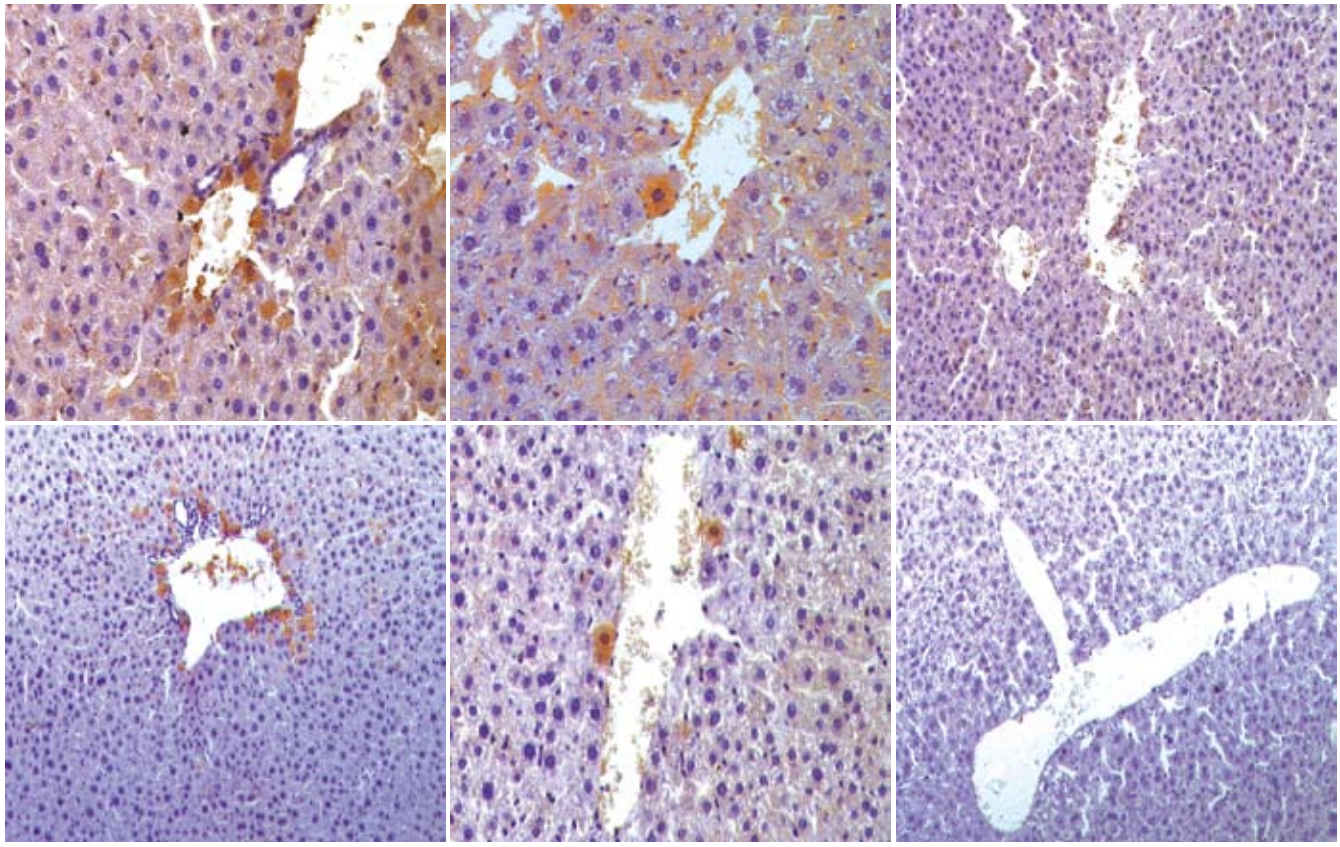
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 3 月 18 日　第 14 卷　第 8 期　(Volume 14 Number 8)



8 | 2006

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》，俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志
www.wjgnet.com
二零零六年三月十八日
第十四卷
第八期
世界胃肠病学杂志社

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31
wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授 北京
黄象谦教授 天津
黄志强教授 北京
裘法祖教授 武汉
王宝恩教授 北京
危北海研究员 北京
吴孟超教授 上海
杨春波教授 福州
周殿元教授 广州

名誉总编辑

潘伯荣教授 西安

社长/总编辑

马连生教授 北京

副总编辑

陈士葆教授 上海
房殿春教授 重庆
姜洪池教授 哈尔滨
王苑本教授 天津
吴云林教授 上海
徐克成教授 广州
杨思凤教授 吉林
姚希贤教授 石家庄
岳茂兴教授 北京
张万岱教授 广州
周学文教授 沈阳

常务编委

程英升副教授 上海
高毅主任医师 广州
江学良副主任医师 上海
李岩教授 沈阳
刘连新教授 哈尔滨
吕宾教授 杭州
罗和生教授 武汉
聂青和副教授 西安
王小众教授 福州

编委

白爱平主治医师 广州
白文元教授 石家庄
白玉贤教授 哈尔滨
蔡淦教授 上海
曹洁副教授 上海
陈海龙教授 大连
陈红松副研究员 北京
陈积圣教授 广州
陈建荣副教授 南通
陈立波副教授 武汉
陈凛教授 北京
陈其奎教授 广州
陈强谱教授 滨州
陈仕珠主任医师 西安
陈卫昌教授 苏州
陈耀凯副教授 重庆
陈贻胜教授 福州
陈知水教授 武汉
陈治水主任医师 哈尔滨
陈祖林副教授 重庆
程爱国教授 唐山
程红岩教授 上海
迟宝荣教授 长春
崔云甫教授 哈尔滨
代文杰教授 哈尔滨
戴冬秋教授 沈阳
党双锁副教授 西安
邓长生教授 武汉
董蕾教授 西安
杜群副研究员 广州
樊红副教授 南京
范建高教授 上海
范志宁主任医师 南京
房静远教授 上海
傅春彬主任医师 吉林
高成新教授 上海
高春芳研究员 上海
高峰教授 西安
高润平教授 长春
戈之铮教授 上海
龚国忠教授 长沙
龚建平教授 重庆
谷俊朝主任医师 北京
关玉盘教授 北京
管冬元副教授 上海
郭克建教授 沈阳
郭晓钟教授 沈阳
郭新宁教授 银川
韩天权教授 上海
郝俊鸣副主任医师 北京
何超教授 杭州
何裕隆教授 广州
何振平教授 重庆
洪天配教授 北京
侯晓华教授 武汉
黄恒青主任医师 福州
黄金华副教授 广州
黄晓东副主任医师 武汉
黄颖秋教授 本溪
黄裕新教授 西安
黄志勇副教授 武汉
季国忠副教授 南京
季加孚教授 北京
姜慧卿教授 石家庄
蒋龙元副教授 广州
金瑞教授 北京
匡安仁教授 成都
兰平教授 广州
蓝宇教授 北京
劳绍贤教授 广州
李定国教授 上海
李东辉教授 厦门
李方儒教授 天津
李国威教授 西安
李继强教授 上海
李靖副教授 重庆
李奇林教授 广州
李涛主治医师 北京
李晓宇主任医师 北京
李延青教授 济南
李永哲副研究员 北京
李玉民教授 兰州
李增山副教授 西安
李兆申教授 上海
李志霞教授 北京
李宗芳教授 西安
梁力建教授 广州
林勇讲师 上海
刘宝瑞教授 南京
刘冰熔教授 哈尔滨
刘成海研究员 上海
刘平教授 上海
刘杞教授 重庆

世界华人消化杂志®
编辑委员会

刘铁夫教授 哈尔滨
刘正稳教授 西安
刘作金副教授 重庆
龙致贤教授 北京
鲁华玉研究员 北京
陆才德教授 宁波
陆云飞教授 南宁
禄韶英主治医师 西安
吕明德教授 广州
吕宁主任医师 北京
吕云福教授 海口
马大烈教授 上海
茅爱武主任医师 上海
梅林教授 北京
孟庆华教授 北京
宁琴教授 武汉
牛建昭教授 北京
欧希龙副教授 南京
潘林娜教授 哈尔滨
潘兴华副主任医师 昆明
潘秀珍教授 福州
彭波副教授 西安
彭吉润主任医师 北京
彭曦副研究员 重庆
彭心宇教授 石河子
彭志海教授 上海
秦波教授 重庆
秦成勇教授 济南
秦环龙教授 上海
钱建民教授 上海
秦仁义教授 武汉
卿三华教授 广州
邱双健副教授 上海
任超世研究员 天津
任建安教授 南京
任建林教授 厦门
邵成浩讲师 上海
邵先玉教授 泰安
邵永孚教授 北京
沈洪教授 南京
沈琳副教授 北京
沈薇教授 重庆
施瑞华教授 南京
石统东副教授 重庆
宋振顺教授 西安
孙诚谊教授 贵阳
孙家邦教授 北京
孙秀发教授 武汉
孙学英教授 哈尔滨
邰升副教授 哈尔滨
谭学瑞教授 汕头
唐采白副教授 徐州
唐芙爱教授 郑州
唐霓副研究员 重庆
唐文富主治医师 成都
唐文皓副主任医师 上海
唐旭东主任医师 北京
汤展宏副教授 南宁
唐志鹏副研究员 上海
田素礼教授 哈尔滨
屠红副研究员 上海
万军教授 北京
汪波副主任医师 北京
汪思应教授 安徽
王承党副教授 福州
王春友教授 武汉
王广义教授 长春
王吉耀教授 上海
王鲁副教授 上海
王效民教授 厦门
王学美研究员 北京
王正康教授 北京
王志刚副主任医师 上海
王忠裕教授 大连
卫洪波教授 广州
魏经国教授 西安
魏来教授 北京
闻勤生教授 西安
吴德全教授 哈尔滨
吴建国教授 武汉
吴君主任医师 贵阳
吴萍主任医师 徐州
席启主任医师 大同
夏建川研究员 广州
向德兵讲师 重庆
肖恩华教授 长沙
谢晓华副教授 广州
徐爱民副教授 上海
许春舫主任医师 苏州
徐存拴教授 新乡
徐大华副主任医师 北京
徐德忠教授 西安
徐列明教授 上海
徐小元教授 北京
许玲副教授 上海
许文燮教授 上海
许亚平副教授 镇江
严律南教授 成都
杨冬华教授 广州
杨广顺教授 上海
杨建勇教授 广州
杨林副研究员 广州
杨维良教授 哈尔滨
杨希山教授 广州
杨云生教授 北京
姚登福教授 南通
姚树坤教授 石家庄
伊力亚尔·夏合丁教授 乌鲁木齐
阴赖宏研究员 北京
于红刚副教授 武汉
于健春教授 北京
于颖彦教授 上海
郁宝铭教授 上海
喻荣彬副教授 南京
张柏和教授 上海
张方信主任医师 兰州
张吉翔教授 南昌
张锦生教授 上海
张军教授 西安
张青云研究员 北京
张群华教授 上海
张水军教授 郑州
张绪清副教授 重庆
张学教授 北京
张宗明教授 北京
赵桂珍教授 沈阳
赵景民教授 北京
赵连三教授 成都
赵平副教授 上海
郑民华教授 上海
智发朝教授 广州
周伯平教授 深圳
周丁华主任医师 北京
周国雄主任医师 南通
周士胜教授 大连
周霞秋教授 上海
周晓东研究员 广州
朱春兰主任医师 哈尔滨
朱立元教授 深圳
朱人敏教授 南京
邹小明教授 哈尔滨
左国营副主任药师 昆明

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2006 年 3 月 18 日　第 14 卷　第 8 期　(总第160期)

述　评

743 乙型肝炎病毒基因的整合机制及对宿主的影响
哈明昊, 魏来

基础研究

747 建立十二色荧光原位杂交技术鉴定食管癌KYSE450细胞系的核型
吴玉鹏, 杨壹羚, 韩亚玲, 徐昕, 蔡岩, 杨光之, 王学英, 詹启敏, 吴旻, 王明荣

752 Ghrelin在大鼠神经系统中的表达对胃黏膜的保护作用
徐珞, 孙向荣, 韩晓华, 钟凤, Inge Depoortere, Theo Peeters

758 自身抗原核点蛋白Sp100基因克隆和真核表达
王雪松, 李永哲, 刘国振

763 胃癌组织Axin蛋白的表达与侵袭转移的相关性
郑亚民, 李非, 董承伟, 伍晓汀

767 HGF质粒体内表达诱导脐血干细胞向肝系细胞分化
范烨, 王学浩, 张峰, 李相成, 王科, 钱晓峰

772 胶原酶门静脉灌注逆转兔CCl_4性肝硬化
金博, 张志成, 孙涛, 程留芳

778 p38MAPK信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞黏附作用
毛华, 黄纯炽, 赵敏芳, 宋卫生

784 siRNA对生长抑素基因表达的抑制作用
朱晓燕, 岳保红, 张钦宪

789 幽门螺杆菌重组VacA蛋黄抗体的体外活性
毛小琴, 杨致邦, 张绍兰, 田一玲, 黄进

文献综述

795 磷脂酶A_2在炎症反应中的作用
杨银治, 夏时海

800 5-脂氧合酶促癌机制研究进展
李勇, 李建英, 王小众

805 AMP-18, 一种新发现的胃黏膜保护因子
陈美娅, 任建林, 潘金水

临床经验

810 溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平
李永哲, 孙可歆, 赵臣

814 记忆合金支架捆绑碘-125粒子治疗食管癌的临床应用
金安琴, 黄晓俊, 王祥, 樊红

819 直肠癌手术后患者48例生存质量评定
陈静, 赵嫚, 谢强, 孙玉华, 梁健

823 联合检测CA19-9和CA125鉴别良恶性腹水
缪应雷, 施丕华, 段丽平

827 腹腔镜在直肠癌手术治疗中的临床应用
周保军, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉, 刘津, 张国建, 段国强, 任鹏涛

病例报告

830 贲门失弛缓症术后并发食管旁疝致胃底绞窄坏死1例
尹勇, 王中林, 陆一民

832 儿童恶性胃肠道间质瘤1例
金仁顺, 朴东明, 姜颍

附　　录	834　世界华人消化杂志投稿须知 839　世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息
致　　谢	840　致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	771　第一届北京国际消化内镜高峰论坛 777　中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会 788　欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 794　国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 799　第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 804　技法与经验 809　第十五次全国中西医结合肝病学术会议 813　第十届全军普通外科学术会议征文通知 818　专家门诊 822　2006广州肝病防治研究新进展学术报告会 826　第二届全国小肠疾病学术会议 829　NERD及相关疾病国际研讨会 831　第十一届全国普通外科学术会议征文通知 833　第十二届全国胆道外科学术会议征文通知
封面故事	范烨, 王学浩, 张峰, 李相成, 王科, 钱晓峰. HGF质粒体内表达诱导脐血干细胞向肝系细胞分化. 世界华人消化杂志　2006;14(8):767-771 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/767.asp
国际会议	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

世界華人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2006-03-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣　　社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁　　英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张海宁
电子编辑 张敏 李琪 韩江燕
本期审读 王瑾晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023，北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023，北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》，俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社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.

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元　全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

March 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 8

EDITORIAL

743 Integration mechanism of hepatitis B virus gene and its influence on host
Ha MH, Wei L

BASIC RESEARCH

747 Identification of complex chromosome abnormalities in esophageal carcinoma cells KYSE450 by multicolor fluorescence *in situ* hybridization
Wu YP, Yang YL, HanYL, Xu X, Cai Y, Yang GZ, Wang XY, Zhan QM, Wu M, Wang MR

752 Expression of Ghrelin in nervous system and its cytoprotective action in rats
Xu L, Sun XR, Han XH, Zhong F, Depoortere I, Peeters T

758 Gene cloning and fusion expression of human autoantigen Sp100 in yeasts
Wang XS, Li YZ, Liu GZ

763 Expression of Axin protein correlates with genesis and metastasis of gastric carcinoma
Zheng YM, Li F, Dong CW, Wu XT

767 *In vivo* expression of hepatocyte growth factor promotes differentiation of stem cells from umbilical cord blood into hepatocyte-like cells
Fan Y, Wang XH, Zhang F, Li XC, Wang K, Qian XF

772 Portal collagenase administration reverses carbon tetrachloride-induced rabbit liver cirrhosis
Jin B, Zhang ZC, Sun T, Cheng LF

778 Role of p38MAPK signal transduction pathway in adhesion of hepatocellular cancinoma cell line $HepG_2$ induced by vascular endothelial growth factor
Mao H, Huang CZ, Zhao MF, Song WS

784 Inhibitory effects of small interfering RNA on expression of somatostatin gene
Zhu XY, Yue BH, Zhang QX

789 *In vitro* activity of IgY against recombinant VacA protein of *Helicobacter pylori*
Mao XQ, Yang ZB, Zhang SL, Tian YL, Huang J

REVIEW

795 Role of phospholipase A_2 in inflammatory reaction
Yang YZ, Xia SH

800 Research progress of 5-lipoxygenase in promotion mechanism of carcinoma
Li Y, Li JY, Wang XZ

805 Advance in a new gastric mucosa protection factor AMP-18
Chen MY, Ren JL, Pan JS

CLINICAL PRACTICE

810 Expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood monocytes of patients with ulcerative colitis
Li YZ, Sun KX, Zhao C

814 Clinical application of self-expandable medical memorial metallic stent with iodine-125 seeds in treatment of esophageal carcinoma
Jin AQ, Huang XJ, Wang X, Fan H

819 Assessment of life quality of patients after rectal carcinoma operation
Chen J, Zhao M, Xie Q, Sun YH, Liang J

823 Value of combined detection of CA19-9 and CA125 in differential diagnosis between benign and malignant ascites
Miao YL, Shi PH, Duan LP

827 Clinical application of laparoscopy in surgical treatment of colorectal carcinoma
Zhou BJ, Yan QH, Song WQ, Cai JH, Liu J, Zhang GJ, Duan GQ, Ren PT

CASE REPORT

830 One case analysis of paraesophageal hernia-induced strangulation and necrosis of gastric fundus after surgical treatment for achalasia
Yin Y, Wang ZL, Lu YM

832 One case analysis of malignant gastrointestinal stromal tumor in children
Jin RS, Piao DM, Jiang Y

APPENDIX

834 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

839 Feedback information from authors, readers and editorial board of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

840 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Fan Y, Wang XH, Zhang F, Li XC, Wang K, Qian XF. In vivo expression of hepatocyte growth factor promotes differentiation of stem cells from umbilical cord blood into hepatocyte-like cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):767-771
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/767.asp

INTERNATIONAL MEETINGS

Easl 2006 - The 41st Annual Meeting
April 26-30, 2006

Canadian Digestive Disease Week Conference
March 4-12, 2006
www.cag-acg.org

XXX pan-American congress of digestive diseases
XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas
November 25-December 1, 2006
amg@gastro.org.mx
www.gastro.org.mx

World Congress on Gastrointestinal Cancer
June 14-17, 2006
c.chase@imedex.com

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi
World Chinese Journal of Digestology
Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date March 18, 2006
Honorary-Editor-in-Chief
Bo-Rong Pan
President and Editor-in-Chief
Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of
World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Published by The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Overseas Distributor
China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481
Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Telephone: +86-10-85381901
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**
Copyright © 2006 by The WJG Press

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 743-746
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

乙型肝炎病毒基因的整合机制及对宿主的影响

哈明昊, 魏 来

哈明昊, 北京大学肝病研究所、北京大学人民医院 北京市 100044
哈明昊, 男, 1976－02－09生, 江苏省徐州市人, 北京大学医学部博士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎、肝纤维化的临床研究.
通讯作者: 魏来, 100044, 北京市西直门南大街11号, 北京大学肝病研究所, 北京大学人民医院. weelai@163.com
电话: 010－68314422－5730 传真: 010－68322662
收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-02-09

摘要

乙型肝炎病毒是导致慢性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的主要病因, 目前认为乙型肝炎病毒基因整合在其致病机制中具有重要作用, 本文试就该领域内目前研究成果做一综述.

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因整合; 肝癌

哈明昊, 魏来. 乙型肝炎病毒基因的整合机制及对宿主的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(8):743-746
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/743.asp

0 引言

乙型肝炎病毒是导致慢性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的主要病因[1], 乙型肝炎病毒整合入肝细胞基因组被认为是肝细胞癌发生过程中的重要步骤. 本文将对乙型肝炎病毒不同感染阶段的整合、整合的方式、整合中HBV基因的状态、整合的机制、整合对宿主的影响, 分别进行一一阐述.

1 乙型肝炎病毒基因的整合

1.1 不同感染阶段的整合 乙型肝炎病毒整合入肝细胞基因组可见于大量的乙型肝炎病毒相关肝细胞癌标本中[2-4]. 这一发现极大的推动了对于乙型肝炎病毒基因整合在肝细胞癌发病机制中地位的研究. 但是与逆转录病毒的感染不同, 乙型肝炎病毒的整合非病毒复制之必须, 因此在乙型肝炎病毒的自然史中, 其基因整合不是常规事件[5]. 大多数的乙型肝炎病毒基因整合都发生于乙型肝炎病毒感染的晚期, 而在这一阶段往往已发生肝细胞的恶性转化[6-7]. 在乙型肝炎感染的不同阶段均可检测到HBV DNA的整合. Murakami *et al*[8]以Alu-PCR法分别检测了19例急性乙肝患者、12例HBV相关慢性活动性肝炎患者、10例HCV相关慢性活动性肝炎患者的肝脏和PBMC标本. 在3例急性乙肝患者、全部12例HBV相关慢性活动性肝炎患者肝脏标本中发现病毒整合; 在4例HBV相关慢性活动性肝炎患者PBMC中发现病毒整合; 在一例急性乙肝患者的肝脏标本中, 发现HBV DNA整合于TNF诱导蛋白基因的内含子序列中. 这些结果提示在HBV急性感染的早期即存在HBV DNA的整合.

1.2 整合的方式 HBV基因整合方式分为Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ. Ⅰ起始于DR1向负链3'端延伸, Ⅱ起始于DR1向负链5'端延伸, Ⅲ起始于DR2向负链3'端延伸, Ⅳ起始于DR2向负链5'端延伸. 病毒与细胞连接序列丛集于DR1附近的Ⅰ, Ⅱ种方式比连接序列丛集于DR2附近的Ⅲ, Ⅳ种方式更为常见, 大约是后者的3倍. 其中Ⅱ种方式最常见, 大约见于46.6%的肝细胞癌标本中. DR1与DR2之间的序列也是病毒－病毒连接时最常选择的序列. 另外, preS-S也是病毒重组的常见序列. 这些序列对应于亚基因组HBV mRNA的转录起始序列, HBV mRNA的逆转录也有助于这些位点的基因整合. Tsuei *et al*[9]以DR1、DR2序列设计引物检测了5例儿童HCC患者HBV整合序列及邻近整合序列的肝细胞基因序列. 发现在10个克隆株中有9株定位于DR1序列, 属Ⅰ型整合方式; Southern blot分析显示5例肝癌组织标本中有2例含有人类长散布DNA功能元件(LINE-1)同源序列; 1例发现HBV整合于人类Y染色体RNA结合区基因序列(RBMY). RBMY基因通常见于成年人类精子细胞, 而在所有患者HCC周围正常肝细胞中均未检测到RBMY基因表达. 该研究结果提示HBV的整合及RBMY基因的激活可能与儿童HCC的发生过程有关.

1.3 整合中HBV基因的状态 整合入肝细胞基因组的均为乙型肝炎病毒基因组的部分序列, 在各个肝细胞癌标本中检测到的插入序列也各不相同[10]. 由乙型肝炎病毒基因整合导致的肝细胞基因序列变异相应也出现极大的差异[11]. 乙

■**背景资料**
近年来,乙型肝炎病毒基因整合与原发性肝癌的相关性已经引起人们的重视, 已经有许多研究证明乙型肝炎病毒感染的原发性肝癌标本中存在广泛的基因整合现象, 提示乙型肝炎病毒整合在此类肝癌的发生中可能起重要作用, 本文对此具体的机制进行全面的综述.

■**研发前沿**
乙型肝炎病毒是导致慢性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的主要病因, 乙型肝炎病毒整合入肝细胞基因组被认为是肝细胞癌发生过程中的重要步骤。本文对乙型肝炎病毒不同感染阶段的整合、整合的方式、整合中HBV基因的状态、整合的机制、整合对宿主的影响, 进行了一一阐述.

■应用要点
对HBV不同感染阶段的整合, 整合的方式, 整合的机制等方面的研究将有助于人们阐明肝细胞恶性转化的具体机制, 并为治疗提供依据.

型肝炎病毒以线性方式整合入人类肝细胞基因组, 插入的序列通常包括经过重排的几个连续的读码框[12]. 靠近HBV DR1与DR2之间部分双链的序列是最常整合入肝细胞基因组的序列, 大概占整合序列的2/3. 通常整合入宿主肝细胞基因组的HBV序列包括: BCP, EnhⅡ, X启动子及HBx序列. 但是, 大多数与HBV整合的宿主序列不是与肿瘤起源密切相关的癌基因家族或抑癌基因[13]. Paterlini *et al*[14]以Alu-PCR法检测了9例HCC患者中的9个HBV DNA整合位点, 这9个位点分别为嗜神经性酪氨酸受体蛋白激酶2(NTRK2)基因、IL-1R相关激酶2(IRAK2)基因、P42有丝分裂激活蛋白激酶1(P42MAPK1)、环己六醇1, 4, 5磷酸酶受体基因(IP3R2)、IP3R1基因、SITA基因、甲状腺素激素不相配蛋白(TRUP)基因、及hTERT基因. Ferber *et al*[15]在其研究中发现两例HBV整合入hTERT序列, 有4个整合位点位于hTERT的启动子及上游调节序列, 有5个整合位点位于hTERT的内含子3. 所有HBV的整合均未改变hTERT的编码序列, 但均发现HBV增强子并排于hTERT序列, 该研究提示HBV的基因整合可能通过hTERT功能的改变发挥致癌作用.

1.4 整合的机制 Nagaya *et al*[16]和Shih *et al*[17]认为DR1和DR2是起始HBV负链和正链合成以及前基因组HBV DNA模板链转换的必须序列, 病毒-病毒及病毒-细胞HBV DNA的整合丛集于DR1和DR2序列附近说明病毒复制的中间物即是病毒整合的底物.起始整合即是单股线性HBV DNA侵入宿主单链序列. 整合序列丛集于HBV DNA黏性末端说明HBV DNA单链的5'端对于侵入细胞DNA序列具有重要作用. Ⅰ和Ⅱ两种方式更为常见则指明了HBV DNA负链对于HBV整合的重要作用. Wang *et al*[18]认为可以用拓扑异构酶Ⅰ对细胞和部分双链HBV DNA的切割来解释HBV DNA的整合. 拓扑异构酶Ⅰ是细胞内一类丰富的酶类, 其作用是在DNA复制过程中松弛DNA的超螺旋结构. 拓扑异构酶Ⅰ调控的单链切割序列正位于HBV的黏性末端, 因此设想通过拓扑异构酶Ⅰ的作用使HBV DNA的部分双链结构得以松弛, 并产生线性的HBV DNA以适于和异源细胞DNA结合. 另外, 拓扑异构酶Ⅰ对HBV DNA的切割也会导致HBV DNA形成对细胞内核酸酶敏感的单链末端突出序列. 这也有助于解释在HBV整合子中常见核酸序列的缺失. HBV家族中其他嗜肝病毒基因整合机制与嗜人类HBV DNA基因整合机制有明显不同. Bruni *et al*[19]发现在大约50%土拨鼠肝炎病毒(WHV)相关的土拨鼠HCC组织标本中, WHV的基因整合位点位于c-myc和N-myc等原癌基因序列内. WHV与myc基因的整合位点是多种多样的, 常位于myc编码序列的上、下游. WHV的基因整合可能是通过增强子插入或整合于距离较远的win, b3n非编码序列而发挥激活N-myc2原癌基因活性. Bruni *et al*[20]发现在win, b3n序列中均存在S/MAR调控元件, 说明WHV的整合可能通过使S/MAR调控元件失活进而间接影响位于S/MAR上游的N-myc2基因的表达而发挥致癌作用.

2 整合对宿主的影响

Wang *et al*[21]在一例患者中发现, 在细胞周期蛋白A基因的第2内含子序列中有HBV的整合. 细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子之间相互作用, 在调控细胞分裂中具有重要作用. 在这例患者中, 细胞周期蛋白的前152个氨基酸被HBV的preS2/S的156个氨基酸置换, 这一HBV与细胞周期蛋白A的融合蛋白显示出致肝细胞癌的活性. Dejean *et al*[22]和Garcia *et al*[23]发现HBV整合于类维生素受体(RAR)β基因. RARs属于配体调控转录因子家族, 其对于调控细胞分化和增殖具有重要作用. 在HBV相关的HCC患者中, 发现包括DR2、C基因、preS1基因在内的(第Ⅲ种整合方式)HBV序列插入RARβ基因序列中. 这样产生的病毒－宿主融合蛋白包含了preS1的前29个密码子及RARβ基因的上游DNA结合区. 由于HBV整合子包含有preS1启动子, 因此preS1启动子即可以起始preS1-RARβ融合蛋白的转录翻译. 该研究结果提示, HBV preS1序列与RARβ序列的融合导致该融合蛋白的过量表达并提高了RAR β致肝细胞癌的活性.

近来一些学者研究乙型肝炎病毒基因整合对端粒酶转式激活作用的影响. Izumi *et al*[24]认为正常细胞的恶性转化与端粒酶的活性及端粒活性的稳定密切相关. 对端粒酶活性的调控主要是通过对端粒酶催化亚基因组序列及人类端粒逆转录酶(hTERT)的转录调控. 包括原癌基因产物(如C-myc)、肿瘤抑制基因产物(如WT1和P53)在内的转录因子, 其过量表达时都能够调控hTERT的转录. hTERT也是HBV的常见整合位点.由于目前对乙型肝炎感染研究手段的欠缺,

除对HCC患者手术标本和肝活检标本的研究外, 一些学者试图通过对HBV整合细胞株的研究来阐明HBV整合的机制.

Maura *et al*[25]以Southern blot方法分析整合了HBV DNA的$HepG_2$ 2.2.15细胞株的亚克隆基因组DNA. 发现经过4代连续培养后, 在$HepG_2$ 2.2.15细胞株中可观察到新增10%的HBV整合位点, 而原来的HBV DNA整合位点没有丢失; 以增加细胞DNA损伤的H_2O_2处理$HepG_2$ 2.2.15细胞株后, 可观察到新增的HBV整合位点达到50%; 以通过抑制ADP核糖基磷酸化进而处理抑制细胞DNA损伤修复$HepG_2$ 2.2.15细胞株后, 亦可观察到新增的HBV整合位点达到50%. 这些研究结果提示: 在HBV持续感染过程中, 由于氧化作用导致细胞DNA链的损伤可能增加HBV DNA的整合.

Livezey *et al*[26]检测亲代不分泌HBV的$HepG_2$、已转染了HBV的$HepG_2$ 2.2.15(HBV复制)和$HepG_2$ T14.1(无HBV复制)细胞株在病毒压力下的活性改变. 经比较发现, $HepG_2$ T14.1细胞株生长最快, $HepG_2$ 2.2.15细胞株生长最慢. 在转染了HBV的两株细胞中均有HBV DNA的整合, RT-PCR亦可见HBX蛋白表达. 将三株细胞分别接种裸鼠, 三周后接种$HepG_2$ 2.2.15和$HepG_2$ T14.1细胞株的裸鼠形成肝细胞癌, 接种$HepG_2$细胞株的裸鼠无肿瘤形成. 接种$HepG_2$ 2.2.15的裸鼠肝脏中检测到一个新的HBV DNA整合位点, 接种$HepG_2$ T14.1的裸鼠肝脏中无新的HBV DNA整合位点. 从裸鼠体内重新提取获得的$HepG_2$ 2.2.15细胞株可以继续复制HBV DNA, 并保留了新的HBV DNA整合位点, 及细胞基因组重排和p53等位基因LOH的缺失. Western blot分析显示在该细胞株中存在P21/Waf1蛋白表达上调.

总之, 目前, 各方学者对HBV DNA与肝细胞基因整合的课题进行了大量研究, 取得了相当的进展, 基本弄清了HBV DNA整合的方式, 最常见的与之整合的肝细胞基因序列, 并初步探讨了HBV DNA基因整合与致肝细胞癌之间的关系. 但目前还存在以下问题. 首先, 嗜人类的HBV DNA的基因整合与WHV DNA的基因整合有很大不同, 多数并未与原癌基因及抑癌基因整合, 因此其致肝细胞癌的机制亟待阐明. 但是人类对其自身基因组结构及功能的研究尚未完善, 是否还有其他与肿瘤发生密切相关的基因组未被发现? 因此不应忽视最常见的与HBV DNA整合的肝细胞基因功能的研究. 第二, HBV DNA整合后常见肝细胞基因的突变, 同时整合后HBV序列表达的蛋白亦为缺陷型, 对于突变后肝细胞基因表达产物及缺陷型HBV功能蛋白的研究所见报道不多, 而对此两种蛋白的研究对HBV致肝细胞癌的机制及宿主肝细胞功能活性的研究较有帮助. 第三, 目前对HBV DNA在抗病毒药物压力作用下整合机制有无改变的研究所见不多. 第四, 目前HBV DNA基因整合研究所用的实验模型多为HCC组织标本或$HepG_2$细胞株, 这两种模型中HBV DNA已稳定的整合入肝细胞基因组, 是一种静态的结果; 我们所要了解的HBV DNA基因整合是一种动态的过程. 因此, 理想的HBV DNA整合模型的欠缺是当前研究阶段最大的瓶颈. 所以, 下一阶段我们还有很多工作要做.

■名词解释

HBV基因整合方式分为Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ. Ⅰ起始于DR1向负链3'端延伸, Ⅱ起始于DR1向负链5'端延伸, Ⅲ起始于DR2向负链3'端延伸, Ⅳ起始于DR2向负链5'端延伸. 病毒与细胞连接序列丛集于DR1附近的Ⅰ, Ⅱ种方式比连接序列丛集于DR2附近的Ⅲ, Ⅳ种方式更为常见, 大约是后者的3倍. 其中Ⅱ种方式最常见, 大约见于46.6%的肝细胞癌标本中. DR1与DR2之间的序列也是病毒一病毒连接时最常选择的序列. 另外, preS-S也是病毒重组的常见序列. 这些序列对应于亚基因组HBV mRNA的转录起始序列, HBV mRNA的逆转录也有助于这些位点的基因整合.

3 参考文献

1 Ljumovic D, Diamantis I, Alegakis AK, Kouroumalis EA. Differential expression of matrix metalloproteinases in viral and non-viral chronic liver diseases. *Clin Chim Acta* 2004; 349: 203-211

2 Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 2005; 34: S75-S78

3 Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Narimatsu T, Habu D, Takeda T, Hirohashi K, Shiomi S. HBV DNA integration and HBV-transcript expression in non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan. *J Med Virol* 2003; 71: 492-498

4 Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003; 22: 3911-3916

5 Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 2005; 54: 1162-1168

6 Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, Kanehisa M, Enomoto M, Tanaka H, Kubo S, Shiomi S, Nishiguchi S. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5821-5826

7 Hassoun Z, Gores GJ. What surgeons should know about viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12: 1-11

8 Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanoue T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 2004; 72: 203-214

9 Tsuei DJ, Chang MH, Chen PJ, Hsu TY, Ni YH. Characterization of integration patterns and flanking cellular sequences of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinomas. *J Med Virol*

■同行评价
本文将近年来国内外"乙型肝炎病毒基因整合的机制及对宿主的影响"等方面的研究进展进行综述，选题热门，学术价值较高，文字质量良好，文献引用广泛，有一定的学术价值和新颖性.

