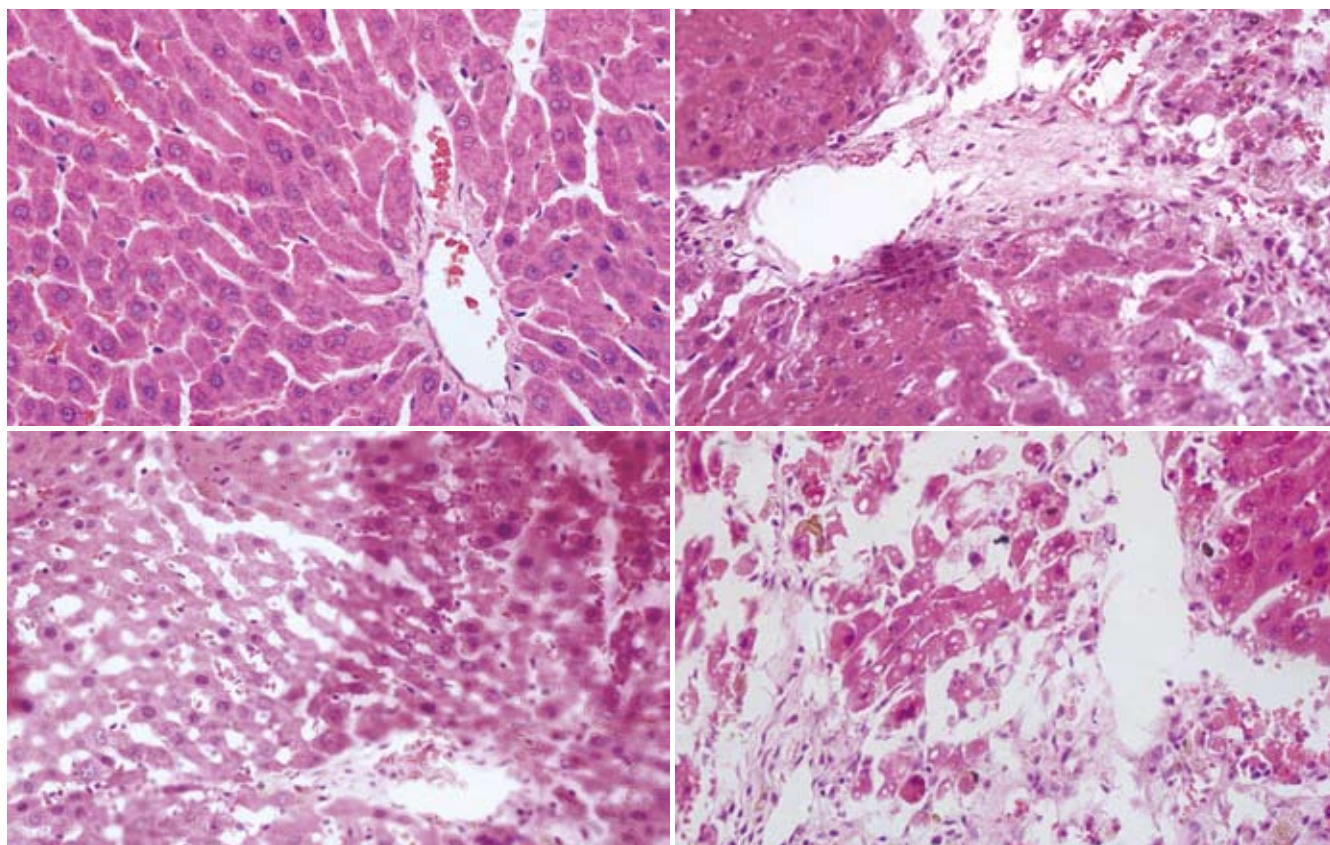


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年5月8日 第17卷 第13期 (Volume 17 Number 13)



13 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
聂新明教授  
陈洪副教授

陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌副教授  
迟宝荣教授  
崔立红副教授  
邓长生教授  
丁士刚主任医师  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
郭晓钟教授  
何松教授  
洪天配教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄晓东副主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
李祖国副教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海林主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
马欣主任医师

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

#### 消化外科学

别平教授  
蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师

陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波副教授  
陈凜教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
仇毓东副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
单云峰副主任医师  
丁义涛教授  
董明教授  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
葛海燕教授  
龚建平教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
何超教授  
何裕隆教授  
黄志勇副教授  
季加孚教授  
英卫东副主任医师  
蒋龙元副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李靖副教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师

李文岗副教授  
李旭副教授  
梁力建教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘作金副教授  
卢实春教授  
陆才德教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
裘正军教授  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施诚仁教授  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
汤恢焕教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师  
汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王要军教授  
王悦华副主任医师



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪副主任医师  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨家和主任医师  
杨秋蒙副主任医师  
杨维良教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈耀凯副教授  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师

高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
林菊生教授  
刘杞教授  
刘正稳教授  
貌盼勇研究员  
宁琴教授  
钱林学主任医师  
秦波教授  
石统东副教授  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副主任医师  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张绪清副教授  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
周霞秋教授  
朱传武副主任医师  
庄林主任医师

### 消化中医药学

蔡淦教授  
陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员

刘孟安教授  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
沈洪教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
谢鸣教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰主任医师  
曹志成院士  
陈公琰主任医师  
李璠教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
沈克平主任医师  
肖文华主任医师  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐克教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授

吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
樊红副教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
胡旭初副教授  
黄文林教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
梅林教授  
彭曦副研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赓宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授

周晓东研究员  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
李淳副教授  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
马大烈教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
魏蕾教授  
阎晓初副教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009年5月8日 第17卷 第13期 (总第273期)

## 述 评

1273 survivin在肝癌发病中的作用及其临床应用

沈雁, 吕宾, 丁莺

## 基础 研究

1279 清肝活血方对酒精性肝损伤大鼠内质网应激反应性凋亡基因表达的影响

韩向晖, 陈珺明, 张莉, 王森, 王磊, 郑培永, 季光

1286 沉默肝癌衍生生长因子对大肠癌细胞增殖的抑制

廖斐, 董卫国, 罗和生, 刘蒙

1292 5-脂氧合酶在大鼠急性坏死性胰腺炎组织中的表达

徐敏, 陈敬涵, 吴恺

1297 5-ASA对TNBS结肠炎大鼠血中性粒细胞凋亡及血清IL-8水平的影响

贺文成, 李瑾, 周瑞, 唐平飞

## 临 床 研 究

1303 Livin、Smac/DIABLO和PTEN在胃癌组织中的表达及其与胃癌的相关性

赵毅, 邓鑫, 王强

1312 腹腔镜胆囊切除意外胆囊癌的处理

徐协群, 刘卫, 李秉璐, 洪涛, 郑朝纪, 何小东, 廖泉, 赵玉沛

1318 CTHRC1和VEGF-C在直肠癌组织中的表达及相关性

李靖涛, 赵洪川, 高春, 姚力, 陈少轩, 姚树坤

## 文 献 综 述

1324 RNA干扰技术在抗乙型肝炎病毒感染应用中的研究进展

孔令波, 佟立新, 王锡育

1329 非酒精性脂肪性肝炎发病机制-病理生理学和分子生物学

胡迎宾

1335 Smad4在消化系肿瘤发生中的作用

张朋彬, 李宜辉

## 研 究 快 报

1339 毫针不同刺激强度对胃扩张疼痛大鼠脊髓背角NMDA受体和P物质的影响

彭艳, 易受乡, 李振海, 林亚平, 唐森

1346 siRNA沉默Livin基因对胃癌细胞生长、凋亡的影响

陈鹏, 孔令斌, 王春松, 杨景玉

1350 抗体可以作为半抗原二硝基氟苯免疫靶向治疗的载体

何晓俊, 储艳秋, 蒋公羽, 戴兆云

1355 阿司匹林对肠上皮细胞的损伤作用及机制

安敏, 张振玉

## 临 床 经 验

1359 埃索美拉唑联合莫沙比利治疗老年低压型LES食管运动功能障碍29例

虞阳, 姚健凤, 夏俊, 赵尚敏, 于晓峰

1363 改良三腔管导丝插入牵引急诊硬化治疗食管静脉曲张大出血89例

陈炳芳, 沈云志, 汪良芝, 王扬, 孙克文, 周燕春, 秦怡

1366 INNO-LiPA HBV DR v2检测乙型肝炎病毒耐药变异的评价

田敬华, 赵辉, 丛旭, 闫杰, 杜绍财, 魏来

	<p>1370 体外高频热疗机联合肝动脉化疗栓塞术治疗肝癌30例 陈京龙, 李文东, 毛羽, 王威, 冯亮, 谢尧</p> <p>1374 清胰片在SAP恢复期中的治疗价值 苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 马涛, 赵光, 王心</p>
致 谢	1378 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1285 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>1291 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>1302 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>1311 第九次全国消化系疾病学术会议征文通知</p> <p>1317 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>1323 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>1328 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568</p> <p>1334 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>1338 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>1345 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>1349 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>1354 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>1358 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知</p> <p>1362 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>1373 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>1377 世界华人消化杂志英文摘要要求</p>
封面故事	<p>韩向晖, 陈珺明, 张莉, 王磊, 郑培永, 季光. 清肝活血方对酒精性肝损伤大鼠内质网应激反应性凋亡基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1279-1285</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1279.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1279.asp</a></p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚;</p> <p>审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-05-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>		<p><b>编辑</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://wcjd.wjgnet.com">http://wcjd.wjgnet.com</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2009年版版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 <b>ISSN 1009-3079</b> <b>CN 14-1260/R</b></p>		<p>邮发代号 82-262</p> <p>国外代号 <b>M 4481</b></p>	<p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p> <p>广告经营许可证 1401004000050</p>

# World Chinese Journal of Digestology

## May 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 13

<b>EDITORIAL</b>	1273 Role of survivin in hepatocellular carcinoma and its clinical applications <i>Shen Y, Lv B, Ding Y</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1279 Effects of Qinggan Huoxue formula on gene expression during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rats with ethanol-induced liver injury <i>Han XH, Chen JM, Zhang L, Wang M, Wang L, Zheng PY, Ji G</i></p> <p>1286 Effects of specific HDGF siRNA on proliferation of human colon carcinoma cells <i>Liao F, Dong WG, Luo HS, Liu M</i></p> <p>1292 Expression of 5-lipoxygenase in rat pancreatic tissue during acute necrotizing pancreatitis <i>Xu M, Chen JH, Wu K</i></p> <p>1297 Effect of 5-ASA on serum level of IL-8 and PMN apoptosis in TNBS-induced rat colitis <i>He WC, Li J, Zhou R, Tang PF</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>1303 Expression of Livin, Smac/DIABLO and PTEN and their relationships with human gastric adenocarcinoma <i>Zhao Y, Deng X, Wang Q</i></p> <p>1312 Unsuspected gallbladder cancer management during or after laparoscopic cholecystectomy <i>Xu XQ, Liu W, Li BL, Hong T, Zheng CJ, He XD, Liao Q, Zhao YP</i></p> <p>1318 Expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma <i>Li JT, Zhao HC, Gao C, Yao L, Chen SX, Yao SK</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>1324 Research progress of RNA interference in anti-infection of hepatitis B virus <i>Kong LB, Tong LX, Wang XY</i></p> <p>1329 Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis: pathophysiology and molecular biology <i>Hu YB</i></p> <p>1335 Role of Smad4 gene in the development of gastrointestinal cancer <i>Zhang PB, Li YH</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1339 Effect of acupuncture with varied intensity on NMDA and SP expression in spinal dorsal horn in rats with gastric distension-induced pain <i>Peng Y, Yi SX, Li ZH, Lin YP, Tang S</i></p> <p>1346 Effects of Livin gene silencing by siRNA on apoptosis and proliferation of gastric cancer cells <i>Chen P, Kong LB, Wang CS, Yang JY</i></p> <p>1350 A potential carrier for targeted therapy of DNFB hapten-induced immune <i>He XJ, Chu YQ, Jiang GY, Dai ZY</i></p> <p>1355 Effects and mechanism of aspirin on enterocyte injury <i>An M, Zhang ZY</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	1359 Effect of esomeprazole and mosapride on the esophageal motility dysfunction in elderly patients with hypotensive LES: an analysis of 29 cases

	<p><i>Yu Y, Yao JF, Xia J, Zhao SM, Yu XF</i></p> <p>1363 Combined treatment of modified Sengstaken-Blakemore tube inserted by guide wire and EIS for 89 patients with severe esophagogastric variceal bleeding</p> <p><i>Chen BF, Shen YZ, Wang LZ, Wang Y, Sun KW, Zhou YC, Qin Y</i></p> <p>1366 Evaluation of INNO-LiPA in detection of HBV drug resistance mutation</p> <p><i>Tian JH, Zhao H, Cong X, Yan J, Du SC, Wei L</i></p> <p>1370 Efficacy of HG-2000 regional high-frequency hyperthermia combined with TACE in treatment of patients with hepatocellular carcinoma: an analysis of 30 cases</p> <p><i>Chen JL, Li WD, Mao Y, Wang W, Feng L, Xie Y</i></p> <p>1374 Therapeutic effect of pancreas clearing tablets (Qingyi pian) on severe acute pancreatitis</p> <p><i>Miao B, Cui NQ, Li ZL, Ma T, Zhao G, Wang X</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	1378 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<p><i>Han XH, Chen JM, Zhang L, Wang M, Wang L, Zheng PY, Ji G.</i> Effects of Qinggan Huoxue formula on gene expression during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rats with ethanol-induced liver injury. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2009; 17(13): 1279-1285</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1279.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1279.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang</i></p> <p>Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** May 8, 2009

### 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@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

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

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: 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

© 2009 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](http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp). If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

# survivin在肝癌发病中的作用及其临床应用

沈雁, 吕宾, 丁莺

沈雁, 吕宾, 丁莺, 浙江中医药大学附属第一医院消化科 浙江省杭州市 310006

吕宾, 教授、主任医师、博士生导师, 长期从事消化系统肿瘤、功能性胃肠病及消化内镜的诊疗工作。

作者贡献分布: 本文综述由沈雁和丁莺完成, 吕宾审校。

通讯作者: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。lvbin@medmail.com.cn

电话: 0571-87068001

收稿日期: 2009-03-23 修回日期: 2009-04-25

接受日期: 2009-04-27 在线出版日期: 2009-05-08

## Role of survivin in hepatocellular carcinoma and its clinical applications

Yan Shen, Bin Lv, Ying Ding

Yan Shen, Bin Lv, Ying Ding, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China  
Correspondence to: Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2009-03-23 Revised: 2009-04-25

Accepted: 2009-04-27 Published online: 2009-05-08

### Abstract

Survivin is a new family member of inhibitor of apoptosis proteins, which has the function of inhibiting apoptosis, inducing proliferation, and regulating cytokinesis and angiogenesis. It expresses highly and specifically in malignant tumors, and closely relates to development, metastasis, prognosis and recurrence of tumors. The gene therapy targeting survivin has been showing its clinical potential increasingly. This review summarizes the role of survivin in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma as well as its clinical applications.

Key Words: Survivin; Hepatocellular carcinoma; Gene therapy

Shen Y, Lv B, Ding Y. Role of survivin in hepatocellular carcinoma and its clinical applications. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1273-1278

### 摘要

survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 具有

抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、参与调节细胞有丝分裂及血管生成的多重功能。他在恶性肿瘤组织中高特异性表达, 与肿瘤的发生、转移、预后、复发等密切相关。靶向survivin的基因治疗日益显示出临床潜力。本文就survivin在肝癌发生发展中的作用及其临床应用作一综述。

关键词: survivin; 肝癌; 基因治疗

沈雁, 吕宾, 丁莺. Survivin在肝癌发病中的作用及其临床应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1273-1278

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1273.asp>

### 0 引言

自从1997年美国耶鲁大学Altieri *et al*<sup>[1]</sup>用效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1)cDNA从人类基因组文库中将survivin筛选克隆出来后, 各国学者围绕其分子结构及生物学功能展开了大量基础和临床研究。作为凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族的新成员, survivin有其独特的分子生物学特点, 并在细胞增殖凋亡的平衡中起到重要的调控作用。原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 占全世界恶性肿瘤的5%<sup>[2]</sup>; 在我国, 每年约有11万人因该病死亡, 占全世界肝癌死亡人数的45%<sup>[3]</sup>。由于肿瘤细胞可借助survivin逃避凋亡监视而达到无限增殖, 因此, 人们对survivin的关注日益集中在其与肿瘤发病的关系上。本文将就survivin在肝癌发生发展中的作用及其临床应用作一综述。

### 1 survivin的基础研究

1.1 survivin的分子生物学特点 survivin基因定位于染色体17q25, 全长14.7 kb, 由3个内含子和4个外显子组成。其mRNA长约1.9 kb, 所编码的蛋白包括了142个氨基酸, 在哺乳动物IAP家族中相对分子质量最小, 仅16.5 kDa。

与家族中的其他成员相比, survivin在结构上具有众多不同之处: (1)其氨基末端只含有一个

### ■背景资料

survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 大量研究显示他能抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、参与调节细胞有丝分裂及血管生成等。他选择性高表达于恶性肿瘤组织, 与肿瘤的发生、发展、转移和预后等密切相关。

### ■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科



## ■研究前沿

survivin与肝癌发病间的联系是近年来国内外肿瘤研究的热点之一。他在肝癌的早期诊断、转移、治疗反应、预后等方面均有重要的临床意义。靶向survivin的各种治疗手段为肝癌的防治提供了全新的思路。

较为保守的BIR(baculovirus IAP repeat)序列,该结构直接作用于细胞凋亡的效应分子caspase,为IAP抑制细胞凋亡所必需<sup>[4-6]</sup>; (2)其羧基末端无RING锌指结构,代之以一个长度为6.5 nm、由40个氨基酸组成的 $\alpha$ 螺旋结构,该结构是survivin与纺锤体微管结合的位点,并负责细胞分裂的执行<sup>[7]</sup>; (3)BIR序列和 $\alpha$ 螺旋结构间的连接区域具有核输出信号功能,该信号的突变可引起survivin抗凋亡与有丝分裂调控作用的分离<sup>[8]</sup>; (4)人类survivin存在两种剪接变构体:一种为缺乏外显子3(survivin- $\delta$ -Ex3),保留了抗凋亡特性;另一种保留了部分内含子2作为隐蔽的外显子(survivin-2B),其抗凋亡能力显著下降<sup>[9-12]</sup>。

**1.2 survivin的分布特点** 大量研究显示, survivin在成熟的终末分化组织中表达沉默,在胸腺、胚胎、造血干细胞及分泌期子宫内膜等分裂旺盛的组织中有微弱表达,而在包括肝癌在内的绝大多数肿瘤组织及转化的肿瘤细胞系中过量表达<sup>[13-16]</sup>。survivin的这种高选择性分布特点提示其与细胞的增殖分化有关,与肿瘤的发生发展关系密切。

有关survivin在细胞内分布的大量研究结果显示, survivin定位可以胞核、胞质为主或两处分布差异不显<sup>[17-19]</sup>; 推测这种差异可能是由于在细胞恶性转化过程中, survivin作为一种转录因子在胞质及胞核间移位所致。但不同定位对肿瘤预后的影响存在分歧:部分学者认为核表达者预后较好<sup>[20-21]</sup>,但也有文献报道survivin胞质染色阳性者有更高的生存率<sup>[22-23]</sup>,还有实验证实,只有当浆核均有高表达时才能作出预后不良的估计<sup>[24]</sup>。

针对survivin的细胞周期调控作用的相关研究还发现,在细胞有丝分裂的不同阶段survivin可特异性地分布于多种亚细胞元件。Jiang *et al*<sup>[25]</sup>在正常和肿瘤细胞中观察到分裂间期survivin与中心体共存于胞质,有丝分裂期移向着丝点,分裂后期分布于中间体纺锤体微管处。这种复杂的定位显示其在细胞的有丝分裂中占有重要的功能地位。

## 2 survivin在肝癌发病中的研究

**2.1 抑制肝癌细胞凋亡** 凋亡是一种生理性的程序化死亡过程,对多细胞生物的发育、细胞内环境稳定及免疫防御至关重要。病理情况下,转化的恶性细胞可通过各种机制逃避这种由基因控制的自主性死亡过程, survivin对细胞凋亡

的抑制便是重要的机制之一<sup>[26]</sup>。survivin的过度表达可使肝癌细胞获得对内外源性凋亡刺激因子的抵抗而达到无限增生。survivin主要通过以下几条途径阻断肝癌细胞的凋亡: (1)死亡受体途径:直接抑制凋亡终末效应器caspase-3、caspase-7的活性,使其不能有效地水解微管结构蛋白,维持了纺锤体的完整性,从而阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程; (2)线粒体/细胞色素C途径:阻断细胞色素C的释放,干扰上游caspase-9的活化过程,间接抑制其对下游效应分子caspase-3的活化; (3)p21途径: survivin与细胞周期蛋白依赖性激酶CDK4形成复合体后,释放出复合体中的p21,后者进一步与caspase-3结合而抑制其活性<sup>[27-29]</sup>; (4)次级线粒体衍生caspase活化因子(second mitochondria derived activator of caspase, SMAC)途径: SMAC是一种重要的凋亡调节因子,他能与现已发现的所有IAP结合,使其丧失抑制caspase的作用; survivin可通过结合并灭活SMAC而达到对凋亡的负性调节。此外,已有研究发现乙型肝炎病毒的HBX蛋白可与survivin-HBXIP复合物结合,通过竞争性结合caspase-9而阻断其所驱动的线粒体/细胞色素C凋亡通路,这可能是乙型肝炎后肝癌的潜在发病机制<sup>[30]</sup>。

**2.2 促进肝癌细胞增殖** survivin在正常分化组织与在高增殖性发育组织、肿瘤组织中表达的巨大差异性,提示其与细胞的增殖、分化有关。通过研究,发现survivin在促进肝癌细胞的增殖分化中主要发挥着以下功能: (1)使肝癌细胞加速通过G<sub>1</sub>/S期检查点: survivin与CDK4结合后,竞争性地抑制CDK4/p16(INK4a)复合物的形成,进一步导致CDK2/cyclinE活化和Rb磷酸化,从而加快G<sub>1</sub>→S期的转换; (2)使肝癌细胞逃避G<sub>2</sub>/M期凋亡监视点: survivin在G<sub>2</sub>/M期特异性表达,可抵抗因DNA损伤或突变自身诱导的细胞凋亡,通过有丝分裂促进转化细胞的异常增殖<sup>[31-34]</sup>。有报道,在HCC细胞株中转染survivin后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞显著减少,而S期和G<sub>2</sub>/M期细胞则增生旺盛<sup>[19]</sup>。在Ikeguchi *et al*<sup>[35]</sup>测定的61例肝癌标本中,有19例标本测出survivin mRNA,癌旁组织无1例检出,其表达水平与高增生能力有关,与凋亡指数呈负相关。

另外,在有丝分裂早期, survivin与纺锤体的微管结合,通过促进姐妹染色单体精确分离和稳定有丝分裂晚期微管结构而维持了纺锤体的完整性,间接促进了细胞的增殖,抑制细胞的凋

亡<sup>[34,36]</sup>。这种结合具有专一性、浓度依赖性和可饱和性,并受微管动力的调节;一旦survivin与微管之间的相互作用瓦解,便会丧失抑制细胞凋亡的作用,且使caspase-3的活性增加。

**2.3 参与肝癌血管形成** 新生血管的生成是肝癌侵袭性生长和转移的形态学基础;血管形成过程的核心是血管内皮细胞的分裂增殖,取决于血管内皮细胞的生存和凋亡的平衡。有研究显示,肿瘤组织中促血管生成的关键因子-血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)刺激静息的内皮细胞,可以浓度依赖的方式显著诱导survivin表达上调<sup>[37-39]</sup>;另一方面, survivin也可能通过上调VEGF的表达而促进肝癌的门静脉浸润及远处转移<sup>[40]</sup>。Coma *et al*联合应用反义寡核苷酸技术和RNA干扰技术降低内皮细胞中survivin的表达后,发现可完全消除VEGF对肿瘤坏死因子或神经酰胺诱导的细胞凋亡的抵抗作用,引起凋亡增加和干扰血管生成,使EC的增殖下降了95%<sup>[41-42]</sup>。因此,抑制survivin的表达既能维持正常的caspase促凋亡机制,又能通过VEGF通路的阻断而间接促进肿瘤血管的凋亡性退化,抑制肿瘤生长。

**2.4 与其他肿瘤相关因子的相互作用** survivin可在生命早期的胚胎组织中表达,说明细胞的发育分化需要survivin的参与;而随着组织的进一步分化,成熟的细胞可能通过STAT3、*c-myc*和VEGF基因等上游基因使其表达沉默。在肝癌的发病过程中,由于上述基因的异常导致survivin重新获得表达,进而推动了肝癌的临床发展。也有报道*p53*基因突变与survivin的过表达有关,野生型的*p53*基因可负性调控survivin基因表达,突变后的*p53*基因丧失了对survivin基因转录的抑制作用,两者间的表达呈正反馈上调<sup>[43-44]</sup>。还有实验显示, survivin与高敏的肿瘤增殖标志物Ki67及bcl-2(B-cell leukemia/lymphoma 2, BCL)的表达均呈显著正相关,推测对肝癌的恶性生物学行为有协同作用<sup>[45]</sup>。

### 3 survivin在肝癌临床应用中的研究

#### 3.1 临床意义

**3.1.1 早期诊断:** 要成为一种有效而可信的肝癌早期诊断指标,要求其在肝癌细胞中有高特异性的表达。日本学者Ito *et al*<sup>[46]</sup>最早于2000年报道了survivin在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达情况。他们通过免疫组织化学染色和RT-PCR技术检测发现,在HepG2、Huh7、

SK-Hep1、HLE细胞株中均有survivin表达;在20例HCC石蜡组织切片中,有14例survivin蛋白表达阳性,阳性率达70%;另8例肝癌组织中有7例、6种肝癌细胞系均有survivin mRNA的表达,其对应的癌旁组织则无survivin蛋白和survivin mRNA的表达。此后,又有一系列实验证据<sup>[13,47]</sup>表明, survivin在肝癌组织和几乎所有肝癌细胞株中均有高水平的表达。survivin表达的高特异性使他具备了良好的早期诊断能力。survivin还可见于部分癌前和良性病变如结肠息肉、乳腺腺瘤等,表明survivin的表达可能继发于细胞增殖与死亡失衡的时期或是某些恶性肿瘤的早期事件。survivin阳性提示组织学上正常的组织存在癌变的可能,因而具有早期诊断价值。

**3.1.2 判断转移:** 肿瘤微血管的形成既为肿瘤细胞的增生提供了充足的营养,又为其向远处扩散打开了通道。常宏 *et al*<sup>[48]</sup>运用免疫组织化学法检测56例HCC中survivin的表达,发现门静脉有癌栓者survivin的阳性率为72.2%,无癌栓浸润者的阳性率为40.0%,差异有统计学意义;对survivin mRNA表达分别做半定量分析及RT-PCR的结果显示,其表达与HCC门静脉癌栓发生密切相关<sup>[49-50]</sup>。上述证据表明, survivin可通过抑制HCC细胞凋亡,增强肿瘤组织微血管的形成,促进肿瘤肝内播散或远处转移。survivin mRNA或蛋白的高表达可以作为判断HCC侵袭性和临床进展的一个潜在重要指标。

**3.1.3 预测放化疗敏感性:** 放化疗杀死肿瘤细胞的机制在于诱导细胞凋亡,而启动Fas/FasL系统是诱导凋亡的关键。肿瘤细胞凋亡机制的缺陷是耐药性产生的关键因素之一。对细胞凋亡机制的修复可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,克服耐药性的产生。已观察到多种化疗药物(如紫杉醇、顺铂、阿霉素、丝裂霉素、氟尿嘧啶等)均可诱导肝癌组织中survivin表达上调,以逃避药物毒性,降低化疗敏感性<sup>[51-53]</sup>;而多项体外实验表明抑制survivin的表达可恢复或增加化疗药的细胞毒性<sup>[54-55]</sup>。

关于survivin与放疗敏感性的关系, Rödel *et al*<sup>[56]</sup>认为, survivin的高表达是一个降低放疗敏感性的因素,降低他的表达可使敏感性升高1.8-2.2倍。国内相关研究发现,针对survivin的siRNA能够沉寂其基因的表达和抑制肿瘤的生长,同时可以提高肿瘤细胞的放射敏感性,改善治疗效果<sup>[57]</sup>。

#### ■ 相关报道

王颖 *et al*设计合成了survivin反义寡核苷酸并转染hepG2细胞,运用流式细胞技术和MTT法分别检测细胞凋亡指数和生长抑制率,证实了下调survivin的表达能诱导细胞凋亡,对肝癌有一定的治疗作用。

## ■创新盘点

本文总结了近年来survivin在肝癌研究中的相关成果,就其在肝癌发生机制中的作用作了较为系统地归纳,并在此基础上进一步阐述了survivin在指导肝癌早期诊断、判断转移、预测治疗反应和预后等方面的意义以及靶向survivin的基因治疗的优势。

3.1.4 评估预后: 癌的预后差、复发率及死亡率高,究其原因,主要与其快速生长、包膜浸润、血管侵犯、肝内或远处转移、耐药性产生等恶性生物学行为有关,而survivin对上述行为有着重要的影响<sup>[58]</sup>. survivin mRNA在人肝癌细胞表达的研究显示, survivin表达阳性的肝癌患者5年无病生存率(19%)明显低于其阴性患者(39%), 另外有57%的肝癌复发患者survivin表达阳性, 而无复发患者中只有19%发现其表达<sup>[59]</sup>. 故有研究者<sup>[60]</sup>认为, 较传统的恶性肿瘤预后评估指标如肿瘤体积、分期及淋巴结转移等, survivin能够更迅速可靠地判断肝癌患者术后复发的风险, 可作为一项独立的预测指标指导治疗方案的制定与调整. 但也有部分研究结果不支持上述观点: Guo *et al*<sup>[61]</sup>在90例手术切除的肝癌组织中发现, survivin表达阳性者为51.1%, 认为其不能作为评估预后的独立因素; 而国外有学者通过研究也认为, survivin对肝癌的预后没有明显的影响<sup>[62]</sup>.

3.2 应用前景 目前, 肝癌的死亡率在我国消化系统恶性肿瘤中列第3位, 仅次于胃癌和食管癌; 在世界范围的癌症死亡中也已跃居第3位. 他临床进展快、生存期短、传统临床治疗的中远期疗效均不理想, 因而寻找新的肝癌治疗策略是全球临床及科研工作者迫切的任务. survivin在肝癌组织中高选择性表达的特点, 使得靶向survivin的基因治疗能够精确定位于癌变组织, 有效破坏癌变细胞特有的生存机制, 诱导细胞凋亡、降低肿瘤的生长潜能<sup>[63-64]</sup>, 且基于survivin的治疗毒性远低于放化疗, 同时能增加癌变细胞对放化疗的敏感性, 因此, 同survivin进行分子水平上的拮抗能够高效、特异、安全、长久地达到控制肝癌发展、促进肝癌细胞凋亡的效果. 以survivin为靶点的各种治疗技术正成为当今肝癌防治研究的热点.

3.2.1 反义技术: 反义核酸技术是根据碱基互补原理, 设计合成反义于目标DNA或mRNA的序列片段, 从而抑制目标基因表达和功能发挥的基因封闭技术. 国内多位学者设计出针对肝癌细胞株SMMC-7721、hepG2等的反义寡核苷酸并转染细胞, 均观察到细胞结构呈典型凋亡改变, 细胞内微管形态结构破坏, 细胞凋亡比率增加, 同时survivin蛋白及mRNA表达降低, 对化疗药物的敏感性增高<sup>[65-67]</sup>. 由此可见, 反义导致survivin功能的丧失, 可能在细胞周期的进程中激活了细胞周期检测点的凋亡程序, 降低了细胞凋亡的阈值; 靶向survivin的反义寡核苷酸

能够有效降低肝癌细胞内survivin的表达, 激活caspase-3, 而后者则通过对细胞内微管系统的降解破坏来诱导细胞凋亡.

3.2.2 RNA干扰技术: RNA干扰是一种在动植物体内广泛存在的序列特异性的转录后基因沉默机制, 是指将与靶基因mRNA序列同源的双链DNA(dsRNA)导入细胞, 可导致靶基因mRNA降解和基因沉默. 卢昕 *et al*<sup>[68]</sup>已成功地构建了survivin基因的RNAi的真核细胞表达载体, 观察其在人肝癌细胞系SMMC-7721对survivin基因的抑制效果, 发现其在mRNA及蛋白质水平对Survivin的抑制率分别达73%和75%; 段瑞红 *et al*<sup>[69]</sup>进一步建立了survivin基因的腺病毒siRNA载体及重组腺病毒, 转染HepG2肝癌细胞后显著抑制了survivin mRNA及蛋白的表达, 肝癌细胞凋亡率明显增加. 这些结果均为RNA干扰技术应用于肝癌的基因治疗奠定了实验基础.

## 4 结论

survivin作为一种新型的凋亡抑制蛋白, 自其发现以来的十余年间备受瞩目. 其特异性的分布、复杂的亚细胞定位、对细胞增殖凋亡的双重调控作用以及在肿瘤的发生、发展中所扮演的重要角色, 引导着人们从各个角度进行了大量研究. 可以初步肯定的是, survivin表达的差异与肝癌的诊断、治疗敏感性及预后间的确存在着某种联系, 但目前对于这种联系的认识仍处于萌芽阶段. 其上游有哪些基因、这些基因又是通过何种确切机制诱导其重新表达? 是否能获取明确的证据, 以说明survivin确实在肝癌的发生、转移、对放化疗的反应及预后复发等方面发挥高特异性标志物的功能? 其推动肝癌发生发展过程中是否还有其他因素的参与, survivin与他们的关系如何? 如何进一步提高survivin靶向治疗的效率及安全性、可行性, 从而在临床上普及使用? 尚须通过更多的研究来探讨上述问题, 进而对survivin在临床应用方面产生深远的影响.

## 5 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 2 Gish RG, Porta C, Lazar L, Ruff P, Feld R, Croitoru A, Feun L, Jeziorski K, Leighton J, Gallo J, Kennealey GT. Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol* 2007; 25:

- 3069-3075
- 3 高君, 孙文兵. 肝癌的早期诊断与鉴别诊断. *中国临床医生* 2009; 37: 5-7
  - 4 Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001; 104: 769-780
  - 5 Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001; 104: 791-800
  - 6 Nikolovska-Coleska Z, Meagher JL, Jiang S, Yang CY, Qiu S, Roller PP, Stuckey JA, Wang S. Interaction of a cyclic, bivalent smac mimetic with the x-linked inhibitor of apoptosis protein. *Biochemistry* 2008; 47: 9811-9824
  - 7 Lens SM, Rodriguez JA, Vader G, Span SW, Giaccone G, Medema RH. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1897-1909
  - 8 Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, Wheatley SP. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem* 2006; 281: 33450-33456
  - 9 Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 100: 30-36
  - 10 Takashima H, Nakajima T, Moriguchi M, Sekoguchi S, Nishikawa T, Watanabe T, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Okanou T. In vivo expression patterns of survivin and its splicing variants in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 77-84
  - 11 O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 131-152
  - 12 Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer. *Cancer Detect Prev* 2009; 32: 308-313
  - 13 Montorsi L, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, Santambrogio R, Spinelli A, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2040-2044
  - 14 Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007; 249: 49-60
  - 15 Lu B, Mu Y, Cao C, Zeng F, Schneider S, Tan J, Price J, Chen J, Freeman M, Hallahan DE. Survivin as a therapeutic target for radiation sensitization in lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 2840-2845
  - 16 Emens LA. Survivin' cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 180-183
  - 17 Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E. Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002; 75: 161-165
  - 18 Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 886-892
  - 19 Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 379-382
  - 20 Kleinberg L, Flørenes VA, Silins I, Haug K, Trope CG, Nesland JM, Davidson B. Nuclear expression of survivin is associated with improved survival in metastatic ovarian carcinoma. *Cancer* 2007; 109: 228-238
  - 21 Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 1654-1660
  - 22 Brennan DJ, Rexhepaj E, O'Brien SL, McSherry E, O'Connor DP, Fagan A, Culhane AC, Higgins DG, Jirstrom K, Millikan RC, Landberg G, Duffy MJ, Hewitt SM, Gallagher WM. Altered cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin is a prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2681-2689
  - 23 Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, Bouvier AM, Plenchette S, Faivre J, Solary E, Piard F. Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 504-510
  - 24 Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwar Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K. Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol* 2007; 82: 193-198
  - 25 Jiang X, Wilford C, Duensing S, Munger K, Jones G, Jones D. Participation of Survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells. *J Cell Biochem* 2001; 83: 342-354
  - 26 Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 2005; 92: 212-216
  - 27 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
  - 28 李凤朝, 孔庆尧, 杨雪梅. Survivin表达与胃癌细胞凋亡、增殖及肿瘤血管形成的关系. *实用癌症杂志* 2004; 19: 592-594
  - 29 Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123
  - 30 Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; 22: 2729-2740
  - 31 Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002; 87: 91-97
  - 32 Chen JG, Yang CP, Cammer M, Horwitz SB. Gene expression and mitotic exit induced by microtubule-stabilizing drugs. *Cancer Res* 2003; 63: 7891-7899
  - 33 Zangemeister-Wittke U. Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1002: 90-94
  - 34 Wolanin K, Piwocka K. [Role of survivin in mitosis] *Postepy Biochem* 2007; 53: 10-18
  - 35 Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3131-3136
  - 36 Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, Remstein ED, Bennett CF, Fielding A. Inhibition of survivin expression

## 同行评价

本文对survivin的基础知识、在肝癌发病中的作用以及对肝癌的临床意义进行了综述, 文章条理清晰、内容较为丰富, 能为读者展现survivin与肝癌关系的研究概貌, 文章有发表价值。



- suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2004; 18: 616-623
- 37 O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398
- 38 Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, Collen D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol* 2003; 163: 935-946
- 39 Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4349-4354
- 40 朱虹, 罗顺峰, 张万广, 张必翔, 陈孝平. Survivin在肝癌中的表达和意义及其与血管内皮生长因子的相关性. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 208-209
- 41 Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* 2001; 158: 1757-1765
- 42 Coma S, Noe V, Lavarino C, Adán J, Rivas M, López-Matas M, Pagan R, Mitjans F, Vilaró S, Piulats J, Ciudad CJ. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumor angiogenesis. *Oligonucleotides* 2004; 14: 100-113
- 43 Kannangai R, Wang J, Liu QZ, Sahin F, Torbenson M. Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 35: 53-60
- 44 Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 2077-2084
- 45 苏丹, 刘宝源, 李晋云, 金克炜, 赖建华. Survivin在肝细胞肝癌中的表达以及与Ki-67和bcl-2的关系. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 636-637
- 46 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085
- 47 Cui F, Chen B, Chen JZ, Huang YX, Luo RC. [Expressions of Survivin and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and their clinical significance] *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2008; 28: 761-763
- 48 常宏, 王永康, 吴泰璜, 穆庆岭, 靖昌庆, 潘晓华. 肝细胞肝癌Survivin与血管内皮生长因子表达相关性及其临床意义. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 669-670
- 49 王颖, 王家(马龙), 吴亮. 原发性肝癌survivin基因表达及靶向survivin治疗. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1082-1088
- 50 廖维甲, 覃理灵, 梅铭惠. 凋亡抑制因子survivin在肝细胞肝癌的表达及临床意义. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 1137-1138
- 51 Chao JI, Kuo PC, Hsu TS. Down-regulation of survivin in nitric oxide-induced cell growth inhibition and apoptosis of the human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 20267-20276
- 52 王俊萍, 叶红军, 杜意平, 李伏娥. 丝裂霉素诱导肝癌细胞Survivin基因表达的研究. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 145-147
- 53 罗顺峰, 朱虹, 张万广, 张必翔, 陈孝平. 5-Fu对肝癌细胞内凋亡抑制蛋白Survivin的诱导作用. *肝胆外科杂志* 2002; 10: 227-228
- 54 Wang L, Zhang GM, Feng ZH. Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 1235-1240
- 55 Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG, Li F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *J Biol Chem* 2004; 279: 15196-15203
- 56 Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Günther K, Schick C, Sauer R, Rödel C. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol* 2002; 178: 426-435
- 57 张燕, 孙婷, 曹祥荣. Survivin基因特异性siRNA腺病毒介导的肿瘤放射增敏作用. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2007; 14: 59-63
- 58 Li F, Ling X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? *J Cell Physiol* 2006; 208: 476-486
- 59 Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11: 33-40
- 60 Romagnoli M, Séveno C, Bataille R, Barillé-Nion S. [Survivin in cancerology : molecular aspects and therapeutic applications] *Med Sci (Paris)* 2008; 24: 821-827
- 61 Guo RP, Zhong C, Shi M, Zhang CQ, Wei W, Zhang YQ, Li JQ. Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 547-555
- 62 Morinaga S, Nakamura Y, Ishiwa N, Yoshikawa T, Noguchi Y, Yamamoto Y, Rino Y, Imada T, Takanashi Y, Akaike M, Sugimasa Y, Takemiya S. Expression of survivin mRNA associates with apoptosis, proliferation and histologically aggressive features in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2004; 12: 1189-1194
- 63 Andersen MH, Svane IM, Becker JC, Straten PT. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5991-5994
- 64 Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1133-1139
- 65 陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良. 反义寡核苷酸抑制survivin基因表达及肝癌细胞生长的研究. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2004; 11: 187-190
- 66 戴德坚, 吴丹, 孟化, 陆才德. 反义survivin-脂质体复合物对肝癌细胞生长凋亡和细胞周期的影响. *中华肿瘤杂志* 2005; 27: 581-584
- 67 Pan K, Liu X, Yang C, Wang Y, Wang X. [Antisense oligonucleotide targeting survivin affects the proliferation and apoptosis of SMMC-7721 cells] *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2006; 23: 625-629
- 68 卢昕, 郑启昌, 熊俊, 张勇, 秦涛. siRNA抑制肝癌细胞株HepG2 Survivin基因表达的研究. *华中科技大学学报(医学版)* 2004; 33: 696-699
- 69 段瑞红, 闫歌, 公茂庆, 王怀位, 孙传红, 蒲丹, 唐霓, 黄爱龙. siRNA腺病毒抑制Survivin基因表达诱导肝癌细胞凋亡. *中国病原生物学杂志* 2007; 2: 321-324

# 清肝活血方对酒精性肝损伤大鼠内质网应激反应性凋亡基因表达的影响

韩向晖, 陈珺明, 张莉, 王淼, 王磊, 郑培永, 季光

韩向晖, 陈珺明, 张莉, 王磊, 郑培永, 季光, 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032  
王淼, 上海中医药大学附属龙华医院 上海市 200032  
韩向晖, 助理研究员, 主要从事肝病防治的基础研究。  
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NCET07-0563  
上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50305  
上海市教委青年基金资助项目, No. 07CZ08  
作者贡献分布: 此课题由季光、郑培永及韩向晖设计; 研究过程由韩向晖、陈珺明、张莉、王淼及王磊操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由季光提供; 数据分析由韩向晖完成; 本论文写作由韩向晖与季光完成。  
通讯作者: 季光, 教授, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学脾胃病研究所, jiliver@vip.sina.com  
电话: 021-64286261 传真: 021-64286261  
收稿日期: 2009-02-19 修回日期: 2009-04-08  
接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-05-08

## Effects of Qinggan Huoxue formula on gene expression during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rats with ethanol-induced liver injury

Xiang-Hui Han, Jun-Ming Chen, Li Zhang, Miao Wang, Lei Wang, Pei-Yong Zheng, Guang Ji

Xiang-Hui Han, Jun-Ming Chen, Li Zhang, Lei Wang, Pei-Yong Zheng, Guang Ji, Institute of Gastroenterology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Miao Wang, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200032, China

Supported by: the Supporting Project for Elitists in New Century of the Ministry of Education, No. NCET07-0563; the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305; the Youth Science Foundation of Shanghai Education Commission, No. 07CZ08

Correspondence to: Professor Guang Ji, Institute of Gastroenterology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com

Received: 2009-02-19 Revised: 2009-04-08

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To assess the role of Qinggan Huoxue (QGHX) formula and its decomposed formulas in inhibition of GRP78/Bip, GRP94 and caspase-12 activation during endoplasmic

reticulum (ER) stress-mediated apoptosis in rats with ethanol-induced liver injury.

**METHODS:** A rat model with ethanol-induced liver injury was successfully developed by gastric gavage of a mixture of ethanol and corn oil for 10 wk. Then, fifty rats were further divided into five condition- and weight-matched groups ( $n = 10$ ): control, model, QGHX, QG, and HX group. Rats in model and treatment groups were given this ethanol mixture every morning, and subsequently administrated with normal saline, QGHX [9.5 g/(kg·d)], QG [3 g/(kg·d)], or HX [6.5 g/(kg·d)] every afternoon. Rats in control group were given the same volume of normal saline. Two weeks after treatment, blood samples were immediately collected from abdominal aorta, then all rats were killed and livers were excised. Hepatocyte apoptosis was detected using DNA agarose gel and flow cytometry. The expressions of GRP78/Bip, GRP94, and caspase-12 mRNA and proteins in liver were detected using real-time PCR and Western blot, respectively.

**RESULTS:** Compared with control rats, the model rats showed higher serum levels of ALT and AST ( $138.3 \pm 43.3$  U/L *vs*  $33.9 \pm 9.8$  U/L,  $257.4 \pm 162.3$  U/L *vs*  $119.6 \pm 28.6$  U/L, both  $P < 0.01$ ), elevated percentages of early and total apoptosis (29% and 26%, both  $P < 0.01$ ), and activated expression of GRP78/Bip, GRP94, caspase-12 mRNA and protein ( $P < 0.01$ ). QGHX formula and its decomposed formulas treatment for 2 wk obviously lowered the levels of serum ALT and AST, remarkably inhibited hepatocyte apoptosis (the percentages of early and total apoptosis were reduced by 8% and 6%, respectively). Additionally, the expressions of GRP78/Bip, GRP94, caspase-12 mRNA and proteins in liver were significantly decreased in QGHX and QG group than those in model group ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). However, the expressions of these genes showed no significant difference between HX and model group.

## ■背景资料

内质网应激(ERS)介导的肝细胞凋亡是酒精性肝损伤发病机制之一, GRP78/Bip、GRP94、GRP58、CHOP等内质网分子伴侣蛋白及caspase-12、9、3等细胞凋亡特异性蛋白酶是ERS应答的相关基因, 他们的异常表达参与了肝细胞ERS凋亡的发生。前期研究工作表明, 中药复方清肝活血方能显著降低酒精性肝损伤大鼠的肝细胞凋亡指数。本文从ERS反应性凋亡通路的角度, 探讨清肝活血方及其拆方抗肝细胞凋亡的可能机制。

## ■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃病研究所药理学

## ■研究前沿

ERS反应性凋亡通路是近年来提出的一条新的凋亡信号通路,他涉及非折叠蛋白反应以及内质网内钙失衡,许多疾病的发生都与ERS引起的损伤有关,逐步揭示ERS介导细胞凋亡的发生、发展过程及药物对凋亡机制的干预,从而寻求疾病新的治疗靶点是近年的研究热点和重点。

**CONCLUSION:** It is proposed that QGHX and QG formula prevent hepatocyte apoptosis in rats with ethanol-induced liver injury by blocking an ER-mediated apoptotic pathway as well as GRP78/Bip, GRP94, caspase-12 activation.

**Key Words:** Endoplasmic reticulum stress; Ethanol-induced liver injury; Apoptosis; Qingan Huoxue recipe

Han XH, Chen JM, Zhang L, Wang M, Wang L, Zheng PY, Ji G. Effects of Qingan Huoxue formula on gene expression during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rats with ethanol-induced liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1279-1285

## 摘要

**目的:** 探讨清肝活血方及拆方对酒精性肝损伤大鼠内质网应激反应性凋亡GRP78/Bip、GRP94、caspase-12基因和蛋白表达的影响。

**方法:** 建立大鼠慢性酒精性肝损伤复合模型,第11周将造模大鼠按体质量和状态均分为模型组、清肝活血方组9.5 g/(kg·d)、清肝方组3 g/(kg·d)、活血方组6.5 g/(kg·d)和空白对照组,每组10只。各组每日上午仍灌胃给予乙醇混合液,下午给予药液或生理盐水,连续给药2 wk,末次给药1 h后称质量,腹主动脉采血,处死,分离肝脏。DNA ladder法和流式细胞术对肝细胞凋亡进行定性和定量检测,RT-PCR和Western blot法检测大鼠肝组织GRP78/Bip、GRP94和caspase-12基因和蛋白表达。

**结果:** 与正常组比较,造模12 wk大鼠血清ALT和AST水平明显升高( $138.3 \pm 43.3$  U/L vs  $33.9 \pm 9.8$  U/L,  $257.4 \pm 162.3$  U/L vs  $119.6 \pm 28.6$  U/L,  $P < 0.01$ );肝细胞发生早期凋亡改变,总凋亡率和早期凋亡率分别达到29%和26%( $P < 0.01$ );肝组织GRP78/Bip、GRP94和caspase-12基因和蛋白表达明显增强( $P < 0.05$ 或0.01)。经2 wk治疗后,清肝活血方及拆方均能明显降低酒精性肝损伤大鼠血清ALT、AST水平;抑制肝细胞凋亡,总凋亡率和早期凋亡率分别降至8%和6%;清肝活血方及清肝方显著降低肝组织GRP78/Bip、GRP94和caspase-12基因和蛋白表达,与模型组比较有统计学差异( $P < 0.05$ 或0.01),而活血方组与模型组则无明显差异。

**结论:** 清肝活血方及拆方对酒精性肝损伤大鼠肝细胞凋亡均表现出较强的抑制作用,其机制可能与下调内质网应激反应性凋亡相关基因caspase-12、GRP78/Bip和GRP94表达有关。

**关键词:** 内质网应激;酒精性肝损伤;凋亡;清肝活血方

韩向晖, 陈珺明, 张莉, 王淼, 王磊, 郑培永, 季光. 清肝活血方对酒精性肝损伤大鼠内质网应激反应性凋亡基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1279-1285

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1279.asp>

## 0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)已逐渐发展为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病<sup>[1]</sup>。如何有效地预防和治疗ALD,是亟待解决的问题。肝细胞凋亡在ALD发病机制中具有重要作用,而内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)反应性凋亡通路是近年的研究热点之一。研究发现,组织中GRP94、GRP78/Bip等内质网分子伴侣表达上调是ERS发生的标志,而天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12(cysteine-containing aspartate-specific proteases 12, caspase-12)则是ERS介导的细胞凋亡特异性启动蛋白酶,其活化是凋亡的中心环节<sup>[2-3]</sup>。前期研究工作表明,清肝活血方能显著降低酒精性肝损伤大鼠的肝细胞凋亡指数。本实验通过建立大鼠慢性酒精性肝损伤复合模型,从ERS反应性凋亡通路的角度,研究清肝活血方及其拆方对相关信号分子基因和蛋白表达的影响,从而探讨该方抗肝细胞凋亡的可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SD大鼠,SPF级,体质量 $280 \pm 20$  g,上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(沪)2003-0003号;清肝活血方(柴胡9 g、黄芩9 g、丹参15g、鳖甲9 g、葛根15 g)、清肝方(柴胡9 g、黄芩9 g)及活血方(丹参15 g、鳖甲9 g、葛根15 g)颗粒由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备;Annexin-FITC凋亡检测试剂盒购自美国BD公司;TRIzol、Easy-DNA<sup>TM</sup>试剂盒为Invitrogen公司产品;逆转录试剂盒:Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自MBI公司;兔抗大鼠GRP78/Bip、GRP94和caspase-12多克隆抗体购自英国Abcam公司。其余试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 慢性酒精性肝损伤模型的建立:** 正常大鼠75只,在课题组原有造模方法的基础上加以改进,复制大鼠慢性酒精性肝损伤模型<sup>[4]</sup>。即每日上午ig乙醇混合液15 mL/kg(56度白酒:玉米油:吡唑 = 5:1:10)1次,每周ip CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液0.3

表 1 RT-PCR扩增引物和条件

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)	退火温度(°C)
GRP78/Bip	上游引物: ATCAGGGCAACCGCATCACACC	312	56
	下游引物: ACG CCTCGGCAGTTTCCTTCATTT		
GRP94	上游引物: GACGGGCAAGGACATCTCTACAAA	362	56
	下游引物: CTTCTTCTCTGCCCCCTGCGTCTG		
caspase-12	上游引物: ATTCTGGTCTTTATGTCCC	495	58
	下游引物: ATACTCTCTCAATGGTGGGC		
GAPDH	上游引物: GTTACCAGGGCTGCCTTCTCTTG	245	60
	下游引物: CCTTGACTGTCCCGTTGA ACTTG		

mL/kg(CCL<sub>4</sub>: 橄榄油 = 1:3)1次, 连续10 wk. 病理结果显示造模成功, 诊断标准参照文献[5]. 第11周起将造模大鼠按体质量和状态均衡随机分为模型组、清肝活血方组9.5 g/(kg·d)、清肝方组3 g/(kg·d)、活血方组6.5 g/(kg·d)、空白对照组. 每组10只, 各组每日上午仍灌胃给予乙醇混合液, 下午给予药液或生理盐水, 连续给药2 wk, 末次给药1 h称质量后, 腹主动脉采血, 处死, 分离肝脏. 肝脏标本-70℃冻存或甲醛固定. 分离血清, 全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)的水平. 取肝组织, 100 g/L甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片, 行常规HE染色, 光镜下观察肝组织脂肪变性、炎症坏死等病变程度.

**1.2.2 Annexin V-FITC/PI双标记法检测肝细胞凋亡:** 新鲜肝组织剪碎至1 mm<sup>3</sup>大小, 然后置于100目铜网上轻搓, 边搓边以生理盐水冲洗, 2500 r/min离心5 min, 弃去上清及细胞碎片, 收集细胞悬液; 冷PBS液洗涤两遍, 用结合缓冲液调整细胞浓度至1×10<sup>9</sup> cell/L; 加入Annexin V-FITC和PI各5 μL; 旋涡混匀, 避光室温孵育15 min后立即用流式细胞仪进行检测, Cell Quest软件分析数据.

**1.2.3 DNA ladder分析:** 使用Easy-DNA™抽提方法提取肝组织DNA, 取DNA样本行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 进行凋亡特征性梯状条带(DNA ladder)分析.

**1.2.4 实时荧光定量PCR检测肝组织GRP78/Bip、GRP94和caspase-12 mRNA的表达:** 将100 mg组织放入研钵中加液氮粉碎, 每100 mg组织对应1 mL TRIzol混匀, 4℃离心(12000 r/min, 10 min), 取上清液, 加入200 μL的氯仿, 混匀, 室温静置15 min; 4℃离心(12000 r/min, 15 min), 取上层水相, 加入等体积异丙醇, 摇匀, 室温静置10 min; 4℃离心(12000 r/min, 10 min), 分离白色沉

淀即mRNA; 提取的总RNA溶于DEPC水中, 分光光度计测RNA浓度, -70℃冻存. 用Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit对总mRNA进行逆转录, 合成cDNA. 取0.5 μL的cDNA于25 μL反应体系中进行PCR扩增(引物与条件见表1), 在进行正式实验前, 预扩增产物须通过电泳鉴定(电泳条件: 120 g/L琼脂糖凝胶, 10 V/cm凝胶的电压)以确定是否真正得到了预期特定扩增产物. 内参照选用GAPDH. 所用引物序列根据GenBank公布的相关数据设计, 由上海英骏生物工程公司合成. PCR反应完成后, 数据采用仪器自带软件: ABI Prism 7300 SDS Software分析, 通过Comparative Delta-delta Ct法对肝脏中GRP78/Bip、GRP94和caspase-12 mRNA的表达水平进行相对定量分析.

**1.2.5 Western blot检测肝组织GRP78/Bip、GRP94和caspase-12蛋白的表达:** 将100 mg肝组织放入研钵中加液氮粉碎, 先加入RIPA缓冲液(每克组织3 mL RIPA), 在4℃条件下匀浆(15000 r/min, 1 min); 然后加入PMSF储存液(每克组织30 μL, 10 g/L PMSF), 冰浴30 min, 离心(15000 r/min, 15min); 分离细胞裂液(上清液), Lowry比色法测定蛋白含量. 每个样品上样50 μg, 经SDS-PAGE电泳分离后, 电转膜仪转膜(100 mA, 40 min); 转膜完毕后加入Western封闭液, 封闭2 h, 分别加入GRP78/Bip、GRP94、caspase-12多克隆抗体(一抗), 4℃过夜; Western洗涤液洗膜15 min, 共3次; 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 4℃反应1h. 化学发光法试剂作用后, X胶片曝光, 经显影、定影处理后观察结果. 凝胶成像及分析系统扫描图像, 进行灰度分析, 以目的条带/β-actin条带灰度比值表示各样本表达强度.

**统计学处理** 实验数据用mean±SD表示, 两组间比较采用t检验, 多组间比较采用One-way ANOVA分析; Excel2000及SPSS12.0软件进行数

#### ■相关报道

在D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导的肝衰竭小鼠模型及体外诱导肝细胞ERS的研究中发现, 内质网应激时肝脏内质网caspase-12蛋白酶大量活化, 通过一系列级联反应, 最终导致细胞凋亡. 提示通过早期干预caspase-12的活化, 对ERS反应性凋亡相关的肝脏疾病可能具有保护作用.



### ■创新盘点

本研究在建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型的基础上,研究清肝活血方及其拆方对ERS反应性凋亡通路中相关信号分子caspase-12、GRP78/Bip、GRP94的调控,从而探讨该方抗肝细胞凋亡的作用靶点和强度,深入揭示该方治疗酒精性肝损伤的机制,并为全面综合研究中医药防治ALD提供可行的方法和新的理论依据。

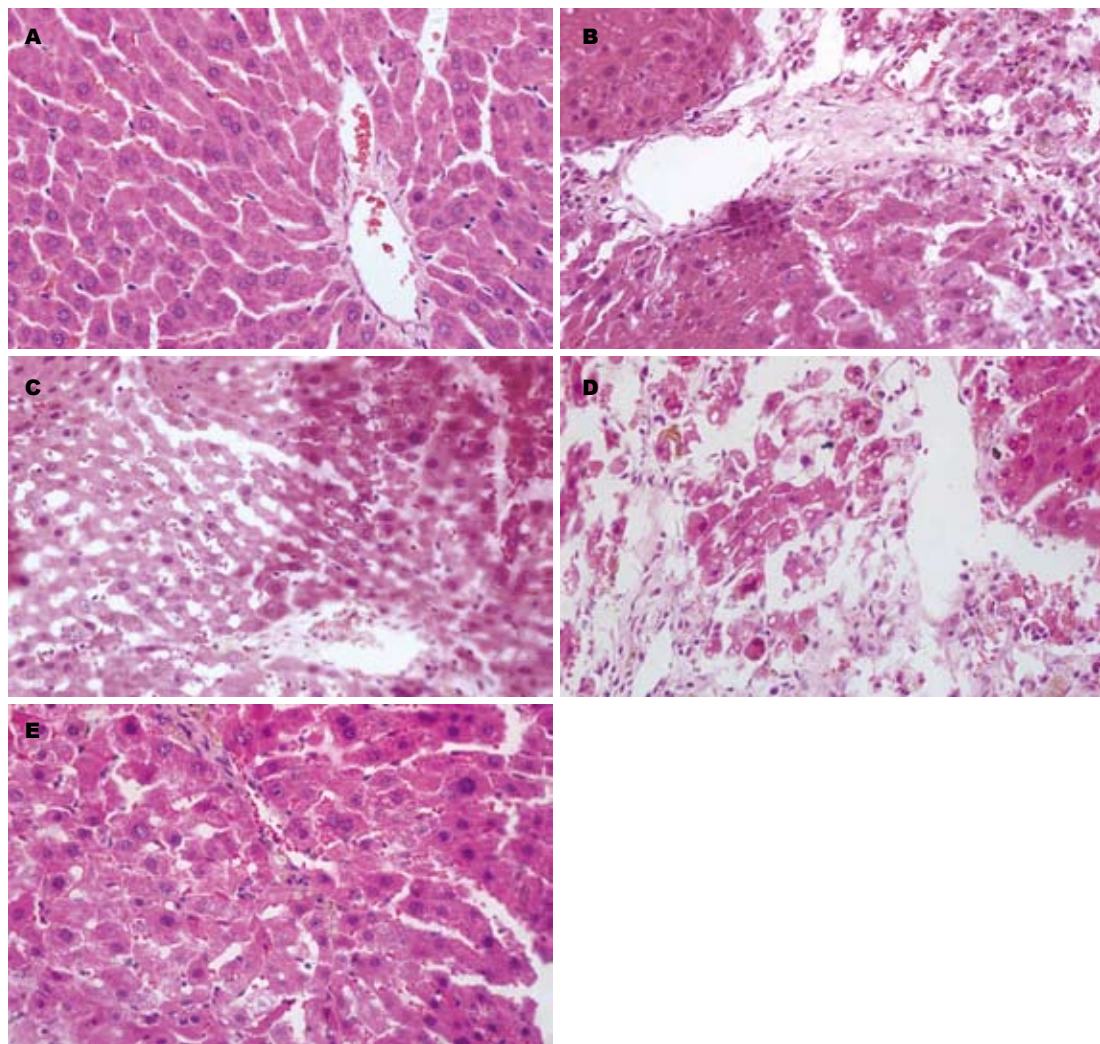


图1 各组大鼠肝脏组织病理变化(HE × 400). A: 空白对照组; B: 模型组; C: 清肝活血方组; D: 活血方组; E: 清肝方组。

据处理及分析。

## 2 结果

**2.1 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠血清ALT和AST的影响** 造模12 wk时, 模型组大鼠血清AST、ALT水平较空白对照组比较明显升高( $P < 0.01$ ), 而经过2 wk的治疗, 清肝活血方及其拆方组(清肝方和活血方)大鼠血清AST、ALT水平有明显下降( $P < 0.05$ 或 $0.01$ , 表2)。

**2.2 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏组织病理的影响** 大体观察, 正常大鼠肝脏被膜光滑, 呈红褐色, 质地柔软; 模型组大鼠表现为肝脏表面粗糙, 体积明显增大, 呈土黄色, 质地较脆, 表面布有白色脂肪斑点; 清肝活血方及拆方组大多数动物肝脏颜色、质地明显改善。光镜下观察, 正常大鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索以中央静脉为中心呈放射性排列, 肝窦正常; 模型组大鼠肝索界限不清, 肝细胞质出现不同

程度的空泡变性; 肝细胞脂肪变性明显, 内含大小不等的脂滴; 肝小叶可见不同程度的点状或灶状坏死, 主要见于中央静脉周围带, 坏死区及肝窦内可见大量炎症细胞浸润, 个别坏死区可见纤维细胞增生; 清肝活血方及拆方组肝细胞脂肪变和炎症程度明显轻于模型组(图1)。

**2.3 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织DNA ladder的影响** 细胞凋亡的生化特征之一是凋亡细胞的DNA可断裂为180-200 bp的多条寡核小体片段, 在琼脂糖凝胶电泳上表现为梯形条带(DNA ladder)。空白对照组大鼠肝组织DNA完整无断裂, 呈现单一条带; 模型组大鼠肝组织出现明显的DNA梯度条带; 清肝活血方组呈现单一条带, 表明未发生细胞凋亡; 而清肝方和活血方组则不同程度抑制DNA梯度条带的发生(图2)。

**2.4 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响** 正常活细胞Annexin V及

表 2 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝功能的影响 (U/L, mean  $\pm$  SD)

分组	n	ALT	AST
空白对照	10	33.9 $\pm$ 9.8	119.6 $\pm$ 28.6
模型对照	8	138.3 $\pm$ 43.3 <sup>b</sup>	257.4 $\pm$ 162.3 <sup>a</sup>
清肝活血方	10	37.6 $\pm$ 27.9 <sup>d</sup>	83.7 $\pm$ 33.8 <sup>d</sup>
清肝方	8	42.0 $\pm$ 26.8 <sup>d</sup>	102.7 $\pm$ 23.6 <sup>c</sup>
活血方	8	46.6 $\pm$ 21.0 <sup>d</sup>	111.5 $\pm$ 21.3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

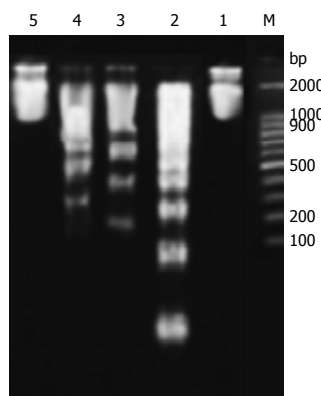


图 2 各组大鼠肝细胞凋亡DNA梯状电泳. M: DNA Marker; 1: 空白对照组; 2: 模型组; 3: 活血方组; 4: 清肝方组; 5: 清肝活血方组.

