*^[17]研究认为,胃癌患者PG I较正常健康者相比明显下降,SPG II因为分布较广、变化不大,PG I/PG II能够比较全面的反映胃黏膜病变情况,胃癌患者PG I/PG II比值明显降低。

另有学者报道,血清PG I含量的变化是判断早期胃癌分化程度的一个亚临床指标,但结果说法不一,是有待于进一步研究探讨的课题。2000年Kalinovskii *et al*^[18]报道,胃癌和慢性胃炎患者的血清PG含量急剧下降,低分化癌患者PG I含量(37.4 $\mu\text{g/L}$)更低于分化较好的胃癌患者的血清PG含量(58.2 $\mu\text{g/L}$)。而吕国强 *et al*^[19]通过对正常对照组、胃癌组、胃癌术后组的血清PG检查比较发现:(1)胃癌组PG I, PG I/PG II明显降低,尤其是早期胃癌降低更有临床意义,这与胃黏膜细胞的萎缩、肠化分泌降低有关。(2)早期高分化胃癌组织可能是广泛地存在肠化生腺细胞、进展期胃癌则可能存在更多的腺细胞萎缩性炎症,而导致PG I分泌减少;而早期低分化胃癌组织认为可能不存在广泛的萎缩和肠化。胃黏膜细胞早期出现异型增生时,细胞逐渐增殖,幼稚细胞含量较高。由于PG I在胚胎胃黏膜中高度表达,胃幼稚细胞能分泌一定量的PG I,因PG II主要在成熟的腺细胞中产生,故而早期低分化胃癌组织的PG I明显高于高分化胃癌组织。

血清PG含量还可以作为胃癌术后复发与转移的检测指标。胃癌术后血清PG I, PG II数值有助于了解残胃黏膜腺体的分泌状况。组织化学研究表明^[20],胃癌细胞本身能够分泌PG I, PG II。Yamaguchi *et al*^[21]认为具有分泌功能的胃癌细胞增殖同样会引起血清中PG的含量变化。当全胃切除患者血清中PG下降到很低水平时,这种变化就会表现出来。许多学者对胃癌根治术后PG变化进行追踪调查,认为PG I, PG II相对性升高是胃癌复发的临床指标之一。胃癌根治术后长期呈良性状态的患者,血清中PG I, PG II无明显变化,分别为 4.17 ± 0.51 和 32.2 ± 3.83 $\mu\text{g/L}$,分别为正常值的1/15和1/12。但胃癌复发时血清PG I常明显升高,因而认为血清中PG I检测对诊断复发、有无转移有意义^[22]。肖志坚

*et al*在此方面研究也有类似报道^[19,23],认为一般胃癌细胞分泌的PG由于受正常细胞分泌的影响,在血清中的变化不能察觉。当胃全切后,如PG再次上升,极可能为部分有分泌功能的癌细胞转移增殖的结果,从而可以尽早发现复发。幼稚细胞的增殖使分泌PG I的量增高,而PG II的增高可能是由于高分化管状或乳头状腺细胞分泌所致。由此提示,转移的癌细胞与原发的胃癌细胞有同源异质性,因此全胃切除术后,检测血清PG I, PG II含量是判断其是否复发的可靠依据。

PG作为一种新的肿瘤标记物,对于胃癌的早期诊断和筛选,以及胃癌术后复发与转移的检测都有重要的意义,以PG作为肿瘤标记物的方法目前在我国还未普及。SPG测定常用放免法与酶学法,由于测定方法不断完善,其对SPG值影响已经很小。许多研究表明,因为PG浓度会因为国家、种族以及其他一些膳食因素、感染因素、饮食习惯的影响而不同,对于具体的血清PG浓度多大可以确诊胃癌还没有统一的标准,因而在以SPG变化作为胃癌早期诊断、筛选与全胃切除术后复发和转移指标时,应对受检者个人情况予以足够重视。

2 胃癌抗原(MG7Ag)

2.1 MG7Ag的结构、分布及生物学特性
MG7Ag是由鼠源性抗人胃癌mAb(胃癌细胞株MKN-46-9作为免疫原免疫BALB/C小鼠)MG7新发现的一个胃肠肿瘤相关抗原,为中性糖脂,抗原决定簇位于糖链上,属糖蛋白抗原,具有分泌性抗原的特点,即在细胞内合成,进而分泌到细胞外。MG-Ags在细胞中的分布形式大致分为4种:胞质型、胞膜型、胞外型及混合型。胞质型和胞膜型分别指抗原主要分布在癌细胞的胞质内或胞膜上,胞外型指癌腺腔内或癌细胞周围的黏液物质中有阳性抗原存在,但癌细胞本身阴性,混合型是上述两种形式同时存在,实际上多数病例属于混合型。抗原分布的差异可能与癌细胞所处的增殖周期不同有关。电镜观察发现,由于不同类型胃癌的细胞分化程度差异较大,MG7抗原物质的分布也明显不同。高分化腺癌,其细胞分化好,异型性小,其抗原主要表现在细胞膜和腺腔的微绒毛上,胞质内很少;低分化腺癌或未分化细胞癌,其抗原分布广泛,阳性物质在细胞膜和胞质内均可见到,呈散在性分布,在低分化腺癌的高尔基复合体、粗面内质网及核膜上,也有抗原存在;未分化细胞癌只

在胞质内有少量抗原物质; 在黏液腺癌, MG7阳性产物位于黏液较多的部位, 分布较均匀; 在黏液细胞癌, 抗原物质除见于黏液及胞质外, 细胞膜上也有阳性产物, 分布不均匀. 因此可以推测, 低分化腺癌的生物行为改变以胞质为主; 高分化腺癌生物行为改变主要在细胞表面; 未分化的癌细胞分泌抗原的活性差; 而黏液腺癌和黏液细胞癌, 抗原物质含量较多, 其原因可能是由于此类型的细胞在癌变后, 其蛋白生成基因更活跃, 分泌活性旺盛, 产生了较多的抗原物质. 胃黏膜上皮细胞在癌变过程中所发生的形态、生化及抗原性的改变, 与基因的损伤和控制失调有关, 不同类型的胃癌, 由于其遗传性改变不一, 其抗原表达的顺序和组型也不同^[24]. 因此, 通过观察抗原表达情况, 有助于胃癌的病理分型、免疫治疗监测和预后判断^[25].

2.2 MG7Ag与胃癌 以往应用多株MG单抗混和包被载体建立的IRMA方法对胃癌获得较高的敏感性, 然而同时也增加了假阳性. 经过不断的试验, 已改为以单纯MG7单抗包被载体的IRMA方法, 从而使特异性大大提高. MG7抗原作为胃癌相关抗原, 其产生、表达和消长反映着胃癌细胞的某些生物学行为改变. 此种抗原在胃癌或癌前病变组织内表达具有较高的敏感性和特异性, 在血清中敏感性优于TAG72、CA19-9等指标, 且随着新技术如免疫-PCR技术的建立, 血清阳性率进一步提高, MG7Ag基本具备了肿瘤标志物的诊断、监测病情、判定疗效等作用, 已被较为成熟的应用于免疫组化、细胞学、放射免疫自显影等实验技术中, 是值得深入研究的肿瘤相关抗原.

有报道MG7Ag在胃癌组织中有80%-94%的阳性表达率^[26], 是研究和诊断胃癌的有效标志物之一. 但由于入血的抗原少且很快被破坏或代谢, 原有的一些检测手段敏感度不够, 故血清中的检出阳性率偏低^[27-28], 国内资料显示基本为40%-60%, 但无论血清还是组织中MG7Ag对胃癌的特异性均很高^[29]. 任军 *et al*^[30]在DNA重组基础上, 结合抗原抗体反应的专一性与PCR技术的高敏感性, 成功构建检测血清MG7Ag的免疫-PCR技术, 大大提高了血清学检测的敏感性, 樊代明 *et al*将此技术用于临床胃癌的血清学诊断, 结果满意>80%, 王曾怡 *et al*^[31]检测胃癌血清MG7Ag, 阳性率达到84%. 黄立群 *et al*^[32]利用此技术研究结果显示, 胃癌组与慢性胃炎组MG7Ag阳性率比较有非常显著差异, 说明

MG7Ag首先具备了肿瘤标志物区分良恶性的能力, 其次MG7Ag诊断胃癌的敏感性为81.48%, 特异性为90.90%, 与众多学者报道的MG7Ag对胃癌的高特异性相符合, 且阳性患者与胃癌的病变早晚无关, 说明在胃癌早期血清中即存在MG7Ag, 可以认为MG7Ag是一种具有早期诊断意义的胃癌标志物; 胃癌患者术后MG7Ag含量明显下降, 对晚期胃癌患者经胃镜局部注射化疗药物后, 病灶有所缩小, 血清MG7Ag也轻度下降, 以上结果说明MG7Ag含量的高低与肿瘤的消长有密切关系, 连续测定MG7Ag有助于观察疗效、推测预后等. 另有学者检测了胃液MG7Ag的含量, 结果发现胃液MG7Ag检测对胃癌诊断的敏感性为82%, 特异性为70%, 提示胃液MG7Ag检测对胃癌诊断有重要价值. 慢性胃炎伴胃黏膜肠上皮化生及异常增生被认为是重要的胃癌前病变. 黄立群 *et al*^[32]发现胃癌前期病变患者血清MG7Ag阳性率明显高于慢性胃炎($P<0.01$), 提示癌变过程异常增生的胃上皮具有的抗原性质发生了改变, 继之出现了MG7Ag的表达, 对这些患者予以随访观察, 结合胃镜检查, 可提高早期胃癌的检出率. 胃黏膜上皮异型增生的患者, 黏膜组织内有MG7Ag的表达, 表明其可能具有与胃癌相似的生物学性状. 陈李华 *et al*^[33]运用MG7对74例胃癌, 23例癌旁肠化黏膜及18例正常胃黏膜抗原表达意义及预后进行探讨, 结果前两者皆有阳性表达, 正常组均为阴性, 三组间有显著性差异; 其表达强度与胃癌组织学类型、浸润深度和淋巴结转移等无明显关系, 并观察到随着抗原表达强度的增加, 胃癌5 a生存率逐渐增高, 但无显著性差异, 其原因有待于进一步的探讨. 刘杰 *et al*^[34]研究认为MG7Ag表达状况和癌变关系密切, MG7Ag表达阳性的胃黏膜不典型增生, 尤其当平均灰度值(高危界值)大于0.19的病例, 是具有潜在癌变倾向的高危人群, 对这些患者进行严密的监测随访, 会提高早期胃癌的检出率. 其他一些可能与胃癌有关的病变如萎缩性胃炎、胃黏膜肠上皮化生等也有类似的结论^[35].

3 PG, MG-7用于胃癌的联合检测

3.1 联合检测中肿瘤标志物的选取 肿瘤标志物在临床应用上有很大价值, 这是因为肿瘤标志物在患者血清中的含量往往和肿瘤组织的生长消退或转移有直接的定量关系, 用免疫学或生物化学方法在血清中检出一个显著增高的肿瘤

■应用要点

胃癌高危人群及癌前疾病的有效筛查是提高胃癌早期诊断率从而降低胃癌死亡率的关键措施之一, 有望将MG-7Ag、PGC作为胃癌前病变随访, 进行癌变风险预测以及早期诊断胃癌的预警标志物, 应用于临床.

■同行评价

本文对目前研究比较多的肿瘤标志物PC、MG-7与胃癌的关系进行了详细的综述,认为他们对诊断胃癌的价值比较高,对于临床有一定的参考意义。

标志物来诊断肿瘤是一个理想的诊断方法。从1864年Bence-jones首先发现本周氏蛋白并作为多发性骨髓瘤的实验室诊断依据以来,许多科学家致力于这方面的研究,希望找到有高度敏感性、高特异性的肿瘤标志物,并应用于肿瘤临床诊治的不同阶段。经过多年的研究,人们发现兼顾两者的理想的标志物很难找到。但是同一种肿瘤可能有不止一种标志物,同一种标志物也可能在不同的肿瘤中出现,这一特点为临床选择高灵敏度或高特异性检测肿瘤提供了灵活而多样的结合方式。对于某一特定的肿瘤来说,可同时选定几种特异性较高的指标,互相补充,提高诊断的阳性率。肿瘤标志物的联合应用有利有弊,并非检测的标志物越多越好,如应用不当,不仅增加工作量和经济负担,且检测结果也易引起误导。尽管采用四项或者五项指标联合检测还能提高灵敏度,但是其特异性和诊断准确度均呈下降趋势,费/效比提高。兼顾特异度与敏感度,是较合理的组合。肿瘤标志物另一重要的特性就是预测价值,其依据是Bayes法则。可用阳性预期值(PPV)和阴性预期值(NPV)来表示。PPV与NPV不仅与灵敏度与特异性有关,还与人群的患病率有关。某一肿瘤标志物的灵敏度、特异性、PPV、NPV不是固定不变的,而是依赖于选定的临界值。将临界值提高,可增加特异性,但灵敏度随之降低;反之,将临界值降低,则灵敏度提高,但特异性下降。总之在联合应用时,一定要做仔细的分析,才能使联合检查达到尽可能“完美”的程度。

3.2 联合检测的常用方法 肿瘤标志物联合应用常采用:(1)并联法:对同一患者同时作多种标志物检测,其中一种或一种以上阳性即为阳性,提高了阳性率,但亦导致特异性下降,容易造成阴性时否定诊断的价值较大,而阳性时诊断价值下降。(2)序贯法:一种标志物检测阳性后才作第二种,依次类推,阴性时则不再继续,其结果是特异性提高而敏感性下降,阳性结果对肯定诊断有较大意义,而阴性结果对否定诊断的意义降低。有人认为标志物联合应用可以任二项阳性为诊断标准较为合适,兼顾了敏感性、特异性和准确性。与胃癌相关的肿瘤标志物中,目前大多还没有统一的标准检测方法,得出的结果还有相互矛盾的地方,有待进一步研究。

3.3 客观评价检测结果 如何应用肿瘤标志物客观的评价手术、放疗或药物治疗是否有效呢?有的肿瘤标志物可反映肿瘤残存量,这种定量

关系十分重要。任何标志物浓度的居高不下,均与残留肿瘤不断产生肿瘤标志物有关,表示手术切除得不完全,或肿瘤抗药,或肿瘤复发。虽然目前尚无一种能被普遍认可的、用肿瘤标志物浓度来评价治疗有效性的标准,但Beastall提出的方案是值得重视的。即无效:则浓度与治疗前相比下降<50%;改善:肿瘤标志物浓度与治疗前相比下降>50%;有效:肿瘤标志物浓度与治疗前相比下降>90%;显效:肿瘤标志物浓度下降至非恶性肿瘤的参考值内。治疗中或治疗后肿瘤标志物浓度变化有3种基本类型:(1)浓度下降到正常水平,提示肿瘤全部除去或病情缓解;(2)浓度明显下降但仍持续在正常水平以上,或短期下降到正常水平后又重新增高,提示有肿瘤残留和(或)肿瘤转移;(3)浓度下降到正常水平一段时间后(约数月)后,又重新增加,提示复发或转移。应注意,如化疗、放疗或手术后立即测定肿瘤标志物浓度,可能会有短暂的升高,这是由于肿瘤坏死所致。另外,化疗、放疗或手术后肿瘤标志物浓度重新恒定升高,可能表示治疗无效,应尽可能改用其他治疗方式。并不是同一器官的肿瘤均表达相同的肿瘤标志物,为了确定何种肿瘤标志物适宜监测疗效,最好在手术前检测一组肿瘤标志物,然后选择升高的作为检测指标。但注意即使某些肿瘤标志物在手术前浓度不增加,也可能可以作为预示复发和转移的指标。不同的患者、不同的肿瘤制定不同的测定时间表。一般而言,治疗前应测定每个患者肿瘤标志物的原始值,治疗后1-2 a,应每月测定(测定时间应根据具体指标的半衰期,通常在2-14 d完成),至浓度明显下降后,每3 mo测定一次。第3-5年,应每年测定1-2次。第6年起,每年1次。但每次改变治疗之前、肿瘤标志物浓度增加或怀疑复发和转移时,均应及时测定。特别在病程监测中,肿瘤标志物的浓度增加或降低与疾病的预后密切相关。

3.4 PG、MG7Ag在胃癌联合检测中的应用 肿瘤细胞在倍增过程中,遗传基因容易发生变异,因此,每个肿瘤实体中都存在生物学特性有很大不同的细胞,细胞表面的受体、抗原表位、表达的基因产物、生长速度、浸润性、转移性,对化疗与放疗的敏感性等方面都可能相去甚远。这些细胞在肿瘤标志物(TM)的合成、表达、释放等方面可能不尽相同。因此,一种肿瘤常常可能产生多种TM。联合检测数种TM,将有可能取长补短,提高对肿瘤的总的诊断水平。一

个新的肿瘤标志物只有通过临床诊断试验才可以确定标志物临床应用价值的大小, 回答他能否取代已有标志物, 是否值得推广等问题. 大量文献证实PG, CA72-4, MG7Ag对胃癌具有较好的敏感性和特异性, 因此在胃癌的检测分析中有不可替代的作用. 刘军 *et al*^[36]利用RIA法对胃癌患者血清MG7Ag、TAG-72进行联合检测, 两者诊断胃癌的敏感性分别为52.8%和69.4%, 特异性分别为86.2%和84.5%, 而两者联合检测可提高胃癌的阳性检出率, 达到86.1%. 杜同信 *et al*^[37]报道二者的联检阳性率85.5%, 特异性也较高, 为93.3%. CA72-4+CA19-9阳性率低于MG7Ag+TAG-72的阳性率. 李建刚 *et al*^[38]利用免疫放射分析法(Immunoradiometric assay, IRMA)对胃癌患者CEA, CA19-9, CA72-4, MG-7Ag进行单项及联合检测, 检测结果表明, 单项检测阳性率均>70%, 但以MG-7Ag阳性率最高(90.4%), 次为CA72-4(84.2%). 两两组合进行双项联合检测, 按双阳性分析, 结果显示MG-7Ag+CA72-4组合阳性率最高(70.6%). 因此认为单项筛选检测, 首选MG-7Ag; 双项组合检测首选MG-7Ag+CA72-4为宜. Lin HZ和Chen L报道PG+CA72-4能明显提高胃癌诊断的敏感性和特异性并有助于胃癌手术后的随访与监测, 但其他关于PG与CA72-4或MG-Ag联合检测对胃癌诊断的价值的研究目前极少. 关于试验对照人群的选择, 由于肿瘤标志物将应用于怀疑肿瘤的人群, 而不是无症状的健康人群, 所以国外有文献认为应选择与所研究肿瘤相关的良性病变人群作对照, 但目前国内外文献中以正常人对照亦不少见.

4 肿瘤标志物检测在临床应用的展望

肿瘤标志物历经多个阶段的发展, 逐渐成为癌症临床诊治中越来越重要的组成部分, 由于免疫学, 分子生物学等基础理论研究的深入, 以及其他相关学科发展的推动, 具有更高特异性、敏感性的肿瘤标志物渐渐被人们发现和熟知, 为肿瘤的早期诊断、治疗方案的选择等提供了依据. 最近2 a已有公司推出可同时检测12种肿瘤标志物的蛋白芯片, 对肝、胃、胰腺等10多种器官的恶性肿瘤的诊断敏感性为80%-94%, 诊断特异性为90%-99%, 具有相当高的临床应用价值. 不断寻找和筛选新的肿瘤相关抗原并对其诊断价值作出客观准确的评价, 是提高恶性肿瘤诊断水平的重要途径, 我们期望越来越

多的具有下列特点的肿瘤标志物被发现: (1)敏感性高, 能早期测出所有肿瘤患者; (2)特异性好, 鉴别肿瘤和非肿瘤患者应100%准确; (3)有器官特异性, 能对肿瘤定位; (4)血清中浓度与瘤体大小、临床分期相关, 可用以判断预后; (5)半衰期短, 能反映肿瘤的动态变化, 可根据其水平的升降监测治疗效果、复发和转移; (6)测定方法精密度、准确性高, 操作简便, 试剂盒价廉. 目前胃癌肿瘤标志物的研究非常活跃, 也取得了很多成果, 相信不久的将来会有更大的飞跃.