2002; 68: 513-521
10 Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Enomoto M, Koh N, Takeda T, Shiomi S, Hirohashi K, Kinoshita H, Otani S. Sequencing of human-viral DNA junctions in hepatocellular carcinoma from patients with HCV and occult HBV infection. *J Med Virol* 2003; 69: 475-481
11 Jayshree RS, Sridhar H, Devi GM. Surface, core, and X genes of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma: an in situ hybridization study. *Cancer* 2003; 99: 63-67
12 Kimbi GC, Kramvis A, Kew MC. Integration of hepatitis B virus DNA into chromosomal DNA during acute hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6416-6421
13 Huang TH, Zhang QJ, Xie QD, Zeng LP, Zeng XF. Presence and integration of HBV DNA in mouse oocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2869-2873
14 Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003; 22: 3911-3916
15 Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, Nagorney DM, Gostout BS, Burgart LJ, Boix L, Bruix J, McMahon BJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI, Roberts LR. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene* 2003; 22: 3813-3820
16 Nagaya T, Nakamura T, Tokino T, Tsurimoto T, Imai M, Mayumi T, Kamino K, Yamamura K, Matsubara K. The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 1987; 1: 773-782
17 Shih C, Burke K, Chou MJ, Zeldis JB, Yang CS, Lee CS, Isselbacher KJ, Wands JR, Goodman HM. Tight clustering of human hepatitis B virus integration sites in hepatomas near a triple-stranded region. *J Virol* 1987; 61: 3491-3498
18 Wang HP, Rogler CE. Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J Virol* 1991; 65: 2381-2392
19 Bruni R, D'Ugo E, Villano U, Fourel G, Buendia MA, Rapicetta M. The win locus involved in activation of the distal N-myc2 gene upon WHV integration in woodchuck liver tumors harbors S/MAR elements. *Virology* 2004; 329: 1-10
20 Bruni R, D'Ugo E, Argentini C, Giuseppetti R, Rapicetta M. Scaffold attachment region located in a locus targeted by hepadnavirus integration in hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 175-181
21 Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990; 343: 555-557
22 Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1986; 322: 70-72
23 Garcia M, de The H, Tiollais P, Samarut J, Dejean A. A hepatitis B virus pre-S-retinoic acid receptor beta chimera transforms erythrocytic progenitor cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 89-93
24 Izumi H, Carl Barrett, J. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1167-1176
25 Maura Dandri, Martin R. Increase in De Novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. *Hepatology* 2002; 35: 217-223
26 Livezey KW, Negorev D, Simon D. Hepatitis B virus-transfected Hep G2 cells demonstrate genetic alterations and de novo viral integration in cells replicating HBV. *Mutat Res* 2000; 452: 163-178

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 747-751
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

建立十二色荧光原位杂交技术鉴定食管癌 KYSE450 细胞系的核型

吴玉鹏, 杨壹羚, 韩亚玲, 徐 昕, 蔡 岩, 杨光之, 王学英, 詹启敏, 吴 旻, 王明荣

吴玉鹏, 王学英, 沈阳农业大学生物科技学院 辽宁省沈阳市 110161
杨壹羚, 韩亚玲, 徐昕, 蔡岩, 杨光之, 詹启敏, 吴旻, 王明荣, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所、分子肿瘤学国家重点实验室 北京 100021
吴玉鹏, 男, 1978-03-18生, 安徽枞阳人, 汉族, 沈阳农业大学生物科技学院2003级硕士研究生.
国家重点基础研究发展规划基金项目, No. 2004CB518705
国家自然科学基金资助项目, No. 30470969, 30125026
北京市科技计划重大专项, No. D0905001040331
通讯作者: 王明荣, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室. wangmr04@126.com
电话: 010-87788425 传真: 010-87778651
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-09

Identification of complex chromosome abnormalities in esophageal carcinoma cells KYSE450 by multicolor fluorescence *in situ* hybridization

Yu-Peng Wu, Yi-Ling Yang, Ya-Ling Han, Xin Xu, Yan Cai, Guang-Zhi Yang, Xue-Ying Wang, Qi-Min Zhan, Min Wu, Ming-Rong Wang

Yu-Peng Wu, Xue-Ying Wang, Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning province, China
Yi-Ling Yang, Ya-Ling Han, Xin Xu, Yan Cai, Guang-Zhi Yang, Qi-Min Zhan, Min Wu, Ming-Rong Wang, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute (Hospital), Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China
Supported by National Basic Research Program of China, No. 2004CB518705; National Natural Science Foundation of China, No. 30470969, 30125026; and Specialized Research Fundation of Beijing Municipal Science and Technology Commission, No. D0905001040331
Correspondence to: Ming-Rong Wang, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute (Hospital), Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, 17 Panjiayuan Nanli, Beijing 100021, China. wangmr04@126.com
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-09

Abstract

AIM: To establish the technique of multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH) for identification of chromosome aberrations in esophageal carcinoma cell line KYSE450.

METHODS: Two pools of 12-color whole-chromosome painting (WCP) probes were designed and labeled by degenerate oligonucleotide primer-polymerase chain reaction (DOP-PCR). FISH was performed twice on the same metaphase spreads. The karyotype was analyzed by the combination of inverted DAPI banding and M-FISH.

RESULTS: Repetitive 12-color M-FISH was successfully established and the cytogenetic abnormalities in KYSE450 cells were characterized. There were 54 chromosomes in the cell line, but only those numbered 13, 21 and X were normal. DNA losses were observed at parts of chromosomes 4, 7, 11, 12, 18 and 19. Chromosomal gains and translocations occurred at chromosome 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 and 19. Chromosome 22 showed monosomy, and no chromosomes 10, 20 and Y were detected.

CONCLUSION: The established 12-color M-FISH is useful for the analysis of chromosomes in the whole genome of human tumors. KYSE450 cell line presents multiple cytogenetic abnormalities, which are in accordance with those occurred in primary esophageal squamous cell carcinoma.

Key Words: Multicolor fluorescence *in situ* hybridization; KYSE450; Karyotype; Esophageal carcinoma

Wu YP, Yang YL, HanYL, Xu X, Cai Y, Yang GZ, Wang XY, Zhan QM, Wu M, Wang MR. Identification of complex chromosome abnormalities in esophageal carcinoma cells KYSE450 by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):747-751

摘要

目的: 应用12色荧光原位杂交技术(multicolor fluorescence *in situ* hybridization, M-FISH)鉴定食管癌细胞系KYSE450的染色体畸变.

方法: 采用DOP-PCR(degenerate oligonucleotide primer-polymerase chain reaction)法混合

■**背景资料**
肿瘤大多存在复杂的染色体异常. 多色荧光原位杂交技术或光谱核型分析是两种强有力的染色体异常分析方法, 但是由于这些技术成本太高, 目前尚难在国内推广应用.

■研发前沿
目前,多色荧光原位杂交技术的研究主要集中在如何将这项技术应用到绝大多数的实体肿瘤,鉴定筛选这些常见实体肿瘤中的染色体异常.另一个方面是如何提高该技术的分辨力,如应用多色特异区带探针鉴定更加细小的染色体的畸变.

标记两组多色painting探针, 先后两次杂交到相同的KYSE450染色体片, 结合反相DAPI显带技术进行核型分析.

结果: 成功地建立了一种重复的12色荧光原位杂交技术, 并鉴定出KYSE450中存在的畸变染色体. 该细胞系共有54条染色体, 只有13, 21和X号染色体是正常的, 其余21条染色体均表现异常. 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 14, 15, 16和17号染色体部分区带增益, 4和18号染色体部分区带缺失. 7, 11, 12和19号染色体同时存在区带增益和其它部分区带缺失. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18和19号染色体显示有易位. 22号染色体丢失1条, 未检测到10, 20, Y染色体成分.

结论: 12色荧光原位杂交可用于鉴定肿瘤中复杂的染色体异常. KYSE450存在较多与原发性食管鳞癌一致的染色体改变.

关键词: 多色荧光原位杂交; 食管癌细胞系; 核型; 食管癌

吴玉鹏, 杨壹羚, 韩亚玲, 徐昕, 蔡岩, 杨光之, 王学英, 詹启敏, 吴旻, 王明荣. 建立十二色荧光原位杂交技术鉴定食管癌KYSE450细胞系的核型. 世界华人消化杂志 2006;14(8):747-751
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/747.asp

0 引言

肿瘤和先天性遗传病等大多有染色体异常, 分析染色体异常的常规方法是基于传统的细胞遗传学显带技术. 对于肿瘤尤其是实体瘤, 传统的显带技术很难对其复杂的染色体异常进行分析. 单色或双色荧光原位杂交有其高度敏感性和特异性, 但不能同时观察肿瘤细胞全部染色体的变化情况. 多色荧光原位杂交(multicolor fluorescence *in situ* hybridization, M-FISH)、光谱核型分析(spectral karyotyping, SKY)等技术的出现使得一次性进行肿瘤细胞全基因组染色体异常的筛查成为可能[1-2], 但是由于这些技术成本太高, 目前尚难在国内推广应用. 我们建立一种12色荧光原位杂交技术, 其费用较为低廉, 经过两次杂交即可完成整个基因组全部染色体的分析.

1 材料和方法

1.1 材料 食管癌细胞系KYSE450由日本京都大学Shimada教授惠赠, 来自于一位59岁男性患者、分化良好且手术前没有经过放化疗的原发食管癌组织[3]. 1-22, X和Y号染色体涂染探针由中国医学科学院基础医学研究所陈虹教授惠赠. DEAC-5-dUTP和FITC-12-dUTP(PerkinElmer), Cy3-dUTP和Cy5-dUTP(Amersham Biosciences), 去离子甲酰胺(Invitrogen), 硫酸葡聚糖(Invitrogen), 4, 6-二氨基-2-苯吲哚(DAPI, Roche), Cot-1 DNA (Invitrogen), 秋水仙胺 (Gibco), RPMI 1640培养基(医科院基础所遗传室), Taq 酶(TaKaRa). 引物由上海生工公司合成. 引物序列: 5'-CCGACTCGAGNNNNNN ATGTGG-3'.

1.2 方法 KYSE450细胞培养对数生长期时, 加秋水仙胺(终浓度为100 μg/L)继续培养100 min左右, 消化离心, 常规低渗、固定和滴片, 空气干燥30 min, 65℃烤150 min后备用. 中期染色体片用RNase(Sigma, 0.1 g/L)和Pepsin(Sigma, 0.05 g/L)先后处理, 10 g/L多聚甲醛固定15 min, PBS缓冲液洗涤后. 染色体片在700 mL/L甲酰胺/2×SSC(pH7.0)72℃变性3 min, 2×SSC 4℃ 3 min洗涤2次, 梯度乙醇脱水, 室温晾干. 采用DOP-PCR法标记染色体涂染探针, 通过琼脂糖凝胶电泳检测标记产物的大小及范围. 按染色体大小成比例地吸取已标记的染色体涂染探针, 加入与探针总体积相同的Cot-1 DNA, 乙醇/醋酸钠法沉淀探针, 700 mL/L乙醇洗涤, 室温暗处晾干. 杂交液(含500 mL/L去离子甲酰胺, 100 g/L硫酸葡聚糖, 2×SSC)5μL加入晾干的探针, 37℃溶解30 min, 混匀后75℃变性8 min, 置冰上2 min, 37℃水浴预复性30 min. 将探针加在预处理好的中期染色体片上, 盖玻片覆盖, rubber cement封片, 置于湿盒中, 37℃温箱中杂交48 h. 除去rubber cement和盖玻片, 将染色体片放入500 mL/L甲酰胺/2×SSC溶液, 42℃洗涤15 min, 2×SSC室温摇洗3 min×2次, 梯度乙醇脱水, 室温暗处晾干. 加甘油∶PBS(9∶1, 含20 g/L DABCO, 1 mg/L DAPI)20 μL, 封片. 荧光显微镜下观察, 通过MetaMorph Imaging System (Universal Imaging Corporation)控制的CCD摄取图像.

2 结果

我们设计了两组探针池(表1), 先后与相同的KYSE450染色体片杂交. 第1次应用Pool 1杂交, 镜检选取分散较好的中期分裂相, 进行定位、拍照及图像合成(图1A). 之后将杂交片置于纯乙醇中浸泡, 脱去盖片, 再用纯乙醇洗涤

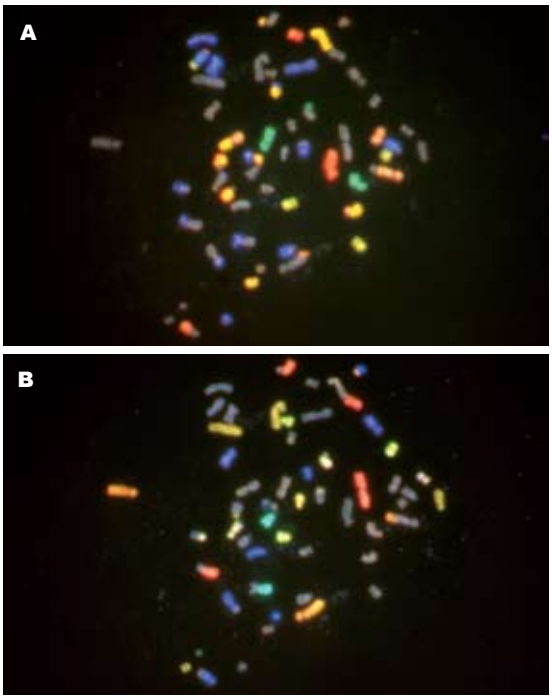


图 1 12色荧光原位杂交合成图. A: 第1次; B: 第2次.

2次, 晾干. 第2次杂交前玻片直接用700 mL/L甲酰胺在72℃变性, 2×SSC洗涤, 梯度乙醇脱水, 晾干后应用Pool 2杂交, 根据第1次定位的坐标, 镜检拍照, 再对第2次杂交的图像进行合成(图1B). 由此我们成功建立了12色荧光原位杂交技术. 综合2次12色杂交和DAPI反相显带(图2)的结果, KYSE450细胞系共有54条染色体(图3), 但只有13, 21和X号染色体是正常的, 其余21条染色体均发生畸变. 其中, 2, 3, 6, 8, 15, 16和17号染色体都存在2条正常染色体, 1, 5和14号染色体都存在1条正常染色体, 但是这些染色体均存在整条染色体或部分区带的净增益. 4和18号分别存在1条正常染色体, 各自的另一条染色体发生了部分区带缺失. 7, 11, 12和19号染色体既表现部分区带增益又有其它区带缺失. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18和19号染色体显示结构畸变, 包括易位和缺失. 其中5和14号整条染色体各参与了一个衍生染色体[der(5)t(5;15)(pter→qter∷q21)和der(14)t(9;14)(q21→q31∷pter→qter)]的组成, 另有一个衍生11号染色体涉及了3条染色体之间的易位, 即der(11)t(11;7;5)(p14→qter∷q22∷q32→q23). 染色体结构畸变的断点位于着丝粒区域的有1p10, 1q10, 2q10, 3q10, 7q10, 9p10, 11q10和19q10, 染色体3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18和19畸变的断点位于非着丝粒区域. 22号丢失1条, 未检测到10, 20, Y染色体成分(表2).

表 1 各染色体标记及两个探针池组合

Pool 1		Pool 2	
Chr 3	DEAC	Chr 1	Cy3
Chr 4	Cy3	Chr 2	Cy5
Chr 6	FITC	Chr 5	Cy3：Cy5
Chr 7	Cy5	Chr 8	DEAC
Chr 9	Cy3：DEAC	Chr 10	Cy3：Cy5：DEAC
Chr 11	Cy3：FITC	Chr 12	Cy3：FITC
Chr 13	DEAC：FITC	Chr 14	FITC
Chr 15	Cy3：Cy5	Chr 16	Cy5：FITC
Chr 17	Cy5：FITC	Chr 18	Cy3：Cy5：FITC
Chr 19	Cy3：Cy5：FITC	Chr 20	Cy5：DEAC
Chr 21	Cy3：Cy5：DEAC	Chr 22	DEAC：FITC
Chr X	Cy5：DEAC	Chr Y	Cy3：DEAC

3 讨论

荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是Pinkel *et al*[4]于1986年创建的一种应用荧光法检测细胞核中或染色体上特异DNA序列的技术. 随着不同荧光素和滤光片的发展, 相继出现了双色或三色标记的探针. 1990年Nederlof *et al*[5]报道了一种组合标记法, 利用3种荧光素(FITC, TRITC, AMCA)标记出7种探针, 用于产前诊断及肿瘤染色体的畸变分析, 这样一次杂交可以检测较多的染色体变化. 但是, 人类有22条常染色体和2条性染色体, 7种探针还是不能满足一次试验检测出人类24条染色体变化情况. 根据组合标记法的设计原则提示, N种荧光分子有2^N-1种组合, 5种不同的荧光染料可以有31种不同的组合, 足以赋予22条常染色体及2条性染色体24种不同的颜色. 直到1996年, 多色荧光原位杂交(M-FISH)技术和光谱核型分析(SKY)的出现终于使这一设想成为现实[1-2]. 该技术是一种快速而强有力的分子细胞遗传学方法, 使研究者能够通过一次杂交同时观察到全部染色体的异常情况, 鉴定出各种简单或复杂的易位、插入以及标记染色体的来源[6-12]. 然而, 国内24色全染色体M-FISH的研究工作罕有报道, 迄今仅有一篇关于白血病细胞染色体分析的文献[13]. 造成这一现状的主要原因是该工作目前只能应用国外公司的已标记探针池试剂盒, 研究所需的成本太高. 为此, 我们建立了一种12色荧光原位杂交技术, 即设计两组探针池, 先后两次杂交到同一染色体片, 成功地鉴定了KYSE450食管癌细胞系的核型, 表明该方法是可行而且有效的.

■创新盘点

由于多色荧光原位杂交技术或光谱核型分析成本太高, 目前尚难在国内推广应用. 本文建立了一种费用较为低廉的12色荧光原位杂交技术, 经过两次杂交即可完成整个基因组全部染色体的分析, 鉴定了食管癌KYSE450细胞系的染色体畸变.

■应用要点
建立的12色FISH技术将可用于筛选与肿瘤发生、发展密切相关的染色体畸变，有助于阐明肿瘤发生、发展分子机制. 对KYSE450的核型的明确将有助于更好地利用该细胞系.

图 2 中期DAPI反相显带图.

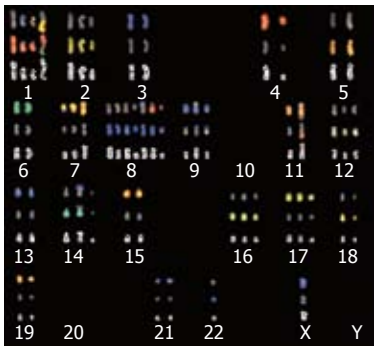


图 3 KYSE450细胞系核型, 每号染色体上排为第1次杂交结果, 中排为第2次杂交结果, 下排为DAPI反相显带结果.

我们应用4种荧光染料(DEAC, FITC, Cy3和Cy5)标记探针, 与国外公司的多色探针池相比, 该技术的显著特点是费用低廉. 我们所使用的染体片预处理液、杂交液等均是自行配制的, 更降低了实验成本. 由于需要在同一染色体片上进行重复杂交, 染色体片的质量非常关键. 高质量中期分裂相染色体是保证M-FISH方法成功的一个重要因素. 这样的分裂相要求染色体细长, 均匀分布, 无扭结, 不交叉重叠, 而且染色体有较少的细胞质, 以免产生较强的背景. 本项研究中, 我们探索了染色体制片及杂交前预处理的一些条件. 例如, 空气湿度过高可能导致探针的靶DNA降解而检测不到信号, 这可以通过杂交前临时制备染色体片解决. 我们对比了以下两种染色体片制备和老化方法: A: 常规滴片, 室温过夜老化, -20℃冻存, 杂交前取出; B: 当天滴片, 65℃烤片1-3 h, 然后杂交. 两种方法老化的染色体片杂交后均有信号, 但后者较好. 而且, 我们发现, 65℃烤片1 h的杂交信号比烤片3 h虽然稍强一点, 但前者经过第2次杂交后, 镜检发现染色体丢失严重, 而烤片3 h则不掉片. 显而易见, 虽然减少染色体片老化时间可以适当提高杂交信号强度, 但是染色体片老化程度不能太低, 因为老化不足会造成染色体丢失, 无法进行第2次杂交.

表 2 KYSE450细胞系中的畸变染色体及其组成

染色体	KYSE450存在的畸变染色体
1	der(1)t(9;1)(pter→p10 : : q10→qter),
	+der(1)t(19;1)(p12→p10 : : q10→qter),
	+der(1)t(1;7;7)(pter→p10 : : p11→p21 : : q11→q35)
2	+der(2)t(16;2)(q21→q11 : : q10→qter)
4	del(4)(pter→q24 :)
5	der(5)t(5;15)(pter→qter : : q21)
7	der(7)t(7;3)(p21→p11 : : q10→q11),
	der(7)t(7;11)(p21→q11 : : q23→q22),
	+der(7)t(11;7)(qter→q10 : : q10→qter)
8	+8,
	+der(8)del(8)(: p22→q12 :),
	+der(8)t(3;8)(q26→q28 : : p12→qter),
	+der(8)t(8;4)(p22→q21.1 : : q32→qter),
	+der(8)t(8;5)(p12→q21.1 : : p14)
9	der(9)t(9;12)(pter→q31 : : q21),
	der(9)t(17;9)(q22→q24 : : p21→qter),
	+der(9)t(9;12)(p21→qter : : q21)
10	null(10)
11	der(11)t(11;7;5)(p14→qter : : q22 : : q32→q23)
12	der(12)t(12;9)(pter→q24.2 : : q22→q31),
	del(12)(pter→q22 :),
	+der(12)t(6;12)(p12 : : p12→q23)
14	der(14)t(9,14)(q21→q31 : : pter→qter)
	+der(14)del(14)(pter→q21 :)
16	+der(16)del(16)(: p12→qter)
17	+der(17)del(17)(: p12→q23:)
18	del(18)(pter→q11 :)
19	del(19)(pter→q13.1 :)
20	null(20)
22	−22
Y	−Y

X, 13, 21号染色体正常; 3, 6, 15号除了表中参与易位的成分外, 均另有2条正常染色体.

在进行第2次杂交前, 需要除去封片剂和盖片, 我们直接将玻片连同盖片在纯乙醇中浸泡, 至盖片脱落后换用新的纯乙醇振荡洗涤5 min ×2次, 晾干即可变性, 进行第2次杂交. 我们的方法比Muller *et al*[14]报道的进行重复杂交时除盖片和封片剂的步骤要简洁得多, 能够最大限度地避免染色体受损而影响杂交效果. 另一方面, 每次杂交时间均不可过长, 否则会导致信号模糊, 特别是第2次杂交的结果将显得不清晰. 这可能由于中期染色体在杂交液中长时间浸泡而变得松散. 我们的经验表明, 每次杂交以36-48 h为宜, 这样能够得到较强的信号且染色体形态保持良好.

我们应用重复12色荧光原位杂交技术分析了食管癌KYSE450细胞系中存在的畸变染色体, 其结果与我们前面研究以及文献报道的食管癌中发生的细胞遗传学改变有较多的一致性. 根据两次杂交的发现, KYSE450中存在1q, 2q, 3q, 5, 6p, 8p, 9, 11q, 12, 14, 15q, 16, 17和19p等染色体部分增益和4q, 7, 11p, 12q, 18q和19q等染色体部分丢失. Yen *et al*[15]运用比较基因组杂交(CGH)技术检测了46例食管癌手术标本, 结果显示扩增频率较高的染色体臂有1q, 2q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12p, 12q, 14q, 17q, 20q和Xq, 丢失多发生在染色体臂1p, 3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 9q, 11q, 13q, 16p, 17p, 18q, 19p和19q. Noguchi *et al*[16]分析53例食管癌组织中的DNA拷贝数变化, 发现最常见的增益位于3q, 5p, 8q, 11q和Xq, 最多的丢失为3p, 5q, 4p, 1p和Xp. 我们最近通过CGH方法观察25例中国北方的食管癌组织, 也发现高频率的1q, 3q, 5p, 9q, 11q, 15q增益和4q, 18q丢失[17]. 所有这些结果表明, KYSE450细胞系中存在的染色体畸变在一定程度上可以反映食管癌的部分原发性细胞遗传学变化, 本研究为更好地利用该细胞系进行相关研究提供了重要的背景资料.

4 参考文献

1 Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497

2 Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 368-375

3 Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T. Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines. *Cancer* 1992; 69: 277-284

4 Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934-2938

5 Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M. Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 1990; 11: 126-131

6 Ferti AD, Stamouli MJ, Panani AD, Raptis SA, Young BD. Molecular cytogenetic analysis of breast cancer: a combined multicolor fluorescence *in situ* hybridization and G-banding study of uncultured tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 149: 28-37

7 Poppe B, Cauwelier B, Van Limbergen H, Yigit N, Philippe J, Verhasselt B, De Paepe A, Benoit Y, Speleman F. Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple color fluorescent *in situ* hybridization. *Haematologica* 2005; 90: 1179-1185

8 Williams SV, Adams J, Coulter J, Summersgill BM, Shipley J, Knowles MA. Assessment by M-FISH of karyotypic complexity and cytogenetic evolution in bladder cancer *in vitro*. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43: 315-328

9 Stamouli MI, Panani AD, Ferti AD, Petraki C, Oliver RT, Raptis SA, Young BD. Detection of genetic alterations in primary bladder carcinoma with dual-color and multiplex fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 149: 107-113

10 Davidsson J, Paulsson K, Johansson B. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization characterization of cytogenetically polyclonal hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 163: 180-183

11 Gunawan B, Mirzaie M, Schulten HJ, Heidrich B, Fuzesi L. Molecular cytogenetic analysis of two primary squamous cell carcinomas of the lung using multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Virchows Arch* 2001; 439: 85-89

12 Strefford JC, Stasevich I, Lane TM, Lu YJ, Oliver T, Young BD. A combination of molecular cytogenetic analyses reveals complex genetic alterations in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 159: 1-9

13 赵萌, 陈冰, 王璐, 徐岚, 曹琪, 苏欣莹, 陈赛娟. 多重荧光原位杂交技术体系的建立及其在检测白血病复杂核型异常中的应用. 中华医学遗传学杂志 2002; 19: 375-378

14 Muller S, Neusser M, Wienberg J. Towards unlimited colors for fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Chromosome Res* 2002; 10: 223-232

15 Yen CC, Chen YJ, Chen JT, Hsia JY, Chen PM, Liu JH, Fan FS, Chiou TJ, Wang WS, Lin CH. Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis. *Cancer* 2001; 92: 2769-2777

16 Noguchi T, Kimura Y, Takeno S, Chujo M, Uchida Y, Mueller W, Gabbert HE. Chromosomal imbalance in esophageal squamous cell carcinoma: 3q gain correlates with tumor progression but not prognostic significance. *Oncol Rep* 2003; 10: 1393-1400

17 Wei F, Ni J, Wu SS, Liu H, Xu X, Han YL, Cai Y, Zhang JW, Chen XJ, Pang H, Lu N, Ji L, Wu M, Wang MR. Cytogenetic studies of esophageal squamous cell carcinomas in the northern Chinese population by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 138: 38-43

■同行评价

本研究建立的12色荧光原位杂交技术, 通过对食管癌KYSE450细胞系中存在的畸变染色体分析, 结果发现与文献报道的食管癌中发生的细胞遗传学改变有较多的一致性, 表明该方法是可行而且有效. 该方法具有经济实用、一次性能进行全染色体分析等优点, 可对复杂的染色体异常进行筛查和分析, 具有较好的学术和应用价值.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 752-757
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

Ghrelin在大鼠神经系统中的表达对胃黏膜的保护作用

徐 珞, 孙向荣, 韩晓华, 钟 凤, Inge Depoortere, Theo Peeters

■背景资料
应激性溃疡在临床上比较常见, 由他引起的大出血和穿孔, 死亡率很高. 大量资料表明, 机体对应激的反应启动于中枢神经系统, 后者的功能改变在应激性溃疡的发病机制中占有重要的地位. Ghrelin研究进展是目前人们所关注的一个热点. 有文献报道Ghrelin在胃溃疡形成中具有重要的作用.

徐珞, 孙向荣, 韩晓华, 钟凤, 青岛大学医学院 山东省青岛市 266021
Inge Depoortere, Theo Peeters, 天主教鲁汶大学 比利时 B-3000
徐珞, 女, 1954-10-26生, 青岛市人, 汉族, 2003年比利时天主教鲁汶大学博士毕业, 教授, 主要从事脑-肠肽结构和功能研究.
国家自然科学基金资助项目, No.30470642
青岛市科技局资助项目, No.05-1-JC-93
通讯作者: 徐珞, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院病理生理教研室. luoxukai@yahoo.com
电话: 0532-83056510 传真: 0532-83813986
收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

Expression of Ghrelin in nervous system and its cytoprotective action in rats

Luo Xu, Xian-Rong Sun, Xiao-Hua Han, Feng Zhong, Inge Depoortere, Theo Peeters

Luo Xu, Xiang-Rong Sun, Xiao-Hua Han, Feng Zhong, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Inge Depoortere, Theo Peeters, Department of Pathophysiology, Centre for Gastroenterological Research, Catholic University of Leuven, B-3000 Leuven, Belgium
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30470642, and the Fund from Qingdao Scientific and Technique Bureau, No. 05-1-JC-93
Correspondence to: Dr. Luo Xu, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. luoxukai@yahoo.com
Received: 2006-01-03 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To investigate the expression of Ghrelin in brain, intestinal myenteric plexus and plasma and study its possible cytoprotective effect and mechanism on gastric mucosa against stress-induced ulcers.

METHODS: Seventy-six healthy male Wistar rats were divided into 6 groups randomly: cold-water restraint group (n = 10); intracerebroventricular (icv) injection of Ghrelin group (n = 24); icv injection of Ghrelin after subcutaneous injection of N^{ω}-Nitro-L-arginine methylester (L-NAME) group (n = 8) and three matched control groups. The expression of Ghrelin in rat brain, intestinal myenteric plexus and plasma were detected by radio-immunoassay (RIA) and double staining of immunofluorescence and immunohistochemistry. The effect and mechanism of Ghrelin on gastric mucosa against stress-induced ulcer were analyzed using neurophysiologic methods.

RESULTS: Ghrelin-positive immunoreaction (IR) was observed in the small intestinal myenteric plexus and primarily cultured myenteric plexus neurons. Ghrelin-IR co-localized with choline acetyl transferase (ChAT), but not with nitric oxide synthase (NOS) or Calbindin (Calb) in the same myenteric plexus neurons. In comparison with that in its matched control group, the content of Ghrelin-IR in plasma was significantly decreased (198.3 ± 29.6 ng/L *vs* 141.7 ± 26.5 ng/L, $P < 0.05$), but increased in hypothalamus, medulla oblongata, pituitary and intestinal myenteric plexus (96.2 ± 18.1 pg/mg *vs* 153.2 ± 11.6 pg/mg, $P = 0.006$; 89.8 ± 16.5 pg/mg *vs* 144.4 ± 13.9 pg/mg, $P = 0.007$; 108.3 ± 11.9 pg/mg *vs* 198.2 ± 23.3 pg/mg, $P = 0.002$; 48.8 ± 12.8 pg/mg *vs* 86.2 ± 21.5 pg/mg, $P = 0.02$; respectively). The formation of stress ulcers was markedly inhibited by microinjection of Ghrelin into the ventricle with a dose-dependent manner (ulcer index: normal saline 86.7 ± 6.2; 50 ng Ghrelin 79.3 ± 10.7, $P = 2.18$; 500 ng Ghrelin: 61.3 ± 11.7, $P = 0.04$; 5 000 ng Ghrelin: 35.6 ± 10.8, $P = 0.005$). However, after a subcutaneous injection of L-NAME, the cytoprotective effect of Ghrelin disappeared.

CONCLUSION: Ghrelin co-localizes with ChAT in intestinal myenteric plexus neurons. The expression of Ghrelin changes in the central nerves system (CNS) and plasma while stress ulcer happens. Ghrelin in the CNS can protect gastric mucosa with a dose-dependent manner, which is probably related to the synthesis of nitric oxide.

Key Words: Ghrelin; Choline acetyl transferase; Nitric oxide synthase; Stress ulcer; Rats

Xu L, Sun XR, Han XH, Zhong F, Depoortere I, Peeters T. Expression of Ghrelin in nervous system and its cytoprotective action in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):752-757

摘要

目的: 研究大鼠脑、小肠肌间神经丛神经元和血浆内Ghrelin的表达, 探讨Ghrelin在水浸加束缚应激性胃溃疡中的作用及机制.

方法: 选择健康♂Wiater大鼠76只, 随机分为6组: 水浸加束缚组(10只); 侧脑室注射Ghrelin组(24只); 皮下注射L-NAME+侧脑室注射Ghrelin组(8只)和相应的3个对照组(正常大鼠组18只, 侧脑室注射生理盐水组8只, 皮下注射L-NAME+侧脑室注射生理盐水组8只). 采用放射免疫分析、荧光免疫组化双染和神经生理学等实验方法, 观察脑、小肠肌间神经丛和血浆内Ghrelin的表达, 探讨Ghrelin对大鼠束缚加水浸诱导的应激性胃溃疡的影响及机制.

结果: 在正常大鼠小肠肌间神经丛内和原代培养的肠肌间神经丛神经元均可见有Ghrelin样免疫反应阳性物(Ghrelin-IR)的表达, 且Ghrelin-IR与胆碱乙酰转移酶(ChAT)共同表达于同一神经元内, 但Ghrelin-IR不与一氧化碳合酶(NOS)和消化道感觉性神经元内特有的钙结合蛋白(Calbindin, Calb)共存. 在大鼠应激性胃溃疡产生的同时, 其血浆内Ghrelin-IR的含量明显减少(198.3±29.6 ng/L *vs* 141.7±26.5 ng/L, $P = 0.026$), 而下丘脑、延脑、垂体和肌间神经丛神经元内Ghrelin-IR的含量明显升高(分别为96.2±18.1 pg/mg *vs* 153.2±11.6 pg/mg, $P = 0.006$; 89.8±16.5 pg/mg *vs* 144.4±13.9 pg/mg, $P = 0.007$; 108.3±11.9 pg/mg *vs* 198.2±23.3 pg/mg, $P = 0.002$; 48.8±12.8 pg/mg *vs* 86.2±21.5 pg/mg, $P = 0.02$); 侧脑室注射Ghrelin大鼠应激性胃溃疡的产生明显减少, 且呈明显的量效依赖关系(溃疡指数: 生理盐水, 86.7±6.2; 50 ng Ghrelin, 79.3±10.7 $P = 2.18$; 500 ng Ghrelin, 61.3±11.7, $P = 0.04$; 5 000 ng Ghrelin, 35.6±10.8, $P = 0.005$), 经sc一氧化氮合酶抑制剂L-NAME后, Ghrelin的胃黏膜细胞保护作用消失.

结论: Ghrelin与ChAT共存表达于肠肌间神经丛胆碱能神经元; 应激性胃溃疡发生时, 中枢神经系统和血浆内Ghrelin的表达发生变化; 中枢Ghrelin对胃黏膜细胞具有保护作用, 且呈明显的量效依赖关系.

关键词: Ghrelin; 胆碱乙酰转移酶; 一氧化氮合酶; 应激性胃溃疡; 大鼠

徐珞, 孙向荣, 韩晓华, 钟凤, Inge Depoortered, Theo Peeters. Ghrelin在大鼠神经系统中的表达对胃黏膜的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(8):752-757
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/752.asp

■**研发前沿**
Ghrelin是1999年发现的脑肠肽. Ghrelin调节胃肠功能的中枢机制及其临床应用研究是人们所关注的一个热点.

0 引言

Ghrelin是1999年由日本科学家Kojima发现的一种由28个氨基酸组成的新的内源性脑肠肽, 是迄今发现的唯一生长激素释放激素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的天然配体. 研究发现, Ghrelin与其受体结合后除了能促进生长激素(growth hormone, GH)的释放外, 还能调节胃肠运动、能量代谢平衡, 并在人类多种疾病或病理状态中发挥重要的作用. 因此, Ghrelin的研究进展是目前人们所关注的一个热点.

应激性溃疡在临床上比较常见, 由他引起的大出血和穿孔, 死亡率很高. 对应激性溃疡发病的机制已有许多研究, 但仍无明确结果. 大量资料表明[1-3], 机体对应激的反应启动于中枢神经系统, 后者的功能改变在应激性溃疡的发病机制中占有重要的地位. Sibilia *et al*[4]报道, Ghrelin在胃溃疡形成中具有重要的作用. 我们建立了大鼠水浸加束缚产生胃溃疡的模型, 通过采用放射免疫、荧光免疫组化双染和神经生理学等方法, 观察了Ghrelin在中枢神经系统和外周肠肌间神经丛的表达及其与应激性胃溃疡发生的关系, 并进一步探讨了中枢Ghrelin在应激性胃溃疡发生中的作用及其机制, 为以后有关应激条件下Ghrelin的研究提供了理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康Wistar大鼠76只(由青岛市药检所提供), 体质量200-250 g. 随机分为(1)正常大鼠组(18只); (2)水浸加束缚应激组(10只); (3)侧脑室注射(icv)生理盐水(NS, 5 μL)对照组(8只); (4)icv Ghrelin 5 μL(50, 500, 5 000 ng)组(共24只); (5)sc L-NAME(70 mg/kg)+icv NS(5 μL)对照组(8只); (6)sc L-NAME(70 mg/kg)+icv Ghrelin 5 μL(500 ng)组(8只). Ghrelin免疫吸附试剂盒由军事医学科学院东亚免疫研究所提供; 激光共聚焦显微镜系日本Olympus公司产品; Ghrelin和Ghrelin抗体由比利时鲁汶大学提供. L-NAME为美国Sigma公司产品. ChAT抗体、NOS抗体和Calbindin抗体为美国Chemicon公司产品. Indocarbocyanin(Cy^3)交联的山羊抗小鼠IgG和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)交联的山羊抗兔IgG系美国

■**创新盘点**
目前关于Ghrelin对消化系统活动的影响主要集中在摄食量、体质量和胃黏膜细胞保护作用等外周机制研究. 我们的研究着重从中枢神经系统入手, 并结合外周胃肠神经系统Ghrelin表达的改变, 由此开辟了更深层次的研究领域.

Jackson ImmunoResearch公司产品.

1.2 方法

1.2.1 动物头部手术 动物经乙醚麻醉后, 头部按常规消毒. 头部正中切口, 左侧脑室定位参照Paxions-Watson大鼠脑图谱(Avademic Press, 第四版), 前囟后1.0 mm, 左旁开1.0 mm, 颅骨表面下深3.5 mm, 用微量注射器注入实验用药物. 术后缝合头皮.

1.2.2 应激性胃溃疡模型制备 动物头部手术结束后15 min, 参照徐叔云 *et al*[5]方法制模. 大鼠空腹48 h(不禁水), 四肢绑扎于铁网上, 浸入20-22℃水中4 h, 水深至大鼠剑突水平. 实验结束后断头, 分别取血、脑、垂体和肠, 并检测胃溃疡产生情况.