■应用要点  
临床多中心、随机、对照研究显示, 清肝活血方能显著改善ALD患者症状、体征和肝功能, 对ALD具有良好的综合治疗效果.

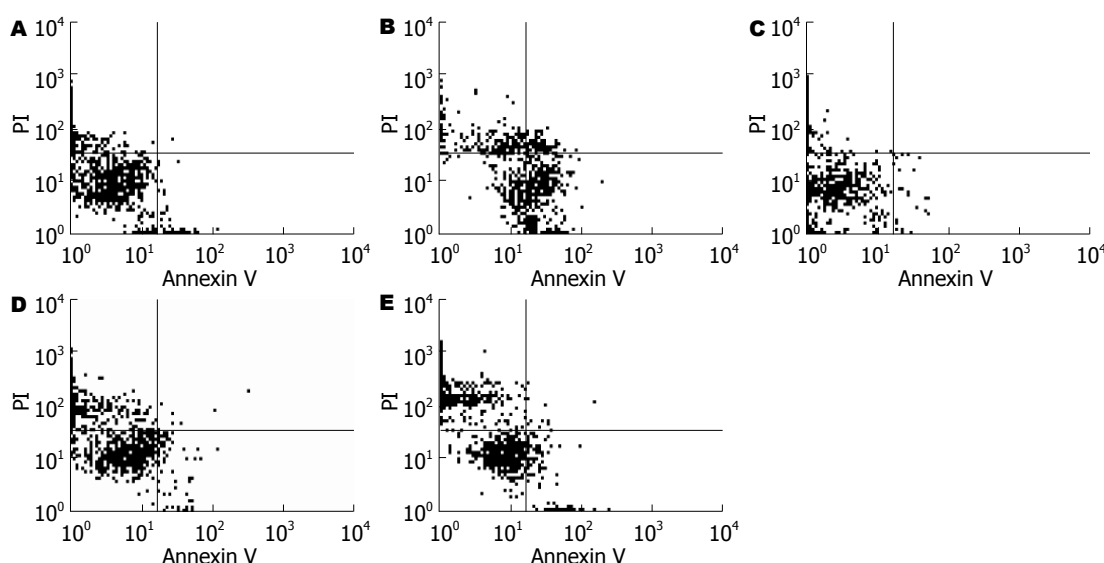


图 3 Annexin V/PI标记检测各组大鼠肝细胞凋亡. A: 空白对照组; B: 模型组; C: 清肝活血方组; D: 清肝方组; E: 活血方组.

PI均低染(Annexin V PI<sup>-</sup>), 分布在流式细胞分析图的左下区(LL); 早期凋亡细胞Annexin V高染而PI低染(Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>), 分布在图的右下区(LR); 死亡细胞Annexin V低染而PI高染(Annexin V PI<sup>+</sup>), 分布在图的左上区(UL); 晚期凋亡细胞Annexin V及PI均高染(Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>), 分布在图的右上区(UR)(图3). 将早期凋亡细胞百分数(LR)和晚期凋亡细胞百分数(UR)之和称为总凋亡率. Annexin V/PI双标记法结果显示, 酒精性肝损伤模型组大鼠肝细胞早期凋亡率和总凋亡率较正常对照组显著增高( $P < 0.01$ ), 而清肝活血方及拆方组大鼠肝细胞早期凋亡率和总凋亡率较模型组显著降低( $P < 0.01$ , 表3), 表明给药后对酒精性肝损伤大鼠肝细胞凋亡有明显的抑制作用.

### 2.5 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94 mRNA表达的影响

荧光定量PCR结果显示, 造模12 wk后, 模型组大鼠肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94 mRNA的相对表达量较正常大鼠显

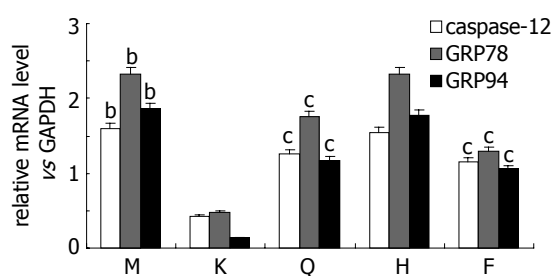


图 4 各组大鼠12 wk肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94 mRNA的表达. M: 模型组; K: 空白对照组; Q: 清肝方组; H: 活血方组; F: 清肝活血方组. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 模型组.

著升高( $P < 0.01$ ), 分别是空白对照组的3.82、4.89和12.96倍; 清肝活血方和清肝方组大鼠肝组织中凋亡基因的相对表达量较模型组均显著降低( $P < 0.05$ ), 其中清肝活血方组caspase-12、GRP78/Bip和GRP94 mRNA表达量分别是模型组的72.35%、56.11%和56.75%, 清肝方组分别为模型组的78.46%、75.95%和63.02%; 活血方组与模型组则无明显性差异(图4).



### ■名词解释

内质网应激(ERS)反应性凋亡通路:当机体细胞受到缺氧、饥饿、钙代谢紊乱、自由基侵袭及药物等应激原的刺激时,内质网腔内未折叠蛋白增多或钙失衡,内质网应激反应信号向胞质和胞核传导,从而使caspase-12活化,诱导内质网分子伴侣产生增加,继而激活非细胞色素C依赖的caspase-9,引起级联反应导致凋亡。他是与死亡受体和线粒体介导细胞凋亡不同的一条途径。

表 3 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝细胞凋亡率的影响 (%)

分组	n	总凋亡率	早期凋亡率
空白对照	7	5.62 ± 1.31	4.97 ± 1.04
模型对照	7	29.76 ± 12.36 <sup>b</sup>	25.26 ± 11.60 <sup>b</sup>
清肝活血方	7	6.44 ± 3.29 <sup>d</sup>	5.18 ± 2.24 <sup>d</sup>
清肝方	9	8.55 ± 4.42 <sup>d</sup>	6.91 ± 4.29 <sup>d</sup>
活血方	7	8.72 ± 6.05 <sup>d</sup>	6.12 ± 4.21 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组。

2.6 清肝活血方及拆方对慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94蛋白表达的影响 Western blot检测结果显示,造模12 wk后,模型组大鼠肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94蛋白表达量均明显高于正常大鼠(P<0.01),分别达到空白对照组的4.31、4.93和9.28倍;清肝活血方组和清肝方组大鼠肝组织中各蛋白表达量较模型组均显著降低(P<0.01),其中清肝活血方组caspase-12、GRP78/Bip和GRP94蛋白表达量分别是模型组的48.81%、61.49%和46.15%,清肝方组分别为模型组的63.09%、79.73%和58.46%;活血方组与模型组则无明显性差异(图5)。

### 3 讨论

近年的国外研究证实,酗酒患者血浆同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)水平明显升高,乙醇能够减弱蛋氨酸合成酶活性,从而引起含硫氨基酸代谢紊乱导致高半胱氨酸血症<sup>[6]</sup>。动物实验也表明,在乙醇饲养的动物模型中,乙醇通过高半胱氨酸介导ERS反应来影响肝细胞凋亡和脂肪合成相关因子的表达。HCY的增加,同时与ERS应答基因(GRP78、GRP94、CHOP、SREBPs)表达增加以及凋亡或凋亡前因子(CRADD、caspase-12、caspase-7、ATM、BAD)的上调有关<sup>[7-10]</sup>。ERS发生时,GRP78/Bip、GRP94、GRP58、PDI、SERCA2b、钙网素(calreticulin)、CHOP等一系列内质网分子伴侣蛋白表达增加,以稳定ER钙离子水平,帮助正确折叠、修饰与转运ER内堆积的蛋白质,或降解错误折叠的蛋白质,从而抑制细胞凋亡,保护细胞免受应激损害<sup>[10]</sup>。其中GRP78/Bip和GRP94广泛存在于内质网上,被认为是ERS的标志性蛋白。ERS实质上是触发了一个包括caspase-12、9、3特异级联反应。caspase-12是内质网特有、

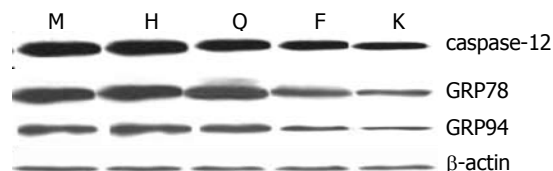


图 5 各组大鼠12 wk肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94蛋白的表达。M: 模型组; K: 空白对照组; Q: 清肝方组; H: 活血方组; F: 清肝活血方组。

细胞凋亡的关键和特异蛋白酶。caspase-12活化是不依赖线粒体凋亡通路成分Apaf-1和细胞色素C来完成的<sup>[12-13]</sup>。

清肝活血方是张仲景《伤寒论》之经方小柴胡汤的加减方。临床研究证实,该方能显著改善ALD患者症状、体征和肝功能,有效逆转肝细胞轻度脂肪性改变,降低4种肝纤维化标志物及血清细胞因子水平,对ALD具有良好的综合治疗效果<sup>[14-16]</sup>。前期研究工作发现,清肝活血方能显著降低酒精性肝纤维化模型动物的肝细胞凋亡指数,表现出较强的抗肝细胞凋亡作用,并有一定的量效关系<sup>[17]</sup>。

本研究应用乙醇-玉米油-吡啶混合物灌胃及小剂量CCl<sub>4</sub>注射的方法造模10 wk,酒精性肝损伤大鼠血清ALT、AST水平明显升高;组织病理亦显示大鼠肝细胞发生明显脂肪变性和炎症甚至纤维化,表明大鼠酒精性肝损伤模型成功制备。经过2 wk治疗后,给药组大鼠肝脏生化指标和病理均发生明显改善。两种凋亡检测方法显示,12 wk模型大鼠肝细胞主要发生早期凋亡改变,总凋亡率和早期凋亡率分别达到29%和26%,并出现凋亡典型的生化学改变。而给药组大鼠肝细胞总凋亡率和早期凋亡率则分别降低至8%和6%左右,表明清肝活血方及拆方对酒精性肝损伤大鼠肝细胞凋亡有明显的抑制作用。应用荧光定量PCR和Western blot进一步检测,发现模型组大鼠肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94 mRNA和蛋白均高表达,表明三种基因参与了酒精性肝损伤肝细胞ERS凋亡的发生;给药组中仅清肝活血方和清肝方组大鼠肝组织caspase-12、GRP78/Bip和GRP94 mRNA和蛋白表达明显降低,提示清肝活血方和清肝方可能通过下调ERS凋亡相关基因来抑制酒精性肝损伤模型肝细胞的凋亡。另外活血方在改善各指标上均表现差于其他两方,尤其对凋亡相关基因并无显著影响。从组方的中药来分析,提示君药柴胡和黄芩可能对抑制酒精性肝损伤肝细胞ERS凋亡发挥主要作用,而调控ERS凋亡信号转

导通路可能是“清肝法”治则的机制之一。通过以上研究, 进一步揭示了清肝活血方的作用机制, 为中医药防治ALD提供可行的方法和新的理论依据。

#### 4 参考文献

- 1 鞠辉, 魏良洲. 酒精性肝病的流行病学现状. 肝脏 2006; 11: 57-58
- 2 Xu YY, Lu Y, Fan KY, Shen ZH. Apoptosis induced by all-trans retinoic acid in N-acetylglucosaminyltransferase V repressed human hepatocarcinoma cells is mediated through endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem* 2007; 100: 773-782
- 3 Yeh TC, Chiang PC, Li TK, Hsu JL, Lin CJ, Wang SW, Peng CY, Guh JH. Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 782-792
- 4 王磊, 季光, 郑培永, 龙爱华. 大鼠酒精性肝纤维化复合模型的建立. 中西医结合学报 2006; 4: 281-284
- 5 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 312-313
- 6 Blasco C, Caballería J, Deulofeu R, Lligoña A, Parés A, Lluís JM, Gual A, Rodés J. Prevalence and mechanisms of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1044-1048
- 7 Ron D. Hyperhomocysteinemia and function of the endoplasmic reticulum. *J Clin Invest* 2001; 107: 1221-1222
- 8 Esfandiari F, Villanueva JA, Wong DH, French SW, Halsted CH. Chronic ethanol feeding and folate deficiency activate hepatic endoplasmic reticulum stress pathway in micropigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G54-G63
- 9 Song Z, Zhou Z, Deaciuc I, Chen T, McClain CJ. Inhibition of adiponectin production by homocysteine: a potential mechanism for alcoholic liver disease. *Hepatology* 2008; 47: 867-879
- 10 Purohit V, Abdelmalek MF, Barve S, Benevenga NJ, Halsted CH, Kaplowitz N, Kharbanda KK, Liu QY, Lu SC, McClain CJ, Swanson C, Zakhari S. Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 14-24
- 11 Grondin M, Marion M, Denizeau F, Averill-Bates DA. Tributyltin induces apoptotic signaling in hepatocytes through pathways involving the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222: 57-68
- 12 姜山, 谢青, 张华. Caspase-12活化在小鼠原代肝细胞凋亡中的作用. 肝脏 2006; 11: 12-14
- 13 Nagy G, Kardon T, Wunderlich L, Szarka A, Kiss A, Schaff Z, Bánhegyi G, Mandl J. Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver. *Arch Biochem Biophys* 2007; 459: 273-279
- 14 季光, 王育群, 曹承楼, 姜鲁峰, 张玮, 邢练军, 王奕. 清肝活血方治疗酒精性肝病的临床研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 13-17
- 15 郑培永, 季光, 尤圣富. 清肝活血方对酒精性肝病大鼠肝脏脂质过氧化损伤的影响. 江苏中医药 2004; 25: 50-51
- 16 季光, 尤圣富, 王磊, 郑培永. 清肝活血方对肝星状细胞增殖及胶原生成的影响. 中西医结合肝病杂志 2006; 16: 23-25
- 17 王磊, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光. 清肝活血方对乙醇性肝纤维化大鼠肝星形细胞和肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2590-2595

#### ■同行评价

本研究设计合理, 方法可靠, 结果可信, 有较好的科学意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码。如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。(常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



# 沉默肝癌衍生生长因子对大肠癌细胞增殖的抑制

廖斐, 董卫国, 罗和生, 刘蒙

## ■背景资料

近年研究发现肝癌衍生生长因子HDGF具有很强的促肿瘤生长作用, 在肿瘤及胚胎组织中呈过表达, 与多种肿瘤的生长、侵袭、转移、复发关系密切。因此进一步研究HDGF拮抗物对肿瘤的作用已成为肿瘤靶向治疗研究的热点。此外利用RNA干扰技术在mRNA水平上诱导基因表达抑制, 现已成为研究基因治疗和寻找药物靶点的重要工具。

廖斐, 董卫国, 罗和生, 刘蒙, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

廖斐, 武汉大学医学院博士在读, 主要从事胃肠道肿瘤的研究。

湖北省科技攻关基金资助项目, No. 2007AA301B33-3

作者贡献分布: 此课题由董卫国、廖斐及罗和生共同设计; 研究过程由廖斐与刘蒙完成; 数据分析由廖斐完成; 本论文写作由廖斐完成。

通讯作者: 董卫国, 教授, 430060, 湖北省武汉市紫阳路99号, 武汉大学人民医院消化内科。dwgwuhan@163.com

电话: 027-88041911-6948 传真: 027-88042292

收稿日期: 2009-02-28 修回日期: 2009-03-26

接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-08

## Effects of specific HDGF siRNA on proliferation of human colon carcinoma cells

Fei Liao, Wei-Guo Dong, He-Sheng Luo, Meng Liu

Fei Liao, Wei-Guo Dong, He-Sheng Luo, Meng Liu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by: the Key Scientific and Technological Projects of Hubei Province, China, No. 2007AA301B33-3

Correspondence to: Professor Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. dwgwuhan@163.com

Received: 2009-02-28 Revised: 2009-03-26

Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To study the effect of specific HDGF-siRNA on proliferation of human colon carcinoma lovo cells.

**METHODS:** Three pairs of specific HDGF-siRNA were transiently transfected into lovo cells by liposome and then the expression of HDGF was detected by RT-PCR and Western blot. The most efficient siRNA was selected for following experiments. Cell proliferation was examined by MTT assay. Finally we also detected the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by RT-PCR and Western blot.

**RESULTS:** After the specific siRNA was transfected into colon carcinoma lovo cells, the expression level of HDGF showed a significantly decrease which was detected by RT-PCR and Western blot. The cell survival rate was significantly

lower in interference group than in blank control group or in negative control group ( $t = 4.432, 4.263$ , both  $P < 0.01$ ), and the expression levels of PCNA and ERK1/2 protein were lower in interference group than in the other two groups ( $t = 14.89, 11.92$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The results show that the specific HDGF-siRNA can effectively silence the expression of HDGF, and HDGF-siRNA significantly inhibit proliferation of colon carcinoma cell line lovo cells, accompanied by down-regulation of PCNA and p-ERK1/2.

**Key Words:** Hepatoma-derived growth factor; Proliferating cell nuclear antigen; Extracellular signal-regulated kinase; Cell proliferation

Liao F, Dong WG, Luo HS, Liu M. Effects of specific HDGF siRNA on proliferation of human colon carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1286-1291

## 摘要

**目的:** 研究沉默肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)对人大肠癌lovo细胞增殖的影响。

**方法:** 将3条HDGF的特异性小干扰RNA(HDGF-siRNA)通过脂质体介导瞬时转染入大肠癌lovo细胞, RT-PCR及Western blot法分别检测HDGF mRNA和蛋白质表达受抑程度, 并筛选出1条沉默效率最高的siRNA用于后续试验; MTT法观察HDGF-siRNA对大肠癌细胞增殖生长的影响; Western blot法检测增殖细胞核抗原(PCNA)及ERK通路蛋白在转染前后大肠癌lovo细胞中表达含量的变化。

**结果:** HDGF-siRNA转染能有效抑制大肠癌lovo细胞中HDGF的表达; 与空白及阴性对照组相比, RNA干扰组大肠癌lovo细胞增殖率明显降低( $t = 4.432, 4.263$ , 均 $P < 0.01$ )、PCNA和p-ERK1/2蛋白均明显下调( $t = 14.89, 11.92$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** HDGF-siRNA不仅有效阻断HDGF在大肠癌lovo细胞的表达, 而且明显抑制大肠

## ■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

癌lovo细胞的增殖,其作用机制可能与下调PCNA,抑制ERK1/2蛋白活化有关.

**关键词:** 肝癌衍生生长因子;增殖细胞核抗原;ERK通路;细胞增殖

廖斐,董卫国,罗和生,刘蒙.沉默肝癌衍生生长因子对大肠癌细胞增殖的抑制.世界华人消化杂志.2009;17(13):1286-1291  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1286.asp>

## 0 引言

大肠癌是一种常见的消化系恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升趋势,严重威胁患者生命.寻求有效的治疗靶标显得尤为重要.许多研究表明生长因子如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在肿瘤的发生发展中扮演重要角色.近年来,一种新的生长因子,即肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF),因其在许多生理病理过程中起重要作用,已越来越受到研究者的关注.目前研究表明,HDGF在许多正常组织中呈低表达或不表达,而在某些恶性肿瘤如肝癌、肺癌和胃癌中的表达水平显著高于正常组织,并随着HDGF表达强度的升高,肿瘤的恶性程度也越高,暗示HDGF与恶性肿瘤的发生发展及预后密切相关<sup>[1]</sup>.

RNA干扰技术是目前用于高效快速鉴定基因功能<sup>[2]</sup>的一项分子学生物技术.为了明确HDGF对结肠癌细胞生长是否有影响,本实验利用该技术阻断大肠癌lovo细胞中HDGF的表达,以观察HDGF基因敲除后对大肠癌lovo细胞增殖的影响,并进一步探讨其作用机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** TRIzol试剂购于Invitrogen公司.逆转录试剂盒、通用PCR试剂盒购于Ferment公司. Annexin V-FITC试剂盒购于晶美公司.脂质体Lipofectamine2000及化学合成的三对HDGF siRNA均购于广州瑞博生物技术有限公司. HDGF单克隆鼠抗、PCNA单克隆鼠抗及内参Acting均购于英国Abcam公司. ERK-1、ERK-2兔抗人mAb及p-ERK小鼠抗人mAb均购于美国Santa Cruz Biotechnology公司. 所有二抗均购于美国Pierce公司. 细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购于江苏碧云天生物技术研究所. ECL发光剂购于美国Milipore公

司. 人大肠癌lovo细胞株购自中科院上海细胞典藏中心. 三条siRNA正反义链序列分别为: siRNA1, CAACAAAUACCAAGUCUUU dTdT, dTdT GUUGUUUAUGGUUCAGAAA; siRNA2, CAAGGAGAAGAACGAGAAA dTdT, dTdT GUUCCUCUUCUUGCUCUUU; siRNA3, CUACCAAGGAAGAUGCUGA dTdT, dTdT GAUGGUUCCUUCUACGACU.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** lovo细胞株为Dukes分期为C期的大肠癌细胞株,以含100 mL/L的胎牛血清的DMEM高糖培养基,在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养.

**1.2.2 细胞转染:** 当细胞密度达30%左右,将HDGF siRNA及阴性对照siRNA以脂质体Lipofectamine2000介导转染入大肠癌lovo细胞,具体操作按试剂说明书进行.

**1.2.3 RT-PCR检测HDGF mRNA的表达:** 转染后24 h,用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA,紫外分光光度仪测定RNA纯度及含量,以逆转录得到的cDNA为模板,根据设计的内参引物GAPDH(正义引物5'-GAAGGTCGGAGTCAACGG-3',反义引物5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'),HDGF基因引物(正义引物5'-ACGAGACGGCATTCTTG-3',反义引物5'-CCTCTTCAACGCTCCTTT-3')进行PCR扩增,扩增长度分别为221 bp和311 bp. 20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,EB溶液染色、拍照并成像分析.

**1.2.4 Western blot检测HDGF蛋白的表达:** 转染后48 h,以细胞裂解液裂解培养瓶中的细胞,提取蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转移至硝酸纤维素薄膜、封闭、加入一抗4℃孵育5 h,漂洗后加入二抗常温孵育1 h,漂洗后,置于暗室中ECL试剂盒(Milipore公司)发光、显影、定影、冲洗晾干、拍照并成像分析.

通过以上实验筛选出RNA干扰效率最高的HDGF特异性siRNA用于后续实验.

**1.2.5 实验分组:** 将大肠癌lovo细胞分为3组: A: 空白对照组; B: 非特异性siRNA转染的阴性对照组; C: 特异性siRNA干扰组.

**1.2.6 MTT细胞增殖实验:** 取对数生长期细胞,用胰酶消化制成单细胞悬液,调整细胞浓度为1×10<sup>5</sup>/L,以每孔200 μL接种于96孔培养板上培养. 置于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养,分别于转

### ■ 研发前沿

随着分子生物学技术的发展,信号转导及表达调控机制成为当今肿瘤研究中的热点.如能从细胞内信号转导角度深入研究HDGF基因沉默后抑制大肠癌细胞增殖的机制,将有助于从基因水平阐明HDGF的分子作用机制,并为大肠癌的治疗提供新的途径.

## ■相关报道

国内外有关报道提示外源性添加HDGF生长因子对多种肿瘤细胞具有显著的促生长作用。国内外已有的研究证明增加HDGF的内源性表达能够促进肿瘤的细胞的非锚着性生长,但对敲除HDGF基因后的体外作用机制尚缺乏报道。

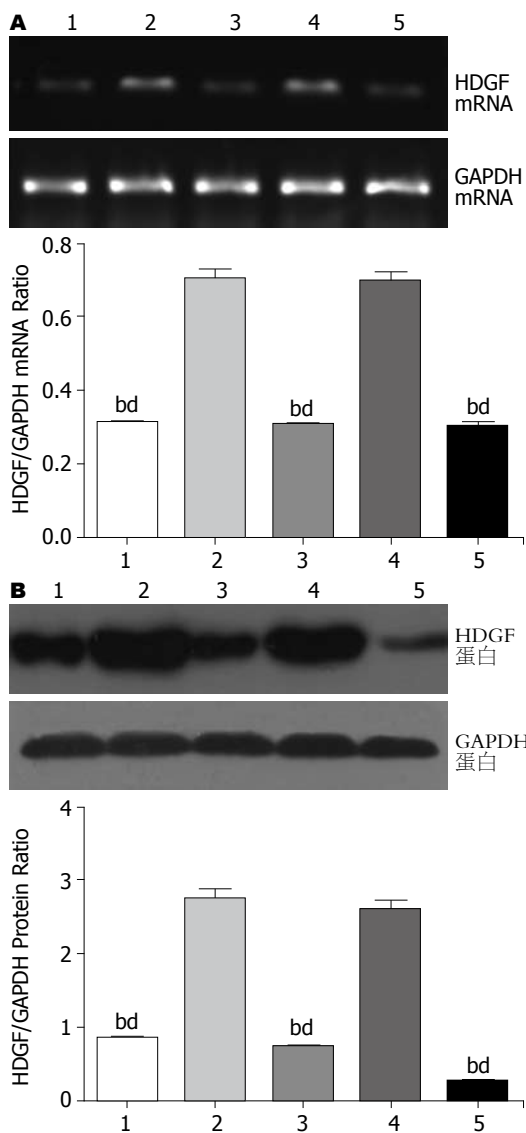


图1 RT-PCR、Western blot分别检测转染前后HDGF的mRNA及蛋白表达。A: mRNA; B: 蛋白; 1: siRNA1; 2: 空白对照组; 3: siRNA2; 4: 阴性对照组; 5: siRNA3; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 阴性对照组。

染后置不含血清培养基中继续孵育24、48及72 h后检测各组细胞, 每组设4个复孔。每孔中加入终浓度为5 g/L的MTT液20  $\mu$ L, 继续培养3 h后终止培养, 吸去上清液, 加入二甲基亚砜(DMSO)每孔150  $\mu$ L, 充分震荡10 min。酶标仪(Bio-TekEX-800, 美国)在490 nm波长比色测定每孔A值。比较各组细胞的生长。

1.2.7 检测增殖细胞核抗原PCNA及ERK1/2通路: 于转染HDGF siRNA 48 h后, 收集各组细胞, 利用免疫印迹法检测PCNA、ERK1/2、p-ERK1/2及内参Actin蛋白的表达。

**统计学处理** 本实验每组设3个平行样本, 各组数据用SPSS11.5统计软件进行方差分析和组间 $q$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

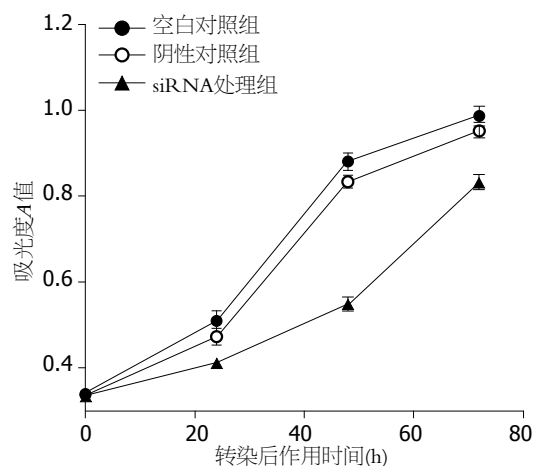


图2 MTT法检测HDGF siRNA转染前后各组细胞在不同时间的生长。

## 2 结果

2.1 RNA干扰效率的检测 转染24 h后收集大肠癌lovo细胞, RT-PCR结果显示: 阴性对照组及未转染组大肠癌lovo细胞HDGF mRNA呈阳性表达, 而3对特异性siRNA对HDGF mRNA表达均有明显抑制, 与两个对照组相比差异有显著性( $t = 22.08$ ,  $P < 0.01$ ), 各组细胞均表达内参GAPDH(221 bp), 其表达强度无明显差异。转染48 h后收集细胞, Western blot检测各组细胞HDGF蛋白的表达, 可见阴性对照组及空白对照组大肠癌lovo细胞HDGF蛋白呈阳性表达, 而HDGF siRNA转染组大肠癌lovo细胞中HDGF蛋白表达明显减弱, 与对照组相比差异有显著统计学意义( $t = 15.63$ ,  $P < 0.01$ )。三条特异性HDGF siRNA对HDGF均有明显的抑制, 以第3条siRNA的干扰效率最高, 故将其应用于后续实验(图1)。

2.2 MTT实验测定细胞存活率和增殖率 空白对照组和阴性对照组的大肠癌lovo细胞在转染后24、48和72 h时细胞生长和增殖均未受影响, 两者比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而HDGF siRNA转染组的大肠癌细胞生长增殖受到明显的抑制, 与两对照组相比, 差异有显著统计学意义( $t = 4.432$ ,  $P < 0.01$ ;  $t = 4.263$ ,  $P < 0.01$ )。48 h后HDGF siRNA转染组大肠癌细胞增殖活性有所恢复, 但仍低于其他两组(图2)。

2.3 阻断HDGF对大肠癌lovo细胞中PCNA蛋白及ERK通路蛋白表达的影响 转染后48 h, 提取细胞总蛋白, Western blot法检测各组细胞中PCNA、ERK通路蛋白的含量, 结果如图3所示, 通过灰度值分析得出RNA干扰组细胞中的PCNA蛋白及pERK1/2蛋白含量较其他两个对照

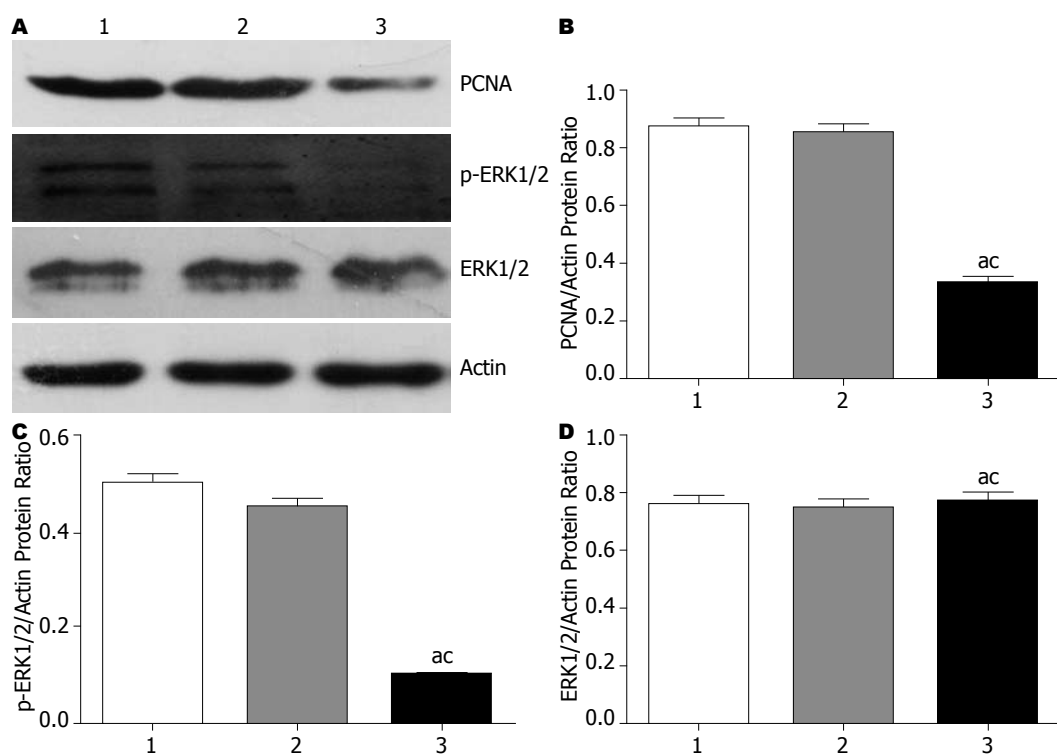


图3 不同处理组PCNA及ERK1/2通路蛋白的表达。A: Western blot检测结果; B: PCNA; C: p-ERK1/2; D: ERK1/2; 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: RNA干扰组; \* $P < 0.05$  vs 空白对照组; \* $P < 0.05$  vs 阴性对照组。

组有明显下调, 差异均有显著统计学意义( $t_{PCNA} = 14.89$ ,  $P_{PCNA} < 0.01$ ,  $t_{p-ERK1/2} = 11.92$ ,  $P_{p-ERK1/2} < 0.01$ )。但转染前后各组细胞的ERK总蛋白含量无明显改变, 各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 目前的治疗主要依赖于手术及化疗, 手术治疗对患者生活质量有影响且术后易复发。化疗易产生耐药且全身不良反应大。随着生物学技术的快速发展, 以癌细胞为靶标的基因治疗被认为是治疗一些恶性肿瘤(包括大肠癌等)的最佳方案。

目前研究报道, 生长因子如EGF、bFGF和PDGF等在肿瘤的发生发展中扮演重要角色, 而HDGF作为一种新的生长因子, 因其具有一个高度保守的PWWP结构域, 提示其可能具有更为重要的功能。近年来的研究表明, HDGF参与心血管、肺、肝、肾等组织器官生长发育的调控<sup>[3-6]</sup>, 还具有血管损伤修复、神经营养等作用<sup>[7-8]</sup>。此外还有文献报道HDGF与肝癌、肺癌、食管癌及肺癌的发展及预后关系密切。但目前国内外尚无关于HDGF对大肠癌细胞生物学行为的研究。为了研究HDGF与大肠癌的关系, 我们前期采用免疫组织化学法对106例大肠癌、30例大肠腺瘤患者的病理组织切片进行了研究, 发现

HDGF主要表达于细胞核, 在胞膜也有表达。统计学分析显示HDGF在大肠癌组织中的表达明显高于大肠腺瘤组织<sup>[1]</sup>, 并与肿瘤的分期、转移有关, 这提示HDGF可能成为大肠癌治疗的一个潜在的分子靶标。本研究进一步利用RNA干扰技术阻断HDGF基因的表达, 观察该疗法能否抑制结肠癌细胞的生长。

细胞异常增殖是肿瘤发生发展的重要机制之一, 也是近年国内外学者研究的热点。有研究报道HDGF对血管平滑肌细胞、肝癌细胞<sup>[9-10]</sup>等具有明显的促增殖作用。本研究利用RNA干扰技术来瞬时抑制HDGF在大肠癌细胞lovo中的表达, 反面论证其抑制大肠癌细胞的增殖与否。值得一提的是小干扰RNA转染入细胞内通常在24 h内尚未完全引起蛋白翻译转录受到抑制, 其发挥沉默效应的有效时间段多集中在转染后24-48 h, 随着小干扰RNA在细胞内停留时间继续延长, 越来越多的核酸酶将其破坏掉, 故48 h后大量的小干扰RNA被破坏掉, 从而导致HDGF转录翻译再度进行。本研究结果显示: 瞬时转染HDGF siRNA 48 h前, 大肠癌lovo细胞的生长增殖受到抑制, 尤以转染后24-48 h抑制效果最为明显, 而48 h后lovo细胞的生长增殖活性又有所增强, 这些结果与小干扰RNA在细胞内的效应时间完全吻合, 恰好证明了对大肠癌生长的抑

#### ■ 创新盘点

本文应用RNA干扰技术合成的HDGF siRNA, 在mRNA和蛋白水平上靶向抑制大肠癌lovo细胞中HDGF表达, 进而引起PCNA的下调及ERK通路的失活, 最终达成抑制大肠癌细胞增殖。



### ■应用要点

随着生物学技术的快速发展,以癌细胞为靶标的基因治疗被认为是治疗一些恶性肿瘤(包括大肠癌等)的最佳方案。

制作用来源于HDGF siRNA,由此可见HDGF对大肠癌细胞增殖的调节起着极为重要的作用。

近年来同源蛋白研究表明: HDGF蛋白与高迁移率族蛋白1(high mobility group protein-1, HMG)具有高度同源性<sup>[11]</sup>, HMG蛋白是一种广泛存在于真核生物细胞核内的非组蛋白,其最重要的功能是对基因表达转录的调控, HDGF与HMG-1的同源性提示HDGF可能也参与转录的调节过程,并可能对控制肿瘤细胞的生长增殖的关键基因进行调控。本研究结果显示:通过RNA干扰抑制HDGF表达的同时,检测到增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达也随之下调,这与Hu *et al*<sup>[12]</sup>研究认为HDGF与PCNA在细胞核内共显性表达的结论相符合。PCNA是DNA多聚酶 $\delta$ 的辅助蛋白,合成于晚G<sub>1</sub>期和S期,参与调节DNA的合成,与细胞的增殖周期密切相关,可较好地反映细胞增殖状态,PCNA阳性表达愈强,说明细胞正处于增殖状态,增殖也愈旺盛<sup>[13]</sup>。PCNA的这一生理功能使他被作为一项评估细胞增殖状态的指标,广泛用于恶性肿瘤的研究。本实验结果显示无论是从蛋白水平还是基因水平,PCNA的表达都随HDGF的表达下调而下调。由此我们推测,PCNA可能是HDGF下游的调节因子之一。阻断HDGF抑制了PCNA蛋白的转录合成,从而影响了DNA的合成,使大肠癌Iovo细胞增殖受到抑制。

此外,细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族重要成员之一,在细胞增殖与分化的调控中起关键作用<sup>[14]</sup>。ERK1/2在受到生长因子、细胞因子、有丝分裂等刺激和一些血管活性物质刺激后,可转化为具有活性的磷酸化形式的p-ERK1/2。p-ERK1/2可从细胞质转位进入细胞核内,进一步激活多种转录调节基因如*myc*、*jun*、*fos*等,从而启动细胞增殖相关蛋白、基因的转录和表达,引起细胞增殖、促进胶原及蛋白质的合成等<sup>[15]</sup>。相应的,磷酸化的p-ERK1/2的下调则可抑制细胞生长、阻碍各种促生长因子信号刺激基因转录。本实验结果显示:阻断HDGF基因后, p-ERK1/2在大肠癌Iovo细胞中的表达含量明显降低,而总ERK1/2的表达无明显变化,即p-ERK1/2与总ERK1/2的比值下降,表明ERK1/2通路处于被抑制状态。由此可见,阻断HDGF可以抑制p-ERK1/2的形成,导致p-ERK1/2入核减少,使其下游导致细胞增殖的因子表达

减少,从而抑制大肠癌Iovo细胞的增殖。因此ERK1/2通路也参与了HDGF siRNA抑制大肠癌细胞增殖的调节过程。然而HDGF基因还可能通过哪些机制参与对大肠癌细胞增殖的调节,具体的相互作用关系以及是否会给生物个体带来毒副作用等尚未明确,值得我们进一步深入研究。

总之,本研究表明沉默HDGF基因可以抑制大肠癌细胞的生长增殖,其作用机制既可能与HDGF本身强有力的促有丝分裂作用被抑制有关,也可能与下调PCNA,抑制ERK1/2通路蛋白活化有关。这些结论都提示HDGF基因不失为大肠癌治疗的一个极好的潜在分子靶标。相信研制HDGF靶向抑制剂对治疗结肠癌有着广阔的临床应用前景。

### 4 参考文献

- 1 吕莉,董卫国,余琼芳,罗和生. 肝细胞瘤衍生生长因子在结直肠腺癌中的表达及与血管形成关系的研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 195-196
- 2 Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6347-6352
- 3 Everett AD. Identification, cloning, and developmental expression of hepatoma-derived growth factor in the developing rat heart. *Dev Dyn* 2001; 222: 450-458
- 4 Cilley RE, Zgleszewski SE, Chinoy MR. Fetal lung development: airway pressure enhances the expression of developmental genes. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 113-118; discussion 119
- 5 Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Okuda Y, Nakamura H. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14: 158-161
- 6 Oliver JA, Al-Awqati Q. An endothelial growth factor involved in rat renal development. *J Clin Invest* 1998; 102: 1208-1219
- 7 Narron JV, Stoops TD, Barringhaus K, Matsumura M, Everett AD. Hepatoma-derived growth factor is expressed after vascular injury in the rat and stimulates smooth muscle cell migration. *Pediatr Res* 2006; 59: 778-783
- 8 Zhou Z, Yamamoto Y, Sugai F, Yoshida K, Kishima Y, Sumi H, Nakamura H, Sakoda S. Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus. *J Biol Chem* 2004; 279: 27320-27326
- 9 Everett AD, Stoops T, McNamara CA. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 37564-37568
- 10 Yoshida K, Nakamura H, Okuda Y, Enomoto H, Kishima Y, Uyama H, Ito H, Hirasawa T, Inagaki S, Kawase I. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1293-1301
- 11 Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, Kuroda T, Mori T, Kawamura K, Yamamoto H, Kishimoto T. Molecular cloning of complementary DNA for a

- novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 25143-25149
- 12 Hu TH, Huang CC, Liu LF, Lin PR, Liu SY, Chang HW, Changchien CS, Lee CM, Chuang JH, Tai MH. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 1444-1456
- 13 Ding X, Yang J, Hu S, Wu X, Li Q. [Evaluation of p53, p21waf1, and PCNA in the diagnosis on lung cancer] *Zhonghua Liuxing Bingxue Zazhi* 2001; 22: 54-57
- 14 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40
- 15 Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-4679

**■同行评价**

本文立题很好, 意义重大, 实验水平很高, 结果可信, 对临床工作者的研究会有很大的帮助。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •****世界华人消化杂志修回稿须知**

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

**1 修回稿信件**

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

**2 稿件修改**

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

**3 版权**

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)

## 5-脂氧合酶在大鼠急性坏死性胰腺炎组织中的表达

徐敏, 陈敬涵, 吴恺

### ■背景资料

急性胰腺炎是临床常见的消化系统急症, 重症急性胰腺炎(包括ANP)发病因素复杂, 并死率高, 其发病实质上是一种严重的全身炎症反应综合征(SIRS)。白三烯(LTs)是一类重要的炎症和过敏介质, 促进中性粒细胞等炎性细胞活化引起炎症反应。LTB<sub>4</sub>是5-LOX代谢产物。本文旨在研究5-LOX与ANP的关系并观察其抑制剂齐留通的保护作用, 对探讨ANP的发病机制提供理论依据。

徐敏, 陈敬涵, 吴恺, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科 上海市 200080

徐敏, 副主任医师, 主要从事胰腺疾病的临床和基础研究。

作者贡献分布: 此课题由徐敏设计; 研究过程由徐敏与陈敬涵操作完成; 实验技术由吴恺指导; 数据分析由徐敏与陈敬涵完成; 本论文写作由徐敏与陈敬涵完成。

通讯作者: 徐敏, 副主任医师, 200080, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科. zhengxu19721973@yahoo.com.cn  
电话: 021-63240090-3061

收稿日期: 2009-03-03 修回日期: 2009-03-28

接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-08

### Expression of 5-lipoxygenase in rat pancreatic tissue during acute necrotizing pancreatitis

Min Xu, Jing-Han Chen, Kai Wu

Min Xu, Jing-Han Chen, Kai Wu, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China  
Correspondence to: Dr. Min Xu, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. zhengxu19721973@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-03 Revised: 2009-03-28

Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of 5-lipoxygenase in rat pancreatic tissue during acute necrotizing pancreatitis.

**METHODS:** Fifty four SD rats were randomized into 3 groups: sham operation group, acute necrotizing pancreatitis group (ANP group) and zileuton treatment group. The model of ANP was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into biliopancreatic duct. At 6, 12, 24 h, the animals were sacrificed. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of 5-lipoxygenase of pancreas. The mRNA expression of 5-lipoxygenase in the pancreas was determined using RT-PCR. The serum level of LTB<sub>4</sub> was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The serum level of amylase was detected.

**RESULTS:** The levels of 5-LOX and 5-LOX mRNA were significantly lower at each time point in zileuton group than in ANP group (1.333% ±

0.516% vs 2.667% ± 0.516%, 3.000% ± 0.632% vs 4.500% ± 0.548%, 3.833% ± 0.753% vs 5.833% ± 0.408%; 0.285% ± 0.005% vs 0.366% ± 0.004%, 0.608% ± 0.005% vs 0.949% ± 0.013%, 0.297% ± 0.002% vs 0.400% ± 0.006%, all  $P < 0.05$ ). Compared with sham operation group, ANP group and zileuton group had significantly elevated serum levels of amylase and LTB<sub>4</sub>. However, serum levels of amylase and LTB<sub>4</sub> were significantly lower in zileuton group than in ANP group (amylase: 1967.50 ± 41.21 IU/L vs 2123.50 ± 49.11 IU/L, 3242.33 ± 87.76 IU/L vs 3531.17 ± 74.14 IU/L, 2286.83 ± 93.91 IU/L vs 2903.33 ± 90.90 IU/L, all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of 5-LOX is significantly higher during acute necrotizing pancreatitis.

**Key Words:** Acute necrotizing pancreatitis; 5-lipoxygenase; Zileuton; Enzyme-linked immunosorbent assay

Xu M, Chen JH, Wu K. Expression of 5-lipoxygenase in rat pancreatic tissue during acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1292-1296

### 摘要

**目的:** 研究5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)在急性坏死性胰腺炎(ANP)病程中的表达。

**方法:** 将SD大鼠54只随机分为3组: 假手术组、ANP组和齐留通组。经十二指肠行胆胰管逆行加压注射50 g/L牛磺胆酸钠, 诱导大鼠ANP模型。各组大鼠分别于6、12、24 h处死。用RT-PCR、免疫组化和Western blot免疫印迹法检测胰腺组织5-LOX mRNA及相应蛋白的表达。ELISA方法检测血清LTB<sub>4</sub>水平。应用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清淀粉酶水平。

**结果:** 与ANP组相比较, 齐留通组各个时点5-LOX蛋白及mRNA表达均显著降低, 差异具有统计学意义(1.333% ± 0.516% vs 2.667% ± 0.516%, 3.000% ± 0.632% vs 4.500% ± 0.548%, 3.833% ± 0.753% vs 5.833% ± 0.408%; 0.285% ± 0.005% vs 0.366% ± 0.004%, 0.608% ± 0.005% vs 0.949% ± 0.013%, 0.297% ± 0.002% vs 0.400% ± 0.006%, 均 $P < 0.05$ )。假手术组血清

### ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

淀粉酶、LTB<sub>4</sub>水平很低, ANP组和齐留通组水平都明显升高, 且齐留通组每个时点都较ANP组水平降低, 差异有统计学意义(血清淀粉酶:  $1967.50 \pm 41.21$  IU/L vs  $2123.50 \pm 49.11$  IU/L,  $3242.33 \pm 87.76$  IU/L vs  $3531.17 \pm 74.14$  IU/L,  $2286.83 \pm 93.91$  IU/L vs  $2903.33 \pm 90.90$  IU/L, 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 急性胰腺炎时, 5-LOX表达明显增加, 使用齐留通后, 5-LOX表达明显减少.

**关键词:** 急性坏死性胰腺炎; 5-脂氧合酶; 齐留通; 酶联免疫吸附测定法

徐敏, 陈敬涵, 吴恺. 5-脂氧合酶在大鼠急性坏死性胰腺炎组织中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1292-1296  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1292.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎是临床上较常见的急重症, 起病急骤, 病情发展迅速, 病死率较高, 特别是临床上重症急性胰腺炎, 病情变化快、机制复杂、治疗困难, 病死率高达30%-50%<sup>[1-2]</sup>. 急性胰腺炎病因学与病理生理学机制尚不完全阐明. 目前认为急性胰腺炎实质上是一种严重的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 炎症细胞被过度激活并释放各种炎症介质和细胞因子, 其效应被级联放大而形成恶性循环, 最终可导致多器官功能障碍<sup>[3]</sup>. 已知白三烯(leukotrienes, LTs)是强效的炎性介质, 参与炎症、变态反应、休克等发病过程<sup>[4]</sup>. 在许多急、慢性炎症性疾病中起重要作用, 如哮喘、类风湿性关节炎、炎症性肠病、牛皮癣等. 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)是催化产生LTs生成的限速酶, 其活性及数量可调节LTs的合成. 但是其在急性胰腺炎中的表达及作用却鲜有报道, 本文应用免疫组化及Western blot免疫印迹的方法检测急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)时胰腺组织中5-LOX的表达, 使用RT-PCR方法来检测胰腺组织5-LOX mRNA的表达, 并用ELISA方法来检测血清中5-LOX代谢产物LTB<sub>4</sub>的水平, 来研究5-LOX在ANP病程中的表达.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 牛磺胆酸钠购自Sigma公司; 齐留通由北京高盟化工有限公司提供原粉; 兔抗大鼠5-LOX多克隆抗体、DAB显色剂、SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; PCR引物、DNA Marker购自上海生工生物工程

技术有限公司; TRIzol购自Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程公司; ELISA试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司. 羊抗兔 $\beta$ -actin多克隆抗体、IgG辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 造模及分组:** 清洁级健康♂SD大鼠54只(由中科院实验动物中心提供), 体质量180-240 g, 随机分为3组: 假手术组(Sham组)、急性坏死性胰腺炎组(ANP组)、齐留通组, 每组18只. ANP组动物模型的建立参照AHO<sup>[5]</sup>法, 实验前12 h禁食不禁水, 称取体质量后, 30 g/L戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉, 经胆胰管逆行加压注入50 g/L的牛磺胆酸钠溶液(剂量0.1 mL/100 g), 完毕后维持压力10-15 min, 诱导大鼠ANP模型, 术毕于左下肢注射5 mL生理盐水, 并分别于制模后6、12、24 h各时点处死. 对照组操作同ANP组, 但以等容量的生理盐水代替牛磺胆酸钠. 齐留通组造模前1 h给予齐留通100 mg/kg灌胃.

**1.2.2 标本的采集:** 直视下以10 mL注射器经腹主动脉穿刺抽血, 处死大鼠, 血样收集于试管中, 室温放置10 min, 之后4000 r/min离心15 min吸取血清.

**1.2.3 免疫组化法检测各组大鼠胰腺组织5-LOX的表达:** 术后各时相剖腹取病变较为一致的胰腺头部, 固定于40 g/L的多聚甲醛溶液中, 石蜡包埋. 以SABC法进行免疫组织化学染色, 步骤按说明书操作, 主要步骤包括: 切片常规脱蜡至水, 以30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断内源性过氧化物酶, 使用微波法进行抗原修复, 滴加一抗进行孵育(4℃过夜), 滴加二抗进行孵育, DAB显色, 苏木素复染、中性树胶封片. 以胞质染色为主, 呈浅黄色-黄褐色. 最后表达以染色强度和阳性细胞率的得分之和进行判断: 无染色记0分, 弱染色(浅黄色)记1分, 中等染色(棕黄色)记2分, 强染色(黄褐色)记3分, 阳性细胞率<5%记0分, 5%-25%记1分, 25%-50%记2分, >50%记3分. 上述两项积分相加, 0分为阴性(-), 1-2分为弱阳性(+), 3-4分为中等阳性(++), 5-6分为强阳性(+++).

**1.2.4 Western blot法检测胰腺组织5-LOX的表达:** 取约50 mg液氮冻存胰腺组织常规提取总蛋白, -80℃保存备用. BCA法测定蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白. 半干转膜仪转膜2 h, 100 g/L脱脂奶粉封闭1 h, 加入1:400稀释的兔抗大鼠5-LOX抗体, 4℃过夜. 加入1:500稀释的羊抗兔Ig-HRP, 室温下反应2 h, ECL显色. 图像使用Total Lab软件灰度扫描, 计算目的蛋白(5-LOX)

### ■ 研发前沿

急性胰腺炎的发病机制目前尚不明确, 通常认为是炎症级联瀑布反应, 而白三烯作为一类重要的炎症介质, 能促进中性粒细胞等炎性细胞活化和释放各种细胞因子, 促进炎症发展. 探讨ANP与产生白三烯有关的机制是当前研究的热点. 5-LOX是白三烯合成的限速酶, 而5-LOX在哮喘、炎症性肠病、类风湿性关节炎等急、慢性炎症性疾病中的发病作用都有研究, 但是5-LOX在急性胰腺炎中的作用机制研究却鲜有报道.



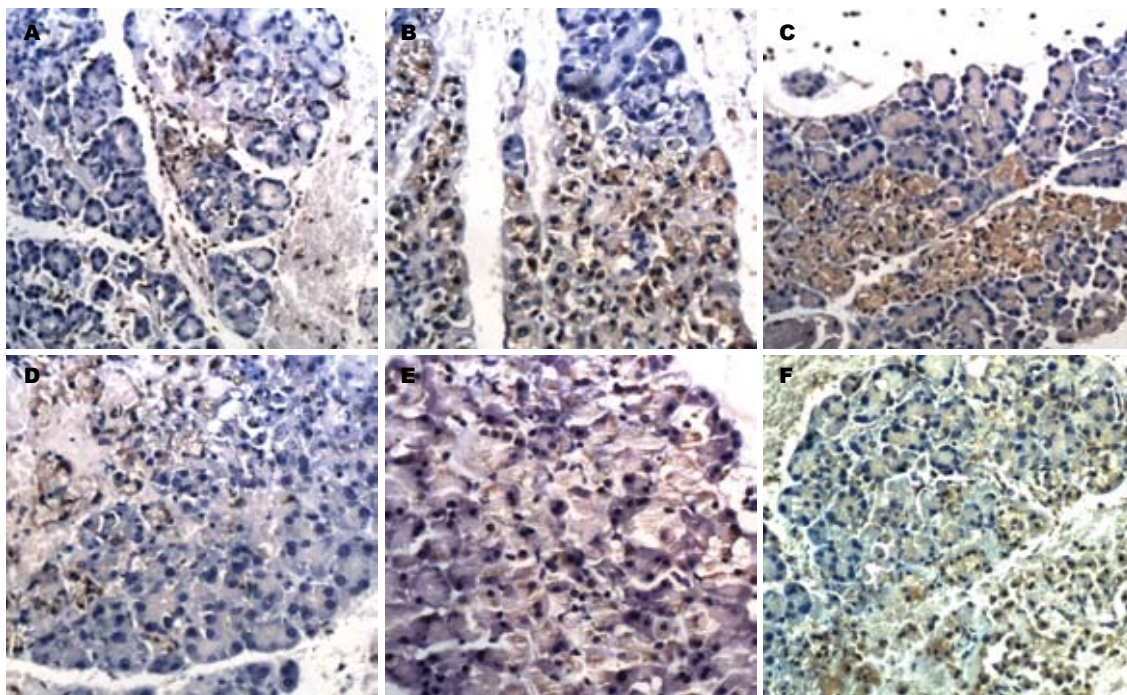
## ■相关报道

已往研究发现在大鼠急性胰腺炎模型中,出现中性粒细胞的活化和白三烯B4的大量生成。Cuzzocrea *et al* 研究发现, 5-LOX基因敲除小鼠用雨蛙肽诱导急性胰腺炎模型,其胰腺炎症明显减轻。均提示5-LOX在急性胰腺炎的发生发展中起重要作用,但是对于其表达和作用机制不甚清楚。

表 1 免疫组化检测各组大鼠胰腺组织5-LOX蛋白及mRNA表达 (mean  $\pm$  SD, %)

分组	蛋白			mRNA		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.192 $\pm$ 0.017	0.189 $\pm$ 0.010	0.186 $\pm$ 0.008
ANP组	2.667 $\pm$ 0.516 <sup>a</sup>	4.500 $\pm$ 0.548 <sup>a</sup>	5.833 $\pm$ 0.408 <sup>a</sup>	0.366 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.949 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	0.400 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
齐留通组	1.333 $\pm$ 0.516 <sup>c</sup>	3.000 $\pm$ 0.632 <sup>c</sup>	3.833 $\pm$ 0.753 <sup>c</sup>	0.285 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>	0.608 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>	0.297 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 假手术组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs ANP组相应时点。

图 1 ANP组和齐留通组胰腺组织5-LOX表达(免疫组织化学  $\times 400$ )。A-C: ANP组6、12、24 h; D-F: 齐留通组6、12、24 h。

与内参蛋白 $\beta$ -actin的比值。

**1.2.5 胰腺组织5-LOX的mRNA表达水平测定:** 术后各时相取胰尾部组织冻存于液氮中备用,以TRIzol法提取细胞总RNA,用半定量RT-PCR对转录产物进行扩增,以 $\beta$ -actin作为内参对照,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后拍照。用凝胶图像分析系统拍照并自动进行电泳条带密度分析,以(靶基因的条带密度)/(内参照 $\beta$ -actin的条带密度)代表靶基因的表达水平。大鼠 $\beta$ -actin引物(上游5'-TTGTACCAACTGGGACGATATGG-3',下游5'-CGACCAGAGGCATACAGGGACAAC-3',扩增片段为217 bp),大鼠5-LOX引物(上游5'-CCCGGGGCATGGAGAGCA-3',下游5'-GCGGTGGGGCAGCGTGTC-3',扩增片段为515 bp)。

**1.2.6 血清LTB4水平:** 应用ELISA法检测各组大鼠血清LTB4水平,严格按照说明书进行操作,测定A值,绘制出标准曲线,比照标准曲线查出各个A值对应的浓度(ng/L)。

**1.2.7 血清淀粉酶检测:** 应用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清淀粉酶水平,单位采用IU/L。

**统计学处理** 实验数据以mean  $\pm$  SD表示,经过正态性和方差齐性(Levene检验法)检验,多个样本均数间的多重比较采用单因素方差分析ANOVA中SNK检验。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准,采用SAS6.0统计软件进行分析。

## 2 结果

**2.1 免疫组化法检测各组大鼠胰腺组织5-LOX的表达** 假手术组大鼠胰腺组织未见5-LOX表达,ANP组可见明显表达( $P < 0.05$ );与ANP组相比较,齐留通组各个时点的表达均显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图1,表1)。

**2.2 Western免疫印迹法检测各组大鼠胰腺组织5-LOX的表达** 假手术组有极少的5-LOX表达,ANP组可见明显表达( $P < 0.05$ );与ANP组相比较,齐留通组各个时点的表达均显著降低,差异具



表 2 各时点胰腺组织淀粉酶水平 (IU/L, mean  $\pm$  SD,  $n = 18$ )

分组	6 h	12 h	24 h
假手术组	576.00 $\pm$ 14.19	581.67 $\pm$ 13.03	577.17 $\pm$ 15.30
ANP组	2123.50 $\pm$ 49.11 <sup>a</sup>	3531.17 $\pm$ 74.14 <sup>a</sup>	2903.33 $\pm$ 90.90 <sup>a</sup>
齐留通组	1967.50 $\pm$ 41.21 <sup>c</sup>	3242.33 $\pm$ 87.76 <sup>c</sup>	2286.83 $\pm$ 93.91 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 假手术组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs ANP组相应时点.

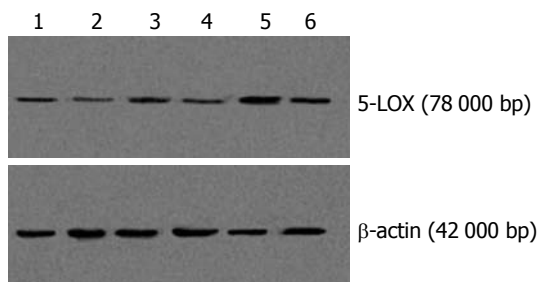


图 2 ANP组和齐留通组胰腺组织5-LOX、 $\beta$ -actin蛋白的表达. 1、3、5: ANP组6、12、24 h; 2、4、6: 齐留通组6、12、24 h.

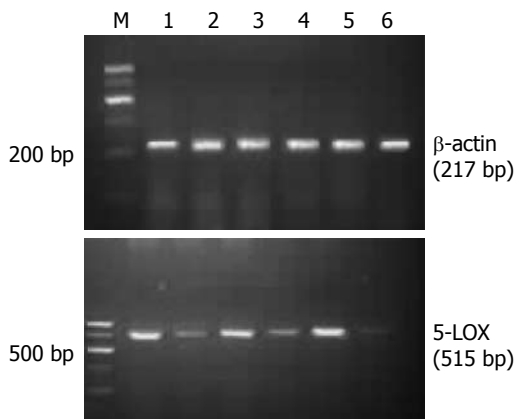


图 3 ANP组和齐留通组胰腺组织5-LOX、 $\beta$ -actin mRNA表达. 1、3、5: ANP组6、12、24 h; 2、4、6: 齐留通组6、12、24 h.

有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2).

**2.3 5-LOX mRNA的表达** 假手术组胰腺组织有较少的5-LOX mRNA表达, ANP组各时点表达水平较假手术组均有所升高, 且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 齐留通组各时相5-LOX mRNA表达水平均低于ANP组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图3, 表1).

**2.4 各组大鼠血清LTB4水平** 假手术组各时点大鼠血清LTB4均较低, ANP组较假手术组LTB4水平明显升高, 两者差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与ANP相比, 齐留通组各时点LTB4水平均显著下降( $P < 0.05$ , 图4).

**2.5 各组大鼠血清淀粉酶水平** 假手术组淀粉酶水平均很低, ANP组各时点的淀粉酶水平均升高

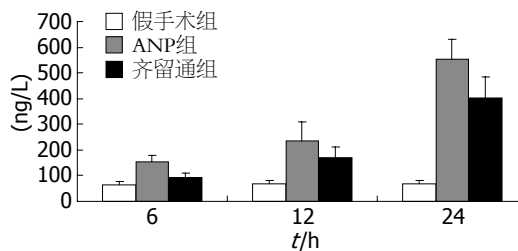


图 4 各组大鼠血清LTB4水平.

( $P < 0.05$ ); 与ANP组相比, 齐留通组水平均降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2).