5 参考文献

- 1 李连弟, 张思维, 鲁凤珠, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 夏毅, 戴旭东, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福. 中国恶性肿瘤死亡谱及分类构成特征研究. 中华肿瘤杂志 1997; 19: 323-328
- 2 李春海. 加强肿瘤生物学标志的研究和评价. 中华检验医学杂志 2000; 23: 6-8
- 3 Kayaba H. Tumor markers: essential diagnostic tools for radiologists. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2003; 63: 133-139
- 4 Gaspar MJ, Arribas I, Coca MC, Diez-Alonso M. Prognostic value of carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Tumour Biol* 2001; 22: 318-322
- 5 Gritti I, Banfi G, Roi GS. Pepsinogens: physiology, pharmacology pathophysiology and exercise. *Pharmacol Res* 2000; 41: 265-281
- 6 Foster C, Aktar A, Kopf D, Zhang P, Guttentag S. Pepsinogen C: a type 2 cell-specific protease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L382-387
- 7 Samloff IM. Pepsinogens I and II: purification from gastric mucosa and radioimmunoassay in serum. *Gastroenterology* 1982; 82: 26-33
- 8 Sipponen P, Harkonen M, Alanko A, Suovaniemi O. Diagnosis of atrophic gastritis from a serum sample. *Clin Lab* 2002; 48: 505-515
- 9 李红涛, 吴开春, 李彩宁, 乔泰东, 郝志明, 王新, 苗继延, 丁杰, 樊代明. 血清胃蛋白酶原诊断胃体黏膜萎缩的研究. 中华内科杂志 2004; 43: 141-142
- 10 Kitahara F, Kobayashi K, Sato T, Kojima Y, Araki T, Fujino MA. Accuracy of screening for gastric cancer using serum pepsinogen concentrations. *Gut* 1999; 44: 693-697
- 11 张祥宏, 卜玉华, 王俊灵, 严霞, 米建民, 赵文元, 张振国, 杨永滨, 三角顺一, 青木一雄. 血清胃蛋白酶原异常居民胃粘膜变化的随访观察. 中国肿瘤临床 2000; 27: 491-494
- 12 程兆明, 张宇川, 陈定驹, 缪才良, 陈琳娜, 李龙. 血清胃蛋白酶原亚群的放免测定对胃癌及其它胃部疾病的诊断意义. 镇江医学院学报 2001; 11: 150-152
- 13 Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K, Costa-Pereira A, Matsukawa M, Kurihara M. Meta-analysis on the validity of pepsinogen test for gastric carcinoma, dysplasia or chronic atrophic gastritis screening. *J Med Screen* 2004; 11: 141-147
- 14 王书奎, 王自正, 夏伟, 傅雷, 杜同信. 胃蛋白酶原免疫放射分析在胃癌诊断中的应用. 中华核医学杂志 2003; 23: 124
- 15 Plummer M, Vivas J, Fauchere JL, Del Giudice G, Pena AS, Ponzetto A, Lopez G, Miki K, Oliver W, Munoz N. Helicobacter pylori and stomach cancer: a case-control study in Venezuela. *Cancer Epidemiol*

- Biomarkers Prev 2000; 9: 961-965
- 16 盛玉祥. 胃蛋白酶原免疫放射分析在胃癌诊断中的意义. 江苏医药杂志 2003; 29: 554
- 17 蒋孟军, 肖志坚, 张荣军, 蔡刚明. 血清胃蛋白酶原 I、II 与胃泌素联合检测对胃癌诊断的临床意义. 标记免疫分析与临床 2004; 11: 131
- 18 Kalinovskii VP, Gamaiunova VB, Shumakov AP, Khanson KP. Radioimmunoassay of serum pepsinogen I in chronic gastritis and stomach cancer. *Vopr Onkol* 2000; 46: 153-155
- 19 吕国强, 肖志坚, 沈安东, 俞宪明, 蒋孟军, 金坚, 马荣赓. 胃蛋白酶原亚群在胃癌及其术后血清含量变化的临床价值. 中华消化杂志 1999; 19: 265-266
- 20 Fernandez R, Vizoso F, Rodriguez JC, Merino AM, Gonzalez LO, Quintela I, Andicoechea A, Truan N, Diez MC. Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 508-514
- 21 Yamaguchi T, Takahashi T, Yokota T, Kitamura K, Noguchi A, Kamiguchi M, Doi M, Ahn T, Sawai K, Yamane T. Urinary pepsinogen I as a tumor marker of stomach cancer after total gastrectomy. *Cancer* 1991; 68: 906-909
- 22 Kodama M, Koyama K, Tsuburaya Y, Ishikawa K, Koyama H, Narisawa T, Uesaka Y. Group I pepsinogen for early detection of gastric cancer recurrence after total gastrectomy. *World J Surg* 1990; 14: 94-99; discussion 99-100
- 23 肖志坚, 蒋孟军, 肖华龙, 吕国强, 程兆明, 王博诚. 胃癌患者全胃切除后血清PG I, PG II 含量变化与胃癌复发的关系. 癌症 2000; 19: 66-68
- 24 Chung YS, Yamashita Y, Kato Y, Nakata B, Sawada T, Sowa M. Prognostic significance of T antigen expression in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 1768-1773
- 25 Takahashi I, Maehara Y, Kusumoto T, Kohnoe S, Kakeji Y, Baba H, Sugimachi K. Combined evaluation of preoperative serum sialyl-Tn antigen and carcinoembryonic antigen levels is prognostic for gastric cancer patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 163-166
- 26 房殿春, 刘为纹. 8种肿瘤相关抗原在活检胃粘膜病变组织中的表达. 内镜 1994; 11: 259-262
- 27 Tatsuta M, Itoh T, Okuda S, Yamamura H, Baba M, Tamura H. Carcinoembryonic antigen in gastric juice as an aid in diagnosis of early gastric cancer. *Cancer* 1980; 46: 2686-2692
- 28 Takahashi H, Okai Y, Paxton RJ, Hefta LJ, Shively JE. Differential regulation of carcinoembryonic antigen and biliary glycoprotein by gamma-interferon. *Cancer Res* 1993; 53: 1612-1619
- 29 Ren J, Chen Z, Juan SJ, Yong XY, Pan BR, Fan DM. Detection of circulating gastric carcinoma-associated antigen MG7-Ag in human sera using an established single determinant immuno-polymerase chain reaction technique. *Cancer* 2000; 88: 280-285
- 30 任军, 樊代明, 周绍娟, 张学庸, 杨安钢, 李明峰, 陈峥. 免疫聚合酶链反应技术的建立及其对胃癌细胞上MG₇-Ag的检测. 中华肿瘤杂志 1994; 16: 247-249
- 31 王曾怡, 李淑侠, 刘晓薇, 杨荣增. 免疫聚合酶链反应技术检测胃癌血清MG₇-抗原. 陕西肿瘤医学 1999; 7: 206-210
- 32 黄立群, 郭光华, 黄杰雄, 彭秀芸, 任军. 血清肿瘤标志物MG7Ag在胃癌诊断中的意义. 中国医师杂志 2002; 4: 691-692
- 33 陈李华, 黄象谦, 吴琳, 黄乃侠, 黄怀德, 王开明, 彭清壁, 朱志建. 胃癌MG₇抗原表达的意义及与预后的关系. 浙江医科大学学报 1995; 24: 17-20
- 34 刘杰, 林一帆, 张沥, 胡家露, 曹晓燕, 樊代明, 陈希陶, 张学庸. 图象自动分析检测MG7抗原表达预测胃癌高危价值探讨. 中华预防医学杂志 1996; 30: 286-289
- 35 汤礼军, 田伏洲, 麻晓林, 晏才杰, 周丁华. 胃粘膜癌前病变组织中MG7-Ag的表达. 解放军医学杂志 1998; 23: 60-61
- 36 刘军, 左国庆. 血清MG7-Ag和TAG-72在胃癌诊断中的应用. 实用医学杂志 1999; 15: 895-896
- 37 杜同信, 王自正, 陈崇华, 蔡璧. 糖类抗原CA72-4、MG-Ag检测对胃癌的诊断价值分析. 标记免疫分析与临床 1998; 5: 54-55
- 38 李建刚, 陈忠, 刘云, 张军. CEA、CA19-9、CA72-4、MG-Ag单项及联合检测对诊断胃癌的临床价值. 同位素 2002; 15: 58-60

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.

辣椒素对胃黏膜的作用及其机制

王锦, 彭燕

王锦, 彭燕, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

通讯作者: 彭燕, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院 消化内科. lywj21@126.com

电话: 0830-3165331

收稿日期: 2007-02-04 接受日期: 2007-03-17

Effects and mechanism of capsaicin on gastric mucosa

Jin Wang, Yan Peng

Jin Wang, Yan Peng, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yan Peng, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. lywj21@126.com

Received: 2007-02-24 Accepted: 2007-03-17

Abstract

Capsaicin, capsaicin-sensitive afferent neurons (CSAN) and vanillin receptor 1 (VR1) have roles in gastric mucosal injury and renovation. Recent research has demonstrated the protection afforded by capsaicin for gastric mucosa. This treatment could increase gastric mucosal blood flow, promote gastric dynamia, regulate gastric acid and excrete prostaglandin. The effects and the mechanism of capsaicin on gastric mucosa are reviewed.

Key Words: Capsaicin; Gastric mucosa; Effect; Mechanism

Wang J, Peng Y. Effects and mechanism of capsaicin on gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1947-1951

摘要

辣椒素(capsaicin)、辣椒素敏感传入神经元(CSAN)及辣椒素受体(VR1)与胃黏膜损伤及修复密切相关。研究显示辣椒素对胃黏膜具有保护作用,可能与其增加胃黏膜血流、促进胃动力、调节胃酸和前列腺素分泌等因素有关。本文对辣椒素对胃黏膜的作用及其机制的研究进展进行综述。

关键词: 辣椒素; 胃黏膜; 作用; 机制

王锦, 彭燕. 辣椒素对胃黏膜的作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2007;15(17):1947-1951

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1947.asp>

0 引言

辣椒是一种常用的调味料,辣椒素(capsaicin)是辣椒果实中的主要生物活性成分。早在明弘治帝十八年,《食物本草》中写道“辣椒,味辛、温、无毒,具有温中、散寒、开胃、消食之功效”。近年国内外研究发现适量的辣椒素可能对人体胃肠黏膜具有保护作用,对胃肠疾病的治疗具有潜在的应用价值^[1-2]。现就辣椒素对胃黏膜的作用及其机制的研究进展作一综述。

1 辣椒素的理化性质

辣椒素分子式C₁₈H₂₇NO₃,化学名称为反-8-甲基-N-香草基-6-壬烯基酰胺,属酰胺类化合物。辣椒素纯品呈单斜长方形片状无色结晶,熔点65℃,沸点210℃-220℃,易溶于乙醇、乙醚、苯以及氯仿,微溶于二硫化碳^[3]。

2 辣椒素的药理作用

大量研究显示,辣椒素药理作用广泛,具有镇痛、止痒、抗炎、抗氧化、心肌保护及调节血压等作用,近年报道辣椒素在减肥、抗癌等方面也可能有一定的作用^[2]。Epstein *et al*^[4]研究显示辣椒素对带状疱疹后遗神经痛、三叉神经痛、糖尿病神经痛、风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、秃发等有显著疗效,并可用于麻醉和戒毒等方面。膀胱内灌注辣椒素溶液治疗神经源性的膀胱过激和痛觉过敏,患者症状可长时间缓解。研究发现辣椒素的镇痛作用与吗啡相似,但比吗啡更持久,吗啡镇痛时间为6 h,而辣椒素可达7-10 h。辣椒素有一些不良反应,其作用于呼吸道黏膜可引起喷嚏、鼻出血、咳嗽、流泪、呼吸困难等症状,辣椒素作用于皮肤产生灼痛感,并引起局部区域充血,甚至神经源性的炎症反应。

■背景资料

人类食用辣椒素千年,但辣椒素对胃黏膜的生理、药理作用及其机制研究尚少。本文就近年辣椒素对胃黏膜的作用及其机制的研究进展作一概括。

■研究前沿

胃肠道是应激反应的器官之一,胃肠黏膜屏障功能的研究是目前国内外消化领域研究的热点.辣椒素与胃黏膜血流、胃动力、前列腺素、P物质(SP)、神经激肽A、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管活性肠肽(VIP)等的改变目前尚在研究中.

3 辣椒素敏感传入神经元及辣椒素受体

辣椒素通过选择性刺激初级传入神经元末梢和细胞膜上特殊的受体而产生作用,这一受体称为辣椒素受体,又称香草醛受体亚型1(vanillin receptor subtype 1, VR1),此类传入神经元命名为辣椒素敏感传入神经元(capsaicin-sensitive afferent neurons, CSAN). 1997年Julius在大鼠的cDNA文库中首次成功克隆出VR1. 研究显示VR1广泛分布在脊髓背根神经节、三叉神经节和迷走神经节的中、小神经元上,因此被认为是一种神经系统特异性受体. 近年来发现一些非神经组织也有VR1的分布,如胃肠道、肝、肺、支气管、膀胱上皮、肥大细胞、角质细胞、巨噬细胞等,可能参与调节多种组织、器官的生理功能^[5-6]. 研究证实VR1是组织接受伤害性化学和物理刺激的感受器,能被伤害性热刺激(>43℃)、酸性(pH<5.9, 室温)和生物碱如辣椒素激活^[7],在炎症产生和痛觉传递中发挥重要作用. Caterina *et al*^[8]培育的VR1阴性小鼠sc辣椒素,喝辣椒水无疼痛抗拒行为,体外培养的VR1阴性小鼠的初级感觉神经对各种有害刺激的反应都严重减弱了.

辣椒素的药理作用复杂,有趣的是不同剂量的辣椒素或辣椒素给药的不同时期对机体产生的作用效果极大不同. 辣椒素初次施用可引起患者烧灼样的刺痛感,施用区局部血管扩张,形成一个痛觉过敏区并可引起神经源性炎症反应. 继续使用辣椒素,神经元变得迟钝,对辣椒素及其他一些伤害性致痛刺激无反应性,即产生“脱敏”作用. 辣椒素小剂量时对CSAN有强烈的刺激作用,但大剂量时可引起神经递质的过量释放,导致CSAN受到长期损害,失去其信息传入功能,称为辣椒素的化学“去神经”作用. 辣椒素又是一种兴奋性毒素,用量过度有神经毒性作用,可引起传入神经的纤维变性、坏死,此作用已经不可逆转. 在新生动物身上大剂量使用辣椒素,可使部分体积较小的神经元细胞死亡,进而造成动物永久性痛觉丧失. 辣椒素的剂量与药理作用是当前研究的热点,多数学者报道在大鼠身上辣椒素用量≥50 mg/kg即可引起化学“去神经”作用^[9]. Richeux *et al*^[10]研究发现29.3 μmol/L的辣椒素就使细胞无法结合α-1酸性糖蛋白,50 μmol/L的辣椒素能诱导DNA链断裂,60 μmol/L的辣椒素可以抑制50%的蛋白质合成. DNA链的断裂或损害导致了神经细胞死亡或基因突变,除神经细胞外,高浓度

的辣椒素还可抑制猴肾细胞及鳞状上皮细胞的蛋白合成.

4 辣椒素对胃黏膜的作用

流行病学资料表明^[1],居住在新加坡的中国人比马来人和印地安人患溃疡病高3倍,认为与中国人较少食辣椒有关. 意大利学者试用辣椒素治疗功能性消化不良,从第3周起辣椒素组上腹痛、饱胀、恶心等症状评分明显低于安慰剂组,第5周末辣椒素组的症状评分从基线下降约60%,而安慰剂组仅下降约30%^[11]. 近几年研究显示适量的辣椒素对胃黏膜具有保护作用,并能促进溃疡愈合^[1]. 辣椒素可预防或明显减轻由盐酸、乙醇、酸化阿司匹林和出血性休克等引起的大鼠胃黏膜损伤^[13-15]. 蒋海清 *et al*^[12]报道胃溃疡患者口服红干辣椒粉可促成溃疡愈合,并有抑制幽门螺杆菌的作用. 李林 *et al*^[13]用800 g/L 辣椒煎剂喂饲大鼠,1 h后未见胃黏膜有明显损伤.

辣椒素对胃黏膜的作用与辣椒素的剂量有关. Sobue *et al*^[14]研究表明,小剂量辣椒素灌注于大鼠胃内产生胃黏膜保护作用,并在早期加速胃黏膜的修复,但大剂量的辣椒素“去神经”后该作用减弱或消失. 蒋海清 *et al*^[12]研究结果表明,灌服50 g/L辣椒煎液6 d有促成盐酸造成的大鼠急性胃黏膜损伤愈合的作用. Takeuchi *et al*^[15]报道应用辣椒素后盐酸乙醇所致的胃黏膜损伤减轻,当辣椒素浓度超过0.6 g/L (5 mg/kg)以上时,显示出和浓度相关的黏膜保护作用;研究还发现在先给予消炎痛或对神经麻痹时,辣椒素对盐酸乙醇所致的胃黏膜损伤的保护作用明显减弱,甚至完全消失. Teng *et al*^[16]报道预先给予大鼠辣椒素(5 mg/kg),可有效地减轻失血性休克所致的胃黏膜损伤,而预给予辣椒素(125 mg/kg)则产生“去神经”作用,使辣椒素的胃黏膜保护作用消失.

5 辣椒素对胃黏膜的作用机制

研究表明消化道内分布有很丰富的CSAN及VR1^[17-18],他们在维持胃肠黏膜的正常机能、对抗多种侵袭因素中发挥重要的作用^[19-25]. Faussone *et al*^[26]应用免疫组化及Western Blot研究显示胃黏膜层、黏膜下层以及壁细胞的神经末梢有VR1的分布,并发现在胃壁细胞线粒体上也有VR1分布. 辣椒素对胃黏膜的作用机制目前尚不完全清楚,可能与下列因素有关:

5.1 增加胃黏膜血流量 CSAN为肽能神经, 分布在胃黏膜下微动脉的周围, 他通过神经末梢所释放的神经肽如血管活性肠肽及生长抑素等, 使黏膜下微动脉舒张导致胃黏膜血流增多. Kang *et al*^[27-29]研究表明, 辣椒素可通过增大胃黏膜血流量发挥对胃黏膜的保护作用. 前列腺素I₂有扩张胃黏膜血管, 增加黏膜血流的作用. Arai *et al*^[30-32]的研究显示, 小剂量辣椒素刺激胃肠黏膜产生内源性前列腺素I₂. 顾洛 *et al*^[33]发现大鼠胃扩张引起胃酸分泌时胃黏膜血流增加, 预先用大剂量辣椒素发挥“去神经”作用, 可阻断胃扩张引起的胃黏膜血流增加效应, 并部分阻断胃酸分泌, CSAN和内源性NO参与胃扩张引起的胃酸分泌及胃黏膜血流增多效应. Saeki *et al*^[34]研究显示辣椒素对乙醇诱导的胃黏膜损伤的抑制作用是因为集合微静脉的收缩.

5.2 促进胃动力 VR1广泛分布在迷走神经节的中、小神经元上. 辣椒素激活胃肠道的VR1后钙离子通道开放, 引起神经元及其纤维释放神经肽如P物质(SP)、神经激肽A、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管活性肠肽(VIP)和兴奋性氨基酸如天门冬氨酸等, 促进胃肠排空^[35]. Zittel *et al*^[36]研究证明VR1的激动剂可以增加腹部手术后胃肠动力, 减少肠梗阻的发生, 提高术后治愈率.

5.3 辣椒素对胃酸分泌的影响 辣椒素对胃酸分泌具有调节作用, 但其影响结果尚不太明确, 多数研究认为小剂量的辣椒素通过激活CSAN, 抑制胃酸分泌^[34,39-43]. Bilski *et al*^[37]实验发现辣椒素不影响基础胃酸分泌, 但减少五肽胃泌素刺激胃酸量. 顾洛 *et al*^[33]的研究认为, 以大剂量辣椒素使CSAN发生“去神经”作用后, 胃扩张引起的胃酸分泌减少. Raybould *et al*^[38]研究发现, 使用辣椒素“去神经”后, 扩张胃引起的胃酸分泌的增加值可降低40%. Faussone *et al*^[26]研究VR1对胃酸分泌的调节, 发现在神经结构中被标记的VR1同时存在于胃壁细胞线粒体, 提示CSAN和壁细胞的VR1对胃酸的分泌可能有联合效应, 认为VR1在调节胃酸分泌中可能有更复杂的途径.

辣椒素对胃酸分泌的调节作用可能通过下列机制: (1)促胰液素. 小剂量的辣椒素可刺激CSAN, 增加促胰液素的分泌. 促胰液素通过抑制胃窦部的G细胞释放胃泌素, 从而间接抑制胃酸分泌和活性. Li *et al*^[39]研究发现肠促胰液素对胃酸分泌的抑制作用是通过CSAN传入路径实

现的; (2)神经肽. 辣椒素作用于CSAN使之释放神经肽, 包括神经激肽A、血管活性肠肽(VIP)、降钙素基因相关肽(CGRP)等^[40-42], 其中CGRP可抑制胃壁细胞分泌胃酸^[34]. 另外, Kato *et al*^[43]实验研究认为巴氯芬抑制胃酸分泌的作用可能与CSAN的激活有关. 辣椒素对胃酸分泌的作用尚待进一步研究.

5.4 前列腺素、表皮生长因子、转化生长因子及其他 Arai *et al*^[30]实验表明小剂量的辣椒素刺激胃肠黏膜可产生内源性的前列腺素I₂. Ma *et al*^[44]研究CSAN和表皮生长因子在溃疡愈合中的作用, 发现辣椒素能够刺激唾液腺和血清中表皮生长因子的表达, 可能是CSAN有利于胃黏膜的保护作用以及溃疡愈合的机制之一. Vongthavaravat *et al*^[45-46]研究发现外源性给予转化生长因子(TGF- α)对胃黏膜有保护作用. 小剂量的辣椒素激活CSAN, 从而介导TGF-2对胃黏膜应激性损伤的保护作用, 但此作用会被辣椒素的“去神经”作用所抑制. Aihara *et al*^[47-49]研究发现辣椒素有促进HCO₃⁻分泌的作用. Park *et al*^[50]研究表明辣椒素可以抑制酒精诱导胃黏膜损伤的过程中的脂质过氧化反应以及髓过氧化酶活性.

总之, 辣椒素对胃黏膜有重要作用, 可能通过介导胃黏膜血流、胃动力等因素对黏膜防御机制发生影响. 人类食用辣椒数千年, 但辣椒素对胃黏膜的生理、药理作用及其机制研究尚少, 仅仅是一个粗略的了解, 参与其中的细胞、分子及相互间的作用等仍有许多不够明确之处, 有待进一步研究与探讨.