1.2.3 血浆、脑、垂体和肠肌间神经丛Ghrelin的提取 采血管中加入抗凝剂: 10 mL/L肝素(每mL全血10 μL)和抑肽酶(每mL全血500单位), 预冷、采集全血2 mL, 轻缓混匀迅速低温离心(4℃, 2 500 r/min 20 min), 取血浆-70℃保存. 将脑和垂体分别置于煮沸的生理盐水中煮5 min和3 min; 吸干、分离各脑区、称质量, 加1 mol/L盐酸1.0 mL制成匀浆, 室温下静置100 min. 然后加1 mol/L氢氧化钠1 mL中和, 离心(4 000 r/min)20 min, 取上清液待测. 显微镜下将回肠肌间神经丛分离、称质量, 放入含有1 mL浓度为0.1 mol/L的盐酸溶液匀浆器中进行匀浆, 经沸水煮沸10 min, 4℃离心(4 000 r/min)15 min, 取上清放入塑料管冰冻干燥, 浓缩后用PBS定容为0.5 mL待测液, -70℃保存.

1.2.4 胃溃疡的检测 于腹上部正中切口, 在胃幽门及贲门两处用线结扎, 以4 g/L甲醛注入胃内, 至胃膨胀充盈, 在结扎线的两端切断, 摘下全胃. 30 min后沿胃大弯剖开, 观察病变部位及病变性质. 按文献[5]方法, 解剖显微镜下(10×)计算溃疡指数. 即损伤面的长径小于1 mm记1分, 1-2 mm记2分, 2-3 mm记3分, 3-4 mm记4分, 大于4 mm的将其分割为若干段, 每段按上法计算. 全胃的得分总和即为溃疡指数.

将正常大鼠断头处死(8只), 无菌状态下剖腹取出回肠, 一部分用于免疫组化实验, 另一部分用于肌间神经丛神经元的培养研究.

1.2.5 肠肌间神经丛神经元的培养 用无菌含有抗生素(青链霉素和庆大霉素)的Krebs培养液冲洗回肠、切成1.0 cm小段. 用小镊子轻轻将浆膜层、纵行平滑肌层和肌间神经丛剥离, 放入含有消化酶(胶原蛋白酶、胰蛋白酶和牛血清白蛋白)的消化液内, 将组织剪碎, 并放入37℃孵育箱孵育30 min, 然后置于冰上, 离心(1 600 r/min) 10 min, 弃上清, 用MEDM培养液冲洗3次, 显微镜下筛选出肠肌间神经丛神经节. 将神经节放入含有神经细胞培养液Medium199(含100 mL/L胎牛血清, 50 μg/L 7 s神经生长因子, 青链霉素和庆大霉素)的培养盘内, 于CO_2培养箱37℃孵育. 每隔2 d换一次培养液.

1.2.6 荧光免疫组织化学双染 将回肠切段(1.5 cm), 显微镜下沿肠系膜剖开肠段, 黏膜向上平铺于装有Krebs培养液的实验盘内, 操作中始终保持通氧(50 mL/L CO_2, 950 mL/L O_2). 镜下轻轻将肠黏膜、黏膜下层和环形肌层剥离, 暴露肌间神经丛, 用40 g/L聚甲醛固定2 h, 0.01 mol PBS缓冲液漂洗3次, 每次5 min, 将标本贴于载玻片上. 切片在含有5 mL/L Triton X-100, 40 mL/L正常山羊血清的0.1 mol/L PBS溶液中孵育2 h, 将兔抗Ghrelin抗体(1∶400)和小鼠抗ChAT抗体(1∶200)或小鼠抗NOS抗体(1∶250)或小鼠抗Calb抗体(1∶200)混合液滴加到切片上, 将贴片置于湿盒内, 4℃孵育48 h. 之后将贴片用0.01 mol/L PBS漂洗3次, 每次5 min; 加入异硫氰酸荧光素(fluorescein iso thiocyanate, FITC)交联的羊抗兔IgG(1∶50)和Cy^3羊抗小鼠IgG(1∶500)混合液, 置于黑暗湿盒内, 4℃孵育2 h. 用0.01 mol/L PBS漂洗3次, 每次5 min. 最后用防淬灭荧光封片剂(Citifluor, 英国)封片, 激光共聚焦显微镜观察结果. 神经细胞培养7-9 d后, 镜下观察神经细胞, 待神经细胞生长成熟后, 用无菌PBS冲洗3次, 40 g/L多聚甲醛固定2 h后进行荧光双染, 步骤同上. 每次实验均设立空白对照, 同时用正常兔血清或小鼠血清代替本实验中用的一抗, 其他步骤同前, 作为阴性对照.

1.2.7 Ghrelin的放射免疫测定 配制Ghrelin标准液, 1∶8 000抗Ghrelin血清和^{125}I-Ghrelin液. 组织及血浆内Ghrelin的放免检测严格按说明书进行操作. 测定程序: 各管加^{125}I-Ghrelin 100 μL, 抗Ghrelin血清100 μL. 样品管加100 μL(下丘脑)或300 μL(其他组织或血), 标准管加Ghrelin 100 μL, 最后以磷酸缓冲液补足总反应体积为500 μL; 4℃冰箱内孵育24 h; 各管加1∶3羊抗兔血清100 μL, 继续孵育24 h, 离心(4 000 r/min)20 min, 弃上清液. 测沉淀物的每分钟脉冲数(counts per minute, cpm), 根据同批测定管的Ghrelin竞争抑制曲线, 求取每升血浆或每克组织中Ghrelin-IR的含量.

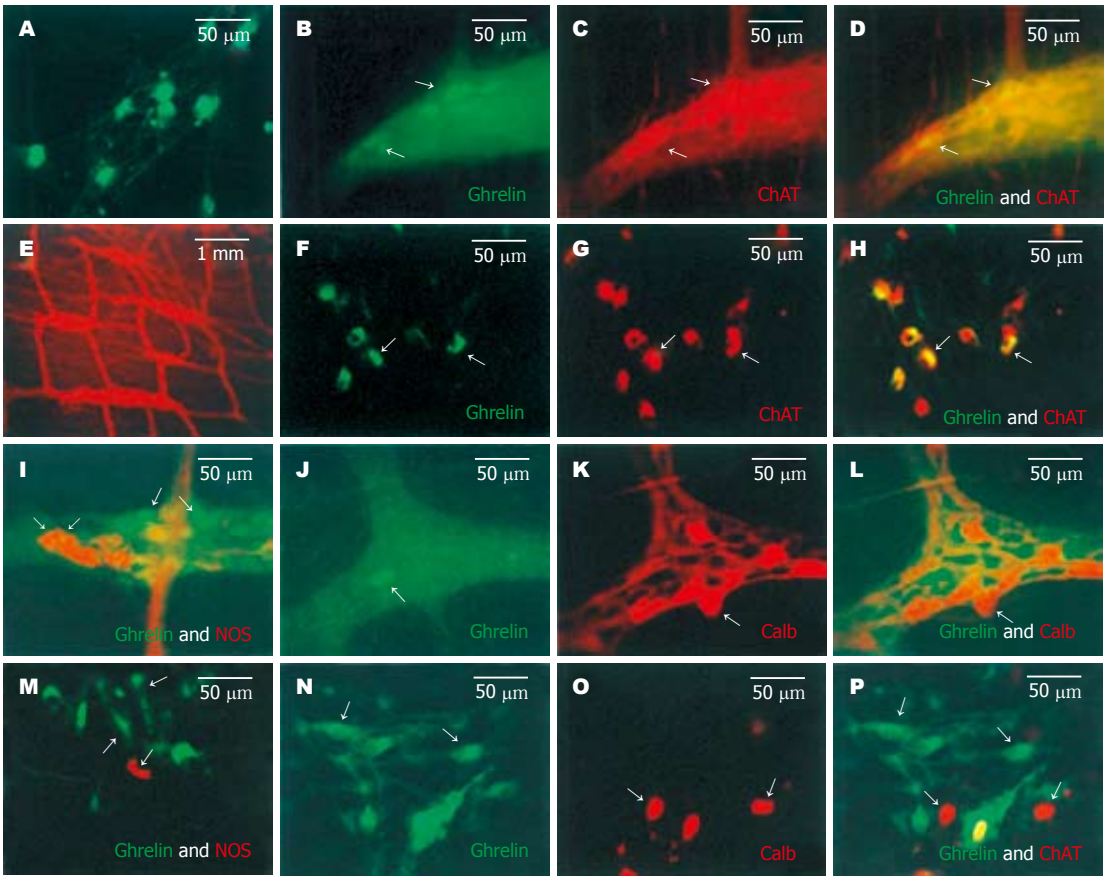


图 1 Ghrelin、ChAT、NOS和Calbindin在肠肌间神经丛神经元中的表达.

■应用要点
本研究将为临床上Ghrelin及其拟似剂对应激性胃溃疡的治疗提供有价值的实验依据.

统计学处理 数据均用mean±SD表示. 两样本均数的比较用t检验法, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肠肌间神经丛神经元Ghrelin-IR的表达 肠肌间神经丛神经元培养5-7 d后, 镜下可见神经元胞体有神经纤维向四周伸长; 当神经元培养7-9 d后, 镜下可见神经元以神经结为中心向四周生长, 胞质饱满, 神经纤维之间形成网络(图1A). 荧光双染结果显示, 正常大鼠肠肌间神经丛内可见有Ghrelin-IR神经元(图1B, J)、ChAT-IR神经元(图1C)和NOS-IR神经元(图1I)的表达. 且Ghrelin-IR与ChAT神经元共存(图1D), 但在nNOS神经元中未发现有Ghrelin的表达(图1I), 该结果进一步在原代培养的肌间神经节细胞得到认可. 镜下可见有大量Ghrelin-IR神经元(图1F), 胞体呈卵圆形或椭圆形, 胞核大而椭圆. Ghrelin-IR主要分布于胞质和突起. 与肠肌间神经丛组织染色结果相同, Ghrelin-IR与ChAT神经元共存(图1F-H), 但不与NOS神经元共存于同一神经元内(图1M). 采用肠内感觉神经元特异性表达的钙结合蛋白(Calbindin, Calb)抗血清与Ghrelin抗血清双染, 结果显示在肠肌间神经丛和原代培养的肠肌间神经节神经元内Ghrelin-IR与Calb没有共存现象(图1J-L, N-P), 提示Ghrelin样免疫阳性神经元不属于肠感觉神经元.

2.2 应激性胃溃疡大鼠Ghrelin-IR的表达 空腹48 h, 束缚后水浸4 h, 诱导大鼠应激性胃溃疡产生, 大鼠血浆中Ghrelin-IR含量显著低于正常对照组($P<0.05$); 下丘脑、延脑及垂体中Ghrelin-IR含量明显增加($P<0.01$), 但中脑和桥脑内Ghrelin-IR含量与正常对照组比较无显著改变; 肠肌间神经丛神经元Ghrelin-IR含量也明显高于正常对照组($P<0.05$, 表1).

2.3 Ghrelin对大鼠应激性胃溃疡的影响 镜下正常大鼠胃黏膜完整无损, 未见有出血点和溃疡形成. 大鼠经束缚加水浸4 h, 镜下见胃黏膜出血, 有大量溃疡形成. 但侧脑室注射不同剂量Ghrelin后(50-5 000 ng), 束缚加水浸, 大鼠应激性胃溃疡的产生显著轻于侧脑室注射生理盐水(NS)后束缚加水浸对照组, 且呈显著的量效依赖关系(50 ng Ghrelin, 溃疡指数: 79.3±10.7, $P>0.05$; 500 ng Ghrelin, 溃疡指数: 61.3±11.7,

■名词解释

1 Ghrelin: 1999年由日本科学家Koji-ma发现的一种由28个氨基酸组成的新的内源性脑肠肽, 是迄今发现的唯一生长激素释放激素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的天然配体. Ghrelin与其受体结合后除了能促进生长激素的释放外, 还能调节胃肠运动、能量代谢平衡, 并在人类多种疾病或病理状态中发挥重要的作用.

2 应激性溃疡: 应激性溃疡又称急性胃黏膜病变、急性出血性胃炎, 是指机体在应激状态下胃和十二指肠出现急性糜烂和溃疡.

表 1 应激性胃溃疡对大鼠血浆、肠肌间神经丛及脑内Ghrelin-IR含量的影响 (n = 10)

脑区	正常对照组 (pg/mg)	应激组 (pg/mg)
下丘脑	96.16 ± 18.12	153.23 ± 11.56[b]
中脑	23.88 ± 5.98	28.56 ± 4.74
桥脑	36.51 ± 12.87	41.25 ± 14.33
延髓	89.79 ± 16.51	144.36 ± 13.94[b]
垂体	108.31 ± 11.87	198.24 ± 23.29[b]
肠肌间神经丛	48.81 ± 12.75	86.24 ± 21.51[a]
血浆 (ng/L)	198.33 ± 29.57	141.71 ± 26.47[a]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 正常对照组.

P<0.05; 5 000 ng Ghrelin, 溃疡指数: 35.6±10.8, P<0.01). 经sc NOS抑制剂L-NAME(70 mg/kg) 15 min后, 侧脑室注入Ghrelin 5 μL(500 ng), 大鼠应激性胃溃疡的产生与侧脑室注射NS对照组和L-NAME+NS组相比均无显著差异(溃疡指数分别为82.0±12.0; 86.7±6.2; 84.1±11.4, P>0.05), 即Ghrelin对胃黏膜细胞保护作用消失.

3 讨论

急性胃黏膜损害(acute gastric mucosa lesion, AGML)是机体在严重创伤、烧伤、休克、感染以及内脏功能严重受损等多种危重情况下发生的, 以胃黏膜的糜烂、溃疡、出血为主要特征的急性应激性病变. 在严重烧伤、创伤和严重感染患者中, 其发生率可达80%-100%[6-7], 是创伤后最为常见的内脏并发症之一[8]; 一旦合并大出血, 处理困难, 死亡率高, 对这种危重患者有着潜在的致命性威胁. 鉴于AGML在临床上的重要性, 多年来, 国内外学者对其进行了大量的基础和临床研究, 迄今其发病机制尤其中枢机制尚未澄清. 应激性胃黏膜损害或胃溃疡是临床危重疾病的常见并发症, 易并发上消化道出血, 预后凶险. 应激是有害或过强刺激引起的机体非特异性反应, 多种形式的应激可引起体内一些激素水平的变化. 传统观点认为引起应激效应的机制是由于交感神经兴奋和下丘脑-垂体-肾上腺功能反应, 尤其是下丘脑释放促皮质激素释放因子(CRF)的中枢效应所致[9]. 近年来发现, 应激期间中枢的某些神经肽(如P物质、神经降压素、脑啡肽、胃动素和胃动素相关肽 Ghrelin)也参与了应激过程的调控[10-12]. 这些肽类实际上广泛分布于中枢神经和外周神经系统. Ghrelin主要由胃黏膜的A/X细胞产生[13], 中枢神经系统也发现有Ghrelin样免疫活性细胞分布[14], 固称之为脑-肠肽, 他具有调节胃酸分泌、胃肠运动和能量代谢等功能[15-17]. 本研究发现小肠肌间神经丛内有Ghrelin免疫反应阳性神经元的表达, 且Ghrelin免疫阳性细胞与ChAT共存, 提示Ghrelin主要分布在肠肌间神经丛兴奋性运动神经元, 该论点也被原代培养的肠肌间神经节神经元荧光双染实验得到了进一步的证实. 但Ghrelin样免疫反应神经元与肠感觉神经元特有的Calb在同一神经元内无共同表达, 提示Ghrelin样神经元不属于肠感觉性神经元.

目前较为一致的意见认为, 应激性溃疡病的发生、发展取决于有害刺激损伤机制和抗损伤机制的平衡状态, 而神经系统在其中又具有特殊重要的作用. 文献报道, 脑-肠肽参与应激性溃疡的形成和调节[18], 下丘脑和边缘系统的某些部位对胃肠功能起重要调节作用[19]. 本实验观察到, 大鼠空腹48 h后, 束缚后水浸4 h, 血浆中Ghrelin含量比正常对照组大鼠明显减少, 而下丘脑、延脑和垂体和肠肌间神经丛神经元中Ghrelin含量也明显增加, 由此表明中枢和外周神经系统中的Ghrelin均参与了应激性胃溃疡的形成. 应激时血浆内Ghrelin含量的降低可能与应激导致胃肠黏膜溃疡、A/X内分泌细胞损伤和功能降低有关. 下丘脑的分泌功能及其所分泌的各种肽类激素、神经多肽是下丘脑参与调节内脏活动、生理功能及垂体分泌的重要物质基础[20]. 本研究发现, 中枢内下丘脑Ghrelin的含量最高, 当应激性胃溃疡产生时, 下丘脑内Ghrelin的含量变化为最大, 由此证实了下丘脑作为中枢神经系统和内分泌系统的连接点在应激反应中具有举足轻重的作用[21].

Ghrelin作为一种重要的脑-肠肽和胃肠激素对胃肠运动和某些消化液的分泌具有重要的生理意义. 有文献报道, Ghrelin广泛分布于中枢神经系统. 中枢内Ghrelin参与胃肠功能的调控[22-24]. 本研究发现侧脑室内注射Ghrelin可明显减轻束缚加水浸诱导的胃溃疡的产生, 且呈明显的量效依赖关系, 提示中枢Ghrelin可能参与了胃黏膜细胞保护作用的调控, 但Ghrelin通过何种途径尚不清楚, 有待于进一步深入探讨. 有资料表明, 某些神经肽增加胃酸分泌而加强溃疡的形成. 但许多抗胃酸分泌的神经肽, 是通过某些化学因子或神经调制而抵抗胃肠溃疡的发生[25]. 一氧化氮(nitric oxide, NO)是新近发现的一种胃黏膜保护因子, 对酒精、缺血-再灌注等诱发的胃黏膜损伤具有保护作用[26]. 本实验发现, 先经皮

下注射一氧化氮合酶抑制剂L-NAME, 再给侧脑室注射Ghrelin, 则Ghrelin对胃黏膜的细胞保护作用消失, 但经皮下注射L-NAME, 侧脑室注射生理盐水, 胃溃疡的产生与对照组相比无显著差异. 该研究结果提示, Ghrelin对胃黏膜的细胞保护作用可能与NO的合成有关. 但Ghrelin如何调控NO的释放、在中枢通过何种途径起作用, 尚待于今后进一步探讨. 随着对Ghrelin结构和功能研究的深入, Ghrelin的生理作用机制及其可能的临床意义将逐渐被阐明.

4 参考文献

1 Ghizoni DM, Pavanati KC, Arent AM, Machado C, Faria MS, Pinto CM, Gasparotto OC, Goncalves S, Dafre AL. Alterations in glutathione levels of brain structures caused by acute restraint stress and by nitric oxide synthase inhibition but not by intraspecific agonistic interaction. *Behav Brain Res* 2006; 166: 71-77

2 Kiyatkin EA. Brain hyperthermia as physiological and pathological phenomena. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 50: 27-56

3 Wright RJ. Stress and atopic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 1301-1306

4 Sibilia V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; 144: 353-359

5 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1158-1162

6 Navab F, Steingrub J. Stress ulcer: is routine prophylaxis necessary? *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 708-712

7 Miller TA, Tornwall MS, Moody FG. Stress erosive gastritis. *Curr Probl Surg* 1991; 28: 453-509

8 Cook D, Heyland D, Griffith L, Cook R, Marshall J, Pagliarello J. Risk factors for clinically important upper gastrointestinal bleeding in patients requiring mechanical ventilation. Canadian Critical Care Trials Group. *Crit Care Med* 1999; 27: 2812-2817

9 Mastorakos G, Pavlatou M. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Horm Metab Res* 2005; 37: 577-584

10 徐珞, 陶尚敏. 神经降压素抗实验性胃溃疡作用初步探讨. 中国行为医学科学 2005; 14: 775-776

11 陈光忠, 罗炳德, 翟惠敏, 王红芹, 邹飞. 复合应激时兔血浆与胃十二指肠黏膜中胃动素含量变化及其机制. 中国危重病急救医学 2003; 15: 229-231

12 Suematsu M, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Matsumoto K, Kitagawa N, Akatsuka H, Hori Y, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adachi Y. Decreased circulating levels of active ghrelin are associated with increased oxidative stress in obese subjects. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 403-407

13 Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept* 2005; 126: 11-19

14 Guan JL, Wang QP, Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Matsuoka T, Funahashi H, Shioda S. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 2003; 24: 1921-1928

15 Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Niijima A, Meguid MM, Kasuga M. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 2003; 124: 1325-1336

16 Otukonyong EE, Dube MG, Torto R, Kalra PS, Kalra SP. Central leptin differentially modulates ultradian secretory patterns of insulin, leptin and ghrelin independent of effects on food intake and body weight. *Peptides* 2005; 26: 2559-2566

17 De Smet B, Depoortere I, Moechars D, Swennen Q, Moreaux B, Cryns K, Tack J, Buyse J, Coulie B, Peeters TL. Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 431-439

18 Funk D, Li Z, Le AD. Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: Relationship to the reinstatement of alcohol seeking. *Neuroscience* 2006; 138: 235-243

19 Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005; 85: 1131-1158

20 吴丽颖, 王福庄, 范明. 下丘脑中某些激素在低氧应激时的变化. 中国神经免疫学和神经病学杂志 2004; 11: 50-54

21 Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 1201-1213

22 Levin F, Edholm T, Ehrstrom M, Wallin B, Schmidt PT, Kirchgessner AM, Hilsted LM, Hellstrom PM, Naslund E. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept* 2005; 131: 59-65

23 Locatelli V, Bresciani E, Bulgarelli I, Rapetti D, Torsello A, Rindi G, Sibilia V, Netti C. Ghrelin in gastroenteric pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 843-848

24 Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Verbeke K, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic gastroparesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 847-853

25 Fujimoto K, Fujimoto H, Ohata M. Changes of serum calcitonin in stress load. *J Bone Miner Metab* 2000; 18: 22-26

26 张在兴, 祝学光, 才文彦, 黎家庆. 内源性一氧化氮对大鼠应激性胃黏膜损伤的保护作用. 北京医科大学学报 1997; 6: 510-513

■同行评价

本实验设计严密, 对于内源性的Gherlin分布, 外源性的Gherlin的体内作用及其机制通过相关的实验分组对照, 实验内容丰富, 科学结论较明确, 实验证据充足, 结果让人信服.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 758-762
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

自身抗原核点蛋白Sp100基因克隆和真核表达

王雪松, 李永哲, 刘国振

■背景资料
PBC是一种自身免疫介导的慢性胆汁淤积性肝病, 目前诊断依赖于临床表现、病理组织学检查和特异性自身抗体检测. 抗Sp100抗体是PBC的高特异性自身抗体, 对其疾病的诊断具有重要价值.

李永哲, 王雪松, 中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科, 北京市 100730
刘国振, 中国科学院北京华大基因研究中心 北京市 101300
王雪松, 女, 1979-06-23生, 吉林省吉林市人, 汉族, 2006年北华大学医学院毕业, 在读硕士, 主要从事自身免疫性疾病研究.
国家自然科学基金项目, No. 30471617
国家高技术研究发展计划(863计划)重大专项基金资助项目, No. 2002AARZ2011
通讯作者: 李永哲, 100730, 北京市, 中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416
收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-08

Gene cloning and fusion expression of human autoantigen Sp100 in yeasts

Xue-Song Wang, Yong-Zhe Li, Guo-Zhen Liu

Yong-Zhe Li, Xue-Song Wang, Department of Laboratory, Hospital of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China
Guo-Zhen Liu, Beijing Huada Genomics Research Center, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471617, and the Key Special Foundation of National 863 Project, No. 2002AARZ2011
Correspondence to: Yong-Zhe Li, Department of Laboratory, Hospital of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
Received: 2006-01-11 Accepted: 2006-02-08

Abstract
AIM: To clone and construct the plasmid containing human autoantigene Sp100 gene, and then to identify the immunoreactivity of the purified recombinant protein.

METHODS: The Sp100 gene was amplified from human liver cDNA library, and then was cloned into PEGH vector to induce the Sp100 expression. The obtained products were identified and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot.

RESULTS: The sequence of Sp100 autoantigene gene was confirmed to be the same as the sequence reported in GenBank. The fusion proteins were found at 53-, 55-, 52-, 37-, 42-, and 47-ku strip on SDS-PAGE gel. Western blot analysis showed that the fusion protein with 55, 52, 42 and 47 ku had the same immunoreactivity as human Sp100 autoantigene.

CONCLUSION: Human plasmid containing Sp100 gene is successfully cloned and expressed in yeast Y258.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Nuclear dots Sp100 protein; Autoantigen; Cloning

Wang XS, Li YZ, Liu GZ. Gene cloning and fusion expression of human autoantigen Sp100 in yeasts. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):758-762

摘要
目的: 克隆人核点蛋白自身抗原Sp100基因, 构建重组表达质粒, 获得具有免疫学活性的纯化重组蛋白.

方法: 从人类肝脏cDNA文库中扩增出Sp100的基因片段, 克隆至PEGH表达载体进行诱导表达, 并对表达产物进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹法(Western blot)鉴定.

结果: 经重组质粒测序结果证实, Sp100目的基因已正确插入真核表达载体中, 基因序列正确, 符合表达框架; SDS-PAGE检测表达产物分别在53 ku, 55 ku, 52 ku, 37 ku, 42 ku, 47 ku处有一明显的蛋白表达条带, Western blot分析表明重组蛋白2, 3, 5, 6具有人Sp100抗原反应性.

结论: 本研究成功克隆人核点蛋白自身抗原Sp100基因, 并将其在酵母菌中成功表达.

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 核点蛋白Sp100基因; 自身抗原; 克隆

王雪松, 李永哲, 刘国振. 自身抗原核点蛋白Sp100基因克隆和真核表达. 世界华人消化杂志 2006;14(8):758-762
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/758.asp

0 引言
原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,

PBC)是一种慢性渐进性胆汁淤积性肝脏疾病, 组织学是以破坏小胆管为其特征的非化脓性炎症, 并以血清中出现特征性自身抗体为其主要标志. 抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody, AMA)是PBC高敏感性血清学指标[1], 但大约有50% PBC患者血清中有抗核抗体(antinuclear antibody, ANA), 尤其是在抗线粒体抗体呈阴性时可作为其诊断的另一重要标志[2]. 抗核抗体中表现为核点型荧光染色的被称为抗核点抗体[3], 主要包括Sp100(多核点型)和p80(少核点型)两种自身抗体. 其中抗Sp100抗体是PBC的特异性自身抗体, 该抗体在PBC中特异性约为97%, 其靶抗原Sp100为可溶性酸性磷酸化核蛋白, 大约20%-30% PBC患者血清中含有抗Sp100核蛋白[4]. 目前对PBC的诊断常基于免疫荧光(大鼠肝肾冰冻切片)或酶联免疫吸附实验(以牛或猪心线粒体提取物为抗原)的检测结果, 但很难对其分型, 并且费用比较昂贵. 我们首次应用基因工程技术在真核表达系统中成功克隆、表达了Sp100重组蛋白, 为进一步建立新的PBC自身抗体检测方法奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人类肝脏cDNA文库; 表达型质粒PEGH及其纯化系列; 酵母菌Y258; IPTG; 聚合酶链反应(polymerase chain reactin, PCR)引物合成均由中国科学院北京华大基因研究中心提供. Taq DNA聚合酶、限制性内切酶、1 kb DNA标志物、低蛋白质分子质量标准(TaKaRa生物技术有限公司). HRP-羊抗人IgG(华美生物技术公司). 人自身免疫抗原标准血清由德国IMTEC公司Werner SchOBler博士惠赠, 其余试剂为进口、国产分析纯或优级纯. PE2400型DNA扩增仪(美国ABI公司), Trans Blot SD半干式电转印仪(美国Bio-Rad公司).

1.2 方法 我们经过软件分析Sp100基因的抗原决定簇位置, 将Sp100基因分为6个片段. 以人肝cDNA文库为模板, 按GenBank中Sp100的cDNA序列设计引物(引物中已包含*Xba* Ⅰ, *Hin*d Ⅲ识别位点和保护碱基). 片段1上游引物5'gcatcaccatcaccatcacggtggtggtatggcaggtgggggcggcg3', 下游引物5'gcatcaccatcaccatcacggtggtggtatggcaggtgggggcggcg3'; 片段2上游引物5'aggcagatcgtcagtcagtcacgatgaactaatcttctttacctgaccctc3', 下游引物5'aggcagatcgtcagtcagtcacgatgaactaatcttctttacctgaccctc3'; 片段3上游引物5'gcatcaccatcaccatcacggtggtggtcaaaaggctgagccaacagag3', 下游引物5'aggcagatcgtcagtcagtcacgatgaatcttcttagggatgagctgcag3'; 片段4上游引物5'gcatcaccatcaccatcacggtggtggtcaaaaggctgagccaacagag3', 下游引物5'aggcagatcgtcagtcagtcacgatgaaggatccttcagagtcctcac3'; 片段5上游引物5'gcatcaccatcaccatcacggtggtggtggatccactgacgttgatgag3', 下游引物5'aggcagatcgtcagtcagtcacgatgaatcttcttagggatgagctgcag3'; 片段6上游引物5'gcatcaccatcaccatcacggtggtggtataaaaaaggaaaagccattttc3', 下游引物5'aggcagatcgtcagtcagtcacgatgaactaatcttctttacctgaccctc3'.

按下列条件进行PCR扩增: 94℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环. 最后于72℃延伸10 min. 取10 μL进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果. 使用乙醇沉淀法将PCR产物进行纯化. 将纯化后的PCR产物与含PEGH GST的融合表达载体一同转入酵母菌Y258中, 涂板, 挑取克隆, 分别提取各片段克隆质粒, 经PCR反应筛选阳性克隆. 同时将筛选出的阳性克隆片段的质粒转化感受态大肠杆菌DH5α. 经提取该质粒及酶切鉴定, 进行测序. 由北京华大基因研究中心完成测序. 将转化好的阳性克隆保存菌液均匀涂布于含氨苄的SC-Ura/raffinose平板上, 30℃培养得到2 mm左右的单克隆菌落. 取一个单克隆至10 mL SC-ura/raffinose液体培养基, 30℃振荡培养36 h, 次日下午吸取10 mL菌液加至150 mL SC-ura/raffinose液体培养基, 30℃振荡培养36 h, 然后将150 mL菌液加至1 L SC-ura/raffinose液体培养基, 30℃振荡培养. 次日测*A*值为0.6-0.8时, 以0.4 mmol/L β-D硫代半乳糖苷于30℃诱导12-16 h. 收集菌体, 用锆珠及裂解液进行剧烈震荡裂解, 离心收集上清液, 进行亲和纯化. 融合蛋白含1个GST的标签, 故表达产物可用GST beads进行纯化. 将上清液与GST beads混合, 4℃翻转3-4 h. 先用洗液Ⅰ(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 1 g/L TritonX-100)悬浮, 洗5次, 弃上清. 再用洗液Ⅱ(50 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, 100 mL/L Glycerol)悬浮, 洗3次, 弃上清. 最后加入洗脱液1 mL, 用盖子封严, 短暂震荡将beads重悬, 4℃翻转摇过夜. 次日, 2 000 r/m离心2 min, 将上清移至新的1.5 mL管中, 即为纯化后的蛋白液体. 将纯化后的蛋白进行SDS-PAGE, 经2.5 g/L考马斯亮蓝室温染色2 h, 脱色过夜后观察. 取纯化后的蛋白液15 μL与2×上样缓冲液5 μL混

■**研发前沿**
对该抗体及其靶抗原的研究已成为国内外研究热点.

■**创新盘点**
本研究在国内首次应用基因工程技术在真核表达系统中成功克隆和表达了Sp100基因, 并确定其抗原决定簇位于Sp100蛋白的羧基末端.

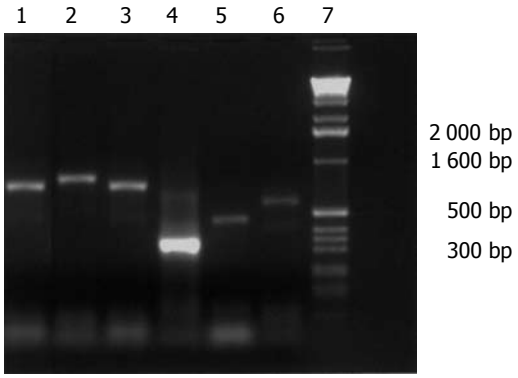


图 1 Sp100片段扩增结果. 1: 片段1, 723 bp; 2: 片段2, 786 bp; 3: 片段3, 705 bp; 4: 片段4, 285 bp; 5: 片段5, 426 bp; 6: 片段6, 558 bp; 7: DNA相对分子量标准1 kb plus Ladder Marker(100, 200, 300, 400, 500, 1 600, 2 000, 3 000, 5 000 bp).

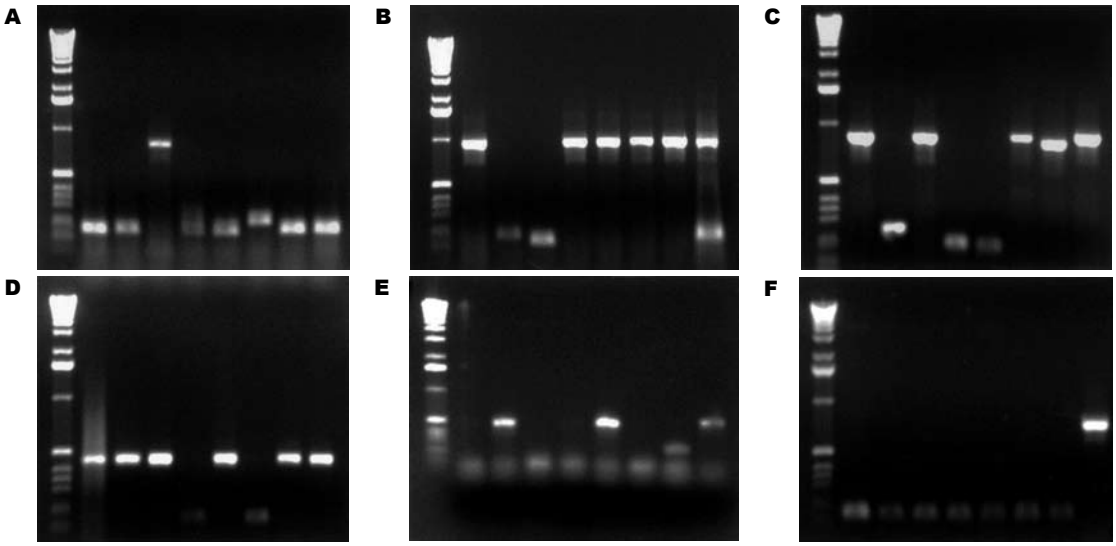


图 2 PCR方法筛选阳性克隆. A: 1个; B: 6个; C: 5个; D: 6个; E: 3个; F: 1个. DNA分子质量标准与图1(7)相同.

合后上样, 同时取10 μL对照上样, 行SDS-PAGE电泳, 考马斯亮蓝R250染色. 利用半干电转移将SDS-PAGE上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉溶液封闭1 h后, 加入一抗自身免疫抗原的标准血清振摇1 h, 经缓冲液冲洗膜后, 加二抗1∶5 000稀释的HRP-羊抗人IgG轻摇1 h, 缓冲液洗膜后, 在DAB, H_2O_2下显色.

2 结果

从人类肝脏cDNA文库中扩增出6个包含Sp100基因的DNA片段(图1). 出现清晰的特异性扩增条带. 分别为723 bp, 786 bp, 705 bp, 285 bp, 426 bp, 558 bp大小的片段. 将转化的克隆以PCR的方法进行筛选, 我们选用通用引物PGST2和PEGH3进行扩增, 结果转化成功的阳性克隆可以在相应大小处见到明显扩增条带, 而其他则为空载体(图2).

2.1 *阳性克隆测序* 将筛选出的阳性克隆质粒转化感受态菌大肠杆菌DH5α, 涂板, 提取质粒后进行测序, 结果如下. 与GenBank中Sp100基因序列(编号: M 60618)比较, 克隆的基因1-6核苷酸测序结果同源性分别为: 97.68%; 100%; 99.99%; 99.35%; 96.52%; 99.99%. Sp100基因测序结果与GenBank中Sp100基因序列一致, 而且读码框正确.

2.2 *融合蛋白SDS-PAGE和Western blot分析* 用2种方法对融合蛋白进行分析. 结果显示, PEGH-Sp100重组质粒诱导表达了6个相应大小的蛋白条带, 其表达的蛋白条带仅能被抗Sp100标准血清特异性识别(图3-4).

3 讨论

自身免疫性肝病是一组以出现自身免疫抗体为特征, 在体内免疫功能异常的基础上发生的炎症性肝胆疾病. 过去认为自身免疫性肝病比较少见, 近年来发现这类疾病的患者人数逐渐增多[5-6], 且其严重的危害程度越来越受到医学界的关注. 由于不同自身免疫肝病具有不同自身免疫抗体谱, 因此自身免疫抗体的检测对自身免疫病的研究、诊断和治疗具有重要意义. 研

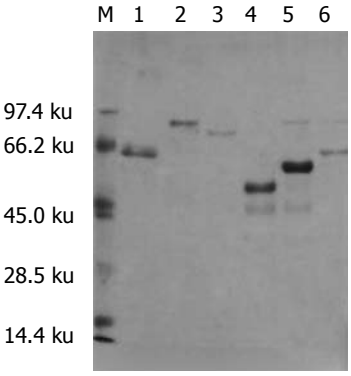


图3 PEGH-Sp100的表达. M: 低分子量蛋白质标准(97.4, 66.2, 45.0, 28.5, 14.4 ku); 1: 53 ku; 2: 55 ku; 3: 52 ku; 4: 37 ku; 5: 42 ku; 6: 47 ku.