### 3 讨论

急性胰腺炎是临床常见的消化系统急症, 发病因素复杂, 近年的研究证实, LTs是一种重要的炎症和过敏介质, 而5-LOX是LTs产生的限速酶. 5-LOX途径的主要代谢产物为白三烯, 包括LTA4、LTB4、LTC4、LTD4、LTE4等. LTs是目前已知最强的中性粒细胞和嗜酸性粒细胞活化因子之一, 在许多炎症和过敏性疾病中都起到重要作用, 如哮喘、类风湿性关节炎等, 其能够介导内皮细胞和中心粒细胞表面黏附分子的表达, 促进中性粒细胞等炎性细胞的迁移、渗出和聚集, 引起炎症反应. 已有研究发现在大鼠急性胰腺炎模型中, 出现中性粒细胞的活化和白三烯B4的大量生成<sup>[6]</sup>.

许多研究证实5-LOX及其代谢产物在许多慢性炎症性疾病中起到很重要的作用. 近年来关于LTs与哮喘的研究比较多, Turner *et al*<sup>[7]</sup>研究表明LTB4可使中性粒细胞从肺毛细血管滤出, 同时增加呼吸道对组胺及乙酰胆碱的反应性. LTC4、LTD4、LTE4对血管、支气管组织具有强烈的致痉作用, 抑制5-LOX活性可减少炎症介质和过敏性慢反应物质的生成. Chen *et al*<sup>[8]</sup>通过对5-LOX基因敲除的小鼠进行研究, 用卵清蛋白致敏再用卵清蛋白气雾剂自小鼠气道吸入的小鼠“哮喘”模型中, 与5-LOX野生型相比, 5-LOX基因缺失型小鼠对卡巴胆碱刺激不产生明显的气道阻力增加, 并且募集至气管和肺组

### ■创新盘点

本论文深入研究了5-LOX在大鼠ANP胰腺组织中mRNA和蛋白水平的表达活化程度以及代谢产物LTB4的合成增加, 为进一步探讨5-LOX在急性胰腺炎发病机制中的作用提供充分的理论依据.

# 同行评价

本研究立题依据充分,研究目的明确,设计严谨,流程合理,实验动物和材料规范,技术难度较大,结果可信,文章简洁,重点突出,图文并茂,结果对ANP的发生机制提供理论依据,对临床重症急性胰腺炎的防治有一定的参考意义。

组织的炎症细胞(如嗜酸性粒细胞)也显著减少。

5-LOX代谢产物LTB<sub>4</sub>是一个作用很强的趋化因子,他可以激活并聚集许多炎性和免疫效应细胞,作用于各种免疫现象所涉及的T细胞释放各种细胞因子,如IL-1、IL-2、INF- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子及基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-3和基质金属蛋白酶-9<sup>[9-11]</sup>。有研究员证实口服LTB<sub>4</sub>受体拮抗剂可对类风湿性关节炎进行长期治疗<sup>[12]</sup>,这也提示LTB<sub>4</sub>在炎症过程及类风湿性关节炎的发病机制中起到重要作用。Gursal *et al*研究发现类风湿性关节炎患者滑液和血清中含有高浓度的LTB<sub>4</sub><sup>[13]</sup>, Nickerson *et al*通过对II型胶原诱导的关节炎小鼠模型进行研究,证实抑制5-LOX的活性后,可抑制中性粒细胞在关节内的聚集和渗出,降低了关节部位的炎症反应程度,减轻了疼痛症状,抑制了II型胶原诱导的关节炎小鼠关节的病情发展<sup>[14]</sup>。Cuzzocrea *et al*<sup>[15]</sup>也用实验证实,5-LOX在炎症性肠病中起到重要作用,通过实验证实,与5-LOX野生型炎症性肠病小鼠相比,5-LOX基因缺失型小鼠结肠损伤范围和程度都明显降低,并且ICAM-1、VCAM-1、P-selectin、E-selectin表达也显著减少。

但是,关于5-LOX在急性胰腺炎中的作用机制研究却鲜有报道,Cuzzocrea *et al*<sup>[16]</sup>通过对5-LOX基因敲除小鼠进行研究,发现在雨蛙肽处理过的5-LOX基因敲除急性胰腺炎小鼠的胰腺和肺组织中,细胞内的黏附分子-1、P-选择素、E-选择素的表达、髓过氧化物酶活性、胰腺炎症和组织损伤程度都较5-LOX野生型小鼠显著减少。据此推断,5-LOX在急性胰腺炎的发生发展中起到重要作用。

齐留通是一种5-LOX选择性抑制剂,本实验使用齐留通进行干预,使用免疫组化和Western blot免疫印迹来检测各组大鼠胰腺组织5-LOX的蛋白表达,发现假手术组5-LOX表达极微,ANP组每个时点5-LOX表达都较假手术组明显增加,齐留通组5-LOX表达较ANP组明显减少。

总之,5-LOX与急性胰腺炎的关系十分密切,其代谢产物是急性胰腺炎发生、发展中十分重要的一类炎性介质,是急性胰腺炎治疗的靶分子之一。对5-LOX蛋白的表达及调节的研究在急性胰腺炎治疗中具有发展前景。随着人们对急性胰腺炎中5-LOX和代谢产物LTs作用的逐步认识和相关药物的开发,对急性胰腺炎发病机制的认识会更全面,治疗会更合理。

# 参考文献

- 1 Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet* 2008; 371: 143-152
- 2 Cappell MS. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am* 2008; 92: 889-923, ix-x
- 3 Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1325-1340, vii
- 4 Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med* 2007; 357: 1841-1854
- 5 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 6 Folch E, Closa D, Prats N, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Leukotriene generation and neutrophil infiltration after experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 1998; 22: 83-93
- 7 Turner CR, Breslow R, Conklyn MJ, Andresen CJ, Patterson DK, Lopez-Anaya A, Owens B, Lee P, Watson JW, Showell HJ. In vitro and in vivo effects of leukotriene B<sub>4</sub> antagonism in a primate model of asthma. *J Clin Invest* 1996; 97: 381-387
- 8 Chen XS, Sheller JR, Johnson EN, Funk CD. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* 1994; 372: 179-182
- 9 Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 501-509
- 10 Rocha PN, Plumb TJ, Coffman TM. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 215-227
- 11 Leppert D, Hauser SL, Kishiyama JL, An S, Zeng L, Goetzl EJ. Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. *FASEB J* 1995; 9: 1473-1481
- 12 Alten R, Gromnica-Ihle E, Pohl C, Emmerich J, Steffgen J, Roscher R, Sigmund R, Schmolke B, Steinmann G. Inhibition of leukotriene B<sub>4</sub>-induced CD11B/CD18 (Mac-1) expression by BIIL 284, a new long acting LTB<sub>4</sub> receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 170-176
- 13 Gürsel T, Firat S, Ercan ZS. Increased serum leukotriene B<sub>4</sub> level in the active stage of rheumatoid arthritis in children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56: 205-207
- 14 Nickerson-Nutter CL, Medvedeff ED. The effect of leukotriene synthesis inhibitors in models of acute and chronic inflammation. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 515-521
- 15 Cuzzocrea S, Rossi A, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Muià C, Caputi AP, Sautebin L. 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of adhesion molecule expression and neutrophil migration. *Lab Invest* 2005; 85: 808-822
- 16 Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, Di Paola R, Dugo L, Genovese T, Britti D, Sciarra G, De Sarro A, Caputi AP, Sautebin L. 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology* 2003; 110: 120-130

编辑 李军亮 电编 何基才

# 5-ASA对TNBS结肠炎大鼠血中性粒细胞凋亡及血清IL-8水平的影响

贺文成, 李瑾, 周瑞, 唐平飞

贺文成, 李瑾, 唐平飞, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省肠病医学研究中心 湖北省武汉市 430071

周瑞, 泰兴市人民医院消化内科 江苏省泰兴市 225400

贺文成, 2007届武汉大学中南医院硕士, 主要从事炎症性肠病的免疫学机制的研究。

作者贡献分布: 贺文成与李瑾对此文所作贡献均等; 此课题由李瑾与贺文成设计; 研究过程及论文撰写主要由贺文成完成; 研究经费由李瑾提供; 周瑞参与大体评分、组织学评分的评估, 为各项指标的检测提供指导; 唐平飞参与实验动物模型的制作。

通讯作者: 李瑾, 教授, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科。lijinluyi@gmail.com

电话: 027-67813072

收稿日期: 2009-02-18 修回日期: 2009-03-20

接受日期: 2009-03-23 在线出版日期: 2009-05-08

## Effect of 5-ASA on serum level of IL-8 and PMN apoptosis in TNBS-induced rat colitis

Wen-Cheng He, Jin Li, Rui Zhou, Ping-Fei Tang

Wen-Cheng He, Jin Li, Ping-Fei Tang, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Rui Zhou, Department of Gastroenterology, Taixing People's Hospital, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Jin Li, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. lijinluyi@gmail.com

Received: 2009-02-18 Revised: 2009-03-20

Accepted: 2009-03-23 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutic mechanism of 5-ASA in inflammatory bowel disease (IBD) through observation of its effects on serum level of IL-8 and PMN apoptosis in trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced rat colitis.

**METHODS:** Thirty female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups, namely, normal control group (group A) and colitis groups (group B and C). Then group B was given 1 mL normal saline while group C was given 5-ASA (200 mg/kg) for 7 d. All of the animals in three groups were anesthetized, and the macroscopic and histological changes of the colon were evaluated and scored. Expression of serum IL-8 was detected using ELISA, and the apoptosis of PMN was examined by flow cytometry.

and the apoptosis of PMN was examined by flow cytometry.

**RESULTS:** Compared with group A, macroscopic and histological scores and the serum level of IL-8 were significantly higher in group B ( $2.74 \pm 0.437$  vs  $0.27 \pm 0.346$ ,  $5.10 \pm 1.101$  vs  $0.50 \pm 0.527$ ,  $4.70 \pm 0.949$  vs  $0.44 \pm 0.458$ ,  $720.97 \pm 71.718$  ng/L vs  $129.88 \pm 18.399$  ng/L, all  $P < 0.01$ ), but they were markedly decreased in group C than in group B ( $1.34 \pm 0.385$  vs  $2.74 \pm 0.437$ ,  $1.70 \pm 0.483$  vs  $5.10 \pm 1.101$ ,  $1.50 \pm 0.850$  vs  $4.70 \pm 0.949$ ,  $392.84 \pm 43.628$  ng/L vs  $720.97 \pm 71.718$  ng/L, all  $P < 0.01$ ). Compared with group A, PMN apoptosis rate was notably lower in group B ( $30.54\% \pm 4.036\%$  vs  $56.13\% \pm 5.188\%$ ,  $P < 0.01$ ), but it was markedly increased in group C ( $48.89\% \pm 4.522\%$ ) than in group B ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** There is notably therapeutic effect in topical enema with 5-ASA for IBD, which may be related to reduced serum level of IL-8 and induced PMN apoptosis.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Trinitrobenzene sulphonic acid; 5-aminosalicylic acid; Interleukin-8; Polymorphonuclear neutrophil; Apoptosis

He WC, Li J, Zhou R, Tang PF. Effect of 5-ASA on serum level of IL-8 and PMN apoptosis in TNBS-induced rat colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1297-1302

## 摘要

**目的:** 观察5-ASA对三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠诱发的结肠炎大鼠血中性粒细胞凋亡及血清IL-8水平的影响, 并探讨5-ASA治疗炎症性肠病(IBD)的作用机制。

**方法:** 成年SD大鼠30只, ♀, 随机分成A、B、C组, A组为正常对照组, B、C组采用TNBS/乙醇灌肠制作大鼠结肠炎模型。B组每天给予生理盐水1 mL灌肠, C组每天给予5-ASA溶液(200 mg/kg)灌肠, 连续7 d。经过处理后评定各

## ■背景资料

5-ASA作为一种有效的IBD治疗药物, 已被广泛应用于临床, 但其具体治疗机制尚不明确。近年来研究发现5-ASA对IBD疾病免疫和炎症瀑布过程中的多数因素均有作用。本次研究通过观察5-ASA对TNBS结肠炎大鼠血中性粒细胞(PMN)凋亡及血清IL-8水平的影响, 来探讨其治疗机制。

## ■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

## ■研究前沿

目前关于5-ASA治疗IBD的机制研究主要集中在:(1)对机体免疫系统的影响,其中又以对淋巴细胞平衡及凋亡和细胞因子网络的影响为热点;(2)对炎症损伤的影响,其中又以对炎症介质的影响及活性氧族的清除作用为热点。关于5-ASA对中性粒细胞的影响的研究很少。目前众多研究只是发现其对免疫和炎症瀑布过程中的众多因素有作用,而对各因素之间的相互联系及其上下游关系比较模糊,以致其具体机制尚不明确。

组大鼠一般状况、结肠大体损伤及结肠组织学损伤;在全麻下心脏采血,分别通过流式细胞术检测血中性粒细胞凋亡率及通过酶联免疫吸附法检测血清中IL-8浓度。

**结果:**与A组比较,B组的DAI评分、大体损伤评分和组织学损伤评分及血清IL-8水平均显著升高( $2.74 \pm 0.437$ 分 vs  $0.27 \pm 0.346$ 分,  $5.10 \pm 1.101$ 分 vs  $0.50 \pm 0.527$ 分,  $4.70 \pm 0.949$ 分 vs  $0.44 \pm 0.458$ 分,  $720.97 \pm 71.718$  ng/L vs  $129.88 \pm 18.399$  ng/L, 均 $P < 0.01$ ),而C组( $1.34 \pm 0.385$ 分,  $1.70 \pm 0.483$ 分,  $1.50 \pm 0.850$ 分,  $392.84 \pm 43.628$  ng/L)明显低于B组(均 $P < 0.01$ );与A组比较,B组中性粒细胞凋亡率明显降低( $30.54\% \pm 4.036\%$  vs  $56.13\% \pm 5.188\%$ ,  $P < 0.01$ ),而C组( $48.89\% \pm 4.522\%$ )明显高于B组( $P < 0.01$ )。

**结论:**5-ASA灌肠对结肠炎大鼠具有显著的治疗作用,其机制可能与其降低血清IL-8水平及诱导血中性粒细胞凋亡有关。

**关键词:**炎症性肠病;三硝基苯磺酸;5-氨基水杨酸;白介素-8;中性粒细胞;凋亡

贺文成,李瑾,周瑞,唐平飞. 5-ASA对TNBS结肠炎大鼠血中性粒细胞凋亡及血清IL-8水平的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1297-1302

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1297.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和Crohn's病(Crohn's disease, CD),是一种病因和发病机制至今尚未完全明确的慢性肠道炎症性疾病。目前认为IBD发病机制可能涉及遗传、免疫失调、感染、环境及精神心理因素等诸多方面,并认为他是多种炎症细胞、细胞因子、炎症介质、神经内分泌肽及活性氧共同作用引起的肠道黏膜的损伤<sup>[1]</sup>。目前针对性的治疗药物主要包括氨基水杨酸类制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂、黏膜保护剂等。氨基水杨酸类制剂(如5-ASA)是目前临床上最为常用的治疗IBD的药物,但其治疗机制并未完全明确。本次研究通过观察5-ASA对TNBS结肠炎大鼠血中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)凋亡及血清IL-8水平的影响,来探讨其治疗机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康成年♀未育Sprague-

Dawley(SD)大鼠30只,7 wk龄,体质量190-220 g,由武汉大学实验动物研究中心提供;50 g/L 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-TNBS)和5-氨基水杨酸(5-ASA)均购自美国Sigma公司;大鼠IL-8 ELISA试剂盒为英国R&D公司产品;大鼠淋巴细胞分离液Ficoll购自天津灏洋生物有限公司;红细胞裂解液为北京索莱宝科技有限公司产品;RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司;100 mL/L胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;酶标仪购自日本日立公司;流式细胞仪购自德国PARTEC公司。

## 1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及处理:30只SD大鼠,置于温度为 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,湿度为50%-70%的净化动物饲养房内,混合食料喂养,自由饮水。随机数字表法将大鼠随机分成A、B、C组,每组各10只。A组作为正常对照组,B、C组参考文献[2-3]方法建立大鼠结肠炎模型:第1天观察记录实验前大鼠的一般情况,第2天禁食不禁水1 d,第3天用20 g/L异戊巴比妥钠(40 mg/kg)ip麻醉,用橡胶管经大鼠肛门插入结肠深约8 cm,每只大鼠一次性注入TNBS/乙醇混合溶液(按100 mg/kg的量计算TNBS加上等体积的无水乙醇)。第4天观察造模效果,造模成功后,第5天,各组分别给予不同的处理方法:B组给予生理盐水1 mL灌肠;C组给予5-ASA溶液(200 mg/kg)1 mL灌肠;此后每天于同一时间段给药1次,于治疗7 d后在全麻下取材。

1.2.2 观察指标及检测方法:(1)大鼠的一般情况:每天在给予处理前观察大鼠精神状态、毛发光泽、活动状态等变化并记录体质量变化、大便性状和便血情况(大便潜血试纸检测)。对后三项指标进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。DAI = (体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。(2)大鼠结肠组织大体损伤评分和组织学损伤评分:各组大鼠均在第12天全麻下取远端结肠约12 cm,沿纵轴剪开肠管并用冰盐水冲洗干净后,参考文献[4]进行局部结肠大体损伤评分。此后,取病变段结肠标本经40 g/L甲醛固定、石蜡包埋后切片进行HE染色,光镜下观察炎症浸润情况,并采用Fedorak积分标准进行组织学损伤评分<sup>[5]</sup>。(3)大鼠血清IL-8浓度检测:第12天各组大鼠全麻下心脏取血,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清IL-8浓度。具体方法及操作步骤按试剂盒说明书进行,根据测得标

## ■相关报道

Brannigan *et al* 通过比较IBD患者与癌症患者肠系膜静脉血中性粒细胞凋亡,发现IBD患者静脉血中性粒细胞凋亡明显受到抑制,同时发现IBD患者血清IL-8水平显著增高,而pro-caspase 3表达水平显著降低;Leuenroth *et al* 通过中性粒细胞的体外培养方法,发现IL-8能抑制中性粒细胞凋亡,并认为可能是通过影响Fas/FasL途径。



表 1 治疗组与各对照组大鼠一般状况比较 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	体质量增加比(%)	食量增加比(%)	DAI	大体评分	组织学评分
A组	13.39 $\pm$ 3.482 <sup>e</sup>	11.24	0.27 $\pm$ 0.346 <sup>f</sup>	0.50 $\pm$ 0.527 <sup>e</sup>	0.44 $\pm$ 0.458 <sup>e</sup>
B组	-7.42 $\pm$ 1.263 <sup>b</sup>	-54.84	2.74 $\pm$ 0.437 <sup>b</sup>	5.10 $\pm$ 1.101 <sup>b</sup>	4.70 $\pm$ 0.949 <sup>b</sup>
C组	5.60 $\pm$ 1.216 <sup>c</sup>	5.32	1.34 $\pm$ 0.385 <sup>d</sup>	1.70 $\pm$ 0.483 <sup>d</sup>	1.50 $\pm$ 0.850 <sup>d</sup>

体质量变化 = 第12天大鼠体质量-第1天大鼠体质量/第1天大鼠体质量; 食量变化 = 第12天每组大鼠平均食量-第1天每组大鼠平均食量/第1天每组大鼠平均食量; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs B组; <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs C组.

表 2 各组大鼠血清IL-8浓度及PMN凋亡率结果 (mean  $\pm$  SD)

分组	IL-8(ng/L)	PMN凋亡率(%)
A组	129.88 $\pm$ 18.399 <sup>b</sup>	56.13 $\pm$ 5.188 <sup>e</sup>
B组	720.97 $\pm$ 71.718 <sup>b</sup>	30.54 $\pm$ 4.036 <sup>f</sup>
C组	392.84 $\pm$ 43.628 <sup>d</sup>	48.89 $\pm$ 4.522 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs B组; <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs C组.

准品的A值及对应浓度结果绘制出标准曲线, 根据标准曲线估算出样本中IL-8的浓度. (4)大鼠血PMN提取、纯化与培养: 第12天各组大鼠在全麻下心脏取血约3 mL, 肝素抗凝, 参考文献[6-7]采用密度梯度离心法分离出PMN, 经台盼蓝染色法检测PMN活力>98%、瑞氏染色法检测PMN纯度>95%后悬于含100 mL/L胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 并调整细胞浓度为 $1 \times 10^6$ /L, 置于50 mL/L CO<sub>2</sub>浓度、37℃培养箱中培养24 h. (5)大鼠血PMN凋亡的检测: 取培养24 h后的PMN, 用PH为7.2的PBS洗涤两次, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6$ /L, 按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色后上流式细胞仪进行凋亡检测.

**统计学处理** 计量资料以mean  $\pm$  SD表示, 使用SPSS13.0统计软件进行统计分析, 采用方差分析法判断资料的同质性, 两组间比较采用 $t$ 检验, 两变量之间的相关关系采用Spearman相关分析, 两变量之间的回归曲线关系采用曲线估计分析,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 大鼠造模后的一般状况** 大鼠经TNBS灌肠苏醒后, 都明显出现食量下降, 稀便(其中尚有7只(B组3只, C组4只)大鼠出现黏液血便)等消化系症状以及毛发无光泽、精神萎靡、体质量下降等全身改变. 经5-ASA治疗后的大鼠上述表现逐渐好

转, 处死前治疗组大鼠已无稀便及血便, 精神明显好转, 食量和体质量明显增加, DAI评分明显下降(表1).

**2.2 结肠大体形态损伤** B组大鼠结肠炎症病变主要靠近肛门段结肠, 病变黏膜弥漫性充血、水肿、脆性增加, 糜烂和溃疡形成, 局部肠壁增厚, 肠腔狭窄, 部分大鼠的结肠与周围组织粘连, 甚至有腹水形成. 经过5-ASA治疗后的大鼠结肠局部病变明显好转, 大部分仅表现为局部肠壁黏膜充血、增厚或瘢痕形成, 少部分尚有局部点状糜烂、浅溃疡. B组结肠大体损伤评分明显高于A组( $P < 0.01$ ,  $t = 11.92$ ), C组则明显低于B组( $P < 0.01$ ,  $t = 8.95$ , 表1).

**2.3 结肠组织学损伤** TNBS/乙醇造模后, 组织学检查病变主要位于黏膜及黏膜下层, 以PMN浸润为主, 亦可见数量不等的巨噬细胞和嗜酸性粒细胞, 黏膜糜烂及溃疡形成, 且病变部位腺体排列紊乱. 经过5-ASA治疗后, 糜烂及溃疡灶被肉芽组织及新生的腺上皮组织取代, 局部纤维组织增生, 尚有散在炎性细胞, 以单核细胞及巨噬细胞为主(图1). B组大鼠组织学损伤评分显著高于A组大鼠( $P < 0.01$ ,  $t = 12.79$ ), 而C组组织学损伤评分较B组显著降低( $P < 0.01$ ,  $t = 7.95$ , 表1).

**2.4 血清IL-8浓度** 先通过标准品绘制出标准曲线, 通过标准曲线计算出各组样本中IL-8的平均浓度, 经统计分析发现: B组血清IL-8的浓度明显高于A组( $P < 0.01$ ,  $t = 25.25$ ), 而C组血清IL-8的浓度明显低于B组, 差异极具显著性( $P < 0.01$ ,  $t = 12.36$ , 表2).

**2.5 血PMN凋亡率** B组血PMN凋亡率明显低于A组( $P < 0.01$ ,  $t = 12.31$ ), C组凋亡率明显高于B组, 差异极具显著性( $P < 0.01$ ,  $t = 9.57$ ), 但较A组低( $P < 0.01$ ,  $t = 3.33$ , 表2).

**2.6 血清IL-8浓度与血PMN凋亡率的相关及回归关系** 把测得的各大鼠的血清IL-8浓度及其对应的血PMN凋亡率输入SPSS13.0统计软

### ■创新盘点

本次研究发现5-ASA能够降低中性粒细胞趋化、活化因子IL-8水平, 能够诱导中性粒细胞凋亡, 从而为5-ASA治疗IBD提供一种可能机制.

# ■名词解释

疾病活动指数 (DAI): 结合患者 (患病动物) 的体质量下降百分率 (体质量不变为0, 1-5为1分, 5-10为2分, 10-15为3分, 大于15为4分)、大便黏稠度 (正常为0, 松散的大便为2分, 腹泻为4分) 和大便出血 (正常0分, 隐血阳性为2分, 显性出血为4分) 3种情况进行综合评分, 将3项结果的总分除以3即得到DAI值. 即  $DAI = (\text{体质量指数} + \text{大便形状} + \text{出血情况}) / 3$ .

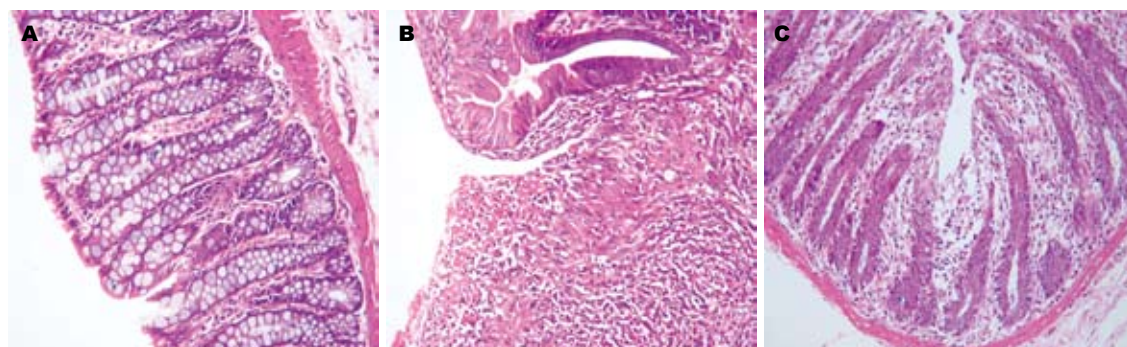


图1 各组大鼠结肠组织镜下观(HE, ×200). A: 正常对照组, 正常肠黏膜形态完整、层次清楚、腺体排列整齐; B: 生理盐水对照组, 结肠炎大鼠肠黏膜上皮破坏形成局部糜烂甚至溃疡、腺体破坏甚至消失、大量炎性细胞浸润甚至形成局部脓肿; C: 5-ASA治疗组, 经过5-ASA 7 d灌肠治疗后大鼠肠黏膜及腺体逐渐被修复、炎性细胞浸润减少, 但仍有散在炎症细胞浸润.

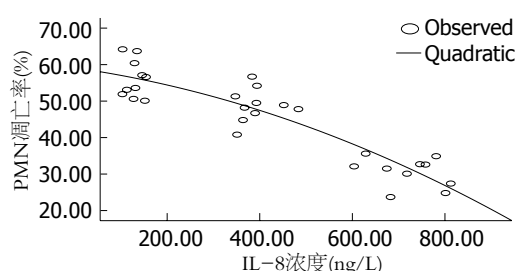


图2 血PMN凋亡率与血清IL-8浓度的曲线关系. 回归方程为  $y = (59.134 - 0.18x - 3 \times 10^{-5}x^2) \times 100$  ( $R^2 = 0.827$ ).

件, 进行Spearman相关分析及曲线估计分析得: Spearman相关系数 = -0.833 ( $P < 0.01$ ), 即两者呈高度负相关; 曲线估计分析得回归方程为  $y = (59.134 - 0.18x - 3 \times 10^{-5}x^2) \times 100$  ( $R^2 = 0.827$ , 图2).

## 3 讨论

本次实验采用TNBS/乙醇制作IBD大鼠模型, 大鼠造模后的一般表现、结肠大体形态、组织学变化均与人类炎症性肠病的特点相似. C组大鼠经7 d的5-ASA灌肠治疗后症状和体征均有明显好转, 且各项指标(食量变化、体质量变化、表观形态评分、DIA评分、组织学评分)均与生理盐水对照组有显著性好转, 再次证明5-ASA对结肠炎有明显的治疗作用, 而本次研究结果出现5-ASA治疗组上述各种指标与正常对照组有统计学差异, 分析其原因可能是我们此次研究选用的治疗时间太短(仅7 d), 经治疗后病变并没有痊愈所致.

IBD的发病机制迄今还不明确, 目前较多学者趋向于认为IBD的发病机制是由多种因素相互作用, 导致体内免疫系统失调, 细胞因子网络平衡破坏, 大量炎症细胞活化并向炎症部位趋化募集, 释放多种炎症因子, 而引起肠组织的炎

症反应<sup>[8-9]</sup>. 因此, 近年来各种细胞因子、炎症细胞在IBD的发病及治疗中的作用备受关注.

IL-8是一种促炎细胞因子, 主要由单核细胞、内皮细胞、表皮细胞以及T淋巴细胞在IL-1、TNF- $\alpha$ 和外源性因子脂多糖的刺激下产生. IL-8又是一种很强的PMN趋化因子, 且能促进PMN的溶酶体酶活性和吞噬作用, 他在PMN介导的组织损伤中起重要作用. 许多研究发现IL-8在IBD的发病及治疗中起着十分重要的作用: Matsuda *et al*<sup>[10]</sup>通过实时定量PCR分析发现活动期UC患者肠组织中浸润的IL-8 mRNA表达明显增加; Daig *et al*<sup>[11]</sup>发现IBD患者肠黏膜中IL-8升高的程度与局部炎症程度相一致, 这种关系尤其见于有大量PMN浸润形成隐窝脓肿的患者; Braunstein *et al*<sup>[12]</sup>通过动物实验发现抗IL-8抗体对IBD具有明显的治疗作用. 本研究也发现结肠炎模型组大鼠血清IL-8浓度显著高于正常对照组, 这与上述研究结果相一致, 同时发现5-ASA治疗组大鼠血清IL-8水平显著低于模型组, 这说明5-ASA能下调结肠炎大鼠血清IL-8水平.

PMN是机体免疫防御系统中的一类重要细胞, 他在血液的非特异性细胞免疫系统中起着十分重要的作用, 他处于机体抵御病原体入侵的第一线, 然而他又是一类主要的急性期炎症细胞, 能产生多种炎症介质, 如前列腺素、白三烯、血栓素、活性氧等介导和放大炎症反应, 且当其解体时能释出溶酶体酶而溶解周围正常组织, 从而引起组织损伤<sup>[13-14]</sup>. 而当PMN凋亡后被巨噬细胞吞噬、清除, 这样不但能使PMN不释放炎症介质及溶酶体酶, 而且也缩短了PMN介导炎症反应的时间. 大量研究表明: IBD急性期肠固有膜内有大量PMN浸润, PMN在IBD的发生发展中起着重要作用<sup>[11]</sup>, 且有众多研究报

道IBD患者血PMN凋亡延迟, PMN凋亡延迟可能是IBD肠组织损伤的重要机制之一<sup>[15-16]</sup>. 因此促进PMN凋亡能减轻炎症反应强度和持续时间, 从而达到治疗IBD的目的. 近年来众多研究发现5-ASA对免疫和炎症瀑布过程中的多数环节均有作用. 目前关于5-ASA对免疫细胞的影响方面的研究主要集中于淋巴细胞, 而5-ASA对PMN有无影响尚不清楚. 本研究通过动物实验发现结肠炎模型组大鼠血PMN凋亡率比正常对照组显著降低( $P<0.01$ ), 而5-ASA治疗组大鼠凋亡率显著高于结肠炎模型组( $P<0.01$ ), 此结果再次验证了“IBD存在血PMN凋亡延迟或减少”, 同时证明5-ASA能上调结肠炎大鼠血PMN凋亡率, 从而减轻炎症反应和黏膜损伤.

PMN凋亡受抑制的具体机制尚不明确, 诸多研究认为可能与多种炎性因子表达失调有关<sup>[17-18]</sup>, 尤其与IL-8的关系受到许多学者的关注. Dunican *et al*<sup>[19]</sup>通过细胞培养技术发现TNF- $\alpha$ 诱导的PMN凋亡延迟是通过IL-8介导的; Leuenroth *et al*<sup>[20]</sup>进一步发现IL-8可能通过抑制Fas-FasL的结合而发挥抑制PMN凋亡的作用. 而本次实验也发现血清IL-8水平与血PMN凋亡率呈高度负相关( $r = -0.883$ ), 且呈一定的曲线关系, 此结果与文献报道相符, 据此我们推测5-ASA可能通过影响IL-8的表达而影响PMN凋亡. 而IL-8具体通过何种途径抑制血PMN凋亡尚有待进一步研究.

总之, 通过本次研究我们可以推测5-ASA治疗IBD的可能机制为: 一方面能下调IBD患者血及局部肠组织IL-8水平, 从而减少局部PMN浸润和激活, 解除IL-8对PMN凋亡的抑制作用, 从而减轻局部炎症反应强度; 另一方面又可能通过各种其他信号途径直接促进IBD患者血PMN凋亡, 从而减少活化PMN数量, 减少PMN释放炎性介质, 从而达到消除炎症减少肠组织损伤的目的.

#### 4 参考文献

- 1 Packey CD, Sartor RB. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med* 2008; 263: 597-606
- 2 Tirosh O, Levy E, Reifen R. High selenium diet protects against TNBS-induced acute inflammation, mitochondrial dysfunction, and secondary necrosis in rat colon. *Nutrition* 2007; 23: 878-886
- 3 Giriş M, Depboylu B, Doğru-Abbasoğlu S, Erbil Y, Olgaç V, Aliş H, Aykaç-Toker G, Uysal M. Effect of taurine on oxidative stress and apoptosis-related

protein expression in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2008; 152: 102-110

- 4 Luk HH, Ko JK, Fung HS, Cho CH. Delineation of the protective action of zinc sulfate on ulcerative colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 443: 197-204
- 5 Fedorak RN, Empey LR, MacArthur C, Jewell LD. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 615-625
- 6 叶正龙, 徐巧莲, 邱海波. 中性粒细胞凋亡在大鼠急性肺损伤发病机制中的意义. *中国急救医学* 2005; 25: 503-505
- 7 冯英凯, 徐剑斌, 钱桂生, 刘友生. 高迁移率族蛋白1对毒素急性肺损伤大鼠中性粒细胞凋亡改变的影响. *免疫学杂志* 2006; 22: 410-415
- 8 Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4280-4288
- 9 Claesson MH, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S, Doria A, Zampieri S. Interactions between infections and immune-inflammatory cells in type 1 diabetes mellitus and inflammatory bowel diseases: evidences from animal models. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26: S8-S11
- 10 Matsuda R, Koide T, Tokoro C, Yamamoto T, Godai T, Morohashi T, Fujita Y, Takahashi D, Kawana I, Suzuki S, Umemura S. Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 328-334
- 11 Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 216-222
- 12 Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schürmann G, Meuer S. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 1997; 41: 215-220
- 13 Bredeştean O, Ciochină AD, Mungiu OC. [The neutrophil in human pathology] *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2007; 111: 446-453
- 14 Kantarci A, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated host response to *Porphyromonas gingivalis*. *J Int Acad Periodontol* 2002; 4: 119-125
- 15 Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000; 13: 361-366
- 16 Ina K, Kusugami K, Hosokawa T, Imada A, Shimizu T, Yamaguchi T, Ohsuga M, Kyokane K, Sakai T, Nishio Y, Yokoyama Y, Ando T. Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 46-53
- 17 Cross A, Moots RJ, Edwards SW. The dual effects of TNF $\alpha$  on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bcl-1. *Blood* 2008; 111: 878-884
- 18 McNamee JP, Bellier PV, Kutzner BC, Wilkins RC. Effect of pro-inflammatory cytokines on spontaneous apoptosis in leukocyte sub-sets within a whole blood culture. *Cytokine* 2005; 31: 161-167
- 19 Dunican AL, Leuenroth SJ, Grutkoski P, Ayala A, Simms HH. TNF $\alpha$ -induced suppression of

#### ■同行评价

本文设计严密, 科学性较强, 具有一定的实用价值.

PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock* 2000; 14: 284-288; discussion 288-289

20 Leuenroth S, Lee C, Grutkoski P, Keeping H,

Simms HH. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions. *Surgery* 1998; 124: 409-417

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心率先失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.



# Livin、Smac/DIABLO和PTEN在胃癌组织中的表达及其与胃癌的相关性

赵毅, 邓鑫, 王强

赵毅, 邓鑫, 王强, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110004

赵毅, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤的诊治工作.

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 2008225008

沈阳市自然科学基金资助项目, No. 080411

作者贡献分布: 赵毅与邓鑫对此文所作贡献均等; 课题设计, 研究过程及数据分析由赵毅与邓鑫完成; 本论文写作由赵毅、邓鑫及王强共同完成.

通讯作者: 赵毅, 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胃肠外科. zhaozhaoyi@hotmail.com  
电话: 024-83956636

收稿日期: 2008-10-22 修回日期: 2009-04-03

接受日期: 2009-04-08 在线出版日期: 2009-05-08

## Expression of Livin, Smac/DIABLO and PTEN and their relationships with human gastric adenocarcinoma

Yi Zhao, Xin Deng, Qiang Wang

Yi Zhao, Xin Deng, Qiang Wang, Department of Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2008225008; the Natural Science Foundation of Shenyang City, No. 080411

Correspondence to: Yi Zhao, Department of Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhaozhaoyi@hotmail.com

Received: 2008-10-22 Revised: 2009-04-03

Accepted: 2009-04-08 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the regulating role and significance of protein Livin, mitochondrial apoptosis-promoting protein Smac/DIABLO and PTEN in carcinogenesis and progression mechanism.

**METHODS:** Real-time RT PCR was used to examine the expression of Livin mRNA and Smac/DIABLO mRNA in 75 gastric carcinoma specimens, 20 normal gastric tissues and 20 adjacent tissues. The expression and location of Livin, Smac/DIABLO and PTEN were detected using Western blot combined with immunohistochemistry (SP).

**RESULTS:** The expression of Livin mRNA was significantly up-regulated in gastric carcinoma specimens ( $6.374 \pm 4.759$ ), however, no expression was found in normal or adjacent tissues. There was a significance in expression between low differentiated carcinoma group and lymph node metastases group ( $\chi^2 = 9.60, 5.51, P < 0.01$  or  $0.05$ ). The expression of Livin mRNA had no correlation with tumor size, invasion of nerve or TNM stage. The expression of Smac/DIABLO mRNA was lower in gastric cancer tissues than in normal gastric tissues and adjacent tissues, but there was no significant difference ( $0.731 \pm 0.420$  vs  $1.104 \pm 0.276, 1.061 \pm 0.737$ , all  $P > 0.05$ ). The expression of Smac/DIABLO mRNA in gastric cancer tissues had no correlation with clinical pathological factors of gastric carcinoma. The expression of Smac/DIABLO held significant difference from intestinal-type gastric carcinoma to diffuse-type gastric carcinoma ( $\chi^2 = 5.06, P < 0.05$ ). The expression of PTEN was not determined in gastric carcinoma tissues and normal tissues.

**CONCLUSION:** There is a diversity of expression of Livin, Smac/DIABLO and PTEN in different stages and pathological types of gastric carcinoma. Real-time RT PCR and the expression of Livin and Smac/DIABLO could be beneficial to diagnosis of gastric carcinogenesis, severity of differentiation, and chemotherapy sensitivity.

**Key Words:** Inhibitor of apoptosis protein; Gastric carcinomas; Smac/DIABLO; Livin; Western blot

Zhao Y, Deng X, Wang Q. Expression of Livin, Smac/DIABLO and PTEN and their relationships with human gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1303-1311

## 摘要

**目的:** 探讨凋亡抑制蛋白Livin及线粒体促凋亡蛋白Smac/DIABLO和PTEN在胃癌发生发

## ■背景资料

Livin在黑色素瘤、白血病、肺癌、膀胱癌、消化系统肿瘤等许多恶性肿瘤中高表达, 该基因可能在肿瘤的发生发展中起重要的作用, 而Smac在不同癌组织中表达不同, Smac高表达可增强癌细胞对各种凋亡刺激的敏感性. 胃癌中是否存在Smac介导的对抗Livin抑制细胞凋亡作用的负性调节机制尚未得到明确的研究结论.

## ■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 关玉盘, 教授, 首都医科大学附属朝阳医院消化科

## ■研究前沿

细胞凋亡调节紊乱是细胞恶性转化及肿瘤进展的关键因素之一。研究肿瘤细胞凋亡的分子调控机制,阐明凋亡信号通路及其相关调控因子的相互作用成为目前的研究焦点。

展分子机制中的调控作用及意义。

**方法:** 实时荧光定量PCR检测75例手术切除胃癌患者组织, 20例癌旁组织及20例正常胃组织中Livin mRNA和Smac/DIABLO mRNA的表达, Western blot结合免疫组织化学法检测两者与PTEN蛋白的表达及组织学定位。

**结果:** 正常胃组织及癌旁组织中均无Livin mRNA表达, 胃癌组织中Livin mRNA相对表达量显著上调( $6.374 \pm 4.759$ ), 其表达在低分化胃癌组及淋巴结转移组具有显著差异( $\chi^2 = 9.60, 5.51, P < 0.01$ 或 $0.05$ ), 与肿瘤大小, 浸润程度及TNM分期等病理表现无关; Smac/DIABLO mRNA胃癌组织中的表达水平低于正常胃组织及癌旁组织, 但差异无显著性( $0.731 \pm 0.420$  vs  $1.104 \pm 0.276, 1.061 \pm 0.737$ , 均 $P > 0.05$ ), Smac/DIABLO mRNA的表达水平与胃癌各临床病理因素无关; 其蛋白表达量与Smac/DIABLO mRNA的表达水平存在差异。Smac/DIABLO在肠型胃癌与弥漫型胃癌中的表达有显著差异( $\chi^2 = 5.06, P < 0.05$ )。正常胃黏膜及胃癌组织中未检出PTEN蛋白表达。

**结论:** Livin、Smac/DIABLO及PTEN的表达水平在不同阶段及病理类型的胃癌中存在差异。实时荧光定量PCR检测Livin及Smac/DIABLO的表达量, 有可能为判断胃癌的发生, 分化程度及预测化疗敏感性提供新的指标。

**关键词:** 凋亡抑制蛋白; 胃癌; Smac/DIABLO; Livin; 蛋白免疫印迹法

赵毅, 邓鑫, 王强. Livin、Smac/DIABLO和PTEN在胃癌组织中的表达及其与胃癌的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1303-1311

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1303.asp>

## 0 引言

细胞凋亡与增殖失衡是导致肿瘤发生和进展的病理基础<sup>[1-3]</sup>, 从分子水平探寻凋亡相关基因的表达变化是目前胃癌研究中的热点。Livin是新近发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员<sup>[4]</sup>, 通过BIR区与caspase-3, 7, 9结合并抑制其活性, 从而抑制细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。Smac/DIABLO(second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI)是目前发现的唯一存在于哺乳动物细胞中直接抑制

IAPs的蛋白, 具有促进细胞凋亡的功能<sup>[7]</sup>。第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡等机制发挥抑制肿瘤的发生发展的作用。最近的研究表明, 凋亡抑制蛋白Livin和线粒体促凋亡蛋白Smac/DIABLO之间存在着相互拮抗、相互调节的关系, 两者复杂的作用机制是肿瘤凋亡信号转导网络中的重要环节。本研究分别从分子水平及蛋白水平检测三者在胃癌组织中的表达, 探讨其表达变化与肿瘤发生发展及临床病理因素之间的关系, 为胃癌的分子诊断、分型及预后转归等研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 中国医科大学附属第二医院普通外科2006-07/2008-07手术切除胃癌标本75例, 所有病例术前均未经放化疗, 术后均经病理证实, 且临床资料完整。年龄32-78岁, 中位年龄63岁; 男48例, 女27例; 高分化4例, 中分化9例, 低分化62例; 有局部淋巴结转移53例, 无转移22例; I期11例, II期18例, III期26例, IV期20例。胃溃疡或十二指肠溃疡患者胃黏膜20例作为正常对照(排除重度不典型增生)。20例癌旁组织为取自距胃癌组织边缘5 cm以上的胃黏膜组织, 病理证实无肿瘤细胞浸润、无明显炎症且无明显细胞增生等病变。肿瘤的分期分级根据世界卫生组织及国际癌症防治联合会制定的标准进行划分。主要试剂及仪器: 鼠抗人Smac/DIABLO/Diablo mAb、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及兔抗鼠二抗均购自Cell Signaling Technology公司(USA); 兔抗人Livin多克隆抗体BA1743购自武汉博士德生物公司, 兔抗人Actin多克隆抗体购自Santa Cruz公司(USA); 鼠抗人Livin mAb购自Alexsis公司(USA); 鼠抗人PTEN mAb购自北京中山生物技术有限公司, 工作浓度1:75; PVDF膜购自Roch公司(USA); 免疫组化SP试剂盒购自福州迈欣生物技术公司; UVP凝胶成像分析系统购自Upland公司(USA); ABI PRISM 7500荧光定量PCR扩增仪购自Applied Biosystems公司(USA); Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG(#11733-046)、Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymerase(#10966-083)均购自Invitrogen公司(USA); 核酸蛋白分析仪DU-800购自Backman

公司(USA); 逆转录试剂购自Promega公司(USA).

## 1.2 方法

1.2.1 RNA提取及纯度测定: 取100 mg待检测的组织, 应用TRIzol Reagent(Invitrogen, USA), 参照说明书提供的方法抽提总RNA, 核酸蛋白分析仪测定其纯度,  $A_{260}/A_{280}$ 值为1.8-2.0, 达到反转录要求. 计算样品总RNA浓度, 置于-80℃保存备用.

1.2.2 cDNA的合成: 逆转录反应体系包括细胞总RNA 4  $\mu$ L(0.5 g/L), 1 U/ $\mu$ L Rnasin 1  $\mu$ L, 0.5 g/L随机引物2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 5 $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, 200 U/L M-MLV 1  $\mu$ L, DEPC水补足至25  $\mu$ L. 逆转录反应条件: 42℃, 60 min; 95℃, 10 min; 4℃, 2 min后终止反应. 产物cDNA于-80℃冻存.

1.2.3 实时定量RT-PCR检测Livin及Smac/DIABLO基因的表达: 应用ABI 7500 RQ-PCR仪检测Livin mRNA及Smac/DIABLO mRNA的相对表达量, 引物根据GenBank Livin $\alpha/\beta$ (NM\_022161, NM\_139317)及Smac/DIABLO(NM\_019887)基因序列应用Primer 5.0(Applied Biosystems)软件设计, 美国Applied Biosystems公司合成. 选取 $\beta$ -actin(AK225414)作为内参. Livin $\alpha/\beta$ : 上游引物: 5'-TCCACAG TGTGCAGGAGACT-3'; 下游引物: 5'-ACGGC ACAAAGACGATGGAC-3'; 扩增产物为两种片段: Livin $\alpha$ : 312 bp, Livin $\beta$ : 258 bp; Smac/DIABLO: 上游引物: 5'-TGT GAC GAT TGG CTT TGG AGT AAC-3'; 下游引物: 5'-TTC AAT CAA CGC ATA TGT GGT CTG-3'; 扩增产物片段: 425 bp,  $\beta$ -actin: 上游引物: 5'-GAGACCTT CAACACCCAGCC-3'; 下游引物: 5'-GGAGT ACAGGTCTTTGCGGATG-3'; 扩增产物片段: 512 bp.

25  $\mu$ L PCR反应体系中需加入10  $\mu$ L cDNA模版, 引物各1  $\mu$ mol, 10 $\times$  Buffer 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ L PCR反应液(Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG)包括1.5 U Platinum Taq DNA polymerase, 20 mmol Tris-HCl(pH 8.4), 50 mmol KCl, 3 mmol MgCl<sub>2</sub>, dGTP、dATP、dCTP和dUTP各200  $\mu$ mol以及1 U uracil-DNA-glycosylase(UDG). 反应条件: 50℃ 2 min(预热UDG), 95℃ 2 min(灭活UDG, 激活DNA聚合酶); 95℃ 15 s, 退火61℃ 30 s, 50个循环, 延伸72℃ 10 s.

将胃癌组织及正常胃组织的cDNA按1:10、

1:100、1:1000、1:10000稀释, 分别构建Livin, Smac/DIABLO及 $\beta$ -actin的标准品及每次扩增的标准曲线. 每次检测均设立空白阴性对照(NTC), 每个样本设3个复管. 巢式RT-PCR对荧光定量PCR的产物进行验证.

1.2.4 Western blot法检测蛋白在肿瘤组织和正常组织中表达的差异: 将100 mg组织提取的总蛋白用考马斯亮蓝试剂盒定量. 取50  $\mu$ g蛋白上样到150 g/L SDS-PAGE凝胶, 电泳. 将凝胶上的蛋白电转移至NC膜, 以50 g/L脱脂奶粉4℃封闭过夜, 分别加一抗(鼠抗人Livin mAb 1:250, 兔抗人Smac/DIABLO多克隆抗体, 兔抗人Actin多克隆抗1:200), 37℃孵育2 h, 0.1% TBST液漂洗PVDF膜3 $\times$ 10 min, 取出PVDF膜加入二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗1:5000, 羊抗兔二抗1:5000), 37℃孵育2 h, TBST洗膜后加入ECL试剂, 曝光, 显影, 定影, 对X光底片拍照保存.

1.2.5 免疫组化SP法检测蛋白表达: 所有组织标本经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m厚切片. 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)95℃抗原修复10 min, 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加非免疫性动物血清室温孵育15 min, 加一抗(兔抗人Livin多克隆抗体抗体浓度为1:50, 鼠抗人Smac/DIABLO抗体1:200, 鼠抗人PTEN mAb 1:75)4℃孵育过夜; PBS冲洗后滴加生物素标记二抗37℃孵育10 min, 辣根过氧化物酶标记抗生物素三抗37℃孵育15 min, PBS冲洗后DAB显色, 冲洗, 苏木素复染, 透明封固. 封片, 显微镜观察并拍照. 以已知的阳性切片作阳性对照(Livin以人乳腺癌, Smac/DIABLO和PTEN以人胃腺癌为阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照).

Livin和Smac/DIABLO蛋白阳性细胞主要为胞质着色, 呈棕黄色颗粒, 胞核偶见着色. PTEN在胞核染色, 呈棕黄色颗粒. 将染色强度和阳性细胞数结合判断Livin、Smac/DIABLO和PTEN染色结果. 每张切片随机选取10个高倍视野, 每个高倍视野计数100个癌细胞, 观察阳性细胞染色强度, 计数阳性细胞百分比. 先按染色强度打分: 与背景颜色相对比, 无色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 再按阳性细胞所占的百分比记分, 阳性细胞<5%为0分, 5%-25%为1分, 26%-50%为2分, >50%为3分. 两者之和是0分为阴性(-), 1-2分

## ■ 相关报道

凋亡抑制蛋白家族IAPs的新成员Livin在凋亡信号转导通路中发挥抑制作用, 而Smac是目前发现的唯一存在于哺乳动物细胞中直接抑制IAPs的蛋白, 可以与多种IAPs分子结合. 最近研究表明Livin和Smac之间存在复杂的相互关系.

### ■创新盘点

本研究从分子和蛋白水平检测Livin及Smac在胃癌中的表达,对两者间的相互关系及其与胃癌各临床病理特征的相关性进行探讨,初步阐明两者在胃癌发生发展过程中的作用及意义。

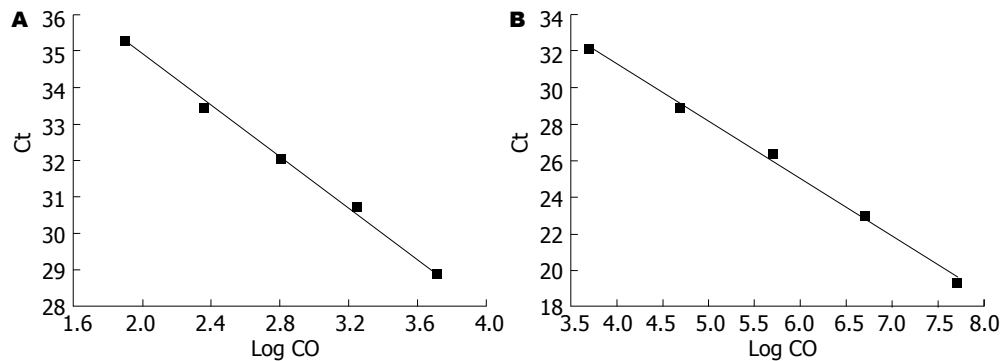


图1 Livin及Smac/DIABLO特异性扩增标准曲线. A: Livin; B: Smac/DIABLO.

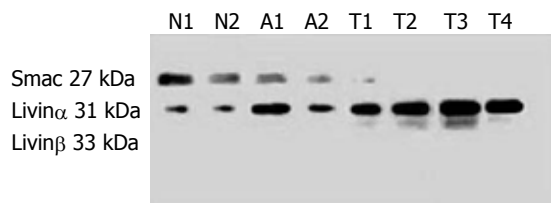


图2 Western blot检测Livin和Smac/DIABLO蛋白的表达. N: 正常胃组织; A: 癌旁组织; T: 胃癌组织.

为弱阳性(+), 3-4分为阳性(++), 5-6分为强阳性(+++).

**统计学处理** 有关数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, SPSS13.0统计软件进行数据分析. 两个样本率的比较采用 $\chi^2$ 检验、Fisher精确概率检验; 采用Spearman等级相关分析两变量之间相关关系. 两样本均数比较采用 $t$ 检验.  $P < 0.05$ 定为具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 荧光定量PCR扩增结果** 荧光定量PCR的标准曲线图中, 标准品cDNA的起始浓度的对数值与Ct值成一直线, Livin、Smac/DIABLO及 $\beta$ -actin的标准曲线斜率slope分别为-3.5398、-3.0459及-3.1378; 纵截距b为42.002、43.822及39.924; 相关系数 $r$ 可达0.9999、0.9959及0.9964, 线性关系良好(图1). Livin及Smac/DIABLO特异性扩增产物分别对应温度( $81.7 \pm 0.16$ ) $^{\circ}\text{C}$ 及( $82.1 \pm 0.14$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 溶解曲线单峰集中无杂带, 产物特异性好. RT-PCR结果显示Livin和Smac/DIABLO分别在312 bp、258 bp和425 bp出现明亮清晰条带.

**2.2 胃癌组织中Livin mRNA及Smac/DIABLO mRNA的相对表达量** 75例胃癌组织中有64例表达Livin mRNA, 其相对表达量为 $6.374 \pm 4.759$ , 20例正常组织及20例癌旁组织中均未检出其表达. 75例胃癌组织中有53例胃癌组织检测到Smac/DIABLO mRNA的表达, 且胃癌组织中的

表达水平( $0.731 \pm 0.420$ )低于正常组织( $1.104 \pm 0.276$ )及癌旁组织( $1.061 \pm 0.737$ ), 但差异无显著性( $P > 0.05$ ).

**2.3 Livin及Smac/DIABLO蛋白在胃癌组织中的表达** Western blot检测Livin $\alpha$ 和Livin $\beta$ 蛋白分别出现在31 kDa和33 kDa处出现条带, Smac/DIABLO蛋白出现在26 kDa处(图2). 75例胃癌组织中有59例检出Livin蛋白表达, 其中58例同表达Livin mRNA的胃癌标本相一致, 而Smac/DIABLO蛋白的表达率为49.33%, 与mRNA表达的一致性较差. 免疫组化染色结果显示, 癌旁组织及正常胃组织均无Livin表达, 其阳性染色主要位于胃癌组织的细胞质, 分布弥散而均匀(图3A). Smac/DIABLO在胃癌组织、癌旁组织及正常胃组织中均有表达, 其阳性染色主要于细胞质和少部分细胞核. 各切片显色分布不均, 以弥漫性分布为主, 少数为片状和局灶性(图3B). 胃癌组织无PTEN表达, 其阳性染色主要位于正常及癌旁组织, 分布弥散而均匀(图3C).

**2.4 Livin、Smac/DIABLO在胃癌组织中的表达与临床病理特性的关系** Livin的表达率随着胃癌组织分化程度的降低而增高, 呈显著负相关( $P < 0.01$ ), 而与肿瘤的大小、临床分期及浸润深度无关( $P > 0.05$ ). 伴淋巴转移组Livin的阳性率(92.45%)大于无淋巴转移组(68.19%), 且差异有显著性( $P < 0.05$ ). Smac/DIABLO表达率随胃癌临床分期的提高、肿瘤浸润深度的加深、随着胃癌组织分化程度的减低及伴淋巴结转移的产生而降低, 但并无显著差异( $P > 0.05$ ); 84.38%的肠型胃癌(27/32例)表达Smac/DIABLO, 明显高于其在弥漫型胃癌的表达率(60.65%)(表1).

## 3 讨论

凋亡是由基因控制的细胞自我消亡过程. 目前



认为机体细胞凋亡的调控机制发生紊乱与肿瘤形成关系密切, 是其形成过程中的一个重要机制. 细胞凋亡受多条通路和多种因子的调控, IAPs家族是新近发现的人类内源性抗凋亡蛋白家族, Livin是Ashhab *et al*<sup>[8]</sup>在2000-2001年根据IAP同源序列发现的一种新的细胞凋亡抑制蛋白, 他含有IAP家族成员特有的BIR和RING指结构域, 其转录产物因剪接方式不同形成有Livin $\alpha$  mRNA和Livin $\beta$  mRNA两种亚型. Livin通过直接或间接阻断以凋亡受体及线粒体为基础的外源性途径和内源性途径, 与各种凋亡刺激因子结合发挥抑制细胞凋亡的作用<sup>[9]</sup>.

目前的国内外研究均提示Livin主要表达于恶性肿瘤组织和胎儿组织, 在成人除胎盘外的大多数终末分化组织中不表达或表达下调<sup>[10]</sup>. 作为一种具有表达特异性的凋亡抑制蛋白, Livin在胃癌中研究的相关报道较少. Yagihashi *et al*<sup>[11]</sup>采用RT-PCR的方法检测了胃癌细胞株Livin mRNA高表达, 并采用ELISA的方法及Western blot检测到在17/35例(47%)胃肠道肿瘤患者血清有抗Livin抗体的表达. 本研究结果显示, 75例胃癌组织中Livin阳性率为85.33%, 而癌旁组织和正常胃组织不表达Livin, 与Yagihashi *et al*的结果相似. Livin特异性表达在胃癌中, 而癌旁组织及良性的胃溃疡组织中无表达, 提示其表达与胃癌的发生发展有一定的关系.

Livin与临床病理因素间的关系在各种肿瘤组织中报道有所不同, 有报道Livin在分期较晚者胃癌中比例较高<sup>[12]</sup>, 但整个研究例数偏少. 本研究结果显示Livin在有淋巴结转移、组织分化较差者中阳性率高, 且差异显著. Livin在胃癌组织中的表达与其分化程度具有显著相关性( $P<0.05$ ), 可能是Livin在胃癌发生过程中导致凋亡受抑, 胃癌细胞表现为过度增殖, 提示其在判断胃癌的侵袭性及恶性程度上有一定的意义. 此外, 本研究中肿瘤浸润较深、临床病理分期较晚者Livin阳性率有升高趋势, 但统计学分析没有显著性差异, 不排除与样本量不足有关.

Western blot结果显示在有Livin表达的胃癌组织中, 其表达的强弱也有差异, 推测可能是每例胃癌类型和病理分期不同, 结合转录水平的研究结果, 表明在胃癌中Livin mRNA和蛋白的表达具有较高的一致性, 该基因在mRNA和蛋白水平是相对稳定.

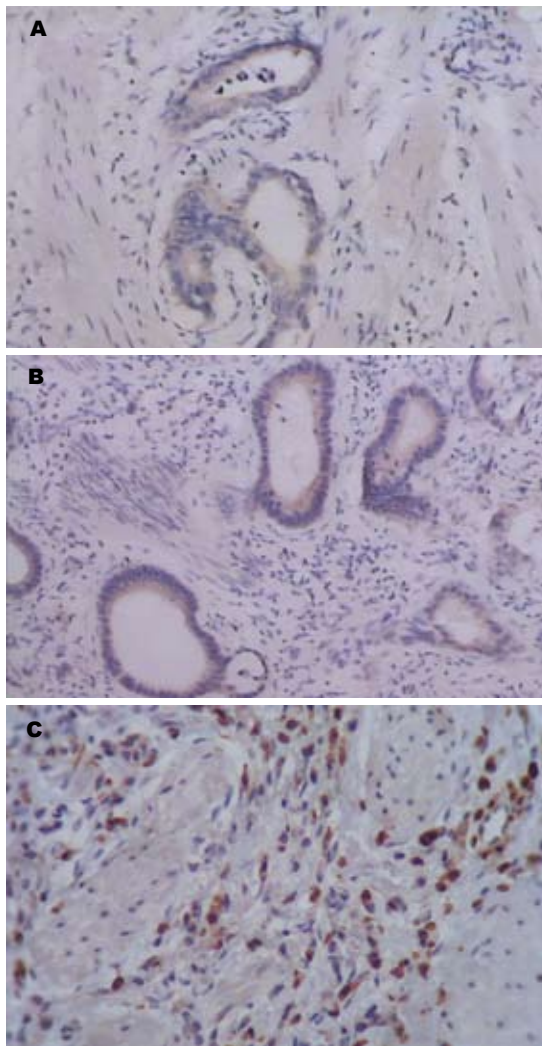


图3 Livin、Smac/DIABLO和PTEN在胃组织中的表达(SP  $\times$  400). A: Livin胃癌组织中; B: Smac/DIABLO胃癌组织中; C: PTEN正常胃组织中.

Livin mRNA和蛋白在正常胃组织、癌旁组织及胃癌组织中表达的一致性提示该基因在胃癌组织中的异常高表达发生于转录以上水平的激活. 最新的研究报道指出<sup>[13]</sup>, Livin在转录水平直接受到 $\beta$ -catenin的调节, 可能是启动Livin基因在肿瘤中的活化的重要原因. Livin可能是通过参与 $\beta$ -catenin/TCF信号转导通路的调节, 在肿瘤发病的分子机制中起着一定的作用.

Livin在细胞内定位尚无定论. 有研究显示转染Livin的HeLa细胞和肺癌细胞在胞质和胞核中同时显色<sup>[14]</sup>. 本研究中Livin阳性显色均位于肿瘤细胞的胞质中, 与Yagihashi *et al*<sup>[15]</sup>在乳腺癌中的研究结果相一致.

胃癌组织中高表达Livin, 其在胃癌中表达具有一定的普遍性, 初步提示Livin可能有助于胃癌的诊断. Livin在胃癌组织中表达增高, 且与

#### ■应用要点

本研究首次应用实时荧光定量PCR、Western blot及免疫组织化学方法, 对凋亡相关调控基因Livin和Smac mRNA及其转录产物所编码的蛋白进行定量检测, 为研究胃癌的分子标志物及其临床检测奠定基础.