6 参考文献

- 1 Satyanarayana MN. Capsaicin and gastric ulcers. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 275-328
- 2 林倚雯, 杨得坡, 黄世亮, 胡海燕. 辣椒素的药理与临床研究概况. *广东医药* 2000; 10: 5-8
- 3 戴雄泽, 刘志敏. 辣椒素类物质研究进展. *辣椒杂志* 2005; 13-16
- 4 Epstein JB, Marcoe JH. Topical application of capsaicin for treatment of oral neuropathic pain and trigeminal neuralgia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 135-140
- 5 陈敏, 张陆勇, 严明. 辣椒素受体研究进展. *中国临床药理学与治疗学* 2006; 11: 126-130
- 6 Kechagias S, Botella S, Petersson F, Borch K, Ericson AC. Expression of vanilloid receptor-1 in epithelial cells of human antral gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 775-782
- 7 衡立君, 高国栋, 陈军. 辣椒素受体VR1在局部炎症状态下的敏化机制. *神经解剖学杂志* 2004; 20: 315-318
- 8 Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception

■相关报道

大量研究显示, 辣椒素药理作用广泛, 具有镇痛、止痒、抗炎、抗氧化、心肌保护及调节血压等作用, 近年报道辣椒素在减肥、抗癌等方面也可能有一定的作用, 但辣椒素对胃黏膜的作用目前尚不清楚, 国外有部分报道, 国内这方面的研究较少.

■应用要点

近年国内外研究发现适量的辣椒素可能对人体胃肠黏膜具有保护作用。辣椒素对胃肠黏膜的损伤修复,对胃肠功能性疾病的治疗具有潜在的应用价值。

- and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288: 306-313
- 9 郭峰, 姜晓钟, 赵云富. 辣椒素的作用机制及其镇痛应用. 第二军医大学学报 2002; 23: 96-98
- 10 Richeux F, Cascante M, Ennamany R, Saboureau D, Creppy EE. Cytotoxicity and genotoxicity of capsaicin in human neuroblastoma cells SHSY-5Y. *Arch Toxicol* 1999; 73: 403-409
- 11 辣椒素治疗功能性消化不良. 国外医药·植物药分册 2002; 17: 222-228
- 12 蒋海清, 侯奕, 黄晓焰, 廖作华, 孙庆伟. 辣椒治疗胃粘膜损伤及溃疡的实验与临床研究. 赣南医学院学报 2003; 23: 369-372
- 13 李林, 王竹立, 叶美红, 赖晓嵘. 辣椒素敏感神经元介导干地黄胃粘膜保护效应. 中山医科大学学报 2000; 21: 133-136
- 14 Sobue M, Joh T, Oshima T, Suzuki H, Seno K, Kasugai K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Itoh M. Contribution of capsaicin-sensitive afferent nerves to rapid recovery from ethanol-induced gastric epithelial damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1188-1195
- 15 Takeuchi K, Niida H, Matsumoto J, Ueshima K, Okabe S. Gastric motility changes in capsaicin-induced cytoprotection in the rat stomach. *Jpn J Pharmacol* 1991; 55: 147-155
- 16 Teng CH, Kang JY, Wee A, Lee KO. Protective action of capsaicin and chilli on haemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1007-1014
- 17 Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 2003; 465: 121-135
- 18 Patterson LM, Zheng H, Ward SM, Berthoud HR. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2003; 311: 277-287
- 19 Domotor A, Kereskay L, Szekeres G, Hunyady B, Szolcsanyi J, Mozsik G. Participation of capsaicin-sensitive afferent nerves in the gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori*-positive or-negative chronic gastritis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 411-417
- 20 Evangelista S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2977-2984
- 21 Fukushima K, Aoi Y, Kato S, Takeuchi K. Gastro-protective action of lafutidine mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons without interaction with TRPV1 and involvement of endogenous prostaglandins. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3031-3037
- 22 Mozsik G, Peidl Z, Szolcsanyi J, Domotor A, Hideg K, Szekeres G, Karadi O, Hunyady B. Participation of vanilloid/capsaicin receptors, calcitonin-gene-related peptide and substance P in gastric protection of omeprazole and omeprazole-like compounds. *Inflammopharmacology* 2005; 13: 139-159
- 23 Horie S, Yamamoto H, Michael GJ, Uchida M, Belai A, Watanabe K, Priestley JV, Murayama T. Protective role of vanilloid receptor type 1 in HCl-induced gastric mucosal lesions in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 303-312
- 24 Larauche M, Anton PM, Peiro G, Eutamene H, Bueno L, Fioramonti J. Role of capsaicin-sensitive afferent nerves in different models of gastric inflammation in rats. *Auton Neurosci* 2004; 110: 89-97
- 25 Kato S, Aihara E, Nakamura A, Xin H, Matsui H, Kohama K, Takeuchi K. Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1115-1121
- 26 Faussone-Pellegrini MS, Taddei A, Bizzoco E, Lazzeri M, Vannucchi MG, Bechi P. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 61-68
- 27 Kang JY, Teng CH, Chen FC. Effect of capsaicin and cimetidine on the healing of acetic acid induced gastric ulceration in the rat. *Gut* 1996; 38: 832-836
- 28 Holzer P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: Blood flow regulation and tissue protection. *Auton Neurosci* 2006; 125: 70-75
- 29 Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PC, Pawlik MW, Pawlik WW, Kwiecien N, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species and capsaicin-sensitive sensory nerves in the pathomechanisms of gastric ulcers induced by stress. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 423-437
- 30 Arai K, Ohno T, Saeki T, Mizuguchi S, Kamata K, Hayashi I, Saigenji K, Murata T, Narumiya S, Majima M. Endogenous prostaglandin I₂ regulates the neural emergency system through release of calcitonin gene related peptide. *Gut* 2003; 52: 1242-1249
- 31 Aihara E, Hayashi M, Sasaki Y, Kobata A, Takeuchi K. Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 423-432
- 32 Harada N, Okajima K, Uchiba M, Katsuragi T. Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G1214-1224
- 33 顾洛, 闰长栋, 杜军, 田苏平, 李栋生. 辣椒素敏感传入神经和NO介导大鼠胃扩张引起的胃酸分泌和胃黏膜血流量变化. 中国应用生理学杂志 2003; 19: 193-196
- 34 Saeki T, Ohno T, Boku K, Saigenji K, Katori M, Majima M. Mechanism of prevention by capsaicin of ethanol-induced gastric mucosal injury—a study in the rat using intravital microscopy. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Suppl 1: 135-144
- 35 Holzer P, Painsipp E, Schuligoi R. Differential effects of intragastric acid and capsaicin on gastric emptying and afferent input to the rat spinal cord and brainstem. *BMC Neurosci* 2005; 6: 60
- 36 Zittel TT, Meile T, Jehle EC, Becker HD. Intraperitoneal capsaicin treatment reduces postoperative gastric ileus in awake rats. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386: 204-211
- 37 Bilski J, Konturek PC, Konturek SJ, Cieszkowski M, Czarnobilski K. Role of endogenous nitric oxide in the control of gastric acid secretion, blood flow and gastrin release in conscious dogs. *Regul Pept* 1994; 53: 175-184
- 38 Raybould HE, Tache Y. Capsaicin-sensitive vagal afferent fibers and stimulation of gastric acid secretion in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 1989; 167: 237-243
- 39 Li P, Chang TM, Chey WY. Secretin inhibits gastric acid secretion via a vagal afferent pathway in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G22-28
- 40 Okajima K, Harada N. Regulation of inflammatory

- responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2241-2251
- 41 Wang L, Hu CP, Deng PY, Shen SS, Zhu HQ, Ding JS, Tan GS, Li YJ. The protective effects of rutaecarpine on gastric mucosa injury in rats. *Planta Med* 2005; 71: 416-419
- 42 Gyires K. Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 63-73
- 43 Kato S, Araki H, Kawauchi S, Takeuchi K. Body temperature dependency in baclofen-induced gastric acid secretion in rats relation to capsaicin-sensitive afferent neurons. *Life Sci* 2001; 68: 1951-1963
- 44 Ma L, Chow JY, Wong BC, Cho CH. Role of capsaicin sensory nerves and EGF in the healing of gastric ulcer in rats. *Life Sci* 2000; 66: PL213-220
- 45 Vongthavaravat V, Mesiya S, Saymeh L, Xia Y, Ward A, Harty RF. Transforming growth factor alpha-mediated gastroprotection against stress ulceration in the rat: involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Life Sci* 2003; 72: 1803-1811
- 46 Vongthavaravat V, Saymeh LA, Mesiya SA, Dunn ST, Harty RF. Functional interaction between transforming growth factor alpha and capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat stomach. *Regul Pept* 2004; 119: 163-167
- 47 Aihara E, Hayashi M, Sasaki Y, Takeuchi K. Gastric HCO₃⁻ secretion induced by mucosal acidification: different mechanisms depending on acid concentration. *Inflammopharmacology* 2005; 13: 179-190
- 48 Aihara E, Hayashi M, Nomura Y, Kato S, Takeuchi K. Stimulation by bradykinin of HCO₃⁻ secretion in rat gastroduodenal mucosa. *Med Sci Monit* 2006; 12: BR1-7
- 49 Aihara E, Sasaki Y, Ise F, Kita K, Nomura Y, Takeuchi K. Distinct mechanisms of acid-induced HCO₃⁻ secretion in normal and slightly permeable stomachs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G464-471
- 50 Park JS, Choi MA, Kim BS, Han IS, Kurata T, Yu R. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. *Life Sci* 2000; 67: 3087-3093

■同行评价

本文层次清楚, 条理清晰, 对进一步研究辣椒素对胃黏膜的作用及其机制有重要的理论参考价值。

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

本刊讯 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展, 由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与世界华人消化杂志共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开。届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流, 会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论, 学习该领域国内外先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展。与会者将被授予国家I类继续教育学分12分。欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加。

通讯地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰腺外科 邮编: 150001 联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389. E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

收费标准: 500元(含资料费及午间工作餐, 统一安排食宿, 费用自理)。报到日期: 2007-08-02。

三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系PC-3凋亡及其抑制转移的作用

刘静冰, 秦叔逵, 李进

■背景资料

胰腺癌号称21世纪最顽固的癌症堡垒, 历来受到消化科及肿瘤科医生的广泛关注, 其早期诊断困难, 外科手术治疗虽经努力可以达到“根治性”切除, 但复发转移较快, 因此其他辅助治疗目前研究较多。

刘静冰, 秦叔逵, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心江苏省南京市 210002

李进, 上海复旦大学医学院附属肿瘤医院 上海市 200032

南京军区医学科研“十·五”计划课题, No. 02MA014

通讯作者: 秦叔逵, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心肿瘤内科. qinsk@csc.org.cn

电话: 025-84453932 传真: 025-84453932

收稿日期: 2007-02-25 接受日期: 2007-03-23

Effects of arsenic trioxide on the pancreatic carcinoma cell line PC-3 and inhibitory migration

Jing-Bing Liu, Shu-Kui Qin, Jin Li

Jing-Bing Liu, Shu-Kui Qin, Oncology Center of Chinese PLA 81st Hospital, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Jin Li, Cancer Hospital, Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: the Medical Research Program of Nanjing Military Region during the 10th Five-Year Plan Period, No. 02MA014

Correspondence to: Shu-Kui Qin, Oncology Center of Chinese PLA 81st Hospital, No. 34, 34 Biao, Yanggongjing Street, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. qinsk@hotmail.com
Received: 2007-02-25 Accepted: 2007-03-23

Abstract

AIM: To explore the effects of As₂O₃ on apoptosis and its inhibitory migration in a human pancreatic carcinoma cell line.

METHODS: The human pancreatic carcinoma PC-3 cell line was treated with As₂O₃. The rate of apoptosis and the growth cycle of the cell line were investigated by flow cytometry. The expression of gene proteins related to apoptosis (Fas, Fas-L, Bcl-2, and Bax) and metastasis (CD44 and nm23) were observed by immunohistochemistry.

RESULTS: A visible apoptotic peak and blockage of the S phase of the cell cycle (14.86%-63.66%) were shown by flow cytometry. Immunohistochemical staining indicated that the expressions of Bcl-2 (+++~+) and CD44 (++++~+) were down regulated, while the expressions of Fas

(+~+++), Fas-L (-~+++), and nm23 (+~+++), were up-regulated.

CONCLUSION: Injections of As₂O₃ can induce human pancreatic carcinoma cell apoptosis and inhibit pancreatic carcinoma migration. The mechanism was thought to be that As₂O₃ regulated the expression of Fas, Fas-L, Bcl-2, CD44 and nm23.

Key Words: Arsenic trioxide; Pancreatic carcinoma cell; Apoptosis; Migration

Liu JB, Qin SK, Li J. Effects of arsenic trioxide on the pancreatic carcinoma cell line PC-3 and inhibitory migration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1952-1955

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(亚砷酸, As₂O₃)注射液诱导人类胰腺癌细胞凋亡及其抑制转移的作用机制。

方法: 用As₂O₃处理人胰腺癌细胞株PC-3, 通过流式细胞仪观察细胞的凋亡率及生长周期的变化; 用免疫组织化学的方法, 检测凋亡相关基因蛋白Fas, Fas-L, Bcl-2和Bax及转移相关基因蛋白CD44和nm23表达的变化。

结果: 流式细胞仪检测显示明显的凋亡峰出现, 并使细胞周期主要被阻滞在S期(14.9%-63.7%); 免疫组化结果显示, Bcl-2(+++~+), CD44(++++~+)基因的表达下调, Fas(+~+++), Fas-L(-~+++), 及nm23(+~+++), 基因的表达上调。

结论: As₂O₃注射液可诱导人类胰腺癌细胞株PC-3凋亡并具有抑制转移作用, 这可能与调节Bcl-2, Fas, Fas-L及CD44, nm23蛋白的表达有关。

关键词: 三氧化二砷; 胰腺癌细胞; 凋亡; 转移

刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系

PC-3凋亡及其抑制转移的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1952-1955

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1952.asp>

0 引言

胰腺癌(pancreatic carcinoma)是胰腺的外分泌性腺癌,在引起人类死亡的十大恶性肿瘤中占第8位,全世界每年有22.7万人死于此病,其发生率在男性和女性分别为0.007%-0.009%和0.0045%-0.006%^[1-5];且胰腺癌预后极差,是所有常见恶性肿瘤中生存率最低的肿瘤,据美国癌症协会统计,2004年美国有31 860例患者被诊断为胰腺癌,其中31 270例死亡^[6];几十年来,胰腺癌的5 a生存率几乎没有变化,仍然低于5%,这主要与其内在的生物侵袭性及临床发现较晚有关^[7].手术切除是可能治愈此病的唯一方法,然而只有10%左右的患者在就诊时获得切除机会,且切除后的5 a生存率仍然只有5%-20%^[8].目前的姑息性治疗,包括放疗、化疗、姑息手术等,只能减轻症状,不能显著延长生存期.三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃, 亚砷酸)注射液在胰腺癌^[9-14]的研究和临床应用上初步显示出良好的前景,但仍较肤浅,我们课题组在预实验^[15]中已观察到As₂O₃对胰腺癌细胞有明显的诱导凋亡作用,本实验进一步观察其诱导凋亡及抗转移的作用机制,希望能为胰腺癌的临床治疗提供一种新的有效药物以及确凿的治疗依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人类胰腺癌细胞株PC-3,引种自北京协和医科大学协和医院病理科.将细胞接种于无菌培养瓶中,加入适量RPMI 1640培养液(含150 mL/L的小牛血清、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L),于37℃、50 mL/L CO₂及饱和湿度的培养箱中培养.细胞呈单纯贴壁生长,每3-5 d传代1次. As₂O₃注射液:哈尔滨伊达药业有限公司上市药品.

1.2 方法 取1.0×10⁶的活细胞接种于培养瓶中,待细胞贴壁后分别加入终浓度为2 mg/L的As₂O₃溶液,置培养箱中培养至预定时间.消化,离心,固定,加入5 g/L的碘化丙啶(propidium iodide) 1 mL进行染色,过滤后,存放在4℃冰箱内20 min后上流式细胞仪检测.使用软件CELL Quest进行分析.收集与As₂O₃(终浓度为2 mg/L)孵育48 h的PC-3细胞,固定,晾干.按免疫组化试剂盒所示方法(SP法)进行操作.阳性判断:以胞质

表 1 As₂O₃对PC-3细胞凋亡及细胞周期的影响(%)

时间(h)	凋亡	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	0.2	60.9	14.9	24.2
12	3.8	39.5	23.9	36.6
24	21.9	38.6	37.1	24.3
48	27.4	31.8	63.7	4.6

和/或胞膜呈棕黄色为阳性细胞,油镜下观察200个细胞,计算阳性细胞百分率.以阳性率<5%为(-);5%-25%为(+);26%-50%为(++);>50%则为(+++).

统计学处理 采用SPSS11软件进行相关资料处理.统计变量以mean±SD表示, P<0.05表示差异具有显著性.

2 结果

2.1 流式细胞术(FCM)分析 2 mg/L As₂O₃注射液分别作用12 h、24 h及48 h后的胰腺癌PC-3细胞,经流式细胞仪检测,结果显示对照组细胞的凋亡率为0.21%; As₂O₃作用组细胞的凋亡率随作用时间的延长而增加,且随用药时间的延长, S期细胞比例呈上升趋势,而G₀/G₁期呈下降趋势(表1).

2.2 PC-3细胞凋亡相关基因蛋白的表达 未加药的对照组PC-3细胞, Bax基因表达强(+++), Bcl-2基因表达强(+++), Fas基因表达弱(+), Fas-L基因表达阴性(-);经As₂O₃作用48 h后, Bax基因仍表达较强(+++), Bcl-2基因表达弱(+), Fas基因表达增强(+++), Fas-L基因表达增强(+++).

2.3 PC-3细胞转移相关基因蛋白的表达 未加药对照组的PC-3细胞, CD44基因表达呈强阳性(++++) , nm23基因表达弱(+);经As₂O₃作用48 h后, CD44基因表达减弱(+), nm23基因表达增强(+++).

3 讨论

自1971年哈尔滨医科大学第一临床医学院率先用As₂O₃治疗急性早幼粒细胞白血病(AML-M₃型,简称APL)取得成功以后,砷剂成为世界血液、肿瘤界研究的新热点;近年来的研究证实, As₂O₃对多种实体瘤均有效^[16-19].对As₂O₃的作用机制,人们进行了较为广泛的研究,发现As₂O₃除诱导细胞凋亡和部分分化外,还可调控细胞凋亡相关基因的表达,在诱导不同类型肿瘤细胞凋亡时,调控凋亡相关基因的表达也不完全相同,并可使线粒体内膜跨膜电位下降,延长细胞

■应用要点

因前期研究已得出: As₂O₃对胰腺癌细胞有明显的诱导凋亡作用,本文则进一步观察了其诱导凋亡及抗转移的作用机制,为临床治疗提供更为可靠的治疗依据.