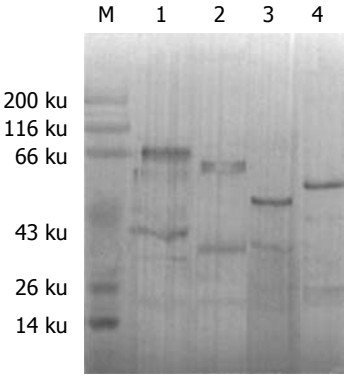


图4 PEHG-Sp100表达产物的Western blot鉴定. M: 蛋白质分子质量标准; 1: 蛋白2; 2: 蛋白3; 3: 蛋白5; 4: 蛋白6.

■应用要点

本文为今后合成短肽及建立新的PBC自身抗体检测方法奠定了基础.

究已证明, 高滴度AMA是PBC患者的重要血清学标志[1], 抗线粒体抗体M2亚型抗体在PBC中敏感性可达90%以上[7-9]. 但临床应用研究发现, 此项指标对PBC的诊断仍存在局限性, 约有10%以上的PBC患者AMA/AMA-M2阴性[10], 其也可出现于某些结缔组织病(尤其是原发性干燥综合征合并肝脏损伤患者)、感染性疾病患者及某些无肝损伤患者中. AMA-M2可能是诊断PBC高敏感性指标而非特异性指标. 临床上PBC与病毒性肝炎重叠综合征、原发性干燥综合征肝损伤、自身免疫性胆管炎等肝脏疾病的鉴别诊断仍十分困难[11].

国外对PBC相关自身抗体谱靶抗原性质、临床诊断应用价值与疾病临床表现及疾病活动性的关系等方面研究进展迅速[12-13]. 国内有很多学者正在进行有关该疾病的靶抗原的研究工作[20]. PBC新特异性自身抗体研究主要依靠间接免疫荧光检测, 在抗核抗体中表现为核点型荧光染色型的抗核点蛋白抗体, 如抗Sp100抗体, 该抗体在PBC中特异性约为97%以上[12], 极少出现在其他自身免疫性疾病中. 另一种抗核抗体为抗核膜抗体, 主要包括抗gp210[14-16]、p62[17-19]、LBR[17]和核板层素抗体[18]等. 目前, 国内只有少数医院能开展间接免疫荧光法测定抗核点抗体, 但其不能对抗核点抗体进行分型, 诊断PBC的特异性较差. 由于PBC患者本身的肝脏组织病理, 生物化学指标和临床表现均缺少特异性, 所以血清中抗核点蛋白Sp100的检测, 特别是在这种胆汁淤积性疾病的临床、生物化学、病理表现以及胆管损伤的证据尚未出现之时, 是诊断抗线粒体抗体阴性PBC最为重要的证据.

Sp100为一种可溶性酸性磷酸化核蛋白, 特异性的位于细胞核[21-22]. 大约20%-30% PBC患者血清中含有抗Sp100核蛋白[23]. Sp100基因开放阅读框架为1 443 bp, 编码481个氨基酸, 分子量为53 ku的蛋白, 抗原决定簇主要位于羧基末端. 本研究在国内首次应用基因工程技术在真核表达系统中成功克隆、表达了Sp100基因. 并将Sp100基因分为6个片段, 采用PCR的方法从人肝脏cDNA文库中获得了扩增片段, 选用GAL-1启动翻译起始序列的载体PEGH构建了表达载体PEGH-Sp100, 并转化酵母菌Y258, 获得其克隆. 所克隆的6个Sp100片段核苷酸序列与已报道的序列比较, 同源性分别高达97.68%; 100%; 99.99%; 99.35%; 96.52%; 99.99%, 说明Sp100基因序列与克隆的基因序列完全相同. SDS-PAGE结果表明, 在电泳上可见到清晰的6条蛋白条带, 大小与预期设计相符, 且在酵母菌中获得了高效表达. Western blot实验结果证实, 表达蛋白2, 3, 5, 6能特异性的被抗Sp100抗体标准血清识别, 而蛋白1, 4与其他自身免疫性疾病患者、健康捐献者血清无非特异性的交叉反应, 说明Sp100蛋白的抗原决定簇主要位于羧基末端, 证明与文献报道的抗原决定簇位置相同[24-26], 从而为合成短肽及实验研究奠定了基础.

随着检测手段的不断提高, 越来越多的新的自身抗原被发现, 自身抗体检测的重要性也随之日益体现. 伴随免疫学及分子生物学技术的应用, 以重组蛋白或多肽作为抗原, 应用免疫印迹法或ELISA法检测PBC各种新特异抗体, 在临床上具有广阔的应用前景; 并可利用重组蛋白研究PBC患者的发病机制和构建动物模型; 还可根据不同临床需要, 结合先进精确的蛋白质芯片技术, 为开发多种自身抗原联合检测相应自身抗体试剂盒奠定了基础.

4 参考文献

1 Omagari K, Hazama H, Kohno S. Enzyme inhibition assay for pyruvate dehydrogenase complex: clinical utility for the diagnosis of primary biliary cirrhosis.

■同行评价
本研究属国内首次报道应用基因工程技术成功克隆和表达了Sp100基因，具有创新性，为今后合成短肽奠定了基础.

World J Gastroenterol 2005; 11: 6735-6739

2 Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, Rodrigo L, Linares A, Fuentes D, Bianchi FB. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 431-437

3 Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesierska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 298-310

4 Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 211-217

5 Feld JJ, Heathcote EJ. Epidemiology of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1118-1128

6 Delgado J, Sperber AD, Novack V, Delgado B, Edelman L, Gaspar N, Krugliak P, Odes S, Jotkowitz AB, Faszczyk M, Fich A. The epidemiology of primary biliary cirrhosis in southern Israel. *Isr Med Assoc J* 2005; 7: 717-721

7 Leuschner U. Primary biliary cirrhosis--presentation and diagnosis. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 741-758

8 Flisiak R, Pelszynska M, Prokopowicz D, Rogalska M, Grygoruk U. High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5706-5709

9 Koizumi H, Onozuka Y, Shibata M, Sano K, Ooshima Y, Morizane T, Ueno Y. Positive rate of anti-mitochondrial antibody in Japanese corporate workers. *Rinsho Byori* 2000; 48: 966-970

10 Sakauchi F, Mori M, Zeniya M, Toda G. Antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis in Japan: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. *J Epidemiol* 2006; 16: 30-34

11 Beuers U, Rust C. Overlap syndromes. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 311-320

12 Wichmann I, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Alvarez A, Walter K, Franco E, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. Clinical significance of anti-multiple nuclear dots/Sp100 autoantibodies. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 996-999

13 Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Sakamoto N, Matsushita S, Tanaka A, Worman HJ, Gershwin ME, Harada M. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1915-1925

14 Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsuhashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006; 26: 138-145

15 Nakamura M. The significance of anti-nuclear envelope (gp210) antibody in primary biliary cirrhosis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2005; 28: 117-122

16 Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsuhashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; 42: 386-392

17 Enarson P, Rattner JB, Ou Y, Miyachi K, Horigome T, Fritzler MJ. Autoantigens of the nuclear pore complex. *J Mol Med* 2004; 82: 423-433

18 Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T, Shibata M, Onozuka Y, Ueno Y, Hashimoto E, Hayashi N, Shibuya A, Amaki S, Miyakawa H. Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study. *J Autoimmun* 2003; 20: 247-254

19 Nesher G, Margalit R, Ashkenazi YJ. Anti-nuclear envelope antibodies: Clinical associations. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 313-320

20 李永哲, 刘镭, 孙庆国, 曾常茜, 赵振国, 佟大伟, 张蜀澜, 高扬, 于孟学, 朱立平. 核包膜蛋白gp210、p62和LBR自身抗原基因克隆表达及其抗体诊断原发性胆汁性肝硬化的价值初探. 中华检验医学杂志 2005; 28: 1120-1125

21 Muratori P, Muratori L, Cassani F, Terlizzi P, Lenzi M, Rodrigo L, Bianchi FB. Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-Sp100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 172-175

22 Czaja AJ, Muratori P, Muratori L, Carpenter HA, Bianchi FB. Diagnostic and therapeutic implications of bile duct injury in autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2004; 24: 322-329

23 Janka C, Selmi C, Gershwin ME, Will H, Sternsdorf T. Small ubiquitin-related modifiers: A novel and independent class of autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 609-616

24 Bluthner M, Schafer C, Schneider C, Bautz FA. Identification of major linear epitopes on the Sp100 nuclear PBC autoantigen by the gene-fragment phage-display technology. *Autoimmunity* 1999; 29: 33-42

25 Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Will H. Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 1123-1130

26 Weichenhan D, Kunze B, Zacker S, Traut W, Winking H. Structure and expression of the murine Sp100 nuclear dot gene. *Genomics* 1997; 43: 298-306

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 763-766
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

胃癌组织 Axin 蛋白的表达与侵袭转移的相关性

郑亚民, 李 非, 董承伟, 伍晓汀

郑亚民, 李非, 首都医科大学宣武医院普外科 北京市 100053
董承伟, 山东潍坊人民医院普外科 山东省潍坊市 261041
伍晓汀, 四川大学华西医院普外科 四川省成都市 610041
郑亚民，男，1971-10-03生，河北省任丘市人，汉族，主治医师，2005年四川大学华西临床医学院普外专业硕士，现在读首都医科大学宣武医院普外专业博士.
通讯作者: 李非，100053，北京市宣武区长椿街45号，首都医科大学宣武医院普外科. gsurger@tom.com
电话: 010-63013355-2705 传真：010-83154745
收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

Expression of Axin protein correlates with genesis and metastasis of gastric carcinoma

Ya-Min Zheng, Fei Li, Cheng-Wei Dong, Xiao-Ting Wu

Ya-Min Zheng, Fei Li, Department of General Surgery, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China
Cheng-Wei Dong, Department of General Surgery, Weifang People's Hospital, Weifang 261041, Shandong Province, China
Xiao-Ting Wu, Department of General Surgery, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Dr. Fei Li, Department of General Surgery, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, 45 Changchun Street, Xuanwu District, Beijing 100053, China. gsurger@tom.com
Received: 2006-01-03 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To investigate the relationship between Axin protein expression and genesis and metastasis of gastric carcinoma.

METHODS: A total of 46 patients with gastric carcinoma underwent surgical resection were included in this study. The expression of Axin protein was detected by immunohistochemical techniques (SABC) in paraffin-embedded samples prepared from gastric carcinoma tissues and normal stomach tissues far from the tumor. In addition, the positive rate of Axin expression was calculated and its corrrelation with the pathological characteristics of gastric carcinoma was analyzed.

RESULTS: In normal stomach tissues, Axin protein expression was strongly positive and intensified in basal cells. Axin was also expressed in tissues from gastric carcinoma and normal stomach mucosa far from the tumor with a positive rate of 62.0% and 91.3%, respectively. There was a significant difference between them ($P < 0.01$). Axin protein expression was significantly correlated with clinical TNM classification (TNM Ⅰ, Ⅱ vs Ⅲ, Ⅳ: 78.6% *vs* 56.3%, $P = 0.035$) and lymphatic metastasis (without vs with: 85.7% *vs* 53.1%, $P = 0.034$). The expression of Axin protein was not markedly correlated with the age and gender of patients, tumor size, biological features and serosa invasion ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Axin protein is down-regulated in gastric carcinoma, which correlates with the genesis and metastasis of the disease.

Key Words: Axin protein; Gastric carcinoma; Carcinogenesis; Metastasis

Zheng YM, Li F, Dong CW, Wu XT. Expression of Axin protein correlates with genesis and metastasis of gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):763-766

摘要

目的: 探讨胃癌组织Axin蛋白的表达与侵袭转移的相关性.

方法: 胃癌患者46例, 均行胃癌根治切除手术. 采集胃癌癌组织及远癌正常胃组织标本, 制备石蜡切片, 采用免疫组化(SABC)法检测Axin蛋白的表达, 研究其表达和分布特点与临床病理间的关系.

结果: 正常胃组织Axin蛋白在基底部细胞表达强, 表面成熟细胞中表达弱; 胃癌组织、远癌正常胃组织中均有Axin蛋白表达, 其阳性表达率分别为62.0%和91.3%, 差异有统计学意义(P<0.01); Axin蛋白的表达与胃癌临床病理分期(TNM Ⅰ,Ⅱ vs Ⅲ,Ⅳ: 78.6% *vs* 56.3%, P=0.035)、有无淋巴转移有关(无*vs*有: 85.7%

■背景资料
Wnt信号传导途径在调控细胞增殖、分化、运动性以及形态学等方面起着重要的作用. Axin蛋白是Wnt信号途径的重要的负向调控因子, Axin基因被认为是抑癌基因. 目前研究显示多种肿瘤的发生和某些肿瘤的浸润转移与Axin基因异常有密切关系, 但对Axin蛋白表达异常与肿瘤发生、发展的关系研究较少.

■创新盘点
研究发现了正常胃组织中, Axin蛋白在其基底部细胞表达强, 表面成熟细胞中表达较弱的特点, 提出Axin蛋白在具有较强增生繁殖能力的专能干细胞中含量增加, 并系统研究了Axin蛋白的表达与胃癌临床特征的关系.

vs 53.1%, P = 0.034), 与胃癌患者性别、年龄、肿瘤大小、生物学特征和是否侵及浆膜无关(P>0.05).

结论: Axin蛋白表达减弱与胃癌的发生以及肿瘤的临床进展和淋巴转移相关.

关键词: Axin蛋白; 胃癌; 肿瘤发生; 肿瘤转移

郑亚民, 李非, 董承伟, 伍晓汀. 胃癌组织Axin蛋白的表达与侵袭转移的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(8):763-766
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/763.asp

0 引言

胃癌严重危害人类健康, 发病和侵袭转移机制的研究是当前的热点. 既往分子生物学研究发现, Wnt信号传导途径在调控细胞增殖、分化、运动性以及形态学等方面起着重要的作用[1-2]. Axin蛋白是Wnt信号途径的一个重要的负向调控因子[3-4], Axin基因被认为是抑癌基因. 现在发现多种肿瘤的发生和某些肿瘤的浸润转移与Axin基因异常有密切关系[5-9], 但对Axin蛋白表达异常与肿瘤发生、发展的关系研究较少, 我们探讨Axin蛋白的表达与胃癌发生及侵袭转移间的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-07/2005-03胃癌患者46例; 男性33例, 女性13例, 年龄30-75岁, 平均57.25±10.87岁. 全部施行胃癌根治切除术, 达到R0、D≥N; 获得术前胃镜或术中、术后病理证实. 术前未接受放化疗及生物治疗. 胃癌病理分期, Ⅰ期10例, Ⅱ期4例, Ⅲ期12例, Ⅳ期20例; 中、高分化腺癌19例, 低分化腺癌27例; 有淋巴转移者32例, 无淋巴转移者14例; 肿瘤直径大于5 cm患者16例, 小于5 cm患者30例; 侵及浆膜者33例, 未侵及浆膜者13例. 试剂: Axin(H-98)多克隆抗体, Santa Cruz Biotechnology, Inc USA; 山羊抗兔SABC免疫组化试剂盒(SA1022), 武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法 胃癌患者手术切除标本, 肉眼下观察记录肿瘤大小、性质、浸润深度. 立即切取直径0.4-1.5 cm大小(视肿块大小而定)胃癌组织, 在距离肿瘤6 cm以上远离癌肿处正常区切取1 cm直径大小正常胃组织(以上均经HE染色病理检查证实), 以40 g/L甲醛固定36-48 h, 常规石蜡包埋, 4 μm厚连续切片. 其余标本送常规病理检查. 采用免疫组化(SABC)方法检测胃癌组织、远离癌肿正常胃组织中Axin蛋白的表达. 两位专业病理医师双盲评估Axin表达平均值, 染色评估时隐藏临床生物学特性, 评估相差2分以上则重新进行评估. 依据Nakajima *et al*[9]的判断标准修订了组织表达阳性和阴性的标准. 根据细胞染色强度和染色细胞所占面积积分之和进行判定: (1)色强度积分: 未染色为0分; 轻度染色为1分; 中度染色为2分; 强染色为3分. (2) 染色面积积分: 无细胞染色为0分, 细胞染色<25%为1分; 细胞染色25%-50%为2分; 细胞染色>50%为3分. 若两项积分之和≥2为表达阳性; <2为表达阴性. 临床病理分期采用2003年UICC和AJCC制定的胃癌TNM分期标准.

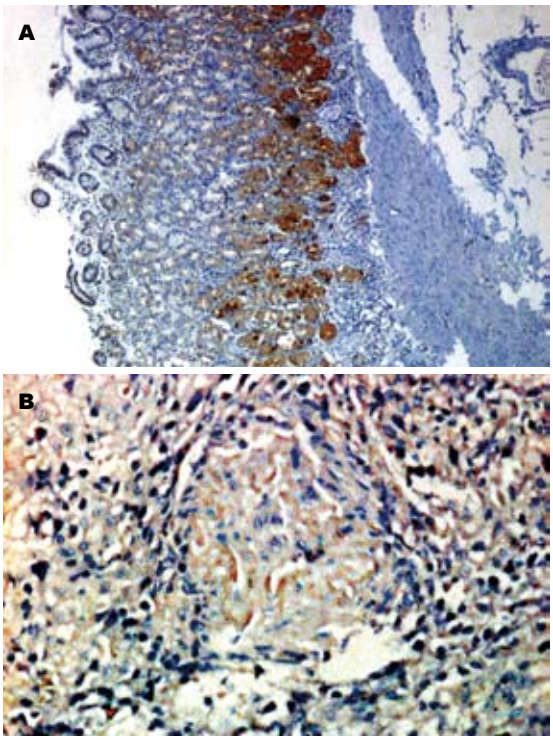


图1 Axin蛋白在胃黏膜中的表达. A: 正常; B: 胃癌.

统计学处理 采用成组对照设计, 借助SPSS12.0统计软件, 两组计数资料采用卡方检验分析. 所有假设检验用双侧检验, 检验水准α=0.05, 以P<0.05认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Axin蛋白在细胞中的表达特征 Axin蛋白染色成棕黄色, 主要分布在细胞质中, 分布比较均匀. 远癌正常组织与胃癌组织作比较发现, Axin蛋白在胃黏膜基底部位分裂增生能力较强的细胞中的表达较强, 在黏膜表面的细胞中表达较弱(图1A), 胃癌组织中Axin蛋白的表达则明显减弱(图1B). Axin蛋白在胃癌组织(62.0%)和正

表 1 Axin蛋白表达与胃癌临床病理特征间的关系

病理特征		*n*	Axin蛋白阳性 *n*(%)	*P*值
性别	男	33	18(54.5)	0.343
	女	13	11(84.6)	
年龄	<50岁	36	22(61.1)	0.885
	≥50岁	10	7(70.0)	
有无淋巴转移	无	14	12(85.7)	0.034
	有	32	17(53.1)	
肿瘤TNM分期	Ⅰ Ⅱ	14	11(78.6)	0.035
	Ⅲ Ⅳ	32	18(56.3)	
肿瘤直径	< 5 cm	30	18(60.0)	0.558
	≥5 cm	16	11(68.8)	
分化	中、高	19	12(63.2)	0.989
	低	27	17(63.0)	
侵及浆膜	否	13	10(76.9)	0.376
	是	33	19(57.6)	

常胃组织中(91.3%)的表达率差异有统计学意义(P<0.01). Axin蛋白表达的减弱与胃癌的发生有相关性.

2.2 Axin蛋白的表达与胃癌临床病理特征间的关系 进一步亚组分析Axin蛋白表达与胃癌临床TNM分期、有无淋巴转移有一定的相关性(P<0.05), 与患者的性别、年龄、肿瘤大小、生物学特征和是否侵及浆膜无关(P>0.05, 表1).

3 讨论

肿瘤是机体在各种致瘤因素作用下, 激活癌基因和/或灭活抑癌基因, 在基因水平上失去对细胞生长的正常调控而导致的异常增生. Axin基因是在研究小鼠融合基因时发现的一个抑癌基因[1], 人类位于染色体16p13.3, 编码的Axin蛋白是由832或956个氨基酸残基组成的支架蛋白, 与axil[10]和conductin[11]是同源蛋白, 具有多种蛋白结合位点, 参与体内多条信号传导途径的调控过程, 调节细胞的增殖和生长. Axin蛋白可以在RanGTP和输出因子CRM1的协同帮助下进行细胞内核浆穿梭, 将细胞核内的β-catenin携带到细胞质中, 降低细胞核内β-catenin的浓度[12]; Axin蛋白与APC、GSK-3 β结合成复合体后加速β-catenin的降解, 从而对Wnt信号传导途径起负向调控作用[13]; Axin蛋白与MEKK1结合并激活其下游因子MEKK4与MEKK7, 促进JNK信号传导途径的活化[14]; 激活JNK信号传导系统和降低β-catenin细胞内含量可以诱导多种细胞的凋亡[14]. Axin蛋白还可以通过HIPK2激活抑癌基因p53的蛋白表达[15]. 我们研究发现, Axin蛋白在正常胃黏膜基底部分裂增生能力强的细胞中的表达明显高于黏膜表面的成熟细胞. 成熟并正常生长的机体细胞如正常结肠上皮细胞中, Wnt信号传导途径处于非活化状态, 增殖分化活动相对静止[16]; 体内具有分裂增生能力的干细胞如胃黏膜基底细胞、骨髓造血细胞等, Wnt信号传导途径活化, 使干细胞保持未分化状态并进一步增殖生长[17], 对细胞增殖和分化过程起着重要的作用. 作为Wnt信号传导途径中的重要负向调控因子, Axin蛋白在具有较强增生能力的干细胞中含量的增加对维持其状态的稳定具重要意义.

Axin蛋白表达异常与多种肿瘤的发生、发展有密切关系. Song *et al*[18]发现在Axin基因突变时, 卵巢滤泡细胞的增殖能力会发生明显的增强. Axin蛋白表达异常导致肿瘤发生的机制目前尚不完全清楚, 可能通过Wnt信号途径、JNK信号传导途径以及对p53表达的作用参与肿瘤的发生. (1)Axin蛋白表达减少, 其抑制Wnt信号途径中与肿瘤发生有密切关系的靶基因(c-myc、cyclin D1、MMP-7等)激活的作用可能减弱[19]; (2)Axin蛋白表达减少时对p53的活化作用减弱或消失[15]; (3)Axin蛋白表达减少可能通过JNK信号传导途径和增加β-catenin胞内含量, 使诱导细胞凋亡的能力下降而导致肿瘤. 我们发现胃癌分期和淋巴转移与Axin蛋白表达相关, 与Nakajima *et al*[9]在食管癌研究的发现相似, 机制不清, 有学者认为可能与β-catenin[20]作用有关. 表达异常的β-catenin减少可促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达[21], 刺激新生肿瘤血管生成所致, 诱导多种实体肿瘤细胞的转移[22].

通过对Axin蛋白表达的调控可能成为肿瘤治疗的新的靶点, Satoh *et al*[6]研究发现腺病毒载体导入野生的Axin基因后, 肝癌细胞中β-catenin的量明显降低, 细胞凋亡率增加, 这为肿瘤基因治疗的深入研究提供了方向. 同时, Nakajima *et al*[9]发现81例没有Axin基因突变的食管癌癌组织中, 有5例Axin蛋白表达明显减少, 除基因突变造成的Axin表达异常外, 是否存在其他因素调控Axin基因表达, 还需要进一步深入研究.

■**应用要点**
本研究对于Axin蛋白在胃癌的发生和侵袭转移中的作用提供了一定的研究结果. 为进一步进行肿瘤发生和转移机制的研究提供思路, 为进一步动物和临床肿瘤诊断和治疗提供理论的依据.

4 参考文献

1 Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek TJ, Perry WL 3rd, Lee JJ, Tilghman SM, Gumbiner BM, Costantini F. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 1997; 90: 181-192
2 Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine*

■同行评价
本研究利用免疫组化方法研究了Axin蛋白在正常胃黏膜组织中的表达和分布特点,并进一步阐明了其与胃癌发生和侵袭转移的关系,研究设计合理,结果明确,结论分析论述有据,对于Axin蛋白在胃癌的发生和侵袭转移中的作用提供了一定的研究结果.

Growth Factor Rev 2000; 11: 273-282

3 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512

4 Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422-426

5 Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 443-453

6 Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000; 24: 245-250

7 Wu R, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 2001; 61: 8247-8255

8 Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res* 2001; 61: 7039-7043

9 Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 1734-1739

10 Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, Ikeda S, Koyama S, Asashima M, Kikuchi A. Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin and inhibits axis formation of Xenopus embryos. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2867-2875

11 Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998; 280: 596-599

12 Wiechens N, Heinle K, Englmeier L, Schohl A, Fagotto F. Nucleo-cytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt-beta-catenin Pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 5263-5267

13 Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J* 1998; 17: 1371-1384

14 Neo SY, Zhang Y, Yaw LP, Li P, Lin SC. Axin-induced apoptosis depends on the extent of its JNK activation and its ability to down-regulate beta-catenin levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 144-150

15 Rui Y, Xu Z, Lin S, Li Q, Rui H, Luo W, Zhou HM, Cheung PY, Wu Z, Ye Z, Li P, Han J, Lin SC. Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation. *EMBO J* 2004; 23: 4583-4594

16 Chen RH, McCormick F. Selective targeting to the hyperactive beta-catenin/T-cell factor pathway in colon cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4445-4449

17 Feng Z, Srivastava AS, Mishra R, Carrier E. A regulatory role of Wnt signaling pathway in the hematopoietic differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1333-1339

18 Song X, Xie T. Wingless signaling regulates the maintenance of ovarian somatic stem cells in Drosophila. *Development* 2003; 130: 3259-3268

19 Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 2002; 21: 5861-5867

20 Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Kench JG, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill GF, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Sutherland RL. Lower levels of nuclear beta-catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Int J Cancer* 2005; 113: 415-422

21 Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; 61: 6050-6054

22 Muller T, Bain G, Wang X, Papkoff J. Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling. *Exp Cell Res* 2002; 280: 119-133

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 767-771
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

HGF质粒体内表达诱导脐血干细胞向肝系细胞分化

范 烨, 王学浩, 张 峰, 李相成, 王 科, 钱晓峰

范烨, 王学浩, 张峰, 李相成, 王科, 钱晓峰, 南京医科大学第一附属医院肝脏外科 江苏省南京市 210029
范烨, 男, 1978-09-28生, 江苏无锡人, 汉族, 南京医科大学在读博士, 主要研究方向为肝再生、肝移植.
通讯作者: 王学浩, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院肝脏外科. wangxuehao@jsltc.cn
电话: 025-83718836-6476
收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-03-24

In vivo expression of hepatocyte growth factor promotes differentiation of stem cells from umbilical cord blood into hepatocyte-like cells

Ye Fan, Xue-Hao Wang, Feng Zhang, Xiang-Cheng Li, Ke Wang, Xiao-Feng Qian

Ye Fan, Xue-Hao Wang, Feng Zhang, Xiang-Cheng Li, Ke Wang, Xiao-Feng Qian, Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Professor Xue-Hao Wang, Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wangxuehao@jsltc.cn
Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To observe the hepatocyte growth factor-induced differentiation of $CD34^+$ hematopoietic stem cells (HSC) from umbilical cord blood into hepatocyte-like cells.

METHODS: Systemic administration of naked plasmid containing HGF cDNA driven under cytomegalovirus promoter (pCMV-HGF) were injected rapidly via the tail vein of the NOD/SCID mice, and the level of HGF protein in the peripheral blood was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. $CD34^+$ human hematopoietic stem cells were isolated from umbilical cord blood by magnetic cell sorting method. 20 μL CCl_4 was administered into the mice to establish the model of acute liver damage and hepatocyte proliferation. pCMV-HGF injection and/or $CD34^+$ human hematopoietic stem cells transplantation were performed on the model mice. Then the mortality of the mice and liver function recovery status were observed. Human specific mRNA and protein were also detected in the mice by reverse transcription polymerase chain reaction and immunohistochemistry, respectively (RT-PCR).

RESULTS: A remarkable enhancement of human HGF protein level was observed in the peripheral blood of the mice. The mortality and status of liver function were not significantly different between each experiment group. Pathological examination showed that the mice received combined treatment HGF and HSC had the lightest liver injury, while the liver injury was not markedly different between the mice received HGF and HSC alone. Human albumin mRNA and protein were all expressed in the liver tissues underwent HSC transplantation with or without HGF, while in the mice with HGF injection, there were much more hepatocyte-like cells.

CONCLUSION: Stem cells from umbilical cord blood can differentiate into hepatocyte-like cells, and HGF can promote this process.

Key Words: Hepatocyte Growth Factor; Hematopoietic Stem Cell; Hepatocyte-like cells

Fan Y, Wang XH, Zhang F, Li XC, Wang K, Qian XF. *In vivo* expression of hepatocyte growth factor promotes differentiation of stem cells from umbilical cord blood into hepatocyte-like cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):767-771

摘要

目的: 观察肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)作用下, 脐血干细胞在体内向肝细胞分化的情况.

方法: HGF的裸DNA质粒通过尾静脉快速注入6-8周龄的非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测外周血中HGF水平. 收集足月妊娠产妇的脐血, 磁式分选法选出$CD34^+$造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC). 20 μL四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)腹腔注射建

■背景资料
近来发现来源于骨髓或脐血的干细胞可在体外或体内向肝脏细胞分化, 本文拟在HGF质粒转染得到体内高表达的基础上, 诱导脐血CD+造血干细胞向肝脏细胞分化, 并修复受损肝脏.

■研发前沿
干细胞向肝脏细胞分化可能存在两种机制: 直接分化或与宿主原有肝细胞融合, 何种干细胞亚群更易向肝脏细胞分化及体内外最佳诱导条件尚有争论, 分化得到的肝细胞是否具有成熟的功能亦未明确.

立NOD/SCID小鼠急性肝损伤模型, 分别输注CD34$^+$HSC和/或HGF质粒, 观察其对死亡率、肝功能恢复的影响, 并检测小鼠肝组织内的人源性细胞.

结果: 快速注入HGF质粒后, 体内HGF水平明显上升. 实验各组存活率及肝功能恢复情况无明显差异. 病理切片显示, 联合应用HGF+HSC的实验组, 其肝组织损伤程度最轻, 单独应用HGF或HSC的两个实验组结果类似, 对照组最重. 在两组注射HSC的小鼠肝组织中, 均可检测到人源性的、分泌白蛋白的肝样细胞, 且联合应用HGF的实验组中, 此种细胞更多, 分布更广.

结论: HGF可以促进脐血干细胞向肝细胞分化, 并发挥肝细胞功能.

关键词: 肝细胞生长因子; 造血干细胞; 肝细胞

范烨, 王学浩, 张峰, 李相成, 王科, 钱晓峰. HGF质粒体内表达诱导脐血干细胞向肝系细胞分化. 世界华人消化杂志 2006;14(8):767-771
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/767.asp

0 引言

近年来, 随着干细胞可塑性研究的不断深入, 同样发现其在体内外均可向肝脏细胞分化, 但最佳诱导条件及分化后细胞是否具有成熟功能尚未明确. 本实验中, 我们采用HGF质粒尾静脉快速注射得到小鼠体内HGF的高表达, 并进一步来诱导外源性造血干细胞向肝脏细胞的分化, 观察其是否可以修复受损的肝脏.

1 材料和方法

1.1 材料 非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠, 6-8周龄, 均由南京大学模式动物研究所提供. HGF ELISA检测试剂盒为Biosource公司产品, Ficoll-Paque(密度1.077)及EasySep^{TN}免疫磁珠阳性选择分离系统购自加拿大Stemcell公司; 人肝细胞单克隆一抗购自日本Dako公司; 人ALB多克隆一抗购自Rockland公司.

1.2 方法

1.2.1 HGF基因体内转染 pCMV-HGF质粒由杨俊伟教授惠赠, 通过尾静脉一次性快速注入1.6 mL含有20 μg此种质粒的溶液[1], 注射后4, 8, 12, 24, 72, 144 h分别采血, ELISA法检测外周血中HGF水平.

1.2.2 人脐血CD34$^+$造血干细胞的分离纯化 选择我院足月妊娠产妇, 产前检查HBsAg和抗-HCV均阴性, 收集其脐血. 密度梯度离心分离单个核细胞, 再通过免疫磁式分选法收集CD34$^+$的HSC. 纯化得到的干细胞直接用于细胞移植, 或加入冻存液后置于液氮中备用.

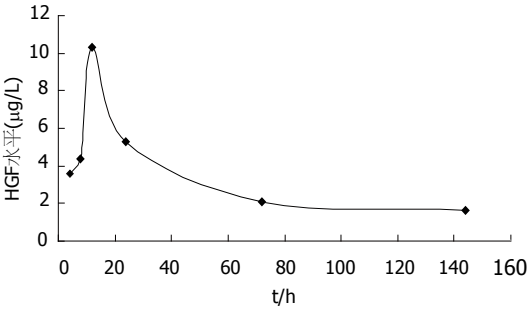


图 1 HGF质粒快速注射后血清HGF水平.

1.2.3 干细胞移植及体内诱导分化 CCl_4 20 μL, 用矿物质油稀释至100 μL, 腹腔内注射, 建立小鼠肝损伤模型, 24 h后尾静脉注射pCMV-HGF(20 μg, 1.6 mL)和/或48 h后尾静脉注射CD34$^+$HSC(细胞数量: 5-10×10^5/鼠). 实验分四组: Ⅰ组: 联合应用HGF+HSC(n = 8); Ⅱ组: 单独应用pCMV-HGF(n = 8); Ⅲ组: 单独应用CD34$^+$HSC(n = 8); Ⅳ组: 对照组, CCl_4建立小鼠肝损伤模型(n = 6). 观察建模14 d后各组的存活率; 建模后第3, 5, 7, 10, 14 d小鼠眼眶取血, 测定血清中ALT、AST水平, 评价各组肝功能恢复状况.

1.2.4 处死后处理 4 wk后处死所有小鼠: (1)制作肝组织石蜡切片, HE染色观察; (2)RT-PCR: 引物设计[2], 白蛋白, 5'-TTGGAAAAATCCCACT-GCAT, 5'-CTCCAAGCTGCTCAAAAAGC; GAPDH, 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC, 5'-TGTTGGGGGCCGAGTTGGGATA. Trizol试剂提取细胞总RNA, 扩增条件: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 50 s, 30个循环, 72℃ 4 min. 将扩增的RT-PCR产物电泳成像; (3)免疫组化: 含40 g/L多聚甲醛的PBS中室温下固定, 参照试剂盒说明逐步操作, 加入人ALB多抗、人肝细胞单抗等一系列步骤, 最后DAB显色, 封片后光镜下观察, 阳性染色细胞为棕黄色或棕褐色.

2 结果

2.1 质粒快速注射后小鼠外周血中HGF水平 如图1所示, 快速注射后4 h即可见到HGF水平明显上升, 12 h达到顶峰, 然后逐渐下降, 但6 d后

表 1 建模后14 d小鼠存活情况

实验组	实验操作	存活率
Ⅰ组	HGF+HSC	7/8(87.5%)
Ⅱ组	HGF	8/8(100%)
Ⅲ组	HSC	7/8(87.5%)
Ⅳ组	对照组	4/6(66.7%)

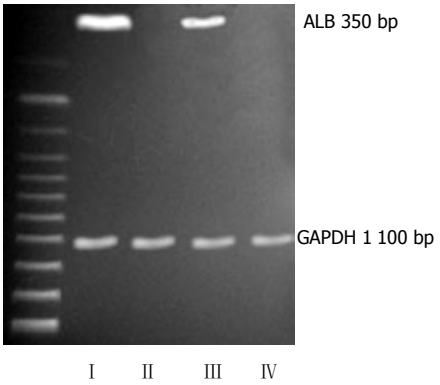


图 2 RT-PCR检测小鼠肝组织内人ALB mRNA的表达. HSC移植的两组均为阳性, 其中联合应用HGF的Ⅰ组表达更高.

仍可测到较高水平的HGF.

2.2 *建模后各组存活率及肝功能恢复情况* 实验各组14 d存活率相近, 肝功能恢复无明显差异, Ⅰ组第5, 7 d ALT、AST水平较其余各组低, 但无统计学意义(表1, 2).

2.3 *病理检查肝组织坏死区情况* 建模后4 wk, 各组小鼠肝脏仍有不同程度的损伤性改变, Ⅰ组最轻, 肝索完整, 肝细胞无明显肿胀, Ⅳ组最重, 组织结构紊乱, 细胞浊肿, Ⅱ组、Ⅲ组介于前两组之间.

2.4 *RT-PCR结果* 如图2所示, Ⅰ、Ⅲ组中均可扩增出人白蛋白的mRNA(350 bp), 且HSC与HGF联用的Ⅰ组表达量更高, 其余两组则为阴性.

2.5 *免疫组化* 造血干细胞移植的两组(Ⅰ组、Ⅲ组)中, 均可以观察到人源性的肝脏实质细胞, 抗人ALB抗体(+), 抗人肝细胞抗体(+), 而另两组为阴性. 肝脏内阳性细胞分布以汇管区为主. 与Ⅲ组比较, Ⅰ组中阳性细胞所占比例更高, 分布更广, 且整合入肝板中(图3).