## ■名词解释

1 IAP: 一类对凋亡信号具有抑制作用的调控因子。  
2 Smac: IAP的主要对抗物, 有促进凋亡作用。

表 1 Livin及Smac/DIABLO在胃癌组织中的表达与临床病理特性的关系

参数	n	Livin		$\chi^2$ 值	P值	Smac/DIABLO		$\chi^2$ 值	P值
		阳性(n)	阳性率(%)			阳性(n)	阳性率(%)		
年龄									
30-50	14	11	78.57	1.38	>0.05	9	64.29	0.35	>0.05
50-70	46	41	89.13			33	71.74		
≥70	15	12	80.00			11	73.33		
性别									
男	48	42	87.50	0.13	>0.05	35	72.92	0.33	>0.05
女	27	22	81.48			18	66.67		
TNM分期									
I + II	29	24	82.76	0.03	>0.05	22	75.86	0.62	>0.05
III + IV	46	40	86.96			31	67.39		
浸润深度									
T1 T2	35	29	82.86	0.32	>0.05	26	74.29	0.41	>0.05
T3 T4	40	35	87.50						
肿瘤大小(cm)									
≥5	31	27	87.10	0.00	>0.05	23	74.19	0.13	>0.05
<5	44	37	84.09			31	70.45		
分化程度									
高中分化	13	7	53.85	9.60	<0.01	10	76.92	0.04	>0.05
低分化	62	57	91.94			43	69.35		
淋巴结转移									
有	53	49	92.45	5.51	<0.05	36	67.92	0.66	>0.05
无	22	15	68.19			17	77.27		
Lauren's分型									
肠型	32	28	87.50	0.02	>0.05	27	84.38	5.06	0.01<P<0.05
弥散型	43	36	83.72			26	60.65		

组织分化程度和淋巴结转移有关, 提示其在胃癌的发生和发展中具有重要的作用. Livin异常高表达可能与胃癌的发病有密切的关系, 可作为辅助胃癌预后判断的分子标志之一.

Smac/DIABLO是2000-07首次报道的一种促凋亡蛋白. 主要定位于线粒体上<sup>[16]</sup>. Smac/DIABLO在正常细胞不诱发凋亡, 只在受损的细胞中起作用. 成熟Smac/DIABLO在细胞发生凋亡时与细胞色素C一同释放入胞质, 通过逆转IAP的作用而实现其促凋亡作用<sup>[17-18]</sup>. Smac/DIABLO参与并介导许多凋亡事件, 包括死亡受体介导的凋亡和中性粒细胞的自发凋亡<sup>[19]</sup>, 直接与Apaf-1, cyto-c和caspase-9作用, 增强caspase的激活效应. 同时通过与IAP结合, 去除IAPs的抑制作用来促caspase-9的激活<sup>[20]</sup>.

Smac/DIABLO作为促凋亡基因, 目前国内外对其在肿瘤组织中的表达报道各异. Yoo *et al*<sup>[21]</sup>研究发现约62%的癌组织中可见Smac/DIABLO表达, 且不同的癌组织中Smac/DIABLO的表达有差异, 在肾癌<sup>[22-23]</sup>、肝癌<sup>[24]</sup>、

神经母细胞瘤<sup>[25-26]</sup>等实体恶性肿瘤中的研究均显示他表达下调或缺失. 本研究中, 胃癌组织中Smac/DIABLO表达率为70.67%(53/75, 正常胃组织及癌旁组织标本中均可见Smac/DIABLO表达, 与Yoo *et al*研究结果基本一致. 胃癌组织中Smac/DIABLO mRNA的相对表达量低于正常胃组织及癌旁组织, 但不具有显著差异( $P<0.05$ ), 且其表达水平与胃癌各临床病理因素无关. 我们推测Smac/DIABLO在癌组织中表达下降, 可能是因为直接或间接影响Livin的活性, 拮抗其发挥抑制胃癌细胞凋亡的功能, 在胃癌中Smac/DIABLO表达量的多少并不一定能反应恶性程度的高低.

值得一提的是, 本研究中Western blot结果显示细胞内Smac/DIABLO蛋白的表达与其mRNA的表达有显著差异, 一致性较差. Smac属于细胞正常的基因表达, 其mRNA和蛋白的表达量不一致表明其表达强度受到许多外界因素的影响, 可能是转录后存在其他一些调节因素的作用, 例如原癌基因或抑癌基因如

*bcl-2*、*p53*等通过其蛋白与凋亡相关基因启动子、转录后加工修饰或翻译调控区的特定序列结合,影响凋亡相关蛋白的表达,发挥对其下游caspase家族的作用效应<sup>[27]</sup>。故推测在胃癌中,一方面胃癌中异常升高的Livin通过与Smac/DIABLO蛋白结合引起Smac/DIABLO蛋白表达减少,对抗其家族其他成员如XIAP或survivin和Smac/DIABLO之间的相互作用,间接发挥抗凋亡作用<sup>[28]</sup>。另一方面可能存在其他各种抑制因子作用于Smac/DIABLO的翻译或之后的蛋白的水平,使某些细胞没有对mRNA进行有效翻译,或者翻译过程中存在蛋白表达丢失的现象,导致两个表达水平上的调控机制的不平衡。

随着对肿瘤相关基因研究的不断深入,越来越多的抑癌基因被相继发现。PTEN又名TEP1(TGF- $\beta$ -regulated and epithelial cell enriched phosphatase)基因和MMAC1(muted in multiple advanced cancers)基因<sup>[29]</sup>。是1997年由3个实验室分离鉴定并统一命名而确认的新的候选抑癌基因。PTEN基因位于染色体10q23.3,全长200 kb,有9个外显子和8个内含子,PTEN第5外显子编码的122-132位氨基酸序列与酪氨酸磷酸酯酶或丝/苏氨酸、酪氨酸双特异磷酸酯酶催化中心的氨基酸序列高度一致。酪氨酸磷酸酯酶能够拮抗蛋白质酪氨酸激酶的生长刺激作用,PTEN蛋白与酪氨酸磷酸酯酶有相同的功能。PTEN基因与抑癌功能相关的结构域主要是氨基端的磷酸酶结构域、脂质结合C2结构域和羧基端结构域。PTEN的N端辅助蛋白与神经突触小泡的运输有关;张力蛋白为一种细胞骨架蛋白,在细胞聚集黏着时,在锚着点通过黏着斑与肌动蛋白细丝形成复合体,共同参与细胞生长调节,并在肿瘤细胞浸润、血管发生及肿瘤转移中起到一定作用<sup>[30-31]</sup>。PTEN蛋白能与肌动蛋白纤维细丝发生局部黏附,参与细胞的黏附聚集而抑制肿瘤细胞的浸润及转移。本研究结果显示,PTEN蛋白表达于正常胃组织,在胃癌中未观察到其特异表达,推测PTEN基因可能在正常胃组织中发挥抑制肿瘤的作用。

以往研究显示,Livin和Smac/DIABLO基因之间的表达存在相互拮抗的负反馈调节关系<sup>[32]</sup>。本研究结果未显示出两者之间存在某种明确的相关性,可能是因为Livin与Smac/DIABLO相互

作用的同时还直接间接受多种因素如死亡受体、caspase酶、线粒体及其他凋亡抑制蛋白等的影响,参与不同的相关传导通路信号的调节,导致两者在胃癌发生发展的不同阶段和不同病理类型中的表达水平及作用地位存在差异。此外,癌前病变的细胞对细胞凋亡信号刺激是有反应的,细胞增生和凋亡相互间是有联系的,促凋亡基因和凋亡抑制基因在肿瘤发生过程中均可表达上调<sup>[33]</sup>。在对检测结果进行分析时,我们发现Livin与Smac基因相对拷贝数的比值在正常胃组织与胃癌组织之间及胃癌进展过程中成单向上升趋势。胃癌中Livin与Smac基因的表达比具有多大的临床意义,是我们下阶段研究中所要观察和探讨的方向之一。

本研究中Samc在Lauren's分型为肠型(84.38%)和弥漫型胃癌(60.65%)中的表达水平呈现一定差异( $0.01 < P < 0.05$ )。可能是由于肠型胃癌往往伴有*p53*基因的突变<sup>[34]</sup>,突变型*p53*使*bax*表达下调,粒体膜通透性减低,进而导致Samc释放障碍。Samc表达水平在肠型胃癌和弥漫型胃癌中存在差异提示两型胃癌可能在演进过程中对凋亡信号的反应敏感性有所不同,体现了“肿瘤的异质化”。但Samc能否为胃癌的分型提供分子病理学依据,尚需大量进一步深入研究。

胃癌中凋亡抑制基因及促凋亡基因表达产物间的相互抑制,相互调节,组成了复杂的肿瘤抑制及促进网络。应用实时荧光定量PCR对检测凋亡相关基因的表达,可以由较少的细胞数量得到更加可信的结果,敏感性和特异性高,简便易行,使其应用于临床胃癌的早期诊断和预后分析成为可能。Livin特异性高表达于各阶段的胃癌组织,提示其存在贯穿于胃癌的发生发展过程,可能在癌细胞的生长、增殖、凋亡过程中起到广泛的直接或间接促进作用,PTEN在维持细胞正常生长,抑抵制癌因素上发挥一定作用。Smac/DIABLO与Livin相互抑制,两者的表达失调可能是胃癌发生发展过程中的一个重要环节。

#### 4 参考文献

- 1 Feng Y, Tian ZM, Wan MX, Zheng ZB. Low intensity ultrasound-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4873-4879
- 2 Nørsett KG, Laegreid A, Kusnierczyk W, Langaas M, Ylving S, Fossmark R, Myhre S, Falkmer S, Waldum

#### ■同行评价

本研究选题尚可,方法先进,具有一定的科学性和可读性。

- HL, Sandvik AK. Changes in gene expression of gastric mucosa during therapeutic acid inhibition. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 613-623
- 3 Gangar SC, Koul A. Histochemical, ultrastructural, and biochemical evidences for Azadirachta indica-induced apoptosis in benzo(a)pyrene-induced murine forestomach tumors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2008; 27: 219-232
- 4 Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Hariu M, Tamura Y, Aketa K, Nabeta C, Nakanishi K, Kamiguchi K, Mano Y, Kitamura H, Kobayashi J, Tsukahara T, Shijubo N, Sato N. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1000-1009
- 5 Grzybowska-Izydorczyk O, Smolewski P. [The role of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in hematological malignancies] *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2008; 62: 55-63
- 6 Liu B, Han M, Wen JK, Wang L. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment. *Cancer Lett* 2007; 250: 168-176
- 7 Tong QS, Zheng LD, Wang L, Zeng FQ, Chen FM, Dong JH, Lu GC. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 509-514
- 8 Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 2001; 495: 56-60
- 9 Ka H, Hunt JS. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas. *Am J Pathol* 2003; 163: 413-422
- 10 Nachmias B, Mizrahi S, Elmalech M, Lazar I, Ashhab Y, Gazit R, Markel G, Ben-Yehuda D, Mandelboim O. Manipulation of NK cytotoxicity by the IAP family member Livin. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3467-3476
- 11 Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1206-1208
- 12 Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Watanabe N. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46: 299-304
- 13 Yuan D, Liu L, Gu D. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 171-178
- 14 Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, Qiu X, Heese K, Wu M. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Differ* 2006; 13: 2079-2088
- 15 Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 362: 125-130
- 16 Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406: 855-862
- 17 Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL, Silke J. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 2007; 131: 682-693
- 18 Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem* 2005; 137: 125-132
- 19 Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008; 133: 693-703
- 20 Bockbrader KM, Tan M, Sun Y. A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 7381-7388
- 21 Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, Park WS, Park CH, Jeon HM, Jung ES, Lee JY, Lee SH. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS* 2003; 111: 382-388
- 22 Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem* 2007; 282: 30718-30727
- 23 Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Magheli A, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 543-550
- 24 Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 580-583
- 25 Kim DK, Alvarado CS, Abramowsky CR, Gu L, Zhou M, Soe MM, Sullivan K, George B, Schemankewitz E, Findley HW. Expression of inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome. *Pediatr Dev Pathol* 2005; 8: 621-629
- 26 Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q. Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 905-913
- 27 Kempkensteffen C, Jäger T, Bub J, Weikert S, Hinz S, Christoph F, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M. The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 2007; 30: 476-483
- 28 Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother WJ. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* 2005; 385: 11-20
- 29 Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, Pavletich NP, Carver BS, Cordon-Cardo C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chi SG, Kim HJ, Misteli T, Jiang X, Pandolfi PP. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 2007; 128: 141-156
- 30 Wang MY, Lu KV, Zhu S, Dia EQ, Vivanco I,



- Shackelford GM, Caveness WK, Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 7864-7869
- 31 Morimoto AM, Berson AE, Fujii GH, Teng DH, Tavtigian SV, Bookstein R, Steck PA, Bolen JB. Phenotypic analysis of human glioma cells expressing the MMAC1 tumor suppressor phosphatase. *Oncogene* 1999; 18: 1261-1266
- 32 Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 24-30
- 33 Schulze-Bergkamen H, Krammer PH. Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol* 2004; 31: 90-119
- 34 Rugge M, Shiao YH, Busatto G, Cassaro M, Strobbe C, Russo VM, Leo G, Parenti AR, Scapinello A, Arslan P, Egarter-Vigl E. The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Mol Pathol* 2000; 53: 207-210

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 第九次全国消化系疾病学术会议征文通知

**本刊讯** 中华医学会消化病学分会定于2009-12-04/06在广州市召开第九次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

#### 1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. (1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性肠病; (7)胃肠激素; (8)消化疾病介入治疗; (9)青年委员会专场(全部用英文交流).

#### 2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编, 论文文责自负. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1964-11后出生). (2)凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文不予受理. (3)通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议不接受书面投稿. 要求作者本人通过会议网站上传稿件并留下联系方式, 会议网址: <http://www.csgd.org.cn>. (4)截稿日期: 2009-09-15.

希望各地委员积极、认真组织所在地区医生踊跃投稿并参会.

# 腹腔镜胆囊切除意外胆囊癌的处理

徐协群, 刘卫, 李秉璐, 洪涛, 郑朝纪, 何小东, 廖泉, 赵玉沛

## ■背景资料

随着腹腔镜技术的推广和腹腔镜胆囊切除技术的日益成熟,腹腔镜胆囊切除的病例越来越多,但是由于胆囊癌早期诊断常较困难,并大多与胆囊结石、胆囊炎伴发,或与胆囊其他良性隆起样病变混淆,术前未被诊断为胆囊癌而在术中、术后被意外发现,从而被称之为意外胆囊癌(UGC).国内外报道的UGC的发生率为0.3%-2.9%,但是有15%-30%的胆囊癌在术前或术中存在恶性证据.有报道称行LC时如发现UGC,会增加肿瘤扩散或戳孔肿瘤种植的风险,但是也有报道称开腹胆囊切除(OC)与LC对这种情况下的胆囊癌的预后没有影响.因此LC会不会导致肿瘤的播散还存在争议.

## ■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

徐协群, 刘卫, 李秉璐, 洪涛, 郑朝纪, 何小东, 廖泉, 赵玉沛, 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院基本外科 北京市 100730

徐协群, 中国协和医科大学医学博士, 主要从事基本外科的临床和基础研究.

作者贡献分布: 徐协群与刘卫对此文所作贡献均等; 此课题由徐协群与刘卫设计; 研究过程由徐协群、刘卫、李秉璐及洪涛进行操作, 郑朝纪、何小东、廖泉及赵玉沛等进行指导及协助下完成; 本论文写作由徐协群完成.

通讯作者: 刘卫, 100730, 中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院基本外科. liuweiy95@gmail.com

电话: 010-65296024

收稿日期: 2009-01-22 修回日期: 2009-02-21

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-05-08

## Unsuspected gallbladder cancer management during or after laparoscopic cholecystectomy

Xie-Qun Xu, Wei Liu, Bing-Lu Li, Tao Hong, Chao-Ji Zheng, Xiao-Dong He, Quan Liao, Yu-Pei Zhao

Xie-Qun Xu, Wei Liu, Bing-Lu Li, Tao Hong, Chao-Ji Zheng, Xiao-Dong He, Quan Liao, Yu-Pei Zhao, Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Correspondence to: Wei Liu, Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China. liuweiy95@gmail.com

Received: 2009-01-22 Revised: 2009-02-21

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To explore the effectiveness of surgeons in determining the unsuspected gallbladder carcinoma (UGC) at laparoscopic cholecystectomy (LC) and the management of UGC.

**METHODS:** A total of 6429 patients with gallbladder disease were included in this study who underwent LC during June, 1989 and November, 2008. Patients with UGC were reviewed retrospectively to assess preoperative diagnosis, intraoperative findings and outcomes.

**RESULTS:** Of the total patients, 27 in 6429 (0.4%) were histopathologically diagnosed as UGC during (17) or after (10) LC. The tumor stages of

the 27 diagnosed were pT<sub>1</sub> (9), pT<sub>2</sub> (9), and pT<sub>3</sub> (91), each with 9 cases. The survival rates of all the UGC patients in one-year, three-year and five-year were 74.1%, 63% and 59.3%, respectively. The five-year survival rates of pT<sub>1</sub> stage, pT<sub>2</sub> stage and pT<sub>3</sub> stage were 100%, 66.7% and 0.0%, respectively, not significantly affected by whether the patients had been diagnosed with UGC during or after LC ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The survival rate from UGC is associated with tumor stage and it is confirmed that a carefully performed LC is adequate treatment for pT<sub>1</sub> stage cancer. If a suspicious lesion is found, intraoperative frozen section is performed for pathological examination. However, radical operation is recommended for T<sub>2</sub> patients and effective measures should be taken to avoid tumor implant and metastasis.

**Key Words:** Laparoscopic cholecystectomy; Gallbladder carcinoma; Unsuspected gallbladder carcinoma

Xu XQ, Liu W, Li BL, Hong T, Zheng CJ, He XD, Liao Q, Zhao YP. Unsuspected gallbladder cancer management during or after laparoscopic cholecystectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1312-1317

## 摘要

**目的:** 探讨腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)遇意外胆囊癌(unsuspected gallbladder carcinoma, UGC)的原因及应对策略.

**方法:** 回顾性分析本院1989-06/2008-11行LC患者6429例中遇到的术中及术后诊断为UGC的27例(0.4%)临床资料.

**结果:** 所有27例胆囊癌病例中, 在LC术中诊断17例, LC术后诊断有10例. pT<sub>1</sub>期、pT<sub>2</sub>期和pT<sub>3</sub>期各9例. 患者的1、3和5年存活率分别为74.1%、63%和59.3%. pT<sub>1</sub>期的5年存活率为100%, pT<sub>2</sub>期的5年存活率为66.7%, pT<sub>3</sub>期的5年存活率为0.0%, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ).

**结论:** UGC患者的存活与肿瘤分期相关, pT<sub>1</sub>期

胆囊癌, 行LC即可. 怀疑有胆囊癌在可能情况下及时行冰冻病理检查, 对于确诊pT<sub>1</sub>期以外的UGC应该尽早开腹行胆囊癌根治术, 并采取必要措施防止肿瘤种植和转移.

**关键词:** 腹腔镜胆囊切除术; 胆囊癌; 意外胆囊癌

徐协群, 刘卫, 李秉璐, 洪涛, 郑朝纪, 何小东, 廖泉, 赵玉沛. 腹腔镜胆囊切除意外胆囊癌的处理. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1312-1317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1312.asp>

## 0 引言

随着腹腔镜技术的普及, 腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)因其创伤小、恢复快等优点受到医生和患者的欢迎和推崇. 随着腹腔镜技术的推广和腹腔镜胆囊切除技术的日益成熟, 腹腔镜胆囊切除的病例越来越多, 但是由于胆囊癌早期诊断常较困难, 并大多与胆囊结石、胆囊炎伴发, 或与胆囊其他良性隆起样病变混淆, 术前未被诊断为胆囊癌而在术中、术后被意外发现, 从而被称之为意外胆囊癌(unsuspected gallbladder carcinoma, UGC)<sup>[1]</sup>. 国内外报道的UGC的发生率为0.3%-2.9%<sup>[2-3]</sup>, 但是有15%-30%的胆囊癌在术前或术中存在恶性证据<sup>[3-4]</sup>. 有报道称行LC时如发现UGC, 会增加肿瘤扩散或戳孔肿瘤种植的风险<sup>[5-7]</sup>, 但是也有报道称开腹胆囊切除(open cholecystectomy, OC)与LC对这种情况下的胆囊癌的预后没有影响<sup>[8-9]</sup>. 因此LC会不会导致肿瘤的播散还存在争议. 现将我院1989年开展LC以来遇到的UGC患者27例临床资料结合文献报道进行回顾性总结.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1989-06/2008-11共行LC患者6429例, 术中及术后发现UGC患者27例(0.4%), 其中男12例, 女15例, 年龄36-88(平均年龄67.3)岁. 术前诊断胆囊结石伴胆囊炎16例, 胆囊息肉样病变6例, 胆囊结石合并胆囊息肉3例, 胆囊腺肌症2例. 其中24例术前均有不同程度的右上腹疼痛、餐后饱胀不适、疼痛向后背放射等病史, 另外3例无不适主诉, 均为胆囊息肉样病变. 其中有5例发病过程中出现发热、黄疸等症状, 均为胆囊多发结石, 有过胆管排石的过程, 保守治疗后好转. 病史最长22年, 最短2 mo, 平均时间86.5 mo. 术前检查: B超: 胆囊结石16例, 其中3例结石直径超过3 cm; 胆囊壁增厚5例; 胆囊息肉样病变6例, 均为单发, 直径范围在9-26 mm. 3例术前行CT

检查, 发现胆囊壁弥漫性增厚, 未发现明确占位, 考虑慢性胆囊炎或胆囊腺肌症的可能大. 3例因为胆囊结石、胆总管结石曾行ERCP, 未发现胆囊有明显异常.

### 1.2 方法

27例患者均在CO<sub>2</sub>气腹下常规行LC术. 胆囊病变如果出现下列胆囊癌高危因素的情况则切除胆囊行冰冻病理检查: (1)胆囊黏膜出现皱缩或溃疡; (2)胆囊壁局部增厚超过4 mm; (3)正常的胆囊壁为结缔组织所代替; (4)胆囊黏膜颜色发生改变; (5)胆囊息肉样病变超过10 mm等. 患者术后资料通过门诊随访获得.

术后存活时间从诊断开始到死亡或我们最后1次随访计算(2008-11-30). 术后存活率应用SPSS10.0以寿命表法进行计算.

## 2 结果

**2.1 临床诊断** 术前胆囊良性疾病如胆囊结石伴胆囊炎, 胆囊息肉样病变, 胆囊结石合并胆囊息肉, 胆囊腺肌症等诊断主要通过影像学如腹部CT(图1), MRI以及腹部超声, 为了对照说明术前明确诊断为早期胆囊癌的病例, 特附其影像学资料(图2). 所有患者术前均常规检查肝功能, 23例肝功能全部正常, 另外4例ALT(最高67 U/L, 正常5-40 U/L)、AST(最高56 U/L, 正常5-37 U/L)、GGT(最高80 U/L, 正常10-67 U/L)、TBIL(最高29.6 μmol/L, 正常5.1-22.2 μmol/L)、DBIL(最高13.1 μmol/L, 正常0-8.6 μmol/L)轻度升高, 另外有9例检查了CA19-9, CEA, 甲胎蛋白(AFP), 5例全部正常, 另外有4例患者CA19-9出现升高(最高79 U/L, 正常0-37 U/L).

**2.2 病理学** 术中和术后病理诊断证实处于pT<sub>1</sub>和pT<sub>2</sub>期胆囊癌患者18例, 另外9例处于pT<sub>3</sub>期. 术中冰冻检查而术后证实为胆囊癌共19例, 术中冰冻切片病理证实为胆囊癌17例, 其中pT<sub>1</sub>期5例, pT<sub>2</sub> 6例, pT<sub>3</sub> 8例, 另外2例术中冰冻病理提示胆囊管状腺瘤伴重度不典型增生, 不排除癌, 建议等石蜡, 术后石蜡病理提示胆囊癌, 分别为pT<sub>2</sub>和pT<sub>3</sub>期. 术中冰冻病理的准确率为89.5%(17/19). 另外8例术中未行冰冻病理而术后石蜡病理提示为胆囊癌, 其中pT<sub>1</sub>期4例, pT<sub>2</sub>期2例, pT<sub>3</sub>期2例. 所有胆囊癌患者的临床特征见表1.

**2.3 手术结果** 所有患者最初都接受LC术, 19例术中冰冻病理检查的术后石蜡病理提示胆囊癌, 另外8例术后石蜡病理证实为胆囊癌. 19例

### ■ 研发前沿

随着技术的进步, 临床实践中微创手术被广泛应用, 腹腔镜越来越多地被用来进行胆囊切除. 在进行腹腔镜胆囊过程中会越来越多的接触到术中或术后胆囊癌的情况, 如何处理这个问题也成为临床实践中一个热点问题.

## ■相关报道

Aoki *et al*报道, 其总共有990例患者因为胆囊结石行LC, 其中发现7例为恶性, 然而在术后对其余983例良性病例的病理检查中发现, 有4例为恶性, 而其在术中的冰冻病理提示为上皮重度不典型增生, 因此有时很难区分胆囊原位癌和胆囊黏膜上皮的不典型增生。

表 1 胆囊癌患者临床特征 ( $n = 27$ )

	<i>n</i>	%
性别		
男	12	44.4
女	15	55.6
病理分型		
T1	9	33.3
T2	9	33.3
T3	9	33.3
大体分型		
息肉样病变	7	25.9
溃疡	2	7.4
胆囊壁增厚	6	22.2
合并胆囊结石	12	44.4
未合并胆囊结石	15	55.6
术中冰冻		
是	19	70.1
否	8	29.9
手术方式		
LC	9	33.3
LC+胆囊癌根治术	15	55.6
LC+开腹探查术	2	7.4
LC(放弃手术)	1	3.7
病理分化类型(腺癌)		
低分化	5	18.5
中分化	6	22.2
高分化	16	59.3
局部淋巴结转移	4	14.8
戳孔种植	2	7.4
远处转移	5	18.5
死亡		
T1	0	0.0
T2	3	11.1
T3	8	29.9

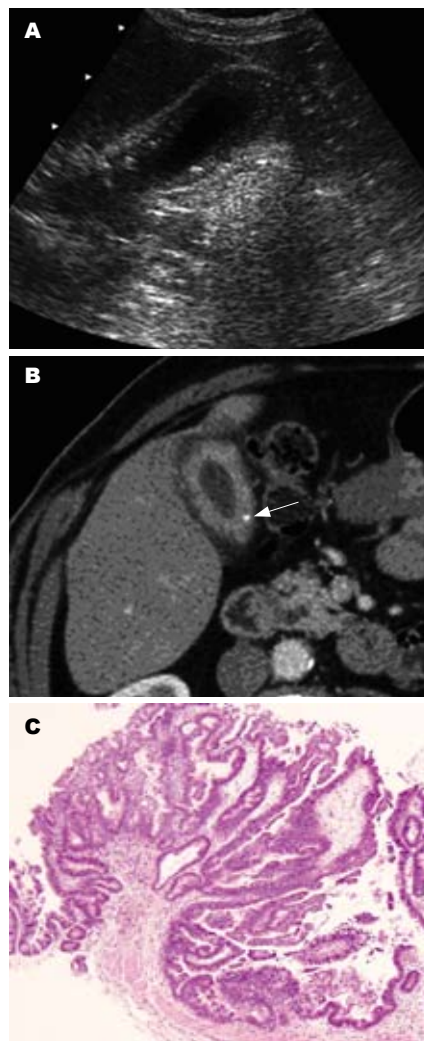


图 1 术前影像学诊断为胆囊腺肌症, 术中冰冻病理和术后石蜡病理均诊断为胆囊腺癌pT<sub>1a</sub>(58岁, 女, 病史10年). A: 超声显示胆囊壁弥漫性的增厚壁内局部多发强回声, 但是未见声影; B: CT显示胆囊壁弥漫性的增厚, 可见胆囊壁内高密度结石影(箭头); C: 石蜡病理提示为胆囊腺癌pT<sub>1a</sub>, 病变浸润至黏膜层(HE染色×20).

中有5例冰冻病理提示为pT<sub>1</sub>期, 仅行单纯LC术, 术中冰冻病理直接提示pT<sub>2</sub>期以上(包括pT<sub>2</sub>期)共14例, 其中pT<sub>2</sub> 6例, 直接中转开腹胆囊癌根治术; pT<sub>3</sub>期6例, 其中4例行肝床楔形切除、区域性淋巴结清扫术, 另外1例, 由于腹腔广泛转移, 而仅行胆囊切除, 1例由于肿瘤位于胆囊颈部, 胆总管旁淋巴结肿大而行胆囊切除、区域性淋巴结清扫以及胆总管T管引流术. 2例术中冰冻病理提示胆囊管状腺瘤伴重度不典型增生, 不除外癌, 建议等石蜡, 术后石蜡病理提示胆囊癌, 分别为pT<sub>2</sub>和pT<sub>3</sub>期, 再次于术后1 wk行开腹胆囊癌根治术. 另外8例术中未行冰冻病理而术后石蜡病理提示为胆囊癌, 其中pT<sub>1</sub>期4例, 未行进一步处理; pT<sub>2</sub>期2例, 于石蜡病理回报术后1 wk再次行肝床楔形切除、区域性淋巴结清扫术; pT<sub>3</sub>期

2例, 其中1例行肝床楔形切除、区域性淋巴结清扫术, 另外1例因为年龄较大(88岁), 家属放弃手术. 术后并发症共2例, 胆瘘1例, 伤口感染1例, 均对症治疗后好转.

2.4 随访结果 患者随访4-96(平均随访时间为57.6) mo. 所有患者的1、3和5年存活率分别为74.1%、63%和59.3%. pT<sub>1</sub>期的5年存活率为100%, pT<sub>2</sub>期的5年存活率为66.7%, pT<sub>3</sub>期的5年存活率为0(T分期Kaplan-Meier存活率Long-rank检验, pT<sub>1</sub>期 vs pT<sub>2</sub>期,  $P < 0.05$ , pT<sub>2</sub>期 vs pT<sub>3</sub>期,  $P < 0.05$ , 图3). 存活时间最长为96 mo, 系pT<sub>1</sub>, 且截止最后一次随访, 所有该期患者均存活. pT<sub>2</sub>期有3例患者死亡, 分别于术后16, 23和39 mo死亡, 死亡原因均为肿瘤复发或转移, 其平均存活时间26 mo. pT<sub>3</sub>期胆囊癌的患者存活时间为19.9±





图2 术前检查提示为早期胆囊癌的典型影像学表现(51岁, 女性, 病史1 mo)。A: 超声显示局部胆囊壁隆起样病变, 符合胆囊癌的表现; B: CT提示胆囊隆起样病变, 符合胆囊癌的表现; C: 石蜡病理提示为胆囊腺癌pT<sub>1a</sub>, 病变浸润至黏膜下层(HE染色×20)。

#### ■应用要点

目前B超仍然是诊断胆囊癌简单有效重要方法, 应该重视B超检查, 对于怀疑存在胆囊癌的患者可以多体位、多方向扫描以排除, 必要时可以术前联合胆囊超声和胆囊增强CT检查以期在术前能够做出明确诊断, 从而能够行一期胆囊癌治疗, 尽可能地避免二期的胆囊癌手术。

表2 27例胆囊癌分期、手术方式和存活情况

T分期	TNM分期	手术方式	n	随访(4–96 mo)
T1	I	LC	9	长期存活
T2	II	LC+Ra	9	4例存活, 1例带病存活, 3例死亡
T3	III	LC	2	死亡
		LC+Ra	7	6例死亡, 1例带病存活

Ra: 开腹胆囊癌根治术。

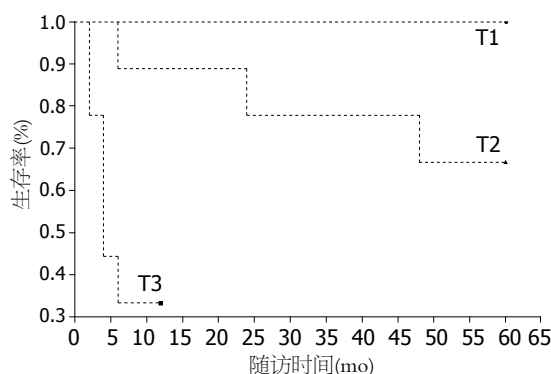


图3 胆囊癌患者T分期的Kaplan-Meier存活率。Long-rank检验, pT<sub>1</sub>期 vs pT<sub>2</sub>期,  $P < 0.05$ , pT<sub>2</sub>期 vs pT<sub>3</sub>期,  $P < 0.05$ 。

4.6 mo, 最长存活23 mo, 无存活超过2年者。脐部戳孔处肿瘤种植2例(pT<sub>2</sub>期和pT<sub>3</sub>期各1例), pT<sub>2</sub>期再次手术切除种植肿瘤, 存活16 mo死亡, pT<sub>3</sub>期, 放弃手术, 于术后8 mo死亡(表2)。

### 3 讨论

胆囊癌是一种发病率相对较低的恶性肿瘤, 胆囊癌占所有胆囊切除手术病例的0.3%-1.5%, 而行LC术的UGC发生率为0.3%-2.9%<sup>[1-3,10]</sup>。在本研究中, 胆囊癌的发生率为0.4%, 术前诊断胆囊结石伴胆囊炎16例, 胆囊息肉样病变6例, 胆囊结石合并胆囊息肉3例, 胆囊腺肌症2例。由于胆囊癌的临床表现与胆囊炎或胆石症类似, 本研究中的胆囊癌患者的临床表现与胆囊炎或胆囊结石没有明显的区别, 因此未能早期发现并诊断胆囊癌, 本研究组中病例均根据术中或术后的病理结果而做出诊断。

由于相对早期的胆囊癌术前通过超声或CT做出诊断比较困难, 因此在LC过程中, 除了大体观察区分胆囊的良性疾病和胆囊癌之外, 术中冰冻病理显得尤为重要。对于术中切除胆囊发现存在黏膜改变或胆囊壁增厚可以进一步送冰冻病理检查。Aoki *et al*<sup>[11]</sup>报道, 其总共有990例患者因为胆囊结石行LC, 其中发现7例为恶性, 然

而在术后对其余983例良性病例的病理检查中发现, 有4例为恶性, 而其在术中的冰冻病理提示为上皮重度不典型增生, 因此有时很难区分胆囊原位癌和胆囊黏膜上皮的不典型增生<sup>[12]</sup>。术中冰冻病理对病变浸润深度的准确率文献报道在70%-86%<sup>[13-14]</sup>, 本研究的冰冻病理准确率为89.5%(17/19)。因此基于冰冻病理的胆囊癌的诊断似乎是不精确的, 其中的原因很可能是由于这种检查方法不可能检查整个胆囊的病变部分。因此可能提示术中冰冻病理不能准确的提示原位癌和肿瘤的浸润深度。

基于肿瘤浸润深度(pT分期)的胆囊癌的手术治疗方式很大程度上决定了治疗的结果<sup>[15]</sup>。对于pT<sub>1</sub>期的胆囊癌, 单纯LC已经足够, 本研究对于pT<sub>1</sub>期的胆囊癌没有任何的复发或转移; 对于pT<sub>2</sub>期胆囊癌是否需要第二次的胆囊癌根治术目前还存在争议<sup>[3,11]</sup>。但是根据本研究我们的经验对于pT<sub>2</sub>期胆囊癌还是需要进行第2次胆囊癌根治术的。胆囊癌LC术后戳孔处肿瘤种植或者腹腔种植的发生率在14%-20%<sup>[16-17]</sup>, 本研究中有2例出现了戳孔处肿瘤种植(7.4%), 另外一方面,

# ■同行评价

本研究选题较好, 临床资料宝贵, 具有较好的临床参考价值.

也有报道称对于腹壁肿瘤复发在LC, OC或LC中转OC的手术方式之间没有差异, 而且手术方式对预后没有影响<sup>[17-18]</sup>. 另外还有文献报道称UGC的预后并不比OC后发现的胆囊癌预后差<sup>[19-20]</sup>. 戳孔肿瘤种植转移的情况, 其发生的原因包括胆囊壁的破损以及LC术中电烙器的广泛应用, 因此为了避免肿瘤腹腔或者戳孔种植转移情况的发生, 要尽量少用电烙器和避免损伤胆囊壁<sup>[21]</sup>. Sarli *et al*报道患者的预后与肿瘤的分期和胆汁泄露密切相关, 但与使用哪种手术方式(LC或OC)无关<sup>[20,23]</sup>. 术中使用标本袋取出胆囊似乎能够预防戳孔肿瘤种植<sup>[24]</sup>.

总之, 根据我们的经验以及文献报道的结果对于LC术前和术中出现以下情况应该高度怀疑存在胆囊癌的可能: (1)慢性胆囊炎或胆囊结石病史超过10年. (2)影像学检查或者术中发现提示胆囊萎缩, 胆囊壁局部增厚超过4 mm或胆囊壁广泛增厚, 胆囊息肉样病变超过10 mm, 胆囊壁钙化, 瓷样胆囊, 胆囊颈部结石或者结石超过2.5 cm等. 目前B超仍然是诊断胆囊癌简单有效重要方法, 应该重视B超检查, 对于怀疑存在胆囊癌的患者可以多体位、多方向扫描以排除, 必要时可以术前联合胆囊超声和胆囊增强CT检查以期在术前能够做出明确诊断, 从而能够行一期胆囊癌治疗, 尽可能地避免二期的胆囊癌手术. 从本研究可以看出由于UGC患者的存活率与肿瘤的分期密切相关, 术前对患者的评估尤为重要, 对于高度怀疑胆囊癌的术中冰冻病理有一定的帮助, 但是还要密切注意术后的石蜡病理. 对于早期的胆囊癌(pT<sub>1</sub>期)单纯LC术已经足够, 而对于pT<sub>2</sub>期以上(包括pT<sub>2</sub>期)胆囊癌不管是LC术中或术后都还需要进行第二次的胆囊癌根治术, 而且LC术对这些患者的预后没有影响<sup>[1,25-27]</sup>. 术中的细致操作以及使用标本袋取出胆囊可能对预防戳孔肿瘤种植、腹腔转移复发有一定的作用.

## 4 参考文献

- Varshney S, Butturini G, Gupta R. Incidental carcinoma of the gallbladder. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 4-10
- Contini S, Dalla Valle R, Zinicola R. Unexpected gallbladder cancer after laparoscopic cholecystectomy: an emerging problem? Reflections on four cases. *Surg Endosc* 1999; 13: 264-267
- Frauenschuh D, Greim R, Kraas E. How to proceed in patients with carcinoma detected after laparoscopic cholecystectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 495-500
- Steinert R, Nestler G, Sagynaliev E, Müller J, Lippert H, Reymond MA. Laparoscopic cholecystectomy

- and gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 682-689
- Clair DG, Lautz DB, Brooks DC. Rapid development of umbilical metastases after laparoscopic cholecystectomy for unsuspected gallbladder carcinoma. *Surgery* 1993; 113: 355-358
- Braghetto I, Bastias J, Csendes A, Chiong H, Compan A, Valladares H, Rojas J. Gallbladder carcinoma during laparoscopic cholecystectomy: is it associated with bad prognosis? *Int Surg* 1999; 84: 344-349
- Shirai Y, Ohtani T, Hatakeyama K. Laparoscopic cholecystectomy may disseminate gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 81-82
- Suzuki K, Kimura T, Ogawa H. Long-term prognosis of gallbladder cancer diagnosed after laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2000; 14: 712-716
- Whalen GF, Bird I, Tanski W, Russell JC, Clive J. Laparoscopic cholecystectomy does not demonstrably decrease survival of patients with serendipitously treated gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 189-195
- Kim KA, Park CM, Park SW, Cha SH, Seol HY, Cha IH, Lee CH, Lee KY. Contrast-enhanced power Doppler US: is it useful in the differentiation of gallbladder disease? *Clin Imaging* 2002; 26: 319-324
- Aoki T, Tsuchida A, Kasuya K, Inoue K, Saito H, Koyanagi Y. Is frozen section effective for diagnosis of unsuspected gallbladder cancer during laparoscopic cholecystectomy? *Surg Endosc* 2002; 16: 197-200
- Albores-Saavedra J, de Jesus Manrique J, Angeles-Angeles A, Henson DE. Carcinoma in situ of the gallbladder. A clinicopathologic study of 18 cases. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 323-333
- Azuma T, Yoshikawa T, Araida T, Takasaki K. Intraoperative evaluation of the depth of invasion of gallbladder cancer. *Am J Surg* 1999; 178: 381-384
- Yamaguchi K, Chijiwa K, Saiki S, Shimizu S, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Reliability of frozen section diagnosis of gallbladder tumor for detecting carcinoma and depth of its invasion. *J Surg Oncol* 1997; 65: 132-136
- de Aretxabala X, Roa I, Burgos L, Cartes R, Silva J, Yañez E, Araya JC, Villaseca M, Quijada I, Vittini C. Preoperative chemoradiotherapy in the treatment of gallbladder cancer. *Am Surg* 1999; 65: 241-246
- Paolucci V, Schaeff B, Schneider M, Gutt C. Tumor seeding following laparoscopy: international survey. *World J Surg* 1999; 23: 989-995; discussion 996-997
- Ricardo AE, Feig BW, Ellis LM, Hunt KK, Curley SA, MacFadyen BV Jr, Mansfield PF. Gallbladder cancer and trocar site recurrences. *Am J Surg* 1997; 174: 619-622; discussion 622-623
- Lundberg O, Kristoffersson A. Wound recurrence from gallbladder cancer after open cholecystectomy. *Surgery* 2000; 127: 296-300
- Gourgiotis S, Kocher HM, Solaini L, Yarollahi A, Tsiambas E, Salemis NS. Gallbladder cancer. *Am J Surg* 2008; 196: 252-264
- Sarli L, Contini S, Sansebastiano G, Gobbi S, Costi R, Roncoroni L. Does laparoscopic cholecystectomy worsen the prognosis of unsuspected gallbladder cancer? *Arch Surg* 2000; 135: 1340-1344
- Darabos N, Stare R. Gallbladder cancer:

- laparoscopic and classic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2004; 18: 144-147
- 22 Varshney S, Butturini G, Gupta R. Incidental carcinoma of the gallbladder. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 4-10
- 23 Chan KM, Yeh TS, Jan YY, Chen MF. Laparoscopic cholecystectomy for early gallbladder carcinoma: long-term outcome in comparison with conventional open cholecystectomy. *Surg Endosc* 2006; 20: 1867-1871
- 24 Akyürek N, Irkörüçü O, Salman B, Erdem O, Sare M, Tatlıcioğlu E. Unexpected gallbladder cancer during laparoscopic cholecystectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 357-361
- 25 Weinstein D, Herbert M, Bendet N, Sandbank J, Halevy A. Incidental finding of gallbladder carcinoma. *Isr Med Assoc J* 2002; 4: 334-336
- 26 Wullstein C, Woeste G, Barkhausen S, Gross E, Hopt UT. Do complications related to laparoscopic cholecystectomy influence the prognosis of gallbladder cancer? *Surg Endosc* 2002; 16: 828-832
- 27 Kwon AH, Imamura A, Kitade H, Kamiyama Y. Unsuspected gallbladder cancer diagnosed during or after laparoscopic cholecystectomy. *J Surg Oncol* 2008; 97: 241-245

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

**本刊讯** 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-07-23/26在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班.学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等.参加学习班者授予国家级1类继续教育学分;大会论文报告者另授继续教育学分6分.

#### 1 征稿内容

功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究;幽门螺杆菌相关疾病的中西医结合基础与治疗研究;脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究;消化系统肿瘤中西医结合诊疗;脾胃学说及其临床应用;其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

#### 2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编.稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送,截稿日期:2009-06-30.

#### 3 联系方式

袁海锋,朱永苹,530011,广西壮族自治区南宁市华东路10号广西中医学院瑞康医院,电话:0771-2188107;13597004049;13077766271,传真:0771-2411156, rkxhmk@sina.com或 czs.xiaohua@163.com

# CTHRC1和VEGF-C在直肠癌组织中的表达及相关性

李靖涛, 赵洪川, 高春, 姚力, 陈少轩, 姚树坤

## ■背景资料

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 因其易发生转移和扩散、术后复发转移率较高, 探索其转移机制一直是众多学者的研究重点. VEGF已经被证实可以通过促进新生血管形成等机制参与肿瘤的发生、发展. CTHRC1被体外实验证实能够提高细胞的迁移能力, 但在直肠癌组织中的表达报道较少.

李靖涛, 高春, 北京协和医学院研究生院 北京市 100010  
赵洪川, 姚力, 陈少轩, 姚树坤, 卫生部北京中日友好医院 北京市 100029

李靖涛, 主治医师, 医学博士在读, 主要从事消化系统恶性肿瘤的发生机制及防治研究.

作者贡献分布: 此课题由姚树坤、赵洪川及李靖涛设计; 研究过程由李靖涛、高春、姚力及陈少轩操作完成; 数据分析由李靖涛与高春完成; 本论文写作由李靖涛与姚树坤完成.

通讯作者: 姚树坤, 教授, 100029, 北京市, 卫生部北京中日友好医院消化内科. yaoshukun6@yahoo.com.cn

电话: 010-64222978

收稿日期: 2009-04-08 修回日期: 2009-04-28

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-08

## Expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma

Jing-Tao Li, Hong-Chuan Zhao, Chun Gao, Li Yao, Shao-Xuan Chen, Shu-Kun Yao

Jing-Tao Li, Chun Gao, Graduate School, Peking Union Medical College, Beijing 100010, China

Hong-Chuan Zhao, Li Yao, Shao-Xuan Chen, Shu-Kun Yao, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Correspondence to: Professor Shu-Kun Yao, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China. yaoshukun6@yahoo.com.cn

Received: 2009-04-08 Revised: 2009-04-28

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To study expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma.

**METHODS:** Ninety-eight patients diagnosed with rectal carcinoma at China-Japan Friendship Hospital from October 2004 to August 2008, were included in our study. No treatment was given before surgery and the specimens were collected after surgery. The expression of CTHRC1 and VEGF-C was examined by immunohistochemistry and the correlation with clinical characteristics was analyzed by SPSS10.0.

**RESULTS:** VEGF-C was mainly located in the tumor cells, and its expression was statistically correlated with tumor differentiation, clinical stages and lymph metastasis ( $P < 0.05$ ). The expression of CTHRC1 was correlated with the

clinical stages and tumor differentiation ( $P < 0.05$ ), both of the expressions had no correlation with the age or gender of patients. Moreover, a positive correlation was observed between VEGF-C and CTHRC1 by correlative analysis ( $r = 0.629, P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** CTHRC1 and VEGF-C may play important roles in invasion and metastasis in human rectal carcinoma. The two biomarkers can be applied to assess the malignancy of rectal cancer.

**Key Words:** Collagen triple helix repeat containing 1; Vascular endothelial growth factor; Rectal cancer

Li JT, Zhao HC, Gao C, Yao L, Chen SX, Yao SK. Expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1318-1323

## 摘要

**目的:** 探讨血管内皮生长因子(VEGF-C)和胶原三股螺旋重复蛋白1(CTHRC1)在直肠癌组织中的表达特点及二者的相关性.

**方法:** 收集我院2004-10/2006-08手术切除的直肠癌病理标本98例, 术前均未行任何治疗. 采用免疫组织化学方法检测VEGF-C和CTHRC1的表达. 分析他们的表达与患者年龄、性别以及直肠癌分化程度、临床分期及淋巴结转移的关系.

**结果:** VEGF-C主要分布于肿瘤细胞中, 其表达与直肠癌分化程度、临床分期及淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ ); CTHRC1表达与直肠癌分化程度、临床分期密切相关( $P < 0.05$ ), 二者与直肠癌发生的年龄、性别无明显相关. 此外, CTHRC1与VEGF-C的表达量呈正相关( $r = 0.629, P < 0.001$ ).

**结论:** VEGF-C和CTHRC1在直肠癌侵袭转移中可能起重要作用, 二者的表达可作为判定直肠癌生物学行为的参考指标.

**关键词:** 胶原三股螺旋重复蛋白1; 血管内皮生长因

## ■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科



## 子; 直肠癌

李靖涛, 赵洪川, 高春, 姚力, 陈少轩, 姚树坤. CTHRC1和VEGF-C在直肠癌组织中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1318-1323  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1318.asp

## 0 引言

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 近年来其发病率有明显增高趋势<sup>[1]</sup>. 血管内皮生长因子C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)已经被研究证实可以通过促进血管形成和诱导淋巴管生成等机制参与肿瘤的发生、发展. 胶原三股螺旋重复蛋白1(collagen triple helix repeat containing 1, CTHRC1)也被体外实验证实能够提高细胞的迁移能力<sup>[2]</sup>, 但其在直肠癌组织中的表达报道较少. 本研究采用免疫组织化学方法研究直肠癌组织中VEGF-C和CTHRC1的表达, 并进行相关性分析, 初步探讨VEGF-C和CTHRC1在直肠癌发生、发展中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2004-10/2006-08手术切除的直肠癌病理标本98例, 男54例, 女44例, 年龄35-90(62.88±10.2)岁, 术前均未行任何治疗. 临床分期: I期20例, II期24例, III期54例. 病理分期: T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> 6例, T<sub>2</sub>N<sub>0</sub> 14例, T<sub>3</sub>N<sub>0</sub> 21例, T<sub>4</sub>N<sub>0</sub> 3例, T<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 3例, T<sub>3</sub>N<sub>1</sub> 8例, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> 43例. 病理类型: 高分化腺癌14例, 中分化腺癌57例, 低分化腺癌27例. 兔抗人VEGF-C pAb(ZA-0266)、二步法检测试剂盒(K86815B)、DAB显色试剂盒(ZLI-9018)为中杉金桥产品. 兔抗人CTHRC1 pAb(ab54181-100)为Abcam公司产品.

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法: 组织常规石蜡包埋, 连续作厚4 μm的切片. 免疫组织化学实验采用SP法, 操作过程严格参照说明书进行, 阳性对照使用由既往实验证实的阳性组织, 阴性对照使用PBS代替一抗.

1.2.2 图像分析: 阳性信号为棕黄色细小颗粒, 表达强度根据细胞着色强弱和着色细胞比例综合确定, 在200倍, 5个及以上视野下按切片中细胞染色强度记分: 0分为细胞无染色, 1分为染色呈浅黄色, 2分为染色呈棕黄色, 3分为染色呈褐色; 再按切片中显色细胞所占比例记分: 0分为无阳性染色细胞, 1分为染色细胞占总数的30%以下, 2分为30%-70%, 3分为70%以上细胞染色. 每张切

表 1 不同性别患者VEGF-C和CTHRC1积分(分)

性别	n	VEGF-C	CTHRC1
M	55	4.82 ± 5.36	5.84 ± 6.35
F	43	4.64 ± 5.20	5.72 ± 6.23

表 2 不同TN分期患者VEGF-C和CTHRC1积分(分)

T分期	N分期	n	VEGF-C	CTHRC1
T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	6	3.54 ± 1.34	4.10 ± 0.77
T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	14	3.27 ± 1.73	5.24 ± 1.66
T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	3	6.20 ± 1.93	7.20 ± 0.60
T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	21	4.05 ± 1.47	4.89 ± 1.63
T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	8	6.03 ± 0.85	7.38 ± 1.23
T <sub>4</sub>	N <sub>0</sub>	3	5.00 ± 0.34	7.27 ± 0.50
T <sub>4</sub>	N <sub>1</sub>	43	6.63 ± 1.26	7.31 ± 1.11

片肿瘤细胞染色积分为: 强度计分×比例记分.

**统计学处理** 实验结果用mean±SD表示, 应用SPSS10.0统计软件根据数据性质, 分别应用t检验、方差分析、Pearson相关分析等方法分析,  $P<0.05$ 表示差异显著有统计学意义.

## 2 结果

2.1 CTHRC1和VEGF-C的表达 CTHRC1、VEGF-C阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 在癌组织中, 主要定位于癌细胞的胞膜和(或)胞质, 少数病例癌细胞胞核着色, 血管内皮细胞上未见VEGF-C染色(图1-3).

2.2 年龄与VEGF-C、CTHRC1积分的关系 VEGF-C积分与CTHRC1积分间具有一定正相关性( $r = 0.629$ ,  $P<0.001$ ); 年龄与VEGF-C、CTHRC1积分无明显相关.

2.3 性别与VEGF-C、CTHRC1积分的关系 t检验结果显示, 不同性别之间VEGF-C积分( $t = 0.40$ ,  $P = 0.688$ )、CTHRC1积分( $t = 0.33$ ,  $P = 0.745$ )均无显著性差异(表1).

2.4 TN分期与VEGF-C积分、CTHRC1积分的关系 VEGF-C积分在T分期之间无显著性差异(图1A, C和E), 在N分期之间有显著性差异, N<sub>1</sub>积分值>N<sub>0</sub>积分值( $P<0.001$ , 图1A-F). CTHRC1积分在不同TN分期间无显著性差异(表2, 图1G-H).

2.5 临床分期与VEGF-C、CTHRC1积分的关系 II期、III期与I期比较, VEGF-C和CTHRC1积分均差异显著( $P<0.05$ ); III期与II期比较, 积分差异亦均显著( $P<0.05$ , 表3, 图2).

2.6 病理分型与VEGF-C积分、CTHRC1积分的

## ■ 相关报道

CTHRC1基因在体外实验中已经被证实其过表达能够提高细胞的迁移能力并抑制I型胶原的合成. 可以通过限制胶原基质沉积和促进细胞迁移参与血管的损伤修复, 因此, 其表达可能与肿瘤的侵袭及恶性程度相关.

# ■创新盘点

本研究采用免疫组织化学方法研究直肠癌组织中CTHRC1和VEGF-C的表达,并进行相关性分析,初步探讨VEGF-C和CTHRC1在直肠癌发生、发展中的作用。

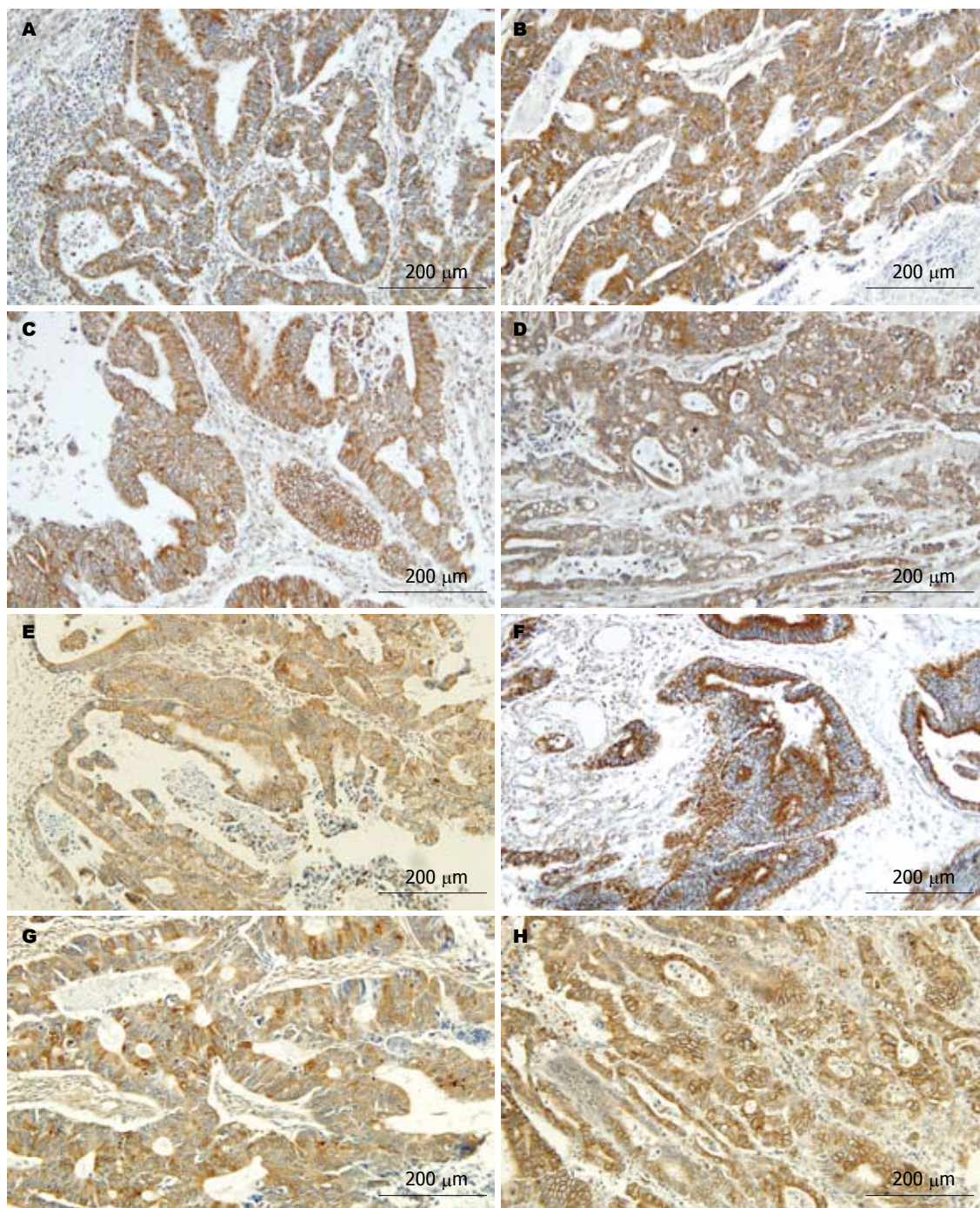


图1 不同TN分期组织VEGF-C和CTHRC1表达( $\times 200$ ). A: 中分化腺癌 $T_2$  VEGF-C阳性表达; B: 中分化腺癌 $T_2N_1$  VEGF-C强阳性表达; C: 中分化腺癌 $T_3$  VEGF-C阳性表达; D: 中分化腺癌 $T_3N_1$  VEGF-C强阳性表达; E: 中分化腺癌 $T_4$  VEGF-C阳性表达; F: 中分化腺癌 $T_4N_1$  VEGF-C强阳性表达; G: 中分化腺癌 $T_2N_1$  CTHRC1强阳性表达; H: 中分化腺癌 $T_3N_1$  CTHRC1强阳性表达。

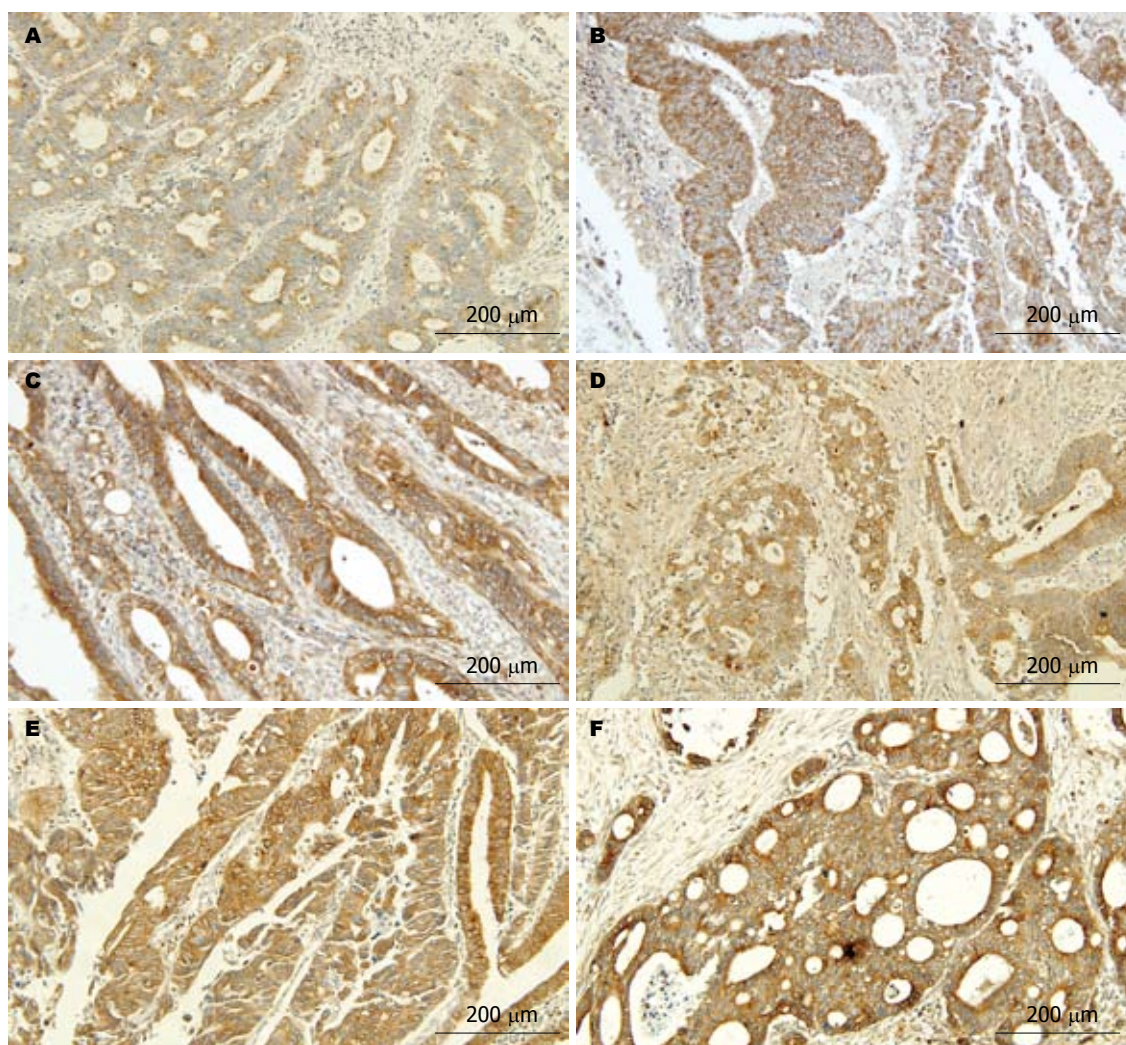
关系 高分化、中分化与低分化组比较, VEGF-C积分和CTHRC1积分差异均显著( $P<0.05$ ); 高分化与中分化组比较, 积分差异亦均显著( $P<0.05$ , 图3, 表4)。

## 3 讨论

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 因其易发生转移和扩散、术后复发转移率较高, 探索其

转移机制一直是众多学者的研究重点<sup>[3]</sup>。肿瘤血管形成和淋巴管生成对肿瘤的生长及转移有重要作用, 并受多种细胞因子的诱导和调节, VEGF-C是其中重要的因子之一。VEGF-C的表达已经被研究证实可能与肿瘤的预后密切相关<sup>[4-7]</sup>。本研究发现VEGF-C的表达与直肠癌的分化程度和临床分期密切相关, 与既往结论基本一致。Zheng *et al*<sup>[8]</sup>的研究中也发现VEGF-C表达





**■应用要点**  
CTHRC1 和 VEGF-C 可能在直肠癌的血管发生和侵袭转移中起着重要作用, 检测 CTHRC1 和 VEGF-C 的表达可能作为判断直肠癌生物学行为的参考指标, 辅助判断直肠癌的预后。

图 2 不同临床分期组织 VEGF-C 和 CTHRC1 表达 ( $\times 200$ )。A: 中分化腺癌 I 期 VEGF-C 弱阳性表达; B: 中分化腺癌 II 期 VEGF-C 阳性表达; C: 中分化腺癌 III 期 VEGF-C 强阳性表达; D: 中分化腺癌 I 期 CTHRC1 弱阳性表达; E: 中分化腺癌 II 期 CTHRC1 阳性表达; F: 中分化腺癌 III 期 CTHRC1 强阳性表达。