同行评价

本文内容新颖, 实验方法成熟, 结果可信, 对胰腺癌机制的研究有参考价值 and 借鉴意义。

倍增时间或阻抑细胞周期进程。

本实验中, FCM分析显示 As_2O_3 作用于胰腺癌细胞48 h后, 细胞凋亡率一直随时间的延长而持续上升; 细胞周期分析显示: S期细胞比例呈上升趋势(14.9%-63.7%), 而 G_0/G_1 期呈下降趋势(60.9%-31.8%)。说明 As_2O_3 诱导胰腺癌细胞凋亡的机制之一为将细胞周期阻滞于S期, 从而阻抑细胞的有丝分裂。

Bcl-2基因家族在细胞凋亡的调控中起着重要的作用, Bcl-2具有抑制细胞凋亡, 延长细胞生命的功能, 其定位于细胞线粒体膜、核膜和内质网, 在诸多凋亡相关基因中尤显重要, 被看做是调控细胞凋亡的最后共同通路之一^[20-21]; Bax是Bcl-2家族的另一成员, 与Bcl-2作用相反, 具有促进细胞凋亡的作用^[22-24]。这一基因家族的成员通常以二聚体的形式发挥作用, 如Bcl-2/Bax。 As_2O_3 作用于胰腺癌细胞48 h后, Bax基因表达无变化, 而Bcl-2基因表达明显减弱(+++~+), 使Bcl-2/Bax的比值下调, 从而促进了细胞的凋亡。Fas基因也称APO-1或CD95, 是存在于人细胞表面介导凋亡的蛋白质分子, 属于TNF受体和NGF受体家族的成员, 通过与其配体(Fas-L)交联, 即可诱导典型的细胞凋亡^[25-27]。本实验发现, As_2O_3 作用于胰腺癌细胞48 h后, Fas及Fas-L基因表达均明显增强(+~+++及~++++)。

CD44属于黏附分子家族透明质酸受体类, 是存在于细胞表面的跨膜糖蛋白, 主要配体为透明质酸(HA), 其大量表达于癌前期病变和恶性肿瘤^[28-32]。大量研究表明, 他的表达与胰腺癌的浸润和转移有关。nm23定位于人17号染色体长臂远端, 他可以抑制参与细胞转移连锁反应中的蛋白质或直接作用于转移相关基因的RNA或DNA^[33-38]。nm23基因的低表达已经在多种高转移性肿瘤中被证实, 通过分析乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌等均发现, nm23基因缺乏及其产物低表达与疾病进展及高转移潜力呈正相关, 且预后也差。经 As_2O_3 作用48 h后的胰腺癌细胞, 转移相关基因蛋白CD44表达减弱(+++~+), nm23表达增强(+~+++), 表明 As_2O_3 抗胰腺癌转移的机制与调节这两种基因蛋白的表达密切相关。

本实验证实了 As_2O_3 长期以来被认为能抑制细胞DNA合成, 干扰细胞代谢, 致染色体畸变或损害细胞基因的作用; 尤其对生长活跃的肿瘤细胞, As_2O_3 可抑制在正常细胞表达少而在肿瘤

细胞表达活跃的基因^[39-42]。研究发现, As_2O_3 通过阻滞细胞周期的发展及以上基因主动参与的激活过程而发挥抗胰腺癌的作用, 本实验为其治疗胰腺癌的作用机制研究提供了新的思路, 为胰腺癌的治疗提供了科学客观的实验依据。

参考文献

- Verma M. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4: 295-301
- Saif MW, Saviglin H, Carpenter M. Impact of ethnicity on outcome in pancreatic carcinoma. *JOP* 2005; 6: 246-254
- Hahn SA, Bartsch DK. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33: 919-994
- Hahn SA, Bartsch DK. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Clin Lab Med* 2005; 25: 117-133
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Brand R, Mahr C. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma: are we ready for screening and surveillance? *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 122-127
- Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM. Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 2005; 128: 1626-1641
- Stojadinovic A, Brooks A, Hoos A, Jaques DP, Conlon KC, Brennan MF. An evidence-based approach to the surgical management of resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 954-964
- 高勇, 贾绍昌, 王杰军, 许青, 郭静. 三氧化二砷诱导人胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 第二军医大学学报 2001; 22: 43-46
- 张兴荣, 蔡洪培, 陈岳祥, 谢渭芬, 沈建伟. 氧化砷诱导胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 胰腺病学 2002; 2: 38-40
- 刘静冰, 秦叔逵, 钱军, 王琳, 何泽明. 三氧化二砷注射液治疗晚期胰腺癌的床观察. 临床肿瘤学杂志 2005; 10: 117-119
- 张兴荣, 蔡洪培, 邓志华, 沈建伟. 细胞内 Ca^{2+} 变化在砷剂诱导胰腺癌细胞凋亡中的作用. 第二军医大学学报 2001; 22: 422-424
- Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest* 2004; 22: 389-400
- 史立军, 闫彬彬, 李双星, 孟艳玲, 马姗姗, 刘铁夫, 李呼伦. As_2O_3 对胰腺癌细胞株的抑制作用及其机制的初步探讨. 中国病理生理杂志 2005; 21: 1572-1574
- 刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1713-1716
- 秦叔逵. 三氧化二砷治疗原发性肝胆癌的研究进展. 肿瘤学杂志 2001; 7: 115-118
- Liu LX, Zhu AL, Chen W, Guo HX, Wang XQ, Liu ZH, Zhang TD, Jiang HC, Wu M. The effect and mechanism of arsenic trioxide on hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2005; 43: 33-36
- 何景利, 王贵英, 单宝恩. 三氧化二砷联合顺铂对人结肠癌细胞株colon26抑制作用机理的研究. 中国肿瘤临床 2005; 32: 1125-1128
- 魏玲, 王兴武, 左文述, 宋现让. 三氧化二砷抑制人乳

- 腺癌细胞生长及其作用机制的初步研究, 中华医学杂志 2005; 85: 1209-1213
- 20 Sharma J, Srinivasan R, Majumdar S, Mir S, Radotra BD, Wig JD. Bcl-XL protein levels determine apoptotic index in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 2005; 30: 337-342
- 21 Brazdil J, Lukas Z, Hermanova M, Pazourkova M, Ruzicka M, Habanec B, Kren L, Dite P. Apoptosis and expression of bcl-2 protein in invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cesk Patol* 2003; 39: 168-173
- 22 吴晓康, 吴育连, 郑樟栋, 吴荣进, 楼善贤, 王丽霞. 胰腺癌细胞凋亡与bcl-2, bax基因的表达. 中国普通外科杂志 2002; 11: 171-173
- 23 Manoj K, Liu ZR, Tian R, Qin RY. Mechanisms of inhibition of growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor subtype 2. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 760-765
- 24 张元, 夏曙霞, 钱家勤. Bax基因表达在胰腺癌组织细胞凋亡中的作用. 肝胆外科杂志 2002; 10: 344-346
- 25 Pernick NL, Sarkar FH, Tabaczka P, Kotcher G, Frank J, Adsay NV. Fas and Fas ligand expression in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2002; 25: e36-41
- 26 Radfar S, Davrinche C, Hollande E. Serial in vivo loss and in vitro gain of Fas expression and function in human cancerous pancreatic duct cells. *Int J Cancer* 2005; 115: 214-223
- 27 Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer* 2002; 94: 2552-2560
- 28 Sugahara KN, Hirata T, Hayasaka H, Stern R, Murai T, Miyasaka M. Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J Biol Chem* 2006; 281: 5861-5868
- 29 Nakai K, Tanaka T, Murai T, Ohguro N, Tano Y, Miyasaka M. Invasive human pancreatic carcinoma cells adhere to endothelial tri-cellular corners and increase endothelial permeability. *Cancer Sci* 2005; 96: 766-773
- 30 Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zoller M. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 2005; 309: 345-357
- 31 Schmidt DS, Klingbeil P, Schnolzer M, Zoller M. CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res* 2004; 297: 329-347
- 32 刘铁夫, 成秉林, 关宇光, 梁桃. CD44基因编码蛋白表达与三氧化二砷抗肿瘤作用关系的研究. 哈尔滨医科大学学报 2001; 35: 111-112
- 33 Ni X, Gu S, Dai J, Cheng H, Guo L, Li L, Ji C, Xie Y, Ying K, Mao Y. Isolation and characterization of a novel human NM23-H1B gene, a different transcript of NM23-H1. *J Hum Genet* 2003; 48: 96-100
- 34 党诚学, 韩玥, 泰兆寅, 纪宗正, 黎一鸣. nm23/NDPK在胰腺癌中表达和临床意义. 中国肿瘤临床与康复 2000; 7: 20-21
- 35 Ohshio G, Imamura T, Okada N, Suwa H, Yamaki K, Imamura M, Ogasahara K, Tsukayama C, Yamabe H. Immunohistochemical expression of nm23 gene product, nucleotide diphosphate kinase, in pancreatic neoplasms. *Int J Pancreatol* 1997; 22: 59-66
- 36 Yu GZ, Wang JJ, Chen Y, Ni CR, Zhu MH. Expressions of nm23, P53 and S100A4 proteins and their relationships with metastasis potential in gastric carcinoma. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006; 9: 165-169
- 37 Elagoz S, Egilmez R, Koyuncu A, Muslehiddinoglu A, Arici S. The intratumoral microvessel density and expression of bFGF and nm23-H1 in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2006; 12: 21-27
- 38 Liu YJ, Yan PS, Li J, Jia JF. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6601-6606
- 39 华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷对人肝癌细胞黏附和侵袭影响的实验研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 922-925
- 40 戴亚红, 刘淑梅, 孟昕, 梁桃. 三氧化二砷对人胃癌细胞株nm23、P53基因表达的影响. 中国康复理论与实践 2005; 11: 626-627
- 41 刘琳, 赵伟, 秦叔逵, 李苏宜, 邱少敏, 王南瑶, 陈惠英. 三氧化二砷抗裸鼠人结肠癌移植瘤作用及其机制的研究. 中国肿瘤临床 2005; 132: 1067-1070, 1080
- 42 林英城, 吴名耀, 李德锐, 吴贤英, 杜彩文, 陈炯玉, 洪超群, 郑瑞明. 三氧化二砷诱导鼻咽癌CNE1细胞凋亡及其作用机制的实验研究. 肿瘤防治研究 2005; 32: 467-469, 528

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

乌司他丁联合三七总皂甙对急性胰腺炎大鼠氧自由基的影响

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华

■背景资料

AP早期即产生大量氧自由基。氧自由基所致胰腺损伤是各种病因所致AP的共同发病环节。AP及全身并发症的发生与氧自由基所致损伤有关。氧自由基在AP发病及转归中起着中心主导地位的作用。凡能清除氧自由基(OFR)的物质都能防止或减轻氧自由基对组织的过氧化损害。

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

通讯作者: 刘俊, 430022, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. liujun_99@126.com

收稿日期: 2007-03-12 接受日期: 2007-04-13

Effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis

Hong-Zhi Wang, Jun Liu, Hui Song, Lei Li, Xiao-Hua Hou

Hong-Zhi Wang, Jun Liu, Hui Song, Lei Li, Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Jun Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. liujun_99@126.com

Received: 2007-03-12 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To investigate the effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins (PNS) on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis (AP).

METHODS: Seventy-five Sprague-Dawley rats were divided into five equal groups: group A (sham-operated), B (AP), C (treated with ulinastatin), D (treated with panax notoginseng saponins) and E (treated with ulinastatin combined with panax notoginseng saponins). A rat model of AP was created by retrogression injection of sodium taurocholate through pancreas biliferous ducts. Serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in each experimental group were observed at 3, 6 and 12 h.

RESULTS: The level of SOD in group B decreased while the MDA increased. Levels of SOD in groups C and D were higher than that in group B (274.750 ± 14.44 U/L and 281.420 ± 16.48

U/L vs 204.440 ± 14.87 U/L, $P < 0.05$) while the levels of MDA were lower (6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$ and 6.78 ± 0.56 $\mu\text{mol/L}$ vs 9.25 ± 0.22 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). The level of SOD in group E was higher than that in group C (318.360 ± 13.71 U/L vs 274.750 ± 14.44 U/L, $P < 0.05$) while the level of MDA was lower (5.53 ± 0.45 $\mu\text{mol/L}$ vs 6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Ulinastatin in combination with PNS has therapeutic effects on AP by increasing the protective SOD and decreasing the MDA injury factors. The effect is more evident when ulinastatin is combined with PNS than when applied separately.

Key Words: Acute pancreatitis; Oxygen free radicals; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Ulinastatin; Panax notoginseng saponins

Wang HZ, Liu J, Song H, Li L, Hou XH. Effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1956-1959

摘要

目的: 探讨乌司他丁、三七总皂甙合用对急性胰腺炎(AP)大鼠氧自由基的影响。

方法: SD大鼠75只, 随机分为A, B, C, D, E5组。A组为假手术组; B组为急性胰腺炎组; C组为乌司他丁治疗组; D组为三七总皂甙治疗组; E组为乌司他丁联合三七总皂甙治疗组。通过胰胆管逆行性注射牛磺胆酸钠制成AP大鼠模型。分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法于术后3 h, 6 h, 12 h测定各组大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)浓度。

结果: B组与A组相比大鼠表现为血清SOD降低和MDA升高。术后6 h, C组和D组较B组血清SOD明显升高(274.750 ± 14.44 U/L, 281.420 ± 16.48 U/L vs 204.440 ± 14.87 U/L, $P < 0.05$), MDA明显降低(6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$, 6.78 ± 0.56 $\mu\text{mol/L}$ vs 9.25 ± 0.22 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$); E组较

■研究前沿

急性胰腺炎的发病机制十分复杂, 目前临床尚无确切的治疗方法。研究的热点主要集中于胰酶、血液循环、细胞凋亡、核因子- κB 、炎性介质、细胞内信号转导等。氧自由基作为一种重要的炎性介质, 受到越来越多的关注。

C组血清SOD明显升高(318.360 ± 13.71 U/L vs 274.750 ± 14.44 U/L, $P < 0.05$), MDA明显降低(5.53 ± 0.45 $\mu\text{mol/L}$ vs 6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$); C组与D组相比没有显著差异。

结论: 乌司他丁、三七总皂甙通过升高SOD保护性因子降低MDA损伤性因子, 对AP起治疗作用。而乌司他丁联合三七总皂甙应用具有协同效应。

关键词: 急性胰腺炎; 氧自由基; SOD; MDA; 乌司他丁; 三七总皂甙

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华. 乌司他丁联合三七总皂甙对急性胰腺炎大鼠氧自由基的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1956-1959
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1956.asp>

0 引言

氧自由基(OFR)导致胰腺损伤是各种病因所致急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)的共同发病环节。本研究通过大鼠AP模型, 经尾iv乌司他丁(Ulinastatin)、三七总皂甙(Panax notoginseng saponins, PNS), 动态观察大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、病理改变等, 以判定乌司他丁、三七总皂甙对AP治疗的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 SD δ 大鼠75只(由华中科技大学同济医学院动物中心提供), 体质量200-300 g, 在22℃恒温房内饲养, 标准颗粒混合饲料(由华中科技大学同济医学院动物中心提供)喂养。实验鼠随机分为5组(每组15只): A组, 为假手术组; B组, 为急性胰腺炎组; C组, 为乌司他丁治疗组; D组, 为三七总皂甙治疗组; E组, 为乌司他丁与三七总皂甙合用治疗组。每组又随机分为3个小组(每小组5只): 3 h组、6 h组、12 h组。

1.1.2 药物与试剂 牛磺胆酸钠(美国Sigma公司), 乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司), 三七总皂甙(商品名: 血塞通注射液, 昆明制药股份有限公司), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 急性胰腺炎模型制备 参照Aho *et al*^[1]的方法制备急性出血坏死型胰腺炎(acute hemorrhagic and necrotizing pancreatitis, AHNP)模型。术前12 h禁食, 自由饮水。采用10 g/L戊巴

表 1 AP时不同时段血清SOD、MDA的变化(mean \pm SD, $n = 5$)

分组	SOD(U/L)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
假手术组3 h	356 150 \pm 14.01	4.70 \pm 0.28
AP组3 h	245 420 \pm 17.73 ^a	7.75 \pm 0.56 ^a
假手术组6 h	365 210 \pm 16.46	4.88 \pm 0.23
AP组6 h	204 440 \pm 14.87 ^a	9.25 \pm 0.22 ^a
假手术组12 h	362 500 \pm 18.11	4.85 \pm 0.42
AP组12 h	175 530 \pm 13.54 ^a	11.12 \pm 0.46 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同时点假手术组。

比妥钠(4 mL/kg)ip麻醉。上腹正中切口进入腹腔, 显露胆总管, 以血管夹阻断近肝门处胆总管后, 用4号头皮静脉针于十二指肠乳头附近经十二指肠壁穿刺, 逆行插入胆总管, 在十二指肠乳头处用手指捏闭胆总管末端。将50 g/L牛磺胆酸钠溶液(0.24 mL/min)注入胆总管, 剂量为1 mL/kg。2 min后松开血管夹, 关腹于背部sc生理盐水(20 mL/kg), 以补充血容量不足。

1.2.2 假手术组 开腹后不进行插管, 仅仅翻动胰腺。其余步骤同上。

1.2.3 治疗组给药方法 急性胰腺炎模型制备成功后20 min, 经尾iv给药, 给予乌司他丁(20 000 U/kg, 浓度为10 000 U/mL)、三七总皂甙(100 mg/kg, 浓度为25 g/L)、合用组(注射乌司他丁10 min后再注射三七总皂甙)。

1.2.4 标本采集 每组大鼠按不同的时间段于术后3 h、6 h、12 h深麻醉后门静脉取血, 装于试管内, 37℃水浴20 min, 随即4℃离心15 min (3000 r/min), 取上清悬液分装于2只EP管中, -20℃冻存。实验结束后, 将大鼠剖腹, 肉眼观察腹水及胰腺炎轻重情况。

1.2.5 检测指标及方法 超氧化物歧化酶(SOD)测定采用黄嘌呤氧化酶法。丙二醛(MDA)测定采用硫代巴比妥酸法(TBA法)试剂盒。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件处理分析。数据均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 AP时的胰腺病理形态及血清SOD、MDA的变化 腹水: 假手术组无腹水; AP组各时段均有红色或暗红色的混浊腹水, 腹水量均超过6 mL, 并且, 腹水混浊程度和量随时间延长而加重。胰腺大体观察: 假手术组无明显改变; AP组胰腺充血水肿, 可见点片状出血、黑色坏死灶及散在

■创新盘点

乌司他丁、三七总皂甙合用与二者单用相比具有显著的差异性, 说明乌司他丁与三七总皂甙合用, 可以有效提高机体对氧自由基的清除能力, 减轻胰腺组织的损伤。

应用要点

急性胰腺炎目前在临床尚无确切的治疗方法。本文通过对AP大鼠的实验性治疗,对AP的临床应用有一定的指导意义。

表 2 不同实验组各时段血清SOD含量和MDA含量的变化比较(mean \pm SD, $n = 15$)

分组		3 h	6 h	12 h
SOD(U/L)	B组(AP组)	245 420 \pm 17.73	204 440 \pm 14.87	175 530 \pm 13.54
	C组(乌司他丁组)	296 400 \pm 14.30 ^a	274 750 \pm 14.44 ^a	247 310 \pm 14.43 ^a
	D组(三七总皂甙组)	305 620 \pm 12.57 ^a	281 420 \pm 16.48 ^a	252 630 \pm 13.75 ^a
	E组(合用组)	337 280 \pm 15.26 ^{ac}	318 360 \pm 13.71 ^{ac}	287 420 \pm 14.35 ^{ac}
MDA(μ mol/L)	B(AP组)	7.75 \pm 0.56	9.25 \pm 0.22	11.12 \pm 0.46
	C(乌司他丁组)	6.25 \pm 0.43 ^a	6.85 \pm 0.65 ^a	7.70 \pm 0.56 ^a
	D(三七总皂甙组)	6.03 \pm 0.47 ^a	6.78 \pm 0.56 ^a	7.62 \pm 0.62 ^a
	E(合用组)	5.08 \pm 0.38 ^{ac}	5.53 \pm 0.45 ^{ac}	6.15 \pm 0.52 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 同时点B组; ^c $P < 0.05$ vs 同时点C、D组。

的皂化斑,病理改变随时间延长而加重。胰腺光镜观察:假手术组无明显改变;AP组胰腺间质水肿,红细胞漏出,腺泡细胞水肿,灶性坏死,部分腺导管扩张,点片状出血坏死,炎细胞浸润。AP组与同时点假手术组相比,血清SOD水平降低($P < 0.05$),血清MDA水平升高($P < 0.05$,表1)。

2.2 乌司他丁、三七总皂甙及两药合用对AP大鼠病理形态及血清SOD、MDA的影响 腹水:AP组为暗红色混浊腹水,量均在6 mL以上;治疗组腹水量明显减少,量约3 mL左右,混浊程度明显低于AP组。胰腺大体观察:AP组胰腺均充血水肿,可见点片状出血坏死、黑色坏死灶及散在皂化斑;治疗组病理改变明显减轻。

各治疗组与同时点AP组相比,血清SOD水平平均明显升高($P < 0.05$),血清MDA水平平均明显降低($P < 0.05$)。乌司他丁治疗组与三七总皂甙治疗组同时点相比,血清SOD、MDA水平无明显改变($P > 0.05$)。乌司他丁、三七总皂甙合用组与乌司他丁治疗组、三七总皂甙治疗组同时点相比,血清SOD水平平均明显升高($P < 0.05$),血清MDA水平平均明显降低($P < 0.05$,表2)。

3 讨论

急性胰腺炎的发病机制极为复杂,尚未完全阐释清楚。目前已知胰酶、炎性介质、胰腺血液循环紊乱、细胞凋亡等因素参与了急性胰腺炎的发生、发展。其中,氧自由基与急性胰腺炎的发病以及胰腺炎时胰外脏器的损伤均有密切关系。研究表明,多种原因诱发的AP均有氧自由基的产生^[2]。Urunuela *et al*^[3]通过结扎胰管(PDO)诱导急性大鼠胰腺炎模型,并用二氢若丹(dihydrorhodamine-123)荧光染色检测胰腺细胞内氧自由基,发现大鼠急性胰腺炎在6 h、12 h氧自由基显著升高,表明急性胰腺炎早期即产

生大量氧自由基。氧自由基在急性胰腺炎组织的损伤过程中起着重要的介导作用,氧自由基所致胰腺损伤是各种病因所致胰腺炎的共同发病环节。而氧自由基的产生主要发生于胰腺缺血后。同时,氧自由基还参与了急性胰腺炎并发肝、肾、肺损害的病理过程。胰腺血流量和微循环灌注量减少导致的微循环障碍可促使水肿性AP转变为重症急性胰腺炎(SAP)^[4]。

王兴鹏 *et al*报道,氧自由基增多引起的组织损伤可能与两方面因素有关:(1)脂质过氧化损伤:氧自由基与膜内多价不饱和脂肪酸结合,形成多种脂质过氧化物(LPO),导致细胞膜多价不饱和脂肪酸与蛋白质比例失调,影响膜通透性,并可使钙离子大量内流,线粒体和溶酶体膜被破坏,最后造成细胞死亡;(2)共价键结合性损伤:氧自由基作用于含巯基的氨基酸,使蛋白质变性和失活,作用于辅基使辅酶活性下降。^[5] SOD活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。MDA的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,因此,MDA的高低可以间接反映机体细胞受氧自由基攻击的严重程度。乌司他丁是从人尿中提取精制而成的糖蛋白,是一种广谱的酶抑制剂,可抑制磷脂酶A₂(PLA₂)、胰淀粉酶、弹性蛋白酶及纤溶酶等的活性,同时可稳定溶酶体膜,抑制溶酶体酶和心肌抑制因子的产生,抑制炎症介质的释放。秦仁义 *et al*^[6]报道,重症急性胰腺炎大鼠模型给予乌司他丁后,血清中肿瘤坏死因子、淀粉酶、氧自由基、一氧化氮明显下降,并显著降低重症急性胰腺炎实验动物的死亡率。乌司他丁作为一种高效广谱的酶抑制剂,阻断了蛋白酶所介导的中性粒细胞在肺内的聚集,抑制了中性粒细胞溶酶体酶活性和吞噬作用,从而减轻了炎性介质与氧自由基的释放,有效制约了