3 讨论

急性肝功能衰竭是一种死亡率很高的疾病, 起病急、进展快, 预后极差, 其治疗已由传统的保肝解毒、支持治疗向肝细胞移植、生物人工肝及肝移植方向发展[3-5]. 肝细胞移植具有操作简单、损伤小、疗效确实等优点, 其主要机制包括提供暂时的肝功能支持, 以及通过产生HGF促进残存肝细胞的再生和功能恢复[6-7]. 但由于细胞来源的匮乏, 限制了其在临床上的广泛应用, 而异种肝细胞移植不可避免的免疫排斥反应又会严重影响治疗效果.

近年来发现, 骨髓或脐带血中的干细胞可以向肝系细胞分化[8-12], 进一步研究[2,13-15]表明, $CD34^+$干细胞亚群具有较好的定向分化潜能, 有望成为生物人工肝或肝细胞移植新的供体细胞来源.

在免疫缺陷小鼠急性肝功能损伤模型中, 将人干细胞输入体内后可自发迁移入肝脏, 分化成为肝样细胞, 分泌白蛋白, 或者与宿主肝细胞融合, 而将干细胞体外培养时, 添加一定剂量的HGF及其他生长因子, 或者与肝细胞共孵育均同样可以诱导其向肝样细胞分化[16-18], 但Lian *et al*[19]认为体外诱导分化的干细胞无法完全转化成为成熟的肝细胞, 此分化过程的发生有待于进一步确认. 而在体内实验时, 由于更接近于实际, 在早期补充外源性HGF, 理论上可以进一步促进干细胞的分化进程. 将干细胞注入肝损伤小鼠体内, 发现可以减轻损伤程度, 降低死亡率[20-21]. 我们考虑通过尾静脉输注造血干细胞并在体内诱导其向肝脏细胞分化, 从而改善肝功能状况.

Yang *et al*[1]的研究显示, 将HGF质粒通过尾静脉快速输注入小鼠体内, 在早期HGF水平即可有较大的提高. 我们将此实验在免疫缺陷小鼠上重复, 得到了类似结果, HGF水平升高可持续将近1 wk. 通过此种转基因方式, 既得到了HGF的体内高表达, 同时避免了使用载体所带来的各种副作用, 包括对肝脏的毒性. 由于这种HGF是由自身细胞分泌, 而非外源性导入, 从而可以保证其活性并减少了输注的风险. 使用体内这种高水平的HGF来诱导干细胞分化, 较之体外实验更接近于实际, 且理论上分化得到的肝细胞功能应该更成熟. 采用CCl_4腹腔注射建立急性肝损伤模型, 对肝脏微血管影响较小, 有利于干细胞向肝脏内的迁移、分化[13]. 本研究结果表明, 这种方法可以促进干细胞进一步向肝样细胞的分化, 其细胞数量及分布范围均有明显增加. 但现有数据显示各组存活率及肝功能恢复无明显差异, 虽然病理检查提示损伤程度可以得到一定程度的改善, 但无法证实分化而来的肝样细胞可以完全代偿成熟肝细胞的作用,

■创新盘点

本研究将HGF质粒通过尾静脉快速输注入小鼠体内, 在早期HGF水平即可有较大的提高, 且可持续将近1 wk. 既得到了HGF的体内高表达, 同时避免了使用载体所带来的各种副作用. 结果表明, 这种方法可以促进干细胞进一步向肝样细胞的分化, 其细胞数量及分布范围均有明显增加.

■应用要点
HGF质粒可大量扩增获得，且高表达的HGF是由自身细胞分泌，而非外源性导入，从而可以保证其活性并减少输注的风险. 通过此种方法诱导干细胞分化，更接近于体内实际，所得到的细胞理论上应该更成熟.

表 2 术后不同时段血清ALT、AST值比较 (nkat/L)

时间 (d)		Ⅰ组	Ⅱ组	Ⅲ组	Ⅳ组
3	ALT	2 210.4 ± 393.4	1 980.4 ± 271.7	2 083.8 ± 478.4	2 207.1 ± 448.4
	AST	7 008.0 ± 1 281.9	7 571.5 ± 1 493.6	6 639.7 ± 1 155.2	7 336.5 ± 1 445.3
5	ALT	1 563.6 ± 471.7	1 778.7 ± 541.8	1 933.7 ± 525.1	1 833.7 ± 410.1
	AST	5 237.7 ± 1 093.6	5 877.8 ± 988.5	6 184.6 ± 1 105.2	6 609.7 ± 1 308.6
7	ALT	1 280.3 ± 310.1	1 600.3 ± 256.7	1 370.3 ± 370.1	1 472.0 ± 526.8
	AST	4 382.5 ± 543.4	5 001.0 ± 1 065.2	4 901.0 ± 978.5	5 704.5 ± 785.2
10	ALT	1 136.9 ± 360.1	1 246.9 ± 220.0	1 166.9 ± 310.1	1 271.9 ± 471.8
	AST	3 949.1 ± 903.5	3 654.1 ± 866.8	4 724.3 ± 398.4	3 999.1 ± 615.1
14	ALT	1 068.5 ± 446.8	1 158.6 ± 385.1	1 048.5 ± 423.4	1 066.9 ± 295.1
	AST	2 805.6 ± 793.5	2 623.9 ± 815.2	3 235.6 ± 805.2	3 447.4 ± 893.5

P>0.05.

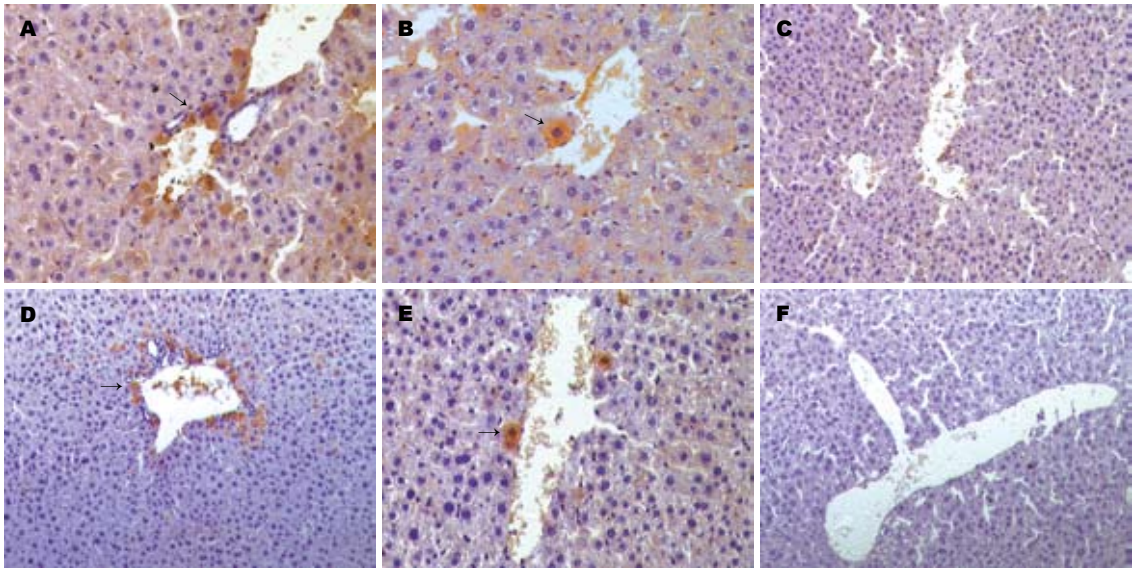


图 3 建模后4 wk标本. A, B, C: 免疫组化检测人白蛋白; D, E, F: 人肝细胞表面抗原. 箭头所指为阳性细胞，分布于Ⅰ组(A, D)和Ⅲ组(B, E)汇管区附近，前者细胞数量多，Ⅳ组(C, F)未见阳性细胞.

其生物学功能并不明确，能否修复损伤的肝脏尚有待于进一步研究.

干细胞的生物学特性决定了其具有巨大的应用前景，尤其在移植领域，不但可有效解决供体细胞来源问题，而且可通过自体干细胞移植或核移植技术的预处理来避免免疫排斥反应的发生，并通过对移植干细胞的基因修饰来纠正患者的先天性缺陷.

4 参考文献

1 Yang J, Chen S, Huang L, Michalopoulos GK, Liu Y. Sustained expression of naked plasmid DNA encoding hepatocyte growth factor in mice promotes liver and overall body growth. *Hepatology* 2001; 33: 848-859

2 Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arii S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21: 217-227

3 Nyberg SL, Hay EJ, Ramin KD, Rosen CB. Successful pregnancy after porcine bioartificial liver treatment and liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2002; 8: 169-170

4 Fox IJ. Transplantation into and inside the liver. *Hepatology* 2002; 36: 249-251

5 Sarkis R, Honiger J, Chafai N, Baudrimont M, Sarkis K, Delelo R, Becquemont L, Benoist S, Balladur P, Capeau J, Nordlinger B. Semiautomatic macroencapsulation of fresh or cryopreserved porcine hepatocytes maintain their ability for treatment of acute liver failure. *Cell Transplant* 2001; 10: 601-607

6 Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver--state of the art. *Science* 2002; 295: 1005-1009

7 Boudjema K, Bachellier P, Wolf P, Tempe JD, Jaeck D. Auxiliary liver transplantation and bioartificial bridging procedures in treatment of acute liver

failure. *World J Surg* 2002; 26: 264-274
8 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
9 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
10 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
11 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
12 Sharma AD, Cantz T, Richter R, Eckert K, Henschler R, Wilkens L, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Ott M. Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol* 2005; 167: 555-564
13 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
14 Tanabe Y, Tajima F, Nakamura Y, Shibasaki E, Wakejima M, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Mitsunari M, Yoshida S, Miake J, Yamamoto Y, Nagata N, Harada T, Kurimasa A, Hisatome I, Terakawa N, Murawaki Y, Shiota G. Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 711-718
15 Nava S, Westgren M, Jaksch M, Tibell A, Broome U, Ericzon BG, Sumitran-Holgersson S. Characterization of cells in the developing human liver. *Differentiation* 2005; 73: 249-260
16 Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via *in vivo* cell fusion. *Hepatology* 2006; 43: 108-116
17 Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 77-81
18 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504
19 Lian G, Wang C, Teng C, Zhang C, Du L, Zhong Q, Miao C, Ding M, Deng H. Failure of hepatocyte marker-expressing hematopoietic progenitor cells to efficiently convert into hepatocytes *in vitro*. *Exp Hematol* 2006; 34: 348-358
20 Di Campli C, Piscaglia AC, Rutella S, Bonanno G, Vecchio FM, Zocco MA, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Improvement of mortality rate and decrease in histologic hepatic injury after human cord blood stem cell infusion in a murine model of hepatotoxicity. *Transplant Proc* 2005; 37: 2707-2710
21 Liu ZC, Chang TM. Transplantation of bioencapsulated bone marrow stem cells improves hepatic regeneration and survival of 90% hepatectomized rats: a preliminary report. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2005; 33: 405-410

■同行评价
本文通过裸DNA质粒尾静脉快速注入技术, 研究HGF体内表达与脐血干细胞的肝系分化, 发现快速注入HGF质粒后, 体内HGF水平明显上升. 在两组注射HSC的小鼠肝组织中, 均可检测到人源性的、分泌白蛋白的肝样细胞, 且联合应用HGF的实验组中, 此种细胞更多, 分布更广. 提示HGF可以促进脐血干细胞向肝细胞分化, 并发挥肝细胞功能. 文章设计合理, 结果可信, 具有一定的理论与实践意义.

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 消息 •

第一届北京国际消化内镜高峰论坛

本刊讯 第一届北京国际消化内镜高峰论坛将于2006-06-02/04在北京举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期:

中英文结构式摘要(800字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-30截稿.

2 联系方式:

北京东单三条甲七号中华医学会北京分会消化内镜委员会 崔宇星 (100005); 电话010-8511196; E-mail: xhnj1196@yahoo.com.cn.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 772-777
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

胶原酶门静脉灌注逆转兔CCl_4性肝硬化

金 博, 张志成, 孙 涛, 程留芳

■背景资料
肝纤维化和肝硬化是各种慢性肝病发展的共同结局, 特征是大量过剩的以胶原为主的细胞外基质沉积于肝内, 肝内胶原降解酶的相对不足不能有效降解过多的细胞外基质, 而导致纤维化不断发展并进展为肝硬化. 目前肝纤维化和肝硬化的逆转治疗是肝病研究的重点和难点, 众多药物抗纤维化的一个重要机制是, 拟通过增加肝组织胶原酶活性, 促进肝内胶原降解而减少在肝脏的沉积, 但临床效果均不理想. 本文采用胶原酶直接门静脉灌注治疗兔肝硬化, 且取得了效果.

金博, 张志成, 孙涛, 海军总医院消化内科 北京市 100037
程留芳, 解放军总医院消化内科 北京市 100853
金博, 2005年军医进修学院博士, 日本富山医科药科大学客座研究员, 美国国立卫生研究院博士后, 副主任医师, 主要从事肝脏病及消化道疾病的研究.
通讯作者: 金博, 100037, 北京市阜成路6号, 海军总医院消化内科. bjbo_jin@hotmail.com
电话: 010-87026435 传真: 010-68589301
收稿日期: 2006-01-04 接受日期: 2006-01-25

Portal collagenase administration reverses carbon tetrachloride-induced rabbit liver cirrhosis

Bo Jin, Zhi-Cheng Zhang, Tao Sun, Liu-Fang Cheng

Bo Jin, Zhi-Cheng Zhang, Tao Sun, Department of Digestive Diseases, Naval General Hospital, Beijing 100037, China
Liu-Fang Cheng, Department of Digestive Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Correspondence to: Dr. Bo Jin, Department of Digestive Diseases, Naval General Hospital, Beijing 100037, China. bjbo_jin@hotmail.com
Received: 2006-01-04 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To investigate whether portal collagenase administration can reverse liver cirrhosis.

METHODS: Four normal controls (group A) received olive oil subcutaneously (sc) for 12 weeks followed by normal saline portal perfusion for 12 weeks. Another four rabbits (group B) received carbon tetrachloride (CCl_4) sc for 12 weeks and then 6 mg of collagenase portally for 12 weeks, while three control rabbits (group C) received CCl_4 for 12 weeks followed by saline for 12 weeks.

RESULTS: After 12 weeks of CCl_4 and another 12 weeks of portal vein perfusion, liver hydroxyproline content in collagenase-treated rabbits was significantly decreased as compared with that in saline-treated controls (177.5 ± 35.6 μg/g *vs* 446.3 ± 150.1 μg/g; F = 13.78, P < 0.01). Further, liver histology showed complete regression of cirrhosis in the collagenase-treated animals. No toxicity of liver, kidney, lung, brain or heart was observed histologically. Anaphylaxis occurred in 2 animals and one was fatal.

CONCLUSION: Portal administration of collagenase can promote the reversion of established liver cirrhosis in the rabbit CCl_4 model.

Key Words: Liver cirrhosis; Collagenase; Portal vein; Rabbits

Jin B, Zhang ZC, Sun T, Cheng LF. Portal collagenase administration reverses carbon tetrachloride-induced rabbit liver cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):772-777

摘要

目的: 观察门静脉灌注胶原酶对逆转实验性肝硬化的作用.

方法: 4只兔作为正常对照(A组)给予四氯化碳(CCl_4) sc 12 wk, 再行门静脉生理盐水灌注12 wk. 另外4只兔先给予CCl_4 sc 12 wk, 再行胶原酶门静脉灌注12 wk (B组), 再有3只兔先行CCl_4 sc 12 wk, 再行生理盐水门静脉灌注12 wk (C组).

结果: 经过12 wk的CCl_4注射和12 wk的门静脉灌注后, 应用胶原酶灌注的B组动物肝羟脯氨酸含量显著低于用生理盐水灌注的对照组(C组)(177.5±35.6 μg/g *vs* 446.3±150.1 μg/g; F = 13.78, P<0.01). 肝组织学检查也显示胶原酶治疗后肝硬化完全消退. 肝、肾、肺、脑、心组织学检查未发现胶原酶的毒性反应. 实验中有2只兔发生过敏反应, 其中1只死亡.

结论: 门静脉灌注胶原酶可以促进已形成的肝硬化向正常肝组织结构逆转.

关键词: 肝硬化; 胶原酶; 门静脉; 兔

金博, 张志成, 孙涛, 程留芳. 胶原酶门静脉灌注逆转兔CCl_4性肝硬化. 世界华人消化杂志 2006;14(8):772-777
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/772.asp

0 引言

肝硬化是大多数慢性炎症性肝病的终末期, 一

旦发生并发症, 5 a死亡率>50%[1]. 肝硬化的病理特征为大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝实质内沉积, 并伴有结节形成和肝功能的损害. 目前肝硬化治疗的唯一方法是肝脏移植, 但供者的缺乏使得大量患者不能得到及时治疗. 近年来的证据表明, 肝纤维化是可逆的[2-6]. 但肝硬化的可逆性仍有争议, 尽管有些肝硬化消退的报道[1,3,7], 但一般认为这些肝硬化的逆转是不完全的[8]. 最近报道用携带金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)序列的腺病毒载体可以使大鼠四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)肝硬化或胆总管结扎造成的肝硬化发生逆转[9-11]. 然而, 此方法的长期生物学安全性仍受到关注, 而且MMP在体内表达的活性也不能得到有效控制. 我们应用有限剂量胶原酶进行门静脉灌注, 研究此方法可否在体内适当地降解肝硬化肝内过多沉积的胶原组织, 从而逆转肝硬化.

1 材料和方法

1.1 材料 盐酸氯胺酮注射液为上海第一制药厂生产. 动物麻醉剂速眠新是由盐酸二氢埃托菲、保定宁、乙二胺四乙酸和氟哌啶醇组成的复合注射液, 由解放军军需大学兽医研究所生产. 麻醉剂由2 mL一支盐酸氯胺酮注射液(0.1 g)和1 mL一支速眠新混合而成. 一次性硬膜外麻醉导管由陕西志俊科贸有限公司生产, 注射用肝素帽由德国B. Braun Melsungen AG公司生产. Ⅳ型胶原酶购于美国Sigma公司, 活性为388 U/mg, 此型胶原酶由7种不同的胶原酶和少量中性蛋白酶组成[13-15]. 肝素钠注射液为北京制药厂生产. 氯胺T和对二甲胺苯甲醛为德国Merck公司生产. 橄榄油、CCl_4、*L*-羟脯氨酸、氢氧化钾、氯化钾、酚酞、硫代硫酸钠、盐酸、硼酸、丙氨酸及甲苯均购于北京化学试剂公司.

1.2 方法 ♂新西兰大白兔24只, 体质量1.7-2.2 kg, 随机分为3组: A组: 5只兔, 作为正常对照组, 给予橄榄油sc, 每周2次, 最初2 wk剂量为0.3 mL/kg, 随后改为0.2 mL/kg, 共注射12 wk. 在停止注射橄榄油后, 开始门静脉灌注生理盐水, 2次/wk, 灌注12 wk. B组: 11只兔, 给予用橄榄油稀释的500 mL/L CCl_4 sc, 每周2次, 最初2 wk剂量为0.3 mL/kg, 随后改为0.2 mL/kg, 于13 wk停止CCl_4注射后开始给予门静脉灌注胶原酶, 2次/wk, 继续灌注12 wk. C组: 8只兔, 给予500 mL/L CCl_4 sc, 2次/wk, 与B组相似. 于13 wk停止CCl_4注射后开始给予门静脉灌注生理盐水, 2次/wk, 继续灌注12 wk. 所有动物在25 wk处死. 在处死动物前, 从下腔静脉采血并分离血清, 用Beckman Coulter Synchron LX20 Clinical System检测血清ALT, AST, 总胆红素、白蛋白、尿素和肌酐. 动物处死后, 分别采取肝、肾、肺等组织的标本, 用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚5 μm, 用HE及Masson三色法染色. 另取肝脏标本用液氮速冻后, 放在罗口盖管内, 储存于-70℃, 准备进行羟脯氨酸测定. 所有动物均在行门静脉灌注前2-9 d剖腹行永久性门静脉插管术. 打开腹腔后, 暴露肝脏, 以缝扎法切取肝组织一块, 大小约0.1-0.2 cm^3, 将活检肝组织分为两部分, 一部分用40 g/L甲醛固定用于病理学检查, 另一部分经液氮速冻后, 储存于-70℃用于羟脯氨酸测定. 然后暴露空肠系膜静脉终末支, 剪一小切口, 结扎远心端, 将一次性硬膜外麻醉导管沿该切口向近心端插入. 导管插入3-4 cm后, 在近心端结扎固定导管, 注射器推注肝素盐水(125 kU/L)无阻力, 回抽可见静脉血后, 将导管剪断, 保留适当长度(12-15 cm), 断端与导管接头连接, 该接头与肝素帽连接. 在接头与肝素帽内充满肝素盐水. 导管带肝素帽的游离端埋入动物右侧腹壁皮下. 此后, 可通过经皮穿刺肝素帽的方法进行门静脉灌注. 将2, 4, 6 mg胶原酶分别溶于20 mL灭菌生理盐水中, 分别对3只兔进行门静脉灌注, 24 h后处死动物. 动物在行门静脉灌注前后分别从耳缘静脉采血, 行血常规、肝肾功能检测. 动物处死后, 取肝、心、肾、肺和脑组织, 用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 切片HE染色行病理学检查.

在确定可耐受的胶原酶剂量后, 将6 mg胶原酶溶于20 mL灭菌生理盐水中, 进行胶原酶门静脉灌注. 速度约为2 mL/min, 每周2次, 灌注后注入5 mL肝素盐水以防导管阻塞. 肝组织羟脯氨酸测定采用Kivirikko *et al*[15]的方法, 稍加改进[16-17].

统计学处理 数据表达方式为mean±SD. 各组之间血清生化指标和肝组织羟脯氨酸含量的差异用*F*检验比较, 门静脉灌注前后肝组织羟脯氨酸含量的差异用配对*t*检验比较. 所有统计学分析均用Stata 7.0统计软件进行. $P<0.05$作为差异显著的标准.

2 结果

2.1 动物存活情况 在CCl_4诱发肝硬化阶段, 有3

■创新盘点
本文通过胶原酶灌注门静脉CCl_4性肝硬化大白兔, 发现其可以促进已形成的肝硬化向正常组织结构逆转.

■应用要点
本文发现胶原酶门静脉灌注可以在一定程度上逆转兔CCl_4性肝硬化, 虽然会发生一些不良反应, 但对于严重肝纤维化或肝硬化患者, 门静脉灌注胶原酶会成为一种新的治疗措施.

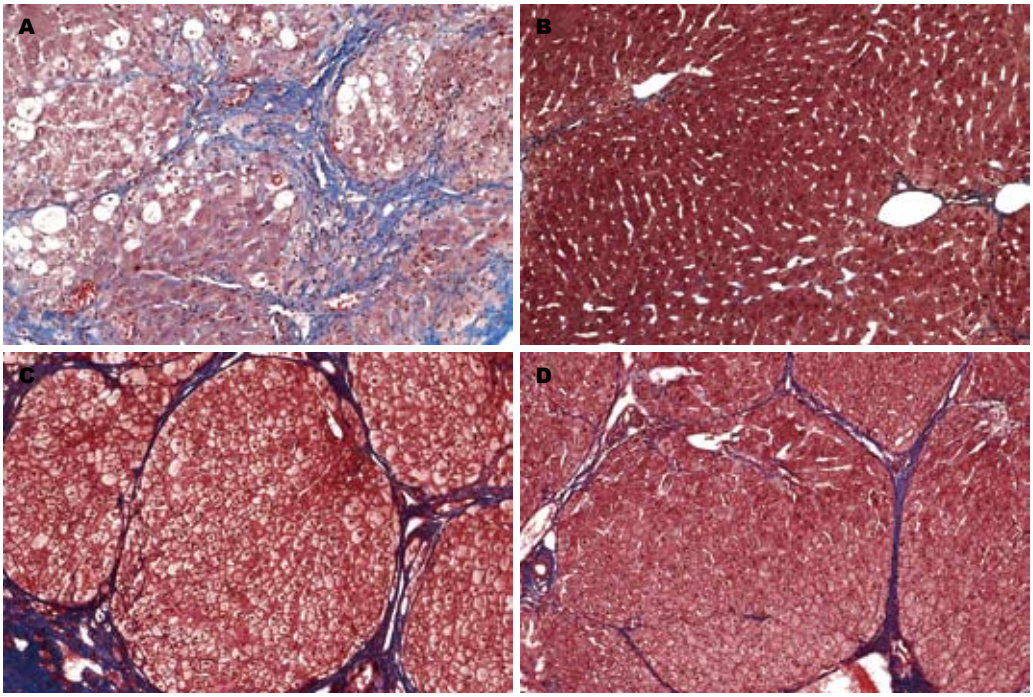


图 1 胶原酶灌注前后肝脏组织学变化. B组应用CCl_4 12 wk后, 兔肝脏组织学表现为明确的肝硬化及肝细胞变性(A); 随后再给予门静脉胶原酶灌注12 wk, 肝脏组织学恢复到几乎正常的组织结构(B); C组应用CCl_4 12 wk后, 兔肝脏组织学表现为明确的肝硬化(C); 再经过12 wk生理盐水门静脉灌注, 肝硬化表现出自发性消退, 但纤维隔仍然存在(D) (Masson三色染色×100).

只动物死于门静脉插管手术, 还有6只动物死于原发性感染及其他原因. 在参与实验的24只动物中, 早期的死亡合计有9只, 占总数的37.5%. 在应用胶原酶治疗之前, A组(正常对照组)只有4只动物存活, B组有8只存活, C组有3只存活. 在胶原酶灌注过程中, B组有2只动物因导管破裂, 胶原酶漏出至皮下, 导致腹壁皮下组织广泛坏死并继发感染而死亡. B组有一只动物在初次进行胶原酶灌注时发生过敏性休克而死亡. 另有一只动物也曾发生过敏性休克, 在给予肾上腺素皮下注射后恢复, 但由于该动物对胶原酶过敏而被排除. 在实验结束时, 参与实验的24只动物, 只有11只存活, 占总数的46%.

2.2 门静脉胶原酶灌注对血细胞及其他器官的影响 血WBC、RBC、血小板、Hb、ALT、AST、胆红素、白蛋白、尿素氮、肌酐水平均无显著改变, 说明胶原酶门静脉灌注对血细胞及肝肾功能无显著影响. 另外, 给予门静脉灌注胶原酶2, 4和6 mg后, 兔脑、心、肝、肾、肺等组织的病理学检查也无异常发现. 在门静脉灌注胶原酶6 wk或12 wk后, 实验组和正常组比较, 血清ALT、AST、总蛋白、尿素氮、肌酐也无显著性差异, 提示门静脉灌注胶原酶6 mg/兔对肝脏和肾脏无损伤作用.

2.3 门静脉胶原酶灌注对硬化肝脏胶原含量的作用 肝脏病理组织学结果表明在CCl_4注射12 wk后, 所有动物均发生肝硬化(图1). B组动物在经过随后的12 wk门静脉胶原酶灌注后, 肝内沉积的纤维组织显著减少, 肝脏组织学几乎恢复到正常(图1B). 接受生理盐水门静脉灌注的对照组(C组)动物, 在停用CCl_4后的12 wk内, 肝纤维化也呈现明显的自发性消退, 但仍有薄的纤维隔存在(图1D). 肝组织羟脯氨酸含量检测结果也表明, 接受胶原酶治疗的兔(B组)肝组织羟脯氨酸含量显著低于应用CCl_4但未接受胶原酶治疗的兔(C组)(177.5±35.6 μg/g *vs* 446.3±150.1 μg/g, F = 13.78, P<0.01). 接受胶原酶门静脉灌注的兔(B组)肝组织羟脯氨酸含量与未应用CCl_4注射的正常组(A组)(177.5±35.6 μg/g *vs* 153.2±22.3 μg/g)相似, 而应用CCl_4但未接受胶原酶治疗的兔(C组)肝组织羟脯氨酸含量则显著高于正常组(A组)(446.3±150.1 μg/g *vs* 153.2±22.3 μg/g, F = 13.78, P<0.005). 比较B组胶原酶灌注前后肝羟脯氨酸含量(501.8±144.4 μg/g *vs* 177.5±35.6 μg/g, t = 4.36, P<0.05), 显示经胶原酶灌注后肝羟脯氨酸含量显著降低, 而应用生理盐水灌注的对照组(C组)灌注前后肝羟脯氨酸含量(705.4±113.2 μg/g *vs* 446.3±150.1 μg/g, t

= 2.39, P = 0.124)虽有一定程度的降低, 但未达到统计学显著性. 在门静脉灌注前, 虽然B组和C组的处理是相同的, 但B组肝组织羟脯氨酸含量仍低于C组动物(501.8±144.4 μg/g *vs* 705.4±113.2 μg/g, t = 2.01, P = 0.101), 这种差异虽然未达到统计学的显著性, 但也反映了动物对CCl_4毒性反应的个体差异, 这种差异是否对本实验的结果造成影响, 还需进行更大规模的实验来验证. 在本实验中, 我们未发现门静脉灌注胶原酶可引起肝脏的出血性炎症反应, 但B组有两只动物胶原酶漏出至皮下, 引起了腹部皮下组织的广泛坏死和出血. 另外, 与未用胶原酶的对照组(C组)比较, 经门静脉给予胶原酶的兔(B组), 其肝、肾和肺的组织病理学检查, 则无异常发现. 提示胶原酶血管内应用可能不会导致炎症反应.

3 讨论

近年来的研究表明, 在致病因子去除以后, 动物或患者的肝硬化均有不同程度的消退[2-4,18-19]. 肝脏MMP是参与肝硬化消退的最重要酶类[20]. 研究表明在肝硬化肝内MMP活性降低, 而其抑制因子金属蛋白酶组织抑制物增加[21-22]. 由于过多的ECM沉积导致MMP活性相对不足, 不能有效地降解肝内沉积的ECM, 是肝纤维化发展为肝硬化的主要原因. 肝硬化消退必须首先降解肝内过度沉积的ECM, 随后才是肝脏结构的恢复. 因此, 增加肝硬化肝内的溶胶原活性是触发肝硬化消退的主要因素. 多年来, 肝病学家进行了许多努力试图增加肝硬化肝内胶原溶解酶的活性. 有些化学药品据称有可能增加肝内MMP活性[6,23], 另外还有人将携带MMP DNA的腺病毒载体输入纤维化的大鼠肝内, 携带的MMP DNA可以在纤维化大鼠肝内表达出活性MMP, 从而增加肝内MMP的活性[9-12], 但是由于基因产物的体内表达难以控制, 所以在人类进行类似的肝脏基因治疗是非常困难的. 另外, 还需要防止这种重组腺病毒载体进入除纤维化肝脏以外的其他器官, 以免破坏这些正常器官的ECM支架. 我们通过门静脉插管将活性的胶原酶直接输送到硬化的肝脏, 通过此方法, 肝内胶原降解酶活性可以通过改变给药剂量来控制, 当肝内过度沉积的ECM被降解后, 可以随时停止给药, 以防肝内ECM被过度降解.

由溶组织梭状芽孢杆菌产生的细菌胶原酶是一类胶原降解酶, 他可识别并结合含重复的Gly-Pro-X胶原样序列, 通过水解胶原蛋白链中几乎所有的Y-Gly键而将胶原分子降解为小分子多肽[24]. 我们检测肝羟脯氨酸含量及病理组织学检查结果显示, 门静脉灌注细菌胶原酶可促进兔已形成的肝硬化消退. 由于硬化肝脏含有大量胶原蛋白, 我们认为从门静脉输入的大部分胶原酶会与肝内胶原结合, 因而可防止胶原酶进入全身系统循环, 避免降解除硬化肝脏以外其他器官的胶原. 结果表明, 只有硬化肝脏内的胶原被降解, 而未发现除肝脏之外其他组织的胶原被降解, 这些结果支持我们的假设. 细菌胶原酶被用于临床治疗胶原性疾病已经有多年的历史. 早期研究表明, 这种胶原酶可局部或全身应用[25-27], 且没有证据表明应用胶原酶可以引起全身性副作用、神经或血管损害、皮肤损伤[25-28]. 一项早期的研究表明, 在44例接受阴茎内注射胶原酶治疗Peyronie's病的患者中, 仅有1例患者血清中可检测到胶原酶特异性IgE, 作者推断发生对胶原酶的过敏反应看来是不可能的[29]. 也有早期研究提示胶原酶可引起出血性炎症反应[30]. 我们的结果既没有发现肝脏或肾脏的功能性损害, 也没有发现心、肺、肝、肾和脑的组织学改变. 而且血细胞也没有明显的损伤. 然而, 在我们的实验中有2只兔发生过敏性休克, 其中1只死亡. 据此看来, 即使是首次应用胶原酶, 也可导致少数动物发生严重过敏反应, 因此在给予细菌胶原酶门静脉灌注时, 应该与抗过敏药物联合使用, 以保证用药的安全性. 我们还观察到, 在B组有两只动物死于胶原酶外漏, 这表明如果发生胶原酶外漏, 6 mg胶原酶也是有害的, 可以消化皮下组织, 引起广泛性皮下组织坏死.

一项前期研究表明, 胶原酶门静脉灌注可增强肝细胞对肝细胞生长因子或转化生长因子-α等生长因子的反应性[31]. 这种由胶原酶所诱发和增强的生长因子的有丝分裂原效应, 对于在经过胶原酶治疗, 肝内过多的ECM被降解以后, 硬化肝脏再生和结构重建是有益的. 然而, 如果这种方法用于临床时, 首先应该排除肝脏恶性肿瘤, 以免因胶原酶灌注而加快肿瘤的生长与播散. 与其他报道一致, 我们的结果也表明, 在毒素撤除后3 mo的时间里, 肝脏组织病理学逐步改善, 在3 mo后虽然肝脏羟脯氨酸含量仍然升高, 但组织学上仅遗留菲薄的纤维隔. 尽管在停止应用CCl_4后, 肝硬化有缓慢的自发性部分吸收, 但门静脉灌注胶原酶可以加快硬化肝脏内沉积的ECM吸收.

■同行评价

选题热门、新颖; 实验方法具有创新性, 有一定的学术和实际应用价值.

CCl_4的肝脏毒性主要是通过其在肝细胞内由细胞色素P-450系统加单氧酶的代谢而发挥的. CCl_4的代谢产物为高反应性自由基$^{\cdot}CCl_3$或$^{\cdot}OOCCl_4$, 这些基团可引起脂质过氧化反应, 影响细胞质膜的功能, 导致肝细胞的病理学变性[32]. 前期研究表明, 应用胶原酶灌注法分离肝细胞后, 肝细胞内细胞色素P-450系统加单氧酶活性降低[33-34]. 但在肝细胞分离时所用的胶原酶剂量远远大于6 mg, 我们实验中所采用的6 mg这样小剂量胶原酶是否会影响肝细胞内细胞色素P-450加单氧酶活性, 还需进一步的验证. 另外, 我们B组的结果表明, 在停止应用CCl_4的12 wk内, 胶原酶门静脉灌注可促进肝硬化消退, 而C组动物在停止应用CCl_4后应用生理盐水门静脉灌注, 虽然肝硬化有一定程度的消退, 但仍不及B组显著. 这说明胶原酶的抗纤维化作用不是通过抑制CCl_4生物代谢来实现的. 为了明确胶原酶抗纤维化作用的机制, 需选用非CCl_4诱导的肝硬化模型进行进一步研究.

总之, 我们报道的结果表明, 虽然会发生一些不良反应, 但门静脉胶原酶灌注确实可以促进已形成的兔肝硬化消退. 这些研究结果需要更大量的实验动物来进一步验证, 也需要采用更完善的技术方法来降低外科手术死亡率, 还需采取措施预防发生过敏反应. 如果目前存在的外科技术以及过敏性等问题能够得到解决, 对于严重肝纤维化或肝硬化患者, 门静脉灌注胶原酶会成为一种新的治疗措施.