表 3 不同临床分期患者 VEGF-C 和 CTHRC1 积分 (分)

临床分期	<i>n</i>	VEGF-C	CTHRC1
I	20	$3.35 \pm 1.59$	$4.9 \pm 1.53$
II	24	$4.17 \pm 1.41^a$	$5.17 \pm 1.73^a$
III	54	$6.51 \pm 1.24^{ac}$	$7.31 \pm 1.09^{ac}$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs I 期; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs II 期。

表 4 不同病理分型患者 VEGF-C 和 CTHRC1 积分 (分)

病理分型	<i>n</i>	VEGF-C	CTHRC1
低分化	27	$6.98 \pm 1.03$	$7.24 \pm 1.01$
中分化	57	$5.09 \pm 1.66^a$	$6.40 \pm 1.66^a$
高分化	14	$2.87 \pm 1.23^{ac}$	$4.03 \pm 1.34^{ac}$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 低分化; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 中分化。

与直肠癌分化程度密切相关, 随着直肠癌分化程度降低, VEGF-C 表达增强。汪美华 *et al* 研究表明 VEGF-C 表达与结肠癌病理分级无关, 其原因可能与仅将结肠癌病理分为高、低分化两级或所用分析方法不一致有关<sup>[9-10]</sup>。

本研究还发现 VEGF-C 的表达与性别、年龄在统计学上无明显相关, 但与淋巴结转移密切相关。VEGF-C 的表达在不同性别和不同年龄无明显差异, 与文献[11-12]报道基本一致。但 De

Vita *et al* 在研究中发现<sup>[12]</sup>, 血清中 VEGF-C 水平与年龄呈负相关, 其原因可能与所选择标本有关, 血清中的 VEGF-C 表达可能与直肠癌组织有差异。目前已有研究发现 VEGF-C 过度表达的肿瘤细胞具有较高的局部淋巴结转移率<sup>[13]</sup>, 本研究在直肠癌组织中证实了上述观点。我们的研究结果显示 VEGF-C 的表达与淋巴结转移有显著的相关性, 并与直肠癌组织的临床分期密切相关, 也许 VEGF-C 可以作为评价直肠癌预后的



# ■同行评价

CTHRC1在直肠癌的研究目前未见相关报道。本研究发现CTHRC1在直肠癌组织中呈高表达,且与VEGF的表达量呈正相关,对进一步研究CTHRC1在直肠癌中的生物学作用有参考价值。

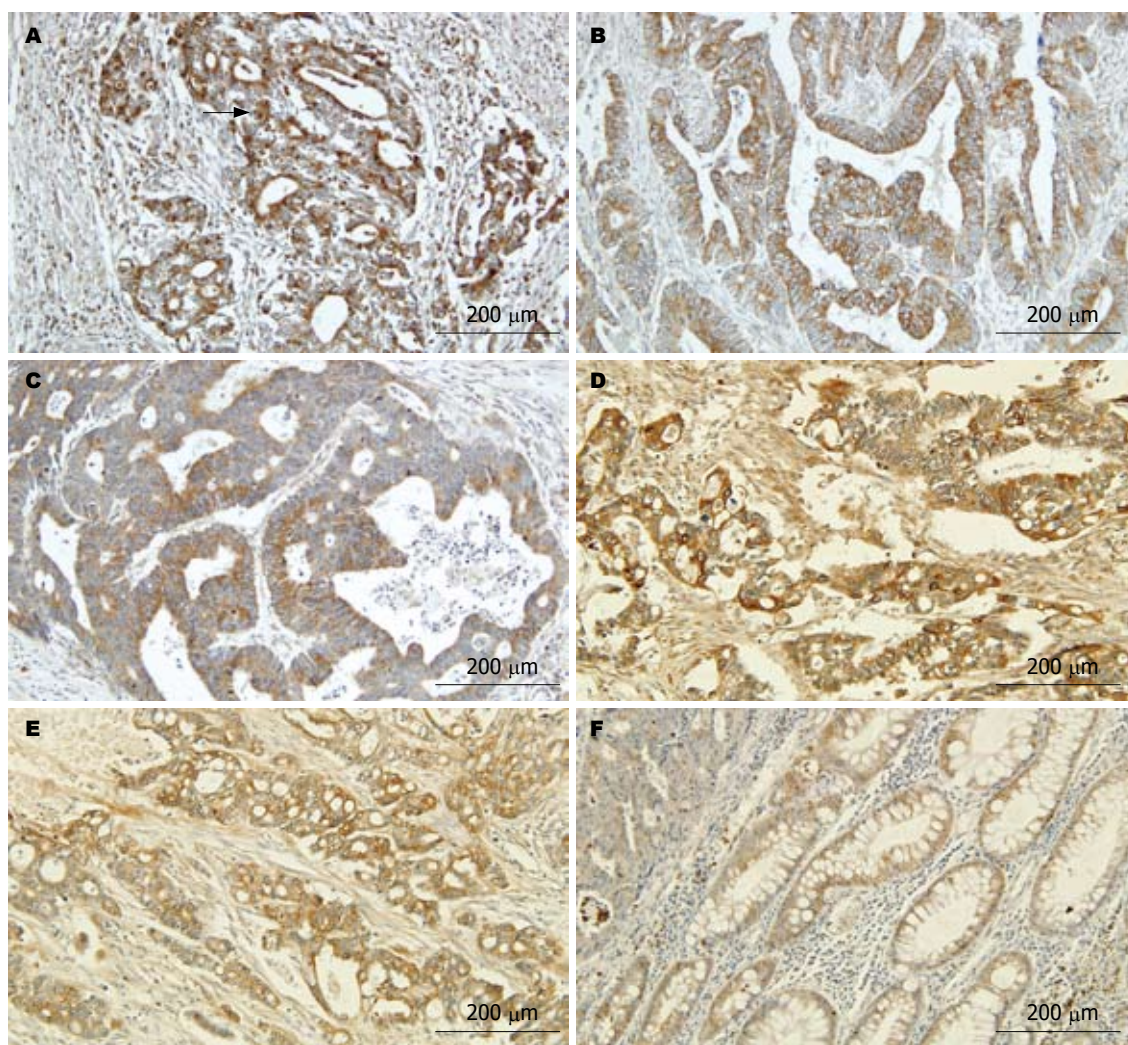


图3 不同病理分型组织VEGF-C和CTHRC1表达( $\times 200$ )。A: 低分化腺癌T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> VEGF-C强阳性表达; B: 中分化腺癌T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> VEGF-C阳性表达; C: 高分化腺癌T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> VEGF-C弱阳性表达; D: 低分化腺癌T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> CTHRC1强阳性表达; E: 中分化腺癌T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> CTHRC1阳性表达; F: 高分化腺癌T<sub>4</sub>N<sub>1</sub> CTHRC1弱阳性表达。

独立危险因素。

对于VEGF-C在肿瘤组织的表达部位及作用方式,目前文献报道不一。Wizigmann-Voos *et al*<sup>[14]</sup>认为VEGF-C主要表达于肿瘤细胞, Brown *et al*却发现VEGF-C不仅表达于肿瘤细胞,也可表达于血管内皮细胞<sup>[15-16]</sup>。我们的研究发现,VEGF-C主要表达于直肠癌细胞中,在肿瘤血管内皮细胞中并无明显表达。结合目前已经明确的作用机制,我们推测VEGF-C可能主要是通过旁分泌作用诱导肿瘤血管及淋巴管形成,从而促进肿瘤细胞的生长、转移,同时可能作为一种自分泌生长调节因子直接促进肿瘤细胞的生长。

CTHRC1基因在体外实验中已经被证实其过表达能够提高细胞的迁移能力并抑制I型胶原的合成<sup>[2]</sup>,可以通过限制胶原基质沉积和促进细胞迁移参与血管的损伤修复,因此,其表达可能与肿瘤的侵袭及恶性程度相关<sup>[17]</sup>。本研究的结果

证实直肠癌组织中CTHRC1的表达与直肠癌的分化程度和临床分期密切相关,但是与直肠癌发生的年龄和性别无明显相关。另外,本研究发现CTHRC1的表达与VEGF-C的表达呈显著正相关,也许CTHRC1能够与VEGF-C发挥协同作用,从而为肿瘤细胞的侵袭和转移创造合适的细胞外环境。

因此,我们推测CTHRC1和VEGF-C可能在直肠癌的血管发生和侵袭转移中起着重要作用,检测CTHRC1和VEGF-C的表达可能作为判断直肠癌生物学行为的参考指标,辅助判断直肠癌的预后。但是二者间的确切关系尚不清楚,有待进一步深入研究和证实。

## 4 参考文献

- 1 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18:



- 581-592
- 2 Pygay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE, Lindner V. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res* 2005; 96: 261-268
- 3 Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. *Cancer Lett* 2008; 260: 1-10
- 4 Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 793-800
- 5 Lee JJ, Chu E. An update on treatment advances for the first-line therapy of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2007; 13: 276-281
- 6 Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani K, Karameris A, Kombouras C. Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer. *J Surg Res* 2008; 147: 99-107
- 7 Ferroni P, Palmirotta R, Spila A, Martini F, Formica V, Portarena I, Del Monte G, Buonomo O, Roselli M, Guadagni F. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and vascular endothelial growth factor tumor tissue content in colorectal cancer. *Oncology* 2006; 71: 176-184
- 8 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230
- 9 汪美华, 万美珍, 周林艳, 陈玉芳, 岳灵萍. COX-2、VEGF在结肠癌组织中的表达及其临床意义. *肿瘤基础与临床* 2008; 21: 294-295
- 10 欧玉荣, 于东红, 刘德纯, 承泽农. COX-2与VEGF-C在大肠癌中的表达及与预后的关系. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2008; 17: 320-323
- 11 牟江洪, 阎晓初, 王东, 吴小华, 李增鹏, 向德兵. 大肠癌VEGF-C表达与淋巴结转移和预后的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1061-1064
- 12 De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E, Castellano P, Romano C, Ciardiello F, Catalano G, Pignatelli C, Galizia G. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 270-278
- 13 Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-560
- 14 Witzigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1358-1364
- 15 Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1255-1262
- 16 蔡瑞霞, 盛霞, 袁志浩, 叶增强. CD105、COX-2和VEGF在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系. *肿瘤防治研究* 2007; 34: 125-127
- 17 Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3716-3722

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志作者署名要求

**本刊讯** 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人员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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)

# RNA干扰技术在抗乙型肝炎病毒感染应用中的研究进展

孔令波, 佟立新, 王锡育

## ■背景资料

HBV感染是全球范围内影响人类健康的重要问题。RNAi技术能够特异性地降低目的基因的表达,是目前最有效的基因沉默技术,体内外研究均证实了RNAi技术在抗HBV感染中的作用。

孔令波, 佟立新, 王锡育, 河北医科大学第一医院肝病中心  
河北省石家庄市 050031

作者贡献分布: 本文综述由孔令波和佟立新完成; 王锡育审核。  
通讯作者: 孔令波, 050031, 河北省石家庄市东岗路89号, 河北医科大学第一医院肝病中心, klbhd@sohu.com

电话: 0311-85917156

收稿日期: 2009-01-02 修回日期: 2009-03-20

接受日期: 2009-03-23 在线出版日期: 2009-05-08

## Research progress of RNA interference in anti-infection of hepatitis B virus

Ling-Bo Kong, Li-Xin Tong, Xi-Yu Wang

Ling-Bo Kong, Li-Xin Tong, Xi-Yu Wang, Liver Disease Center, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China

Correspondence to: Ling-Bo Kong, Liver Disease Center, the First Hospital of Hebei Medical University, 89 Donggang Road, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China. klbhd@sohu.com

Received: 2009-01-02 Revised: 2009-03-20

Accepted: 2009-03-23 Published online: 2009-05-08

## Abstract

RNA interference (RNAi) can specifically suppress the expression of genes, and it is the most effective gene-silencing technique. Both *in vivo* and *in vitro* researches have approved the effect of RNAi on hepatitis B virus (HBV) infection. In recent years, multiple researches have been launched on selection of target sequences of small interfering RNA (siRNA), application of chemical modification, and selection of transduction method, short hairpin RNA (shRNA) vector and combination strategies. In this paper, we briefly review the advances of RNAi in anti-HBV infection.

Key Words: RNA interference; Hepatitis B virus; Small interfering RNA; Short hairpin RNA

Kong LB, Tong LX, Wang XY. Advance of RNA interference in hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1324-1328

## 摘要

RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术能够

特异性地降低目的基因的表达,是目前最有效的基因沉默技术,体内外研究均证实了RNAi在抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染中的作用。近年来,为使RNAi更适应抗HBV感染临床应用的需要,许多学者针对小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)靶序列、转导方法、短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)载体、各种联合策略的选择及化学修饰的应用等方面进行了大量研究。本文综述RNAi技术,尤其是HBV特异shRNA在抗HBV感染中应用的研究进展。

关键词: RNA干扰; 乙型肝炎病毒; 小分子干扰RNA; 短发夹状RNA

孔令波, 佟立新, 王锡育. RNA干扰技术在抗乙型肝炎病毒感染中的应用的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1324-1328  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1324.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性流行,全球约20亿人曾感染过HBV,其中3.5亿为慢性HBV感染者,每年约100万人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌<sup>[1]</sup>。我国属于HBV感染高流行区,一般人群HBsAg阳性率为9.09%<sup>[2]</sup>。虽然疫苗计划免疫降低了HBV感染的发生率,抗病毒药物如干扰素及核苷(酸)类似物的合理应用也使很大一部分慢性乙型肝炎患者的病情得以控制。但抗HBV感染,阻断肝细胞内HBV基因的复制和表达,仍是亟待解决的难题。RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是一项发展迅速并极富应用前景的基因控制技术,通过产生内源性特异序列的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),诱导特异靶基因mRNA降解,从而使该基因“沉默”。随着这几年RNAi研究的不断深入, RNAi的机制逐渐被阐明,为抗HBV基因治疗提供了很有前景的研究方向。本文将近年来RNAi技术,尤其是HBV特异短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)在抗HBV感

## ■同行评议者

曹洁, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

染中应用的研究进展作一综述。

## 1 HBV基因组及其RNAi的作用机制

**1.1 HBV基因组及其复制概况** HBV是部分双链环状DNA分子。HBV基因组含有4个部分重叠的开放读码框(open reading frame, ORF), 即前S/S区、前C/C区、P区和X区。前S/S区编码大(前S1、前S2及S)、中(前S2及S)、小(S)3种包膜蛋白; 前C/C区编码HBeAg及HBcAg; P区编码病毒聚合酶; X区编码X蛋白。

HBV进入肝细胞质后, 被运至细胞核膜, 脱去核衣壳, 放出HBV DNA, 生成松弛环状DNA, 再进入细胞核内, 在宿主酶的作用下, 以负链DNA为模板延长正链, 修补正链中的缝隙区, 形成共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA), 然后以cccDNA为模板, 在宿主RNA聚合酶II的作用下, 转录成几种不同长度的mRNA, 包括3.5、2.4、2.1及0.9 kb。其中3.5 kb的mRNA含有HBV DNA序列上的全部遗传信息, 称为前基因组RNA。后者进入肝细胞质作为模板, 在HBV逆转录酶作用下, 合成负链DNA, 再以负链DNA为模板, 在HBV DNA聚合酶的作用下合成正链DNA, 形成子代部分双链环状DNA。后者一部分又进入细胞核进行病毒复制周期, 而另一部分入内质网与HBsAg装配成完整的HBV, 释放至肝细胞外。

**1.2 RNAi的作用机制** RNAi现象是指内源性或外源性双链RNA(double strands, dsRNA)介导细胞内mRNA发生特异性降解, 导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能表型缺失。这一现象属于转录后的基因沉默机制。这一机制能够特异性地降低目的基因的表达, 是目前最有效的基因沉默技术。

RNAi的特异效应作用机制被分为起始阶段和效应阶段两部分加以阐明<sup>[3]</sup>。起始阶段: 由外源或转基因、病毒感染等方式引入的dsRNA, 在细胞内被一种核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)III中特异识别双链RNA的酶Dicer, 以ATP依赖的方式逐步切割为21-23 nt长的3'端有2个nt突出的siRNA。效应阶段: 一方面, siRNA同核酸酶结合形成所谓的RNA诱导基因沉默复合物(RNAs induced silencing complex, RISC)。RISC在ATP的作用下由含双链siRNA的形式变为含单链siRNA的活化形式, 与同源靶基因表达的mRNA特异性结合, 在结合处siRNA 3'端的12个bp处切割mRNA, 诱发mRNA降解, 从而

在RNA水平上抑制靶基因表达。某些学者认为RNAi过程中还具有自身循环放大机制, 并将其归为模型的第三阶段-循环放大阶段, 其机制大致如下: 在效应阶段, RISC中的解旋酶促使siRNA解链后, 释放出来单链的siRNA又可作为特殊引物, 以靶mRNA为模板, 在RNA依赖的RNA聚合酶作用下, 形成新的dsRNA, 在Dicer酶作用下又可被裂解为21-23 nt的siRNA, 又能够诱发RNAi作用。如此循环, 使得大量靶mRNA降解, 呈放大效应。

siRNA的产生包括5种方式: 化学合成、体外转录、长片段dsRNA经RNaseIII降解、PCR扩增shRNA表达框及构建shRNA表达质粒<sup>[4-5]</sup>。

## 2 RNAi技术在抗HBV感染中的应用

HBV mRNA的降解不仅抑制了相关蛋白的表达, 也可以抑制HBV复制。将RNAi技术应用于抗HBV治疗具有很多优势: RNAi特异性针对病毒转录产物从而阻断病毒复制, 不会激活非特异性细胞反应, 将不良反应降到最小; RNAi具有高效性, 少量的siRNA就可达到抑制HBV mRNA、降低病毒表达产物的作用; RNAi可以针对病毒基因保守区发挥作用, 从而限制了病毒产生逃避突变株的能力; siRNA可以在病毒非活跃复制的情况下发挥其抑制病毒基因转录及降低蛋白表达水平的作用<sup>[6]</sup>。

近年来, 为使RNAi更适应抗HBV感染临床应用的需要, 学者们针对siRNA靶序列的选择、化学修饰的应用、转导方法的选择、shRNA载体的选择及各种联合策略的选择等方面做了大量研究。

**2.1 靶序列的选择** 从2003年开始, 国内外学者针对HBV的4个开放读码框的不同位点设计了不同长度的siRNA, 证实siRNA可以明显减少病毒复制形式的DNA、不同长度的mRNA和表达的蛋白含量。尽管所选用的siRNA靶向基因序列不同, 但是几乎都能不同程度抑制HBV的转录和病毒蛋白的表达, 证实了HBV siRNA选择范围较大、多靶位都具有抗病毒效应, 为灵活选择靶向序列、多位点siRNA的联合应用创造了非常有利的条件。由于各实验室采用的siRNA制备方法不相同, HBV感染的评价模型也不尽相同, 因此目前很难对所选用的siRNA抗病毒效率高低作出统一的评价。

由于基因突变可能降低siRNA抗病毒的效果, 应当选择HBV基因组保守基因区域作

### ■研发前沿

近年来, 为使RNAi更适应抗HBV感染临床应用的需要, 学者们针对siRNA靶序列的选择、化学修饰的应用、转导方法的选择、shRNA载体的选择及各种联合策略的选择等方面做了大量研究。这也是近年来RNAi技术在抗HBV感染中应用的研究热点。

## ■创新盘点

本文系统的阐述了近年来RNAi技术在抗HBV感染中应用中的研究进展,包括siRNA靶序列的选择、化学修饰的应用、转导方法的选择、shRNA载体的选择及各种联合策略的选择等。

为siRNA序列的靶位点,并同时使用多个位点。有研究选择了两个RNAi靶区,设计了两组shRNA, shRNA-1以HBsAg为靶位, shRNA-2以编码HBcAg及聚合酶的重叠区域的前基因组RNA为靶位。在HepG2.2.15细胞及HBV感染小鼠模型均证实了shRNAs对HBV基因表达的抑制作用,并且证实这种抑制作用是剂量依赖性和特异性的<sup>[7]</sup>。Wu *et al*<sup>[8]</sup>针对HBV P、S及X保守区构建了siRNA腺病毒表达质粒,该质粒与HBV共转染Huh27细胞时,能够显著降低HBsAg及HBcAg的表达水平。

**2.2 化学修饰的应用** 近年来,研究者们采用了多种化学修饰方法来提高siRNA的稳定性,减少非特异反应,提高细胞对siRNA的摄取率。为抑制体内核酸酶对siRNA的降解, Morissey *et al*<sup>[9]</sup>将合成的siRNA进行化学修饰,让siRNA所有2'-OH缺失,并用2'-氟代、2'-磷硫酰化处理。修饰的单链siRNA半衰期为15.5-18 h,双链siRNA为2.1-3 d,与未修饰siRNA相比,稳定性提高了近900倍。在水动力法建立的HBV体内感染模型中,尾静脉直接注射这种化学修饰的siRNA后3 d血清HBV DNA下降近1000倍,肝组织内HBV DNA、HBsAg水平均受到明显抑制。此实验对于将siRNA应用于体内乃至临床研究具开创性意义。随后Morissey *et al*<sup>[10]</sup>进一步将化学修饰的siRNA用新型生物材料稳定核酸脂质颗粒(stable nucleic-acid-lipid particle, SNALP)进行包裹,并系统研究了siRNA-SNALP在小鼠体内的生物学分布、半衰期、药效学、免疫刺激反应和不良反应。将SNALP用<sup>3</sup>H-胆碱酯酶标记,尾静脉直接注射后24 h约28%分布于肝脏,8.2%分布于脾脏,Cy3标记的siRNA-SNALP注射后2 h就出现于肝内,7 d后才逐渐消失,实现了siRNA-SNALP对肝组织有效的时间和空间定位。免疫刺激反应研究发现:未修饰的siRNA诱发了干扰素 $\gamma$ 和炎症因子的表达,而化学修饰的siRNA-SNALP不会引起血清白介素-6、干扰素 $\gamma$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达发生变化。在随后的连续给药3 d,停药第3、7 d均观察到对HBV表达的持续、高抑制作用,并呈剂量依赖性关系。此项研究结果较好解决了siRNA在肝组织定位和稳定性表达的问题,免疫刺激反应和不良反应的观察则为siRNA的使用安全性提供了保障,连续给药和药物剂量实验的系统研究为探索体内实验乃至临床给药途径和剂量提供了重要的实验依据,为siRNA最终应用于临床研究迈出了重要一步。

## ■应用要点

体内外研究均证实了RNAi在抗HBV感染中的作用,为抗HBV感染的基因治疗提供了有价值的研究方向。但是还需要不断完善RNAi技术,使之能够安全、有效地应用于抗HBV感染的基因治疗。

最近,有研究报道了一种核糖核酸内切酶制备的siRNA(Endoribonuclease-prepared siRNA, esiRNA),由于esiRNA可以直接抑制长的靶序列,靶序列的基因变异对于他的作用影响较小,在这点上esiRNA更优于化学修饰的siRNA。以HBsAg及HBcAg编码区为靶序列的esiRNA,显著抑制HBsAg及HBcAg表达<sup>[11]</sup>。

**2.3 转导方法的选择** 在将siRNA应用于临床之前,应该研究一种有效的转导方式。抗体介导的转导是一种新的方法。抗体介导的转导,是将核苷酸结合区域融合至抗原结合片段或识别膜受体的单链抗体可变区基因片段,产生出一种具有细胞识别及核苷酸结合功能的融合蛋白。这种融合蛋白可以结合核苷酸并通过受体介导的摄取效应将其转导至目标细胞。有研究构建了两个含有抗HBsAg的人单链抗体可变区基因片段的融合蛋白,即s-tP及sCk-tP。s-tP及sCk-tP被设计来介导siRNA、siRNA表达框及siRNA生成质粒的定向转导。应用sCk-tP将荧光素异硫氰酸盐-siRNA、荧光素异硫氰酸盐-siRNA表达框及质粒DNA特异转染至HBsAg阳性细胞,有效抑制了HBV基因表达及复制。在HBV转基因小鼠,siRNA或siRNA生成质粒也能抑制HBV基因表达。此研究揭示了一种应用抗HBsAg融合蛋白的siRNA或siRNA生成质粒的定向转导方法,为将siRNA应用于临床增添了希望<sup>[12]</sup>。

在RNAi技术应用于实际治疗方法之前,还应该实现siRNA的器官定向转导。在一项研究中,证实了载脂蛋白A-I(apoprotein A-I, apo A-I)在将核苷酸转导至肝脏中的潜在可能。将抗HBV的siRNA结合入apo A-I及1,2-二油酰-3-三甲基-丙烷(DOTAP)/胆固醇(DTC-Apo)复合体,静脉注射入携带活跃复制HBV的小鼠模型。结果显示,这种毫微粒通过受体介导的细胞内摄作用可以显著抑制病毒蛋白表达。apo A-I介导的siRNA转导方法的优势在于他是肝脏特异性的,小剂量( $\leq 2$  mg/kg)单次治疗,抗病毒作用可以持续8 d。在活体内,可见肝脏定向基因沉默,肝脏发射的生物发光信号在荧光素酶特异的siRNA及DTC-Apo脂复合物的第4次处理后明显减少<sup>[13]</sup>。

**2.4 shRNA载体的选择** 为克服常规质粒载体介导的shRNA感染效率不高,抗病毒作用持续时间不长的缺点,有研究将聚合酶III-shRNA表达盒克隆入AdEasy腺病毒穿梭载体,与骨架质粒同源重组后,通过293细胞包装产生病毒



颗粒, 成功构建了腺病毒-shRNA表达载体. 在体外HBV阳性肝细胞株模型中, 腺病毒介导的HBV shRNA可以明显抑制所有HBV RNA转录分子表达, 持续时间长达9 d. 将HBV shRNA导入尾静脉注射重组腺病毒的HBV转基因小鼠, 发现HBV shRNA处理后4 d, 与对照组相比血清HBsAg分泌平均下降了5-6倍, HBeAg平均下降了3-4倍, 抑制作用可以持续13 d. 感染后4 d肝内HBV RNA转录水平下降5倍, 20 d平均下降7-9倍. 在干扰素受体缺陷的HBV转基因小鼠, 同样观察到siRNA对HBV RNA转录分子、HBsAg、HBeAg的直接、特异性抑制作用, 排除了腺病毒感染诱发机体干扰素抗病毒反应. 该研究首次将病毒载体应用于HBV转基因小鼠模型, 观察到shRNA的特异抗病毒作用, 最重要的是通过HBV转基因小鼠, 验证了siRNA对新感染模型以外的、已存在的病毒基因的转录和表达具有抑制作用, 这一点对临床HBV慢性感染者siRNA治疗更具有指导意义<sup>[14]</sup>. 腺病毒载体的缺点在于其效力的衰减, 以及由于先天及获得性免疫而引发的不良反应. 为克服这些缺点, 应用一甲基聚乙烯乙二醇-琥珀酰亚胺丙酸盐修饰第一代表达抗HBV siRNA的腺病毒载体, 结果证实这种修饰可以提高腺病毒载体在抗HBV感染治疗中应用的可行性<sup>[15]</sup>.

Jia *et al*<sup>[16]</sup>为抑制HBV表达及复制, 在HepG2.2.15细胞研究了一个以逆转录病毒为基础的RNA干扰系统, 这个系统利用U6-RNA聚合酶III启动子来促进HBV特异shRNA的有效表达及传递. 在此系统, 将逆转录病毒载体与一个嘌呤选择标志整合入宿主细胞基因组, 并且允许shRNA的稳定表达. 在对嘌呤霉素抵抗的HepG2.2.15细胞, HBV蛋白及mRNA水平平均下降超过88%, HBV复制被抑制, 抑制作用持续达2 mo. 结果提示, 以逆转录病毒为基础的RNA干扰技术在实验生物学及分子医学方面均有乐观的应用前景. 这是首次报道, 利用包含一个选择标志及人U6-RNA聚合酶III启动子的逆转录表达系统来将shRNA转导至HepG2.2.15细胞, 以沉默HBV基因. 其优势在于: 包含一个抗生素选择标志的逆转录病毒载体pBABE-嘌呤霉素, 可以整合入宿主基因组, 使shRNA可以稳定表达; 逆转录病毒转导可以应用于人类; 人U6-RNA聚合酶III启动子小并且稳定, 并可以很容易插入病毒载体, 所以其可以促进shRNA的高表达, 随之, 介导高效率的沉默.

通过支架/基质附着区(Scaffold/Matrix attachment region, S/MAR)游离基因保持载体pEPI-1表达的siRNA, 在转染至HepG2.2.15细胞后, 可以有效抑制HBV基因表达、细胞内HBV DNA复制及子代HBV的释放, 在没有抗生素选择压力的情况下, 这种作用可以持续8 mo. 这种新的S/MAR载体系统为慢性乙型肝炎的基因治疗开辟了新的远景. 作为非病毒载体, 他可能更符合基因治疗的安全需要, 并且可以长期抑制HBV复制<sup>[17]</sup>.

**2.5 联合策略** 应用siRNA联合策略以抑制多重病毒抗原表达及病毒复制. siRNA联合应用可以更强烈地抑制病毒复制及抗原表达, 尤其是cccDNA扩增. 在联合治疗中, 多个siRNAs可以阻断病毒基因组多个位点, 并且使之不能立即修复, 因此, 可以更有效地抑制HBV复制. 将针对HBV核定位信号区域不同位点的特异siRNA, 转染至HepG2.2.15细胞后, HBsAg、HBeAg及mRNA水平均有不同程度下降, HBV DNA水平及cccDNA复制分数显著下降. 这种抑制作用是高度选择性、序列特异性及剂量依赖性的, 尤其重要的一点是siRNA联合治疗可以显著抑制cccDNA扩增<sup>[18]</sup>.

由于HBV的一些特性, 目前, RNAi不能完全取代现行的抗HBV疗法, 但是由于他是一种转录后的基因沉默现象, 最终使mRNA降解, 故对于其研究最重要的意义是可发展成与核苷(酸)类似物或其他抗HBV药物的联合用药, 建立起一种抗HBV的“鸡尾酒疗法”. Chen *et al*<sup>[19]</sup>发现shRNA与拉米夫定联合作用的抗HBV效果较单用拉米夫定强6倍, 比单用shRNA要强3倍, 这为RNAi与核苷(酸)类似物联合作用抗HBV治疗提供了一定的依据. 另外, 在HBV野毒株和YMDD变异株感染细胞中, 比较靶向HBV核心区的shRNA抗病毒作用差异, 发现shRNA可以抑制HBV变异株复制, 但较野毒株作用稍弱, 提示siRNA可以应用于耐受拉米夫定的HBV耐药毒株的抗病毒治疗.

### 3 结论

尽管体内外研究均证实了RNAi在抗HBV感染中的作用, 有了可喜的进展, 但是还存在以下问题: 如何大量制备低成本的siRNA; 如何进一步提高siRNA在体内稳定性并保持抗病毒效应的持久性; siRNA对机体不良反应的评价等. 因此, 真正将RNAi应用于临床还需要一个比较长的过

### ■名词解释

RNAi现象: 指内源性或外源性双链RNA介导细胞内mRNA发生特异性降解, 导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能表型缺失. 这一现象属于转录后的基因沉默机制.

## ■同行评价

本文选题尚可, 内容全面, 语言流畅, 具有一定的可读性。

程, 还要不断完善RNAi技术, 使之能够安全、有效地应用于抗HBV感染的基因治疗。

## 4 参考文献

- 1 World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204 dex, 2000-10, cited 2009-04. 1(1): 24 screens. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/in.html>
- 2 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658
- 3 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001; 107: 297-307
- 4 Ryther RC, Flynt AS, Phillips JA 3rd, Patton JG. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther* 2005; 12: 5-11
- 5 Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; 431: 338-342
- 6 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
- 7 Ying RS, Zhu C, Fan XG, Li N, Tian XF, Liu HB, Zhang BX. Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res* 2007; 73: 24-30
- 8 Wu HL, Huang LR, Huang CC, Lai HL, Liu CJ, Huang YT, Hsu YW, Lu CY, Chen DS, Chen PJ. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 2005; 128: 708-716
- 9 Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockridge JA, Dickinson B, McSwiggen JA, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Polisky BA, Zinnen S. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 2005; 41: 1349-1356
- 10 Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machemer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1002-1007
- 11 Meng Z, Xu Y, Wu J, Tian Y, Kemper T, Bleekmann B, Roggendorf M, Yang D, Lu M. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by endoribonuclease-prepared siRNA. *J Virol Methods* 2008; 150: 27-33
- 12 Wen WH, Liu JY, Qin WJ, Zhao J, Wang T, Jia LT, Meng YL, Gao H, Xue CF, Jin BQ, Yao LB, Chen SY, Yang AG. Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery. *Hepatology* 2007; 46: 84-94
- 13 Kim SI, Shin D, Choi TH, Lee JC, Cheon GJ, Kim KY, Park M, Kim M. Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol Ther* 2007; 15: 1145-1152
- 14 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 773-778
- 15 Crowther C, Ely A, Hornby J, Mufamadi MS, Salazar F, Marion P, Arbuthnot P. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication in vivo using peg-modified adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2008 Aug 21. [Epub ahead of print]
- 16 Jia F, Zhang YZ, Liu CM. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication in HepG2.2.15 cells by RNA interference based on retrovirus delivery. *J Biotechnol* 2007; 128: 32-40
- 17 Jenke AC, Wilhelm AD, Orth V, Lipps HJ, Protzer U, Wirth S. Long-term suppression of hepatitis B virus replication by short hairpin RNA expression using the scaffold/matrix attachment region-based replicating vector system pEPI-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2355-2359
- 18 Xin XM, Li GQ, Jin YY, Zhuang M, Li D. Combination of small interfering RNAs mediates greater suppression on hepatitis B virus cccDNA in HepG2.2.15 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3849-3854
- 19 Chen Y, Du D, Wu J, Chan CP, Tan Y, Kung HF, He ML. Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 398-404

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位. 2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位. 即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-05-08)

# 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制: 病理生理学和分子生物学

胡迎宾

胡迎宾, 武汉市普爱医院消化内科 湖北省武汉市 430033  
通讯作者: 胡迎宾, 430033, 湖北省武汉市硚口区汉正街473号,  
武汉市普爱医院消化内科. hu\_yingbin@163.com  
电话: 027-68835023  
收稿日期: 2009-02-17 修回日期: 2009-03-24  
接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-08

## Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis: pathophysiology and molecular biology

Ying-Bin Hu

Ying-Bin Hu, Department of Gastroenterology, Wuhan Pu'ai Hospital, Wuhan 430033, Hubei Province, China  
Correspondence to: Ying-Bin Hu, Department of Gastroenterology, Wuhan Pu'ai Hospital, 473 Hanzheng Street, Qiaokou District, Wuhan 430033, Hubei Province, China. hu\_yingbin@163.com  
Received: 2009-02-17 Revised: 2009-03-24  
Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-08

### Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), characterized by liver fatty infiltration, inflammation, hepatocellular injury and fibrosis, may easily develop into liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The increased flow of FFAs (free fatty acids) to the liver and the *de novo* lipogenesis in the liver lead to fat overload. Lipotoxicity can induce oxidative stress, inflammatory reaction and apoptosis. Subsequently chronic liver injury activates a fibrogenic response that accelerates the evolution of NASH towards end-stage liver disease. Further research on pathophysiology and molecular biology is beneficial to clinical diagnosis and management of NASH.

**Key Words:** Non-alcoholic steatohepatitis; Pathophysiology; Molecular biology

Hu YB. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis: pathophysiology and molecular biology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1329-1334

### 摘要

非酒精性脂肪性肝炎以肝脏脂肪浸润、炎

症、肝细胞损害和纤维化为特征, 可进一步发展为肝硬化及肝癌。游离脂肪酸向肝内转运和肝脏脂肪酸的从头合成导致肝细胞内脂肪超负荷。脂毒性引起氧化应激、炎症反应和肝细胞凋亡。随后慢性肝损伤激活纤维化反应发展至终末期肝病。对非酒精性脂肪性肝炎病理生理学和分子生物学发病机制的深入研究将有利于临床诊断和治疗。

**关键词:** 非酒精性脂肪性肝炎; 病理生理学; 分子生物学

胡迎宾. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制: 病理生理学和分子生物学. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1329-1334  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1329.asp>

### 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)被认为是代谢综合征在肝脏中的表现, 后者包括内脏性肥胖、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、血脂异常及高血压病。有一部分NAFLD患者可进一步发展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)。虽然这一具体过程尚不清楚, 但目前认为NASH以脂肪浸润、肝细胞损害、炎症和纤维化为其特征。本文将对NASH的病理生理学和分子生物学发病机制进行综述, 旨在为临床诊断和治疗提供依据。

### 1 导致肝脏中脂肪沉积的因素

以甘油三酯(triglycerides, TG)为主的脂肪在肝内沉积是发展为NAFLD和NASH的绝对必要条件, 远距离产生的内分泌激素(如胰岛素)以及局部产生的激素和细胞因子共同调控着肝脏的脂肪代谢。

**1.1 IR** IR是指体内周围组织对胰岛素的敏感性降低, 如肌肉、脂肪组织对胰岛素促进葡萄糖摄取的作用不敏感。为克服IR, 机体分泌更多的胰岛素并减少胰岛素的清除<sup>[1]</sup>, 从而导致其他组织脏器(如肝脏)的代谢变化。NAFLD患者常表现为高IR: 一方面是肌肉组织对葡萄糖的摄取

### ■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)被认为是代谢综合征在肝脏中的表现, 后者包括内脏性肥胖、胰岛素抵抗(IR)、血脂异常及高血压病。有一部分NAFLD患者可进一步发展为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。NASH以肝脏脂肪浸润、炎症、肝细胞损害和纤维化为特征, 可进一步发展为肝硬化及肝癌。游离脂肪酸向肝内转运和肝脏脂肪酸的从头合成导致肝细胞内脂肪超负荷。脂毒性引起氧化应激、炎症反应和肝细胞凋亡。随后慢性肝损伤激活纤维化反应发展至终末期肝病。本文将对NASH的病理生理学和分子生物学发病机制进行综述, 旨在为临床诊断和治疗提供依据。

### ■同行评议者

唐霓, 副研究员, 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室; 金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科

## ■研发前沿

尽管关于NASH的发病机制有了大量新的研究资料,但IR、炎症和纤维化三者间相互作用的具体过程,脂肪肝、NASH和心血管危险因素之间的联系,各种FFAs的不良反应,符合NASH发病机制的动物模型建立等问题都有待进一步解决。

减少及脂肪组织分解加速导致游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)增多;另一方面则是胰岛素对肝葡萄糖生成(hepatic glucose production, HGP)抑制减弱<sup>[2-4]</sup>。糖尿病患者IR较NAFLD更为严重,但NAFLD患者的IR是独立于糖尿病和/或肥胖的代谢缺陷<sup>[2,5]</sup>。

**1.2 肝脏的脂肪代谢障碍** 肝脏的脂肪代谢障碍可能与FFAs的浓度,脂肪酸的氧化合成以及极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)有关。NAFLD患者脂肪分解加速,大量FFAs向肝中转运,示踪研究显示肝中脂肪的氧化不仅没有减少而是增加,同时VLDL也相应增加<sup>[6]</sup>,提示FFAs可能是脂肪代谢障碍最为重要的因素。增加的FFAs即可来自于脂肪细胞和高脂饮食,也可通过肝内从头合成(*de novo* lipogenesis, DNL)产生<sup>[7]</sup>。人类和动物研究均发现内脏性脂肪的分解及FFAs动员至门静脉导致肝内IR<sup>[3,5]</sup>。在动物中给予高脂饮食出现肝细胞脂肪变性和HGP增加,而在人类中低热低脂饮食则减少肝中40%-80%的脂肪<sup>[8]</sup>。向肝内转运的FFAs不仅出现在脂肪餐后,即使是禁食的受试者也可通过动员腹部脂肪转运FFAs至肝<sup>[9]</sup>,提示血液中FFAs可能优先通过门静脉转运,导致肝内脂肪沉积。DNL是肝内FFAs增加的另一来源。在正常人禁食情况下, DNL对肝内FFAs的贡献约5%左右,而在NAFLD患者中, DNL对肝内FFAs的贡献增加至25%左右<sup>[10]</sup>。胰岛素通过固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)以及葡萄糖通过碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate response element binding protein, ChREBP)转录调控DNL<sup>[11]</sup>。

**1.3 脂肪因子** 脂肪组织(尤其是内脏性脂肪)的增加伴随着胰岛素增敏因子和抗炎因子的减少以及致炎因子的增加。炎症因子反过来通过调节脂肪细胞分泌代谢而增强IR。Kanda *et al*<sup>[12]</sup>研究表明单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)通过募集巨噬细胞在脂肪组织中产生炎症,加重脂肪肝和IR。NAFLD患者脂联素(adiponectin)水平降低,且与肝脏TG的含量成负相关<sup>[13]</sup>,这可能与抑制包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )在内的多种炎症因子有关<sup>[14]</sup>。瘦素(leptin)一方面参与肝内TG沉积和促炎效应,另一方面调节氧化应激反应<sup>[15-17]</sup>。抵抗素(resistin)在啮齿类是由脂肪细胞和单核细胞产生,而在人类主要是由脂肪组织中的间

质细胞产生<sup>[18]</sup>。肝内抵抗素在NASH患者中显著增加,并被炎症细胞所调节<sup>[19]</sup>。最近发现内脏性脂肪还能分泌一种致炎细胞因子,即内脏脂肪素(visfatin)<sup>[20]</sup>,也可能参与到NASH的发生中。

**1.4 过氧化物酶体增殖物激活受体** 过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)属于配体激活的转录因子中的核受体超家族,根据其结构及功能可分为3种亚型: PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$ 及PPAR $\gamma$ 。人工合成的PPAR $\gamma$ 配体(噻唑烷二酮类)已经用于治疗糖尿病,而PPAR $\alpha$ 配体(贝特类)则用于治疗高脂血症。PPAR $\gamma$ 激动剂通过活化AMP激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)促进胰岛素敏感的脂肪组织摄取和存储FFAs,同时抑制肝脏脂肪酸的合成<sup>[21]</sup>。PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 均有抗炎效应,并能改善脂肪沉积引起的IR<sup>[22]</sup>。近年来在NASH患者中发现给予PPAR $\gamma$ 激动剂治疗后,脂联素水平显著增加,而抵抗素、TNF- $\alpha$ 、IL-6和C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平则显著减低,并且肝脏脂肪变性明显改善<sup>[23]</sup>。

## 2 肝细胞脂肪超负载的损害机制

细胞中的脂肪超负载(fat-laden)可引起各种直接或间接的脂毒性作用。代谢调节异常、线粒体损害和氧化应激损伤肝细胞,并引发基因表达异常,最终导致炎症反应和细胞死亡<sup>[24]</sup>。

**2.1 线粒体功能障碍和氧化应激** FFAs的 $\beta$ 氧化、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的产生均在线粒体中进行。而研究发现NASH患者无论线粒体结构还是功能都发生异常。越来越多的证据表明IR和脂肪超负载导致线粒体功能障碍,ROS和RNS生成增加<sup>[25]</sup>。其中ROS又可抑制细胞色素c氧化酶,破坏含铁硫蛋白氧化还原酶的呼吸链以及损害线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)<sup>[26]</sup>,形成恶性循环。TNF- $\alpha$ 诱导一氧化氮合酶-2(nitric oxide synthase-2, NOS-2)增加RNS产物<sup>[27]</sup>,然后RNS通过硝基化酪氨酸残基破坏呼吸链或者直接损害DNA<sup>[28]</sup>。研究表明给ob/ob小鼠喂养尿酸饮食后,尿酸与过氧亚硝酸盐反应形成无活性的含氮尿酸盐,从而减少细胞色素c的破坏以及脂质过氧化物的生成<sup>[29]</sup>。FFAs增加还可活化细胞色素P450亚族CYP2E1和CYP4A10/4A14,导致ROS增加和线粒体呼吸链解偶联<sup>[25,30]</sup>。线粒体中的胆固醇也被证实与NASH患者的炎症浸润有关<sup>[31]</sup>。现在研究还发现非线粒体来源



的ROS, 例如来源于过氧化物酶体和微粒体的ROS, 枯否细胞(kupffer cells, KCs)和肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)产生的ROS, 也都参与NASH的氧化应激中<sup>[32-33]</sup>. NASH患者中反映脂质氧化损害的指标(硫巴比妥酸反应物、丙二醛、羟基壬烯醛、硝基酪氨酸蛋白、8-羟基-2'脱氧鸟嘌呤核苷和硫氧还蛋白)增加, 而反映抗氧化的因子(辅酶Q10、铜锌超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽转移酶)减少<sup>[34-36]</sup>, 提示氧化应激在促进和维持细胞损害的过程中起重要作用.

**2.2 NASH中肝细胞的坏死和凋亡** 尽管机体存在抗氧化应激系统, 但持续过度的细胞毒性仍可导致细胞坏死和/或凋亡<sup>[37-38]</sup>. 与对照组相比, NASH患者中抗凋亡因子Bcl-2继发性增加<sup>[39]</sup>, 提示测定血浆中凋亡产物以及抑制死亡受体介导的凋亡有可能为NASH的诊断和治疗提供线索.

**2.3 NASH与基因表达调控** 转录因子Sp1和Sp3已被证实参与NASH的发生发展过程, 他们通过激活I型胶原的表达促进纤维化的形成<sup>[40]</sup>, 而转录因子CCAAT增强子结合蛋白- $\beta$ (CCAAT enhancer binding protein- $\beta$ , C/EBP- $\beta$ )则参与脂肪代谢、炎症反应和内质网应激等过程<sup>[41]</sup>. 调控抗氧化基因表达的转录因子Nrf-1和调控氧化应激适应性反应的转录因子APE/Ref-1在NASH患者中均显著升高<sup>[42]</sup>. 新近研究发现PI3K-Akt-PTEN信号转导通路缺陷的小鼠在40 wk后发展为NASH, 在80 wk后则发展为肝癌<sup>[43]</sup>, 提示炎症反应和血管生成可能是两者的共同之处.

### 3 NASH中的炎症和纤维化

除了肝细胞损害外, 炎症和纤维化也是从脂肪变性过渡到脂肪性肝炎的重要特征. 在慢性肝病患者中, 肝脏炎症是肝纤维化发生发展的独立危险因素. 因此细胞损害, 炎症和纤维化三者之间关系密切.

**3.1 肝脏中的炎症信号通路** 在动物模型和NASH患者中, 肝脏NF- $\kappa$ B的表达显著增加, 活化的NF- $\kappa$ B通过信号转导通路介导肝脏炎症、脂肪变性和IR<sup>[44-45]</sup>. 在基因敲除I $\kappa$ B激酶 $\beta$ (I $\kappa$ B kinase  $\beta$ , IKK $\beta$ )小鼠中, 给予高脂饮食后仍然保留对胰岛素的敏感性, 而另一项研究认为基因敲除IKK $\gamma$ /NEMO(NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO)的肝细胞引起脂肪性肝炎和肝细胞癌<sup>[46-47]</sup>. 这一方面说明NF- $\kappa$ B调控的复杂性, 另外一方面说明完全抑制NF- $\kappa$ B活性可能导致肿瘤发生.

TNF诱导的c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号转导通路也参与到NASH中的炎症和IR. 同时敲除JNK-1和JNK-2的小鼠肝脏炎症和IR均显著降低<sup>[48]</sup>, 而仅敲除JNK-2的小鼠则与野生型小鼠相近<sup>[49]</sup>, 提示抑制JNK-1对减轻脂肪沉积引起的肝细胞损害更为有效.

TNF- $\alpha$ 和IL-6在NASH患者中显著增加, 他们受NF- $\kappa$ B、JNK或p38 MAPK等信号转导通路调控<sup>[50]</sup>. 在ob/ob小鼠和高脂饮食模型中, 抑制TNF- $\alpha$ 能够显著减轻脂肪变性、炎症和肝细胞损害<sup>[51]</sup>. 另外的研究则发现敲除TNF- $\alpha$ 或TNFR1基因的小鼠在脂肪性肝炎、脂质过氧化和肝细胞损害方面与野生型小鼠差异不大<sup>[45]</sup>. IL-6也是一个存在争议的细胞因子, 他可通过JAK-STAT信号转导通路促进肝细胞再生而减轻小鼠脂肪肝<sup>[52]</sup>. 尽管如此, IL-6缺陷的小鼠却能改善IR<sup>[53]</sup>, 这可能与JAK-STAT通路的负性调控分子家族细胞因子信号转导抑制因子(suppressors of cytokine signaling, SOCS)有关. 其中SOCS-1和SOCS-3可以阻断胰岛素受体信号导致IR<sup>[54]</sup>. SOCS还可干扰瘦素受体信号, 可能与瘦素抵抗有关.

**3.2 其他致炎机制** 近来研究认为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)也参与到NASH的炎症过程中, 这与肠道细菌代谢产物入血后作用于KCs有关. PRRs包括Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)和其他识别内毒素等细胞代谢产物的受体<sup>[55-56]</sup>. TLRs活化后通过NF- $\kappa$ B促进炎症因子和致纤维化因子的分泌<sup>[57]</sup>. 在NASH患者和动物模型中发现IL-8和MCP-1也通过NF- $\kappa$ B途径而表达增加, 他们分别促进中性粒细胞和单核细胞的浸润<sup>[50,58]</sup>.

**3.3 肝纤维化机制** 虽然肝纤维化和肝硬化是所有慢性肝病的最终结果, 但NASH所致肝纤维化与其他肝损害所致肝纤维化有所不同. NASH所致纤维化主要发生在小叶中央区, Disse腔周围纤维组织较厚, 而包绕肝细胞团的纤维组织较薄. NASH的致纤维化因素除了HSCs外, 还与脂肪因子、氧化应激和IR密切相关.

### 4 结论

FFAs向肝内转运和肝脏脂肪酸的从头合成导致肝细胞内脂肪超负载. 脂毒性和细胞死亡激活炎症反应信号转导通路, 促进炎症细胞浸润, 加重细胞损害及纤维化. 尽管关于NASH的发病机

#### ■应用要点

对非酒精性脂肪性肝炎病理生理学和分子生物学发病机制的深入研究将有利于临床诊断和治疗.

# 同行评价

本文内容新颖, 逻辑性强, 参考文献引用合理, 是一篇临床实用性较强的优秀文章。

制有了大量新的研究资料, 但IR、炎症和纤维化三者间相互作用的具体过程, 脂肪肝、NASH和心血管危险因素之间的联系, 各种FFAs的不良反应, 符合NASH发病机制的动物模型建立等问题都有待进一步解决。只有研究更加深入, 才能最终找到NASH的有效诊断和治疗方法。

## 参考文献

- 1 Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4753-4761
- 2 Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005; 48: 634-642
- 3 Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3023-3028
- 4 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192
- 5 Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, DeFronzo RA. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007; 133: 496-506
- 6 Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175-1183
- 7 Carpentier A, Patterson BW, Leung N, Lewis GF. Sensitivity to acute insulin-mediated suppression of plasma free fatty acids is not a determinant of fasting VLDL triglyceride secretion in healthy humans. *Diabetes* 2002; 51: 1867-1875
- 8 Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 603-608
- 9 Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004; 113: 1582-1588
- 10 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343-1351
- 11 Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1139-1142
- 12 Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116: 1494-1505
- 13 Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de Iasio R, Gentilcore E, Natale S, Cassader M, Rizzetto M, Pasquali R, Marchesini G. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3498-3504
- 14 Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473-2476
- 15 Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, Barzilai N. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J* 2007; 21: 53-60
- 16 Huang W, Dedousis N, O'Doherty RM. Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2260-2265
- 17 Marra F. Leptin and liver tissue repair: do rodent models provide the answers? *J Hepatol* 2007; 46: 12-18
- 18 Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 2005; 48: 2203-2205
- 19 Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzinghi B, Romagnani P, Milani S, Ginés P, Colmenero J, Parola M, Gelmini S, Tarquini R, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2006; 169: 2042-2053
- 20 Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007; 178: 1748-1758
- 21 Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152
- 22 Gastaldelli A, Miyazaki Y, Mahankali A, Berria R, Pettiti M, Buzzigoli E, Ferrannini E, DeFronzo RA. The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. *Diabetes Care* 2006; 29: 2275-2281
- 23 Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 2297-2307
- 24 Rubio A, Guruceaga E, Vázquez-Chantada M, Sandoval J, Martínez-Cruz LA, Segura V, Sevilla JL, Podhorski A, Corrales FJ, Torres L, Rodríguez M, Aillet F, Ariz U, Arrieta FM, Caballería J, Martín-Duce A, Lu SC, Martínez-Chantar ML, Mato JM. Identification of a gene-pathway associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 46: 708-718
- 25 Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it.

- Mitochondrion* 2006; 6: 1-28
- 26 Paradies G, Ruggiero FM, Gadaleta MN, Quagliariello E. The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the activity of the phosphate carrier and on the phospholipid composition in rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1103: 324-326
  - 27 Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, Carmona P, Hernández-Muñoz I, Siles E, De La Torre P, Ruiz-Cabello J, García I, Solís-Herruzo JA. Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 13353-13361
  - 28 Szabó C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1753-1758
  - 29 García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 2006; 44: 581-591
  - 30 Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075
  - 31 Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006; 4: 185-198
  - 32 Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 1998; 273: 15639-15645
  - 33 De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006; 131: 272-275
  - 34 Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62
  - 35 Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygur A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 850-855
  - 36 Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Furutani M, Hirohama A, Kakisaka Y, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H, Yodoi J. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 32-38
  - 37 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
  - 38 Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33
  - 39 Ramalho RM, Cortez-Pinto H, Castro RE, Solá S, Costa A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Apoptosis and Bcl-2 expression in the livers of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 21-29
  - 40 García-Ruiz I, de la Torre P, Díaz T, Esteban E, Fernández I, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 30551-30558
  - 41 Rahman SM, Schroeder-Gloeckler JM, Janssen RC, Jiang H, Qadri I, Maclean KN, Friedman JE. CCAAT/enhancing binding protein beta deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45: 1108-1117
  - 42 Xu Z, Chen L, Leung L, Yen TS, Lee C, Chan JY. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4120-4125
  - 43 Watanabe S, Horie Y, Suzuki A. Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2005; 33: 161-166
  - 44 Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-190
  - 45 Dela Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1663-1674
  - 46 Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198
  - 47 Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, Roskams T, Trautwein C, Pasparakis M. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2007; 11: 119-132
  - 48 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336
  - 49 Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006; 43: 163-172
  - 50 Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, Birkeland K, Bjørø K, Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006; 44: 1167-1174
  - 51 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity

- and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 52 Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004; 40: 933-941
- 53 Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 3417-3427
- 54 Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 365-371
- 55 Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palù G, Martinez D. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G571-G578
- 56 Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 2006; 130: 1886-1900
- 57 Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 1324-1332
- 58 Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, dela Peña A, Horsmans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2004; 41: 926-934

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志计量单位标准

**本刊讯** 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa( $M$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ ( $A$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 $u$ (小写正体). 计量单位在+、-、 $\pm$ 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d,  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 $\text{CO}_2$ 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg $\cdot$ d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5%  $\text{CO}_2$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



# Smad4在消化系统肿瘤发生中的作用

张朋彬, 李宜辉

张朋彬, 李宜辉, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化科 重庆市 400037

作者贡献分布: 张朋彬, 李宜辉对此文所作贡献均等.

通讯作者: 张朋彬, 400037, 重庆市. 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科. zpb666@sina.com

电话: 023-68774204

收稿日期: 2009-02-17 修回日期: 2009-03-24

接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-08

## Role of Smad4 gene in the development of gastrointestinal cancer

Peng-Bin Zhang, Yi-Hui Li

Peng-Bin Zhang, Yi-Hui Li, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400037, China

Correspondence to: Peng-Bin Zhang, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400037, China. zpb666@sina.com

Received: 2009-02-17 Revised: 2009-03-24

Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-08

### Abstract

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multifunctional cell factor, which can inhibit the growth of most normal cells and cancer cells. Smad4 is a intracellular mediator of TGF- $\beta$ , and it conducts TGF- $\beta$  signal from cell membrane to the nucleus, and regulates transcriptions of the target genes. Researches have revealed that abnormal expression of Smad4 could cause pre-cancerous diseases, induce carcinogenesis, and influence the biological features of tumor cells.

**Key Words:** Smad4 gene; Gastrointestinal cancer; Transforming growth factor- $\beta$

Zhang PB, Li YH. Role of Smad4 gene inactivation in the development of gastrointestinal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1335-1338

### 摘要

转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ , TGF- $\beta$ )是一多功能的细胞因子,对细胞的生长分化具有调节作用. Smad4为TGF- $\beta$ 细胞内信使,也是一抑癌基因,能抑制多数细胞的生

长,对肿瘤的生长也具有抑制作用. 目前研究发现, Smad4的表达异常,可诱发胃肠道癌前疾病的发生,并促进这些癌前疾病向肿瘤的发展,并影响肿瘤细胞的生物学特性.

**关键词:** Smad4基因; 消化系统肿瘤; 转化生长因子- $\beta$

张朋彬, 李宜辉. Smad4在消化系统肿瘤发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1335-1338

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1335.asp>

### 0 引言

转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )是一多功能的细胞因子,对细胞的生长分化具有调节作用. 他能抑制多数细胞的生长,对肿瘤的生长也具有抑制作用. 目前研究发现,部分消化系统肿瘤并不受TGF- $\beta$ 抑制,这是由于TGF- $\beta$ 受体或TGF- $\beta$ 的信号传导的细胞内信使-Smad4蛋白的表达发生了异常,造成TGF- $\beta$ 信号传递中断,使肿瘤细胞逃脱了TGF- $\beta$ 的抑制作用<sup>[1]</sup>.

### 1 Smad4蛋白介导TGF- $\beta$ 对细胞生长的抑制作用

TGF- $\beta$ 能够抑制多数细胞的生长,如上皮细胞、内皮细胞、血液细胞等,并可使这些细胞停滞于G<sub>1</sub>期<sup>[2-3]</sup>. 在信号传递时, TGF- $\beta$ 首先与细胞膜上II型受体(type II TGF- $\beta$  receptor, T $\beta$ R II)结合,二者结合后,可使I型受体(type I TGF- $\beta$  receptor, T $\beta$ R I)加入这一复合体并将T $\beta$ R I活化. T $\beta$ R I通过磷酸化受体活化性Smad(receptor-activated smads, R-Smads)的MH2区而将后者激活, R-Smads活化后与共享性Smad(common-mediator smad, co-Smad)结合,形成Smad复合体,转入细胞核,通过直接与DNA结合或与其他转录因子协同,调节基因的表达式<sup>[4-7]</sup>. 在TGF- $\beta$ 信号从细胞膜传至细胞核过程中, R-Smads与co-Smad缺一不可,否则TGF- $\beta$ 信号不能从细胞膜传至细胞核,造成TGF- $\beta$ 信号传递中断. Smad蛋白共分三类,除前述R-Smads及co-Smad外,还包括抑制性Smad(inhibitory Smads, I-Smads),其中co-

### ■背景资料

Smad4基因,又称DPC4基因,是近期新发现的一抑癌基因,最初从胰腺癌中发现. 近年来, Smad4在胃肠道肿瘤中的作用越来越受到重视. Smad4的表达缺失或突变,可诱发胃肠道癌前疾病的发生,促进这些癌前疾病向肿瘤发展,并影响了这些肿瘤的生物学行为,如侵袭和转移等. 研究Smad4在肿瘤的发生发展中的作用,对于认识肿瘤的发生机理及预后有着积极的指导意义.