酶、细胞因子、氧自由基级联反应所形成的恶性循环和放大效应^[7]。三七总皂甙是五加科植物三七的提取物, 具有活血祛瘀, 通脉活络的功效, 其药理机制与扩张血管、改善微循环、保护组织抗氧化能力、抑制脂质过氧化反应、减少钙离子内流、影响自由基生成等有关。三七总皂甙不仅具有清除自由基的作用, 而且也有钙通道阻断作用^[8]。王学梅 *et al*^[9]研究表明, 三七皂苷能有效地清除超氧自由基(O_2^-)、羟自由基(OH^\cdot), 其中以清除 OH^\cdot 较为显著。罗伟 *et al*^[10]研究表明, 三七总皂甙具有较强的抗氧自由基损伤和抗脂质过氧化损伤作用, 其作用机制可能在于其一方面减少氧自由基的产生, 一方面通过激活抗氧化酶SOD活性, 抑制氧自由基, 降低脂质过氧化物, 从而发挥抗脂质过氧化损伤的作用。

研究表明, 与对照组相比, 乌司他丁、三七总皂甙二者单用与合用均可升高各组SOD水平及降低各组MDA水平, 并明显减轻AP所导致的病理损害。而乌司他丁、三七总皂甙二者合用与二者单用相比具有显著的差异性, 说明乌司他丁与三七总皂甙合用, 可以有效提高机体对氧自由基的清除能力, 减轻胰腺组织的损伤, 延长急性胰腺炎大鼠的生存时间。本结果显示, 乌司他丁与三七总皂甙合用具有协同作用, 比单独使用乌司他丁或三七总皂甙效果好。

4 参考文献

- 1 Aho HJ, Nevalainen TJ, Lindberg RL, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. The role of phospholipase A in sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 1027-1031
- 2 范学良, 李永渝, 葛树培. 大鼠实验性急性胰腺炎时观察血浆和组织脂质过氧化物的变化. *中国病理生理杂志* 1991; 7: 430-433
- 3 Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 159-164
- 4 Plusczyk T, Witzel B, Menger MD, Schilling M. ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G145-153
- 5 袁耀宗. 消化系统疾病临床新技术. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2002: 169
- 6 秦仁义, 王春友, 邹声泉. 乌司他丁治疗急性胰腺炎的实验及临床研究. *中国普通外科杂志* 2001; 10: 292-295
- 7 谭朝华, 徐军美, 杨昭云, 杨东林, 吕志平. 乌司他丁对急性肺损伤兔炎症细胞因子及氧自由基的影响. *中国医师杂志* 2004; 6: 1360-1362
- 8 Guan YY, Kwan CY, He H, Sun JJ, Daniel EE. Effects of Panax notoginseng saponins on receptor-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1994; 15: 392-398
- 9 王学梅, 戴云, 张建圣, 高云涛. 分光光度法测定三七皂苷清除活性氧自由基的研究. *云南中医中药杂志* 2006; 27: 41-42
- 10 罗伟, 田明, 张新, 李保东. 三七总甙对高血压病患者氧自由基及红细胞流变性的影响. *安徽中医临床杂志* 2000; 12: 369-371

■同行评价

本文工作细致, 材料和方法较成熟, 对急性胰腺炎的治疗有一定临床意义。

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

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

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

结直肠癌组织中ECM1基因水平的测定及临床意义

侯彦强, 姜加陶, 彭亮, 周琳, 倪健, 孔宪涛, 仲人前

■背景资料

结直肠癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 发现和寻找新的标志物和治疗靶点对提高结直肠癌防治的具有重要意义. ECM1具有促进血管生成特性, 与肿瘤的发生、发展相关.

侯彦强, 彭亮, 上海市第一人民医院松江分院检验科 上海市 201600

姜加陶, 周琳, 孔宪涛, 仲人前, 中国人民解放军第二军医大学长征医院实验诊断科全军临床免疫中心 上海市 200003

倪健, 上海富纯中南生物技术有限公司 上海市 201702

国家自然科学基金项目, No. 30080027

上海市基础研究重大项目, No. 02JC14005

上海市松江区科学技术攻关项目, No. 06KG27

通讯作者: 仲人前, 200003, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军临床免疫中心. rqzhong@yahoo.com

收稿日期: 2007-02-17 接受日期: 2007-03-31

Detection and clinical significance of ECM1 gene expression in colorectal cancer tissue

Yan-Qiang Hou, Jia-Tao Lou, Liang Peng, Lin Zhou, Jian Ni, Xian-Tao Kong, Ren-Qian Zhong

Yan-Qiang Hou, Liang Peng, Department of Clinical Laboratory, Songjiang Branch Hospital, the First People's Hospital of Shanghai City, Shanghai 201600, China

Jia-Tao Lou, Lin Zhou, Xian-Tao Kong, Ren-Qian Zhong, Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Clinical Immunology Center of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Jian Ni, Shanghai Fuchun Zhongnan Biotech Company, Shanghai 201702, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30080027, Shanghai Basic Research Major Project, No. 02JC14005 and the Key Item from Science and Technology Department of Songjiang District in Shanghai, No. 06KG27

Correspondence to: Ren-Qian Zhong, Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Clinical Immunology Center of Chinese PLA, Shanghai 200003, China. rqzhong@yahoo.com

Received: 2007-02-17 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To investigate the expression and significance of the ECM1 gene in colorectal cancer tissue.

METHODS: Based on TaqMan-MGB methodology, real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) was used to detect the mRNA levels of ECM1 in tissue from normal controls ($n = 46$), colorectal adenoma ($n = 18$), colorectal cancer without lymphatic metastasis ($n = 25$)

and colorectal cancer with lymphatic metastasis ($n = 21$).

RESULTS: The mRNA expression of ECM1 in colorectal cancer tissue including those with and without lymphatic metastasis was significantly higher than that in normal and adenoma tissue [$(6.89 \pm 2.96) \times 10^9$ copy/g RNA, $(5.01 \pm 2.22) \times 10^{10}$ copy/g RNA vs $(9.81 \pm 3.16) \times 10^8$ copy/g RNA, $(10.1 \pm 3.65) \times 10^8$ copy/g RNA, $P < 0.01$]. There was no significant difference between normal and adenoma tissue ($P > 0.05$). ECM1 mRNA expression in metastatic colorectal cancer was higher than that in the other three groups ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Over-expressed mRNA of ECM1 in colorectal cancer tissue correlates with the properties of metastasis in colorectal cancer.

Key Words: Extracellular matrix protein 1; Colorectal cancer; Real time quantitative polymerase chain reaction

Hou YQ, Lou JT, Peng L, Zhou L, Ni J, Kong XT, Zhong RQ. Detection and clinical significance of ECM1 gene expression in colorectal cancer tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1960-1964

摘要

目的: 探讨细胞外基质蛋白1基因在结直肠癌中的表达及其意义.

方法: 基于TaqMan-MGB荧光探针技术, 建立实时荧光定量RT-PCR方法, 检测正常结直肠黏膜组织($n = 46$), 结直肠腺瘤($n = 18$), 结直肠癌(淋巴结未转移)($n = 25$)和结直肠癌(淋巴结转移)($n = 21$)中ECM1基因的表达.

结果: 正常黏膜, 腺瘤组织, 结直肠癌(淋巴结未转移)组织和结直肠癌(淋巴结转移)组织中ECM1基因的表达均值分别为 $(9.81 \pm 3.16) \times 10^8$ 拷贝/g RNA, $(10.1 \pm 3.65) \times 10^8$ 拷贝/g RNA, $(6.89 \pm 2.96) \times 10^9$ 拷贝/g RNA, $(5.01 \pm 2.22) \times 10^{10}$ 拷贝/g RNA. 正常黏膜和腺瘤组织组间无明显差异($P > 0.05$); 结直肠癌(淋巴结未转移)组明显高于正常黏膜和腺瘤组织组

($P<0.01$); 结直肠癌(淋巴结转移)组明显高于其他三组($P<0.01$).

结论: ECM1基因在结直肠癌中表达升高, 并且与结直肠癌的转移相关.

关键词: 细胞外基质蛋白1; 结直肠癌; 实时定量聚合酶链反应

侯彦强, 姜加陶, 彭亮, 周琳, 倪健, 孔宪涛, 仲人前. 结直肠癌组织中ECM1基因水平的测定及临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1960-1964

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1960.asp>

0 引言

细胞外基质蛋白1(extracellular matrix protein 1, ECM1)是1994年Mathieu *et al*^[1]在鼠的成骨基质细胞系MN7中分离出来的一种分泌性糖蛋白, 近年来对ECM1功能的研究表明其具有多种功能, 其中Han *et al*^[2]研究报道, ECM1可促进血管内皮细胞的增殖(在体外培养中)和血管的生成(在鸡胚中), 同时还证明了ECM1存在于两个恶性程度较高的乳腺癌细胞系MDA-435和LCC15的基质中, 而相对恶性程度较低的乳腺癌细胞系MCF-7、Sk-Br-3等则不表达ECM1, 提示ECM1的表达可能与肿瘤及肿瘤的转移有关, 而目前在多种肿瘤的研究中也已确认细胞外基质与肿瘤的发生、发展及转移等有密切的关系, 本研究拟采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR)技术从基因水平探讨ECM1在结直肠癌中的表达及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 长征医院结直肠癌患者手术切除的标本46例, 每例患者取癌组织及远离癌组织的正常黏膜组织各一块, 另取18例腺瘤组织做对照. 所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他针对肿瘤的治疗, 所有病例均经病理证实. 总RNA抽提试剂盒(QIAGEN公司); 逆转录酶及逆转录反应缓冲液(TaKaRa公司); 荧光定量PCR试剂盒PCR TaqMan universal Master Mix(ABI公司); 7700 Sequence Detector分析仪(ABI公司); GAPDH标准品(上海基康生物技术有限公司). 根据Gene bank上人ECM1 mRNA的序列, 利用ABI公司的Primer Express 2.0引物和探针设计软件设计基因专一的引物和探针, 两条引物设计在不同的外显子上, 以避免因RNA内基因组DNA的污染所造成的假

阳性. ECM1引物、探针序列如下: 上游引物: 5'-GACCTGCCATTTCAGAACAG-3'; 下游引物: 5'-GGGACCACACAGATCATTGATG-3'; 探针: FAM-AATTTCTCCTCCTCTGCAC-MGB. 所用内参为GAPDH, 其引物、探针序列如下: 上游引物: 5'-CCATCAATGACCCCTTCATTG-3'; 下游引物: 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAAC-3'; 探针: FAM-CCTCAACTACATGGTTTAC-MGB. 以上引物及探针均在上海基康生物技术有限公司设计合成.

1.2 方法

1.2.1 组织细胞总RNA的提取 称量新鲜组织标本 ≤ 30 mg, 总RNA用QIAGEN公司的总RNA抽提试剂盒提取, 操作严格按说明书进行; 采用10 g/L琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测所提取的总RNA的质量和浓度, 以计算RNA含量, 样本-80℃储存备用.

1.2.2 定量阳性模板的克隆和制备 ECM1-pEGFP-N2真核表达载体质粒为本室构建, 将提取的ECM1-pEGFP-N2质粒在260 nm下测A值, 得出拷贝数, 用TE稀释成 1.0×10^8 拷贝数/ μ L, 置于-20℃保存备用. 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)标准品由上海基康生物技术有限公司提供, 浓度为 2×10^8 拷贝数/ μ L, 置于-20℃保存备用.

1.2.3 逆转录(RT)反应 将提取的各种组织细胞的RNA进行逆转录反应, 反应条件如下: 于DEPC处理的0.5 mL PCR管中加入总RNA 2 μ g, Reverse Transcription Buffer(5 \times) 5 μ L, RNAasin(RNA酶抑制剂)1 μ L, dNTP 2.5 μ L, Oligo(dT)2.0 μ L, AMV(禽成髓病毒逆转录酶 10 U)2.0 μ L, 焦磷酸钠2.5 μ L, DEPC处理的无粒子水补至总体积为25 μ L. 反应条件: 42℃ 45 min, 94℃ 3 min终止反应.

1.2.4 阳性标准模板的配制及标准曲线的绘制 (1)将人还原磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)标准品用TE 1:10稀释成(2.0×10^6 , 2.0×10^5 , 2.0×10^4 , 2.0×10^3 , 2.0×10^2 拷贝数/ μ L)各种浓度的模板; (2)将ECM1-pEGFP-N2质粒用TE 1:10稀释成(2.0×10^6 , 2.0×10^5 , 2.0×10^4 , 2.0×10^3 , 2.0×10^2 拷贝数/ μ L)各种浓度的内参模板; (3)将上述不同稀释度的两种标准模板按以下条件进行检测: 反应体系: 于PCR管中加入TaqMan MGB probe(10 pmol/L) 1.25 μ L, Forward Primer(20 pmol/L) 2.25 μ L, Reverse Primer(20 pmol/L) 2.25 μ L, Template DNA 2 μ L, TaqMan Master mix(2 \times)

■创新盘点

本文采用先进的TaqMan-MGB探针技术探讨ECM1基因在结直肠癌中的表达及意义, 首次在国内报道ECM1在结直肠癌中高表达, 与肿瘤的转移性相关.

■名词解释

TaqMan-MGB探针(TaqMan Minor Groove Binder Probe): 又称MGB探针, MGB(Minor Groove Binder, 小型的凹槽结合物)是个三肽, 他可以结合在DNA双螺旋的小沟里, 从而起到稳定DNA双螺旋结构的作用. 该探针在TaqMan探针的3'端连接得是非荧光淬灭剂及MGB, 非荧光淬灭剂与荧光报告基团在空间位置上更接近, 可使淬灭作用更安全, 明显降低本底, 显著提高敏感性, 这种改进的TaqMan探针被称为TaqMan-MGB探针或MGB探针.

25 μL , ddH₂O至50 μL . 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s循环40次; (4)反应结束后计算机自动生成GAPDH和ECM1的标准曲线.

1.2.5 实时荧光定量PCR检测 将逆转录后的各种组织细胞的标本在7700 Sequence Detector分析仪上进行扩增和分析, 反应体系及反应条件同上, 每份标本均做ECM1和GAPDH测定. 反应结束后计算机将标本与标准曲线对比, 并结合内参得到各标本的ECM1基因拷贝数.

统计学处理 结果用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, SPSS10.0统计软件分析数据, 采用方差分析.

2 结果

2.1 组织细胞总RNA的质量鉴定 从组织细胞中提取的总RNA采用琼脂糖凝胶电泳对RNA完整性进行检测, 电泳显示18S、28S两条带, 28S亮度约为18S的2倍, 证实抽提的总RNA完整. 紫外分光光度仪检测RNA浓度, 所选用标本RNA的 $A_{260/280}$ 比值为1.8-2.2, 标本总RNA浓度为0.12-0.58 g/L.

2.2 标准曲线和线性范围 将不同浓度的阳性标准模板同时进行定量PCR检测, 检测临界点定在PCR产物进入指数增长期的起始点, 即Ct(Cycle threshold, 阈循环)值处, 将Ct值与不同定量模板的对数拟合作图, 得到一条定量标准曲线. 因此, 对未知样品可根据样品的Ct值和定量标准曲线计算出该样品的起始拷贝数. ECM1标准曲线的相关系数为0.999, GAPDH的标准曲线的相关系数为0.999.

2.3 各组组织中的ECM1基因的表达水平 46例正常黏膜中可检测到ECM1基因的表达, 均值为 $(9.81 \pm 3.16) \times 10^8$ 拷贝/g RNA; 18例腺瘤组织组织中ECM1均值为 $(10.1 \pm 3.65) \times 10^8$ 拷贝/g RNA; 25例结直肠癌(淋巴结未转移)组织中ECM1均值为 $(6.89 \pm 2.96) \times 10^9$ 拷贝/g RNA; 21例结直肠癌(淋巴结转移)组织中ECM1均值为 $(5.01 \pm 2.22) \times 10^{10}$ 拷贝/g RNA(表1). 统计分析结果显示, 正常黏膜和腺瘤组织组间无明显差异(方差检验, $P > 0.05$); 结直肠癌(淋巴结未转移)组明显高于正常黏膜和腺瘤组织组(方差检验, $P < 0.01$); 结直肠癌(淋巴结转移)组明显高于其他3组(方差检验, $P < 0.01$). 此结果表明, ECM1基因在结直肠癌中表达升高, 而且在转移性结直肠癌中升高更为明显.

表 1 各组组织细胞中的ECM1基因的表达水平(拷贝/g RNA)

分组	<i>n</i>	mean \pm SD
正常黏膜	46	$(9.81 \pm 3.16) \times 10^8$
腺瘤组织	18	$(10.1 \pm 3.65) \times 10^8$
结直肠癌		
淋巴结未转移	25	$(6.89 \pm 2.96) \times 10^9$
淋巴结转移	21	$(5.01 \pm 2.22) \times 10^{10}$

3 讨论

细胞外基质蛋白1是从鼠的成骨基质细胞系MN7中分离出来的一种85 kDa的分泌性糖蛋白, ECM1基因有3个不同的剪切体ECM1a, ECM1b和ECM1c, 分别编码540, 415和559个氨基酸的蛋白质, ECM1a可表达于各种组织, 但基因表达最丰富的是胎盘和心脏, ECM1b为限制性表达模式, 仅在扁桃体和角化细胞中可检测到, 而ECM1c的表达现仍未确定, 但在皮肤中约占ECM1 RNA的15%^[3-4]. 对于ECM1功能的研究, 目前主要集中该分子在骨及皮肤中作用的研究, 如现已发现ECM1是一种软骨内骨形成的负调节因子, 可抑制碱性磷酸酶的活性和骨的矿化^[5]; ECM1基因定位在染色体1q21的临近表皮分化复合体区, ECM1可能在角化细胞分化中起作用; ECM1基因的功能性缺失可导致类脂蛋白沉积症的发生^[6]; 硬化性苔癣患者血清中存在高滴度的ECM1自身抗体, 提示ECM1可能是硬化性苔癣患者体液免疫的一个作用靶点^[7].

目前, 已知细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肿瘤的发生、发展及转移等方面有重要作用, 尤其是在肿瘤的转移中, 一方面ECM能影响肿瘤细胞的增殖、转移, 另一方面肿瘤细胞与ECM的黏附、肿瘤细胞对ECM的侵袭及肿瘤细胞在ECM中的迁移等都与肿瘤的转移密切相关^[8-9]. 对于ECM1与肿瘤的关系, 目前的研究资料极少, Kebebew E *et al*^[10-11]研究报道, ECM1可作为恶性甲状腺肿瘤的一个诊断性标志物, 而且能提高针吸活检的正确率. Han *et al*^[12]研究表明, ECM1可促进血管内皮细胞的增殖(在体外培养中)和血管的生成(在鸡胚中), 同时还证明ECM1存在于两个恶性程度较高的乳腺癌细胞系MDA-435和LCC15的基质中, 而相对恶性程度较低的乳腺癌细胞系MCF-7、SK-BR3等则不表达ECM1. 已知血管的生成是肿瘤发展的一个

重要因素,在血管形成之前,大多数肿瘤相对较小,保持在原位,生长缓慢.然而,当血管生成后,肿瘤变得恶性程度更高,生长快速,侵袭和转移.据以上分析,ECM1很可能与肿瘤的发生和转移有某种关联性.

实时荧光定量PCR是近年来发展起来的一项新技术,是目前国际公认的核酸分子定量的标准方法^[12].TaqMan-MGB探针(TaqMan Minor Groove Binder Probe)是近年来在TaqMan探针的基础上发展起来的一种新型的荧光标记探针技术,可全程应用于荧光定量PCR分析,这种探针比TaqMan探针有更高的敏感性和特异性^[13-15].由于不同标本在RNA产量、质量以及逆转录效率上可能存在差别,为了标准化目标基因mRNA的表达,本实验用GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)作为内参基因同时进行扩增.在设计ECM1的引物和探针时,我们应用了ABI公司的Primer Express 2.0引物和探针设计软件设计了基因专一的引物和探针,两条引物设计在不同的外显子上(9和10外显子),以避免因RNA内基因组DNA的污染所造成的假阳性.这样的设计对ECM1的3种基因形式(ECM1a、ECM1b和ECM1c)都可检测,但缺点是不能区分为那种基因形式.