4 参考文献

1 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105

2 Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001; 344: 418-423

3 Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1599-1607

4 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549

5 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000; 2: 545-551

6 Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003; 72: 943-959

7 Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Ann Intern Med* 1997; 126: 682-688

8 Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004; 40: 860-867

9 Iimuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* 2003; 124: 445-458

10 Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Galvez J, Hernandez I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1122-1133

11 Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002; 9: 127-134

12 Angleton EL, Van Wart HE. Preparation and reconstitution with divalent metal ions of class I and class II Clostridium histolyticum apocollagenases. *Biochemistry* 1988; 27: 7406-7412

13 Bond MD, Van Wart HE. Purification and separation of individual collagenases of Clostridium histolyticum using red dye ligand chromatography. *Biochemistry* 1984; 23: 3077-3085

14 Bond MD, Van Wart HE. Characterization of the individual collagenases from Clostridium histolyticum. *Biochemistry* 1984; 23: 3085-3091

15 Kivirikko KI, Laitinen O, Prockop DJ. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal Biochem* 1967; 19: 249-255

16 Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. An assay for hydroxyproline and proline on one sample and a simplified method for hydroxyproline. *Anal Biochem* 1975; 63: 331-340

17 金博, 李玉彬, 王援朝, 王立秋. 氯胺T法测定羟脯氨酸含量的方法改进. 陕西医学检验 1994; 9: 176

18 Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1303-1313

19 Dunn MA, Cheever AW, Paglia LM, Kelly EP, Duvall RH, Andrade ZA, Goldner FH. Reversal of advanced liver fibrosis in rabbits with Schistosomiasis japonica. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 499-505

20 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384

21 Perez-Tamayo R, Montfort I, Gonzalez E. Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. *Exp Mol Pathol* 1987; 47: 300-308

22 Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ. Altered balance between matrix metal-

loproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1895-1902
23 Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, Pines M. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2001; 33: 379-386
24 French MF, Mookhtiar KA, Van Wart HE. Limited proteolysis of type I collagen at hyperreactive sites by class I and II Clostridium histolyticum collagenases: complementary digestion patterns. *Biochemistry* 1987; 26: 681-687
25 Gelbard MK, James K, Riach P, Dorey F. Collagenase versus placebo in the treatment of Peyronie's disease: a double-blind study. *J Urol* 1993; 149: 56-58
26 Eiler H, Hopkins FM. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 436-443
27 Rydevik B, Brown MD, Ehira T, Nordborg C. Effects of collagenase on nerve tissue. An experimental study on acute and long-term effects in rabbits. *Spine* 1985; 10: 562-566
28 Rydevik B, Ehira T, Linder L, Olmarker K, Romanus M, Branemark PI. Microvascular response to locally injected collagenase. An experimental investigation in hamsters and rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1989; 23: 17-21
29 Hamilton RG, Mintz GR, Gelbard MK. Humoral immune responses in Peyronie's disease patients receiving clostridial collagenase therapy. *J Urol* 1986; 135: 641-647
30 Vargaftig BB, Lefort J, Giroux EL. Haemorrhagic and inflammatory properties of collagenase from C. histolyticum. *Agents Actions* 1976; 6: 627-635
31 Liu ML, Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology* 1994; 19: 1521-1527
32 Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 1989; 43: 139-154
33 Binda D, Lasserre-Bigot D, Bonet A, Thomassin M, Come MP, Guinchard C, Bars R, Jacqueson A, Richert L. Time course of cytochromes P450 decline during rat hepatocyte isolation and culture: effect of L-NAME. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 59-67
34 Eeckhoutte C, Albo AG, Carletti M, Giaccherino AR, Galtier P, Nebbia C, Dacasto M. Time-dependent variations of drug-metabolising enzyme activities (DMEs) in primary cultures of rabbit hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2002; 16: 375-382

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会

本刊讯 中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会将于2006-07-27/30在长春举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要(500字)及全文3 000字各1份, 2006-03-31截稿.

2 联系方式

吉林省长春市新民大街1号吉林大学白求恩医学部一院消化科 迟宝荣教授(130021); 电话: 0431-4612437; E-mail: chibaorong@sohu.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 778-783
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

p38MAPK信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞黏附作用

毛 华, 黄纯炽, 赵敏芳, 宋卫生

■背景资料
血管内皮细胞生长因子(VEGF)在肝癌组织中有较高表达, 并与肝癌浸润和转移密切相关. VEGF对肿瘤细胞形态学改变研究甚少. p38信号通路是MAPK家族重要组成, 在全身性炎症反应、休克、细胞迁移、细胞凋亡、心血管疾病等方面具有重要作用. 业已表明肿瘤转移过程涉及多种机制, 其中癌细胞运动、黏附、瘤体内血管生成、癌细胞凋亡及转移相关基因与肿瘤浸润.

毛华, 黄纯炽, 赵敏芳, 宋卫生, 南方医科大学珠江医院消化科 广东省广州市 510280
毛华, 男, 1963-06-28生, 江西安义县人, 汉族, 2000年第一军医大学博士, 教授, 主要从事消化系统疾病诊疗、消化道肿瘤化疗工作.
通讯作者: 毛华, 510280, 广东省广州市工业大道253号, 南方医科大学珠江医院消化内科. huam@fimmu.com
电话: 020-61643170 传真: 020-84352197
收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Role of p38MAPK signal transduction pathway in adhesion of hepatocellular cancinoma cell line $HepG_2$ induced by vascular endothelial growth factor

Hua Mao, Chun-Zhi Huang, Min-Fang Zhao, Wei-Sheng Song

Hua Mao, Chun-Zhi Huang, Min-Fang Zhao, Wei-Sheng Song, Department of Gastroenterology, Zhoujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dr. Hua Mao, Department of Gastroenterology, Zhoujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China. huam@fimmu.com
Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

Abstract

AIM: To investigate the role of the p38MAPK signal transduction pathway in the metastasis and adhesion of hepatocellular carcinoma cell line $HepG_2$ induced by vascular endothelial growth factor (VEGF).

METHODS: Hepatocellular cancinoma cell line $HepG_2$ were or not pretreated with specific blocker (SB203580) of p38MAPK signal transduction pathway. ^{3}H-TdR infiltration and the experiment of rat tail colloid were used to measure the effects of different concentrations of VEGF on the homotypic and hetertypic adhesion in $HepG_2$ cells. Flow cytometry was adopted to detect VEGF-induced expression of CD44v6 and by Boyden-Chamber assay was used to evaluate VEGF-induced metastasis of $HepG_2$ cells.

RESULTS: After 1 and 5 μg/L VEGF induction for 60 min, the values (dpm/min) of ^{3}H-TdR infiltration in $HepG_2$ cells were 1 758.67 ± 289.46 and 1 380.03 ± 328.55; for 90 min, the values were 3 124.30 ± 2 262.14 and 2 245.60 ± 273.24, respectively. After 10 μg/L VEGF induction, the values were 1 232.32 ± 201.04, 2 337.50 ± 333.04, and 2 236.99 ± 237.07, respectively, which were dramatically lower than those in control group (P < 0.05 or 0.01). However, in the $HepG_2$ cells pretreated with SB203580, the values of ^{3}H-TdR infiltration after 60, 90 and 120 min were 1 232.32 ± 201.04, 2 337.50 ± 333.04, and 2 236.99 ± 237.07, respectively, and the homotypic adhesion induced by VEGF were inhibited. After 5 and 10 μg/L induction for 60 min, the optical densities (A values) of the experiment of rat tail colloid were 0.263 ± 0.021 and 0.238 ± 0.034, respectively. After 1, 5, and 10 μg/L VEGF induction for 90 min, the A values were 0.269 ± 0.023, 0.373 ± 0.083, and 0.393 ± 0.081, respectively; for 120 min, the A values were 0.371 ± 0.061, 0.390 ± 0.074, and 0.433 ± 0.122, respectively, in $HepG_2$ cells, which were remarkably higher than those in control group (P < 0.05 or P < 0.01). However, in the $HepG_2$ cells pretreated with SB203580, the A values after 60, 90, and 120 min were 0.201 ± 0.035, 0.347 ± 0.112, and 0.479 ± 0.217, respectively, and the hetertypic adhesion induced by VEGF was restrained. After 5 μg/L VEGF induction for 2 h, the CD44v6 positive $HepG_2$ cells counted for a percentage of 32.6% ± 4.2%, but rate of positive cell decreased to 4.3% ± 0.54% when p38MAPK signal transduction pathway was blocked (P < 0.01).

CONCLUSION: VEGF can promote the hetertypic adhesion and decrease the homotypic adhesion of hepatocellular carcinoma $HepG_2$ cells by through p38MAPK signal transduction pathway, which play an important role in the invasion and metastasis of $HepG_2$ cells.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Hepatocellular cancinoma; $HepG_2$; Adhesion; Metastasis

Mao H, Huang CZ, Zhao MF, Song WS. Role of p38MAPK signal transduction pathway in adhesion of hepatocellular cancinoma cell line $HepG_2$ induced by

vascular endothelial growth factor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):778-783

摘要

目的: 观察血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通过p38信号传导通路诱导肝癌$HepG_2$细胞转移及其对黏附作用的影响.

方法: 以p38MAPK信号通路特异性阻断剂SB203580预处理肝癌$HepG_2$细胞, 采用^{3}H-TdR掺入及鼠尾胶黏附实验测定不同浓度VEGF对肝癌$HepG_2$细胞同质性和异质性黏附作用, 流式细胞术检测VEGF诱导肝癌细胞CD44v6表达.

结果: 1 μg/L和5 μg/L VEGF诱导$HepG_2$细胞60 min ^{3}H-TdR掺入实验结果(dpm/min)分别为1 758.67±289.46、1 380.03±328.55; 90 min分别为3 124.30±2 262.14、2 245.60±273.24; 10 μg/L VEGF诱导$HepG_2$细胞60, 90, 120 min ^{3}H-TdR掺入实验分别为1 232.32±201.04、2 337.50±333.04、2 236.99±237.07, 显著低于对照组的2 184.49±336.03、3 560.00±255.17、4 337.40±377.35(P<0.05或0.01); 经SB203580预处理的$HepG_2$细胞, 60, 90, 120 min后的结果为2 634.23±375.21、3 834.82±535.79、4 398.40±564.76, VEGF诱导肝癌细胞同质性黏附作用降低. 5 μg/L和10 μg/L VEGF诱导$HepG_2$细胞60 min鼠尾胶黏附实验吸光度A值为0.263±0.021、0.238±0.034, 1, 5和10 μg/L VEGF诱导$HepG_2$细胞90 min A值分别为0.269±0.023、0.373±0.083、0.393±0.081; 120 min分别为0.371±0.061、0.390±0.074、0.433±0.122, 分别高于对照组的0.130±0.025、0.143±0.036、0.210±0.028(P<0.05或0.01); 经SB203580预处理的$HepG_2$细胞, 60, 90, 120 min鼠尾胶黏附实验吸光度A值分别为0.201±0.035、0.347±0.112、0.479±0.217, VEGF诱导的肝癌细胞异质性黏附作用降低. 5 μg/L VEGF诱导肝癌细胞2 h后CD44v6表达阳性细胞数为32.6%±4.2%, 用SB203580阻断p38信号传导通路后, CD44v6阳性细胞数(4.3%±0.54%)显著下降(P<0.01).

结论: VEGF可以通过p38信号传导通路增加肝癌细胞异质性黏附作用以及降低肝癌细胞的同质性黏附作用, 促进肝癌$HepG_2$细胞侵袭与转移.

关键词: 内皮细胞生长因子; 肝癌; $HepG_2$细胞; 黏附; 转移

毛华, 黄纯炽, 赵敏芳, 宋卫生. p38MAPK信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞黏附作用. 世界华人消化杂志 2006;14(8):778-783
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/778.asp

■**创新盘点**
本文阐述了VEGF诱导肝癌细胞转移的机制, 是通过p38MAPK信号通路导致了同质性黏附作用降低和异质性黏附作用增强.

0 引言

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可诱导肿瘤血管形成, 在肿瘤组织中有较高表达, 与肿瘤浸润和转移密切相关[1-5]. 我们研究了VEGF可以通过p38MAPK信号传导通路诱导肝癌细胞出现转移[6-8], 但是与肿瘤浸润和转移密切相关VEGF是否通过p38MAPK信号传导通路影响肝癌转移过程中肿瘤细胞黏附作用, 目前还未见文献报道. 我们研究了VEGF作用于肝癌细胞后以及用SB203580特异性阻断p38MAPK信号传导通路后VEGF对肝癌细胞同质性黏附和异质性黏附的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌$HepG_2$细胞株由南方医科大学南方医院消化疾病研究所实验中心提供, RPMI 1640购自Sigma, 小牛血清购自杭州四季青公司, VEGF购自美国Pepro Tech, 用无血清RPMI 1640培养液配制成10 mg/L, 置于-200℃保存待用. 鼠尾胶(主要含Ⅰ、Ⅳ型胶原酶, 由暨南大学医学院病理教研室谢举楫教授惠赠). 牛血清白蛋白(BSA)为Sigma公司产品, 用无血清RPMI 1640培养液配制成10 μg/L置于4℃冰箱保存. p38磷酸化活性检测试剂盒购自NEW ENGLISH BioLabs公司. MTT为美国Sigma公司产品. p38MAPK信号通路特异性阻断剂SB203580购自美国Calbiochem公司, M_r 337.4, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解, 配制成1 mmol/L, 置于-20℃保存待用. CD44v6小鼠抗人一抗, FITC标记羊抗小鼠IgG二抗购自武汉博士德生物工程有限公司. 美国Meridian公司生产Acas ULTIMA312型激光共聚焦显微镜.

1.2 方法

1.2.1 p38MAPK蛋白激酶测定 $HepG_2$细胞以1×10^6细胞/瓶的浓度接种于50 mL培养瓶中, 设对照组、5 μg/L VEGF组、5 μg/L VEGF+5 μmol/L SB203580, 37℃、50 mL/L CO_2培养2 h后, 收集细胞, 超声波裂解30 s, 冰浴10 min, 10 000 g低温离心10 min, 收集细胞裂解液上清, 考马斯

■应用要点
研究肿瘤转移过程中p38 MAPK信号传导通路改变，对于了解p38信号传导通路与肿瘤转移关系以及p38信号传导通路作为肿瘤治疗靶点提供理论依据和治疗途径.

亮蓝法测定蛋白质浓度. 取200 μL细胞裂解液上清, 加入2 μL p38mAB, 冰上放置45 min于4℃以12 000 *g*离心10 min, 取上清500 μL, 加入蛋白A-Sepharose 40 μL, 混匀, 4℃搅拌孵育1 h, 4℃, 10 000 *g*离心, 加入1×SDS-PAGE 50 μL加样缓冲液, 煮沸10 min, SDS-PAGE电泳, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 显影, 定影, 对显影条带进行定量分析.

1.2.2 细胞基质黏附实验(异质性黏附实验) 将4℃保存的5 g/L鼠尾胶(暨南大学医学院病理教研室谢举楦教授惠赠, PBS稀释)加入96孔板中, 每孔20 μL, 置于37℃烤箱中1 h. 在铺好鼠尾胶的96孔板中加入培养的$HepG_2$细胞(10^8/L), 每孔100 μL, 37℃, 50 mL/L CO_2培养24 h后, 每孔加终浓度5 μg/L VEGF分别培养60, 90, 120 min, 对照组仅加PBS缓冲液. 另外一组为预先用SB203580阻断p38MAPK组(简称SB组), 在铺好鼠尾胶的96孔板中加入培养的$HepG_2$细胞(10^8/L), 每孔100 μL, 37℃, 50 mL/L CO_2培养24 h后, 每孔加终浓度5 μ SB203580, 15 min后加入5 μg/L VEGF, 培养120 min(SB组). 各组细胞培养结束后, 缓慢吸出培养液, 每孔加入5 g/L的四氮唑兰盐(MTT)20 μL, 继续培养4 h, 吸出MTT, 每孔中加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL, 室温孵育10 min, 用Biol Rad-酶联免疫检测仪在570 nm测吸光度*A*值. 每组设4个复孔, 取平均值.

1.2.3 流式细胞术检测VEGF诱导肝癌细胞CD44v6表达 $HepG_2$细胞以1×10^6细胞/瓶的浓度接种于50 mL培养瓶中, 设对照组、1, 5, 10 VEGF组、1 μg/L VEGF+5 μmol SB203580、5 μg/L VEGF+5 μmol SB203580、10 μg/L VEGF+5 μmol SB203580组, 37℃、CO_2培养2 h后, 观察VEGF及阻断p38信号通路VEGF对肝癌黏附分子CD44v6表达关系. 除对照组外, 其余每管细胞中加入0.5 mL稀释抗CD44v6一抗(武汉博士德生物医学公司, 1∶86稀释). 冰浴30 min, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清. 加入FITC标记羊抗小鼠IgG二抗(武汉博士德生物医学公司, 1∶100稀释), 暗处冰浴30 min. 500目尼龙网过滤, 调整细胞浓度为1×10^6/mL, 总量0.5 mL, 冰浴备用. 上机检测. 每组测试3次, 取3次测试结果平均值.

1.2.4 细胞间黏附实验(同质性黏附实验) 96孔板中加入培养的$HepG_2$细胞(10^8/L), 每孔100 μL, 置于37℃、50 mL/L CO_2培养箱. 在细胞生长旺盛时加入含^{3}H-TdR的新鲜RPMI 1640培养液, 标记18-24 h后, 调整细胞浓度为10^8/L, 然后将标记的细胞悬液100 μL加到单层培养的靶细胞表面, 设置空白、全部加入标记肿瘤细胞对照组, 以及VEGF 1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L浓度组, 各组分别培养60, 90, 120 min, 每组设3个复孔, 取平均值. 另外一组预先用SB203580阻断p38MAPK信号传导通路组, 在长满单层细胞的培养孔中每孔预先终浓度5 μmol SB203580, 15 min后加入终浓度5 μg/L VEGF, 置于37℃、CO_2培养箱中培养2 h, 培养结束后, 多头细胞收集仪收集96孔板底部的细胞至醋酸纤维滤纸上, 考干后置于闪烁液中, Backman-L600型液闪仪进行液闪计数, 测定脉冲数cpm(dpm/min). 每组取3次实验结果的平均值.

1.2.5 肝癌细胞E-cadherin表达 消化培养的$HepG_2$细胞(108^5/L)100 μL置于细胞培养皿中央, 置于37℃、CO_2培养6-8 h. 对照组加入5 μL RPMI 1640, 一组加入VEGF, 使终浓度为5 μg/L, 另外一组在加终浓度为5 μg/L VEGF前15 min, 预先在细胞培养皿底加入终浓度5 μmol SB203580(SB组), 继续培养120 min, 5mL/L小牛血清100 μL覆盖细胞10 min, 去除内源性非特异性蛋白. 加入小鼠抗人E-Cadnine IgG一抗0.5-1 mg/L, 置于湿盒中, 室温下孵育60 min. 加入FITC标记羊抗小鼠二抗, 室温下暗处孵育30 min后, 上机激光共聚焦显微镜检测计算每个样品100个细胞的平均荧光值.

统计学处理 多组间计数资料比较采用*F*检验、两组间比较采用*t*检验.

2 结果

2.1 VEGF对肝癌细胞p38MAPK激活 VEGF诱导肝癌细胞后5 min p38MAPK活性开始增加, 30-60 min明显增高, 120 min达到高峰, 300 min接近基础水平(图1).

2.2 p38MAPK信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞异质性黏附作用 VEGF可以使肝癌细胞与基质的黏附(异质性黏附)作用增加. 明显高于对照组($P<0.05$). 5 μg/L、10 μg/L VEGF对肝癌细胞的异质性黏附作用大于1 μg/L VEGF($P<0.05$). 肝癌细胞的异质性黏附作用在VEGF诱导后60 min开始产生, 90-120 min作用最强, 持续作用6 h, 并呈时间、剂量依赖关系. 用SB203580阻断p38MAPK信号传导通路, 能够抑制VEGF增强肝癌细胞异质性黏附作用, 有利于肝癌细胞道的侵袭与转移(表1).

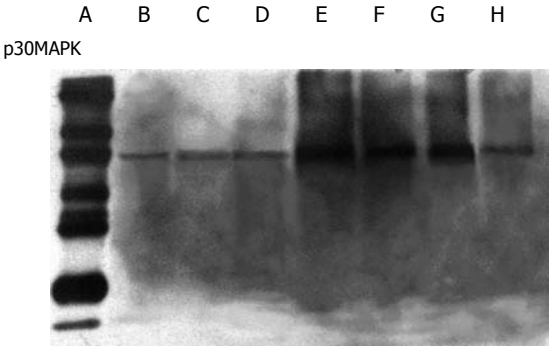


图 1 VEGF对肝癌细胞p38MAPK活性测定. A: MAPK; B: 对照组; C: 诱导5 min; D: 诱导15 min; E: 诱导30 min; F: 诱导60 min; G: 诱导120 min; H: 诱导300 min.

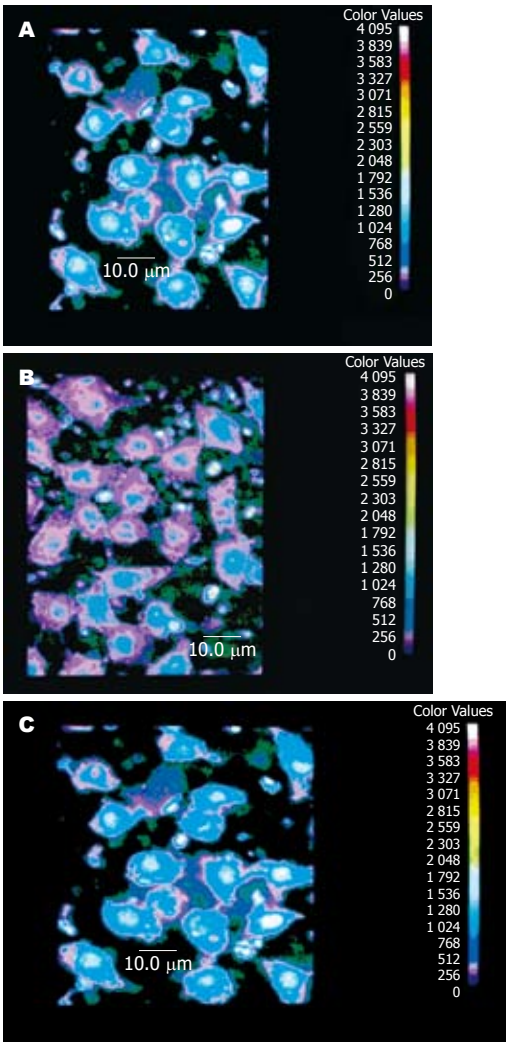


图 2 激光扫描共聚焦显微镜下的肝癌细胞. A: 对照组肝癌细胞; B: 肝癌细胞E-cadherin表达; C: 阻断p38信号传导通路, 抑制VEGF诱导肝癌细胞E-cadherin 表达下降.

2.3 p38信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞CD44v6表达 对照组CD44v6表达阳性肝癌细胞为1.7%, 1 μg/L、10 μg/L VEGF诱导肝癌细胞2 h后CD44v6表达阳性细胞数为3.1%, 1.7%, 与对照组比较, 差异无显著性(P>0.05), 5 μg/L VEGF肝癌细胞2 h CD44v6表达阳性细胞数为32.6%, 显著高于其余各组(P<0.01). 用SB203580阻断p38信号传导通路后, 能显著抑制5 μg/L VEGF上调肝癌细胞表达CD44v6蛋白(表2).

表 1 p38MAPK信号传导通路调控VEGF诱导HepG$_2$细胞异质性黏附作用 ($\bar{x}$值)

分组	t (VEGF 作用) min		
	60	90	120
对照	0.130 ± 0.025	0.143 ± 0.036	0.210 ± 0.028
1 μg/L VEGF	0.185 ± 0.017	0.269 ± 0.023[a]	0.371 ± 0.061[a]
5 μg/L VEGF	0.263 ± 0.021[a]	0.373 ± 0.083[a]	0.390 ± 0.074[a]
10 μg/L VEGF	0.238 ± 0.034[a]	0.393 ± 0.081[a]	0.433 ± 0.122[b]
SB组	0.201 ± 0.035	0.347 ± 0.112	0.479 ± 0.217[b]

[a]P<0.05 *vs* 对照组, [b]P<0.01.

表 2 流式细胞术检测p38信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞CD44v6表达

分组	CD44v6表达阳性细胞数 (%)
对照	1.7 ± 0.12
1 μg/L VEGF	3.1 ± 0.24
5 μg/L VEGF	32.6 ± 4.20[b]
10 μg/L VEGF	1.7 ± 0.09
SB+1 μg/L VEGF	3.3 ± 0.21
SB+5 μg/L VEGF	4.3 ± 0.54
SB+10 μg/L VEGF	2.1 ± 0.41

[b]P<0.01 *vs* 其他各组.

2.4 p38信号传导通路调控VEGF诱导肝癌细胞同质性黏附作用 1 μg/L VEGF作用肝癌细胞120 min后同质性黏附作用降低有显著性, P<0.05; 5 μg/L、10 μg/L VEGF作用肝癌细胞60, 90 min后显著降低同质性黏附作用, P<0.05, 作用120 min后同质性黏附作用有非常显著性降低, P<0.01. 用SB203580阻断p38信号传导通路, 可以显著抑制VEGF诱导肝癌细胞同质性黏附作用降低(表3).

2.5 肝癌细胞E-cadherin表达 激光扫描共聚焦显微镜观察发现肝癌细胞表达的钙黏附素蛋白分布在细胞膜表面. 对照组肝癌细胞荧光强度(图2A)较VEGF诱导2 h后肝癌荧光强度(图2B)更高, VEGF能够降低肝癌细胞钙黏附素的表达, 与对照组比较, 差异有非常显著性(P<0.01). SB203580阻断p38MAPK信号传导通路, 可阻断VEGF诱导的E-cadherin表达降低(图2C), 与对

表 3 VEGF诱导肝癌细胞同质性黏附作用 (dpm/min)

分组	t (VEGF 作用)		
	60 min	90 min	120 min
空白对照	50.54 ± 10.23	105.70 ± 23.56	115.10 ± 31.09
对照	2 184.49 ± 336.03	3 560.00 ± 255.17	4 337.40 ± 377.35
1 μg/L	1 758.67 ± 289.46	3 124.30 ± 2 262.14	2 657.43 ± 310.31[a]
5 μg/L	1 380.00 ± 328.55[a]	2 245.60 ± 273.24[a]	2 091.50 ± 213.84[b]
10 μg/L	1 232.30 ± 201.04[a]	2 337.50 ± 333.04[a]	2 236.90 ± 237.07[b]
SB组	2 634.23 ± 375.21	3 834.82 ± 535.79	4 398.40 ± 564.76

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组, [b]$P<0.01$.

照组(757±103)比较(*vs* 803±121, $P>0.05$), 与VEGF组(352±56)比较($P<0.01$).

3 讨论

癌的侵袭与转移行为是引起肿瘤患者死亡的主要原因, 癌转移是一个复杂的多步骤连续过程, 包括肿瘤细胞从原发部位脱落、肿瘤细胞溶解组织基质后移动、肿瘤细胞与血管内皮细胞黏附、肿瘤细胞穿透血管壁、肿瘤细胞在血管内运行、转移灶的形成等过程. 已有资料显示, 癌转移与肿瘤细胞之间黏附能力降低以及瘤细胞与内皮细胞黏附能力增强有关[9-13]. 研究表明, E-cadherin的表达减少或在动物高浸润性肿瘤细胞株, 其瘤细胞表面的钙黏附蛋白分子E(E-cadherin)丧失与肿瘤细胞从原发瘤上脱落密切相关[14-15]. 钙黏附蛋白分子是一类介导同种细胞相互黏附的钙依赖性跨膜蛋白, 参与形成和维护正常细胞的连接, 是介导细胞间连接最重要的一类分子. 他通过连接素与细胞骨架形成一复合物, 他的活性也可影响细胞间紧密连接、缝隙连接和桥粒连接. 而将编码黏附分子E的DNA插入到肿瘤细胞基因组中, 则肿瘤细胞丧失转移和浸润能力[16-17]. E-黏附素介导细胞间的黏附作用, 高浸润性肿瘤细胞E-cadherin的表达和分泌减少, 使瘤细胞彼此分散才能侵入细胞外基质(extracellular matrix, EMC)[18-20]. 肿瘤的生长可分为肿瘤细胞的克隆性增殖期(无血管期)和血管形成期[21]. 当肿瘤组织生长在2-3 mm以内时, 肿瘤细胞数在10^7以内, 肿瘤组织没有血管生成, 肿瘤一般无转移倾向. 一旦新生毛细血管长进肿瘤组织, 肿瘤组织中VEGF表达增加, 血管生成增多, 肿瘤转移倾向增高[22]. VEGF促使肿瘤组织血管生成是肿瘤生长和转移的形态学基础, 是促进肿瘤转移的重要因素, 他不仅为肿瘤细胞提供充足的营养, 促进肿瘤细胞分裂、增殖, 而且为转移的肿瘤细胞提供了通道. 我们研究表明VEGF也能使肝癌细胞本身转移能力增强[23-24], VEGF可以减少肝癌$HepG_2$细胞E-cadherin黏附素的表达和分泌, 细胞间同质性黏附作用降低, 5 μg/L VEGF作用肝癌细胞2 h, 与对照组比较, 差异有非常显著性, $P<0.01$. 同质性黏附作用减弱, 恶性肿瘤细胞彼此间黏附及连接作用减弱, 使肿瘤细胞从原发灶脱落, 获得高转移的能力[25-26].

我们研究表明, VEGF可以使肝癌细胞穿透羊膜基质能力增强, VEGF诱导向下室转移的细胞显著高于对照组[27]. 癌细胞侵袭转移过程, 包括肿瘤细胞从原发癌灶脱离, 并与基质和血管内皮细胞黏附, 进入循环中在远隔器官着床的过程. 我们研究发现, VEGF可以诱导肝癌$HepG_2$细胞异质性黏附作用增加, 呈时间、剂量依赖关系. 异质性黏附作用增加可以增强肿瘤细胞与内皮细胞的黏附, 穿过内皮细胞进入血液循环; 异质性黏附作用增加可以增强脱离的肿瘤细胞要与基质的胶原纤维黏附, 有利于肿瘤细胞的运动和转移灶的形成[28]. 1 μg/L VEGF作用120 min后、1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L VEGF作用60, 90, 120 min后诱导大肠癌细胞同质性黏附作用减弱, 与对照组比较, 差异有显著性或非常显著性, $P<0.05$或$P<0.01$. 恶性肿瘤细胞彼此间黏附及连接作用减弱, 使肿瘤细胞从原发灶脱落, 获得高转移的能力[29].

VEGF诱导肝癌细胞转移, 与其增强肝癌细胞异质性黏附作用, 降低肝癌细胞同质性黏附作用有关. 研究VEGF作用的信号传导途径, 并阻断VEGF发生生物学作用的信号途径, 可能成为抑制VEGF诱导的肿瘤侵润与转移的新靶点.

4 参考文献

1 Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothe-

lial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1604-1606
2 Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Brivio F, Fumagalli L, Gardani GS. Changes in circulating VEGF levels in relation to clinical response during chemotherapy for metastatic cancer. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 152-155
3 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
4 江丰收, 胡冰, 孙玉蓓, 庄建生, 吕桦. 常见消化道恶性肿瘤患者血清VEGF表达水平及其临床意义. 肿瘤 2005; 25: 284-286
5 康旭, 王芳, 曹军, 冼沛中. MMP-9、TIMP-1及VEGF在大肠癌中的表达与临床病理和预后的相关性研究. 中国实验诊断学 2005; 9: 546-548
6 Mao H, Yuan AL, Zhao MF, Lai ZS. Role of signal transduction pathway of mitogen-activated protein kinase on metastasis of hepatocellular carcinoma induced by VEGF. *Zhonghua Xiaohua Zazhi* 2001; 2: 38-41
7 Chen JL, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Zhou T, Yao M, Zhang DQ, Wu YL. Effect of P-selectin monoclonal antibody on metastasis of gastric cancer and immune function. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1607-1610
8 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜, 张亚历, 周殿元. p38MAPK信号通路影响血管内皮细胞生长因子诱导肝癌细胞超微结构变化. 世界华人消化杂志 2000; 8: 536-538
9 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 分裂原激活蛋白激酶p38信号传导通路在抑制血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. 中华消化杂志 2000; 20: 14-16
10 Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1409-1414
11 Mine S, Fujisaki T, Kawahara C, Tabata T, Iida T, Yasuda M, Yoneda T, Tanaka Y. Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells *in vitro* through up-regulation of CD44. *Exp Cell Res* 2003; 288: 189-197
12 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003; 23: 1581-1588
13 孙惠川. 血管生成相关分子与肿瘤转移复发. 实用肿瘤杂志 2005; 20: 281-282
14 史洪淼, 周政, 田芸, 王玲, 宿芳, 李娜, 郝立宏. 上皮钙黏附素与肿瘤转移的研究进展. 大连医科大学学报 2005; 27: 280-282
15 Sun BC, Sun Y, Zhao XL, Liu YX, Zhang SW, Liu YX. Expressions and significance of E-cadherin and beta-catenin in synovial sarcoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 727-730
16 Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 2000; 31: 558-565
17 Santos-Garcia A, Abad-Hernandez MM, Fonseca-Sanchez E, Julian-Gonzalez R, Galindo-Villardon P, Cruz-Hernandez JJ, Bullon-Sopelana A. E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E100-E105
18 姚宏. 上皮钙黏附素和连环素复合物在肿瘤中的研究. 肿瘤研究与临床 2004; 16: 361-363
19 Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, van Eijk R, Eilers PH, van de Water B, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2006; 94: 661-671
20 Sun BC, Sun Y, Zhao XL, Liu YX, Zhang SW, Liu YX. Expressions and significance of E-cadherin and beta-catenin in synovial sarcoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 727-730
21 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 1-18
22 陈汝福. 抗肿瘤血管形成基因治疗研究现状. 国外医学・肿瘤学分册 1998; 25: 211-213
23 姜金波, 朱民, 李雪梅, 寿楠海, 吕丽红, 邵军, 尹金岭. 结肠癌VEGF-C表达、淋巴管密度与淋巴转移和预后的关系. 山东大学学报・医学版 2005; 43: 616-620
24 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 彭齐荣, 张亚历. 血管内皮细胞生长因子诱导肝癌细胞转移的扫描电镜观察. 第一军医大学学报 2000; 20: 254-256
25 蒋新农, 周柔丽. 肿瘤细胞黏附、迁移与转移的相关性. 生物化学与生物物理进展 1998; 25: 404-407
26 毛华, 赵敏芳, 袁爱力, 赖卓胜, 姜文奇. 血管内皮生长因子对肝癌细胞侵袭能力和同质性黏附作用影响. 肿瘤 2002; 22: 197-199
27 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. 中华肝胆外科杂志 2001; 7: 34-36
28 Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54: 271-335
29 杨秋霞, 赵贤姝. CD44分子生物学特性及与肿瘤关系的研究进展. 国外医学・免疫学分册 2000; 23: 12-15

电编 张敏 编辑 菅鑫妍

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 784-788
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

siRNA对生长抑素基因表达的抑制作用

朱晓燕, 岳保红, 张钦宪

■背景资料
胃癌的发病机制十分复杂, 其病因目前尚未阐明, 胃肠激素在胃癌发生、发展的过程中所起的作用正日益受到关注. 在哺乳动物细胞中可以诱导RNAi效应, 他已经成为基因功能研究的重要工具. 本研究设计并体外合成了siRNA, 通过转染胃癌细胞系SGC-7901, 研究其干扰生长抑素基因表达的效应.

朱晓燕, 张钦宪, 郑州大学医学院组胚教研室 河南省郑州市 450052
岳保红, 郑州大学第一附属医院检验科 河南省郑州市 450052
朱晓燕, 女, 1976-12-26生, 在读博士, 郑州大学医学院组胚教研室讲师, 主要从事消化道肿瘤分子生物学研究.
通讯作者: 张钦宪, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学医学院组胚教研室. qxz53@zzu.edu.cn
电话: 0371-66658153 传真: 0371-66658153
收稿日期: 2005-12-21 接受日期: 2006-02-25

Inhibitory effects of small interfering RNA on expression of somatostatin gene

Xiao-Yan Zhu, Bao-Hong Yue, Qin-Xian Zhang

Xiao-Yan Zhu, Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Bao-Hong Yue, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Correspondence to: Dr. Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. qxz53@zzu.edu.cn
Received: 2005-12-21 Accepted: 2006-02-25

Abstract
AIM: To research inhibitory effects of small interfering RNA (siRNA) on the expression of somatostatin gene.

METHODS: According to the gene sequence of somatostatin in GenBank, we designed the siRNA-targeted templates and synthesized siRNA using T7 RiboMAX Express RNAi System *in vitro*. The obtained siRNA was then transfected into gastric cancer cell line SGC-7901. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical techniques were used to detect the expression of somatostatin at both mRNA and protein levels.

RESULTS: The target siRNA with a length of 21 bp was successfully synthesized. Before transfection, somatostatin was strongly and positively expressed in gastric cancer cell line SGC-7901, locating at the cytoplasm. Forty-eight hours after transfection , somatostatin expression was markedly inhibited and the inhibitory rate in siRNA-transfected cells was significantly higher than that in the cells transfected with empty vector and non-transfected cells (49.71% ± 0.056% *vs* 10.49% ± 0.021%, 0%, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: siRNA can inhibit the expression of somatostatin specifically.

Key Words: Somatostatin; RNA interference

Zhu XY, Yue BH, Zhang QX. Inhibitory effects of small interfering RNA on expression of somatostatin gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):784-788

摘要
目的: 研究siRNA对生长抑素(SOM)基因表达的抑制作用.

方法: 根据生长抑素基因序列设计和合成RNA干扰的靶序列, 应用RiboMAXT7体外转录试剂盒合成siRNA并转染胃癌细胞系SGC-7901, 经RT-PCR, 免疫组化法检测生长抑素在mRNA和蛋白质水平的抑制效应.

结果: 成功合成了siRNA(21 bp). 胃癌细胞系SGC-7901中SOM基因的表达呈强阳性, 分布在胞质中, siRNA作用48 h后SOM基因的表达明显抑制, 与空转染和空白对照组相比有显著性差异(49.71%±0.056% *vs* 10.49%±0.021%, 0%, $P<0.01$).

结论: siRNA可特异性抑制生长抑素基因的表达.