### ■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

## ■研发前沿

Smad4表达缺失或突变使细胞逃脱了TGF- $\beta$ 的抑制作用,促进了癌前病变的发生及其向癌的转化,并影响了癌细胞的生物学行为。研究Smad4基因在肿瘤发生中的机制及作用,有助于肿瘤的预防及治疗。

Smad为Smad4。

Smad4又称DPC4(homozygously deleted in pancreatic carcinoma, locus 4, DPC4),最初作为抑癌基因从胰腺癌中筛选出来<sup>[8]</sup>。人类Smad4编码基因位于染色体18q21.1,他含有11个外显子,转录552个氨基酸。在结构上,Smad4与R-Smads相似,含有两个高度保守的功能区,即氨基端的MH1区和羧基端的MH2区,二者之间为连接区(linker)。MH1区在细胞核中可与DNA或其他转录因子结合,指导目的基因的转录;MH2区则是Smad磷酸化及活化的部位,也是形成Smad同聚体或异聚体的结合部位,MH2区的突变可造成其结构及功能的异常,造成TGF- $\beta$ 信号中断<sup>[9-13]</sup>。

## 2 Smad4在癌前疾病中的表达

家族性幼年性息肉病(familial juvenile polyposis, FJP)是一常染色体显性遗传疾病,多发于幼年时期,其胃肠道易发生错构瘤样息肉,这些息肉有较强的癌变倾向<sup>[14-15]</sup>。Howe *et al*研究发现,9例FJP中有5例发生了Smad4突变,其中多数是由于第9外显子,主要表现为碱基缺失,造成移码突变(frameshift mutation),使MH2区功能丧失,阻碍了磷酸化及同(异)聚体的形成<sup>[16]</sup>。Woodford-Richens *et al*对FJP息肉中Smad4基因及Smad4蛋白表达研究发现,伴有Smad4基因胚系突变的息肉中,Smad4蛋白表达也明显减少,而无胚系突变的息肉中Smad4蛋白表达正常。伴有Smad4突变的息肉中基质较少,上皮细胞数较多,有较强的癌变倾向<sup>[17]</sup>。目前研究表明,在25%-60%的FJP中存在Smad4基因胚系突变<sup>[18-21]</sup>。

动物实验表明,通过基因敲除手段,部分Smad4(+/-)小鼠在50 wk后胃及十二指肠即可发生息肉样病变,在100 wk后所有Smad4(+/-)小鼠均发生了息肉样病变。这些息肉与人类FJP相似,无Smad4蛋白表达,说明Smad4的灭活促进了息肉的形成,而且部分息肉中可见癌变发生<sup>[22]</sup>。

家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)是一常染色体显性遗传病,表现为结肠布满腺瘤样息肉,若不作治疗,患者多于35-40岁左右发生结肠癌<sup>[23-24]</sup>。FAP的发生与结肠腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)突变密切相关<sup>[25]</sup>。APC蛋白能下调Wnt信号途径,对细胞的迁移、黏附及分裂具有重要影响。APC基因的突变造成APC蛋白功能的障碍,致使Wnt信号途径调节障碍,导致某些基因过度表达(如*c-myc*),造成细胞生长过度,易发生

癌变。小鼠敲除APC基因后,其胃肠道可发生息肉样病变,与FAP相似,常用来制作FAP模型<sup>[26]</sup>。Takaku *et al*研究发现,同时敲除APC及Smad4基因(APC+/- Smad4+/-)的小鼠,其胃肠道息肉恶性程度较单独敲除APC基因(APC+/-)小鼠的恶性程度明显增高。在第14周时,APC+/- Smad4+/-小鼠胃肠道息肉平均为1-2 mm,而APC+/-小鼠<0.5 mm;APC+/-小鼠病息肉多局限于黏膜层内,而APC+/- Smad4+/-小鼠息肉常突破黏膜下层,发生癌变。APC+/- Smad4+/-小鼠发生癌变的细胞侵袭能力较强,在第18周时将3例癌变细胞进行种植,全部成功,而2例APC+/-小鼠癌变细胞种植均未成功。提示Smad4的缺失促进了息肉的发生,对息肉的癌变起了促进作用,并影响着癌细胞的生物学特性<sup>[27]</sup>。

## 3 Smad4在癌组织中的表达

肿瘤的发生是多基因多因素的过程。在胰腺癌的发生发展过程中,有多种基因发生了异常,如K-ras, *p53*等<sup>[28]</sup>。Harn *et al*首先发现,在84例胰腺癌中,有25例发生了Smad4同源缺失;27例胰腺癌中,有6例发生了Smad4突变<sup>[8]</sup>,而这些突变多数位于MH2区<sup>[29]</sup>。动物实验表明,在胰腺癌的发展过程中,Smad4缺失可加速K-ras诱发的胰管癌的发展过程<sup>[30]</sup>。此外,Smad4在肿瘤组织中与肿瘤分化程度有关。Hua *et al*通过免疫组化研究发现,34例胰腺癌中8例无Smad4表达,与高中分化胰腺癌相比,其在低分化腺癌的表达更少( $P = 0.037$ ),表达Smad4胰腺癌患者预后好于无表达者<sup>[31]</sup>。

除胰腺癌外,Smad4在结肠癌及胃癌中的表达也出现异常。一般认为,在结肠癌中,Smad4的突变是一晚期事件。目前研究也表明,在结肠癌及胃癌中,Smad4蛋白的表达在高分化癌组织中无明显变化,但在低分化癌组织中表达明显减少<sup>[32-34]</sup>。Miyaki *et al*对176例结肠癌研究发现,95%的Smad4突变发生在MH2区,其中腺瘤中Smad4突变率为0%,黏膜内癌为10%,无转移时为7%,伴有远处转移时为35%,广泛转移时为31%,提示Smad4的突变诱发了结肠癌的发生,并对癌细胞的侵袭转移等生物学行为产生了影响<sup>[35]</sup>。

Smad4的表达与肿瘤的预后相关。Boulay *et al*对结肠癌行5-氟尿嘧啶化疗的患者进行了分析,研究发现,在202例患者中,有135例发生Smad4基因缺失,发生率为67%;正常表达Smad4

的结肠癌患者的预后明显好于不表达者<sup>[36]</sup>。

#### 4 其他癌基因对Smad4的影响

在消化系统肿瘤中, 多伴有Ras癌基因的激活, Ras癌基因可使细胞获得无限增殖能力, 并使这些细胞不受TGF- $\beta$ 抑制。Saha *et al*研究发现, Ras癌基因产物可通过泛素-蛋白酶系统降解Smad4蛋白, 使细胞内Smad4蛋白水平明显降低, 同时Smad4蛋白降解产物增加, Smad2/3与Smad4形成复合体减少, 相应进入细胞核的Smad复合体减少, TGF- $\beta$ 信号传递减弱, 若强制表达Smad4, 或灭活Ras癌基因, 可恢复TGF- $\beta$ 信号传递, 说明Ras癌基因产物部分通过降解Smad4而促进了细胞增殖<sup>[37]</sup>。

#### 5 结论

肿瘤的发生是多种因素造成的。肿瘤细胞常具有以下几个特点: 能够抵抗生长抑制因子的作用, 能够在无外源性生长因子时生长、侵袭和转移, 有无限增殖能力<sup>[38]</sup>。Smad4表达缺失或突变使细胞逃脱了TGF- $\beta$ 的抑制作用, 促进了癌前病变的发生及其向癌的转化, 并影响了癌细胞的生物学行为。研究Smad4基因在肿瘤发生中的机制及作用, 有助于肿瘤的预防及治疗。

#### 6 参考文献

- 1 Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078-2093
- 2 Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-2810
- 3 Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998; 95: 737-740
- 4 Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 383-408
- 5 Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997; 16: 5353-5362
- 6 Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 2002; 10: 283-294
- 7 Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Doré JJ Jr, Leof EB. Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4750-4759
- 8 Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353
- 9 Massague J. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev*

- 2003; 17: 2993-2997
- 10 Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997; 388: 87-93
- 11 Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 1998; 94: 585-594
- 12 Wrana JL. Crossing Smads. *Sci STKE* 2000; 2000: RE1
- 13 de Caestecker MP, Hemmati P, Larisch-Bloch S, Ajmera R, Roberts AB, Lechleider RJ. Characterization of functional domains within Smad4/DPC4. *J Biol Chem* 1997; 272: 13690-13696
- 14 Zbuk KM, Eng C. Hamartomatous polyposis syndromes. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 492-502
- 15 Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1634-1640
- 16 Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998; 280: 1086-1088
- 17 Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Poulson R, Bevan S, Salovaara R, Aaltonen LA, Houlston RS, Wright NA, Tomlinson IP. Comprehensive analysis of SMAD4 mutations and protein expression in juvenile polyposis: evidence for a distinct genetic pathway and polyp morphology in SMAD4 mutation carriers. *Am J Pathol* 2001; 159: 1293-1300
- 18 Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF, Ringold J, Larsen-Haidle J, Merg A, Mitros FA, Vaccaro CA, Petersen GM, Giardiello FM, Tinley ST, Aaltonen LA, Lynch HT. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J Med Genet* 2004; 41: 484-491
- 19 Pyatt RE, Pilarski R, Prior TW. Mutation screening in juvenile polyposis syndrome. *J Mol Diagn* 2006; 8: 84-88
- 20 Handra-Luca A, Condroyer C, de Moncuit C, Tepper M, Fléjou JF, Thomas G, Olschwang S. Vessels' morphology in SMAD4 and BMPR1A-related juvenile polyposis. *Am J Med Genet A* 2005; 138A: 113-117
- 21 Friedl W, Uhlhaas S, Schulmann K, Stolte M, Löff S, Back W, Mangold E, Stern M, Knaebel HP, Sutter C, Weber RG, Pistorius S, Burger B, Propping P. Juvenile polyposis: massive gastric polyposis is more common in MADH4 mutation carriers than in BMPR1A mutation carriers. *Hum Genet* 2002; 111: 108-111
- 22 Takaku K, Miyoshi H, Matsunaga A, Oshima M, Sasaki N, Taketo MM. Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res* 1999; 59: 6113-6117
- 23 Näthke IS. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 337-366
- 24 Clark S, Hyer W, Guenther T. Familial adenomatous polyposis. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1463-1464; author reply 1464-1465
- 25 Fodde R, Smits R. Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol Med* 2001; 7: 369-373
- 26 McCart AE, Vickaryous NK, Silver A. Apc mice: models, modifiers and mutants. *Pathol Res Pract*

#### ■ 相关报道

一般认为, 在结肠癌中, Smad4的突变是一晚期事件。目前研究也表明, 在结肠癌及胃癌中, Smad4蛋白的表达在高分化癌组织中无明显变化, 但在低分化癌组织中表达明显减少。

## ■同行评价

本文综述了抑癌基因Smad4在消化系统肿瘤发生中的作用, 文章条理清楚, 层次分明, 参考文献引用合理, 对消化系统基础与临床研究有一定的参考价值。

- 2008; 204: 479-490
- 27 Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998; 92: 645-656
- 28 Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006; 20: 1218-1249
- 29 Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 1998; 4: 257-262
- 30 Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, Jhala NC, Kim HG, Schoeb TR, Grizzle WE, Klug CA. Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res* 2007; 67: 8121-8130
- 31 Hua Z, Zhang YC, Hu XM, Jia ZG. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2764-2767
- 32 肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫. 结肠癌组织Smad4蛋白表达的意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1065-1068
- 33 张朋彬, 徐采朴, 史景泉. SMAD4蛋白在胃癌组织中表达的研究. *第三军医大学学报* 2001; 23: 1021-1023
- 34 Kim JY, Park DY, Kim GH, Choi KU, Lee CH, Huh GY, Sol MY, Song GA, Jeon TY, Kim DH, Sim MS. Smad4 expression in gastric adenoma and adenocarcinoma: frequent loss of expression in diffuse type of gastric adenocarcinoma. *Histol Histopathol* 2005; 20: 543-549
- 35 Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999; 18: 3098-3103
- 36 Boulay JL, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, Laffer U, Herrmann R, Rochlitz C. SMAD4 is a predictive marker for 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 630-634
- 37 Saha D, Datta PK, Beauchamp RD. Oncogenic ras represses transforming growth factor-beta /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 2001; 276: 29531-29537
- 38 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿拉伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



# 毫针不同刺激强度对胃扩张疼痛大鼠脊髓背角NMDA受体和P物质的影响

彭艳, 易受乡, 李振海, 林亚平, 唐森

彭艳, 易受乡, 李振海, 林亚平, 唐森, 湖南中医药大学针灸推拿学院 经穴与脏腑相关重点实验室 国家中医药管理局三级实验室 湖南省长沙市 410007

国家重大基础研究(973)基金资助项目, No. 2005-CB523306-9

湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJ50049

湖南省教育厅基金资助项目, No. 08C632

作者贡献分布: 此课题由易受乡与林亚平设计; 研究过程由李振海、唐森及彭艳操作完成; 研究所用工具由易受乡、李振海及唐森提供; 数据分析由李振海与唐森完成; 本论文写作由彭艳与李振海完成。

通讯作者: 易受乡, 教授, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学东塘校区. yishouxiang@yahoo.com.cn  
电话: 0731-5381161

收稿日期: 2009-02-27 修回日期: 2009-03-26

接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-05-08

## Effect of acupuncture with varied intensity on NMDA and SP expression in spinal dorsal horn in rats with gastric distension-induced pain

Yan Peng, Shou-Xiang Yi, Zhen-Hai Li, Ya-Ping Lin, Sen Tang

Yan Peng, Shou-Xiang Yi, Zhen-Hai Li, Ya-Ping Lin, Sen Tang, Major Laboratory of Meridians and Viscera, Tertiary Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Institute of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 program), No. 2005-CB523306-9; the Natural Science Foundation of Hunan, No. 06JJ50049; and the Subject of Hunan Education Department, No. 08C632

Correspondence to: Professor Shou-Xiang Yi, Institute of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, Hunan Province, China. yishouxiang@yahoo.com.cn  
Received: 2009-02-27 Revised: 2009-03-26

Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of varied intensity acupuncture on pain-ethology scoring and on expression of n-methyl-d-aspartate receptor (NMDA receptor) and substance P (SP) in spinal dorsal horn quasi-pain in rats with pain induced by gastric distension.

**METHODS:** Fifty healthy male Sprague Dawley

rats were randomly assigned to blank, sham operation, model, acupuncture of lighter stimulus intensity at "Zusanli" point and acupuncture of heavier stimulus intensity at "Zusanli" point groups. Gastric distention model was established by applying implanted aerostat in the gastric and filling in gas to 40 mmHg. Acupuncture of lighter and heavier stimulus intensity was applied. Pain-ethology scoring was observed and expression of NMDA receptor and SP was detected using immunohistochemical method.

**RESULTS:** Compared with sham operation group, pain-ethology scoring and expression of NMDA receptor in spinal dorsal horn of model group were increased significantly (both  $P < 0.01$ ). After acupuncture, pain-ethology scoring was decreased significantly ( $11.77 \pm 2.16$  vs  $22.83 \pm 1.87$ ,  $14.73 \pm 2.19$  vs  $21.73 \pm 2.30$ , both  $P < 0.01$ ). Compared with model group, expression of NMDA receptor and SP in spinal dorsal horn of the two acupuncture groups was decreased significantly ( $140.60 \pm 21.30$  vs  $240.20 \pm 25.59$ ,  $63.60 \pm 13.74$  vs  $108.67 \pm 11.37$ ;  $63.60 \pm 13.74$  vs  $108.67 \pm 11.37$ ,  $82.67 \pm 12.13$  vs  $108.67 \pm 11.37$ , all  $P < 0.01$ ), and acupuncture of lighter stimulus intensity group had more obvious effect.

**CONCLUSION:** Acupuncture at "Zusanli" could relieve stress reaction induced by gastric distension and decrease pain-ethology scoring, which is related to inhibited expression of pain correlation information substances (NMDA and SP).

**Key Words:** Acupuncture; Stimulus; Gastric distention; Visceral pain; Pain-ethology scoring; Dorsal root ganglion; Comu posterus medullae spinalis; N-methyl-d-aspartate; Substance P

Peng Y, Yi SX, Li ZH, Lin YP, Tang S. Effect of acupuncture with varied intensity on NMDA and SP expression in spinal dorsal horn in rats with gastric distension-induced pain. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1339-1345

## 摘要

**目的:** 探讨毫针不同刺激强度针刺足三里穴

## ■背景资料

内脏痛是临床上极为普遍的症状, 大都疼痛弥散, 难以定位, 伴有牵涉痛, 运动和自主神经反射增强, 皮肤肌肉组织痛觉增敏, 持续的刺激可以由不痛进展为疼痛等特点. 近年来的研究表明, 针灸对内脏痛、内脏痛觉增敏具有良好的调节作用。

## ■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

## ■研究前沿

目前研究已表明,内脏痛信息在神经系统内的转导是一个相当复杂的过程,多条上行通路和高位中枢的许多核团参与其中,在这个过程中,神经元中的神经活性物质及受体、调节酶和钙离子通道对内脏痛信息的传递发挥了重要作用。尽管已经取得了一定的进展,但仍未能完全解释内脏痛复杂的产生机制及治疗机制,有待深入探讨。

后对胃扩张大鼠的拟痛行为学、脊髓背角N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体表达和P物质(SP)含量的影响。

**方法:** 50只大鼠按完全随机法分成5组,分别为空白组、假手术组、模型组、轻手法组和重手法组。采用胃内植入气囊并充气压40 mmHg造成胃扩张疼痛模型,轻手法和重手法针刺足三里穴为施治因素,以拟痛行为学评分标准观察其拟痛行为学,用免疫组织化学法检测脊髓背角中NMDA受体表达和SP含量。

**结果:** 与假手术组比较,胃扩张造模后,大鼠拟痛行为学评分和脊髓背角内NMDA受体均明显增加( $P<0.01$ );轻、重手法针刺均能明显降低胃扩张疼痛大鼠的疼痛反应,与针前比较有非常显著性意义( $11.77\pm 2.16$ 分 vs  $22.83\pm 1.87$ 分,  $14.73\pm 2.19$ 分 vs  $21.73\pm 2.30$ 分,均 $P<0.01$ );并能降低NMDAR受体( $140.60\pm 21.30$  vs  $240.20\pm 25.59$ ,  $63.60\pm 13.74$  vs  $108.67\pm 11.37$ ,均 $P<0.01$ )、SP阳性细胞数( $63.60\pm 13.74$  vs  $108.67\pm 11.37$ ,  $82.67\pm 12.13$  vs  $108.67\pm 11.37$ ,均 $P<0.01$ ),与模型组比较差异有非常显著性意义;且轻手法组优于重手法组( $P<0.01$ )。

**结论:** 不同刺激强度针刺足三里后,减轻了胃扩张疼痛大鼠的应激反应,其作用机制是抑制脊髓背角内疼痛相关信息物质NMDA受体激活和SP的释放。

**关键词:** 毫针; 刺激; 胃扩张; 疼痛; 拟痛行为学评分; 背根神经节; 脊髓背角; N-甲基-D-天冬氨酸; P物质

彭艳, 易受乡, 李振海, 林亚平, 唐森. 毫针不同刺激强度对胃扩张疼痛大鼠脊髓背角NMDA受体和P物质的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1339-1345

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1339.asp>

## 0 引言

针灸治疗疾病已有几千年的历史,其操作手法经过历代的传承和发展,单式和复式手法有上百种之多。针灸的临床操作追求的是疗效,如何将这此手法简化操作,稳定并扩大疗效是当代针灸理论和临床研究者的重要课题。本课题组曾在以往研究中证明了针灸对胃运动、胃分泌具有调整作用,对胃黏膜具有保护作用,探讨其可能的机制,并从基因表达水平进行了研究<sup>[1-3]</sup>。针刺对胃痛有什么样的调整作用? 现有资料表明针刺对内脏痛调整作用与其影响其感觉传入神经传入

通路上的递质有关,故本研究探讨针刺传入信号对其神经递质影响如何? 其作用机制为何? 不同毫针强度对内脏痛疗效是否有差异? 我们选择胃扩张疼痛大鼠作为研究对象,观察毫针不同刺激强度对其拟痛行为学,脊髓背角N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体表达、P物质(Substance P, SP)等含量的变化影响,探讨针刺缓解内脏痛是否通过影响其感觉传入通路上相关神经递质有关,并进一步比较不同刺激强度对这种变化是否存在差异,为针刺刺激量与针刺效应间关系的机制研究提供实验依据,也为针刺治疗胃痛临床和理论研究提供参考。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康SD  $\delta$  大鼠50只,清洁级,体质量270-310 g,月龄3-4 mo,由湖南中医药大学实验动物中心提供。SABC免疫组织化学试剂盒、Rabbit anti-Substance试剂、Rabbit anti-NMDAR-2B试剂、DAB显色素为武汉博士德生物技术有限公司生产。冰冻切片机(CM1850, 德国莱卡),LEICA DM LB2型双目显微镜(德国LEICA公司),Motic B5显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司),MIAS医学图像分析系统(北京航空航天大学)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 50只大鼠完全随机分为5组: A空白组, B假手术组(植入气囊但不做胃扩张), C胃扩张模型组, D胃扩张模型+毫针轻手法组, E胃扩张模型+毫针重手法组, 每组10只。

**1.2.2 造模:** 参照Rouzade *et al*<sup>[4]</sup>和Traub *et al*<sup>[5]</sup>报道的方法,术前禁食12 h,自由饮水。除空白束缚组外,其他各组均以下述方法植入气囊。术后给以青霉素抗炎,当天禁食,给以100 g/L葡萄糖10 mL大鼠尾静脉注射,次日按常规喂养,若3 d后仍不能自由活动、不进食饮水者予以剔除。于手术后3、11 d进行胃扩张,经改装的台式水银血压计通过一个三通管与胃扩张气囊软管及50 mL的注射器相连,给予40 mmHg<sup>[6]</sup>(1 mmHg = 0.133 kPa)压力的时相性胃扩张(充气5 min,间歇10 min,交替进行,15 min为1轮,共3轮),使大鼠产生胃扩张疼痛同时进行拟痛行为学评分。

**1.2.3 穴位定位:** 根据新世纪全国高等中医药院校规划教材《实验针灸学》<sup>[7]</sup>大鼠针灸穴位定位方法及拟人比照法定取足三里穴: 又名后三里,在膝关节后外侧,腓骨小头下约5 mm处。

**1.2.4 针刺方法:** 以医用15 mm、28号毫针针刺

表 1 各组大鼠拟痛行为学评分比较 (份,  $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	针刺处理前	针刺处理后	针刺前后差值
空白组	6.00 $\pm$ 1.70	5.23 $\pm$ 1.62	0.70 $\pm$ 0.57
假手术组	6.67 $\pm$ 1.74	5.43 $\pm$ 1.31	1.23 $\pm$ 1.07
模型组	22.37 $\pm$ 2.07 <sup>bd</sup>	20.43 $\pm$ 2.09 <sup>bd</sup>	1.93 $\pm$ 1.15
轻手法组	22.83 $\pm$ 1.87 <sup>bd</sup>	11.77 $\pm$ 2.16 <sup>bdfhi</sup>	11.07 $\pm$ 3.04 <sup>bdfh</sup>
重手法组	21.73 $\pm$ 2.30 <sup>bd</sup>	14.73 $\pm$ 2.19 <sup>bdfi</sup>	7.00 $\pm$ 1.12 <sup>bdf</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 假手术组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 模型组;  
<sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 重手法组; <sup>i</sup> $P < 0.01$  vs 同组针刺前后。

入穴位7-9 mm, 留针30 min, 期间运针3次, 每次持续3 min. 每天针刺1次, 连续针刺7 d. 毫针轻手法组, 频率每分钟60次, 捻转角度180度. 毫针重手法组频率每分钟约120-150次, 捻转角度360度. 毫针针刺采用专人操作, 其频率及角度由手法测定仪(上海针灸经络研究所研制)监测稳定后再对大鼠进行操作。

1.2.5 实验步骤: 术前禁食不禁水12 h, 除空白组外均按要求进行手术植入气囊, 术后第3天C、D、E组进行胃扩张刺激, 同期所有组进行拟痛行为学评分; 第4天D、E组开始进行轻、重不同刺激强度毫针针刺, 每日1次, 共7 d, 其他组与针刺组同期捆绑; 第11日C、D、E组再次进行胃扩张刺激, 同时各组再次进行拟痛行为学评分, 评分完立即对所有大鼠麻醉、灌注取材并测定各项指标。

1.2.6 观察指标: (1)拟痛行为学评分: 各组分别于植入气囊3、11 d采用单盲法进行拟痛行为学评分, 将大鼠放在自制鼠笼内, C、D、E组行胃扩张疼痛刺激3次(A、B组不刺激), 观察其拟痛行为学表现, 每间隔10 min观察行为学5 min. 评分标准参照Al-Chaer *et al*<sup>[8]</sup>的直肠AWR评分和预试实验结果制定, 对出现的行为依据其程度的不同分为0-3分4个等级. 各个行为根据与胃扩张的相关性大小赋以不同的权重, 总权重定为10, 舔足频率 $W_1 = 2$ , 抬颈频率 $W_2 = 3$ , 弓背 $W_3 = 5$ . 单个行为的评分为每次扩张后评分的均值, 综合评分 = 舔足评分 $\times W_1$  + 抬颈评分 $\times W_2$  + 弓背评分 $\times W_3$ . (2)脊髓背角SP和NMDAR2-B: 免疫组化SABC法标记脊髓背角SP和NMDAR2-B阳性细胞. 用PBS代替一抗作阴性对照. NMDAR-2B受体阳性判定标准为细胞核中出现棕色或棕黄色颗粒状, SP阳性细胞判定标准为细胞质或细胞核中出现棕黄色细颗粒状. 采用MIAS医学图像分析系统(北京航空航天大学), 光镜下10 $\times$

表 2 各组大鼠脊髓背角NMDAR2-B和SP阳性细胞数密度比较 (个/mm<sup>2</sup>,  $n = 5$ , mean  $\pm$  SD)

分组	NMDAR2-B	SP
空白组	53.07 $\pm$ 16.87	19.57 $\pm$ 5.22
假手术组	71.33 $\pm$ 12.83	30.93 $\pm$ 6.80
模型组	240.20 $\pm$ 25.59 <sup>bd</sup>	108.67 $\pm$ 11.37 <sup>bd</sup>
轻手法组	140.60 $\pm$ 21.30 <sup>bdfh</sup>	63.60 $\pm$ 13.74 <sup>bdfh</sup>
重手法组	179.53 $\pm$ 21.79 <sup>bdf</sup>	82.67 $\pm$ 12.13 <sup>bdf</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 假手术组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 模型组;  
<sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 重手法组。

40倍, 每张切片随机分析3个视野, 计算每只大鼠脊髓背角中的SP、NMDAR-2B受体的阳性细胞数密度(阳性细胞数/统计场面积)取平均值。

统计学处理 所有数据输入SPSS15.0 for Windows统计软件进行处理, 以mean $\pm$ SD进行统计描述. 各组数据进行正态性检验, 符合正态分布者, 组内自身前后比较, 采用配对 $t$ 检验, 不符合则采用配对计量资料比较的符号秩合检验; 组间比较, 符合正态分布者, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD和SNK法, 方差不齐者用Tamhane's T2或Dunnett's T3法; 不符合正态分布, 采用多个独立样本比较的秩和检验(K Independent Samples)。

## 2 结果

2.1 不同毫针刺刺激强度对胃扩张大鼠拟痛行为学评分的影响 (1)针刺前, 与空白组相比, 假手术组拟痛行为学评分无明显变化, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 与假手术组比较, 模型组、针刺组拟痛行为学评分明显增高, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ); (2)针刺后, 轻、重手法组拟痛行为学评分明显降低, 与针刺前比较有非常显著性意义( $P < 0.01$ ); 其前后差值与模型组比较有非常显著性意义( $P < 0.01$ ); 且轻手法组拟痛行为学评分下降更明显, 其差值与重手法组比较有非常显著性意义( $P < 0.01$ , 表1)。

2.2 不同毫针刺刺激强度对胃扩张疼痛大鼠脊髓背角NMDAR2-B和SP含量影响 胃扩张疼痛刺激后, 假手术组与空白组之间比较, 差异无显著意义( $P > 0.05$ ), 模型组、轻手法组、重手法组较假手术组脊髓背角内NMDAR2-B和SP阳性细胞数都有显著升高( $P < 0.01$ )(主要分布在脊髓背角的I层和II层), 提示胃扩张疼痛刺激可以提高脊髓背角内NMDAR2-B和SP阳性细胞数; 与

## ■ 相关报道

现阶段研究发现参与内脏痛的感觉传入相关的神经递质有多种, 如5-羟色胺(5-HT)、缓激肽(BK)速激肽(NK)、P物质(SP)和N-甲基-D天冬氨酸(NMDA), 还包括降钙素基因相关肽(CGRP)、生长抑素、血管活性肠肽、组胺、嘌呤以及白介素-1 $\beta$ 等. 在脊髓节段, NMDA受体和P物质(SP)是近年研究的热点。



# ■ 创新盘点

本文比较了毫针不同刺激强度对胃扩张疼痛大鼠拟痛行为学、脊髓背角NMDA受体表达、P物质等含量的变化影响,探讨针刺缓解内脏痛是否与影响其感觉传入通路上相关神经递质有关,为针刺治疗胃痛临床和理论研究提供参考。

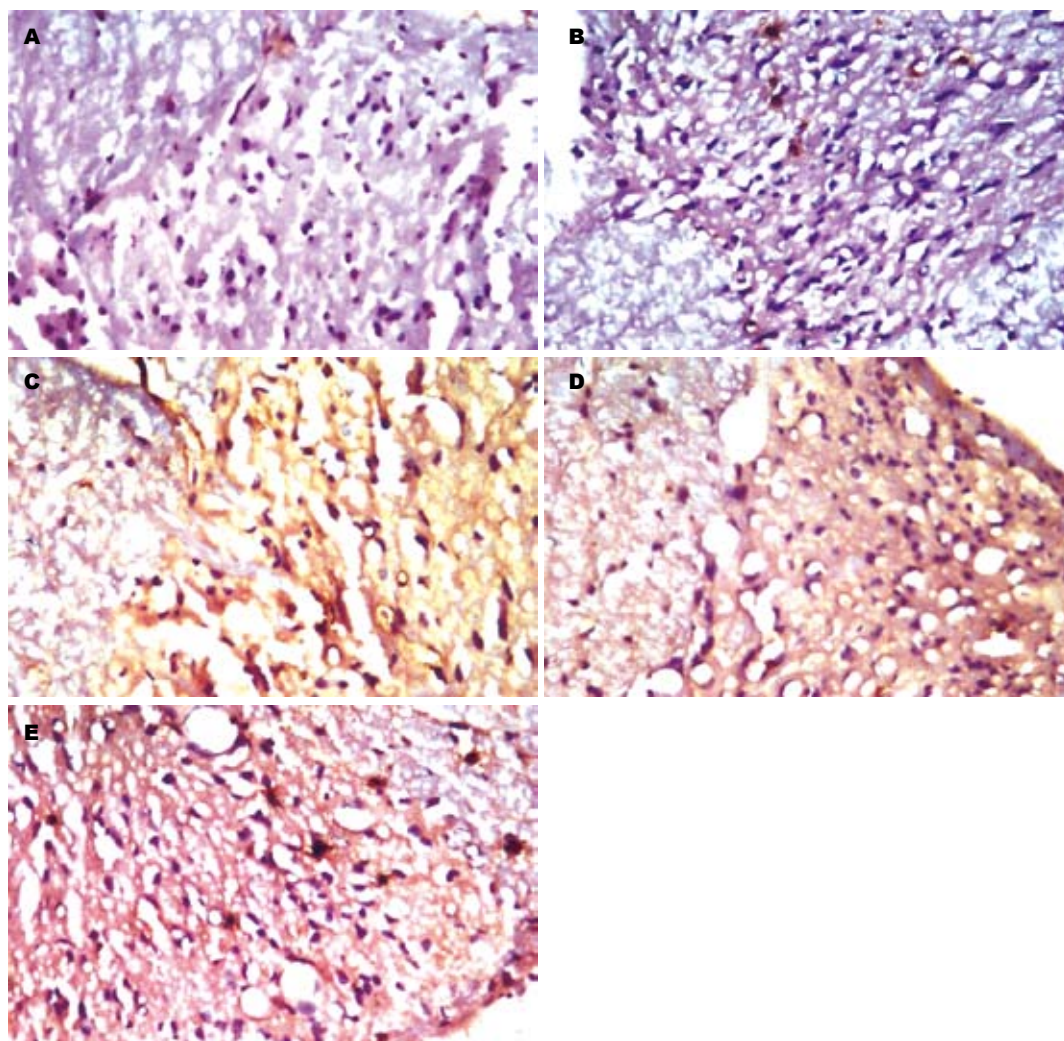


图1 各组大鼠脊髓背角NMDA-2B阳性表达( $\times 400$ )。A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 轻手法组; E: 重手法组。

模型组比较,轻手法组、重手法组NMDAR2-B和SP阳性细胞数明显下降( $P<0.01$ ),但仍较假手术组高( $P<0.01$ ),说明针刺能部分降低脊髓背角NMDAR2-B和P物质阳性表达;两针刺组之间相比,毫针不同刺激强度针刺效应不同,轻手法组降低NMDA受体和SP阳性细胞数效应强于重手法组( $P<0.01$ ,表2,图1-2)。

## 3 讨论

内脏痛(visceral pain)是临床上极为普遍的症状,给人类带来巨大痛苦,主要是由于各脏器及胸腹壁层的感觉神经末梢受到强烈机械、化学物质或炎症产物的刺激,此外也可因局部血液循环障碍、平滑肌痉挛及代谢产物不能及时排除而引起的疼痛感觉。内脏痛大都疼痛弥散,难以定位,伴有牵涉痛,运动和自主神经反射增强,皮肤肌肉组织痛觉增敏,持续的刺激可以由不痛进展为疼痛等特点<sup>[9-10]</sup>。

近年来的研究表明,针灸对内脏痛、内脏痛觉增敏具有良好的调节作用。李为民 *et al* 的动物行为学研究发现,急性内脏痛模型大鼠腹壁撤回反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分以及腹直肌肌电(rectus abdominis electromyogram, EMG)在不同刺激等级水平均异常升高,而电针后AWR和EMG水平明显降低<sup>[11]</sup>。后来他们又采用电针方法对肠易激综合征大鼠的慢性内脏痛敏进行疗效观察,也取得良好的即刻和累加镇痛效应<sup>[12]</sup>。本实验中拟痛行为学评分是依据文献报道<sup>[8,11-12]</sup>及预实验情况制定,研究结果发现大鼠胃扩张可以升高其拟痛行为学评分。轻、重两种不同手法刺激均能降低胃扩张疼痛大鼠拟痛行为学评分。

现阶段研究发现参与内脏痛的感觉传入相关的神经递质有多种,如5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、缓激肽(bradykinin, BK)、速激肽(neurokinin, NK)、SP



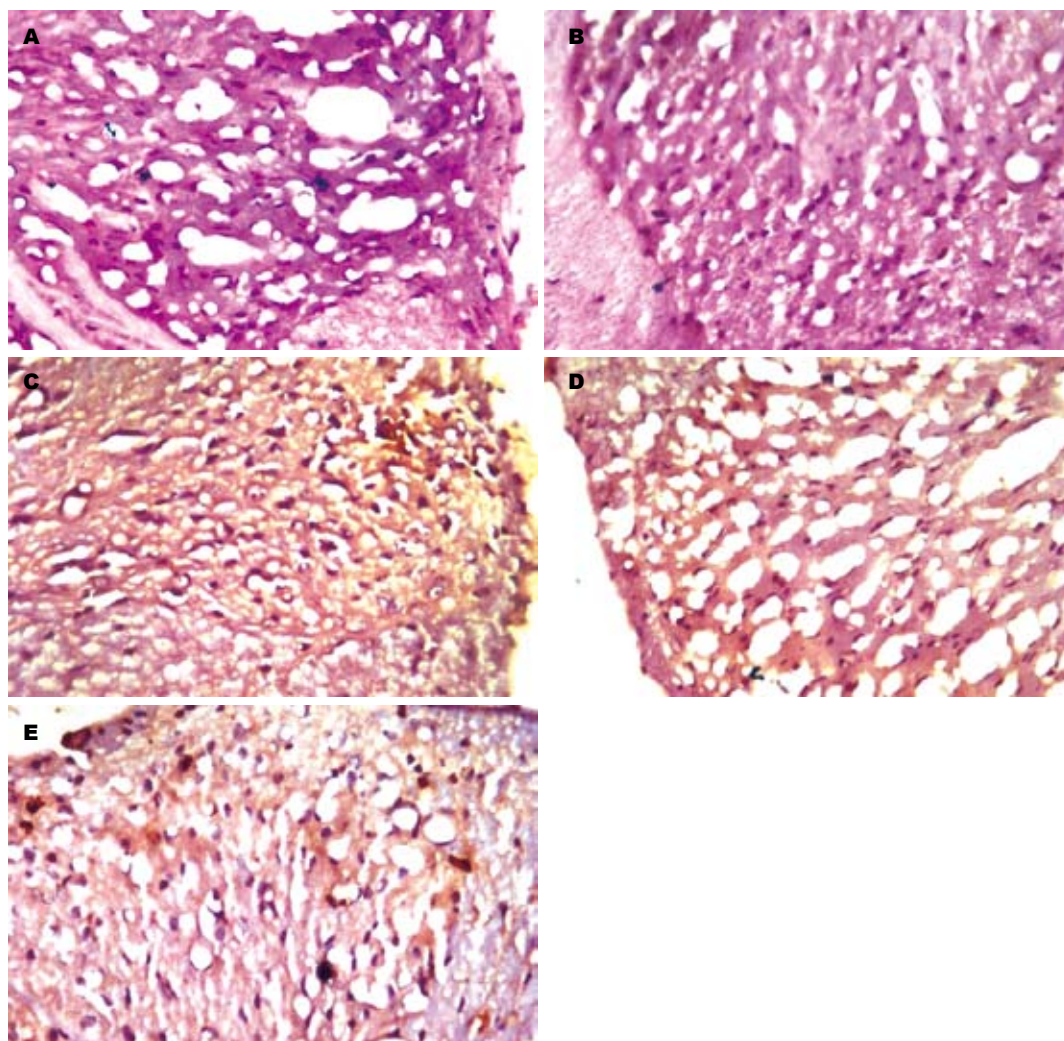


图 2 各组大鼠脊髓背角SP阳性表达( $\times 400$ )。A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 轻手法组; E: 重手法组。

#### ■名词解释

内脏痛(visceral pain): 临床上极为普遍的症状, 他给人类带来巨大痛苦, 主要是由于各脏器及胸腹壁层的感受神经末梢受到强烈机械、化学物质或炎症产物的刺激, 此外也可因局部血液循环障碍、平滑肌痉挛及代谢产物不能及时排除而引起的疼痛感觉。

和NMDA, 还包括降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)、生长抑素、血管活性肠肽、组胺、嘌呤以及白介素-1 $\beta$ 等<sup>[13]</sup>。在脊髓节段, NMDA受体和SP是近年研究的热点。NMDA受体是一种配体门控离子型谷氨酸受体, 参与体内神经发育、突触可塑性、学习记忆以及痛觉信号的转导等生理病理过程。Ma *et al*<sup>[14]</sup>研究提示NR2B蛋白首先由背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元合成, 再分布于伤害性初级传入纤维中枢端, 即脊髓背角I层的突触前膜。DRG神经元有外周突和中枢突, 外周突末梢直接接受伤害性刺激, 而终止在脊髓背角浅层的中枢突末梢, 释放神经递质(如谷氨酸、天冬氨酸、SP和CGRP等), 激活脊髓背角特异性伤害性感受神经元, 传递痛觉冲动<sup>[15]</sup>。Petralia *et al*<sup>[16]</sup>发现大鼠DRG神经元有NR1的表达, 而Liu *et al*<sup>[17]</sup>进一步研究发现, 70%的DRG中枢突末梢中NR1和谷氨酸共存。这些研究提示, 脊髓

突触前膜的NMDA受体为自身受体, 可调节谷氨酸、天冬氨酸等神经递质的释放, 在痛觉信息的传递过程中起到重要作用。而Ma *et al*<sup>[14]</sup>研究发现, 70%的C纤维和A $\delta$ 纤维传入末梢表达NR2B, 表明突触前膜的NMDA受体以NR2B型为主。因此推测NR2B在脊髓水平痛觉信息传递中可能起到重要作用。NR2B在CNS痛觉信息传递和调制通路中呈选择性分布, 且在疼痛的产生和中枢性痛觉敏化形成中起到重要作用, 提示NR2B是一个潜在的镇痛治疗靶点<sup>[18]</sup>, 成为近年研究的热点。SP最先发现于马脑和肠的提取, 其在脊髓背根含量远高于腹根, 为一种感觉神经递质, 在痛觉调控中起重要作用。普遍认为SP是参与痛觉的一级传入神经纤维末梢的递质, 在周围神经中SP主要由背根神经节细胞合成, 然后沿着背根传入纤维转运至位于背角最背部第I和第II层的末梢, 而由脑的下行纤维所释放的SP可能参与对伤害性感受进行调制<sup>[19]</sup>。肠

# ■同行评价

本研究设计合理,结果可靠,结论可信,对针刺镇痛机制的研究有一定的参考价值。

胃黏膜及皮下肌层肠神经中能够分泌大量SP,当胃肠受到伤害性刺激时,冲动可由胃肠道经初级伤害性神经纤维传至脊髓,SP一直参与此伤害性刺激传递。

较多的研究显示,针刺可引起体内活性物质的改变,雷亚宁 *et al* 通过电针内脏牵拉痛大鼠双侧足三里穴,在外周激活了肌间神经丛内含脑啡肽(enkephalin, ENK)神经元,促进ENK的释放,抑制Ach和SP的释放,因而产生镇痛作用<sup>[20]</sup>。Xiao *et al* 研究发现电针能显著提高机械性结直肠刺激后的痛阈值,在慢性内脏超敏性(chronic visceral hypersensitivity, CVH)大鼠结肠内降低了5-HT的浓度,因而他们认为电针可能通过外周5-羟色胺能途径而缓解痛觉增敏和应激引起的结肠功能紊乱<sup>[21]</sup>。有的学者研究发现针刺足三里穴能明显下调内脏痛大鼠脊髓后连合核(DCN)和延髓内脏带中的胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的免疫阳性表达,他们认为针刺可以通过调控DCN和孤束核及迷走神经背侧运动核的功能,抑制星形胶质细胞的活化,从而减轻内脏的疼痛<sup>[22-23]</sup>。

本实验研究发现胃扩张疼痛大鼠脊髓背角中NMDAR-2B阳性细胞数较假手术组显著升高,与既往报道NMDAR-2B参与伤害性刺激传递相一致<sup>[15]</sup>。40 mmHg胃扩张是一伤害性刺激,使胃部产生疼痛,DRG神经元的外周突末梢直接接受这种伤害性刺激,终止在脊髓背角浅层的中枢突末梢,释放神经递质(如谷氨酸、天冬氨酸、SP和CGRP等),激活脊髓背角特异性伤害性感受神经元,传递痛觉冲动。这些受体中NMDAR-2B比重较大<sup>[14]</sup>,因此胃扩张疼痛大鼠脊髓背角中NMDAR-2B阳性细胞数明显升高。轻、重两种不同手法刺激均能降低胃扩张疼痛大鼠NMDAR-2B阳性细胞数,但均不能降低到假手术组水平( $P<0.01$ ),提示针刺能够部分降低胃扩张疼痛刺激引起的大鼠NMDAR-2B阳性细胞数升高。其作用机制为针刺传入信号在脊髓背角抑制NMDAR-2B表达,抑制伤害性刺激由DRG神经元的外周突末梢向脊髓的中枢突传递,从而发挥对大鼠胃扩张疼痛的调制作用。

本实验研究发现胃扩张疼痛刺激后,假手术组与空白组之间脊髓背角SP表达比较,差异无显著意义( $P>0.05$ ),模型组、轻手法组、重手法组较假手术组脊髓背角内脊髓背角SP阳性细胞数都有显著升高( $P<0.01$ ),提示胃扩张疼痛刺激可以升高脊髓背角内SP含量。40 mmHg胃扩

张引起的伤害性冲动可由胃肠道经初级伤害性神经纤维传至脊髓,刺激了脊髓浅层固有的SP神经元合成,也接收到来自脑的下行纤维所释放的SP脑的下行纤维所释放的SP调节<sup>[19,24]</sup>,因此使得胃扩张疼痛刺激后脊髓背角内SP含量升高。与模型组比较,轻手法组、重手法组SP阳性细胞数明显下降( $P<0.01$ ),说明针刺可以降低胃扩张疼痛刺激引起脊髓背角内SP含量升高。其机制可能为针刺抑制胃扩张的伤害性刺激冲动的产生和向脊髓的传递,同时调节高位中枢释放镇痛物质,从而降低脊髓背角的SP含量,发挥镇痛作用。但未降低至假手术组水平,说明针刺只能部分降低脊髓背角SP含量,这与以往报道的针刺镇痛作用不完全相吻合。

总之,两种不同强度手法刺激针刺胃扩张疼痛大鼠足三里穴,均能降低胃扩张疼痛大鼠疼痛行为学积分、脊髓背角中NMDAR-2B和SP阳性细胞数的升高,抑制其行为学反应和低位中枢传递疼痛信息物质,发挥镇痛作用。其作用机制可能与选足三里穴针刺相关,大量临床报道<sup>[25-27]</sup>,足三里对胃痛等腹痛具有较好的镇痛作用。实验研究报道<sup>[28]</sup>,足三里穴处的躯体传入神经节段部分与胃的节段重叠,电针足三里穴能翻转或拮抗胃扩张引起的背角神经元放电的改变。因此毫针针刺足三里通过调节胃肠的运动功能,减少伤害性刺激的产生,同时抑制疼痛信息物质的合成和释放,减少疼痛物质向中枢传递,刺激脊髓高位中枢的镇痛物质,而发挥对胃扩张疼痛大鼠镇痛作用。

本研究还发现两种不同强度刺激手法针刺胃扩张疼痛大鼠足三里穴效应不同,在降低拟痛行为学积分、脊髓背角中NMDAR-2B和P物质阳性细胞数的升高方面有一定差异,轻手法刺激强度要优于重刺激手法。其机制分析如下:本实验中的轻手法刺激强度(频率每分钟60次,捻转角度180度),在新版《针灸学》<sup>[29]</sup>中,此强度实为中等强度刺激(频率每分钟60-90次,捻转角度90-180度),李万瑶 *et al*<sup>[30]</sup>报道此强度的手法刺激效果可以很好的舒张血管,提高痹证患者肢体血供,起到镇痛和恢复肢体功能的作用。本研究认为此强度刺激之所以能较好的抑制胃扩张疼痛是因为此强度针刺在大鼠受到胃扩张伤害性刺激时,抑制胃扩张伤害性刺激的产生和传递,能更好地抑制SP等疼痛相关信息物质的释放,抑制NMDAR-2B的疼痛递质受体的表达,刺激中枢释放更多的镇痛物质,从而发挥

更好的镇痛作用。

#### 4 参考文献

- 1 易受乡, 林亚平, 严洁, 常小荣, 杨昱. 电针对大鼠胃运动、P物质和胃动素的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 284-287
- 2 易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平. 针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1721-1723
- 3 严洁, 黎喜平, 黄艾, 易受乡, 常小荣, 林亚平, 胡蓉. 电针足阳明经穴对大鼠胃黏膜损伤修复机制的研究. 中国中医药信息杂志 2006; 13: 20-22
- 4 Rouzade ML, Fioramonti J, Bueno L. A model for evaluation of gastric sensitivity in awake rats. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 157-163
- 5 Traub RJ, Sengupta JN, Gebhart GF. Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience* 1996; 74: 873-884
- 6 Ozaki N, Gebhart GF. Characterization of mechanosensitive splanchnic nerve afferent fibers innervating the rat stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1449-G1459
- 7 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327
- 8 Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 2000; 119: 1276-1285
- 9 Cervero F, Laird JM. Visceral pain. *Lancet* 1999; 353: 2145-2148
- 10 Jänig W, Häbler HJ. [Physiology and pathophysiology of visceral pain] *Schmerz* 2002; 16: 429-446
- 11 李为民, 崔可密, 吴根诚. 电针对急性内脏痛大鼠腹部撤回反射和腹直肌肌电的影响. 中国临床康复 2004; 8: 1899-1901
- 12 李为民, 崔可密, 吴根诚. 电针治疗肠易激综合征大鼠作用观察. 上海针灸杂志 2006; 25: 43-47
- 13 温建忠, 郭政. 内脏痛及痛过敏生物学研究新进展. 临床医药实践杂志 2004; 13: 243-246
- 14 Ma QP, Hargreaves RJ. Localization of N-methyl-D-aspartate NR2B subunits on primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibers in rats. *Neuroscience* 2000; 101: 699-707
- 15 Zhuo M. Glutamate receptors and persistent pain: targeting forebrain NR2B subunits. *Drug Discov Today* 2002; 7: 259-267
- 16 Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J Neurosci* 1994; 14: 6102-6120
- 17 Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8383-8387
- 18 王公明, 田玉科, 戴体俊. NMDA受体2B亚基: 一个潜在的镇痛治疗靶点. 国际麻醉学与复苏杂志 2006; 27: 309-312
- 19 边景檀, 沈上, 明晓云, 石玉顺, 韩济生. 中枢P物质参与电针镇痛的证据. 神经科学 1994; 1: 9-15
- 20 雷亚宁, 丁友梅, 张军明, 茹立强, 任艳华, 刘芬. 电针刺足三里穴对内脏牵拉痛大鼠的镇痛作用. 中华麻醉学杂志 2005; 25: 688-690
- 21 Tian XY, Bian ZX, Hu XG, Zhang XJ, Liu L, Zhang H. Electro-acupuncture attenuates stress-induced defecation in rats with chronic visceral hypersensitivity via serotonergic pathway. *Brain Res* 2006; 1088: 101-108
- 22 王景杰, 秦明, 邱建勇, 段丽, 曹荣, 饶志仁. 电针刺激足三里穴对内脏痛大鼠行为学及骶髓后连合核中GFAP、OX42表达的影响. 神经解剖学杂志 2006; 22: 371-341
- 23 秦明, 黄裕新, 王景杰, 段丽, 曹荣, 饶志仁. 电针“足三里”穴对内脏痛大鼠延髓内c-fos和GFAP表达的影响. 针刺研究 2006; 31: 136-139
- 24 Gibson SJ, Bloom SR, Polak JM. A novel substance P pathway linking the dorsal and ventral horn in the upper lumbar segments of the rat spinal cord. *Brain Res* 1984; 301: 243-251
- 25 陈竞. 针刺内关、足三里治疗腹痛48例. 中国针灸 2005; 25: 563-563
- 26 曾华, 何克茜, 黄玉英. 654-2足三里注射治疗功能性复发性腹痛临床观察. 医学文选 2006; 25: 250-250
- 27 孟宪臻, 张建君. 足三里温针灸预防消炎痛胃肠道损伤的观察与护理. 中国实用护理杂志 2004; 20: 51-52
- 28 张建梁, 晋志高, 逯波, 陈淑萍, 蔡虹, 景向红. 脊髓背角神经元对胃扩张及电针“足三里”穴的反应. 针刺研究 2001; 26: 268-273
- 29 石学敏. 针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 136
- 30 李万瑶, 朱莉莉. 针刺强度对痹证患者肢体血流图的影响. 陕西中医 1986; 7: 419

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2008年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



## siRNA沉默Livin基因对胃癌细胞生长、凋亡的影响

陈鹏, 孔令斌, 王春松, 杨景玉

### ■背景资料

Livin是凋亡抑制蛋白家族(IAPs)中的最新成员, 于2000年由Lin *et al* 从人胎肾cDNA文库中发现。到目前为止, 人体中已发现有8种IAPs家族成员, 其中大部分特异性存在于肿瘤组织中, 少部分存在于正常组织中, 并能抑制多种细胞凋亡, 在细胞程序性死亡中发挥重要的作用。因此, 诱导细胞凋亡已成为开发新抗癌药物的研究热点之一。

陈鹏, 王春松, 山东大学医学院 山东省济南市 275012  
孔令斌, 济宁医学院 山东省济宁市 272013  
杨景玉, 山东省寄生虫病防治所 山东省济宁市 272033  
山东省教育厅基金资助项目, No. J08LH03  
作者贡献分布: 本论文写作由陈鹏完成; 孔令斌完成实验设计、项目申请及论文审阅指导; 王春松进行试验及数据分析; 杨景玉完成行政、技术及材料支持、指导论文修改。  
通讯作者: 孔令斌, 272013, 山东省济宁市, 济宁医学院。  
klb3904@163.com  
收稿日期: 2008-11-04 修回日期: 2009-01-06  
接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-05-08

### Effects of Livin gene silencing by siRNA on apoptosis and proliferation of gastric cancer cells

Peng Chen, Ling-Bin Kong, Chun-Song Wang, Jing-Yu Yang

Peng Chen, Chun-Song Wang, Medical School of Shandong University, Jinan 27500, Shandong Province, China  
Ling-Bin Kong, Jining Medical College, Jining 272013, Shandong Province, China  
Jing-Yu Yang, Shandong Institute of Parasitic Disease, Jining 272033, Shandong Province, China  
Supported by: the Shandong Province Education Department, No. J08LH03  
Correspondence to: Ling-Bin Kong, Jining Medical College, Jining 272013, Shandong Province, China. klb3904@163.com  
Received: 2008-11-04 Revised: 2009-01-06  
Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-05-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression and effect of Livin gene silencing by siRNA on growth and apoptosis in gastric cancer BGC-823 cells.

**METHODS:** Two siRNAs (Livin-sh-1 and Livin-sh-2) were self-designed as expression vector and transfected into gastric cancer BGC-823 cells. After G418 positive clone selection, BGC-823 mRNA was measured by semi-quantitative RT-PCR, cell proliferation detected by MTT, and gastric cell apoptosis by flow cytometry.

**RESULTS:** Compared with cells without siRNA transfection, expression of Livin  $\alpha/\beta$  mRNA was decreased significantly in siRNA control group (Livin  $\alpha$ :  $0.11 \pm 0.07$  vs  $0.37 \pm 0.10$ ,  $0.34 \pm$

$0.08$ ; Livin  $\beta$ :  $0.13 \pm 0.04$  vs  $0.43 \pm 0.09$ ,  $0.45 \pm 0.11$ , all  $P < 0.05$ ). Compared with empty siRNA vector group, cell growth at 24 h, 48 h, 96 h, and 1 wk was not affected in blank control group. Cell growth in siRNA group was not significantly affected at 24 h and 48 h, but was significantly inhibited at 96 h and 1 wk ( $P < 0.01$ ). Cell apoptosis was significantly higher in siRNA in transfection group than in non-transfected group or than in empty siRNA vector transfection group ( $14.85\% \pm 1.35\%$  vs  $4.51\% \pm 0.36\%$ ,  $6.13\% \pm 0.71\%$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Livin gene silenced by siRNA induces growth suppression and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells. Livin gene stands a chance as a new target for gastric cancer treatment.

**Key Words:** Livin gene; Small interfering RNA; Gastric cancer

Chen P, Kong LB, Wang CS, Yang JY. Effects of Livin gene silencing by siRNA on apoptosis and proliferation of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1346-1349

### 摘要

**目的:** 观察小分子干扰RNA(siRNA)沉默Livin基因在胃癌BGC-823细胞中的表达, 并探讨Livin基因对胃癌细胞生长、凋亡的影响。

**方法:** 自行设计两条针对Livin基因的siRNA: Livin-sh-1和Livin-sh-2, 以此构建相应的表达载体并分别转染至对数生长期胃癌BGC-823细胞, 经G418筛选后分别采用半定量RT-PCR检测不同siRNA实验分组细胞BGC-823 mRNA水平变化, 四氮唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖、流式细胞仪检测胃癌细胞的凋亡。

**结果:** siRNA对照组与空siRNA载体组Livin  $\alpha/\beta$  mRNA表达差别无显著性; 但转染siRNA组Livin  $\alpha/\beta$  mRNA表达显著低于空白对照组和空siRNA载体组(Livin  $\alpha$ :  $0.11 \pm 0.07$  vs  $0.37 \pm 0.10$ ,  $0.34 \pm 0.08$ ; Livin  $\beta$ :  $0.13 \pm 0.04$  vs  $0.43 \pm 0.09$ ,  $0.45 \pm 0.11$ , 均 $P < 0.05$ )。空白对照组与

### ■背景资料

刘平, 教授, 南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤科



空siRNA载体组相比, 24、48、96 h和1 wk时细胞生长未受影响; 而siRNA组在转染后24 h和48 h细胞生长未受影响, 但在96 h和1 wk时则被明显抑制( $P<0.01$ )。转染siRNA组的细胞的凋亡率与空白对照组和转染空siRNA载体组相比显著增加( $14.85\% \pm 1.35\%$  vs  $4.51\% \pm 0.36\%$ ,  $6.13\% \pm 0.71\%$ , 均 $P<0.05$ )。

**结论:** siRNA沉默Livin基因能抑制胃癌细胞的生长, 促进胃癌细胞的凋亡, Livin基因有可能成为胃癌治疗的新靶点。

**关键词:** 小分子干扰RNA; Livin基因; 胃癌

陈鹏, 孔令斌, 王春松, 杨景玉. siRNA沉默Livin基因对胃癌细胞生长、凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1346-1349

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1346.asp>

## 0 引言

研究证明, 细胞凋亡过程调控异常与肿瘤发生发展密切相关。随着对凋亡研究不断深入, 人们发现许多抗肿瘤药物是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的。有研究表明胃癌的发生同地域、幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染、N-硝基化合物和饮食等环境因素关系密切<sup>[1]</sup>。Livin是凋亡抑制蛋白家族(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)中的最新成员, 于2000年由Lin *et al*从人胎肾cDNA文库中发现<sup>[2]</sup>。到目前为止, 人体中已发现有8种IAPs家族成员, 其中大部分特异性存在于肿瘤组织中, 少部分存在于正常组织中<sup>[3]</sup>, 并能抑制多种细胞凋亡, 在细胞程序性死亡中发挥重要的作用, 因此, 诱导细胞凋亡已成为开发新抗癌药物的研究热点之一。本研究为了进一步探讨Livin基因表达对胃癌细胞生长、凋亡的影响, 在既往成功构建小干扰RNA(siRNA)表达载体的基础上, 将上述表达载体转染胃癌BGC-823细胞株, 观察了转染细胞生长速度、细胞凋亡。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人类低分化胃癌细胞株BGC-823购自上海肯强仪器有限公司; pSliencer<sup>TM</sup> 4.1-CMV neo和*E. coli*化学感受态细胞购自百奥生物(南通)有限公司。RNA提取试剂盒、Lipofectamine 2000转染试剂盒、G418均购自美国Invitrogen公司、Real-time PCR试剂盒购自上海生工。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成:** 采用Oligov6.0基因分析软件, 对人Livin基因序列(GenBank中NM-

139317, NM-022161)进行分析后设计引物序列如下: Livin-1: 5'-ACAAGGTGAGGTGCTTCTGC-3'; Livin-2: 5'-AGTCTCCTGCACACTGTGGA CAA-3'。

**1.2.2 细胞培养:** 人类低分化胃癌细胞株BGC-823进行常规细胞培养。

**1.2.3 分组:** siRNA组分别转染pSliencer<sup>TM</sup> 4.1-CMV neo-sh-1和pSliencer<sup>TM</sup> 4.1-CMV neo-sh-2; siRNA对照组转染pSliencer<sup>TM</sup> 4.1-CMV neo-3; 空siRNA载体组转染pSliencer<sup>TM</sup> 4.1-CMV neo。

**1.2.4 细胞转染及RT-PCR检测转染效果:** 转染前24 h用2.5 g/L胰蛋白酶消化人低分化胃癌细胞株BGC-823, 具体操作按Invitrogen公司转染试剂Lipofectamin2000操作说明书进行。

**1.2.5 MTT法测定细胞生长曲线:** 取对数生长的稳定转染细胞的各组细胞, 每孔 $5 \times 10^3$ 接种于96孔培养板上, 接种后0-7 d, 用MTT法分别测定个孔吸光度值, 各组细胞均设6个复孔, 取平均值描绘生长曲线。

**1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡:** 转染后的胃癌细胞加入培养缓冲液后用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

**统计学处理** 计量数据均以mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS软件, 多组均数间的显著性检验用方差分析, 两组均数间的比较用*t*检验。

## 2 结果

**2.1 各组Livin $\alpha/\beta$  mRNA表达** 转染siRNA组Livin $\alpha/\beta$  mRNA表达量明显低于空白对照组和空siRNA载体组( $P<0.05$ ); 后两组的Livin $\alpha/\beta$  mRNA表达量差别无显著性( $P>0.05$ )。但各组中的均显示Livin $\beta$ 表达量高于Livin $\alpha$ (表1)。

**2.2 MTT法检测各组细胞生长曲线** 空白对照组与空siRNA载体组相比, 转染后24、48、96 h和1 wk时细胞生长未受影响( $P>0.05$ )。siRNA组与空白对照组相比在转染后24 h和48 h细胞生长未受明显影响, 而96 h和1 wk时被明显抑制( $P<0.01$ , 图1)。

**2.3 细胞凋亡检测结果** 转染siRNA组的细胞的凋亡率显著增加, 与未转组和转染空siRNA载体组比较, 差异有显著性( $14.85\% \pm 1.35\%$  vs  $4.51\% \pm 0.36\%$ ,  $6.13\% \pm 0.71\%$ , 均 $P<0.05$ ), 说明沉默Livin的表达可增加细胞的凋亡。

## 3 讨论

肿瘤是一种环境因素与遗传因素相互作用所致

### ■研发前沿

细胞凋亡过程调控异常与肿瘤发生发展密切相关, 诱导细胞凋亡已成为开发新抗癌药物的研究热点之一。

### ■相关报道

Crnkovic-Mertens *et al*应用siRNA使Livin基因沉默; 国内Lin *et al*对胃癌中Livin表达做了研究, 同样发现胃癌组织中Livin阳性表达率高于正常和癌旁组织。

### 应用要点

以Livin为靶点的抑制物及反义Livin能够保护细胞不进行凋亡,具有广谱和低不良反应,为肿瘤治疗提供了新的研究方向。

表 1 各组Livin $\alpha$ / $\beta$  mRNA表达量 (mean  $\pm$  SD)

分组	Livin $\alpha$	Livin $\beta$
空白对照组	0.37 $\pm$ 0.10	0.43 $\pm$ 0.09
空siRNA载体组	0.34 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.11
siRNA组	0.11 $\pm$ 0.07	0.13 $\pm$ 0.04

的一类疾病。正常细胞中的癌基因和原癌基因等的动态平衡维持着机体内细胞的适当数量和功能,细胞在各种致癌因素的作用下,基因突变引起原癌基因功能过强,抗癌基因功能丧失,细胞生长因子及其受体、细胞内的信号传导、细胞周期调控等发生异常,细胞正常凋亡被抑变成不可控制的生长便可引起肿瘤。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)所引起的序列特异性基因沉默, siRNA是21-23 nt小片段双链RNA,可以特异性和互补靶基因mRNA序列结合,诱导其降解,产生强大的RNA干扰效应<sup>[4-5]</sup>。siRNA与靶序列之间严格的碱基配对,具有很强的特异性,他可以在染色质水平、转录水平、转录后水平和翻译水平中参与基因表达的调节。尽管RNAi的效果看似和靶序列与siRNA的结合性有关,但目前并没有可靠的方法来预判或鉴别RNAi的理想靶序列<sup>[6]</sup>。有报道指出,化学合成和载体介导的siRNA在哺乳动物细胞,包括恶性肿瘤细胞中都能成功的沉默特定的基因<sup>[7]</sup>。

Livin是新近发现的细胞凋亡抑制因子,他在抑制细胞凋亡上具有多重功能, Livin在正常组织一般不表达或表达很低<sup>[8-9]</sup>,但在一些肿瘤中却高表达,这与他在肿瘤细胞中高表达能抑制肿瘤细胞的凋亡有着密切关系。其有望成为恶性肿瘤的早期诊断及预后评估的可靠指标之一。对于Livin的表达与恶性肿瘤特征(如侵入行为、减短寿命、抵制治疗、提高复发率等)的相关性,各家报道不完全一致<sup>[10-12]</sup>,有待进一步去研究探索,以期Livin成为指导临床评估的重要指标。抑制IAP家族成员蛋白表达,诱导肿瘤细胞发生凋亡,是目前肿瘤凋亡治疗的一个较有希望的研究方向,可能为逆转肿瘤耐药以及作为手术、放疗和化疗的辅助治疗手段<sup>[13]</sup>,在减少肿瘤转移和复发的方面有重要作用。

本研究结果显示,转染siRNA组Livin $\alpha$ / $\beta$  mRNA表达量、细胞生长曲线及细胞凋亡明显低于空白对照组和空siRNA载体组,与Crnkovic-

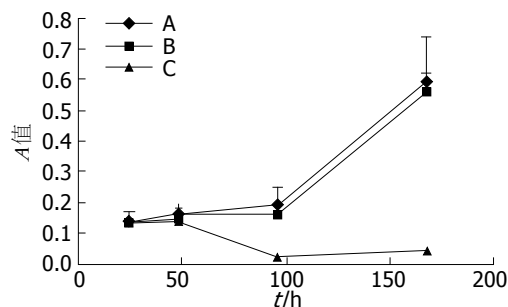


图 1 转染后各组细胞的生长曲线。A: 空白对照组; B: 空siRNA载体组; C: siRNA组。

Mertens *et al*<sup>[14]</sup>应用siRNA使Livin基因沉默所获得的结果有相似之处。siRNA组与空白对照组相比在转染后24 h和48 h细胞生长未受明显影响,而96 h和1 wk时被明显抑制。由此表明, Livin基因表达在细胞增殖和凋亡调控中起重要作用。Liu *et al*<sup>[12]</sup>对40例胃癌患者利用Livin干扰技术可明显干扰Livin基因表达,并使胃癌细胞的凋亡敏感性增加。通过干预阻断凋亡抑制蛋白Livin表达,可以促进癌细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。Wagener *et al*<sup>[16]</sup>用RT-PCR法检测, Livin蛋白质在肾癌细胞质及细胞核中均过度表达( $P = 0.0077$ )。

作为一种新的基因阻断技术, RNAi将会被广泛用于胃癌治疗研究。现已取得令人瞩目的成就,但在胃癌的许多研究方面,如胃癌肿瘤疫苗的研究、寻找对抗胃癌腹膜转移的途径以及探讨遗传性胃癌的基因缺陷等, RNAi技术还隐藏着巨大的应用前景,值得进一步研究和探索,涉及的相关技术问题也还有待进一步解决。

### 参考文献

- Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* 2007; 13: 470-476
- Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J. KIAIP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 820-831
- Grzybowska-Izydorczyk O, Smolewski P. [The role of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in hematological malignancies] *Postępy Hig Med Dosw* (Online) 2008; 62: 55-63
- Lopes RB, Gangeswaran R, McNeish IA, Wang Y, Lemoine NR. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer* 2007; 120: 2344-2352
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- Wang J, Barr MM. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol* 2005; 392:

- 36-55
- 7 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 737-747
- 8 Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003; 19: 9-12
- 9 Ka H, Hunt JS. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas. *Am J Pathol* 2003; 163: 413-422
- 10 Kleinberg L, Lie AK, Flørenes VA, Nesland JM, Davidson B. Expression of inhibitor-of-apoptosis protein family members in malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2007; 38: 986-994
- 11 Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1206-1208
- 12 Liu P, Wang TS, You SH, Ge HM. [Expression of livin in gastric cancer and effect of silencing of the livin gene on apoptosis in gastric cancer cells] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2007; 29: 570-574
- 13 Crnković-Mertens I, Muley T, Meister M, Hartenstein B, Semzow J, Butz K, Hoppe-Seyler F. The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2006; 54: 135-142
- 14 Crnković-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* 2003; 22: 8330-8336
- 15 Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 2001; 495: 56-60
- 16 Wagener N, Crnković-Mertens I, Vetter C, Macher-Göppinger S, Bedke J, Gröne EF, Zentgraf H, Pritsch M, Hoppe-Seyler K, Buse S, Haferkamp A, Autschbach F, Hohenfellner M, Hoppe-Seyler F. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and non-tumorous adult kidney. *Br J Cancer* 2007; 97: 1271-1276

## ■同行评价

本文选题新颖, 具有一定的科学性, 但科研设计需进一步完善。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志名词术语标准

**本刊讯** 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)

# 抗体可以作为半抗原二硝基氟苯免疫靶向治疗的载体

何晓俊, 储艳秋, 蒋公羽, 戴兆云

## ■背景资料

二硝基氟苯(DNFB)是最常用的半抗原之一, 他可直接结合蛋白质, 激发机体产生细胞免疫反应, 皮肤试验可诱导红肿, 甚至水泡溃烂等变态反应, 20多年来一直作为过敏药物疗效评价及临床测试人体细胞免疫的标准方法。

何晓俊, 金坛市人民医院内科 江苏省金坛市 214300  
储艳秋, 蒋公羽, 复旦大学化学系 上海市 200433  
戴兆云, 复旦大学附属华东医院消化科 上海市 200040  
上海市中医肝病基金资助项目, No. SH-ZXYJH2005-004  
通讯作者: 戴兆云, 上海市延安西路221号, 200040, 复旦大学附属华东医院消化科, daizhaoyun1@yahoo.com.cn  
电话: 021-62483180-80201  
收稿日期: 2008-12-24 修回日期: 2009-01-22  
接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-05-08

## A potential carrier for targeted therapy of DNFB hapten-induced immune

Xiao-Jun He, Yan-Qiu Chu, Gong-Yu Jiang,  
Zhao-Yun Dai

Xiao-Jun He, Department of Internal Medicine, Jintan People's Hospital, Jintan 214300, Jiangsu Province, China  
Yan-Qiu Chu, Gong-Yu Jiang, Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200443, China  
Zhao-Yun Dai, Department of Gastroenterology, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China

Supported by: the Liver Foundation of Combination of Traditional Chinese Medicine in Shanghai, No. SH-ZXYJH2005-004

Correspondence to: Dr. Zhao-Yun Dai, Department of Gastroenterology, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China. daizhaoyun1@yahoo.com.cn  
Received: 2008-12-24 Revised: 2009-01-22  
Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the influence of dinitrofluorobenzene (DNFB) on the antibody titer of hepatitis B immunoglobulin (HBIG).