结直肠癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,发病率在我国占第4位,死亡率居第3位^[16].本文选取结直肠癌作为研究对象,成功建立检测人ECM1 mRNA的实时荧光定量PCR方法,研究发现,ECM1基因的表达水平在结直肠正常黏膜和腺瘤组织组间无明显差异($P>0.05$);结直肠癌(淋巴结未转移)组明显高于正常黏膜和腺瘤组织组($P<0.01$);结直肠癌(淋巴结转移)组明显高于其他三组($P<0.01$).此结果表明,ECM1基因在结直肠癌中表达升高,而且在转移性结直肠癌中升高更为明显,由此可认为ECM1基因在结直肠癌组织中过表达,并且与结直肠癌的转移相关.值得注意的是,从基因到蛋白的表达是一个复杂的过程,虽然我们发现了ECM1基因的这种表达现象,但ECM1蛋白是否会有类似的表达模式,这还有待于进一步深入研究(我们近来的实验研究初步证实ECM1蛋白有类似的表达,另文发表).另外,ECM1在肿瘤中到底发挥了怎样的作用,或这种相关仅仅是种附带现象,目前尚无这方面的研究资料,这也还需要进一步研究确认.也许ECM1可以作为一种新的肿瘤标记分

子,来判定结直肠癌或其他肿瘤恶性程度及预后,用于结直肠癌或其他肿瘤的诊断或治疗之中,这有待于进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Mathieu E, Meheus L, Raymackers J, Merregaert J. Characterization of the osteogenic stromal cell line MN7: identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting, and microsequencing. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 903-913
- 2 Han Z, Ni J, Smits P, Underhill CB, Xie B, Chen Y, Liu N, Tylzanowski P, Parmelee D, Feng P, Ding L, Gao F, Gentz R, Huylebroeck D, Merregaert J, Zhang L. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J* 2001; 15: 988-994
- 3 Smits P, Ni J, Feng P, Wauters J, Van Hul W, Boutaibi ME, Dillon PJ, Merregaert J. The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic structure, cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization. *Genomics* 1997; 45: 487-495
- 4 Mongiat M, Fu J, Oldershaw R, Greenhalgh R, Gown AM, Iozzo RV. Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 17491-17499
- 5 Deckers MM, Smits P, Karperien M, Ni J, Tylzanowski P, Feng P, Parmelee D, Zhang J, Bouffard E, Gentz R, Lowik CW, Merregaert J. Recombinant human extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals in vitro. *Bone* 2001; 28: 14-20
- 6 Hamada T, McLean WH, Ramsay M, Ashton GH, Nanda A, Jenkins T, Edelstein I, South AP, Bleck O, Wessagowit V, Mallipeddi R, Orchard GE, Wan H, Dopping-Hepenstal PJ, Mellerio JE, Whittock NV, Munro CS, van Steensel MA, Steijlen PM, Ni J, Zhang L, Hashimoto T, Eady RA, McGrath JA. Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). *Hum Mol Genet* 2002; 11: 833-840
- 7 Oyama N, Chan I, Neill SM, Hamada T, South AP, Wessagowit V, Wojnarowska F, D'Cruz D, Hughes GJ, Black MM, McGrath JA. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis. *Lancet* 2003; 362: 118-123
- 8 金博. 细胞外基质与肝脏肿瘤. 世界华人消化杂志 2002; 10: 63-64
- 9 韩韬, 段国兰. 细胞外基质与肿瘤转移关系的研究进展. 医学综述 2000; 6: 22-24
- 10 Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Ann Surg* 2005; 242: 353-361; discussion 361-363
- 11 Kebebew E, Peng M, Reiff E, McMillan A. Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 2006; 106:

■同行评价

本文对于细胞外基质蛋白1(ECM1)基因在结肠癌中的表达及其临床意义做了部分研究和探讨,进一步充实了该领域的研究,提出了比较有价值的新的研究发现.有一定的可读性.

- 2592-2597
- 12 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7276-7280
- 13 Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 655-661
- 14 de Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, Swinkels DW. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum Mutat* 2002; 19: 554-559
- 15 Walburger DK, Afonina IA, Wydro R. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63D mutations in the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis. *Mutat Res* 2001; 432: 69-78
- 16 李季, 田素礼, 李巍, 李福蕴. 结直肠癌中PETN的缺失表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2771-2775

电编 何基才 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer

27-30 June 2007

Barcelona

meetings@imedex.com

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation

10 October 2007

Dresden

symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13th Annual International Congress

20-23 June 2007

Rio De Janeiro

www.ilts.org

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology

11-12 October 2007

Dresden

symposia@falkfoundation.de

ERCP在胆总管结石患者胆汁细菌学研究中的价值

吴汉平, 康生朝, 张方信, 马强

吴汉平, 康生朝, 张方信, 马强, 兰州军区兰州总医院消化内科 甘肃省兰州市 730050
通讯作者: 吴汉平, 730050, 甘肃省兰州市, 兰州军区兰州总医院消化内科. wuhanp@yahoo.com.cn
电话: 0931-8975243
收稿日期: 2007-02-04 接受日期: 2007-03-17

Clinical significance of endoscopic retrograde cholangiopancreatography for bacteriological study of bile in patients with choledocholithiasis

Han-Ping Wu, Sheng-Chao Kang, Fang-Xin Zhang, Qiang Ma

Han-Ping Wu, Sheng-Chao Kang, Fang-Xin Zhang, Qiang Ma, Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Correspondence to: Han-Ping Wu, Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. wuhanp@yahoo.com.cn
Received: 2007-02-04 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To discuss the reliability of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) in a bacteriological study of choledochal bile and to study the bacterial category and antibiotic susceptibility in bile of choledocholithiasis patients in the Lanzhou area.

METHODS: Bile was aspirated by ERCP in 36 choledocholithiasis patients and 11 non-stone control patients to assess bacterial category and antibiotic susceptibility.

RESULTS: Twenty-nine strains of bacteria were found in 25 (69.4%) of the choledocholithiasis patients and 1 (9.1%) patient in the non-stone control group. Twenty-three of the 29 strains (79.3%) were gram-negative, including *Escherichia coli* (14), *Klebsiella pneumoniae* (5) and *aeruginosum* (3). Six strains were Gram-positive (20.7%). With respect to antibiotics, gram-negative bacilli were sensitive to imipenem (23/23,

100%), ceftazidime (21/23, 91.3%), and cefepime (18/23, 78.3%), but resistant to ampicillin (23/23, 100%), ciprofloxacin (16/23, 69.6%) and gatifloxacin (15/23, 65.2%). Gram-positive bacteria were sensitive to ciprofloxacin (6/6, 100%), vancomycin (6/6, 100%) and levofloxacin (4/6, 66.7%).

CONCLUSION: ERCP is an easy, reliable method to obtain bile for bacteriological study. Gram-negative bacilli (mainly *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *aeruginosum*) exist in the bile of most choledocholithiasis patients in the Lanzhou area. Imipenem and ceftazidime were the most effective antibiotics.

Key Words: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Choledocholithiasis; Bile; Bacteria

Wu HP, Kang SC, Zhang FX, Ma Qiang. Clinical significance of endoscopic retrograde cholangiopancreatography for bacteriological study of bile in patients with choledocholithiasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1965-1967

摘要

目的: 探讨ERCP法取材进行胆汁细菌学研究的可靠性, 并初步了解兰州地区胆总管结石患者的胆汁中细菌种类及药敏情况。

方法: 对36例胆总管结石患者及11例非结石胆道狭窄患者行ERCP检查, 用导管取胆汁行细菌培养及药敏试验。

结果: 胆总管结石组中25例(69.4%)检出29株细菌, 革兰氏阴性菌23株(79.3%), 大肠埃希氏菌14株, 克雷伯氏菌5株及铜绿假单胞菌3株, 主要敏感抗生素为亚胺培南(23/23, 100%), 头孢他啶(21/23, 91.3%), 头孢吡肟(18/23, 78.3%); 革兰氏阳性菌6株(20.7%), 主要敏感抗生素为环丙沙星(6/6, 100%), 万古霉素(6/6, 100%)及左氧氟沙星(4/6, 66.7%); 非结石胆道狭窄患者11例胆汁标本有1例(9.1%)检出细菌, 两组有显著差别($P < 0.05$)。

结论: ERCP法取胆汁进行细菌学研究是简

■背景资料

胆总管结石与胆道细菌感染关系密切, 两者可能互为因果。研究胆总管结石患者胆道中细菌存在与分布情况对针对性治疗意义重大。以往对胆汁细菌学研究只能通过手术取材, 可行性差。随着ERCP技术的发展, 内镜法取胆汁进行研究成为受人关注的新方法。

■相关报道

既往的研究提示胆管结石患者无症状期胆汁中多存在细菌,并可能是结石形成的原因(参考文献3-4);ERCP目前已成为胆管结石的最佳治疗方法(参考文献5-8);胆管结石患者胆汁中以革兰氏阴性菌为主,可多种菌并存,多数对亚胺培南及三代头孢敏感(参考文献10-15)。

便、可靠的方法。多数胆总管结石患者胆汁中存在革兰氏阴性菌,以大肠埃希氏菌为主,克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌次之,亚胺培南及头孢他啶为其主要敏感抗生素。

关键词: 逆行胰胆管造影;胆总管结石;胆汁;细菌

吴汉平, 康生朝, 张方信, 马强. ERCP在胆总管结石患者胆汁细菌学研究中的价值. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1965-1967

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1965.asp>

0 引言

胆总管结石与胆道细菌感染关系密切。最早有国外学者研究发现,100%胆总管结石中可检出细菌,提示细菌在胆总管结石形成中起到重要作用^[1]。在本研究中,我们探讨了通过内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)对胆总管结石患者取胆汁进行细菌学研究的可靠性,并同时初步了解胆总管结石患者胆汁细菌学及药敏特点。

1 材料和方法

1.1 材料 Olympus TJF-240电子十二指肠镜;造影导管;VITEK32型全自动微生物鉴定仪。实验组:2006年我院就诊胆总管结石(排除并存胆囊结石者)患者36例,其中,男13例,女23例,年龄32-81(平均52.5)岁。该组所有患者均通过腹部B超、CT或MRI检查,并最终经ERCP证实。对照组:同期我院就诊的非结石胆总管狭窄患者11例(男4例,女7例),年龄35-78(平均55)岁。所有患者均通过腹部B超、CT或MRI检查发现胆总管扩张,ERCP证实胆总管内无结石(其中胆总管炎性狭窄7例,乳头括约肌功能紊乱3例,胆管癌1例)。两组患者在ERCP术前10 d内均无腹痛、发热、黄疸等急性胆道感染症状。两组性别年龄差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 取材方法 患者行ERCP检查。术前十二指肠镜插入部及内腔、造影导管均用0.2 mol/L戊二醛浸泡30 min以上,并用无菌水冲洗后备用。胆总管深插管成功后,先用无菌注射器抽吸胆汁5 mL后弃去,再换用无菌注射器抽取胆汁2 mL立即送检。

1.2.2 需氧菌培养 所取胆汁标本接种在血平板上,37℃恒温箱中进行常规培养,48 h后观察结果。用VITEK32型全自动微生物鉴定仪进行细菌鉴定及药敏试验。

统计学处理 用统计软件SPSS11.0对数据进行卡方检验。

2 结果

2.1 胆汁需氧菌培养及菌种分析 胆总管结石组36例胆汁标本需氧菌培养25例检出细菌,共检出需氧菌29株。阳性检出率为69.4%。革兰氏阴性菌23株,占该组检出细菌的79.3%。其中大肠埃希氏菌14株,克雷伯氏菌5株,铜绿假单胞菌3株,嗜水气单胞菌1株。革兰氏阳性菌6株,占20.7%,其中肠球菌3例,金黄色葡萄球菌2株,表皮葡萄球菌1株。对照组11例胆汁标本有1例检出细菌,检出率为9.1%,所检出细菌为铜绿假单胞菌。两组相比,细菌检出率有明显差别($P<0.01$)。

2.2 抗生素敏感性分析 药敏试验结果表明,胆总管结石组检出革兰氏阴性菌的敏感抗生素依次为:亚胺培南(23/23, 100%),头孢他啶(21/23, 91.3%),头孢吡肟(18/23, 78.3%);耐药抗生素依次为:氨苄青霉素(23/23, 100%),环丙沙星(16/23, 69.6%),加替沙星(15/23, 65.2%)。革兰氏阳性菌的敏感抗生素为:环丙沙星(6/6, 100%),万古霉素(6/6, 100%)及左氧氟沙星(4/6, 66.7%)。

3 讨论

正常情况下胆汁内无细菌生长。但据国内外文献报道^[2-3],在无症状期及并发胆道感染的胆总管结石患者胆汁中可培养出一种或多种致病菌株,这些致病菌几乎都来自肠道,为条件致病菌,经Vater壶腹(或胆肠吻合口)逆行进入胆道,亦可通过血行或淋巴通道进入胆道。胆汁中细菌的存在不但是促进胆总管结石形成的重要因素^[4],而且也成为胆总管结石患者反复出现胆道感染的病原菌。因此,了解胆总管结石患者胆汁中细菌的种类及药敏情况对指导临床选择抗生素至关重要。既往对胆汁的细菌学研究主要是通过手术中抽取胆汁标本。但近年来随着ERCP技术的普及,内镜下乳头括约肌切开取石术由于微创、安全、经济等优点,已经成为治疗胆总管结石的最佳选择^[5-8]。对内镜下治疗的患者,经导管抽吸胆汁进行细菌检测的可靠性曾受到质疑。因为内镜、导管无法严格消毒,并在进镜、插管过程中可受到胃肠道内细菌污染而影响检测结果。我们采用对照研究方法证实,在相同取材条件及方法下,胆总管结石患者胆汁中细菌的检出率显著高于非结石胆道狭窄患者,

且其细菌种类、比例与手术采集标本相近^[3,9], 并且与国内外其他学者进行的胆道细菌学研究结果相近^[10-15]. 非结石胆道狭窄组11例中仅1例检出细菌(该例患者为胆管癌, 导管越过狭窄处抽出较混浊含絮状物的胆汁), 其余均为阴性. 这证明采用0.2 mol/L戊二醛充分浸泡内镜及导管, 取材过程中注意无菌操作, 所采集的胆汁标本受外源细菌污染的可能性很小. 内镜法取材进行胆汁的细菌学研究较手术取材简便, 而两者结果的可靠性相当.

我们也同时初步了解了兰州地区胆总管结石患者的胆汁中细菌种类及其药敏情况. 结果表明, 多数胆总管结石患者在无症状期其胆道内也有致病菌存在, 多数为革兰氏阴性菌, 以大肠埃希氏菌为主, 克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌次之, 其敏感抗生素为: 亚胺培南及头孢三代, 而对喹诺酮类抗生素耐药率较高. 少数患者为革兰氏阳性菌(肠球菌、葡萄球菌), 对喹诺酮类抗生素及万古霉素较敏感.

4 参考文献

- 1 Tabata M, Nakayama F. Bacteria and gallstones. Etiological significance. *Dig Dis Sci* 1981; 26: 218-224
- 2 Leung JW, Liu YL, Lau GC, Chan RC, Lai AC, Ling TK, Cheng AF. Bacteriologic analyses of bile and brown pigment stones in patients with acute cholangitis. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 340-345
- 3 廖彩仙, 邹衍泰, 林建华, 王孟龙, 吕祥枝. 无症状期胆管结石病人的胆汁细菌学分析. *中华肝胆外科杂志* 1999; 5: 397-398
- 4 陈晓文, 智发朝, 曹东林, 周思朗, 陈勇伟, 谢栋. 胆总管结石的成因观察. *第四军医大学学报* 2006; 27: 261-263
- 5 Freitas ML, Bell RL, Duffy AJ. Choledocholithiasis: evolving standards for diagnosis and management. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3162-3167
- 6 Lakatos L, Mester G, Reti G, Nagy A, Lakatos PL. Selection criteria for preoperative endoscopic retrograde cholangiopancreatography before laparoscopic cholecystectomy and endoscopic treatment of bile duct stones: results of a retrospective, single center study between 1996-2002. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3495-3499
- 7 王立新, 彭颖, 徐智, 侯纯升, 凌晓峰, 陆少美, 张同琳, 周孝思. 胆总管结石的内镜治疗. *中国微创外科杂志* 2007; 7: 43-45
- 8 范震, 张啸, 张筱凤, 吕文, 林秀英, 郭英辉, 黄平, 赵幼安, 郝洪升, 李延青. 十二指肠镜治疗胆总管结石583例疗效分析. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 167-169
- 9 周平红, 姚礼庆, 徐美东. 胆道感染病原菌调查与耐药性分析. *中国临床医学* 2001; 8: 648-650
- 10 万建华, 赵金满. 胆系感染病原菌及耐药性分析. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1234-1235
- 11 陈晓文, 智发朝, 周丹, 万田谟, 朱建新. 胆总管结石伴胆道感染胆汁细菌培养结果分析. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 369-370
- 12 叶国良, 陈会松, 盛红, 程德希. 胆石症并胆道感染患者胆汁与血细菌培养比较及药敏分析. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 805-807
- 13 Flores C, Maguilnik I, Hadlich E, Goldani LZ. Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary hospital. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 333-336
- 14 Chang WT, Lee KT, Wang SR, Chuang SC, Kuo KK, Chen JS, Sheen PC. Bacteriology and antimicrobial susceptibility in biliary tract disease: an audit of 10-year's experience. *Kaohsiung J Med Sci* 2002; 18: 221-228
- 15 Neve R, Biswas S, Dhir V, Mohandas KM, Kelkar R, Shukla P, Jagannath P. Bile cultures and sensitivity patterns in malignant obstructive jaundice. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22: 16-18

■同行评价

本文通过研究使用ERCP在不同病人胆汁中检查细菌菌株的对比, 认为ERCP是简便可靠的, 可推广的取胆汁行细菌检查的方法. 这对胆总管结石患者的抗感染治疗具有一定的指导作用.

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

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

结直肠高级别上皮内瘤变的临床分析38例

钟晓刚, 黄顺荣, 殷舞, 麦威, 秦千子

■背景资料

WHO肿瘤新分类中把上皮内瘤变概念引入胃肠道肿瘤的诊治, 便于规范和交流, 防止临床过度治疗。高级别瘤变相当于重度异常增生和原位癌。临床医生如何认识“高级别上皮内瘤变”病理诊断和合理制定该类患者的处理策略值得探讨。

钟晓刚, 黄顺荣, 麦威, 秦千子, 广西壮族自治区人民医院胃肠外科 广西南宁市 530021

殷舞, 广西壮族自治区人民医院病理科 广西南宁市 530021
通讯作者: 钟晓刚, 530021, 广西南宁市桃源路6号, 广西壮族自治区人民医院胃肠外科. zhongxiaogang@csc.org.cn

电话: 0771-2186306

收稿日期: 2007-02-09 接受日期: 2007-03-07

Clinicopathologic characteristics of high-grade colorectal intraepithelial neoplasia: analysis of 38 cases

Xiao-Gang Zhong, Shun-Rong Huang, Wu Yin, Wei Mai, Qian-Zi Qin

Xiao-Gang Zhong, Shun-Rong Huang, Wei Mai, Qian-Zi Qin, Department of Gastrointestinal Surgery, Guangxi People's Hospital, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wu Yin, Department of Pathology, Guangxi People's Hospital, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Xiao-Gang Zhong, Department of Gastrointestinal Surgery, Guangxi People's Hospital, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zhongxiaogang@csc.org.cn

Received: 2007-02-09 Accepted: 2007-03-07

Abstract

AIM: To reveal the clinicopathological features of high-grade colorectal intraepithelial neoplasia and discuss treatment strategy.

METHODS: Thirty-eight cases of high-grade colorectal intraepithelial neoplasia diagnosed by colonoscopy biopsy were treated and followed up for 3 to 36 months. A retrospective review of clinical findings, endoscopic and histopathological features, and prognosis was used to determine appropriate treatment and follow-up for high-grade colorectal intraepithelial neoplasia.

RESULTS: Among the 38 patients, 17 underwent a preoperative endoscopic biopsy and agreed to a surgical operation; lesions in 19 cases were endoscopically resected, while the remaining 2 cases just agreed to being followed-up. Seventeen cases were diagnosed with a malignant carcinoma, and 21 eventually showed

high-grade colorectal intraepithelial neoplasia. Pathological diagnosis pre- and post-treatment showed poor consistency; the Kappa value was 0.376, and in the cases of endoscopic clamping biopsy it was 0.580. Of the patients undergoing surgical or endoscopic treatment, one with malignant carcinoma had liver metastasis, and one suffered a recurrence 11 months later. One case with high-grade colorectal intraepithelial neoplasia was found to have an adenocarcinoma at a previous endoscopic resection site after 3 months. There were no new tumors in the other cases during 3 years of follow-up. In accordance with the characteristics of carcinoma cases, cancer risk appears related to tumor size, endoscopic features, severity of clinical symptoms, the villous morphology of biopsy pathology, and a high level of CEA or CA19-9.

CONCLUSION: Close attention needs to be paid when using the WHO's new diagnostic standards of high-grade intraepithelial neoplasia instead of the prestige of tumors of the digestive system. Clinicians should be careful when choosing treatment for high-grade intraepithelial neoplasia, especially in cases of endoscopic clamping biopsy.