关键词: 生长抑素; RNA干扰

朱晓燕, 岳保红, 张钦宪. siRNA对生长抑素基因表达的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006;14(8):784-788
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/784.asp

0 引言
RNA干扰(RNA interference, RNAi)是双链RNA(dsRNA)介导的序列特异性转录后同源

靶基因沉默效应[1]. 由于小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)在哺乳动物细胞中可以诱导RNAi效应, 他已经成为基因功能研究的重要工具[2]. 胃癌的发病机制十分复杂, 其病因目前尚未阐明, 胃肠激素在胃癌发生、发展的过程中所起的作用正日益受到关注[3-4]. 我们设计并体外合成了siRNA, 通过转染胃癌细胞系SGC-7901, 研究其干扰生长抑素(somatostatin, SOM)基因表达的效应, 为筛选抑制SOM基因表达的有效序列, 进一步研究其功能奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 *材料* 胃癌细胞系SGC-7901, 由本教研室保存; 胎牛血清和胰蛋白酶购自TaKaRa; T7RiboMAX™ Express RNAi System购自Promega公司; CodeBreaker™ siRNA Transfection Reagent购自Promega公司; Trizol Reagent RNA提取试剂盒购自Invitrogen; RT-PCR两步法试剂盒购自上海生物工程公司; PUC19DNA Marker购自上海生物工程公司.

1.2 *方法* 在GenBank中取得SOM基因全长cDNA序列, 用Sira mode of Sfdd软件(http://sfdd.wardworch.org/sirna.pl)进行siRNA的设计及RNA二级结构的预测. SOM基因全长cDNA共633个碱基, 根据分析结果选择162-180 bp为靶序列, gcaggaactggccaagtac. 依据所设计的靶向siRNA序列, 根据试剂盒的要求设计siRNA模板寡核苷酸, 由上海生物工程公司合成, 序列为: Primer1: 5'-ggatcctaatacgactcactatagcaggaactggccaagtac-3'; Primer2: 5'-aagtacttggccagttcctgctatagtgagtcgtattaggatcc-3'; Primer3: 5'-ggatcctaatacgactcactatagtacttggccagttcctgc-3'; Primer4: 5'-aagcaggaactggccaagtactatagtgagtcgtattaggatcc-3'. 根据GenBank上发表的看家基因β-actin的序列, 利用Primer premier5.0软件设计了β-actin的序列, 上游引物: 5'-ttctgacccatgcccaccat-3'(sense); 下游引物: 5'-atggatgatgatatcgccgcgctc-3'(antisense), 扩增长度为198 bp. 根据GenBank上发表的SOM基因的序列(accession No. BC032625)利用Primer premier5.0软件设计了RT-PCR的序列, 上游引物: 5'-gatgctgtcctgccgcctccag-3'(sense); 下游引物: 5'-acaggatgtgaaagtcttcca-3'(antisense), 356 bp. 用T7RiboMAX™ Express RNAi System试剂, 按照试剂盒说明书以合成的寡核苷酸为模板, 体外合成siRNA. 37℃, 50 mL/L CO_2, 100 mL/L胎牛血清常规培养胃癌细胞系SGC-7901, CodeBreaker™ siRNA Transfection Reagent转染SGC-7901. 转染前6孔板接种3孔, 24孔板接种3孔, 分别设空白细胞对照组, 空转染试剂对照组和转染实验组, 待细胞长到50%-70%, 进行转染. 24孔板转染时, 准备2个500 μL离心管, 每管加入2 μL转染试剂与125 μL无血清培养基充分涡旋混合, 室温孵育20 min, 空转染对照组不加siRNA, 实验组加入双链siRNA 0.1 μL到稀释的转染试剂, 使siRNA转染浓度达到10 nmol/L, 轻轻用手指弹匀, 室温孵育20 min, 分别加入6孔板中的两个孔中, 加100 mL/L胎牛血清培养基2.5 mL, 37℃, 50 mL/L CO_2, 培养48 h后收集细胞. 6孔板转染时, 准备两个1.5 mL离心管, 每管加入10 μL转染试剂与625 μL无血清培养基充分涡旋混合, 室温孵育20 min, 空转染对照组不加siRNA, 实验组加入双链siRNA 0.5 μL到稀释的转染试剂, 使siRNA转染浓度达到10 nmol/L, 轻轻用手指弹匀, 室温孵育20 min, 加入6孔板中的2个孔中, 加100 mL/L胎牛血清培养基2.5 mL, 37℃, 50 mL/L CO_2, 培养48 h后收集细胞.

1.2.1 *免疫组化检测抑制效应* 转染后48 h, 收集24孔板培养的三组细胞, 做细胞涂片, 40 g/L多聚甲醛固定, 按照试剂盒要求做免疫组化.

1.2.2 *RT-PCR检测抑制效应* 转染后48 h, 收集6孔板培养的三组细胞, 每孔加1 mL Trizol试剂, 按试剂盒操作说明, 分别提取总RNA, 电泳鉴定, 按照RT-PCR试剂盒两步法说明书操作, 分别用SOM基因和β-actin基因引物, 进行RT-PCR.

统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件对数据进行统计学处理, 对计数资料采用χ^2检验, 对计量资料, 统计学数据用均数±标准差(mean±SD)表示. 以$\alpha = 0.05$为检验水准.

2 结果

根据设计的siRNA模板寡核苷酸, 成功合成了siRNA(图1).

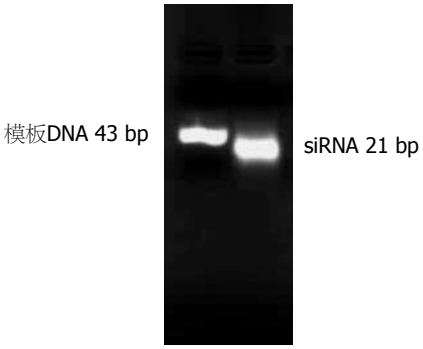


图1 合成的siRNA.

■**研发前沿**
目前应用RNA干扰技术来研究基因的功能成为该领域的热点. 生长抑素通过与受体结合, 启动生物反应, 但其具体的信号传导途径不详, 故成为研究的重点.

2.1 *免疫组化结果* 胃癌细胞系SGC-7901中SOM

■创新盘点
以往利用反义核酸技术特异性抑制该基因的表达，从而研究该基因的功能，存在特异性不强、效率不高等缺点，本实验采用RNAi技术特异性抑制生长抑素基因的表达，为进一步研究生长抑素基因在胃癌发生、发展中的作用奠定了基础.

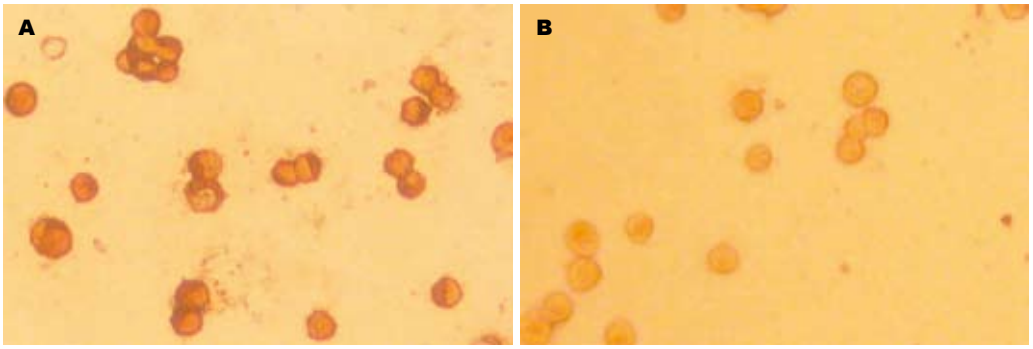


图 2 siRNA作用前后胃癌细胞系SOM基因表达. A: 作用前，强阳性，分布在细胞质中; B: 作用后48 h, SOM表达明显被抑制.

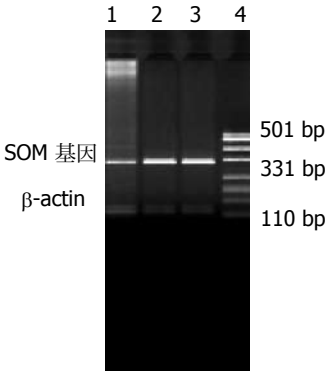


图 3 RT-PCR产物电泳图. 1: 转染组; 2, 3: 对照组; 4: Marker (501 bp−110 bp).

基因的表达呈强阳性，分布在胞质中(图2A). siRNA作用胃癌细胞系48 h后SOM基因的表达明显被抑制(图2B). 镜下观察标本，并同时做半定量计数分析. 每个标本随机观测十个视野(40×10)，记录强阳性(细胞内含大量粗大棕黄色颗粒，计3分)，阳性(细胞内有较多的棕黄色着色颗粒，计2分)及弱阳性(细胞内可见散在的棕黄色颗粒，计1分)细胞平均积分值. 抑制率(mean±SD)% = (1-实验组阳性细胞平均积分值/对照组阳性细胞平均积分值)×100%(表1).

2.2 siRNA对SOM基因的抑制作用 取RT-PCR产物5 μL, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳，结果(图3)可以看出两组样品在198 bp处均可见到β-actin，转染组在356 bp处条带较弱，说明SOM基因表达受到抑制，而正常对照组在356 bp处条带较亮，说明扩增出了靶基因.

表 1 siRNA对SGC-7901细胞SOM表达的抑制率 (%)

组别	抑制率
实验组	49.71 ± 0.056[b]
空转染对照组	10.49 ± 0.021
空白对照组	0

实验组, $P<0.01$ *vs* 对照组.

3 讨论

肿瘤是多基因、多因素疾病，是多个基因相互作用的基因网络调控的结果，胃肠激素在胃癌发生、发展的过程中起着重要作用[5-6]. 生长抑素(somatostatin, SOM)是1973年Brazeau *et al*[7]从羊下丘脑中分离并提纯的，此后的研究证实生长抑素不仅存在于下丘脑，而且广泛分布于脑、胰、肠道神经细胞，对机体几乎所有的生理性内分泌反应均起抑制作用[8-9]. 大部分研究表明，SOM对正常细胞和肿瘤的生长增殖具有抑制作用[10-13]，但Koper *et al*[14]发现，SOM或其激动剂对体外培养的人脑膜瘤细胞没有抑制作用，反而具有刺激作用. Savage *et al*[15]和Tatsuta *et al*[16]对SOM和SOM的类似物SMS201-995在肿瘤发生中的作用进行研究发现，SOM对十二指肠肿瘤和胃癌非但没有抑制作用，反而促进其肿瘤发生. 生长抑素通过与膜上生长抑素受体(SSTR)结合起作用[17]. SSTR是一种膜蛋白受体，属G蛋白偶联受体家族，共有5个亚型，即SSTR1-SSTR5, SSTR各亚型由于序列的不同而导致与配体结合的亲和力不同[18]. SSTR分布广泛，包括内分泌细胞与淋巴细胞在内的许多正常细胞及肿瘤细胞等都能表达SSTR. SSTR具有识别不同化学信使的能力，并能通过一些直接或间接的偶联系统启动生物反应，但具体的信号传导途径不详[19]. 尽管大量文献报道SOM抗肿瘤作用机制，但看法不尽一致. Lahlou *et al*[20]认为通过Ras-, Rap1-, 和 B-Raf-ERK2激活有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)抑制细胞的增殖. Liang *et al*[21], Charland *et al*[22]报道SOM可以抑制肿瘤细胞Akt磷酸化和细胞周期启动. Hu *et al*[10]研究发现SOM类似物可诱导瘤细胞凋亡，同时伴随着肿瘤内增高的去磷酸化状态，SOM类似物已应用于神经内分泌肿瘤的治疗[23]. Mentlein *et al*[24]在神经胶质瘤细胞中发现SOM通过抑制

血管内皮生长因子抑制肿瘤生长. 对该基因进行功能研究是了解肿瘤发生、发展过程的重要策略, 不仅可以探究造成基因表型差异的遗传原因或外界原因, 而且对肿瘤的诊断和治疗具有重要的意义.

一般认为, 目前对基因功能的研究最有效的方法有两种: 一是观察该基因突变的表型改变, 这类改变可通过同源重组的方式直接诱导产生, 也可经研究某随机突变生物体中该基因损害而得到认识; 另一种是利用反义核酸技术特异性抑制该基因的表达, 从而研究该基因的功能, 但反义技术存在特异性不强、效率不高等缺点[25-26], 自1998年以来, RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术已成功应用于线虫、果蝇、斑马鱼、真菌、植物以及哺乳动物等生物的基因功能研究, 并且应用范围不断拓宽, 他的出现为基因功能研究提供了一种新的具有高效性和高度特异性的功能基因组研究策略[27-28]. siRNA作用靶序列的选择是RNA干扰的关键, 选择靶序列应遵循下列原则[29-31]: (1)选择GC含量在35%-50%之间的mRNA区域; (2)避免选择启动子起始部位下游50-100 nt内的区域或终止子上游50-100 nt内的区域; (3)避免超过3个G或3个C重叠. 多聚G或多聚C序列能产生堆积, 形成类聚物而干扰siRNA沉默机制; (4)选择以2个AA开始的序列, 这将使合成siRNA更加容易、更加经济和创建一个对核酸酶更有抵抗力的siRNA; (5)保证靶序列与其他基因没有同源性. 通过BLAST查询是否具有同源性, 以避免产生同一序列的基因干扰. 本实验设计并合成的siRNA能有效抑制SOM基因的表达, 为进一步研究SOM基因在胃癌发生、发展中的作用机制奠定了基础.

■**应用要点**

本实验体外合成了siRNA, 可在mRNA和蛋白质水平抑制胃癌细胞系SGC-7901生长抑素基因的表达, 为阐明生长抑素基因在胃癌发生、发展中的作用奠定了基础.

4 参考文献

1 Heidersbach A, Gaspar-Maia A, McManus MT, Ramalho-Santos M. RNA interference in embryonic stem cells and the prospects for future therapies. *Gene Ther* 2006; 13: 478-486

2 Omarov R, Sparks K, Smith L, Zindovic J, Scholthof HB. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *J Virol* 2006; 80: 3000-3008

3 Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 636-643

4 Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delporte C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 2006; 55: 327-333

5 Lindblad M, Garcia Rodriguez LA, Chandanos E, Lagergren J. Hormone replacement therapy and risks of oesophageal and gastric adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2006; 94: 136-141

6 Gower WR Jr, Premaratne S, McCuen RW, Arimura A, McAfee Q, Schubert ML. Gastric atrial natriuretic peptide regulates endocrine secretion in antrum and fundus of human and rat stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G638-G645

7 Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-79

8 Kao JY, Pierzchala A, Rathinavelu S, Zavros Y, Tessier A, Merchant JL. Somatostatin inhibits dendritic cell responsiveness to *Helicobacter pylori*. *Regul Pept* 2006; 134: 23-29

9 Hirsch AB, McCuen RW, Arimura A, Schubert ML. Adrenomedullin stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in the fundus of the stomach. *Regul Pept* 2003; 110: 189-195

10 Hu C, Yi C, Hao Z, Cao S, Li H, Shao X, Zhang J, Qiao T, Fan D. The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 726-730

11 Delaunoit T, Rubin J, Neczyporenko F, Erlichman C, Hobday TJ. Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 502-506

12 Zavros Y, Kao JY, Merchant JL. Inflammation and cancer III. Somatostatin and the innate immune system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G698-G701

13 Cascinu S, Del Ferro E, Catalano G. A randomised trial of octreotide *vs* best supportive care only in advanced gastrointestinal cancer patients refractory to chemotherapy. *Br J Cancer* 1995; 71: 97-101

14 Koper JW, Markstein R, Kohler C, Kwekkeboom DJ, Avezaat CJ, Lamberts SW, Reubi JC. Somatostatin inhibits the activity of adenylate cyclase in cultured human meningioma cells and stimulates their growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 543-547

15 Savage AP, Matthews JL, Adrian TE, Ghatei MA, Cooke T, Bloom SR. Effect of a long-acting analogue of somatostatin, SMS 201-995, on the development of intestinal tumours in azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis* 1987; 8: 561-563

16 Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Taniguchi H. Enhancement by somatostatin of experimental gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* 1989; 49: 5534-5536

17 Kolby L, Wangberg B, Ahlman H, Jansson S, Forssell-Aronsson E, Erickson JD, Nilsson O. Gastric carcinoid with histamine production, histamine transporter and expression of somatostatin receptors. *Digestion* 1998; 59: 160-166

18 Smith WH, Nair RU, Adamson D, Kearney MT, Ball SG, Balmforth AJ. Somatostatin receptor subtype expression in the human heart: differential expression by myocytes and fibroblasts. *J Endocrinol* 2005; 187: 379-386

19 Volante M, Bozzalla-Cassione F, Papotti M. Somatostatin receptors and their interest in diagnostic pathology. *Endocr Pathol* 2004; 15: 275-291

20 Lahlou H, Saint-Laurent N, Esteve JP, Eychene A, Pradayrol L, Pyronnet S, Susini C. sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-,

■同行评价
立题有一定的科学性，SOM对胃癌细胞作用如何还未定论，因此siRNA抑制SOM基因的表达具有意义.

Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 39356-39371
21 Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2003; 2: 339-345
22 Charland S, Boucher MJ, Houde M, Rivard N. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 2001; 142: 121-128
23 Kaltsas GA, Papadogias D, Makras P, Grossman AB. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 683-699
24 Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J. Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer* 2001; 92: 545-550
25 Thaler S, Rejdak R, Dietrich K, Ladewig T, Okuno E, Kocki T, Turski WA, Junemann A, Zrenner E, Schuettauf F. A selective method for transfection of retinal ganglion cells by retrograde transfer of antisense oligonucleotides against kynurenine aminotransferase II. *Mol Vis* 2006; 12: 100-107
26 Maksimenko A, Polard V, Villemeur M, Elhamess H, Couvreur P, Bertrand JR, Aboubakar M, Gottikh M, Malvy C. *In Vivo* Potentialities of ews-fli-1 targeted antisense oligonucleotides-nanospheres complexes. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1058: 52-61
27 Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13: 83-105
28 Arias CF, Dector MA, Segovia L, Lopez T, Camacho M, Isa P, Espinosa R, Lopez S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* 2004; 102: 43-51
29 Shabalina SA, Spiridonov AN, Ogurtsov AY. Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 65
30 Ramakrishnan VG, Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC. Application of RNA interference in tick salivary gland research. *J Biomol Tech* 2005; 16: 297-305
31 Aronin N. Target selectivity in mRNA silencing. *Gene Ther* 2006; 13: 509-516

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的新进展及原创性等基础或临床研究的文章.

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet. com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 789–794
ISSN 1009–3079 CN 14–1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

幽门螺杆菌重组VacA蛋黄抗体的体外活性

毛小琴, 杨致邦, 张绍兰, 田一玲, 黄 进

毛小琴, 杨致邦, 张绍兰, 田一玲, 黄进, 重庆医科大学基础医学院微生物学教研室, 重庆, 400016
毛小琴, 2002年重庆医科大学硕士. 主要从事幽门螺旋杆菌感染的研究.
通讯作者: 杨致邦, 400016, 重庆市, 重庆医科大学基础医学院微生物学教研室. dryangfm365@sina.com
电话: 023–68485090 传真: 023–68486859
收稿日期: 2006–01–07 接受日期: 2006–01–26

In vitro activity of IgY against recombinant VacA protein of *Helicobacter pylori*

Xiao-Qin Mao, Zhi-Bang Yang, Shao-Lan Zhang, Yi-Ling Tian, Jin Huang

Xiao-Qin Mao, Zhi-Bang Yang, Shao-Lan Zhang, Yi-Ling Tian, Jin Huang, Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Bang Yang, Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China. dryangfm365@sina.com
Received: 2006–01–07 Accepted: 2006–01–26

Abstract

AIM: To explore the physicochemical and biological properties of IgY extracted from the yolk of hen's egg immunized with recombinant VacA protein of *Helicobacter pylori*.

METHODS: The purified antigen of recombinant VacA was used to immunize the hens and the VacA-IgY antibody was extracted from the yolk of hen's egg by water dilution methods and then purified by deposition technique with ammonium sulfate. In order to evaluate VacA-IgY heat stability, the titer of VacA-IgY was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after being heated for 15 min under different temperatures. VacA-IgY was added into Tris-HCl of different pH values and incubated under a temperature of 37℃ to access its acid stability using ELISA. The competence of anti-pepsin digestion was also measured by ELISA. The $VacA^+$ *H pylori* were co-cultured with Hela cells and VacA-IgY antibody was added to observe its neutralization on the cytotoxity of *H pylori* by MTT assay *in vitro*.

RESULTS: The activity of VacA-IgY was maintained about 50% after water baths (70℃, 15 min). The activity of VacA-IgY seldom changed at pH values 5.0-7.0, but declined rapidly below the pH value 5.0, even absolutely disappeared at pH value 2.0. After incubation with pepsin (pH4.0, 60 kU/L) for 1 h, the activity of VacA-IgY had no changes, and 2 h after incubation, it still maintained over 50%. The VacA-IgY antibody neutralized the cytotoxity of $VacA^+$ *H pylori* in a concentration-dependent manner. $VacA^+$ *H pylori* ultrasonic extracts inhibited 50% proliferation of Hela cells at a concentration of 20 mg/L, while VacA-IgY completely neutralized the cytotoxity of *H pylori* at concentrations of 80-320 mg/L ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The VacA-IgY antibody shows a good heat stability, certain acid stability, and competence of anti-pepsin digestion, and can neutralize the cytotoxity of VacA protein of *H pylori* effectively *in vitro*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; VacA; Recombinant protein; Activity; Hen-egg yolk antibody; Cytotoxity

Mao XQ, Yang ZB, Zhang SL, Tian YL, Huang J. *In vitro* activity of IgY against Recombinant VacA in *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):789-794

摘要

目的: 制备幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)重组VacA的鸡蛋黄抗体IgY(VacA-IgY), 了解其理化特性和生物学活性, 评价其抗*H pylori*感染的作用.

方法: 以纯化的重组VacA免疫产蛋鸡, 水稀释法提取蛋黄抗体(VacA-IgY), 硫酸铵沉淀法纯化IgY. 将一定浓度的VacA-IgY在不同温度的水浴中维持一定时间, 评价其耐热性; 在不同pH的Tris-HCl中孵育一定时间, 评价其耐酸性; 加入胃蛋白酶并作用一定时间后, 评价其对酶消化的耐受作用. 以上评价均采用ELISA

■背景资料
幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)与胃部疾病的发生、复发有关. 对已感染者的大量研究表明, 多种抗生素和铋剂的联合应用是清除*H pylori*的有效方法, 但10%-15%的病例由于细菌产生耐药性而治疗失败. 而且随着抗生素的应用, 耐药菌株不断增加. 寻找清除*H pylori*感染的有效措施是临床急需解决的问题, 也是研究的热点和重点.

■**创新盘点**
本文对制备的IgY进行了体外活性测定, 与其他研究者不同的是, 在设计稳定性试验时, 紧密联系IgY作为口服制剂应用于人体的要求, 充分考虑到胃内正常与异常情况下的pH环境和胃蛋白酶的浓度, 为下一步应用于体内的动物实验奠定坚实的基础. 研究发现, 制备的IgY具有良好的稳定性和生物学活性, 有望作为口服制剂应用于*H pylori*的治疗.

法测定抗体效价变化. 采用Hela细胞体外培养MTT法分析VacA-IgY对*H pylori*细胞毒活性的中和作用.

结果: 本实验制备的VacA-IgY在70℃水浴15 min后活性保持约50%; 在pH≥5时, 抗体活性几乎无改变, pH<5时, 抗体活性下降较快, pH2.0左右, 抗体活性几乎丧失; pH4.0时, 60 kU/L胃蛋白酶作用1 h, 抗体活性几乎无变化, 2 h后活性仍保持50%以上. VacA-IgY能浓度依赖性地中和*H pylori*菌体蛋白的Hela细胞毒活性. 20 mg/L超声提取物即可降低1/2的Hela细胞增殖能力, 80-320 mg/L的VacA-IgY能完全中和*H pylori*菌体蛋白的Hela细胞毒活性(P<0.01).

结论: 成功制备了重组VacA的IgY, 且具有较好的耐热性、耐胃酶消化和一定的耐酸性; 在其体外具有中和*H pylori*细胞毒活性的作用.

关键词: 幽门螺杆菌; 细胞空泡毒素; 重组蛋白; 蛋黄抗体; 活性; 细胞毒性

毛小琴, 杨致邦, 张绍兰, 田一玲, 黄进. 幽门螺杆菌重组VacA蛋黄抗体的体外活性. 世界华人消化杂志 2006;14(8):789-794
http://www. wjgnet. com/1009-3079/14/789. asp

0 引言

胃部疾病的发生、复发和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*) 感染有关[1-14]. *H pylori*感染呈全世界流行, 人群中有50%-60%感染, 发展中国家则可高达70%-90%. 近年的研究发现, *H pylori*感染者患胃癌的危险性是未感染者的4-6倍[15]. 细胞空泡毒素抗原(vacuolating cytotoxin antigen, VacA)是*H pylori*引起细胞损伤的主要毒力因子, 可导致细胞空泡样变性和细胞死亡, 与消化性溃疡和胃癌的细胞病变相关, 并具有良好的免疫原性[16-20]. 因此针对VacA毒株感染的防治措施显得尤为重要. 目前*H pylori*的治疗多采用多种抗生素联合疗法, 但其易产生副作用、治疗费用高和耐药菌株产生等问题, 使得寻找抗生素替代疗法成为迫切需要并具有重要意义. 1893年Klemperer发现母鸡的抗体可从血清传递至蛋黄中, 赋予鸡胚和雏鸡被动免疫. 由于鸡蛋黄的英文名称为Yolk, 故将鸡蛋黄中的免疫球蛋白IgG命名为IgY. IgY具有突出的生物学优势, 近年来将之用于人类疾病的治疗也受到关注. 众多研究已证实蛋黄抗体(IgY)为一种有效的被动免疫制剂, 尤其是防治胃肠道感染性疾病方面有很好的效果[21-23]. Mine *et al*[24]总结了IgY的治疗作用后表明口服IgY是抗人胃肠道病原的有效防治制剂. 我们探讨*H pylori*重组细胞空泡毒素蛋黄抗体(vacuolating cytotoxin antigen IgY, VacA-IgY)的理化特性和体外中和*H pylori*细胞毒活性的作用. 为进一步研究IgY在体内的抗*H pylori*感染作用和开发治疗性IgY抗体制剂奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 $VacA^+$ *H pylori*菌株从重庆医科大学附属第一医院胃镜室提供的胃窦黏膜中, 经自制*H pylori*选择培养基分离培养, 鉴定后保存. Hela细胞为重庆医科大学病理生理学教研室馈赠. VacA阳性株*H pylori*重组蛋白VacA, 菌体蛋白抗原为本室制备保存[25]. $VacA^+$血清为本室用Helico Blot试剂盒从*H pylori*阳性患者血清筛选并保存. 胎牛血清、RPMI-1640、胰蛋白酶(1∶250)、MTT、DMSO均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品. 胃蛋白酶(Pepsin 1∶3 000)为上海生工生物工程公司产品. HRP标记的羊抗人IgG为BioRad公司产品. HRP标记羊抗鸡IgY为Promega公司产品. 布氏肉汤为北京陆桥商检新技术公司产品. 22周龄洛曼产蛋鸡, 由西南农业大学荣昌分校生物中心提供.

1.2 方法 选22周龄健康产卵洛曼鸡, 按该种属鸡要进行饲养. 将重组VacA蛋白抗原与等体积完全弗氏佐剂混匀并充分乳化后, 胸肌多点肌肉注射洛曼鸡作基础免疫, 剂量为100 μg/只. 分别于第1次免疫后15, 45, 75 d改为不完全弗氏佐剂颈背部皮下多点注射进行第2, 3, 4次加强免疫, 免疫剂量分别是200 μg/只, 300 μg/只, 300 μg/只. 于第1次免疫后15 d开始每天收集鸡蛋, 编号后于4℃保存, 并留取免疫前的鸡蛋作阴性对照. 取免疫后所产鸡蛋, 弃蛋壳、蛋清及卵黄衣膜, 取出蛋黄(约10 mL/只), 用无菌双蒸水稀释10倍, 充分振荡混匀后置4℃过夜; 然后10 000 *g*低温超速离心20 min, 收集上清, 再在上清液中加入饱和硫酸铵使终浓度达500 mg/L, 经充分均匀搅拌后, 于4℃放置2 h, 15 000-20 000 *g*离 15-20 min后收集沉淀. 再将沉淀溶于原体积的1 mmol/L的磷酸盐缓冲液(或生理盐水)中, 并加入饱和硫酸铵, 使其浓度达330 mg/L, 离心收集沉淀. Bradford法测定蛋白含量, ELISA法检测抗体效价.

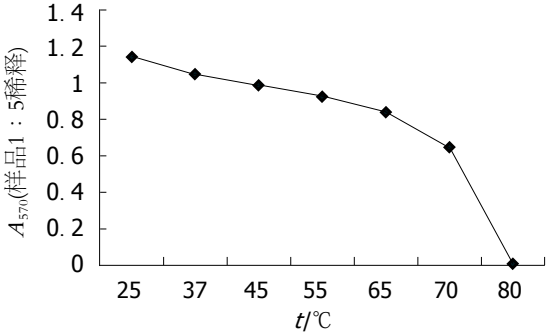


图 1 VacA-IgY热稳定性.

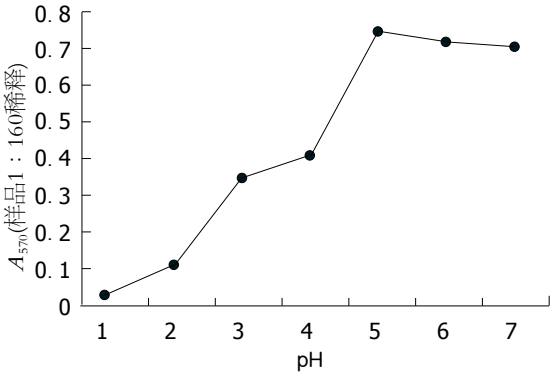


图 2 VacA-IgY耐酸性.

1.2.1 IgY稳定性试验 用pH 7.0的0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液将IgY稀释成1 g/L, 分别放入25, 37, 45, 56, 65, 70, 80, 90℃水浴中维持15 min, ELISA法测定抗体效价. 分别用pH值为1, 2, 3, 4, 5, 6, 7的0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液将IgY分别稀释成1 g/L, 37℃孵育2 h, 立即加入适量的2 mol/L Tris碱中和, 使pH值均为7.0, ELISA法测定IgY的抗体效价. 用无菌的pH 4.0, 0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液将IgY稀释成1 g/L. 在100 μL IgY溶液中分别加入5, 10 μL上述胃蛋白酶溶液, 37℃分别作用1, 2, 4, 8 h后, 用2 mol/L Tris碱调整pH至7.0, 同时设立空白对照; ELISA法测定IgY抗体效价.

1.2.2 VacA-IgY的活性 采用MTT法, 本实验方法参见文献[26]. 收集选择性培养基培养3 d的VacA$^+$ *H pylori*菌体, 离心(4℃, 8 000 *g*)10 min, PBS洗涤2次后用小体积PBS重悬, 冰浴下超声破碎10 min, 离心(4℃, 12 000 *g*)20 min收集上清, 沉淀再次冰浴超声破碎10 min, 重复上述过程一次, 合并两次上清, Bradford法测定蛋白含量. 吸取200 μL(1×10^8 个/L)Hela细胞培养液转种于96孔细胞培养板孔中, CO_2孵箱(37℃, 50 mL/L CO_2, 饱和湿度)中培养24 h. 实验孔加入10, 20, 40, 80, 160, 320 mg/L的超声提取物, 每个稀释度作4孔平行. 同时设空白孔、对照孔. 空白孔只加入RPMI-1640培养液200 μL, 不加细胞和超声提取物, 对照孔加细胞但不加超声提取物. 以上各组在CO_2孵箱(37℃, 50 mL/L CO_2, 饱和湿度)中继续培养48 h后, 1 000 r/min离心后弃去上清, 每孔加入200 μL不含血清的RPMI-1640和20 μL 5 g/L MTT溶液, 37℃继续孵育4 h. 离心后弃去孔内培养液, 每孔加入DMSO 150 μL, 振荡10 min. 以空白孔调零, 测定实验组和对照组的570 nm吸光度值(A_{570}), 计算各个稀释度4孔A_{570}平均值(mean), 用mean±SD表示各稀释度的A 值. 以不加超声粉碎提取物(对照组)的细胞存活率为100%, 以细胞存活率＝实验组A_{570}值/对照组A_{570}值×100%计算细胞存活率, *t*检验分析计算结果. 吸取200 μL(2×10^8 个/L)Hela细胞培养液转种于96孔细胞培养板孔中, CO_2孵箱(37℃, 50 mL/L CO_2, 饱和湿度)中培养24 h. 将60 mg/L超声提取物与不同浓度IgY(10, 20, 40, 80, 160, 320 mg/L)按1∶1混合, 37℃作用2 h后吸20 μL加入细胞板孔中. 同时设立对照组和空白组. 每组作4个复孔. 其余方法同上.

2 结果

2.1 VacA-IgY稳定性 Bradford法测定蛋白含量为25.66 g/L, ELISA法测定抗体效价为1∶12 800. 制备的IgY在低于55℃时抗体活性无明显改变, 效价稳定. 在70℃, 15 min条件下仍能保持约50%的活性(图1). IgY在pH 5-7时, 抗体活性几乎无改变, pH<5时, 抗体活性下降很快, 在pH 2.0左右, 抗体活性几乎完全丧失(图2). 在pH 4.0, IgY与40-60 ku/L胃蛋白酶(体内正常浓度)共同温育1 h可保持其抗体效价, 在超过正常胃蛋白酶浓度(120 kU/L)时仍能保持50%以上的抗体效价. 总体来讲, VacA-IgY在胃蛋白酶存在情况下, 活性下降得很快(表1).

2.2 *H pylori*超声提取物的Hela细胞毒活性 MTT测定结果显示, *H pylori*超声裂解蛋白明显降低Hela细胞的增生能力. 20 mg/L超声提取物即可降低Hela细胞增生能力的1/2, 随超声提取物浓度的增高, 细胞的增生能力逐渐降低(表2).

2.3 VacA-IgY对超声提取物细胞毒活性的中和作用 MTT结果显示, IgY浓度为320-80 mg/L可完全中和超声提取物对Hela细胞的毒性作用; 随着IgY浓度的降低, 其中和作用也随之降低(表3).

3 讨论

用*H pylori*超声裂解全菌蛋白制备的IgY的抗感

■同行评价

本文研究成功制备重组Va-cA的IgY, 并且具有良好的耐热性、耐酸性, 在体外具有中和*H pylori*细胞毒性作用, 具有临床意义和使用价值. 本文章具有科学性、创新性和可读性, 较好地反映了我国目前在胃肠病学基础和临床对*H pylori*的研究水平.

表 1 VacA-IgY耐胃蛋白酶消化测定

胃蛋白酶 (1 200 kU/L)	消化时间 (h)	IgY滴度
5 μL	1	1∶320
5 μL	2	1∶80
5 μL	4	1∶20
5 μL	8	0
10 μL	1	1∶160
10 μL	2	1∶40
10 μL	4	1∶10
10 μL	8	0
对照	0	1∶320

表 2 *Helicobacter pylori*菌体蛋白诱导Hela细胞毒反应 (MTT, mean ± SD)

Ag (mg/L)	A_{570} (mean ± SD)
20	0.591 ± 0.118[b]
40	0.462 ± 0.121[b]
60	0.351 ± 0.092[b]
80	0.213 ± 0.082[b]
160	0.102 ± 0.051[b]
320	0.071 ± 0.030[b]
对照	1.233 ± 0.152

[b]P<0.01 *vs* 对照.

表 3 VacA-IgY对*Helicobacter pylori*菌体蛋白细胞毒活性的中和作用 (MTT, mean ± SD)

IgY (mg/L)	A_{570} (mean ± SD)
320	1.108 ± 0.131
160	1.151 ± 0.183
80	1.122 ± 0.157
40	0.601 ± 0.133[b]
20	0.354 ± 0.177[b]
10	0.122 ± 0.055[b]
0	0.031 ± 0.023[b]
对照	1.133 ± 0.131

[b]P<0.01 *vs* 对照.

染作用虽有报道[27], 但有研究发现这种IgY无抗VacA的活性, 故限制了其应用[28]. 制备特异的有抗VacA活性的IgY将更有临床意义和应用价值. 用*H pylori*培养物提取的天然VacA作抗原制备的IgY的抗感染作用虽有报道[29], 但由于诸多因素使其应用受到限制: (1)*H pylori*培养条件苛刻, 成本高, 大量培养较困难; (2)VacA基因存在所有的菌株中, 但仅在50%-60%的菌株表达; (3)从培养物中提取VacA程序复杂, 得率极低; (4)VacA基因呈多态性, 导致不同来源的菌株表达的蛋白在结构上有一定差异. 因此用天然VacA来大量生产IgY生物制剂效率极低, 且均一性欠佳. 目前基因工程技术成熟、简便, 可容易地大量获得均一性的目的蛋白. 用重组VacA为抗原制备IgY和其抗*H pylori*感染的作用国内外尚无报道. 我们通过BLAST对5株有代表性的中国菌株VacA毒性亚单位进行同源性比较, 得到一个高度同源的基因片段为待表达的目的基因, 利用基因工程技术克隆表达并纯化了重组VacA蛋白, 以此作免疫原大量制备了高浓度、高效价、高纯度和高特异性的蛋黄抗体(VacA-IgY). 有望获得更适用于国内临床的免疫制剂用于*H pylori*诊断和防治. 我们考虑到本IgY可能作为一种口服制剂或食品添加剂, 必须具有耐热、耐酸、耐胃蛋白酶消化的特性, 故考察了其在体外不同温度、酸性和胃酶环境中的稳定性.