**METHODS:** Three different doses (2, 4, 8 mg) of DNFB were mixed with phosphate buffer solution (PBS) of HBIG respectively, 13 mg in a volume of 500  $\mu$ L PBS, while same solutions of HBIG were used as controls. The 2, 4 mg tubes and the control tubes were not precipitated except for the 8 mg tube with 10 000 r/min configuration. The 3 transparent tubes were desalted with column of Sephadex G-25 Superfine HiTrap respectively. All of the eluents of the 3 tubes were half-diluted consecutively with phosphate buffer saline (PBS) respectively to change totally into 36 samples of 2 mg group, 4 mg group and

control group, with 12 in each group. The above samples were all tested for the antibody titer of HBIG using ELISA. The 2 mg tube, 4 mg tube and the control tube were all precipitated in solution of saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Compared with standard curves of both quantity of DNFB and gauges of  $A_{340}$  in supernants made of same controlled tubes, the remaining DNFB in supernants in different tubes were all obtained respectively.

**RESULTS:** Except for the 8 mg group, there were no difference in the 3 groups in terms of the absorbance values ( $A_{450}-A_{630}$ ) of HBIG in same dilution grade of any group with two-way anova (analysis of variance) ( $P > 0.05$ ). However there was great difference between different dilution grades in any group with two-way anova ( $P < 0.01$ ). The 6.5 mg of HBIG in the 2 mg tube and 4 mg tube were respectively combined with 0.67 mg and 0.86 mg of DNFB, meaning that each molecule of HBIG with 88.72 and 103.48 molecules of DNFB, namely 6.12% and 7.86% in residual amino acid of each molecule of HBIG combined with DNFB.

**CONCLUSION:** The immune globulin (antibody) might be used as a carrier for DNFB target therapy.

**Key Words:** Hepatitis B immune globulin; Dinitrofluorobenzene; Targeted therapy; Anti-HBs; Hapten

He XJ, Chu YQ, Jiang GY, Dai ZY. A potential carrier for targeted therapy of DNFB hapten-induced immune. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1350-1354

## 摘要

**目的:** 了解半抗原二硝基氟苯(DNFB)结合乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)后对其抗体功能的影响。

**方法:** 常温下把HBIG(13 mg/500  $\mu$ L PBS)水溶液分别与不同剂量(2、4、8 mg)的DNFB混合, 组成2、4、8 mg管, 混匀过夜后离心。取2、4 mg管及未加DNFB的HBIG水溶液对照管, 各取半量对半稀释, 以HiTrap分子筛柱脱

## ■同行评议者

高春芳, 研究员, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科



盐, 3个洗脱液再分别作对半系列稀释11次, 3组共组成36个标本. ELISA法检测乙肝表面抗体的效价. 取2、4 mg管的另一半分别予饱和硫酸铵沉淀后取上清, 以紫外光光度分析仪测定 $A_{340}$ , 与加入不同剂量DNFB的5个系列浓度作内标的对照管上清相比较, 计算相应管中HBIG结合掉的DNFB量.

**结果:** 2、4 mg管及对照组, 经双因素方差分析及q检验, 三组间同稀释度间吸光差值( $A_{450}-A_{630}$ )无差异, 而各稀释度间则有非常显著差异( $P<0.01$ ). 饱和硫酸铵沉淀结合分光光度法测定证实2、4 mg管中6.5 mg HBIG分别结合DNFB 0.67 mg和0.86 mg, 即每一个HBIG分子分别结合88.72及113.48个DNFB半抗原分子, 约占HBIG氨基酸残基的6.12%和7.86%.

**结论:** 免疫球蛋白(抗体)可作为半抗原DNFB免疫靶向治疗慢性病毒感染或肿瘤的一种有效载体.

**关键词:** 乙型肝炎免疫球蛋白; 二硝基氟苯; 靶向治疗; 抗HBs; 半抗原

何晓俊, 储艳秋, 蒋公羽, 戴兆云. 抗体可以作为半抗原二硝基氟苯免疫靶向治疗的载体. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1350-1354

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1350.asp>

## 0 引言

半抗原是一类特殊的抗原, 他是指那些不能单独, 需与机体蛋白(载体)结合后形成完全抗原才能激发机体产生免疫的抗原. 二硝基氟苯(dinitrofluorobenzene, DNFB)是最常用的半抗原之一, 他可直接结合蛋白质, 激发机体产生细胞免疫反应<sup>[1-2]</sup>, 皮肤试验可诱导红肿, 甚至水泡溃烂等变态反应, 20多年来一直作为抗过敏药物疗效评价及临床测试人体细胞免疫的标准方法. 为研究DNFB结合蛋白后对其功能的影响, 本课题组以不同剂量比的DNFB溶解到乙型肝炎免疫球蛋白(hepatitis B immunoglobulin, HBIG)溶液中, 两者混匀过夜结合后以分子筛去除游离的DNFB, 取结合了DNFB的HBIG, 以酶联免疫法(ELISA)检测该免疫球蛋白的抗体效价, 并进行了结合量测定, 从而评估DNFB结合的效应.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HBIG是上海市新兴医药公司生产的药品(批号为: 20050201-2), 100 IU/mL, 蛋白含量为130 g/L, 平均相对分子质量为160 kDa. 测定乙

型肝炎表面抗体试剂盒为上海科华生物科技公司产品. 酶标测定仪由上海仪器厂出品. DNFB均为分析纯级产品. 精细脱盐柱(Sephadex G-25 Superfine HiTrap)从Amersham Biosciences公司购买. 酶标仪(Thermo labsystems, Model No. 353)为上海生化仪器厂产品. UV-240型紫外分光光度计购自日本Shimadzu株式会社. PBS为pH为8.4的磷酸钠缓冲溶液.

### 1.2 方法

**1.2.1 HBIG结合DNFB:** 四管500  $\mu$ L PBS各含13 mg HBIG, 分别加入DNFB 2、4、8及0 mg作为2 mg管、4 mg管、8 mg管和对照管. 各管标本混匀后, 置4℃结合过夜.

**1.2.2 脱盐取结合物:** 四管标本过夜结合后经4000 g于4℃下离心10 min, 8 mg管有少量沉淀. 溶液澄清的2 mg管、4 mg管和对照管各取半量以PBS稀释至1 mL, 以Sephadex G-25 Superfine HiTrap柱脱盐, 按说明书把无色的第一段1.5 mL丢弃, 取第二段黄色洗脱液2 mL作为DNFB结合物.

**1.2.3 分组及抗体测定:** 2 mg管、4 mg管、对照管的各以上脱盐结合物作为母液, 分别取50  $\mu$ L以PBS进行对半倍比系列稀释至1:1024, 加上各自未稀释的第一管, 分别制成2 mg管、4 mg管、对照组的系列稀释度溶液各12管. 各组均按由低到高的稀释度排列, 第1、2、3行分别为2 mg管、4 mg管和对照组共36个标本. 测定方法: 按试剂盒说明书测定乙肝表面抗体效价. 对以上36个标本进行顺序加样, 并同时按测定要求设立第1, 第2阳性对照, 第1, 第2阴性对照及2个空白对照, 共42个加样孔. 用酶标仪分别测定450 nm和630 nm的两个吸光值数据, 取差值进行比较. 半抗原2 mg管、4 mg管及对照组对半系列稀释与吸光值的关系.

**1.2.4 HBIG结合DNFB直观及定量分析:** 取澄清的2 mg管、4 mg管和对照管标本剩余的另一半溶液250  $\mu$ L, 分别加入无离子水至500  $\mu$ L, 各加入硫酸铵380 mg配成饱和溶液, 置4℃下1 h后4000 g沉淀, 2 mg管、4 mg管和对照管标本沉淀. 取各管上清400  $\mu$ L, 各加入无离子水1100  $\mu$ L, 对照管上清标本调零, 以UV-240型紫外分光光度计测定 $A_{340}$ . 另以同样方法制取的对照管上清400  $\mu$ L共5管, 分别加入内标量DNFB 0.2 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 1.5 mg, 2.0 mg混匀, 寻找最大吸光峰值的波长, 再测定各管该波长的吸光度值 $A_{340}$ , 制作标准曲线.

### ■ 相关报道

Lu *et al*发现带有半抗原结构(DNFB或FITC)的叶酸偶联物作肿瘤靶向治疗, 疗效较为突出, 甚至出现了6只小鼠移植瘤中, 2只小鼠的肿瘤完全消退, 并建立了完全的特异抗癌免疫, 可阻断同样肿瘤的再次攻击.

## ■应用要点

免疫球蛋白(抗体)可作为半抗原DNFB免疫靶向治疗慢性病毒感染或肿瘤的一种有效载体。

表 1 三个配伍组36个标本抗体效价吸光度差值( $A_{450}-A_{630}$ )比较

	稀释度											
	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
2 mg管	1.732	1.820	2.083	1.989	1.887	1.788	1.638	1.239	0.563	0.341	0.151	0.089
4 mg管	1.759	2.144	1.859	1.910	2.009	1.620	1.403	0.828	0.397	0.219	0.107	0.058
对照组	1.606	2.186	1.737	1.885	2.045	1.745	1.279	1.021	0.607	0.341	0.154	0.079



图 1 ELISA法测定乙肝表面抗体效价微孔反应板实物图。1-2: 阳性对照; 3-4: 阴性对照; 5-6: 空白对照。

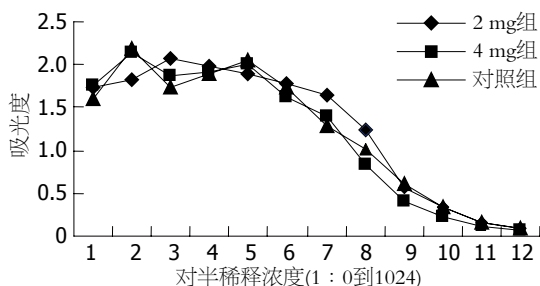


图 2 三管系列稀释与抗体吸光度值的比较。

**统计学处理** 3个配伍组间及其12种不同稀释度间比较, 采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)及 $q$ 检验。所有数据采用SPSS10.0软件进行分析。

## 2 结果

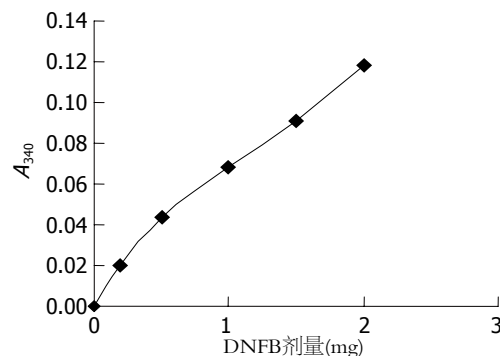
**2.1 ELISA法测定乙型肝炎表面抗体活性** 双因素方差分析及 $q$ 检验, 三个配伍组间比较( $F_1 = 1.43, P_1 = 0.262 > 0.05$ ), 提示无显著差异, 而12种稀释度间比较( $F_2 = 117.38, P_2 < 0.0001$ ), 提示有非常显著差异(表1, 图1-2)。

**2.2 HBIG结合DNFB直观观察** 从混合了DNFB的HBIG与未混合DNFB的HBIG溶液对饱和硫酸铵沉淀的反应看, 半抗原结合免疫球蛋白, 并和他一起在水溶液中沉淀(图3)。

**2.3 紫外分光光度计结合定量分析** DNFB在饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 上清液中紫外吸收最大光谱峰为340 nm。在饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀HBIG后, 以同样方法制作的上清液中分别加入不同内参照量的DNFB, 与所相应测出的 $A_{340}$ 值制成标准曲线(图4)。而2 mg管、4 mg管上清在 $A_{340}$ 分别为0.026及



图 3 4 mg管、2 mg管和对照管饱和硫酸铵沉淀结果图(上清已吸出, DNFB呈黄色)。1: 4 mg管; 2: 2 mg管; 3: 对照管。

图 4 内参照DNFB剂量与 $A_{340}$ 测定值对应图。

0.062。2 mg管、4 mg管上清DNFB含量分别应为0.26 mg及0.91 mg。以此折算, 2 mg管、4 mg管中HBIG分别结合了0.67 mg、0.86 mg的DNFB。

## 3 讨论

以DNFB外搽皮肤作为皮炎动物模型, 可用于评价抗过敏药物的疗效。临床上也以此方法测定Ⅵ型变态反应。长期以来, 两者均是经典方法<sup>[1-2]</sup>, 原理是DNFB渗透到皮下, 与皮下的蛋白结合产生抗原性改变, 从而诱导迟发性T细胞超敏反应(DTH)<sup>[3-6]</sup>。但DNFB作为半抗原结合蛋白质后, 对该蛋白功能是否有影响至今未见报道。

HBIG为HBsAg免疫人体后分离的免疫球蛋白, 纯度高达99%以上, 为HBsAg的多位点多克隆抗体蛋白, 由于活性测定方便, 效价与抗体

活性呈线性关系, 来源又较便利, 我们就选取他作为研究目标. 我们分别以2、4、8 mg的3种不同剂量的DNFB, 加到已有PBS液稀释至500  $\mu$ L的含13 mg HBIG的3管中, 并采用未加DNFB的同样HBIG溶液作对照, 除出现沉淀的8 mg管外, 其余3管均以分子筛柱去除小分子DNFB, 取其洗脱结合物经系列对半稀释, 以ELISA测定乙型肝炎表面抗体效价, 其结果经双因素方差分析(Two-way ANOVA), 3个配伍组间比较, 各组间无显著差异( $P>0.05$ ), 提示DNFB结合HBIG后, 对其功能没有任何影响. 可能是DNFB与HBIG分子内部的疏水键结合, 而不影响分子表面结合抗原的亲水键有关. 而各组中12种稀释度间比较, 有非常显著差异( $P<0.01$ ). 8 mg管出现沉淀, 提示这样的结论需在一定范围内才会成立, 同时也说明半抗原与抗体间存在相互作用, 加入的DNFB剂量过大, 可破坏HBIG溶液的稳定性, 出现浑浊而沉淀, 这与我们以往报道的大量DNFB结合HBsAg的变化相吻合<sup>[7]</sup>. 从饱和硫酸铵溶液沉淀结果及过分子筛柱时黄色的DNFB分布变化看, 有明显的半抗原实现了与HBIG的结合. 作者以饱和硫酸铵溶液沉淀HBIG, 利用内参照法, 以UV-240型紫外分光光度计定量分析证实, 2 mg管和4 mg管分别有0.67 mg及0.86 mg的DNFB实现了与DNFB的结合, 由于DNFB与免疫球蛋白分子质量比为0.0011625, 理论上讲, 这两种剂量(2、4 mg)相当于每毫克的HBIG分别结合了0.104 mg及0.132 mg的半抗原DNFB, 每一个HBIG(约含1450个氨基酸残基)分别结合了88.72及113.48个DNFB, 约占其氨基酸残基的6.12%和7.86%.

在医学上, 以与此类似的二硝基氯苯(DNCB)丙酮溶液皮肤外用诊断及治疗疾病已有20-30年的时间. 传统文献认为<sup>[2-6]</sup>, DNCB外搽皮肤后即可与皮下蛋白结合, 经1 wk机体可产生针对半抗原的DTH反应. 杨国亮 *et al* 早在20世纪80年代就以DNCB外搽法成功治愈皮肤病毒性疣, 治愈率达90%<sup>[2-5]</sup>. 除了外搽治疣外, 更常用于测定机体的非特异性细胞免疫功能, 还用于治疗斑秃<sup>[6]</sup>. 杜光辉 *et al*<sup>[8]</sup>以含10 mg的DNCB丙酮溶液瘤内注射治疗小鼠艾氏移植瘤, 疗效明显, 小鼠寿命延长率较单纯丙酮组, 对照组分别延长809.2%, 128.5%, 几乎已达小鼠自然寿命. Berd<sup>[9]</sup>以DNFB与自体癌瘤结合产生的DNP(二硝基酚)修饰的自体癌瘤, 作为自体疫苗治疗癌症有明显疗效, 有效率达45%, 有的同时也出现了远处

肺部癌灶的好转, 病理上出现炎性细胞的浸润, 该治疗不良反应轻, 仅有个别注射处皮疹, 已申报美国专利<sup>[10]</sup>. 戴兆云 *et al*<sup>[11]</sup>也新近发现剂量小至1 mg的DNCB无水乙醇溶液瘤内注射治疗移植性恶性黑色素瘤小鼠, 抑瘤率也分别高达96.73%(对PBS液)、94.06%(对无水乙醇)的疗效, 肿瘤接种后1 mo时, 疗效竟是无水酒精注射法的16倍多(剥出的平均瘤重分别为0.13, 2.19 g), 特别是von *et al*<sup>[12]</sup>及Herrmann *et al*<sup>[13]</sup>更是以DNCB外搽肿瘤灶, 分别成功治愈了恶性黑色素瘤、恶性Merkel氏瘤各1例. 并观察到强大的抗癌免疫, 看来使用很小剂量的半抗原可在一定程度上诱导打破免疫耐受. 由于抗体结合半抗原DNFB后不影响其抗体活性, 那利用结合半抗原的单抗可进行免疫靶向治疗<sup>[14]</sup>, 从而激发细胞免疫, 对肿瘤及慢性感染的防治可能具有很大的实用意义.

虽然半抗原DNFB结合蛋白质的特性已发现了数十年了, 但对其结合蛋白质的化学本质仍不是很清楚. 最初我们发现DNFB结合的蛋白质没有发生共价键性结合<sup>[15-16]</sup>, 提出与疏水性结合有关, 但由于当时未对结合后的沉淀物进行检测, 特别是Aleksic *et al*<sup>[17]</sup>对结合物的深入研究, 确认半抗原的结合, 与甲醛对蛋白的作用<sup>[18]</sup>有些相似, 实际上是共价键性结合, 这为免疫靶向治疗打下了化学基础. Lu *et al*发现带有半抗原结构<sup>[19-20]</sup>(DNFB或FITC)的叶酸偶联物作肿瘤靶向治疗, 疗效较为突出, 甚至出现了6只小鼠移植瘤中, 2只小鼠的肿瘤完全消退, 并建立了完全的特异抗癌免疫, 可阻断同样肿瘤的再次攻击. 所有这些为利用半抗原进行免疫靶向治疗癌症, 以及治愈像慢性乙型肝炎那样的慢性感染开拓了新的研究方向.

#### 4 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药政局编. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 135-136
- 2 杨国亮, 王使生. 现代皮肤病学. 上海: 上海医科大学出版社, 1996: 61-78
- 3 Buckley DA, Du Vivier AW. The therapeutic use of topical contact sensitizers in benign dermatoses. *Br J Dermatol* 2001; 145: 385-405
- 4 Gibbs S. Topical immunotherapy with contact sensitizers for viral warts. *Br J Dermatol* 2002; 146: 705
- 5 Gibbs S, Harvey I, Sterling J, Stark R. Local treatments for cutaneous warts: systematic review. *BMJ* 2002; 325: 461
- 6 贾泰无, 孙瀚秦. DNCB治疗斑秃158例. 中国皮肤性病学杂志 1990; 4: 222-223
- 7 孙莲娜, 许跃芳, 戴兆云. 半抗原二硝基氟苯大量结合

#### ■同行评价

本研究总体设计合理, 方法可靠, 结论明确, 具有较好的学术价值.

- 的乙型肝炎病毒表面抗原抗原性变化. 上海医学 2008; 31: 101-103
- 8 杜光辉, 张咏裳, 周惜才, 蔡丹. 瘤内注射DNCB治疗小鼠移植性肿瘤的研究. 肿瘤防治研究 1996; 23: 294-296
- 9 Berd D. Contribution of dead cells to the immunogenicity of an autologous, hapten-modified melanoma vaccine. *Vaccine* 2003; 21: 795-797
- 10 Berd D, inventor; Thomas Jefferson University, assignee. Composition comprising tumor cells and extracts and method of using thereof. United States Patent: 6458369. 2002 October 1
- 11 戴兆云, 章宏海, 顾翔宇, 吴一新. 二硝基氯苯酒精溶液对黑色素瘤小鼠瘤内注射的疗效. 世界肿瘤杂志 2006; 5: 86-88
- 12 von Nida J, Quirk C. Successful treatment of in-transit melanoma metastases using topical 2-4 dinitrochlorobenzene. *Australas J Dermatol* 2003; 44: 277-280
- 13 Herrmann G, Groth W, Krieg T, Mauch C. Complete remission of Merkel cell carcinoma of the scalp with local and regional metastases after topical treatment with dinitrochlorobenzol. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 965-969
- 14 Lu Y, Low PS. Targeted immunotherapy of cancer: development of antibody-induced cellular immunity. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 163-167
- 15 Dai ZY, Chu YQ, Wu B, Wu L, Ding CF. Investigation of non-covalent complexes of glutathione with common amino acids by electrospray ionization mass spectrometry. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 759-771
- 16 Wu B, Chu YQ, Dai ZY, Ding CF. Interaction between cytochrome c and the hapten 2,4-dinitrofluorobenzene by electrospray ionization mass spectrometry. *Chin J Chem Phys* 2008; 21: 217-220
- 17 Aleksic M, Pease CK, Basketter DA, Panico M, Morris HR, Dell A. Investigating protein haptenation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as a model protein. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 723-733
- 18 Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 2004; 279: 6235-6243
- 19 Lu Y, You F, Vlahov I, Westrick E, Fan M, Low PS, Leamon CP. Folate-targeted dinitrophenyl hapten immunotherapy: effect of linker chemistry on antitumor activity and allergic potential. *Mol Pharm* 2007; 4: 695-706
- 20 Lu Y, Xu LC, Parker N, Westrick E, Reddy JA, Vetzal M, Low PS, Leamon CP. Preclinical pharmacokinetics, tissue distribution, and antitumor activity of a folate-hapten conjugate-targeted immunotherapy in hapten-immunized mice. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3258-3267

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



# 阿司匹林对肠上皮细胞的损伤作用及机制

安敏, 张振玉

安敏, 张振玉, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 实验操作、实验数据搜集及数据的统计分析由安敏完成; 资金提供、课题申请由张振玉完成; 实验设计、论文修改由安敏和张振玉共同完成。

通讯作者: 张振玉, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院消化科. anmin157@163.com

收稿日期: 2009-01-12 修回日期: 2009-04-01

接受日期: 2009-04-08 在线出版日期: 2009-05-08

## Effects and mechanism of aspirin on enterocyte injury

Min An, Zhen-Yu Zhang

Min An, Zhen-Yu Zhang, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhen-Yu Zhang, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. anmin157@163.com

Received: 2009-01-12 Revised: 2009-04-01

Accepted: 2009-04-08 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect and mechanism of aspirin on proliferation of enterocytes.

**METHODS:** After co-culture of aspirin solution with Caco-2 cells for 24 h and 48 h, the proliferation of Caco-2 cells in each group was examined using MTT. Caco-2 monolayer cells model was established. After treatment with different concentrations of aspirin, Transepithelial resistance (TER) of cells was measured by EVOM volttohmmeter.

**RESULTS:** After 24 h, the cell survival rates were  $96.67\% \pm 1.13\%$ ,  $84.32\% \pm 1.29\%$ ,  $62.33\% \pm 2.02\%$  and  $42.99\% \pm 2.09\%$  in groups with aspirin of 0, 0.1, 1, 10 mmol/L, respectively; after 48 h, the cell survival rates were respectively  $96.45\% \pm 1.21\%$ ,  $76.89\% \pm 2.28\%$ ,  $50.28\% \pm 0.98\%$  and  $32.66\% \pm 1.99\%$ . The TER in the group with aspirin of 10 mmol/L was reduced to 50.1% after 72 h. Multiple factors chi square test showed that the influence of aspirin on the proliferation of Caco-2 cells and the epithelial barrier was dose-dependent and time-dependent.

**CONCLUSION:** Aspirin could inhibit the prolifer-

ation of enterocyte and affect the epithelial barrier, in a dose-dependent and time-dependent manner.

**Key Words:** Aspirin; Tight junction; Transepithelial resistance; Caco-2 cells

An M, Zhang ZY. Effects and mechanism of aspirin on enterocyte injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1355-1358

## 摘要

**目的:** 探讨阿司匹林对肠上皮细胞增殖的影响及作用机制。

**方法:** 将不同浓度的阿司匹林溶液与肠上皮细胞株Caco-2细胞共同培养24 h及48 h, 采用MTT法检测阿司匹林对Caco-2细胞的增殖作用。建立Caco-2单层细胞模型, 采用不同浓度阿司匹林溶液处理后, 用EVOM电压电阻仪测定细胞跨膜电阻抗(TER)变化。

**结果:** 在不同浓度的阿司匹林(0、0.1、1、10 mmol/L)作用下, 24 h细胞存活率分别为  $96.67\% \pm 1.13\%$ 、 $84.32\% \pm 1.29\%$ 、 $62.33\% \pm 2.02\%$ 和 $42.99\% \pm 2.09\%$ ; 48 h细胞存活率分别为  $96.45\% \pm 1.21\%$ 、 $76.89\% \pm 2.28\%$ 、 $50.28\% \pm 0.98\%$ 和 $32.66\% \pm 1.99\%$ , 阿司匹林对Caco-2细胞的增殖作用呈现剂量-时间依赖性 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 阿司匹林作用组TER明显降低, 至10 mmol/L组作用72 h时, TER值降低至50.1%。

**结论:** 阿司匹林可抑制肠上皮细胞的增殖, 同时损伤细胞屏障功能, 损伤紧密连接, 且以上两种作用呈剂量和时间依赖性。

**关键词:** 阿司匹林; 紧密连接; 跨膜电阻抗; Caco-2 细胞

安敏, 张振玉. 阿司匹林对肠上皮细胞的损伤作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1355-1358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1355.asp>

## 0 引言

阿司匹林是最用的非甾体类抗炎药(non-

## ■背景资料

阿司匹林是最用的非甾体类抗炎药(NSAIDs)之一。随着阿司匹林的临床应用的日趋广泛, 其消化系统不良反应也日益受到关注。长期以来人们比较注意其引起的胃损伤。

## ■同行评议者

王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

## ■ 研发前沿

近年来随着胶囊内镜、双气囊小肠镜等检查方式在临床的逐渐普及,发现NSAIDs引起的肠道不良反应作用并不低,其可以引起小肠出血、蛋白丢失性肠病、回肠吸收功能障碍、肠通透性升高及结肠出血、穿孔等。所以,对于长期服用阿司匹林的安全性应予以足够的重视。

steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)之一。一般短期使用常用于缓解各种疼痛,退热及手术期的镇痛;长期则主要用于治疗类风湿性关节炎、骨性关节炎等风湿性疾病,而且近来常采用低剂量阿司匹林来临床用于预防心肌梗死、动脉血栓、动脉粥样硬化等心血管疾病。近年研究证实阿司匹林还可预防结直肠癌<sup>[1]</sup>。随着阿司匹林的临床应用的日趋广泛,其消化系不良反应也日益受到关注<sup>[2]</sup>。长期以来人们比较注意其引起的胃损伤,但是近年来随着胶囊内镜、双气囊小肠镜等检查方式在临床的逐渐普及,发现NSAIDs引起的肠道不良反应作用并不低,可以引起小肠出血、蛋白丢失性肠病、回肠吸收功能障碍、肠通透性升高及结肠出血、穿孔等<sup>[3-5]</sup>。所以,对于长期服用阿司匹林的安全性应予以足够的重视。本研究采用Caco-2细胞与阿司匹林共培养,通过MTT法及Caco-2单层细胞跨膜电阻抗的测定,研究阿司匹林对Caco-2细胞增殖的影响以及对细胞紧密连接屏障的作用,探讨阿司匹林引起肠道损伤的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Caco-2细胞细胞株由中国人民解放军南京军区总院普外科惠赠。DMEM高糖培养液为美国Hyclone公司生产。新生小牛血清为杭州四季青公司生产。阿司匹林购自山东新华制药股份有限公司,批号为0702285。噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:**将Caco-2细胞置于细胞培养瓶内,以DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)为培养液:含4.5 g/L D-葡萄糖、L-谷氨酰胺,不含丙酮酸钠和碳酸氢钠、 $1 \times 10^5$  U/L青霉素、100 mg/L链霉素、100 mL/L小牛血清,pH值为7.2。在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养,隔天更换培养液,每3 d按1:3比例传代,实验时取对数生长期细胞。

**1.2.2 MTT比色实验:**将处于对数生长期的细胞,用2.5胰蛋白酶消化后,以每孔 $2 \times 10^4$ 加入96孔培养板中,每孔体积200 μL,置于37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h后换上含不同浓度阿司匹林的培养液(0.1、1、10 mmol/L)180 μL,每种浓度设6孔重复,以不含阿司匹林的培养液180 μL为阴性对照,分组继续培养24、48 h后,每孔加入MTT 20 μL(5 g/L),温浴4 h,弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL,室温避光摇床上充分振荡

表 1 各浓度组阿司匹林作用于Caco-2细胞后的细胞存活率(% , mean ± SD)

分组	24 h	48 h
对照组	96.67 ± 1.13	96.45 ± 1.21
阿司匹林(mmol/L)		
0.1	84.32 ± 1.29 <sup>ac</sup>	76.89 ± 2.28 <sup>acg</sup>
1.0	62.33 ± 2.02 <sup>ae</sup>	50.28 ± 0.98 <sup>aeq</sup>
10.0	42.99 ± 2.09 <sup>a</sup>	32.66 ± 1.99 <sup>ag</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 1.0, 10.0 mmol/L阿司匹林组;

<sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 10.0 mmol/L阿司匹林组; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs 24 h。

20 min,混匀后以空白孔调零,在酶标仪上检测490 nm波长吸光度值(A)。按下列公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = (1-实验组A值/对照组A值) × 100%。经换算成细胞存活率。每次实验重复3次。

**1.2.3 跨膜电阻抗(TER)的测定:**用STX2双杆电极EVOM电压电阻仪测定单层细胞的跨膜电阻抗。Caco-2细胞以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于涂明胶的多聚碳膜Transwell培养板的顶层小室微孔膜上(直径6.5 mm,孔径大小0.4 μm)培养。当测定的TER值达到稳定后4 d,进行实验处理。处理分为4组,即对照组,0.1、1、10 mmol/L的阿司匹林处理组。每个处理组取3个孔,重复实验,计算其平均值。测定的TER结果,用最初测定结果的百分比表示。

**统计学处理** 实验所得数据,用Stata 9.0统计软件分析,采用多因素卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 阿司匹林对Caco-2细胞的生长抑制作用** 随着阿司匹林作用浓度的增加及作用时间的延长,Caco-2细胞的生长抑制率逐渐升高,即细胞存活率越来越低,且这种作用呈现剂量-时间依赖性(表1, $P < 0.05$ )。

**2.2 阿司匹林对Caco-2细胞的屏障功能的作用** 为了确定阿司匹林是否对Caco-2细胞的屏障功能有直接的破坏作用,本实验观察了阿司匹林对培养的Caco-2细胞的作用。测定不同浓度阿司匹林作用不同时间的跨膜电阻抗(TER)变化(图1)。

## 3 讨论

近年来,大量的研究证实阿司匹林可以引起较多的不良反应<sup>[6]</sup>,尤其是胃肠道损害较为突出,主要表现为黏膜糜烂和溃疡,严重者可以发生

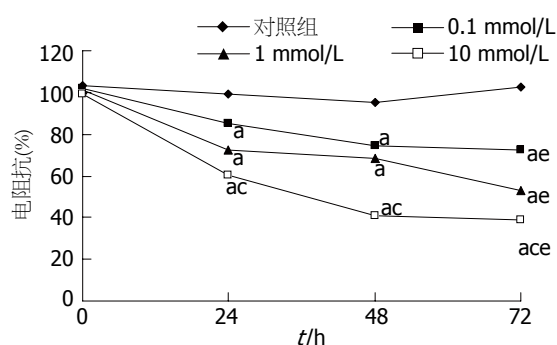


图1 不同浓度阿司匹林引起的跨膜电阻抗时间变化曲线图.  $^aP<0.05$  vs 对照组;  $^bP<0.05$  vs 其他浓度组;  $^cP<0.05$  vs 其他时间组.

出血或者穿孔. 但是阿司匹林对肠道的不良反应则研究较少<sup>[7]</sup>. 阿司匹林引起肠道损伤的可能机制有以下几点: (1)阿司匹林对肠黏膜有直接的化学刺激作用, 而且由于其肠肝循环特点, 从而延长了其与肠黏膜的接触时间. 肠腔内容物如细菌、胆盐、食物等可以进一步诱导损伤, 其中细菌可能是主要的侵袭因素. (2)阿司匹林选择性抑制环氧合酶COX尤其是COX-1的活性<sup>[8-9]</sup>, 减少了内源性前列腺素的合成与释放, 破坏肠上皮黏膜的屏障作用, 引起肠内细菌及侵袭因子的侵入, 从而诱发新的炎症病灶的产生, 诱发旧的溃疡病灶复发. (3)阿司匹林可以诱导中性粒细胞在肠黏膜受损的部位聚集, 浸润, 从而加重受损部位的免疫损伤. (4)阿司匹林还可以促进一些炎症介质, 如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和白三烯(leukotriene, LT)的释放. 超过生理限度的TNF及LTB可以引起前列腺素释放减少, 内皮素释放增加, 而内皮素则是强烈的缩血管因子. 二者比例失调, 可以影响受损黏膜的修复.

Caco-2细胞来源于人结肠癌细胞株, 以普通的培养条件培养成熟的Caco-2细胞可形成与小肠上皮细胞相同的细胞极性和致密的单细胞层组织, 其形态与人体的肠上皮细胞相似, 并且可以分泌与人体相同的酶类及转化因子等<sup>[10]</sup>, 且与被动吸收的营养物质有较好的相关性, 临床常用于建立体外肠屏障模型<sup>[11]</sup>.

本研究利用MTT比色方法了解阿司匹林对Caco-2细胞的剂量及时间毒性情况. MTT还原物甲瓟是能量代谢的反映, 其生成量随着细胞数的增多而增加<sup>[12-13]</sup>. 由本研究可以看出, 阿司匹林在实验给定浓度(0.1、1、10 mmol/L)条件下, 对Caco-2细胞的生长有显著的抑制作用, 且这种抑制作用随着作用时间和作用浓度的增加

越来越明显. 这说明阿司匹林可以直接作用于肠上皮细胞, 引起肠上皮细胞的损伤. 此外本实验进一步测定Caco-2细胞单层细胞的跨膜电阻抗, 实验结果表明阿司匹林可以使TER值明显降低, 说明单层细胞的通透性升高, 即提示上皮细胞完整性可能已经遭到破坏. 肠黏膜屏障是肠道最重要的一道屏障, 由完整的肠上皮细胞和紧密连接构成. 阿司匹林对细胞屏障功能的破坏可能是由于破坏了细胞间的紧密连接而引起<sup>[14-15]</sup>. 这种可能的机制将在今后的实验中进一步证实.

本实验证明, 阿司匹林对肠上皮细胞有直接的杀伤作用, 且可以破坏上皮细胞屏障功能, 为进一步研究阿司匹林损伤肠上皮细胞屏障功能及其机制奠定了一定的实验基础.

#### 4 参考文献

- 1 韩英, 李世荣. 非甾体类抗炎药物与食管、大肠癌的预防. *中华消化杂志* 1998; 18: 364
- 2 Takeuchi K, Hatazawa R, Tanigami M, Tanaka A, Ohno R, Yokota A. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sci* 2007; 80: 329-336
- 3 Thiéfin G, Beaugerie L. Toxic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 286-294
- 4 Bjarnason I, Takeuchi K, Simpson R. NSAIDs: the emperor's new dogma? *Gut* 2003; 52: 1376-1378
- 5 Hawkey CJ. NSAIDs, coxibs, and the intestine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47 Suppl 1: S72-S75
- 6 Somasundaram S, Sigthorsson G, Simpson RJ, Watts J, Jacob M, Tavares IA, Rafi S, Roseth A, Foster R, Price AB, Wrigglesworth JM, Bjarnason I. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 639-650
- 7 Goltsov A, Maryashkin A, Swat M, Kosinsky Y, Humphery-Smith I, Demin O, Goryanin I, Lebedeva G. Kinetic modelling of NSAID action on COX-1: focus on in vitro/in vivo aspects and drug combinations. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 122-136
- 8 Yokomizo A, Moriwaki M. Transepithelial permeability of myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1774-1776
- 9 Cruz N, Qi L, Alvarez X, Berg RD, Deitch EA. The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *J Burn Care Rehabil* 1994; 15: 207-212
- 10 Adebayo D, Bjarnason I. Is non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) enteropathy clinically more important than NSAID gastropathy? *Postgrad Med J* 2006; 82: 186-191
- 11 张大真, 权正良, 李增烈. 长期服用小剂量肠溶型阿司匹林对胃十二指肠黏膜损害的病例对照研究. *胃肠病学* 2006; 11: 427-430
- 12 Czyzewski K, Styczynski J. Imatinib is a substrate

#### ■创新盘点

本研究采用Caco-2细胞与阿司匹林共培养, 通过MTT法及Caco-2单层细胞跨膜电阻抗的测定, 研究阿司匹林对Caco-2细胞增殖的影响以及对细胞紧密连接屏障的作用, 探讨阿司匹林引起肠道损伤的机制.

## ■同行评价

本研究紧密结合临床,设计合理,技术可行,结果对临床工作具有一定的指导价值。

- for various multidrug resistance proteins. *Neoplasma* 2009; 56: 202-207
- 13 Molskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, Skepper JN. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 2009 Mar 20. [Epub ahead of print]
- 14 Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C800-C806
- 15 Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Di Nicuolo F, Vecchio FM, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Lactobacillus acidophilus protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 2004; 69: 225-228

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨 国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会,广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开,现将会议征文有关事项通知如下:

### 1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展,名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结。

### 2 征稿要求

论文资料务必真实可靠,书写规范,简明扼要,每篇以3000字以内为宜,并附800字左右的摘要1份;来稿请用电脑打印,用word软件编入,并附软盘,或发送电子邮件,文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话。截稿日期:2009-07/30

### 3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合。入选论文并参会者给予记I类学分6分,另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志。参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分。

### 4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿。无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班。

### 5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556



# 埃索美拉唑联合莫沙比利治疗老年低压型LES食管运动功能障碍29例

虞阳, 姚健凤, 夏俊, 赵尚敏, 于晓峰

虞阳, 姚健凤, 夏俊, 赵尚敏, 于晓峰, 华东医院消化内科 上海市 200040

作者贡献分布: 本课题由虞阳与于晓峰设计; 实验操作由夏俊完成; 数据统计由姚健凤与赵尚敏完成; 论文写作由虞阳完成。

通讯作者: 于晓峰, 200040, 上海市延安西路221号, 华东医院消化内科, yuxiaofeng252@yahoo.cn

电话: 021-62483180

收稿日期: 2008-12-02 修回日期: 2008-12-27

接受日期: 2009-03-25 在线出版日期: 2009-05-08

## Effect of esomeprazole and mosapride on the esophageal motility dysfunction in elderly patients with hypotensive LES: an analysis of 29 cases

Yang Yu, Jian-Feng Yao, Jun Xia, Shang-Min Zhao, Xiao-Feng Yu

Yang Yu, Jian-Feng Yao, Jun Xia, Shang-Min Zhao, Xiao-Feng Yu, Department of Gastroenterology, Huadong Hospital, Shanghai 200040, China

Correspondence to: Xiao-Feng Yu, Department of Gastroenterology, Huadong Hospital, 221 Yan'an West Road, Shanghai 200040, China. yuxiaofeng252@yahoo.cn

Received: 2008-12-02 Revised: 2008-12-27

Accepted: 2009-03-25 Published online: 2009-05-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutic effect of esomeprazole and mosapride on aged hypotensive type LES esophageal motility dysfunction.

**METHODS:** A total of 57 aged hypotensive type LES esophageal motility dysfunction patients were divided into treatment group ( $n = 29$ ) and control group ( $n = 28$ ). Patients in treatment group were given esomeprazole 20 mg per day and mosapride 5 mg three times daily for 1 mo while patients in control group were given mosapride 5 mg three times daily for 1 mo. After medication treatment, the clinical symptoms, lower esophageal sphincter (LES) pressure and esophageal motility were observed.

**RESULTS:** Fifty seven cases of patients complet-

ed the study. The total effective rate of treatment group was 86.2%, which was significantly higher than that of control group (60.7%). LES pressure was improved significantly in both groups ( $1.82 \pm 0.36$  vs  $1.09 \pm 0.18$ ,  $P < 0.001$ ;  $1.91 \pm 0.45$  vs  $1.06 \pm 0.17$ ,  $P < 0.001$ , respectively). Esophageal motility became better in both groups, but no statistical difference was observed between them after treatment ( $48.3\%$  vs  $53.6\%$ ,  $P = 0.193$ ).

**CONCLUSION:** Esomeprazole and mosapride are effective for aged hypotensive type LES esophageal motility dysfunction.

**Key Words:** Esophageal motility dysfunction; Aged hypotensive; Esomeprazole; Mosapride

Yu Y, Yao JF, Xia J, Zhao SM, Yu XF. Effect of esomeprazole and mosapride on the esophageal motility dysfunction in elderly patients with hypotensive LES: an analysis of 29 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1359-1362

### 摘要

**目的:** 探讨埃索美拉唑联合枸橼酸莫沙比利治疗老年低压型食管下括约肌(LES)食管运动功能障碍的作用。

**方法:** 采用随机对照法, 将低压型LES并伴有食管蠕动功能异常的老年患者分为2组: 治疗组29例, 给予埃索美拉唑20 mg, qd和枸橼酸莫沙比利5 mg, tid, po; 对照组28例给予枸橼酸莫沙比利5 mg, tid, po。1 mo后观察临床症状改善及LES压力和食管运动功能的改变, 并观察有关不良反应的发生。

**结果:** 57例患者均完成研究, 治疗组总有效率显著高于对照组总有效率( $86.2\%$  vs  $60.7\%$ ,  $P < 0.01$ ); 治疗后, 两组患者LES压较治疗前均明显升高( $1.82 \pm 0.36$  vs  $1.09 \pm 0.18$ ,  $1.91 \pm 0.45$  vs  $1.06 \pm 0.17$ , 均 $P < 0.001$ ); 治疗组食管运动功能改善率与对照组相比无统计学差异( $48.3\%$  vs  $53.6\%$ ,  $P = 0.193$ )。

**结论:** 联合应用埃索美拉唑和莫沙比利治疗

### ■背景资料

老年人常有食管运动功能障碍, 临床多表现为反酸、吞咽困难、胸痛、烧心等症状。对于低压型LES伴食管蠕动功能障碍的老年患者, 促动力药物能有效改善LES压及食管蠕动功能, 质子泵抑制剂(PPIs)能较好地改善患者的临床症状。

### ■同行评议者

程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心; 黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

## ■应用要点

对于老年低压型LES食管运动功能障碍患者,可应用埃索美拉唑联合莫沙比利治疗,有效且安全。

老年低压型LES食管运动功能障碍性疾病安全有效。

**关键词:** 食管运动功能障碍; 老年; 埃索美拉唑; 莫沙比利

虞阳, 姚健凤, 夏俊, 赵尚敏, 于晓峰. 埃索美拉唑联合莫沙比利治疗老年低压型LES食管运动功能障碍29例. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1359-1362

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1359.asp>

## 0 引言

老年患者常会出现反酸、吞咽困难、胸痛、烧心等症状,内镜、X线及核素扫描等检查往往正常,而通过食管测压检查可以发现不少存在食管运动功能障碍。本研究将我院于2004-08/2008-04通过食管测压检查发现的老年低压型食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)并伴有食管蠕动功能障碍的患者,给予埃索美拉唑和莫沙比利联合治疗观察其疗效。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 57例患者均系我院门诊及住院患者,男49例,女8例,年龄60-86(平均71±8)岁。所有患者均存在反酸、吞咽困难、胸痛、烧心中的一种或一种以上症状,经心电图、心动超声、同位素心肌灌注显像、胸片及腹部B超排除心血管、肺、胸膜、肝胆或其他脏器引起的症状,并通过胃镜检查除外胃、食管器质性疾病引起的上述症状。同时这些患者均经过食管测压检查确定为低压型LES并伴有食管蠕动功能异常。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及用药:** 57名患者随机分为治疗组和对照组,治疗组29例给予埃索美拉唑(耐信片,阿斯利康)20 mg, qd及枸橼酸莫沙比利(新络纳片,康宏)5 mg, tid, po; 对照组28例给予枸橼酸莫沙比利(新络纳片,康宏)5 mg, tid, po。疗程均为1 mo。

**1.2.2 临床症状:** 详细询问患者反酸、吞咽困难、胸痛、烧心等症状严重程度及发生频度进行症状记分。根据症状不同程度积分分别为0、1、2、3分,0分指无症状;1分症状轻微可以忍受;2分介于1分、3分之间;3分症状明显,不能忍受,需休息和药物治疗。根据症状发生频度不同记录为0、1、2、3分,0分指无症状;1分症状每月发生;2分症状每周发生;3分症状每天发生。将各级症状所占的百分比和症状频度分级的积分相乘,为症状总分。疗效判定症状评定标准:

(1)显效:临床症状总分降低80%以上;(2)有效:临床症状总分降低50%-80%;(3)无效:临床症状总分降低50%以下。总有效率(%)=[(显效+有效)/总例数]×100%。

**1.2.3 LES压力和食管蠕动功能测定:** 采用瑞典CTD-Synectics公司生产的连续灌注导管测压系统,包括四通道测压导管,液压毛细管灌注系统,压力换能器和计算机记录仪。食管测压术前3 d停用影响食管动力的药物,禁食10 h。患者平卧位,经鼻腔插管,使远端侧孔全部进入胃腔内,用外段外拉法测LES压力,然后通过干咽和湿咽,观察食管体部蠕动幅度、间期、传播速度和方向。记录并比较治疗后LES压力的变化和食管蠕动功能改善情况。

**1.2.4 不良反应:** 记录治疗期间出现任何与用药有关的症状;治疗前后检查血、尿常规及肝、肾功能。

**统计学处理** 统计工具采用SPSS13.0统计软件分析。计数数据采用 $t$ 检验,率的比较采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 被认为统计学上有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 一般资料** 两组患者的年龄、性别、体质量和胸痛、吞咽困难、烧心、反酸症状的发生率以及治疗前LES压力经比较,差异均无显著性。

**2.2 治疗后临床症状改善情况** 经治疗后,治疗组29例患者症状改善的显效率为34.5%(10/29),有效率为51.7%(15/29),总有效率为86.2%(25/29);对照组28例患者症状改善的显效率为25%(7/28),有效率为35.7%(10/28),总有效率为60.7%(17/28)。治疗组的总有效率高于对照组( $P=0.041$ ,表1)。

**2.3 治疗后LES压力的改变** 经治疗后,治疗组和对照组的LES压均较治疗前显著升高( $P<0.001$ ,表2)。

**2.4 治疗后食管运动功能的改变** 经治疗后,治疗组患者的食管运动功能改善率为48.3%(14/29),对照组为53.6%(15/28),两组间无统计学差异( $P=0.193$ )。

**2.5 不良反应发生率** 所有入选病例均完成实验,治疗组29例患者中2例(6.9%)出现腹胀,但症状为一过性,未经停药及治疗自行改善;对照组28例患者中1例(3.6%)出现头晕,症状为轻度,未影响患者治疗及正常生活。治疗前后血、尿常规及肝肾功能检查均未见异常。

## 3 讨论

老年患者中,反酸、吞咽困难、胸痛、烧心等

表 1 治疗后临床症状改善情况 (%)

分组	n	显效	有效	总有效率
治疗组	29	34.5(10/29)	51.7(15/29)	86.2(25/29) <sup>a</sup>
对照组	28	25.0(7/28)	35.7(10/28)	60.7(17/28)

<sup>a</sup>P = 0.023 vs 对照组.

表 2 治疗后LES压力的改变 (kDa)

分组	n	治疗前LES压	治疗后LES压
治疗组	29	1.09 ± 0.18	1.82 ± 0.36 <sup>b</sup>
对照组	28	1.06 ± 0.17	1.91 ± 0.45 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.001 vs 治疗前LES压.

症状十分常见, 在除外心血管和呼吸道的疾病后, 通过食管测压检查可以发现不少患者的这些症状是由于食管运动功能障碍引起的. 近年来食管运动功能紊乱性疾病发病率日益增高, 并引起临床医生, 尤其是消化科医生的重视. 我国人群中食管体部动力障碍为引起上述症状的主要因素<sup>[1]</sup>, 在我们先前的研究中发现<sup>[2]</sup>, LES压力异常及食管体部蠕动异常均为产生上述临床症状的主要因素之一. 由于老年患者全身各脏器的慢性退行性变随着年龄而增加, 导致神经肌肉的退行性变, 同时老年人慢性病多也容易继发神经肌肉的异常, 故更容易引起食管体部平滑肌及食管下括约肌功能紊乱失调而产生症状<sup>[3]</sup>.

本研究入组的57名患者年龄在60-86岁, 其中≥80岁的高龄老人11例(19.30%), 男性明显高于女性约6.1:1, 临床症状主要为反酸、吞咽困难、胸痛、烧心. 所有入组患者均经过食管测压检查确定为低压型LES并伴有食管蠕动功能异常, LES压力异常及食管体部蠕动异常均为产生相关临床症状的因素<sup>[4-5]</sup>. 本研究发现, 应用莫沙比利治疗后, 无论是否同时合用埃索美拉唑, 患者的LES压力较治疗前均有明显的增高, 食管运动功能也有了较为明显的改善. 莫沙比利是一种高选择性5-HT<sub>4</sub>受体激动剂, 可增强食管蠕动和下食管括约肌张力从而防止胃内容物反流入食管, 增强食管的清除作用<sup>[6-7]</sup>. 此外, 莫沙比利还可以增加胃和十二指肠收缩以及胃和十二指肠的协调运动, 减少十二指肠胃反流<sup>[8]</sup>. 本研究同时发现, 在应用莫沙比利的同时加用埃索美拉唑, 对反酸、吞咽困难、胸痛、烧心等症状改善的总有效率明显高于单用莫沙比利组. 我们认为, 引起这种结果的主要原因是由于我们入组的患者均是低压型LES, LES压力过低将使胃和十二指肠内容物反流入食管, 造成酸性物质对食管黏膜损害或刺激食管内感觉神经引起相应症状<sup>[9-10]</sup>. 质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)能选择性抑制壁细胞膜中H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶来抑制胃酸分泌, 埃索美拉唑作为新型

PPI, 临床治疗效果不逊色于其他PPI制剂<sup>[11-12]</sup>. 他通过提高胃内容物的pH值, 从而减少胃内反流物对食管黏膜的损伤作用, 抑制胃酸分泌的治疗对过度的食管黏膜酸暴露及其产生的症状有效<sup>[13]</sup>. 国外研究发现, 联合应用PPIs和促动力药物能更有效的改善症状<sup>[14-15]</sup>. 本研究也发现, 莫沙比利和/或埃索美拉唑治疗食管运动功能障碍疾病都是安全, 无明显不良反应的.

总之, 食管运动功能障碍疾病是老年人的常见疾病, 应用莫沙比利可以有效改善低压型LES患者的LES压并改善食管蠕动功能异常, 而同时加用埃索美拉唑可以更有效的改善患者的相关症状.

#### 4 参考文献

- Wong WM, Lai KC, Hui WM, Hu WH, Huang JQ, Wong NY, Xia HH, Chan OO, Lam SK, Wong BC. Pathophysiology of gastroesophageal reflux diseases in Chinese--role of transient lower esophageal sphincter relaxation and esophageal motor dysfunction. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2088-2093
- 于晓峰, 夏俊, 姚健凤, 王根生. 食管运动功能障碍临床研究. *上海医学* 2001; 24: 430-432
- 郭荣斌, 彭丽华, 程留芳, 王巍峰. 老年胃食管反流病食管运动功能改变. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 125-128
- Quigley EM. New developments in the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease (GERD): implications for patient management. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 Suppl 2: 43-51
- Coron E, Hatlebakk JG, Galmiche JP. Medical therapy of gastroesophageal reflux disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 434-439
- Yoshida N. [Pharmacological effects of the gastroprokinetic agent mosapride citrate] *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 113: 299-307
- Cho YK, Choi MG, Han HW, Park JM, Oh JH, Jeong JJ, Cho YS, Lee IS, Kim SW, Choi KY, Chung IS. The effect of mosapride on esophageal motility and bolus transit in asymptomatic volunteers. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 286-292
- Ruth M, Hamelin B, Rohss K, Lundell L. The effect of mosapride, a novel prokinetic, on acid reflux variables in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 35-40
- Trudgill NJ, Riley SA. Transient lower esophageal sphincter relaxations are no more frequent in patients with gastroesophageal reflux disease than

#### ■名词解释

食管运动功能障碍: 指一组临床上表现为胸痛、反酸, 伴有或不伴有吞咽困难的食管症候群, 内镜和组织学检查除外食管结构上的异常, 通过食管动力学检查大致可分为高压型和低压型.

## ■同行评价

本研究提供了丰富的信息, 研究符合伦理学要求, 但方法缺乏新颖性.

- in asymptomatic volunteers. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2569-2574
- 10 许军英, 谢小平, 侯晓华. 食管运动功能异常与食管黏膜损伤的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1502-1504
- 11 Edwards SJ, Lind T, Lundell L. Systematic review: proton pump inhibitors (PPIs) for the healing of reflux oesophagitis - a comparison of esomeprazole with other PPIs. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 743-750
- 12 Devault KR, Johanson JF, Johnson DA, Liu S, Sostek MB. Maintenance of healed erosive esophagitis: a randomized six-month comparison of esomeprazole twenty milligrams with lansoprazole fifteen milligrams. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 852-859
- 13 Koek GH, Tack J, Sifrim D, Lerut T, Janssens J. The role of acid and duodenal gastroesophageal reflux in symptomatic GERD. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2033-2040
- 14 Madan K, Ahuja V, Kashyap PC, Sharma MP. Comparison of efficacy of pantoprazole alone versus pantoprazole plus mosapride in therapy of gastroesophageal reflux disease: a randomized trial. *Dis Esophagus* 2004; 17: 274-278
- 15 Miyamoto M, Haruma K, Takeuchi K, Kuwabara M. Frequency scale for symptoms of gastroesophageal reflux disease predicts the need for addition of prokinetics to proton pump inhibitor therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 746-751

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

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

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



# 改良三腔管导丝插入牵引急诊硬化治疗食管静脉曲张大出血89例

陈炳芳, 沈云志, 汪良芝, 王 扬, 孙克文, 周燕春, 秦 怡

陈炳芳, 沈云志, 汪良芝, 王扬, 孙克文, 周燕春, 秦怡, 常州市第一人民医院消化科 江苏省常州市 213003

作者贡献分布: 陈炳芳与沈云志对此文所作贡献均等; 此课题由陈炳芳与沈云志设计; 研究过程由陈炳芳、沈云志、汪良芝、王扬、孙克文、周燕春及秦怡操作完成; 数据分析由陈炳芳完成; 本论文写作由陈炳芳与沈云志完成。

通讯作者: 陈炳芳, 213003, 江苏省常州市, 江苏省常州市第一人民医院消化科, s\_y\_1@163.com

电话: 0519-86181102

收稿日期: 2008-12-10 修回日期: 2009-03-02

接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-05-08

## Combined treatment of modified Sengstaken-Blakemore tube inserted by guide wire and EIS for 89 patients with severe esophagogastric variceal bleeding

Bing-Fang Chen, Yun-Zhi Shen, Liang-Zhi Wang, Yang Wang, Ke-Wen Sun, Yan-Chun Zhou, Yi Qin

Bing-Fang Chen, Yun-Zhi Shen, Liang-Zhi Wang, Yang Wang, Ke-Wen Sun, Yan-Chun Zhou, Yi Qin, the First Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Bing-fang Chen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. s\_y\_1@163.com

Received: 2008-12-10 Revised: 2009-03-02

Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-05-08

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of combined treatment of modified Sengstaken-Blakemore tube inserted by guide wire and EIS for patients with severe esophagogastric variceal bleeding.

**METHODS:** Modified Sengstaken-Blakemore tube inserted by guide wire was performed on 89 patients with severe esophagogastric variceal bleeding, and 5min after the insertion, 35 mL on average EIS of 5% sodium morrhuate were injected into patients with esophagogastric varices. Fasting for 24 h was advised to the patients, and blood pressure, respiratory rate, heart rate and bleeding recurrence were also observed. Besides, intravenous drop infusion of H<sub>2</sub>A, PPI

and antibiotics were given to the patients.

**RESULTS:** The successful rate of modified Sengstaken-Blakemore tube insertion in patients with severe esophagogastric variceal bleeding was up to 100%. Bleeding site was confirmed in 88 patients in the first surgery. Severe esophagogastric variceal bleeding was alleviated in 87 patients by EIS administration (97.7%), of which, 17 were relieved with repeated EIS, and complications occurred in 7 cases (7.86%) and 1 case died in the study (1.1%).

**CONCLUSION:** Combined treatment of modified Sengstaken-Blakemore tube inserted by guide wire and EIS shows relatively safe and effective performance for patients with severe esophagogastric variceal bleeding.