Key Words: Intraepithelial neoplasia; Colorectum; Carcinoma; Treatment

Zhong XG, Huang SR, Yin W, Mai W, Qin QZ. Clinicopathologic characteristics of high-grade colorectal intraepithelial neoplasia: analysis of 38 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1968-1971

摘要

目的: 研究结直肠高级别上皮内瘤变的临床病理特征, 探讨临床合理治疗决策。

方法: 回顾性总结38例经内镜检查和病理初步诊断为结直肠高级别上皮内瘤变患者的临床资料, 分析其临床表现、内镜形态学、组织病理学特点、预后等, 随访观察3-36 mo。

结果: 38例患者中, 最终确诊17例为结直肠癌, 21例仍为高级别上皮内瘤变。治疗前后诊断一致性较差(Kappa值为0.376)。结直肠高级别

■研发前沿

结直肠高级别上皮内瘤变临床病理诊断的适用性、临床医生如何合理制定治疗策略以及其癌变的化学预防是目前研究的热点和难点。

上皮内瘤变合并癌的高危因素包括: 肿瘤大小、内镜形态特点、症状严重、绒毛状腺瘤合并高级别上皮内瘤变、CEA或CA19-9增高等。

结论: 使用WHO新的诊断结直肠高级别上皮内瘤变需引起临床医生重视, 特别是对于内镜下单纯活检病例, 应当谨慎选择治疗方式和随访时间。

关键词: 上皮内瘤变; 结直肠; 肿瘤; 治疗

钟晓刚, 黄顺荣, 殷舞, 麦威, 秦千予. 结直肠高级别上皮内瘤变的临床分析38例. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1968-1971
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1968.asp>

0 引言

结直肠癌前病变在临床中倍受关注, 但表述众多、易于混淆, WHO肿瘤新分类中把上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia)概念引入胃肠道肿瘤的诊断, 便于规范和交流。上皮内瘤变分为低级别和高级别, 高级别指结构和细胞学异常扩展到上皮上半部, 乃至全层, 相当于重度异常增生和原位癌^[1], 是具有恶性特征的黏膜病变, 但无浸润间质证据, 而病理诊断结直肠癌必须存在浸润穿透黏膜肌层进入黏膜下层的依据^[2]。因此临床医生如何认识“高级别上皮内瘤变”病理报告, 如何合理制定该类患者的处理策略值得探讨。现总结分析正式使用这一病理诊断以来, 我科诊治的38例结直肠高级别上皮内瘤变患者临床和随访资料, 为临床合理处置提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-10/2006-10广西壮族自治区人民医院收治结直肠高级别上皮内瘤变38例, 经电子肠镜和病理活检初步诊断。其中男22例, 女16例, 年龄26-84(中位58)岁, 随访时间3 mo-3 a。临床主要症状包括: 便血21例, 大便性状改变7例, 腹痛5例, 腹块2例, 贫血或消瘦3例。肿瘤部位: 右半结肠7例, 左半结肠10例, 直肠21例, 其中距肛缘5 cm以上15例, 距肛缘5 cm以下6例。肿瘤直径0.7-6.5 cm, 18例 ≥ 2 cm, 20例 < 2 cm。多原发肿瘤4例, 高级别瘤变合并同时癌变6例。

1.2 方法

38例患者接受术前肠镜检查49次, 病理检查49次, 其中29次为单纯肠镜下活检, 20次为肠镜下肿瘤切除活检; 19例接受肠镜下肿瘤切除, 17例接受外科手术治疗, 2例因故未做特殊治疗, 全部病例均接受临床随访。31例患者在接受治疗后, 进行了第2次肠镜复查。手术治疗方式包括:

局部肿瘤切除、局部肠段切除、(腹腔镜或开放)根治性、姑息性切除手术。治疗前后肿瘤标本行病理检查进行比较分析; 对症状、CEA、CA19-9等肿瘤标志物、肠镜及病理特征以及预后情况作总结分析, 采用信访、电话和门诊随访等方式随访, 临床相关资料见表1。

统计学处理 数据用SPSS13.0统计软件分析, Kappa或 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 临床与病理诊断 初诊38例高级别瘤变患者中17例接受手术, 19例接受肠镜下肿瘤切除, 最后诊断以术后病理和随访结果做出。手术组: 术后病理结果14例为癌, 其余3例仍为高级别瘤变, 术前首次即明确合并癌变者6例, 术前反复内镜检查和病理活检最终明确为癌者3例, 术后病理才明确为癌者5例, 内镜治疗组: 共3例确诊癌。浸润癌所占总体比例为44.7%(17/38), 高级别瘤变诊断符合率为65.63%(21/32), 总体诊断一致性Kappa值为0.376。初诊38例高级别瘤变患者, 治疗前肠镜下单纯病理钳夹活检29次, 其中癌性病变接受活检共15次, 仅8次病理报告为癌, 诊断一致性Kappa值为0.580, 内镜切除肿瘤后病理结果与最后诊断及随访结果比较, 诊断一致性Kappa值为0.643(表2)。

2.2 外科治疗和随访 17例接受外科手术, 14例恶性肿瘤中行根治术12例, 术中配合肠镜定位者2例, 术中冰冻为癌做局部切除加根治者1例, 1例术中发现肝转移, 术后病理明确已有淋巴结转移8例, 术后临床病理分期如下: Dukes' A期1例(7.14%), Dukes' B期5例(35.71%), Dukes' C期6例(42.86%), Dukes' D期2例(14.29%), 淋巴结转移比例为57.14%(8/14)。随访结果提示14例接受手术的恶性患者无死亡, 随访最长者无瘤存活已32 mo, 1例术后11 mo出现局部肿瘤复发, 总体预后与目前报道结直肠癌相当。

2.3 内镜治疗和随访 内镜下圈套器热凝切除或黏膜下局部切除(EMR)19例, 其中浸润癌2例, 但未接受进一步手术治疗。另17例高级别瘤变者中有13例在3 mo内接受了肠镜复查, 发现异常者1例, 病理诊断为浸润癌, 后手术治疗。此例患者在第一次肠镜时病变即大于3 cm, 无蒂, 曾临床疑癌, 但两次活检不支持, CEA和CA19-9无增高, 患者不愿外科手术, 行肠镜下瘤体切除。肠镜下局部切除的高级别瘤变患者已接受为期5-36 mo随访, 目前尚未出现癌变, 仍继续接受1 a 1次的肠镜随访, 未进行药物干预。2例因故从未

■创新盘点

本文全面的总结分析诊治的结直肠高级别上皮内瘤变病例的临床、病理特征, 并进行较长期的随访观察, 对高级别上皮内瘤变诊断适用性、治疗合理选择、癌变的高危因素、诊治后随访等临床问题作出客观的评价, 为临床诊治提供参考。

■应用要点

正确理解上皮内瘤变概念和临床应用的适用性,合理的决定治疗策略。

表 1 结直肠高级别上皮内瘤变外科手术和内镜治疗及随访结果

项目		外科手术		内镜治疗	
		<i>n</i>	比例(%)	<i>n</i>	比例(%)
术后病理	高级别瘤变	3	17.65	17	89.47
	浸润癌	14	82.35	2	10.53
随访诊断	前后一致(3 mo内)	17	100.00	18	94.73
	前后不一致(3 mo内)	0	0.00	1	5.27
最后诊断	高级别瘤变	3	17.65	16	84.21
	浸润癌	14	82.35	3	15.79
手术方式	外科局部肠段切除	1	5.88		
	外科局部肿瘤切除	2	11.67		
	局切后补根治手术	1	5.88		
	根治性手术	11	64.71		
	姑息性手术	2	11.76		
内镜治疗	圈套器热凝切除或EMR			19	
肿瘤标志物	CEA升高	6	42.86	2	10.53
	CA19-9升高	4	28.57	0	0.00
淋巴结转移	有	8	57.14	0	0.00
浸润癌预后	复发/转移	2	14.29	0	0.00
	无瘤生存	12	85.71	3	100.00

进行治疗者,分别随访8, 15 mo, 接受了肠镜复查,病理不支持癌变。

2.4 癌变相关高危因素 全部17例恶性肿瘤中, 10例肿瘤直径超过2 cm(58.82%), 21例上皮内瘤变直径超过2 cm仅8例(38.10%), 经 χ^2 检验两组间差异有统计学意义($P<0.01$, 表3)。17例恶性肿瘤中, 治疗前临床或肠镜诊断疑癌者11例(68.75%), 初次病理为绒毛状腺瘤伴高级别瘤变6例, 4例最终诊断为癌(66.67%), 6例恶性肿瘤CEA增高, 4例恶性肿瘤CA19-9增高, 出现明显梗阻症状或消瘦3例患者, 术后病理均为癌。

3 讨论

“上皮内瘤变”诊断的引入应用于界定胃肠肿瘤性病变, 目的有利于统一, 避免临床过度治疗^[3], 2002年Vienna分类又将“上皮内瘤变”称为“黏膜内肿瘤”^[4]。但与此同时如临床医生不能正确理解和认识此诊断, 合理处置, 则可能延误病情。分析我院收治的38例高级别瘤变患者, 治疗后病理诊断结合随访, 确诊为癌共17例, 其中术前即合并有癌的6例, 病理仍为高级别瘤变的21例, 病理诊断的一致性较差, 尤以肠镜下单纯病理活检明显, 但多次活检可提高准确率, 完整切除肿瘤后病理结果与最后诊断及随访结果较一致。全部病例总体诊断一致性Kappa值为0.376。诊断的一致性较差, 其原因与内镜下病理取材有关, 因此对不是完整切除瘤体后的病理, 需持谨慎态度。

上皮内瘤变更强调肿瘤的演进过程, 病理医生诊断浸润前病变, 特别是高级别上皮内瘤

表 2 诊断一致性Kappa分析(*n*)

诊断	总体病例		单纯活检病例		切除活检病例	
	初诊	确诊	初诊	确诊	初诊	确诊
高级别瘤变	32	21	21	14	19	18
癌	6	17	8	15	1	2
Kappa值	0.376		0.580		0.643	

表 3 结直肠肿瘤大小与诊断结果的比较(*n*)

肿瘤大小	诊断		合计
	高级别瘤变	癌	
≥2 cm	8	10	18
<2 cm	13	7	20
合计	21	17	38

$P<0.01$.

变, 并不排除该病灶同时存在癌的可能, 临床医师应当改变肿瘤非良性即恶性的简单概念。分析原诊断结直肠高级别上皮内瘤变, 最后诊断为癌或者随访期间明确为癌者的相关因素, 发现可能高危因素包括: (1)临床和肠镜特点高度疑癌; (2)患者症状重, 特别是有消瘦表现; (3)CEA或CA19-9明显增高; (4)肿瘤直径大于2 cm($P<0.01$), 特别是大于3 cm病变; (5)临床出现不全梗阻或表现为腹块者; (6)绒毛状腺瘤伴高级别瘤变等。因此对于结直肠单纯活检中应用这一诊断术语, 如果具有上述危险因素者, 提倡积极处理, 但尚需要进一步扩大病例准确分

■名词解释

上皮内瘤变, 是一种以形态学改变为特征的上皮性病变, 既包括组织结构和细胞形态学改变, 也包括增殖动力学和细胞分化的异常。大多数学者将其视为异常增生的同义词。

析合并癌变的高危因素以指导临床. 文献报道超声内镜和染色内镜能提高诊断准确率^[5], 临床可加强应用总结.

从解剖学及肿瘤生物学基础分析, 结直肠中黏膜固有层存在淋巴管, 但肿瘤浸润不超过黏膜下层不转移^[6]. 本组手术病例中恶性者淋巴结转移比例已达57.14%(8/14), 其中Dukes' C期6例, Dukes' D期2例, 1例已有肝脏转移, 如不及时治疗, 可能延误病情. 因此应结合临床、X光、内窥镜、患者自身体质以及有无癌变的高危因素等多因素来决定治疗方案. 尤其对于临床或内镜下诊断疑癌者, 虽然病理诊断高级别瘤变, 不支持癌, 临床医生应当多次肠镜下活检病理确诊, 必要时积极的手术处理. 对于直肠高级别瘤变, 特别是近肛缘的病变, 由于涉及能否保留肛门, 需慎重决定手术方式^[7]; 应当在作好根治手术准备的情况下, 扩肛后局部完整切除, 由冰冻或最终的石蜡病理切片结果再决定术式. 当然, 在某些微创手术医疗中心, 开展腹腔镜内镜配合手术或经肛内镜微创手术不失为处理结直肠高级别瘤变较好的微创方式^[8].

“腺瘤-癌序列”已为多数病理和临床医师所认可, 肿瘤性息肉从理论上讲有癌变可能^[9, 10], 因此结直肠高级别上皮内瘤变如何随访、如何干预, 值得临床思考. 文献报道, 内镜下切除肿瘤患者中20%或更多患者1 a后结肠镜检可以发现新肿瘤病灶^[11], 而未经治疗的腺瘤性息肉经过5-10 a可发现同位置癌变, 但对于高级别上皮内瘤变随访时间如何确定尚无统一标准^[12]. 本组多数患者接受内镜切除术后3 mo、术后1 a肠镜复查, 未出现穿孔等并发症, 3 mo内发现1例患者为癌, 给予了及时治疗. 目前一般认为不到3 mo内发现浸润性癌, 表明最初活检时已存在癌. 参考既往对结直肠腺瘤治疗随访指南, 对于高级别上皮内瘤变, 接受术后3 mo近期肠镜复查和每12 mo复查一次肠镜可能是临床获益的, 特别如有临床疑癌等高危因素, 建议多次取材, 以排除第一次肠镜取材小、表浅或在病灶边缘取材等误差所导致信息量不足. 肿瘤标志物如CEA, CA19-9以及大便隐血等客观指标也是随访观察的重要内容. 当然, 能否借助肿瘤恶变过程中更特异的分子标记等来协助诊断值得期待^[13], 如何防止高级别瘤变癌变的药物化学预防也有待研究^[14], 这些必将对临床选择产生重要影响.

4 参考文献

- Hamilton SR, Altonen LA. World Health Organization classification of tumor. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press 2000: 105-118
- 来茂德. WHO新的结直肠肿瘤分类的特点. 中华病理学杂志 2003; 32: 170-172
- 吕福东, 刘复生. 胃肠道上皮性肿瘤的分类及诊断存在的问题. 癌症进展杂志 2005; 3: 87-91
- Dixon MF. Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited. *Gut* 2002; 51: 130-131
- Bianco MA, Rotondano G, Marmo R, Garofano ML, Piscopo R, de Gregorio A, Baron L, Orsini L, Cipolletta L. Predictive value of magnification chromoendoscopy for diagnosing invasive neoplasia in nonpolypoid colorectal lesions and stratifying patients for endoscopic resection or surgery. *Endoscopy* 2006; 38: 470-476
- 王鲁平, 虞积耀. 胃肠道活检标本诊断中病理诊断术语与认识的进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2007-2009
- Watson AJ, Smith BB, Whitehead MR, Sykes PH, Frizelle FA. Malignant progression of anal intraepithelial neoplasia. *ANZ J Surg* 2006; 76: 715-717
- Cocilovo C, Smith LE, Stahl T, Douglas J. Transanal endoscopic excision of rectal adenomas. *Surg Endosc* 2003; 17: 1461-1463
- Joyce T, Pintzas A. Microarray analysis to reveal genes involved in colon carcinogenesis. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 895-900
- Luebeck EG, Moolgavkar SH. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15095-15100
- Fornasarig M, Valentini M, Poletti M, Carbone A, Bidoli E, Sozzi M, Cannizzaro R. Evaluation of the risk for metachronous colorectal neoplasms following intestinal polypectomy: a clinical, endoscopic and pathological study. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1565-1572
- Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, Smith RA, Lieberman DA, Burt RW, Levin TR, Bond JH, Brooks D, Byers T, Hyman N, Kirk L, Thorson A, Simmang C, Johnson D, Rex DK. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 143-59; quiz 184-185
- Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Odze RD. Utility of MMP-1, p53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 206-215
- Kelloff GJ, Lippman SM, Dannenberg AJ, Sigman CC, Pearce HL, Reid BJ, Szabo E, Jordan VC, Spitz MR, Mills GB, Papadimitrakopoulou VA, Lotan R, Aggarwal BB, Bresalier RS, Kim J, Arun B, Lu KH, Thomas ME, Rhodes HE, Brewer MA, Follen M, Shin DM, Parnes HL, Siegfried JM, Evans AA, Blot WJ, Chow WH, Blount PL, Maley CC, Wang KK, Lam S, Lee JJ, Dubinett SM, Engstrom PF, Meyskens FL Jr, O'Shaughnessy J, Hawk ET, Levin B, Nelson WG, Hong WK. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3661-3697

■同行评价

本文属于回顾性的临床总结, 临床病理资料较齐全, 结合目前的病理概念讨论了结直肠高级别上皮内瘤变的临床处理, 外科治疗的注意点, 有一定的临床参考价值.

电编 何基才 编辑 张焕兰

T淋巴细胞亚群和DNA倍体检测在腹水鉴别诊断中的价值

张卫国, 童强, 王强, 王小虎, 李胜保

■背景资料

腹水检测对疾病的判断有着非常重要的意义。目前, 大多数医院仍然采用一般性状态、生化、细胞及细菌检查等传统检测手段。对于鉴别感染性与非感染性腹水方面的敏感性、特异性等远远不能满足临床的需要。需要寻找新的检测方法而流式细胞仪检测相当准确、快捷, 有必要在这方面进行探讨。

张卫国, 童强, 王强, 王小虎, 李胜保, 郟阳医学院附属太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000

通讯作者: 童强, 442000, 湖北省十堰市, 郟阳医学院附属太和医院消化内科. zwg789@sina.com
电话: 0719-8801430

收稿日期: 2006-12-20 接受日期: 2007-04-02

Value of T lymphocyte subset determination and DNA ploidy analysis for differential diagnosis of ascites

Wei-Guo Zhang, Qiang Tong, Qiang Wang, Xiao-Hu Wang, Sheng-Bao Li

Wei-Guo Zhang, Qiang Tong, Qiang Wang, Xiao-Hu Wang, Sheng-Bao Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Taihe Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Wei-Guo Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Taihe Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China. zwg789@sina.com

Received: 2006-12-20 Accepted: 2007-04-02

Abstract

AIM: To investigate the value of T lymphocyte subset determination and DNA ploidy analysis for differential diagnosis of ascites.

METHODS: In 74 cases of ascites, 24 with tuberculous peritonitis, 21 with liver cirrhosis and 29 with carcinomatous ascites, T lymphocyte subsets and DNA ploidy in ascitic fluid were detected by flow cytometry.

RESULTS: In descending order of T lymphocyte ($CD3^+$), helper/inducer T lymphocyte ($CD4^+$), and helper T lymphocyte/suppressor T lymphocyte ($CD4^+/CD8^+$) in ascitic fluid, tuberculous peritonitis ($CD3^+$: $86.2\% \pm 5.1\%$, $CD4^+$: $64.3\% \pm 6.4\%$, $CD4^+/CD8^+$: $3.20\% \pm 0.30\%$), carcinomatous ascites ($65.7\% \pm 4.6\%$, $32.5\% \pm 2.2\%$, $1.04\% \pm 0.11\%$) and liver cirrhosis ($15.1\% \pm 2.7\%$, $3.6\% \pm 0.5\%$, $0.36\% \pm 0.05\%$) ($P < 0.01$) were determined. In ascending order, $CD8^+$, liver cirrhosis ($10.1\% \pm 3.2\%$), tuberculous peritonitis ($20.1\% \pm 4.3\%$) and carcinomatous ascites ($31.3\% \pm 5.2\%$) ($P < 0.01$) were determined. The positive rate from

DNA ploidy analysis in carcinomatous ascites (89.7% , 26/29) was significantly higher than that in tuberculous peritonitis (4.2% , 1/21) or liver cirrhosis (4.7% , 1/27) ($P < 0.01$).

CONCLUSION: T lymphocyte subsets and DNA ploidy in ascitic fluid show obvious differences among patients with tuberculous peritonitis, liver cirrhosis and carcinomatous ascites. T lymphocyte subset determination and DNA ploidy analysis are thus useful for the differential diagnosis of ascites.

Key Words: T lymphocyte subsets; DNA ploidy; Ascites; Flow cytometry; Differential diagnosis

Zhang WG, Tong Q, Wang Q, Wang XH, Li SB. Value of T lymphocyte subset determination and DNA ploidy analysis for differential diagnosis of ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1972-1975

摘要

目的: 探讨T淋巴细胞亚群和DNA倍体检测在腹水鉴别诊断中的价值。

方法: 腹水患者74例, 其中结核性腹膜炎24例, 肝硬化21例, 癌性腹水29例, 流式细胞仪测定腹水T淋巴细胞亚群和DNA倍体。

结果: 腹水中T淋巴细胞($CD3^+$)、T辅助/诱导细胞亚群($CD4^+$)、T辅助细胞亚群/T抑制细胞亚群($CD4^+/CD8^+$)所占比例从大到小依次为结核性腹膜炎($CD3^+$: $86.2\% \pm 5.1\%$, $CD4^+$: $64.3\% \pm 6.4\%$, $CD4^+/CD8^+$: $3.20\% \pm 0.30\%$)、癌性腹水($65.7\% \pm 4.6\%$, $32.5\% \pm 2.2\%$, $1.04\% \pm 0.11\%$)、肝硬化腹水($15.1\% \pm 2.7\%$, $3.6\% \pm 0.5\%$, $0.36\% \pm 0.05\%$) (三组间 $P < 0.01$)。从从小到大依次为肝硬化腹水($10.1\% \pm 3.2\%$)、结核性腹膜炎($20.1\% \pm 4.3\%$)、癌性腹水($31.3\% \pm 5.2\%$) (三组间 $P < 0.01$)。腹水DNA倍体阳性率癌性腹水达89.7%(26/29), 与结核性腹膜炎4.2%(1/24)和肝硬化4.7%(1/21)具有显著性差异($P < 0.01$)。

结论: T淋巴细胞亚群和DNA倍体在结核性

腹膜炎、肝硬化及癌性腹水存在显著差异, 其检测可用于腹水的鉴别诊断.