**Key Words:** Esophagogastric variceal bleeding; Endoscopic injection sclerotherapy; Modified Sengstaken-Blakemore tube; Guide wire insertion

Chen BF, Shen YZ, Wang LZ, Wang Y, Sun KW, Zhou YC, Qin Y. Combined treatment of modified Sengstaken-Blakemore tube inserted by guide wire and EIS for 89 patients with severe esophagogastric variceal bleeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1363-1365

### 摘要

**目的:** 研究改良三腔管导丝插入牵引急诊硬化对食管静脉曲张大出血患者的治疗效果。

**方法:** 致死性食管静脉曲张破裂大出血患者89例, 应用改良三腔管导丝插入法, 并在改良三腔管牵引5 min后牵引下行急诊内镜硬化治疗(EIS), 于曲张静脉内注射5%鱼肝油酸钠6-10 mL, 平均用量约35 mL。术后禁食24 h, 观察患者血压、呼吸、心率和再出血, 常规静脉给予H<sub>2</sub>A或PPI和抗生素。

**结果:** 致死性食管静脉曲张破裂活动性大出血时改良三腔管插入成功率100%; 首次牵引下EIS明确出血部位88例, 首次急诊EIS止血成功87例(97.7%)。其中17例为多次EIS后止血,

### ■背景资料

食管静脉曲张破裂出血是肝硬化最严重的并发症之一, 其死亡率较高。传统应用三腔二囊管压迫治疗有效率可达95%。但过程较痛苦, 且不能长时间压迫, 一旦解除气囊压迫又易再次发生出血。目前, 内镜下硬化剂注射治疗被认为是较有效的方法, 急诊止血率可达90%以上, 应用改良三腔管、应用改进并独创导丝插入法和/或内镜下导丝引导法行急诊EIS大大提高了食管静脉曲张破裂大出血急诊止血率。

### ■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科; 程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

## ■研究前沿

对于肝硬化食管静脉曲张患者, EIS已被广泛应用。当患者食管曲张静脉大出血时行急诊内镜治疗, 食管内充满血液导致视野不清, 无法看清出血灶, 硬化剂注射治疗时易造成注射针孔的涌血、喷血而影响操作, 应用改良三腔管、改进并独创导丝插入法和/或内镜下导丝引导法行急诊EIS很好地解决了这个问题。

并发症7例(7.86%), 死亡1例(1.1%)。

**结论:** 导丝引导插入法成功率高, 改良三腔管牵引下急诊EIS是救治致死性食管静脉曲张大出血有效、安全和简便的方法。

**关键词:** 食管静脉曲张破裂大出血; 内镜硬化治疗; 改良三腔管; 导丝插入

陈炳芳, 沈云志, 汪良芝, 王扬, 孙克文, 周燕春, 秦怡. 改良三腔管导丝插入牵引急诊硬化治疗食管静脉曲张大出血89例. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1363-1365

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1363.asp>

## 0 引言

2004-03我们对89例危重的食管静脉曲张破裂活动性大出血患者, 应用导丝引导、插入改良三腔管, 在牵引下行急诊内镜硬化治疗(endoscopic injection sclerotherapy, EIS), 急诊EIS止血成功率达97.9%。现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-03/2008-10我科共收治危重急性食管静脉曲张破裂大出血患者89例, 其中男55例, 女34例, 年龄31-71(平均年龄46.3)岁。乙型肝炎后肝硬化67例, 乙型肝炎肝硬化合并原发性肝癌4例, 丙型肝炎后肝硬化2例, 乙型肝炎合并丙肝肝硬化2例, 血吸虫性肝硬化5例, 酒精性肝硬化3例, 原发性胆汁性肝硬化2例, 隐源性肝硬化4例。肝功能分级: Child-pugh A级27例, B级26例, C级36例。Olympus公司生产的GF240电子胃镜、内镜注射治疗针、单囊三腔管(简称改良三腔管), 导引钢丝为沙氏扩张管用的导丝, 硬化剂为50 g/L鱼肝油酸钠。

### 1.2 方法

**1.2.1 改良三腔管的制作:** 将18号三腔二囊管(上海新亚医用橡胶厂生产)去掉食管囊, 将插入(头端)剪去1 cm, 这样导管通向胃腔的通道便开口于改良三腔管的顶端插入导丝后, 增加了导管的硬度。

**1.2.2 致死性食管静脉曲张破裂大出血诊断标准:** 反复呕血、便血, 出血量大于1000 mL/d; 神志恍惚、反应迟钝、大汗、呼吸急促或缓慢; 呈休克状态, 收缩压<90 mmHg, 脉率>120 次/min。

**1.2.3 治疗方法:** (1)保持呼吸道通畅, 立即给予心电、血压监护, 吸氧。保持二条静脉通路, 快速输血、补液扩容。(2)改良三腔管插入: 抽净胃囊

内气体, 改良三腔管表面涂上液体石蜡油, 管亦注入液体石蜡油, 以利于润滑; 再将沙氏导丝插入改良三腔管通向胃管的腔道内; 从鼻孔轻轻插入约20 cm时, 嘱患者做吞咽动作, 缓缓送入导管; 边插边严密观察患者的呼吸。(3)如患者处于活动性大出血时, 则将沙氏导丝可经胃镜活检孔插入后再拔出胃镜, 再将改良三腔管沿着导丝滑入胃腔。插至60-65 cm处时, 向胃囊内充气200 mL, 拔出沙氏导丝, 向外牵引改良三腔管, 达到压迫止血目的。(4)急诊EIS: 改良三腔管牵引5 min后, 插入胃镜至食管下段, 经活检孔插入内镜注射针, 在直视下于出血破口下方的曲张静脉内或红色征旁每点注射50 g/L鱼肝油酸钠6-10 mL; 如看不到出血部位, 则在食管下端近贲门右侧壁曲张静脉内注射; 共注射4-6个点。硬化剂平均用量约35 mL。经推注硬化剂后, 内镜下可见注射部位静脉显著肿胀、呈青紫色隆起。(5)术后处理: 禁食24 h, 观察血压、呼吸、心率和再出血情况, 常规静脉给予H<sub>2</sub>A或PPI和抗生素。

## 2 结果

89例患者均为致死性食管静脉曲张破裂活动性大出血, 包括19例EIS术前曾用三腔管压迫后发生再出血患者, 均行急诊改良三腔管导丝插入法、并在牵引下EIS。三腔管插入成功率100%, 首次EIS能明确出血部位88例, 主要位于食管下段右侧壁、近齿状线周围。首次急诊EIS止血87例(97.7%)。EIS后注射部位溃疡或糜烂近期复发出血21例次, 其中17例次经再次EIS止血。EIS并发症7例(占7.86%): 1例患者EIS术中不配合, 强行将改良三腔管拉出致食管穿孔, 肺部渗出性改变2例, 血红蛋白尿1例, EIS无效即刻大出血死亡1例, 食管溃疡致穿孔1例, 胸腔积液1例。

## 3 讨论

Sengstaken及Blakemore创用的三腔二囊管一直是压迫止血治疗食管静脉曲张出血的主要方法, 临时止血率可达95%。他仅用于紧急暂时止血或作为其他介入或外科手术治疗术前应用的应急措施, 传统的三腔管牵引仅用作暂时性止血措施, 易发生再次出血, 近期再出血率仍高约42%<sup>[1]</sup>, 且患者较痛苦。单气囊三腔管最初由Linton所推荐使用, 即将原三腔二囊管去掉食管囊<sup>[2]</sup>。胡季平 *et al*<sup>[3]</sup>认为根据门静脉高压时侧支循环的血流情况, 只要行胃囊压迫, 就能阻断或部分阻断食管静脉血流。有报道一些医院

仅采用单纯胃囊充气压迫止血, 止血成功率达77%<sup>[4]</sup>. 且可免除食管囊注气后的窒息感, 避免了食管囊压迫所引起的食管黏膜糜烂、溃疡、出血. 但是鉴于近年药物治疗<sup>[5]</sup>和内镜治疗的进步, 目前已不再推荐气囊压迫作为首选止血措施<sup>[6]</sup>, 他仅作为简单易行的配合治疗措施, 常在紧急情况下配合药物治疗、为外科手术治疗或内镜硬化和粘堵等治疗赢得时间. 急诊EIS是食管静脉曲张大出血行之有效的治疗方法, 其适应证较外科急诊手术宽且不受胸腹水限制. 改良三腔管是食管静脉曲张破裂大出血时行急诊EIS的有效方法. 由于活动性大出血, 食管胃腔内视野一片模糊, 难以窥清出血部位; 大量呕血后致循环功能不全, 同时患者因大出血而烦躁, 常不配合治疗, 更加重了出血; 尤其是多部位静脉曲张出血者, 更易影响视野观察, 为此我们制作了改良三腔管, 即去掉食管囊, 剪去三腔管的头端, 使改良三腔管插入更容易, 同时避免了急诊EIS时因食管囊影响视野和硬化注射的操作. 我们将沙氏导丝插入改良三腔管的胃导管腔内, 增加了导管的硬度, 使插入率达100%, 又减少了患者的痛苦. 如患者正在行急诊内镜检查时突然发生大出血, 也可将沙氏导丝经胃镜活检孔插入, 再拔出内镜, 然后将改良三腔管沿着导丝顺利滑入胃腔内. 从而大大地提高了插入率.

改良三腔管插入的体会: 按常规自鼻腔插入改良三腔管, 将胃囊注气, 牵引压迫胃底贲门区, 以阻断流向食管静脉的血流达到临时止血; 同时纠正休克, 改善循环功能, 牵引后食管内暂无活动性大出血, 内镜下视野均较清晰, EIS操作较容易. 在完成出血部位下方曲张静脉内注射后, 将胃囊放松牵引, 再行贲门小弯侧的观察和注射. 一旦EIS术中发生大出血, 可立即再将胃囊牵引, 这样为临床抢救提供了安全有效的应急措施.

注射部位: 根据食管静脉解剖的特点, 胃食管

管交界处及其上方2-5 cm范围为静脉曲张破裂的特定部位, 应把握好硬化注射的第一针, 选择在出血部位曲张静脉的下方, 将注射针斜向刺入曲张静脉内, 助手快速推注硬化剂. 硬化剂用量要足, 从而使血管内局部血栓形成, 管壁肿胀, 达到止血效果. 如不能确定出血部位时, 可在贲门附近不同平面, 采用静脉内快速注射, 同样可达到止血效果.

注射针眼大出血的救治措施: 硬化剂治疗食管胃静脉曲张的主要并发症是注射硬化剂的针眼大出血. 我们采用组织胶于出血处注射和/或局部喷洒, 起到了意想不到的止血效果; 说明组织胶对活动性大出血的止血可起到“一针止血”的效果. 本组结果表明, 改良三腔管牵引下急诊EIS, 使首次急诊止血率达97.9%. 改良三腔管牵引后, 压迫了胃底贲门区, 阻断了流向食管静脉的血流达到临时止血目的, 且胃腔内的血液和胃液不会反流入食管, 从而行急诊EIS时视野较清晰, 操作较容易. 在治疗中间, 可随时放松牵引, 以寻找有无其他活动性出血灶<sup>[6]</sup>. 应用改良三腔管、应用改进并独创导丝插入法和/或内镜下导丝引导法行急诊EIS大大地提高了食管静脉曲张破裂大出血急诊止血率, 具有创伤、安全、有效、经济等特点, 尤其适合在基层医院推广应用.

#### 4 参考文献

- 1 程荣辉, 柯建利, 陈秀琴. 食管静脉曲张大出血带管急诊硬化疗法. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 229
- 2 彭贺新. 三腔二囊管插入方法的改良. 中华消化杂志 2002; 22: 623
- 3 胡季平, 许玉莲. 改进型三腔二囊管填塞治疗门静脉高压上消化道出血38例报告. 中国血吸虫病防治杂志 1999; 11: 163
- 4 于月华, 秦北宁, 古彩喆. 单用三腔管胃囊压迫治疗门脉高压上消化系出血30例观察. 实用肝脏病杂志 1999; 4: 184
- 5 丁惠国. 肝硬化门脉高压症内科治疗的选择与评价. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1579-1582
- 6 芦菲, 刘冰熔, 刘红霞, 郑善国. 三腔单囊管压迫胃底静脉前后食管曲张静脉压力的变化. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1688-1691

#### ■同行评价

本研究有一定的重要性与较强的临床实用价值, 且符合伦理学要求, 但研究的新颖性一般.

编辑 李军亮 电编 何基才

# INNO-LiPA HBV DR v2检测乙型肝炎病毒耐药变异的评价

田敬华, 赵辉, 丛旭, 闫杰, 杜绍财, 魏来

## ■背景资料

持续慢性乙型肝炎是引起终末期肝病和肝细胞癌的一个主要原因。核苷(酸)类似物已经被证实可以有效控制疾病并可以防止肝细胞癌发生。然而发生抗病毒耐药是限制核苷(酸)类似物长期应用的一个主要因素。在治疗中早期检测到这些耐药变异, 对选择药物、指导近期治疗非常必要。比较, 选择一种好的检测手段来快速、便捷、准确地检测出HBV耐药变异非常关键。

田敬华, 赵辉, 丛旭, 闫杰, 杜绍财, 魏来, 北京大学人民医院  
北京大学肝病研究所 北京市 100044

作者贡献分布: 此课题由田敬华与魏来设计; 研究过程由田敬华、赵辉、丛旭及闫杰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由魏来、丛旭及杜绍财提供; 数据分析由田敬华完成; 本论文写作由田敬华完成, 魏来修改。

通讯作者: 魏来, 教授, 主任医师, 100044, 北京市西直门南大街11号, 北京大学人民医院, 北京大学肝病研究所。

weelai@163.com

电话: 010-88325566

收稿日期: 2009-03-31 修回日期: 2009-04-17

接受日期: 2009-04-17 在线出版日期: 2009-05-08

## Evaluation of INNO-LiPA in detection of HBV drug resistance mutation

Jing-Hua Tian, Hui Zhao, Xu Cong, Jie Yan, Shao-Cai Du, Lai Wei

Jing-Hua Tian, Hui Zhao, Xu Cong, Jie Yan, Shao-Cai Du, Lai Wei, Hepatology Institute, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China

Correspondence to: Professor Lai Wei, Hepatology Institute, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China. weelai@163.com

Received: 2009-03-31 Revised: 2009-04-17

Accepted: 2009-04-17 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** To assess the accuracy of INNO-LiPA HBV DR v2 for detecting hepatitis B virus (HBV) drug resistance.

**METHODS:** Sera from 237 chronic hepatitis B patients undergoing lamivudine or adefovir treatment were detected using INNO-LiPA and direct sequencing of the reverse transcriptase region of the HBV Polymerase gene.

**RESULTS:** Sequencing results were observed for 179/235 samples (76.1%) and 1293/1410 amino acid positions (91.7%). It showed high concordance with directing antiviral drug-resistance mutations, particularly for the sensitive detection of mixed drug-resistance mutations.

**CONCLUSION:** The INNO-LiPA HBV DR v2 appears to be useful for the rapid antiviral drug-

resistance mutations assay of HBV.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Line Probe Assay; Nucleic acid hybridization; Sequence analysis

Tian JH, Zhao H, Cong X, Yan J, Du SC, Wei L. Evaluation of INNO-LiPA in detection of HBV drug resistance mutation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1366-1369

## 摘要

**目的:** 评价INNO-LiPA HBV DR v2对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)耐药检测的准确性。

**方法:** 选取237例慢性HBV感染者经过拉米夫定和(或)阿德福韦酯的抗病毒治疗, 取外周血, 采用INNO-LiPA和聚合酶基因耐药测序分析法测定HBV耐药性。

**结果:** INNO-LiPA HBV DR v2耐药分析法与聚合酶基因序列分析法测定的耐药检测结果比较, 标本符合率为179/235(76.1%), 氨基酸密码子符合率为1293/1410(91.7%)。与直接测序法有着很高的一致性。尤其检测混合型耐药灵敏度较直接测序要高。

**结论:** INNO-LiPA法是一种较灵敏的快速检测HBV耐药型的试验方法。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 线性探针技术; 核酸杂交; 序列分析

田敬华, 赵辉, 丛旭, 闫杰, 杜绍财, 魏来. INNO-LiPA HBV DR v2检测乙型肝炎病毒耐药变异的评价. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1366-1369

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1366.asp>

## 0 引言

慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗过程中发生病毒耐药变异是限制核苷(酸)类似药物治疗的一个主要障碍<sup>[1]</sup>。随着治疗时间的延长, 拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовир

## ■同行评议者

范小玲, 教授, 北京地坛医院综合科; 党双锁, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科



dipivoxil, ADV)等这些抗病毒药物治疗的患者体内可出现变异株, 从而发生病毒学突破, 导致治疗失败<sup>[2]</sup>. 一些病毒发生的耐药变异已被证实可以引起对几种药物的交叉耐药, 这就限制了对患者的进一步长期有效地治疗<sup>[9]</sup>. 因此在治疗中早期检测出这些变异, 对选择药物、指导远期治疗非常必要. 基因型耐药的检测对预防和证实发生表型耐药并采取新的治疗措施格外重要<sup>[3]</sup>.

最常见的检测乙型肝炎抗病毒药物耐药变异的方法有直接测序、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析技术(restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP)和反向杂交线性探针技术(reverse hybridization line probe, LiPA)等. PCR扩增后的直接测序被认为是检测对新药物治疗耐药检测的首选方法. 然而, 只有当变异株超过HBV准种池(quasispecies pool)的20%以上直接测序才能检测到<sup>[4]</sup>. PCR-RFLP和LiPA方法要更加灵敏, 可以检测到病毒准种池中5%的变异株<sup>[5,10]</sup>. 但这些方法同样存在缺点. PCR-RFLP只能检测单位点变异, 对仅用于少数耐药变异位点监测不失为一种简便方法, 但随着多种核苷(酸)类似物的相继问世和HBV耐药变异位点的不断出现, 该方法将难以胜任<sup>[8]</sup>. LiPA检测技术的缺点是对新出现的变异都要设计新的试剂条带, 迫使该技术要定期进行更新. 另外由于核苷酸序列上基因型的不同, 为了检测一个氨基酸置换通常需要许多个探针来检测<sup>[10]</sup>. 本研究比较直接基因测序法与INNO-LiPA技术对HBV耐药变异检测的能力.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2006年在我院临床治疗及随访的慢性乙型肝炎患者237例, 其中男146例, 女91例, 年龄23-65岁, 全部符合2000年修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准<sup>[6]</sup>. 其中159例患者接受LAM 100 mg/d治疗1年以上, 平均疗程1年半, 并符合临床耐药诊断标准: 血清HBV DNA转阴后又出现HBV DNA反跳至 $1 \times 10^8$  copy/L以上; 排除LAM治疗过程中患者依从性差而引起的HBV DNA反跳; 排除其他原因引起的丙氨酸转氨酶(ALT)升高. 另78位患者接受LAM和(或)ADV治疗, 治疗过程中发生病毒学突破. INNO-LiPA HBV DR v2试剂盒(比利时Innogenetics公司), 限制性内切酶EcoR I (购自NEB); T4 DNA Ligase、pEASY-T1 Cloning vector、E. coli JM109感受态

细胞购自北京全式金生物技术有限公司. DNA核酸提取、纯化试剂购自Geneaid公司. Qiagen的HotStar Taq DNA聚合酶.

### 1.2 方法

1.2.1 DNA的提取: 用Geneaid的Viral Nucleic Acid Extraction Kit II试剂自100  $\mu$ L血清提取HBV DNA.

1.2.2 HBV DNA直接测序检测: 提取的HBV DNA进行巢式PCR扩增. 5  $\mu$ L DNA模板加到PCR反应体系 $10 \times$ 缓冲液, 0.4  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP, 引物各10 pmol, 1 U的Taq酶(Invitrogen)共30  $\mu$ L. 根据HBV聚合酶区序列设计引物. PCR上游引物: SPR1A, 5'-GTTTCAGGAACAGT AAGCCC-3'; 下游引物: SPR1B, 5'-GAAAGGC CTTGTAAGTTGGCG-3'<sup>[13]</sup>; PCR产物长1049 bp. 二轮PCR引物BSA, 5'-AGGACCCCTGCTCGT GTTAC-3'; WS4, 5'-ACATACTTTCCAATCAAT AG-3', PCR产物长730 bp(引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成). 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, (第2轮为50 $^{\circ}$ C 30 s), 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min. 扩增产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测后直接送测序或进行纯化、克隆.

1.2.3 INNO-LiPA HBV DR v2的测定: 严格按照INNO-LiPA HBV DR v2试剂盒说明书操作. 上游引物 nt 255 to 278(5'-CGTGGTGGACTT CTCTCAATTTTC-3'); 下游引物HBV nt 1121 to 1099(5'-AGAAAGGCCTTGTAAGTTGGC GA-3'); Qiagen HotStar Taq DNA聚合酶(5000 kU/L); Qiagen  $10 \times$ PCR缓冲液(Tris-HCl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , pH8.7); dNTP(25 mmol/L). 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 50个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min. PCR扩增可得到生物素化的HBV DNA聚合酶区产物. 扩增产物长867 bp. 扩增产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测. 可测到的HBV DNA用Auto-LiPA全自动反应仪进行变性、杂交、冲洗、显色. 结果可以在条带上相应的寡核苷酸探针位置显现出颜色.

1.2.4 目的基因的克隆及筛选: PCR扩增产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 并用UNIQ-10柱式PCR产物回收试剂盒回收DNA片段, 参考试剂盒说明书进行. 经PCR纯化试剂盒纯化后的PCR产物与pEASY-T1 Cloning vector连接并转化E. coli JM109感受态细胞, 蓝白筛选阳性克隆, 重组质粒用EcoR I、Hind III双酶切, 后用10 g/L

### ■研发前沿

INNO-LiPA方法在国外已获准应用于临床检测HBV耐药变异, 于国内目前仅限于科研使用, 且从未有实验数据报道.

### ■相关报道

Degertekin *et al* 最新报道INNO-LiPA 试剂最新版本INNO-LiPA HBV DR v3可检测包括LAM、ADV、ETV与LdT所有常见耐药位点. 涵盖了HBV聚合酶基因逆转录酶区共11个密码子位置(80、173、180、181、184、194、202、204、233、236、250).

## ■创新盘点

本研究以中国北方人群乙型肝炎患者为研究对象,应用INNO-LiPA技术与传统的直接测序法进行了比对,对INNO-LiPA技术有了本土的评价。

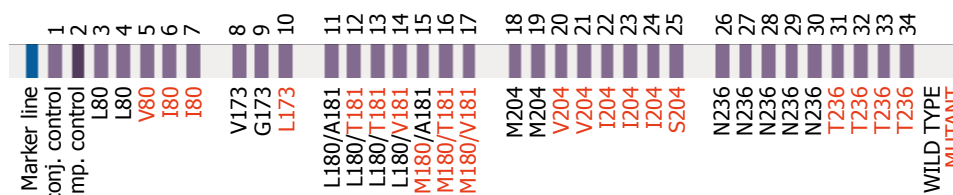


图 1 INNO-LiPA HBV DR v2试剂条。1-34: 试剂上显色条带的位置; L80-T236: 氨基酸密码子; conj. control: 结合质控线; amp. control: 扩增质控线; WILD TYPE: 野生株; MUTANT: 变异株。

表 1 INNO-LiPA HBV DR v2与测序检测结果的一致性 (n)

LiPA	测序		
	WT(129)	WT+mutant(21)	Mutant(85)
WT(99)	90	2	7
WT+mutant(53)	34	15	4
Mutant(83)	5	4	74

WT: Wild type野生株; Mutant: 变异株; T+mutant: 混合株; 加粗字为完全符合标本。

琼脂糖凝胶电泳鉴定, 菌液送测序。

1.2.5 HBV基因序列的测定及分析: PCR产物及克隆菌液送北京三博远志生物技术有限责任公司应用Sanger双脱氧核糖核酸链末端终止法进行测序。测序结果应用BioEdit 7.0软件进行分析。

1.2.6 INNO-LiPA与测序结果比对: 如果测序与INNO-LiPA结果均为野生株或均为变异株或均为混合株, 可以认为两者检测结果相符。若一个实验显示变异株而另一实验结果为野生株, 则认为两实验结果不符。结果不符的标本进行克隆测序予以确认。每份标本挑取5个克隆。

## 2 结果

2.1 结果判读 LiPA试剂条上含有34个反应线, 其中2个质控线和32个HBV 探针线, 能够同时检测出: 乙型肝炎病毒聚合酶基因第80位、173位、180位、181位、204位和236密码子的野生型及耐药型突变, 见图1。结果判读相对简单, 但也存在部分试剂条上部分位置的显色模糊不清楚或显色缺失会给判读带来一些障碍。

2.2 LiPA与测序结果的标本符合率 本研究共对237份标本同时进行了LiPA与测序的PCR扩增检测。LiPA扩增中有2份标本扩增质控线(amp. control)未出, 提示扩增失败。结果LiPA与测序结果的标本完全符合率为76.1%(179/235)。共有38个标本(16.2%)LiPA检测为混合株, 而测序仅显示为变异株或为野生株(表1)。

2.3 LiPA与测序结果的密码子符合率 在氨

表 2 INNO-LiPA HBV DR v2与测序结果的一致性 (氨基酸密码子)

密码子	LiPA检测	测序检测		
		Mutant	WT	密码子符合率(%)
rt80	Mutant	36	0	95.7
	WT	10	189	
rt173	Mutant	4	6	97.4
	WT	0	225	
rt180	Mutant	79	17	88.9
	WT	9	130	
rt181	Mutant	1	2	94.5
	WT	11	221	
rt204	Mutant	95	33	74.5
	WT	27	80	
rt236	Mutant	4	1	99.1
	WT	1	229	

WT: Wild type野生株; Mutant: 变异株。

基酸密码子的比较中, 密码子完全符合率为91.7%(1293/1410)。考察的6个氨基酸密码子位置中80、173、180、181、236位置两方法符合率分别为95.7%、97.4%、88.9%、94.5%、99.1%, 大部分(5/6)结果符合率都在88%以上, 而204位氨基酸密码子符合率差别较大, 这是由于在rt204位置有V和I两种变异, 可发生的变异模式包括: rtM204V, rtM204I, rtM204V+I。LiPA检测中在rt204位置上有10个标本显示为rtM204V变异, 23个标本显示为rtM204I变异, 相同标本测序显示为野生株; LiPA有27个标本显示为野生株, 其中有21个测序为rtM204I变异, 有6个标本为rtM204V变异; 有9个标本显示为rtM204V+I(表2)。

2.4 克隆测序验证不符者 二者比较结果不符标本应用克隆测序验证, 结果34个LiPA测为变异而测序显示为野生株的标本克隆测序所得序列提示有变异。

## 3 讨论

近年来抗HBV药物中, 核苷类似物的发展很快,

## ■应用要点

INNO-LiPA法是一种较灵敏的快速检测HBV耐药型的试验方法。

已上市的核苷类药物有LAM、ADV、恩替卡韦(entecavir, ETV)及替比夫定(telbivudine, LdT). 但核苷类药物存在各种耐药及交叉耐药, 停药后复发率高<sup>[7]</sup>. 及早发现体内HBV发生的耐药变异对相应调整用药策略, 联合、序贯治疗或进行个性化治疗都有很好的指导意义, 并可对进一步的治疗进行监测预防. 选择一种好的检测手段来快速、便捷、准确地检测HBV耐药变异非常关键.

PCR产物直接测序一次可准确测序HBV逆转录酶A-E区, 全长549 bp. 可通过一次实验, 检测全部已知和可能的耐药变异位点. 但该方法的灵敏度较差, 只有当变异株所占比例超过HBV准种池20%时才能被检测到<sup>[8]</sup>. 而且只显示优势菌株的特征, 不能检测出含量较低的变异株. INNO-LiPA方法在国外已获准应用于临床检测<sup>[1]</sup>. 该法灵敏度高, 可检测出样品中占HBV准种池5%-10%的变异株, 还具有提供信息量大、自动化程度高等优点<sup>[8]</sup>.

本研究通过对比, 验证了LiPA与测序比较好地符合率(91.7%), 尤其对混合型耐药有很好的检出. 这对监测患者体内HBV准种池中各型毒株, 及早更换用药方案, 预防耐药意义很大.

实验中应用克隆测序来验证LiPA与测序, 限于克隆数目, 不能完全反映HBV准种的真实情况, 给验证带来困难. 在后续工作中要增加克隆数量做到尽可能反映HBV病毒池各类型准种的真实比例, 另应留取序列标本结合临床指标来跟踪随访验证结果. 实验应用Auto-LiPA全自动反应仪对本标进行全自动地变性、杂交、冲洗、显色, 大大提高了操作的标准化程度. 后期结果目测判读, 个别氨基酸密码子位置条带显现模糊, 可能会存在人为判断误差. 若应用扫描仪器进行结果自动判读, 相信会使INNO-LiPA的操作更加完善.

INNO-LiPA的缺点是: (1)LiPA只能检测目前现存已知的变异. 对新的抗病毒治疗药物发

生的新奇变异就需要设计出新的探针, 因此这项技术需要时常地更新. (2)探针区域的多态性可能会使结果表现为不确定. (3)因缺乏对应的探针, 该技术不能提示标本出现新的变异<sup>[10]</sup>.

总之, 与测序方法相比较, INNO-LiPA由于其技术上的简便快速准确, 加上使用Auto-LiPA全自动反应仪的操作标准化, 使他更适合于大通量的科研或临床耐药检测.

## 4 参考文献

- 1 Degertekin B, Hussain M, Tan J, Oberhelman K, Lok AS. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J Hepatol* 2009; 50: 42-48
- 2 Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 132: 1574-1585
- 3 Osiowy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, Giles E, Borlang J. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2). *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1994-1997
- 4 Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254-265
- 5 Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, Ross LL, Lutz MW, Condreay LD. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3338-3347
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 342-329
- 7 Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 125-140
- 8 成军. 加强HBV耐药的认识和监测. *中华检验医学杂志* 2008; 31: 849-851
- 9 Lok AS. Navigating the maze of hepatitis B treatments. *Gastroenterology* 2007; 132: 1586-1594
- 10 Hussain M, Fung S, Libbrecht E, Sablon E, Cursaro C, Andreone P, Lok AS. Sensitive line probe assay that simultaneously detects mutations conveying resistance to lamivudine and adefovir. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1094-1097

## ■同行评价

本文的科学性、实用性和可读性较强, 能较好地反映目前我国检测乙肝病毒检测的水平, 具有较高的临床应用价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 体外高频热疗机联合肝动脉化疗栓塞术治疗肝癌30例

陈京龙, 李文东, 毛羽, 王威, 冯亮, 谢尧

## ■背景资料

原发性肝癌在我国是常见的恶性肿瘤, 死亡率位居各种肿瘤死亡率第2位, 近10年来其死亡率一直呈上升趋势, 外科手术及TACE疗效较好, 但仍存在复发、转移以及不能一次性根治的问题。本研究采用体外高频热疗联合TACE治疗中晚期肝癌, 目的是增加抗肿瘤效果, 减少复发及转移。

陈京龙, 李文东, 毛羽, 王威, 冯亮, 谢尧, 北京地坛医院肿瘤微创中心 北京市 100015

作者贡献分布: 陈京龙与李文东对此文所作贡献均等; 此课题由陈京龙、李文东及毛羽设计; 研究过程由陈京龙、李文东、毛羽、王威、冯亮及谢尧操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈京龙与李文东提供; 数据分析陈京龙与李文东完成; 本论文写作由陈京龙完成。

通讯作者: 毛羽, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院。chejl6412@yahoo.com.cn

电话: 010-84322470

收稿日期: 2008-11-16 修回日期: 2009-04-08

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-05-08

## Efficacy of HG-2000 regional high-frequency hyperthermia combined with TACE in treatment of patients with hepatocellular carcinoma: an analysis of 30 cases

Jing-Long Chen, Wen-Dong Li, Yu Mao, Wei Wang, Liang Feng, Yao Xie

Jing-Long Chen, Wen-Dong Li, Yu Mao, Wei Wang, Liang Feng, Yao Xie, Tumor Center of Minimally Invasive Therapy, Ditan Hospital, Beijing 110015, China

Correspondence to: Yu Mao, Tumor Center of Minimally Invasive Therapy, Ditan Hospital, Beijing 110015, China. chejl6412@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-16 Revised: 2009-04-08

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-05-08

## Abstract

**AIM:** The observe the effect of regional high-frequency hyperthermia combined with hepatic arterial chemoembolization (TACE) in patients with hepatocellular carcinoma.

**METHODS:** From April 2007 to July 2008, a total of 56 hepatocellular carcinoma patients were assigned to combined treatment group and control group. Thirty patients were in regional high-frequency hyperthermia combined with TACE group; 26 patients were in TACE alone control group. TACE involved Seldinger's puncture in the study. For patients in combined treatment group, regional high-frequency hyperthermia therapy was given 3-5 d after TACE and lasted 50-60 min each time.

**RESULTS:** According to WHO solid tumor

evaluation standard, effective rate in combined treatment group was 51.7%, and it was 36% in control group. There was statistic difference between the two groups ( $P < 0.05$ ). One-year survival rate was 58.8% in combined treatment group, and 47.35% in control group, and there was statistic difference between the two groups ( $P < 0.05$ ). Meantime, pain relief was up to 75% in combined treatment group, and merely 28.6% in control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Regional high-frequency hyperthermia combined with TACE is effective, safe, not invasive and is recommended for wide use in clinical practice.

**Key Words:** Hepatic arterial chemoembolization; High-frequency hyperthermia; Hepatocellular carcinoma

Chen JL, Li WD, Mao Y, Wang W, Feng L, Xie Y. Efficacy of HG-2000 regional high-frequency hyperthermia combined with TACE in treatment of patients with hepatocellular carcinoma: an analysis of 30 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1370-1373

## 摘要

**目的:** 观察体外高频热疗联合肝动脉化疗栓塞术(hepatic arterial chemoembolization, TACE)治疗肝癌的疗效。

**方法:** 治疗组为体外高频热疗联合TACE(联合组)30例, 单纯TACE组(TACE组)26例。TACE方法采用Seldinger's氏穿刺法, 体外高频热疗一般在TACE术后第3-5天后进行, 治疗时间为50-60 min, 每例患者平均热疗5次。

**结果:** 按WHO实体瘤疗效评定标准, 联合组有效率为51.7%, TACE组有效率为36.0%, 两组比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。联合组1年生存率58.8%, TACE组为47.35%, 两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。联合组的止痛有效率与TACE组比较有统计学差异(75% vs 28.6%,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 体外高频热疗联合TACE治疗中晚期肝

## ■同行评议者

黄志勇, 副教授, 华中科技大学同济医院普外科; 郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科



癌具有一定的疗效, 治疗过程中无严重不良反应、无创伤、安全可靠, 值得临床推广应用。

**关键词:** 肝动脉化疗栓塞术; 高频热疗; 肝癌

陈京龙, 李文东, 毛羽, 王威, 冯亮, 谢尧. 体外高频热疗机联合肝动脉化疗栓塞术治疗肝癌30例. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1370-1373  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1370.asp>

## 0 引言

原发性肝癌是世界范围内最常见的恶性程度很高的肿瘤之一, 在世界各地均有发生, 每年大约有50-100万的新发病例, 而我国约占其中的40%-50%。绝大部分肝癌发现时已属于中晚期, 丧失了手术时机。经导管动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)相对安全有效, 为不能手术切除的中晚期肝癌的首选治疗, 但外科术后的复发转移以及TACE达不到一次性根治的问题仍然突出。我院引进的珠海和佳医疗设备公司生产的HG-2000体外高频热疗机应用频率为13.56 MHz的电磁波, 产生内生热及高频振荡双重效应, 利用肿瘤组织与正常组织的温差现象抑制肿瘤细胞合成, 辅助放、化疗治疗恶性肿瘤, 可增加TACE疗效, 减少肿瘤的复发转移, 同时具有镇痛改善症状的作用。我院于2007-04/2008-07应用体外高频热疗联合TACE治疗肝癌30例, 对照组为单纯TACE治疗的26例肝癌患者观察临床疗效。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 入组者均为我院住院或门诊患者。体外高频热疗联合TACE(联合组)30例, I a期及I b期各1例, II a期7例, II b期12例, III a期4例, III b期3例, 其中男26例, 女4例, 年龄36-77岁, 中位年龄58岁, 合并乙型肝炎后肝硬化26例, 合并丙型肝炎后肝硬化3例, 结肠癌肝转移1例, 其中1名患者因失访退出。单纯TACE(TACE组)组共26例, II a期5例, II b期11例, III a期10例, 年龄25-72岁, 中位年龄55岁, 其中合并乙型肝炎后肝硬化24例, 合并丙型肝炎后肝硬化1例, 合并胆汁性肝硬化1例; 两组临床资料均观察3 mo以上; 对比分析性别、年龄、病种、临床分期等无显著差异; 多属中晚期肝癌, 肿瘤最大直径12 cm×10 cm, 平均5 cm×6 cm; Karnofsky评分(KPS)均≥60分。肝癌的诊断及分期参照2001-09广州第八届全国肝癌学术会议修订的标准执行。

## 1.2 方法

**1.2.1 治疗方法:** TACE方法采用seldinger's氏穿刺法, 取右侧腹股沟韧带中点下方1 cm为穿刺点, 将导管至肝固有动脉, 明确肿瘤供血动脉、病灶性质, 数目, 大小等情况, 超选择肿瘤血管, 再次造影明确病变位置, 注入化疗药物羟喜树碱5-20 mg, 盐酸吡柔比星10-30 mg并予盐酸格拉司琼6 mg注入, 予碘化油及聚乙烯醇颗粒栓塞剂混合栓塞肿瘤血管, 药物剂量根据肿瘤大小及肿瘤供血情况而定。体外高频热疗采用的是HG-2000体外高频热疗机, 应用电磁波频率为13.56 MHz, 对肿瘤病灶局部进行加温, 加温至41℃-43℃, 加温时间为50-60 min, 每例患者热疗3-10次, 平均5次。两组TACE方法相同, 治疗次数在1-3次以上, 体外高频热疗一般在术后第3-5天后进行。

**1.2.2 疗效评价:** 按WHO实体瘤疗效评定标准: 完全缓解(CR): 全部肿瘤完全坏死或消失, 并维持在4 wk以上; 部分缓解(PR): 肿瘤坏死≥50%或病灶最大垂直两径乘积缩小≥50%; 好转(MR): 25%≤肿瘤坏死(缩小)≤50%; 稳定(SD): 肿瘤坏死(缩小)<25%或增大<25%; 进展(PD): 肿瘤增大≥25%或者出现新病灶。缓解率(RR)以(CR+PR)合计, 治疗前后做腹部增强CT判断肿瘤大小变化。自手术之日起计算生存期。疼痛状况的缓解主要根据患者的主诉疼痛分级(VRS), 采用自身对比法比较疼痛的缓解程度。无效: 与治疗前相比无变化; 轻度缓解: 疼痛虽较治疗前减轻, 但仍有明显疼痛, 睡眠受干扰; 中度缓解: 疼痛较治疗前明显减轻, 睡眠不受干扰; 完全缓解: 完全无痛。

**统计学处理** 采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理及分析, 用 $\chi^2$ 检验对两组结果进行比较,  $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。治疗过程中仅治疗组1例患者右背部肝区部位发生I度烫伤, 原因与患者出汗较多有关, 未给与特殊处理自行痊愈。

## 2 结果

**2.1 高频热疗联合TACE与单纯TACE对甲胎球蛋白(AFP)变化的影响** 治疗前54例原发性肝癌, AFP阳性者, 联合组为78.57%(22/28), TACE组为76.92%(20/26), 治疗后, 联合组AFP阳性为35.71%(10/28); TACE组为50%(13/26), 两组治疗前后对比有显著差异( $P<0.05$ )。

**2.2 高频热疗联合TACE与单纯TACE对肿瘤和**

## ■ 相关报道

高频热疗会对细胞产生直接的细胞毒效应, 高热使癌细胞膜最先受到破坏, 抑制DNA、RNA和蛋白质的合成, 使癌细胞中溶酶体活性升高, 导致无氧糖酵解增加而引起乳酸增加, 调节免疫功能, 促进癌细胞死亡。有研究报道, 热化疗可下调实验鼠*p53*、*bcl-2*和上调*bax*的表达, 可增加放化疗的效果, 研究结果证实了高频热疗联合动脉化疗栓塞术治疗肝癌有较好的疗效。

## ■ 应用要点

体外高频热疗联合动脉化疗栓塞术治疗肝癌不良反应小、无创伤、疗效可靠, 值得临床推广应用。可减少肝癌的复发及转移, 增加抗肿瘤效果。

### ■名词解释

体外高频热疗: 是一种透热治疗, 其应用频率为13.56 MHz的电磁波, 在两极板之间形成电容场, 人体作为介质在电容场作用下, 组织中带电离子高速运动, 相互摩擦产生热能, 肿瘤组织由于血循环差, 不利于充分散热, 可产生比正常组织高的温差, 可使肿瘤细胞被杀伤而正常组织不受损。

表 1 两组治疗对肿瘤缓解率结果的比较 (*n*)

分组	<i>n</i>	CR	PR	MR	SD	PD	RR(%)
联合组	29	0	15	2	6	6	51.7
TACE组	25	0	9	2	9	6	36.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 联合组, 缓解率(RR)以CR+PR合计。

表 2 两组治疗对疼痛的缓解率比较 (*n*)

分组	<i>n</i>	完全缓解	中度缓解	轻度缓解	无效	有效率(%)
联合组	8	3	3	2	0	75.0(6/8)
TACE组	7	1	1	3	2	28.6(2/7) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 联合组。

疼痛缓解程度的比较 两组治疗对肿瘤缓解率的比较见表1。联合组发生疼痛患者8例, TACE组发生疼痛患者7例, 治疗后, TACE组联合组与TACE组对肿瘤疼痛缓解有效率之间比较, *P*<0.05(表2)。

2.3 不同治疗方法对生存率的影响 联合组30例, 失访1例, 其余29例患者, 观察至6 mo者27例, 12 mo者17例, TACE组, 观察至6 mo者24例, 12 mo者19例。两组患者观察至6 mo, 联合组的27例患者, 生存25例, 死亡2例。观察至12 mo, 联合组的17例患者, 生存10例, TACE组的19例患者, 生存9例, 两组比较差异具有统计学意义(*P*<0.05, 表3), 观察不足6 mo的生存病例未计入统计。随访的联合组17例和TACE组19例患者在临床分期及其他影响生存率的因素上无显著差异。

### 3 讨论

原发性肝癌在我国是常见的恶性肿瘤, 据统计, 20世纪肝癌死亡率位居我国各种肿瘤死亡率的第2位, 近10年来其死亡率一直呈上升趋势。不论是肝癌的高发区或低发区, 在尸检中肝癌发病率均呈上升趋势。外科手术及TACE疗效较好, 但仍存在复发、转移以及不能一次性根治的问题。我们采用体外高频热疗联合TACE治疗中晚期肝癌, 目的为增加抗肿瘤效果, 减少复发及转移。

对不适合手术或单纯介入的患者, 体外高频热疗可考虑作为联合抗肿瘤治疗的手段, 其原理为高频热疗对细胞产生直接的细胞毒效应<sup>[1]</sup>。高热使癌细胞膜最先受到破坏, 抑制DNA、RNA和蛋白质的合成, 导致癌细胞死亡<sup>[2]</sup>。使癌细胞中溶酶体活性升高<sup>[3]</sup>。导致无氧糖酵解增加而引起

表 3 两组治疗对生存率的影响 (%)

分组	6 mo	12 mo
联合组	92.6(25/27)	58.80(10/17)
TACE组	75.0(18/24)	47.35(9/19) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 联合组。

乳酸增加, 最终导致癌细胞死亡<sup>[4]</sup>。调节免疫功能, 促进癌细胞死亡<sup>[5]</sup>。热疗可以增加放疗和化疗的敏感性<sup>[6]</sup>。高热与药物联合应用对肿瘤具有定向协同治疗作用, 并可以减轻不良反应, 特别是癌性疼痛。有研究报道, 热化疗可下调实验鼠 *p53*、*bcl-2* 和上调 *bax* 的表达, 可增加放疗的效果<sup>[1]</sup>, 进一步为高频热疗抗肿瘤的作用奠定了实验基础。早在1985年美国FDA即认证高频热疗为手术、放疗、化疗等肿瘤的第五大治疗手段, 可配合肿瘤放疗和化疗<sup>[2]</sup>。肝癌、前列腺癌等辅助治疗, 研究结果证实了高频热疗联合动脉化疗栓塞术治疗肝癌有较好的疗效。

研究结果显示, 在抗肿瘤治疗方面, 按WHO实体瘤疗效评定标准, 联合组的有效率CR+PR为51.7%<sup>[3]</sup>, 与TACE组的36%之间存在显著差异(*P*<0.05)。联合组12 mo生存率为58.8%较TACE组的47.35%有所增加(*P*<0.05), 治疗对AFP变化的影响提示, 联合组治疗后, AFP阳性为35.71%(10/28); TACE组为50%(13/26), 两组治疗前后对比有显著差异(*P*<0.05)。另外体外高频热疗在肿瘤的止痛方面疗效显著, 联合组发生疼痛患者8例, TACE组发生疼痛患者7例, 联合治疗组止痛的有效率可达75%<sup>[4-5]</sup>, TACE组止痛的有效率28.6%(*P*<0.05)。提示体外高频热疗联合TACE治疗中晚期肝癌安全有效。联合组在治疗过程中无不良反应发生, 且其无创伤、疗效可靠, 值得临床推广应用<sup>[6]</sup>。

目前体外高频热疗已广泛应用于临床抗肿瘤治疗; 本临床研究结果示体外高频热疗联合TACE治疗中晚期肝癌安全有效, 可进一步于多种肿瘤的临床治疗中研究热疗联合化疗的疗效, 为患者提供一种无创有效的抗肿瘤治疗方案。

### 4 参考文献

- Liang H, Zhan HJ, Wang BG, Pan Y, Hao XS. [Expression change of apoptosis-associated genes after hyperthermia, chemotherapy and radiotherapy in human colon cancer-transplanted nude mice] *Zhonghua Weichang Waikao Zazhi* 2008; 11: 270-275
- Franckena M, Stalpers LJ, Koper PC, Wiggendaad

- RG, Hoogenraad WJ, van Dijk JD, Wárlám-Rodenhuis CC, Jobsen JJ, van Rhooon GC, van der Zee J. Long-term improvement in treatment outcome after radiotherapy and hyperthermia in locoregionally advanced cervix cancer: an update of the Dutch Deep Hyperthermia Trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70: 1176-1182
- 3 樊喜文, 张国庆, 杨树法. 介入治疗中晚期肝癌61例临床分析. *新疆医科大学学报* 2006; 29: 825-827.
- 4 Baker HW, Snedecor PA, Goss JC, Galen WP, Gallucci JJ, Horowitz IJ, Dugan K. Regional hyperthermia for cancer. *Am J Surg* 1982; 143: 586-590
- 5 Ohguri T, Imada H, Kato F, Yahara K, Morioka T, Nakano K, Korogi Y. Radiotherapy with 8 MHz radiofrequency-capacitive regional hyperthermia for pain relief of unresectable and recurrent colorectal cancer. *Int J Hyperthermia* 2006; 22: 1-14
- 6 邢海凤, 睦家治, 冀照铸, 刘亚民. 肝动脉栓塞术加体外高频热疗治疗原发性肝癌78例. *现代医用影像学* 2005; 14: 157-159

## ■同行评价

本文病例选择较为合理, 研究方法可行, 统计方法得当, 具有一定的科学性和临床经验总结价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>1</sup> $P<0.05$ , <sup>2</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>3</sup> $P<0.05$ , <sup>4</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t=4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)



## 清胰片在SAP恢复期中的治疗价值

苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 马涛, 赵光, 王心

### ■背景资料

重症急性胰腺炎的远期预后患有急性胰腺炎、慢性胰腺炎、糖尿病三种不良转归, 也有研究发现重症急性胰腺炎的恢复期出现进食不足、慢性腹泻、体质量下降等营养状态受损情况, 严重影响了患者的生存质量。

苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 马涛, 赵光, 王心, 天津医科大学南开临床学院 南开医院 全国胆胰疾病诊疗中心 天津市 300100  
十一五国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2006BAI04A15  
作者贡献分布: 此论文由崔乃强与苗彬设计; 研究过程由苗彬与李忠廉操作完成; 病例随访由马涛与赵光完成; 数据分析由王心完成; 本论文写作由苗彬完成; 崔乃强为课题负责人。  
通讯作者: 崔乃强, 主任医师, 300100, 天津市, 天津医科大学南开临床学院, 南开医院, 全国胆胰疾病诊疗中心。  
cuiinq@vip.sohu.com  
电话: 022-27435296  
收稿日期: 2009-03-05 修回日期: 2009-04-04  
接受日期: 2009-04-08 在线出版日期: 2009-05-08

### Therapeutic effect of pancreas clearing tablets (Qingyi pian) on severe acute pancreatitis

Bin Miao, Nai-Qiang Cui, Zhong-Lian Li, Tao Ma, Guang Zhao, Xin Wang

Bin Miao, Nai-Qiang Cui, Zhong-Lian Li, Tao Ma, Guang Zhao, Xin Wang, Nankai Clinical School, Tianjin Medical University, Nankai Hospital National Medical Center of Biliopancreatic Diseases, Tianjing 300100, China  
Supported by: the National Science and Technology Support Plan during the 11<sup>th</sup> Five-Year Plan Period, No. 2006BAI04A15

Correspondence to: Nai-Qiang Cui, Nankai Clinical School, Tianjin Medical University, Nankai Hospital National Medical Center of Biliopancreatic Diseases, Tianjing 300100, China. cuiinq@vip.sohu.com  
Received: 2009-03-05 Revised: 2009-04-04  
Accepted: 2009-04-08 Published online: 2009-05-08

### Abstract

**AIM:** To explore the therapeutic effect of pancreatic clearance pills (Qingyi pian) on severe acute pancreatitis.

**METHODS:** From January 1997 to December 2007, 272 cases of severe acute pancreatitis were randomly divided into traditional Chinese medicine group and control group. Their recurrence and nutritional status were recorded.

**RESULTS:** The 1-year AP recurrence rate after discharge was 46.3% (126/272). The 1-year AP recurrence rate of the Chinese medicine group was significantly lower than that of the control group (39.9% vs 53.0%,  $P < 0.05$ ). Nutritional

damage score at 6 and 12 mo after discharge was significantly lower in Chinese herb group than in the control group ( $t = 2.23, 2.77, P < 0.05$  or 0.01).

**CONCLUSION:** Use of pancreatic clearance pills within the first 3 months after discharge reduces long-term AP recurrence rate and improves nutritional status for SAP patients.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Recurrence; Chinese herb; Nutrition

Miao B, Cui NQ, Li ZL, Ma T, Zhao G, Wang X. Therapeutic effect of pancreas clearing tablets (Qingyi pian) on severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1374-1377

### 摘要

**目的:** 探讨清胰片对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者恢复期的治疗价值。

**方法:** 选择1997-01/2007-12我院符合纳入标准的SAP痊愈患者294例, 失访及剔除22例, 合格病例为272例, 随机分为中药组和对照组, 观察两组急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)复发及营养状态。

**结果:** SAP患者出院12 mo内AP复发率为46.3%(126/272)。中药组出院12 mo内AP的复发率较对照组显著下降(39.9% vs 53.0%,  $P < 0.05$ )。中药组出院后6、12 mo营养状态受损评分均较对照组明显减低( $t = 2.23, 2.77, P < 0.05$ 或0.01)。

**结论:** 出院后3 mo内继续服用中药清胰片治疗可以减少SAP恢复期的远期AP的复发并可改善其营养状态。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 复发; 中药; 营养

苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 马涛, 赵光, 王心. 清胰片在SAP恢复期中的治疗价值. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1374-1377  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1374.asp>

### ■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学盛京医院肝胆外科; 崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科



## 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床上常见的一类急腹症,起病急,进展快,病情凶险,早期即可发生全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),病死率高达20%-30%<sup>[1]</sup>。由于病情笃重,脏器损害广泛以及感染、手术和出血、瘘等并发症的多重打击,SAP痊愈出院患者仍存在一个漫长的恢复期。在此期间常出现体质量下降、进食不足等营养不良情况,甚至再次发作胰腺炎,降低了患者的生活质量,使病程迁延,医疗负担加重。改善患者的营养状态,减少胰腺炎的复发为此阶段的治疗重点。中药清胰片为经验方,由大柴胡汤化裁而来,除泻下热结以外,兼和解少阳,是表里双解的方剂。我院将其应用于急性胰腺炎的治疗已有近30年的历史,对急慢性胰腺炎均有良好疗效。本文通过随机对照临床试验的方法研究中药清胰片在SAP患者恢复期中的治疗价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 纳入标准:符合中华医学会消化病分会胰腺疾病学组制定的SAP诊断标准<sup>[2]</sup>即临床确定急性胰腺炎诊断(症状、体征、血尿淀粉酶升高、影像学指标);同时符合Ranson指标3项和APACHE-II评分8分以上,Balthazar CT分级系统在D级以上。并且经住院治疗后SAP的临床症状和体征消失,血、尿淀粉酶恢复正常,其他化验指标如血常规、肝肾功能和血糖等亦恢复正常,进低脂半流质饮食无不适反应;而且不伴胰腺脓肿、出血、胰瘘、胆瘘、及消化道瘘等需要治疗的残留并发症的痊愈出院患者。

1.1.2 治疗药物:清胰片(药品批号:津药准字19872341)是由柴胡、黄芩、白芍、大黄、胡连等7味中药组成的纯中药制剂,具有清热解毒,通里攻下,调气疏肝,缓急止痛的功效<sup>[3]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 治疗及随访:1997-01/2007-12我院符合纳入标准的SAP痊愈出院患者294例,随机分为中药组和对照组,中药组给予清胰片4片(每片0.3 g),tid,给药期限为出院后3 mo。对照组无治疗。两组基线资料均衡性一致。

进行为期1年的随访,分为出院时、出院1、3、6、12 mo时5个随访点。随访内容为AP复

发、饮食及体质量变化等项目。AP复发的诊断标准:出院后再次出现持续性腹痛(偶无腹痛),血清淀粉酶活性增高 $\geq$ 正常值上限3倍,影像学提示胰腺有或无形态改变,排除其他疾病者<sup>[2]</sup>。

1.2.2 营养状态评价:根据2002年欧洲肠外肠内营养学会(ESPEN)推荐的营养风险筛查工具中的营养状态受损评分<sup>[4]</sup>评估SAP恢复期的营养状态:0分,正常营养状态;1分,3 mo内体质量丢失 $>5\%$ 或食物摄入量比正常需要量减少25%-50%;2分,一般情况差或2 mo内体质量丢失 $>5\%$ ,或食物摄入量比正常需要量减少25%-50%;3分,身体质量指数(body mass index, BMI) $<18.5$ ,且一般情况差,或1 mo内体质量丢失 $>5\%$ (或3 mo体质量下降15%),或者前1 wk食物摄入量比正常需要量减少75%-100%。

**统计学处理** 计量资料采用 $t$ 检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验。采用SPSS11.0统计软件进行双对比数据录入,进行逻辑核查和统计学处理,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 随访资料 在全部294例随访病例中,失访及剔除未按医嘱服药者、资料不全者22例,合格病例为272例,随访率为92.5%,随访时间为1年。在272例合格病例中,男/女:117/155;年龄:50.6 $\pm$ 21(16-77)岁;发病原因分别为:胆源性:132例(48.71%);酒精性:52例(19.19%);高脂血症:49例(18.08%);ERCP后:5例(1.84%);其他:33例(12.18%)。Ranson:4.5 $\pm$ 1.3(3-6);APACHE II:10.8 $\pm$ 2.5(8-22);Balthazar CT评分:4.4 $\pm$ 0.6(4-6);平均住院天数:46 $\pm$ 29(19-311) d。在随访期内有126例再次发作AP。复发率为46.3%。在复发的126例患者中,出院1 mo内复发的有34例,1-3 mo有32例,3-6 mo有28例,6-12 mo有32例。随访期内AP复发2次的23例,3次复发的8例,4次复发1例。

2.2 中药治疗组与对照组随访期内复发的比较 在138例中药治疗组中,随访期内有55例复发,其中出院1 mo内复发的有17例,1-3 mo有15例,3-6 mo有13例,6-12 mo有10例。在134例对照组中,随访期内有71例复发,出院1 mo内复发的有17例,1-3 mo有17例,3-6 mo有15例,6-12 mo有22例。在出院6-12 mo时中药组AP复发率明显较对照组下降。在随访期内(0-12 mo),中药组AP复发率也明显较对照组下降(表1)。

2.3 中药组与对照组随访期内营养状态受损评分的比较 在出院时和出院后1 mo和3 mo时,中

## ■ 研究前沿

急性胰腺炎反复发作的发病机制及中西医结合治疗的研究是目前研究热点。中药有可能在控制急性胰腺炎复发方面作出贡献。

## ■应用要点

重症急性胰腺炎痊愈出院患者继续服用清胰片3 mo,可以降低1年后的AP复发率并改善患者的营养状态,从而极大改善SAP恢复期的远期生存质量。

表 1 患者出院后AP复发率比较  $n(\%)$ 

分组	$n$	0-1 mo	1-3 mo	3-6 mo	6-12 mo	1-12 mo
中药组	138	17(12.32)	15(10.87)	13(9.42)	10(7.24) <sup>a</sup>	55(39.9) <sup>c</sup>
对照组	134	17(12.68)	17(12.68)	15(11.2)	22(16.42)	71(53)

$\chi^2 = 3.88$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 4.71$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

表 2 中药组与对照组随访期内营养状态受损评分比较

分组	$n$	出院时	出院后			
			1 mo	3 mo	6 mo	12 mo
中药组	138	1.78 ± 0.53	1.84 ± 0.71	2.16 ± 0.72	1.86 ± 0.56 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.62 <sup>c</sup>
对照组	134	1.82 ± 0.66	1.91 ± 0.58	2.23 ± 0.81	2.03 ± 0.69	0.85 ± 0.69

$t = 2.23$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;  $t = 2.77$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

药组和对照组之间营养状态差异无显著性,而出院后6 mo和12 mo时,中药组的营养状态受损评分均较对照组明显减低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 表2)。

## 3 讨论

SAP作为一种特殊类型的急腹症,由于起病急骤,病情进展迅速且复杂多变,并发症多,病程多迁延数月。SAP恢复期发生在疾病的最后阶段,通常在院外治疗,屈振亮 *et al*报道认为此期患者主要存在营养不良,免疫力低下等情况<sup>[5]</sup>。在本研究中,我们随访了SAP患者恢复期中再次发作AP和营养状态及中药的治疗价值。

有资料显示,约近20%-30%轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)患者复发,甚至在常规治疗期间就出现复发,说明MAP是一种易复发的疾病<sup>[6]</sup>。Gullo *et al*报道急性胰腺炎的复发率为27%<sup>[7]</sup>。但对于SAP目前尚无可靠数据说明其复发率,我们的随访数据表明,高达46.3%的SAP痊愈患者在出院1年内又再次发作AP,远高于目前报道的MAP的复发率,说明SAP患者比一般MAP更易复发。

Yasuda *et al*报道SAP预后主要有急性胰腺炎、慢性胰腺炎、糖尿病三种不良转归<sup>[8]</sup>。本组资料中,SAP出院后1年内多次发作胰腺炎者32例,此类患者病情多为间歇性发作,一部分患者又发展为伴有消化吸收不良、脂肪泻等胰腺外分泌不足表现的慢性胰腺炎。

本研究中,在复发的126例患者中,出院1 mo内复发的有34例。SAP后期临床症状缓解并不代表腹腔内病变已完全消退,腹腔内仍有弥散或

分隔的积液和坏死胰腺组织,需要一定时间的局限、液化和吸收<sup>[9]</sup>。SAP症状缓解后过早停止治疗、不规范治疗,容易出现症状反复。

在过去的一些研究中,通里攻下的代表方剂大承气汤对于反复发作的急性胰腺炎有良好疗效<sup>[10]</sup>。中药清胰片主要由理气活血,通里攻下药物组方而成。研究表明,清热解毒及活血化瘀中药具有改善腹腔脏器血供、减少炎性渗出、促进胆汁排空等作用<sup>[11]</sup>,在本研究中,SAP患者出院后服用清胰片可以减少远期(6-12 mo)的AP复发,可能与上述机制相关。

Thomson *et al*研究发现在急性胰腺炎恢复期,由于肝细胞线粒体及诸多细胞器均不同程度受损,导致线粒体氧化磷酸化活性明显减弱,ATP合成减少,无法维持能量代谢的平衡而产生营养不良<sup>[12]</sup>。由于SAP的病理特征为胰腺广泛坏死,胰管破裂,胰液外溢。由于胰腺修复能力不足,SAP痊愈患者常常伴有胰腺外分泌不足<sup>[13]</sup>。胰腺的外分泌不足造成患者长期腹泻甚至脂肪泻也是导致患者体质量下降,营养状态低下的重要原因<sup>[14]</sup>。研究表明清胰片对胰腺的外分泌能有明显的促进作用,并可翻转蛙皮素对胰腺外分泌所造成的抑制状态,而增进胰液和淀粉酶的排出从、减少胰腺组织淀粉酶的含量,减轻胰腺肿胀,改善胰腺的血液灌流<sup>[15]</sup>。本组资料中,中药清胰片能明显改善SAP恢复期患者的远期(6-12 mo)营养状态。

## 4 参考文献

- 1 崔乃强,齐清会,孔棣,周振理,吴咸中. 重型急性胰腺炎的中西医结合治疗-附145例报告. 中国中西医结合

- 外科杂志 1999; 4: 5-8
- 2 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中华消化杂志 2004; 24: 190-192
- 3 樊华, 王洪志, 范俊婷, 刘勇, 李婉晴. 清胰片质量标准的研究. 天津中医药 2008; 25: 414-416
- 4 蒋朱明, 江华. 肠外肠内营养临床有效的循证基础: 营养风险筛查(NRS2002)与相对有效理念. 中国临床营养杂志 2007; 15: 1-2
- 5 屈振亮, 傅强, 夏庆. 重症急性胰腺炎中西医结合诊治常规(草案). 中国中西医结合外科杂志 2007; 13: 232-237
- 6 Somogyi L, Martin SP, Venkatesan T, Ulrich CD 2nd. Recurrent acute pancreatitis: an algorithmic approach to identification and elimination of inciting factors. *Gastroenterology* 2001; 120: 708-717
- 7 Gullo L, Migliori M, Pezzilli R, Oláh A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. An update on recurrent acute pancreatitis: data from five European countries. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1959-1962
- 8 Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Long-term outcome of severe acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 397-402
- 9 Appelros S, Lindgren S, Borgström A. Short and long term outcome of severe acute pancreatitis. *Eur J Surg* 2001; 167: 281-286
- 10 赵宏智. 大承气汤辅助治疗反复急性胰腺炎25例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1825-1827
- 11 曲鹏飞, 苗彬, 崔乃强. 重症急性胰腺炎感染与肠屏障学术进展. 中国中西医结合外科杂志 2008; 14: 307-309
- 12 Thomson A. Nutritional support in acute pancreatitis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 261-266
- 13 Ioannidis O, Lavrentieva A, Botsios D. Nutrition support in acute pancreatitis. *JOP* 2008; 9: 375-390
- 14 贾建国, 刘大川. 重症急性胰腺炎患者的代谢特点与营养支持. 中国临床营养杂志 2008; 16: 377-382
- 15 苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 马涛, 赵光, 王心. 早期通里攻下法对重症急性胰腺炎结局影响的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1042-1047

#### ■同行评价

本文研究中药清胰片对重症急性胰腺炎复发的预防作用, 丰富了传统医学理论, 对临床有一定参考价值, 在一定程度上反映了我国重症胰腺炎的研究与治疗特色。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志英文摘要要求

**本刊讯** 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)

## 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!

曹洁 副教授  
中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

陈凜 教授  
中国人民解放军总医院普通外科

陈卫昌 教授  
苏州大学附属第一医院消化内科

程英升 教授  
同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

崔云甫 教授  
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

戴朝六 教授  
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

党双锁 教授  
西安交通大学第二医院感染科

杜群 副研究员  
广州中医药大学脾胃研究所药理室

樊晓明 主任医师  
广州中医药大学脾胃研究所药理室

范小玲 主任医师  
北京地坛医院综合科

房林 副教授  
同济大学附属上海市第十人民医院普外科

高春芳 研究员  
中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

关玉盘 教授  
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

黄晓东 副主任医师  
武汉市中心医院消化内科

黄志勇 副教授  
华中科技大学同济医院普外科

金瑞 教授  
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李军祥 教授  
北京中医药大学附属东方医院消化内科

刘平 教授  
南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤科

刘占举 教授  
同济大学附属第十人民医院胃肠内科

倪润洲 教授  
南通大学附属医院消化内科

潘秀珍 教授  
福建省立医院消化内科

沈柏用 副教授  
上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

孙殿兴 主任医师  
白求恩国际和平医院肝病科

唐霓 副研究员  
教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

王正康 教授  
北京中日友好医院普外科

王志刚 副主任医师  
上海市第六人民医院普外科

许玲 副教授  
中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

张国梁 主任医师  
天津市第一中心医院消化内科

郑鹏远 教授  
郑州大学第二附属医院消化科

周国雄 主任医师  
南通大学附属医院消化内科