关键词: T淋巴细胞亚群; DNA倍体; 腹水; 流式细胞; 鉴别诊断

张卫国, 童强, 王强, 王小虎, 李胜保. T淋巴细胞亚群和DNA倍体检测在腹水鉴别诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1972-1975

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1972.asp>

0 引言

腹水可由多种疾病产生, 腹水检查在其病因诊断中具有重要意义. 传统检测手段包括一般性状、生化、细胞及细菌检查, 近年肿瘤标志物、细胞因子等检测也逐渐步入临床^[1-11], 由于敏感性、特异性、操作复杂程度的原因, 目前的检测方法仍不能满足临床的需要. 本文采用流式细胞仪对几种不同病因腹水中T淋巴细胞亚群和DNA倍体进行检测, 探讨其在腹水鉴别诊断中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 74例腹水患者为我院2001-01/2006-04住院患者, 其中结核性腹膜炎24例, 男14例, 女10例, 平均年龄36岁; 肝炎后肝硬化21例, 男12例, 女9例, 平均年龄38岁; 癌性腹水29例, 男17例, 女12例, 平均年龄41岁; 癌性腹水中胃癌14例; 结肠癌10例; 卵巢癌3例; 胰腺癌2例. 流式细胞仪为Beckman coulter公司Epics XL型号. 荧光mAb CD3-FITC、CD4-FITC、CD8-PE和红细胞溶解剂(IMMUNO PREPTM A)、白细胞稳定剂(IMMUNO PREPTM B)、细胞膜固定剂(IMMUNO PREPTM C)均购自法国Immunothch公司.

1.2 方法

收集3组患者肝素抗凝的新鲜腹水100 mL, 2000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗涤, 制备成细胞悬液, 调整细胞数为 10^6 /mL. 取100 μ L细胞悬液, 加入CD3-FITC、CD4-FITC、CD8-PE, 室温避光20 min, 分别加入IMMUNO PREPTM A、IMMUNO PREPTM B、IMMUNO PREPTM C, 置入流式细胞仪检测, 并用SYSTEM II TM software处理数据, 测定腹水T淋巴细胞亚群. 另取100 μ L细胞悬液, 按试剂盒说明进行溶血、固定、PI染色, 置入流式细胞仪检测, 以腹水中二倍体DNA含量细胞为内标, 分析样品

细胞的DNA指数(DNA index, DI)、增殖指数(proliferation index, PI)和S期细胞百分比(S phase fraction, SPF). $DI = \text{肿瘤细胞G0/G1峰道数} / \text{正常二倍体细胞G0/G1期峰道数}$. $DI < 0.9$ 或 $DI > 1.1$ 可判为异倍体, 且按照国际标准DNA异倍体必须在组方图上出现两个相分离的峰.

统计学处理 数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 统计学处理采用方差分析及 q 检验.

2 讨论

2.1 不同病因腹水T淋巴细胞亚群变化 结核性腹膜炎、癌性腹水及肝硬化患者腹水 $CD3^+$ (T淋巴细胞)、 $CD4^+$ (T辅助/诱导细胞亚群)、 $CD8^+$ (T抑制/毒性细胞亚群)、 $CD4^+/CD8^+$ 均存在显著差异($P < 0.01$), $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 由高到低依次为结核性腹膜炎>癌性腹水>肝硬化腹水($P < 0.01$), $CD8^+$ 由高到低依次为癌性腹水>结核性腹膜炎>肝硬化腹水($P < 0.01$), 肝硬化腹水 $CD4^+/CD8^+$ 明显倒置(表1).

2.2 不同病因腹水DNA倍体结果 24例结核性腹膜炎和21例肝硬化患者中各有1例腹水DNA倍体为阳性, 阳性率分别为4.2%和4.7%, 而29例癌性腹水26例呈阳性, 阳性率达89.7%, 与前二组比较具有显著性差异($P < 0.01$).

3 讨论

腹水的病因在临床上以肝硬化、结核性腹膜炎和癌性腹水最为常见^[12-22], 常需联合多种检测手段方能确诊, 甚至试验性治疗来进行鉴别诊断, 而腹水的直接检测对病因的诊断至关重要. 我们采用流式细胞仪对腹水的T淋巴细胞亚群和DNA倍体进行检测, 发现肝硬化腹水 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 较结核性腹膜炎和癌性腹水显著低下, 且 $CD4^+/CD8^+$ 明显倒置, 3种腹水中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 以结核性腹膜炎最高, 癌性腹水居中, 而 $CD8^+$ 则以癌性腹水最高, 结核性腹膜炎次之. 腹水T淋巴细胞亚群反应了腹腔局部的免疫功能, T淋巴细胞由 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 两大亚群组成^[23], $CD4^+$ 主要介导细胞和体液免疫, $CD8^+$ 则参与抗病毒、移植排斥反应及对非己抗原诱发的免疫应答的抑制^[24-28], 免疫功能的改变往往敏感地表现在 $CD4^+/CD8^+$ 比值改变上, $CD4^+/CD8^+$ 比值的下降被认为是疾病严重和预后不良的重要指标之一. 我们的研究提示, (1)肝硬化患者腹腔局部的免疫功能明显低下, 这可能是患者易并发自发性腹膜炎的一个原

■同行评价

本文采用流式细胞仪对几种不同病因腹水中T淋巴细胞亚群和DNA倍体进行检测, 探讨其在腹水鉴别诊断中的价值. 具有一定的临床意义. 具有一定的创新性.

表 1 不同病因腹水T淋巴细胞亚群变化(mean ± SD)

分组	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
结核性腹膜炎	86.2 ± 5.1	64.3 ± 6.4	20.1 ± 4.3	3.20 ± 0.30
癌性腹水	65.7 ± 4.6	32.5 ± 2.2	31.3 ± 5.2	1.04 ± 0.11
肝硬化	15.1 ± 2.7	3.6 ± 0.5	10.1 ± 3.2	0.36 ± 0.05

三组之间比较 $P < 0.01$.

因; (2)结核性腹膜炎患者腹膜腔局部免疫力增强. 当结核杆菌感染时, 首先致敏T细胞, 当机体再次受到结核杆菌或抗原物质入侵时与致敏的T细胞互相作用, 释放出一系列细胞因子(IL-1、TNF等)及黏附分子(P-选择素等), 使得淋巴细胞、单核细胞定向腹膜腔内募集, 聚集于结核杆菌或抗原所在部位周围; (3)癌性腹水中的CD8⁺增高. 机体对肿瘤细胞的免疫监控过程中, 抗原提呈细胞将肿瘤抗原有效地提呈给T淋巴细胞, 激活肿瘤抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)是抗肿瘤免疫的关键环节^[29-30], CD8⁺增高致CD4⁺/CD8⁺降低, 降低了患者局部对肿瘤的免疫力, 可导致肿瘤细胞不断增殖与扩散.

正常细胞DNA倍体为二倍体, 具有较恒定的DNA含量, 而细胞癌变过程中DNA含量和(或)染色体结构异常是较普遍的, 尤其是分化程度很低的恶性肿瘤更为常见, 并以DNA指数的形式表现出来, 出现非整倍体细胞峰. 联合DNA倍体检测更有助于将癌性腹水鉴别开来, 本研究中癌性腹水DNA倍体阳性率达89.7%, 结核性腹膜炎、肝硬化患者腹水阳性率不足5%. 同时研究发现, 有些恶性腹水DNA倍体出现假阴性结果, 可能是: (1)原发肿瘤为二倍体肿瘤, 且转移灶与原发灶有同源性; (2)少量恶性细胞的异倍体峰被大量组织细胞所形成的二倍体细胞峰掩盖; (3)少量的染色体变异不能被流式细胞仪所识别; (4)大量间皮细胞稀释恶性细胞, 导致异倍体峰缺如; (5)染色体的机械缺失和复制中的错误相平衡, 而表现为二倍体. 另外良性腹水DNA倍体出现假阴性结果可能是因为细胞破坏、叠连而不能被流式细胞仪所识别, 反应性间皮细胞增生、染色体一过性畸变和数据分析也可造成假阳性结果.

我们的研究表明, T淋巴细胞亚群和DNA倍体在结核性腹膜炎、肝硬化及癌性腹水存在显著差异, 其检测可用于腹水的鉴别诊断, 而流式细胞仪检测又相当准确、快捷, 值得推广.

参考文献

- Sharma SK, Tahir M, Mohan A, Smith-Rohrberg D, Mishra HK, Pandey RM. Diagnostic accuracy of ascitic fluid IFN-gamma and adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculous ascites. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26: 484-488
- Appalaneni V, Yellinedi S, Baumann MA. Diagnosis of malignant ascites in prostate cancer by measurement of prostate specific antigen. *Am J Med Sci* 2004; 327: 262-263
- Arroyo V. Pathophysiology, diagnosis and treatment of ascites in cirrhosis. *Ann Hepatol* 2002; 1: 72-79
- Tuncer K, Akarca US, Aktas EO, Ilter T, Musoglu A. Detection of a foreign body during laparoscopy for differential diagnosis in a patient with ascites. *Endoscopy* 2004; 36: 92
- Liatsos C, Hadjileontiadis LJ, Mavrogiannis C, Patch D, Panas SM, Burroughs AK. Bowel sounds analysis: a novel noninvasive method for diagnosis of small-volume ascites. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1630-1636
- Sari R, Yildirim B, Sevinc A, Bahceci F, Hilmioglu F. The importance of serum and ascites fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA 19-9, and CA 15-3 levels in differential diagnosis of ascites etiology. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1616-1621
- Dittrich S, Yordi LM, de Mattos AA. The value of serum-ascites albumin gradient for the determination of portal hypertension in the diagnosis of ascites. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 166-168
- Buyukberber M, Koruk M, Savas MC, Gulsen MT, Pehlivan Y, Devenci R, Sevinc A, Gergerlioglu S. Leptin levels in the differential diagnosis between benign and malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 398-402
- Li CP, Huang TS, Chao Y, Chang FY, Whang-Peng J, Lee SD. Advantages of assaying telomerase activity in ascites for diagnosis of digestive tract malignancies. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2468-2471
- Campisi C, Bellini C, Eretta C, Zilli A, da Rin E, Davini D, Bonioli E, Boccardo F. Diagnosis and management of primary chylous ascites. *J Vasc Surg* 2006; 43: 1244-1248
- Riquelme A, Calvo M, Salech F, Valderrama S, Pattillo A, Arellano M, Arrese M, Soza A, Viviani P, Letelier LM. Value of adenosine deaminase (ADA) in ascitic fluid for the diagnosis of tuberculous peritonitis: a meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 705-710
- Charalabopoulos K, Peschos D, Zogas L, Bablekos G, Golias C, Charalabopoulos A, Stagikas

- D, Karakosta A, Papathanasopoulos A, Karachalios G, Batistatou A. Alterations in arterial blood parameters in patients with liver cirrhosis and ascites. *Int J Med Sci* 2007; 4: 94-97
- 13 Tanrikulu AC, Aldemir M, Gurkan F, Suner A, Dagli CE, Ece A. Clinical review of tuberculous peritonitis in 39 patients in Diyarbakir, Turkey. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 906-909
- 14 Lopez Rodriguez R, Campos Franco J, Lado Lado FL, Alende Sixto MR, Gonzalez Quintela A. Tuberculous peritonitis: a Third World's disease?. *An Med Interna* 2004; 21: 331-333
- 15 Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. *Am J Surg* 2003; 185: 567-573
- 16 Sotoudehmanesh R, Shirazian N, Asgari AA, Malekzadeh R. Tuberculous peritonitis in an endemic area. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 37-40
- 17 Ahmed N, Riley C, Oliva K, Rice G, Quinn M. Ascites induces modulation of alpha6beta1 integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 1475-1485
- 18 Kobayashi M, Sakamoto J, Namikawa T, Okamoto K, Okabayashi T, Ichikawa K, Araki K. Pharmacokinetic study of paclitaxel in malignant ascites from advanced gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1412-1415
- 19 Lee YT, Ng EK, Hung LC, Chung SC, Ching JY, Chan WY, Chu WC, Sung JJ. Accuracy of endoscopic ultrasonography in diagnosing ascites and predicting peritoneal metastases in gastric cancer patients. *Gut* 2005; 54: 1541-1545
- 20 Yajima K, Kanda T, Ohashi M, Wakai T, Nakagawa S, Sasamoto R, Hatakeyama K. Clinical and diagnostic significance of preoperative computed tomography findings of ascites in patients with advanced gastric cancer. *Am J Surg* 2006; 192: 185-190
- 21 Ozenci V, Miller AM, Palmborg A, Egevad L, Jaremko GA, Kalkner KM, Pisa P. Presence and specificity of tumor associated lymphocytes from ascites fluid in prostate cancer. *Prostate* 2005; 65: 20-26
- 22 Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, Hihara J, Miyahara E, Noma K, Toge T. Locoregional immunotherapy of malignant ascites from gastric cancer using DTH-oriented doses of the streptococcal preparation OK-432: Treatment of Th1 dysfunction in the ascites microenvironment. *Int J Oncol* 2004; 24: 959-966
- 23 Chi TH, Wan M, Zhao K, Taniuchi I, Chen L, Littman DR, Crabtree GR. Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature* 2002; 418: 195-199
- 24 Jing L, Chong TM, Byrd B, McClurkan CL, Huang J, Story BT, Dunkley KM, Aldaz-Carroll L, Eisenberg RJ, Cohen GH, Kwok WW, Sette A, Koelle DM. Dominance and diversity in the primary human CD4 T cell response to replication-competent vaccinia virus. *J Immunol* 2007; 178: 6374-6386
- 25 Wang Z, Davies JD. CD8 blockade promotes antigen responsiveness to nontolerizing antigen in tolerant mice by inhibiting apoptosis of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2007; 178: 6148-6157
- 26 Della Bella S, Crosignani A, Riva A, Presicce P, Benetti A, Longhi R, Podda M, Villa ML. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* 2007; 121: 283-292
- 27 Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 2007; 316: 612-616
- 28 Dace DS, Chen PW, Niederkorn JY. CD8⁺ T cells circumvent immune privilege in the eye and mediate intraocular tumor rejection by a TNF-alpha-dependent mechanism. *J Immunol* 2007; 178: 6115-6122
- 29 Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4⁺ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2101-2111
- 30 Santori FR, Arsov I, Vukmanovic S. Modulation of CD8⁺ T cell response to antigen by the levels of self MHC class I. *J Immunol* 2001; 166: 5416-5421

电编 何基才 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

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

异丙酚静脉麻醉胃镜检查并发皮下坏死1例

雷巧玲, 孙盈盈

■背景资料

异丙酚是新型快速短效的静脉麻醉药物, 具有良好的镇静催眠作用, 已越来越多的应用于无痛苦胃镜检查。自临床应用以来, 人们便发现它能引起注射部位的疼痛。有研究表明, 异丙酚产生注射痛的机制可能与注射时引起的扩血管-缓激肽系统激活有关, 但具体机制尚不十分明确。

雷巧玲, 孙盈盈, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科 陕西省西安市 710038

通讯作者: 雷巧玲, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科. gastdy9@fmmu.edu.cn
电话: 029-84777721

收稿日期: 2007-01-06 接受日期: 2007-01-28

摘要

本文报告了1例异丙酚静脉麻醉胃镜检查致皮下坏死的少见病例, 分析了可能的发生原因, 并对预防和处置提出对策。

关键词: 异丙酚; 胃镜检查; 并发症

雷巧玲, 孙盈盈. 异丙酚静脉麻醉胃镜检查并发皮下坏死1例. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1976-1977

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1976.asp>

0 引言

异丙酚是新型快速短效的静脉麻醉药物。因其具有良好的镇静催眠作用, 能消除患者的焦虑和恐惧, 已越来越多的应用于无痛苦胃镜检查。异丙酚自临床应用以来, 人们便发现它能引起注射部位的疼痛, 特别是在较浅表的小静脉血管注射时, 发生率较高, 但不慎渗漏于血管外致局部组织坏死尚未见报道。

1 病例报告

患者, 女, 70岁, 因间断上腹胀4 mo, 加重伴恶心, 呕吐10 d, 于当地医院行异丙酚静脉麻醉胃镜检查。左手背建立静脉通路, 推注异丙酚的过程中发现局部肿胀, 随更换右手背静脉穿刺继续推注药物完成检查。因当天检查后患者全身情况无异常变化, 仅左手注射部位有肿胀, 右手拔针后出现瘀斑, 疼痛均不明显未予重视, 次日患者双手背红肿瘀斑范围逐渐扩大, 肿胀明显且呈暗紫色, 于术后10 d入院时, 双手背皮损面积分别为左手整个背即腕关节至掌指关节全部累及约10 cm×11 cm, 右手以拇指侧为重, 面积约6 cm×8 cm, 表皮坏死, 呈暗紫色, 局部结有厚硬痂壳, 表面温度高, 无渗出, 无压痛。立

即给予氧化锌油与黄连素粉混合外敷治疗, 红肿逐渐消失, 痂皮逐渐脱落, 1 wk后痊愈。

2 讨论

有研究表明, 异丙酚产生注射痛的机制可能与注射时引起的扩血管-缓激肽系统激活有关, 但具体机制尚不十分明确, 其疼痛的严重程度与其发生率和注射点有密切关系, 手背静脉注射痛的发生率为39%-87%, 而前臂或肘窝静脉的发生率为3%, 此药误入血管外不会造成组织损伤或坏死^[1-2]。而本例静注异丙酚渗漏于手背皮下造成组织损伤甚至坏死的原因尚不清楚, 也未见相关报道, 结合临床可能与下列因素有关: (1)异丙酚为一种脂肪乳化剂, 渗透压较高, 外渗后致局部组织肿胀, 炎性渗出; (2)手背部皮下组织薄, 血液循环不丰富, 且该患者已恶心呕吐10 d, 有脱水和外周组织循环不良的基础, 致吸收困难; (3)本例为老年人, 药液外渗后, 疼痛感觉不敏感, 未引起医护人员的重视, 早期未予及时处理, 导致对局部组织损害的进一步扩大。

氧化锌油与黄连素粉混合涂敷是基于氧化锌油对皮肤有抗菌、收敛、滋润和保护作用, 又有吸着和干燥的性能, 主要通过毛囊吸收到细胞核内, 被细胞所摄取的锌能促进核酸和核蛋白的形成, 参与细胞的能量代谢, 促进人体组织的修复, 还能改善皮肤色素沉着, 而黄连素为广谱抗生素, 主要成份为小檗碱, 还有黄连碱及棕榈碱等, 对局部组织有活血化淤、消炎止痛的作用。二者合用对皮肤无刺激性, 又有收敛、保护、消炎, 促进组织再生和修复的作用。

值得提示的是, 为防止异丙酚静脉注射发生渗漏, 静注时, 应尽可能选择前臂大静脉和肘窝部静脉给药, 选择血管不能离关节太近, 否则易在活动时发生渗漏, 躁动患者要绝对禁止近关节处穿刺, 注射时针头固定要牢固, 若不慎脱出或穿透血管壁, 拔针后按压部位面积

要大, 不仅按压皮肤针眼处, 更要按压其上方血管壁针眼处, 且按压时间要延长至5 min, 一旦发现局部有药液外渗, 尽快应用硫酸镁进行湿热敷, 改善局部循环, 促进吸收, 以防局部组织坏死.

3 参考文献

- 1 崔剑, 温荟琳, 陶国才, 曹剑, 毕敏. 利多卡因、芬太尼和曲马多在预防异丙酚静脉注射痛中的效果研究. 实用医学杂志 2003; 19: 978-979
- 2 陈伯奎. 临床麻醉药理学. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 300

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

本文所述的注射部位皮肤坏死尚未见相关的中文文献报道, 且作者提出了有效的处理方法, 故对提高临床对此类并发症的认识和处理有一定的借鉴意义.

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

• 消息 •

第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届 消化介入新技术研讨会会议及征文通知

本刊讯 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会是卫生部“十年百项”适宜技术推广、上海市重大医学成果转化及国家级继续医学教育项目, 为进一步提升国内消化系统疾病尤其是消化道恶性病变介入诊治的技术水平, 我们联合上海同仁医院、山东省立医院和山东省医学影像研究所, 定于2007-09-21/25在山东省济南市举办第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会, 参会者可获得国家级一类继续医学教育学分12分. 会议将以专题讲座、论文交流、操作演示及研讨沙龙多种形式相结合, 安排相关学科的著名专家着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗的新理论、新技术和新方法.

1 征文内容

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

2 征文要求

专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文, 优秀论文将安排在国家级杂志上发表. 所有稿件一律要求电脑打印(WORD格式), 邮寄者需附软盘; 特别鼓励用E-mail投稿(用附件WORD格式). 截稿日期: 2007-07-31. 征集疑难病例: 会议将安排专门时间研讨疑难病例, 欢迎与会代表将临床中遇到的疑难病例带到会上讨论. 通信地址: 250021, 济南市经五路纬七路324号, 山东省立医院消化科张春清收. 联系电话: 0531-85186350, 86701337; 传真: 0531-87902348; E-mail: zhchqing@medmail.com.cn.

致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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈凜 教授

中国人民解放军总医院普通外科

程英升 副教授

上海交通大学附属第六人民医院放射科

崔云甫 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆外科

邓长生 教授

武汉大学中南医院消化内科

董明 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

关晓辉 主任医师

吉林北华大学附属医院消化内科

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

何裕隆 教授

中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李君祥 教授

北京中医药大学附属东方医院消化内科

刘宝瑞 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘彬彬 副研究员

复旦大学附属中山医院肝癌研究所

刘占举 教授

郑州大学第二附属医院消化内科

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

宋振顺 教授

第四军医大学西京医院肝胆外科

王春友 教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

王健生 副教授

西安交通大学医院第一附属医院肿瘤外科

吴君 主任医师

贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

吴硕东 教授

中国医科大学附属盛京医院第一微创胆道外科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

徐智 教授

北京大学第三医院普通外科

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

赵增仁 副主任医师

河北医科大学第一医院普外科

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化内科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科

朱春兰 主任医师

黑龙江省医院附属消化病医院消化二科