巴氏消毒法是对牛奶、啤酒等不能进行高温灭菌的食品进行消毒的一种常用方法, 其主要目的是杀死无芽胞的病原菌, 而又不影响食品的营养成分. 现食品生产上常用高温瞬时法, 即只需在72℃保持15 s即可. 本研究制备的VacA-IgY在低浓度(1 g/L)、72℃维持15 min也能保持50%以上的活性, 说明VacA-IgY若制成口服制剂或用作食品添加剂可完全经受巴氏消毒法中的高温瞬时法. 胃内生态环境最主要的特点是酸性. 胃壁细胞和喷门、幽门腺体的分泌液构成胃液, 含有盐酸和胃蛋白酶等. 儿童胃腺体和杯状细胞较少, 盐酸和各种酶的分泌量较成人低. 1岁内的儿童, 吸乳时胃液pH为3.5-5.5, 4-9岁时, 胃酸的分泌量为42.5 mL/h(成人为146 mL/h), H^+的产生量为成人的1/3. 这也可能是儿童易受*H pylori*感染的原因之一. 因此, IgY作为防治胃肠道感染的口服制剂必须能抵抗胃内的强酸环境才能凑效. 本研究制备的VacA-IgY在pH 5-7时抗体活性几乎无改变, 在pH 3-4时活性保持50%左右, 但在pH 2时活性几乎完全丧失. 由于5 mo以内的婴儿胃内pH值通常为4-5, 2岁以内也不小于3, 说明VacA-IgY可用于防治婴幼儿胃肠道感染. 但在成人胃内pH环境, 该IgY不能保持活性. 这表明该IgY要用于成人胃肠道感染, 必须加入适量的保护剂. 另外, IgY到达胃内时易受胃蛋白酶降解而失活. Gutierrez *et al*[30]发现胃蛋白酶对IgY生物活性作用小, 但在pH 2.0时胃蛋白酶可完全灭活IgY. 本实验考虑到IgY在pH小于4时抗体活性下降, 而胃蛋白酶在pH大于4时活性几乎丧失, 故采用pH 4.0的Tris-HCl配制IgY溶液和胃蛋白酶. 同时考虑到

成人胃内胃蛋白酶正常浓度为40-60 ku/L(取其高限值60 ku/L), 按1∶20体积比加入VacA-IgY溶液中后其终浓度达到60 ku/L, 故配制1 200 ku/L的胃蛋白酶原液. 并比较胃蛋白酶在生理浓度和病理浓度情况下IgY抗体活性的变化. 结果显示, VacA-IgY对正常浓度的胃蛋白酶有较好的耐受能力, 甚至在胃蛋白酶浓度异常增高至正常浓度2倍时, IgY仍能保持一定的活性. 因此特异性IgY口服进入消化道后, 有望在胃内发挥良好的作用.

我们制备的重组VacA-IgY在大于80 mg/L时可完全中和VacA$^+$ *H pylori*超声提取物对Hela细胞的毒性作用, 说明用重组VacA毒性片段制备的VacA-IgY也具有天然VacA制备的IgY中和*H pylori*细胞毒活性的作用. 我们首次成功制备了针对重组VacA的特异性的、大量的、高纯度的蛋黄抗体. 但仍存在许多问题, 如耐酸性和耐酶消化的能力不太理想. 后续工作将进一步探索如何提高抗体的耐酸性和耐酶消化的特性, 以保证抗体在胃内活性的保持和作用的发挥, 为探讨该抗体在动物体内抗*H pylori*作用的研究提供实验依据, 为制备IgY口服制剂或食品添加剂奠定基础.

4 参考文献

1 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶C在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 302-307

2 徐灿, 金霞东, 李兆申.幽门螺杆菌与胃食管反流病.世界华人消化杂志 2001; 9: 679-681

3 王东旭, 房殿春, 李为, 杜群先, 刘为纹. 幽门螺杆菌感染与抑癌基因失活的关系. 世界华人消化杂志 2001; 9: 984-987

4 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1045-1049

5 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 801-804

6 宋春芳, 袁媛. 细胞凋亡与胃癌及幽门螺杆菌相关胃疾病. 世界华人消化杂志 2002; 10: 427-429

7 于君, 沈祖尧. 幽门螺杆菌感染所致胃黏膜分子生物学行为改变在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2002; 10: 499-502

8 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 幽门螺杆菌感染与胃肠外疾病关系的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 706-709

9 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 912-915

10 Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1103-1107

11 Hu GY, Yu BP, Dong WG, Li MQ, Yu JP, Luo HS, Rang ZX. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 910-914

12 徐智民, 张万岱, 周殿元. 幽门螺杆菌的研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 635-639

13 Mitani K, Tatsuta M, Iishi H, Yano H, Uedo N, Iseki K, Narahara H. *Helicobacter pylori* infection as a risk factor for gastric ulceration. *Hepatogastroente-rology* 2004; 51: 309-312

14 崔梅花, 胡伏莲. 幽门螺杆菌的致病因子. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1993-1996

15 Testino G. Immature cells and *Helicobacter pylori* infection in early gastric cancer. An immunohistochemical study. *Minerva Med* 1997; 88: 183-186

16 Muller I, Medina-Selby A, Palacios JL, Martinez P, Opazo P, Bruce E, Mancilla M, Valenzuela P, Yudelevich A, Venegas A. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H pylori* strain with other *H pylori* strains revealed higher variab-ility for VacA and CagA virulence factors. *Biol Res* 2002; 35: 67-84

17 Pessina A, Bayo M, Croera C, Meringolo F, Neri MG, Montesissa L, Raimondi A. *In vitro* sensitivity of human gastric cancer cells (HGC-27) to *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1228-1234

18 Tabel G, Hoa NT, Tarnawski A, Chen J, Domek M, Ma TY. *Helicobacter pylori* infection inhibits healing of the wounded duodenal epithelium *in vitro*. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 421-430

19 Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* 2004; 6: 143-154

20 Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 198: 1887-1897

21 Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. *Poult Sci* 2002; 81: 632-641

22 Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, Hammarstrom L. Randomized, placebocontrolled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 19-25

23 王忠泽, 侯小军, 荫俊, 宋伟, 张松乐, 王威, 白洁. 抗大肠杆菌O157: H7鸡蛋黄抗体的制备及其被动保护作用的研究. 中国人兽共患病杂志 2002; 18: 17-19

24 Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food* 2002; 5: 159-169

25 刘淼, 杨致邦, 林珊珊, 吴利先. 幽门螺杆菌vacA毒性片段与hpaA融合基因的原核表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1096-1099

26 司徙镇强, 吴军正. 细胞培养. 第1版. 北京: 世界图书出版公司, 2004: 250-252

27 Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn*

Lab Immunol 2002; 9: 1061-1066
28 Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol* 2003; 52: 217-222
29 陈翠萍, 杨朝晖, 王永谦. IgY抗体在体外和体内对幽门螺杆菌作用的研究. 中华微生物和免疫学杂志 2002; 22: 37-40
30 Gutierrez Calzado E, Cruz Mario E, Samon Chavez T, Vazquez Luna E, Corona Ochoa Z, Schade R. Extraction of a monospecific Coombs-reagent from chicken eggs. *ALTEX* 2003; 20: 21-25

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行.

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授, 国际肝胆胰协会侯任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会. 会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功.

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像. 大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加.

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加.

本次会议已列入2006年国家级继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分.

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件. 以附件的形式发送至chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 795-799
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

磷脂酶A_2在炎症反应中的作用

杨银治, 夏时海

杨银治, 夏时海, 武警医学院附属医院消化内科胰腺中心 天津市 300162
国家自然科学基金资助项目, No.30300465
武警医学院科研基金资助项目, No.WY2002-19
通讯作者: 夏时海, 300162, 天津市河东区, 武警医学院附属医院消化内科胰腺中心. xshhcx@sohu.com
电话: 022-60578765 传真:022-24370605
收稿日期: 2005-12-31 接受日期: 2006-01-21

摘要

磷脂酶A_2是一类催化磷脂二位酰基水解的酶族, 主要分为三种类型: 分泌型、胞浆型、非钙离子依赖型, 其结构特点的差异导致其功能千差万别. 磷脂酶A_2参与多种急、慢性炎症反应, 是花生四烯酸、溶血磷脂等炎性介质生成的限速酶, 他促进了一系列炎性介质和细胞因子的大量释放和激活, 在炎性病变的发生和发展过程中起重要的作用, 直接影响其发展和预后.

关键词: 磷脂酶A_2; 炎症

杨银治, 夏时海. 磷脂酶A_2在炎症反应中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(8):795-799
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/795.asp

0 引言

磷脂酶A_2(phospholipase A_2, PLA_2)是一类催化磷脂二位酰基(Sn-2)水解的酶族, 分多种类型和亚型, 分布广泛, 具有产生二十烷酸类炎性介质、参与磷脂重建、肺泡表面活性物质代谢、细胞信号传递、宿主反应和促进血液凝固等多种作用. 在肺脏、心血管、胃肠道、皮肤、骨骼等系统的急、慢性炎症反应中, PLA_2活性均有增高并介导一系列病理生理过程[1], 在参与炎症反应的过程中, 在许多炎症介质和细胞因子的表达激活的网络调节中起着“扳机样”作用, 促进局部炎症病变向全身多系统多脏器发展, 在危重症的发生、发展及组织的损伤和再损伤中起着重要的作用. 本文就其结构特点及其与炎性反应的关系予以综述.

1 PLA_2的分类、结构及生物学特点

根据存在部位、氨基酸顺序同源性和生化功能特征, PLA_2一般分为三种类型: 分泌型、胞质型和Ca^{2+}非依赖型.

1.1 分泌型($sPLA_2$) 该型包括PLA_2-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅸ和Ⅹ, 为小分子水溶性的蛋白质, 他们都含有一个含组氨酸和天门冬氨酸的催化部位, 其最大活性都依赖于结合在酶活性中心的Ca^{2+}浓度以及适宜的pH条件.

Ⅰ型PLA_2以酸性pH为最适条件, 分子量为13-15 ku, 来源于眼镜蛇科、环蛇科的蛇毒和哺乳动物的胰腺, 其中胰腺来源的ⅠB型$sPLA_2$在食物脂质消化中起作用, 有学者用knockout鼠(ⅠB型$sPLA_2$高表达)做实验, 与正常鼠对照, 给knockout鼠高脂饮食, 发现ⅠB型$sPLA_2$在高脂饮食引起的肥胖和胰岛素抵抗方面有抑制作用[2].

Ⅱ型PLA_2分子量也是13-15 ku, 但是以碱性pH为最适条件; 在正常情况下, Ⅱ型PLA_2广泛分布于哺乳动物的组织和细胞中及响尾蛇科、蝰蛇科毒液中, 但是Ⅱ型PLA_2酶活性变化相当大[3-4]. 用Northern印迹分析发现Ⅱ型PLA_2还存在于胎盘中, 在妊娠后期急剧增加, 推测可能与分娩有关[5]. Ⅱ型PLA_2对底物Sn-2位点没有选择性, 正常情况Ⅱ型PLA_2不引起细胞磷脂的水解[6]. 在结构上Ⅱ型PLA_2在近催化位点存在与Ca^{2+}高度亲和力的区域, 在5'端含有cAMP和IL-26反应序列. 当cAMP和几个细胞因子水平增高时, 可在转录水平调控Ⅱ型PLA_2, 在活性中心以外还存在一个碱性氨基酸残基序列, 为肝素结合位点, Ⅱ型PLA_2与肝素有高度亲和力[6]. Ⅱ型PLA_2亦来源血小板, 故也称为血小板型 PLA_2, 最近发现他在抗菌、动脉粥样硬化和肿瘤方面起重要的作用[7-8]; 在急性胰腺炎多器官衰竭过程中发挥重要作用[9].

在$sPLA_2$Ⅴ缺乏鼠中分离得到的巨噬细胞, 用酵母多糖诱导其产生白细胞三烯C_4和前列腺素E_2(PGE_2), 产生量仅有正常鼠的一半[10], 结果表明在急性炎症反应中$sPLA_2$Ⅴ在调控类花生四烯酸物质反应中对免疫系统也产生调控作用[7]. 另外发现$sPLA_2$Ⅴ和$sPLA_2$Ⅹ水解脂蛋白颗粒中磷酸卵磷脂比ⅡA型PLA_2更有效, 近来已证实$sPLA_2$

■**背景资料**
PLA_2是一类催化磷脂二位酰基水解的酶族, 分多种类型和亚型, 分布广泛, 作用多样, 特别是在炎症反应中起重要的作用, 近年来国内外有了大量的报道, 不仅参与了炎症反应的发生、发展, 而且在感染早期宿主的防御中起重要的作用, 本文就PLA_2的结构、生物学特点、在炎症反应中的活化、与其他炎症因子的相互调控作用及临床意义进行了综述.

■同行评价
本文介绍了磷脂酶A_2结构特点及其与炎性反应的关系, 认为磷脂酶A_2在调控多种主要的炎性介质生成的过程中发挥着举足轻重的作用. 内容较为全面, 学术价值较高, 有一定新颖性.

Ⅴ和sPLA$_2$Ⅹ在活体动脉粥样硬化损害中的作用, 因此Makoto Murakami推断他们在动脉粥样硬化发展过程中起很大作用[7].

1.2 胞质型(cPLA$_2$) 该型包括cPLA$_2$A、cPLA$_2$B、cPLA$_2$C、cPLA$_2$D和PLA$_2$-IV. cPLA$_2$A的分子质量为85 ku, 广泛存在于体内各种组织的细胞中, 其催化活性不依赖于Ca^{2+}. 该酶含有一个CaLB区, 类似于一些信号转导蛋白的C-2结合区域. cPLA$_2$和其他PLA$_2$没有同源性, 是唯一一个已明确对Sn-2位的花生四烯酸(AA)具有优先选择性的PLA$_2$.该酶具有溶血磷脂酶和转酰基酶的作用. 当小于毫摩尔级浓度的Ca^{2+}存在时, 有助于他向膜的转位, 已经证明以CaLB区介导的cPLA$_2$从细胞质移位到核周膜是激动剂刺激细胞产生脂质介质和AA所必需的. cPLA$_2$可能在精神分裂症的发病过程中起一定作用[11]; 也是唯一一个在促性腺素刺激下产生花生四烯酸的过程中起作用的PLA$_2$[12]; cPLA$_2$C被发现有辅酶A(CoA)依赖性的转酰基和溶血磷脂超氧化物歧化酶的作用, 参与磷脂的脂肪酸的重塑和细胞内的有毒性的溶血磷脂的清除[13]; 最近又发现cPLA$_2$D可能在银屑病的发病机制中有着重要的意义[14].

1.3 Ca^{2+}非依赖型(iPLA$_2$) 包括PLA$_2$-Ⅵ、Ⅶ和Ⅷ. Ⅵ型是非钙离子依赖性的胞浆型PLA$_2$, 分子质量为80-85 ku, 他能被ATP激活, 并且以聚合体的方式起作用. Ⅶ型存在于血浆中, 为45 ku的不依赖于Ca^{2+}的分泌型PLA$_2$. Ⅷ型也是胞浆型和Ca^{2+}非依赖性的. PLA$_2$-VIA被认为是一种细胞凋亡的调控器, 缺氧细胞死亡不依赖于胱门蛋白酶, 而和PLA$_2$-VIA诱导的核固缩有关, 缺氧引起PLA$_2$-VIA活性升高, PLA$_2$-VIA移位到核内, 这种核萎缩和细胞死亡能被PLA$_2$-VIA的抑制剂BEL所抑制[15]. 这表明PLA$_2$-VIA在不依赖于胱门蛋白酶而诱导的细胞核固缩的凋亡途径中起重要作用. 近来又有学者发现PLA$_2$-VIA不仅对各种类型细胞的膜磷脂的稳定性起作用, 而且在细胞的刺激-应激偶联中发挥重要的作用[16].

PLA$_2$-VIB因为翻译过程中起始位点的不同, 导致有88 ku、77 ku、74 ku和63 ku蛋白变体, 他有一个定位于溶酶体的碳端[17]. 在鼠的肝脏中, PLA$_2$-VIB以一个63 ku的蛋白存在, 并且定位于溶酶体[18]; 溶酶体膜富含有包括游离脂肪酸的磷脂, 可能这有助于类花生酸的产生[7].

2 PLA$_2$在炎性反应中的作用及其机制

业已证实, AP时伴有促炎细胞因子升高, 且其升高幅度与AP的严重程度密切相关[19]; 而PLA$_2$的激活及异常表达也与多种细胞因子如肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)及IL-8等的表达诱导相关. 因此, PLA$_2$及TNF-α、血小板活化因子(PAF)、IL-1 IL-6及IL-8等CKs网络在危重病进展中起着十分重要的作用, 而PLA$_2$或许是其网络中的中心环节[20]. PLA$_2$作为一个重要的炎症因子, 特别是Ⅱ型PLA$_2$和cPLA$_2$A, 这两个细胞信号转导的重量级分子, 像“扳机”(trigger)一样, 在调控多种主要的炎性介质生成的过程中发挥着举足轻重的作用.

2.1 Ⅱ型PLA$_2$的作用及其机制

2.1.1 水解膜磷脂 外界细胞刺激因子改变细胞膜磷脂的分布, 最适底物转位于细胞外, Ⅱ型PLA$_2$水解之, 产生并释放溶血磷脂和AA. 与此同时Ⅱ型PLA$_2$可激活环氧化酶的同工酶COX$_2$的活性而引发PG的合成. Ⅱ型PLA$_2$也可作用于特异的受体后, 刺激AA代谢, 生成炎性介质, 通过炎性信号传递, 启动和放大信号而加重炎性反应[4,6].

2.1.2 脱粒作用 由IgE、Ca^{2+}、载体A23187和P物质诱导的大鼠腹膜肥大细胞释放的组胺可有效的被特异性的Ⅱ型PLA$_2$抑制剂所抑制, 表明Ⅱ型PLA$_2$可能在脱粒过程中起重要作用. 在肥大细胞活化后, Ⅱ型PLA$_2$在细胞表面的表达瞬息高效产生, 最终分泌到培养基[21]. 以一种自分泌和旁分泌方式产生某种融合分子作用于细胞膜, 也有利于膜与分泌颗粒的融合[6]. Ⅱ型PLA$_2$引起组胺释放的作用也可被肝素抑制, 说明肝素对Ⅱ型PLA$_2$活性调节也起一定作用[22].

2.1.3 抗菌作用 中性粒细胞分泌的Ⅱ型PLA$_2$对感染初期阶段宿主的防御起重要作用[6,21].Ⅱ型PLA$_2$不能直接降解完整细菌的细胞膜显示抗菌作用, 而要与细胞渗透性增加蛋白(BPI)结合才能降低微生物的活力. BPI与Ⅱ型PLA$_2$结合有高度的特异性, 可能与末端的碱性氨基酸残基的序列有关.

2.2 cPLA$_2$A的作用及其机制

2.2.1 cPLA$_2$A诱导促炎性细胞因子及趋化因子生成 以脂多糖(LPS)为激活剂, 通过反义寡核苷酸技术减少Hela细胞中cPLA$_2$A表达, 同时检测细胞上清液中IL-1B和IL-6的浓度, 结果发现IL-1B和IL-6含量与cPLA$_2$A的产生具有明显的剂量关系[23]. cPLA$_2$A水解膜磷脂产生的AA和溶血磷脂酰胆碱, AA代谢生成的血栓素A$_2$(TXA$_2$)可促进肿瘤坏死因子-A(TNF-A)和IL-1B的合成. 白

三烯B_4(LTB_4)能够增加单核细胞、巨噬细胞生成IL-1、IL-2、肿瘤坏死因子-C(TNF-C)的能力[24]. 研究表明LPC可诱导产生TNF-A等多种促炎性细胞因子、巨噬细胞炎性蛋白-1A(MIP-1A)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF); 反过来, 这些因素可通过正反馈方式继续上调$cPLA_2A$的表达, 导致更多的炎性因子产生[25].

2.2.2 $cPLA_2A$在氧自由基产生中的作用 在细菌感染时引发的中性粒细胞呼吸爆发以及缺血再灌注损伤等炎性病理过程中, 伴有大量氧自由基的产生. 还原型辅酶(NADPH)氧化酶是诱导氧分子生成超氧化阴离子的关键酶, 活化后定位于质膜. AA是调节氧化酶活性的重要因素, 可能是通过含有受体酪胺酸激酶以及磷脂酶C(PLC)的信号转导通路介导的. 此外, 产生超氧化阴离子的同时会产生相同数量的H^+, 这些H^+必须经过H^+通道清除到细胞外, 如果H^+通道活性被抑制, 超氧化阴离子将无法完成. AA可以激活H^+通道, 而氧化酶复合体中的$GP91^{phox}$恰恰参与了H^+通道的构成, 这也表明NADPH氧化酶的活性是AA依赖性的[26]. 于是, 在某些刺激因素的作用下, $cPLA_2A$可以通过"$cPLA_2A$-AA-NADPH氧化酶-超氧阴离子"途径产生大量的氧自由基, 促进炎性病变的进一步加剧. 最新的研究提示, NADPH氧化酶也可以通过促进$cPLA_2A$向质膜聚集与其结合来激活NADPH氧化酶本身; 但二者结合位点及AA的作用靶点有待进一步的明确[27].

2.2.3 $cPLA_2A$促进病理状态下诱导型一氧化氮合酶(NOS)生成 炎性状态下, NOS表达的增多在多种脏器组织损伤中起重要作用. 这是由于在NOS作用下, 产生过量的一氧化氮(NO)使血管扩张, 通透性增加, 导致黏膜充血、水肿; 同时还具有趋化中性粒细胞和单核细胞的作用; NO为弱自由基, 与固有层的炎性细胞产生的O_2^-发生反应, 生成具有高度细胞毒性的过氧化亚硝酸盐, 导致细胞脂质过氧化、蛋白质巯基氧化、亚硝基化、芳香族氨基酸的硝基化、以及DNA键的断裂[28]等细胞毒作用. 可能是由于5-LOX作为$cPLA_2A$下游的酶, 可通过产生中间介质活性氧来激活核转录因子κB(NF-κB), 而NOS基因的启动子带有NF-κB的结合元件. 因此, 在炎症时$cPLA_2A$活化, 可以通过5-LOX上调NOS的表达产生过量的NO, 从而造成组织损伤.

2.3 其他类型PLA_2的活化以及在炎症中的作用 其他类型PLA_2的活化以及在炎症中的作用仍未明确, 现在观点认为$iPLA_2$不直接参与激活剂诱导的AA释放, 他通过影响细胞内AA的分布, 为其他PLA_2的作用底物提供AA来源; 此外还有一类PLA_2, 叫PAF乙酰水解酶(PAF-AHs), 可特异性的水解PAF及氧化磷脂[18].

2.4 在炎症中$sPLA_2$和$cPLA_2A$间的"对话"(cross-talk) 在炎性反应中AA的大量出现是通过$cPLA_2A$与$sPLA_2$两者相互作用而产生的. 越来越多的研究表明, 炎症时大量AA的产生受$cPLA_2A$的调控. 实验结果显示, 在同时表达$cPLA_2A$和$sPLA_2$细胞中, AA的大量产生在某种程度上取决于$cPLA_2A$的活化[29-30]. 虽然其中的机制有待阐明, 但是已有报道推测, 上述现象是因为$sPLA_2$的水解能力需要12、15-LOX的代谢产物来诱导(即通过$cPLA_2$-12、15-LOX途径), 可能是通过活化转录因子来增加$sPLA_2$的基因表达及提高膜的敏感程度来实现的[29-30]. 由此说明$sPLA_2$产生AA的能力是$cPLA_2A$依赖性的. 反过来, $sPLA_2$也可以通过激活上游的MAPK使得$cPLA_2A$进一步活化. 另外, $sPLA_2$的胞吐作用可通过促进LTP_4形成来调节$cPLA_2$活性, 后者释放后能刺激自身受体, 从而激活$cPLA_2$. 而在大鼠3Y1纤维细胞中, COX_2依赖性PGE_2生成延迟过程中, $cPLA_2$有助于Ⅱ型PLA_2的表达.

3 PLA_2的活化方式及其在炎性反应中意义

3.1 Ⅱ型PLA_2的活化 Ⅱ型PLA_2的活化主要有两条途径. 一条是经受体连接的G蛋白途径; 另一条是依赖于磷脂酶C(PLC)介导的间接途径, 致使Ca^{2+}增加和蛋白激酶C激活. 第一条途径其激活机制类似于对腺苷环化酶的激活, 许多激活剂如肾上腺素能激动剂、凝血酶、Ras癌基因产物、内毒素等均涉及到G蛋白的调节, 既而通过受体介导PLA_2的释放[31]. Ⅱ型PLA_2的激活对Ca^{2+}有依赖性, Ⅱ型PLA_2激活后可在Sn-22位酯酰键处水解膜磷脂, 引起膜损害, 细胞膜通透性增加, 进一步加重Ca^{2+}升高, 使细胞内Ca^{2+}转运失控, 线粒体内代偿性Ca^{2+}蓄积, 从而激活ATP合成酶的抑制剂, 使ATP合成减少. 而细胞内Ca^{2+}增加, 又可使PLA_2活性放大, 形成恶性循环, Ⅱ型PLA_2在这个炎性级联反应中处于中心位置[21]. 作为高阳离子的Ⅱ型PLA_2优先结合到阴离子磷脂界面进行水解, 因此磷脂和其他磷脂酶对该酶活性的影响是不容忽视的, 目前正在被进一步研究[22].

3.2 cPLA$_2$A的活化 cPLA$_2$A的活化完全是通过受体后信号转导机制实现的, 并依赖多种因素的共同调节. 激动剂与受体结合后, 通过特定的转导通路使细胞内Ca^{2+}浓度升高, Ca^{2+}与cPLA$_2$A氨基端的C2区域结合, 使酶从胞质转移到细胞内膜, 这种转位可促使cPLA$_2$A与膜磷脂结合, 同时产生的AA可被分布在核周围COX-2及5-脂氧化酶(5-LOX)非常方便的利用[32]. 与此同时, cPLA$_2$A的活化也需要促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化作用. cPLA$_2$A两个催化中心连接区域的Ser^{505}和Ser^{727}是影响cPLA$_2$A活性的最重要的两个磷酸化位点, 在激动剂引起的胞外信号调节激酶(ERK)及P38 MAPK途径被激活后, 这两个位点被磷酸化, 从而激活 cPLA$_2$A. 另外, 存在于质膜的磷脂酰肌醇-4,5二磷酸(PIP$_2$)通过诱导cPLA$_2$A构象的改变来促使酶的活性中心与膜磷脂底物的结合. 通过以上途径的协同作用, 可使cPLA$_2$A长时间激活, 因此, cPLA$_2$A在AA、溶血磷脂及下游多种炎性因子的释放中发挥着“轴心”作用.

总之, PLA$_2$种类繁多, 结构功能复杂, 机制尚不完全清楚, 在炎性病变的发生和发展中起重要的作用, 特别是通过激活Ⅱ型PLA$_2$和cPLA$_2$A来促进一系列炎性介质释放和激活, 促进炎性病变的发生和发展, 因此在炎性反应过程中Ⅱ型PLA$_2$和cPLA$_2$A这两个细胞信号转导的重量级分子, 像“扳机”一样, 在调控多种主要的炎性介质生成的过程中发挥着举足轻重的作用. 因此, 研究Ⅱ型PLA$_2$和cPLA$_2$A的特异性的抑制剂可以为治疗炎性疾病提供一个重要的措施.

4 参考文献

1 Sadurska B, Szumilo M. Phospholipases A in mammalian cells: structure, properties, physiological and pathological role. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59: 116-123

2 Huggins KW, Boileau AC, Hui DY. Protection against diet-induced obesity and obesity- related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E994-E1001

3 Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, Kudo I, Nishiyama N, Matsuki N. Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 2319-2323

4 Farooqu AA, Horrocks LA. Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J Mol Neurosci* 2001; 16: 263-272

5 Landi L, Galli MC, Cabrini L, Hakim G, Carru C, Fiorentini D. HPLC and light scattering detection allow the determination of phospholipids in biological samples and the assay of phospholipase A2. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 44: 1157-1166

6 Murakami M, Kudo I, Inoue K. Secretory phospholipases A2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995; 12: 119-130

7 Murakami M. Hot topics in phospholipase A2 field. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1179-1182

8 Graff JR, Konicek BW, Deddens JA, Chedid M, Hurst BM, Colligan B, Neubauer BL, Carter HW, Carter JH. Expression of group IIa secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3857-3861

9 Kihara Y, Yoshikawa H, Honda H, Fukumitsu K, Yamaguchi T, Otsuki M. Natural disruption of group 2 phospholipase A2 gene protects against choline-deficient ethionine-supplemented diet-induced acute pancreatitis and lung injury. *Pancreas* 2005; 31: 48-53

10 Satake Y, Diaz BL, Balestrieri B, Lam BK, Kanaoka Y, Grusby MJ, Arm JP. Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J Biol Chem* 2004; 279: 16488-16494

11 Tao R, Yu Y, Zhang X, Guo Y, Shi J, Zhang X, Xie L, Liu S, Ju G, Xu Q, Shen Y, Wei J. Cytosolic PLA2 genes possibly contribute to the etiology of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 137: 56-58

12 Duffy DM, Seachord CL, Dozier BL. An ovulatory gonadotropin stimulus increases cytosolic phospholipase A2 expression and activity in granulosa cells of primate periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5858-5865

13 Yamashita A, Kamata R, Kawagishi N, Nakanishi H, Suzuki H, Sugiura T, Waku K. Roles of C-terminal processing, and involvement in transacylation reaction of human group IVC phospholipase A2 (cPLA-2gamma). *J Biochem (Tokyo)* 2005; 137: 557-567

14 Gilroy DW, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J* 2004; 18: 489-498

15 Shinzawa K, Tsujimoto Y. PLA2 activity is required for nuclear shrinkage in caspase-independent cell death. *J Cell Biol* 2003; 163: 1219-1230

16 Balsinde J, Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 2005; 17: 1052-1062

17 Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW. The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem* 2000; 275: 9937-9945

18 Yang J, Han X, Gross RW. Identification of hepatic peroxisomal phospholipase A(2) and characterization of arachidonic acid-containing choline glycerophospholipids in hepatic peroxisomes. *FEBS Lett* 2003; 546: 247-250

19 夏时海, 赵晓晏, 郭萍. 急性胰腺炎促炎细胞因子和抗炎细胞因子的动态变化及其作用. 临床消化杂志 2001; 13: 51-53

20 Vadas P, Pruzanski W. Induction of group II phospholipase A2 expression and pathogenesis of the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 39: 160-167

21 Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain.

Brain Res Bull 1999; 48: 233-238
22 Thomet OA, Wiesmann UN, Blaser K, Simon HU. Differential inhibition of inflammatory effector functions by petasin, isopetasin and neopetasin in human eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1310-1320
23 Wang XH, Yan GT, Wang LH, Hao XH, Zhang K, Xue H. The mediating role of cPLA2 in IL-1 beta and IL-6 release in LPS-induced HeLa cells. *Cell Biochem Funct* 2004; 22: 41-44
24 Rocha PN, Plumb TJ, Coffman TM. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 215-227
25 Ousman SS, David S. MIP-1alpha, MCP-1, GM-CSF, and TNF-alpha control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. *J Neurosci* 2001; 21: 4649-4656
26 Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest* 2001; 107: 1339-1345
27 Shmelzer Z, Haddad N, Admon E, Pessach I, Leto TL, Eitan-Hazan Z, Hershfinkel M, Levy R. Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol* 2003; 162: 683-692
28 Wang S, Zhou W, Wei M, Zhang G. Effects of lead on NO, NOS, SOD, MDA in rat cerebral cortex. *Weisheng Yanjiu* 2002; 31: 226-228
29 Kuwata H, Yamamoto S, Miyazaki Y, Shimbara S, Nakatani Y, Suzuki H, Ueda N, Yamamoto S, Murakami M, Kudo I. Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A2 regulates the expression and function of type IIA secretory phospholipase A2. *J Immunol* 2000; 165: 4024-4031
30 Morioka N, Takeda K, Kumagai K, Hanada T, Ikoma K, Hide I, Inoue A, Nakata Y. Interleukin-1beta-induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A2 enzymes: secretory type IIA and cytosolic type IV. *J Neurochem* 2002; 80: 989-997
31 Ma Z, Turk J. The molecular biology of the group VIA Ca^{2+} independent phospholipase A2. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 67: 1-33
32 Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem* 2001; 276: 30150-30160

电编 李琪 编辑 王瑾晖

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

• 消息 •

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3 000字及摘要800字各1份, 电脑打印(附软盘), 2006-06-15截稿.

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授, 电话: 13313695959, E-mail: liubingrong@medmail.com.cn.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 800-804
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

5-脂氧合酶促癌机制研究进展

李 勇, 李建英, 王小众

■背景资料
近年来研究发现, 胃癌、直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌等多种人类恶性肿瘤中5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)的表达明显增高, 这表明5-LOX在恶性肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 对5-LOX的研究将成为恶性肿瘤防治研究的一个新靶点.

李勇, 李建英, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
福建省科技人才创新基金资助项目, No.2002J061
通讯作者: 李建英, 350001, 福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科. JYLi99@hotmail.com
电话: 0591-83357896-8482
收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-01-25

摘要
5-脂氧合酶蛋白是花生四烯酸代谢途径中的一种关键酶, 在恶性肿瘤的发生、发展过程中起了重要作用. 抑制5-脂氧合酶及其产物的表达有可能预防和逆转恶性肿瘤的发生, 本文结合国内外文献, 就5-脂氧合酶分子生物学特征及促癌机制的研究进展作一综述.

关键词: 5-脂氧合酶; 肿瘤

李勇, 李建英, 王小众. 5-脂氧合酶促癌机制研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(8):800-804
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/800.asp

0 引言
近年来研究发现, 胃癌、直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌等多种人类恶性肿瘤中5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)的表达明显增高, 而抑制5-LOX表达有可能预防和逆转恶性肿瘤的发生, 这表明5-LOX在恶性肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 对5-LOX的研究将成为恶性肿瘤防治研究的一个新靶点, 研究5-LOX与恶性肿瘤的关系具有重要意义. 本文就这方面研究进展综述如下.

1 5-LOX的分子生物学特征
1976年, 人们从兔子多形核白细胞的代谢产物中发现5-氢过氧化二十碳四烯酸(5-HPETE)和5-羟二十碳四烷酸(5-HETE), 从而首次发现5-LOX的存在. 5-LOX是脂氧合酶同工酶的一种, 也是其中研究最为深入的一种, 在人体内分布广泛, 是机体催化花生四烯酸生成生物活性分子从而影响细胞信号传导及代谢的关键酶. 人类5-LOX基因定位于第10号染色体p11.2亚带, 长度超过82 kb, 包括14个外显子和13个内含子. 外显子跨度在82-613 bp之间, 而内含子跨度接近200 bp, 长度超过26 kb, 主要转录起始点位于起始密码ATG上游65 bp处, 5-LOX的启动子区域不含TATA和CCAAT序列, 但具有一含有多个GC盒的富含(G+C)区. 5-LOX蛋白包含672或673个氨基酸, 其相对分子质量随合成该酶的白细胞不同从72 ku到80 ku不等[1-3].

2 5-LOX代谢过程及其活性的调节
细胞膜上的磷脂在磷脂酶A2作用下释放出花生四烯酸(arachidonic acid, AA), AA通过5-LOX活化蛋白FLAP呈递于5-LOX, 5-LOX通过加氧酶作用, 催化促使氧分子与AA合并, 从而生成5-HPETE, 继而形成不稳定的LTA4, 接着分子氧在C-5处插入, 使LTA4转为5-HETE. 水解酶可水解LTA4成为LTB4(一种有效的中性粒细胞化学诱导物, 可使白细胞黏附于内皮细胞). LTC4合成酶可促使LTA4与谷胱甘肽结合形成LTC4. LTC4可进一步代谢产生LTD4、LTE4, 三者合称为慢反应物质[4-5].

自从发现白细胞三烯的合成与通过钙离子载体刺激细胞有关以来, 现今人们普遍接受细胞内Ca^{2+}是5-LOX的激活剂, 通过与5-LOX的可逆结合调节其活性. 除了Ca^{2+}外, Ba^{2+}、Sr^{2+}、Mn^{2+}、Mg^{2+}均有类似作用, 但作用低下. 而Zn^{2+}、Cu^{2+}和Co^{2+}则抑制该酶活性[6-7]. 近期研究表明[8], 肌动蛋白聚合作用抑制剂可以通过Src家族激酶信号通路提高细胞内Ca^{2+}水平, 从而促使AA释放及5-LOX产物的产生.

ATP是人们发现的第1个对5-LOX酶粗提物有激活作用的物质, 其他核苷酸(ADP, AMP, cAMP, CTP和UTP)对其仅有微弱催化作用, 而且该激活作用依赖于Ca^{2+}的存在. 目前发现Mg^{2+}亦可辅助ATP的催化作用. 在酶催化过程中, 脂质过氧化物氧化5-LOX中的Fe^{2+}为Fe^{3+}, 促进5-LOX活化. 在细胞中, FLAP是激活5-LOX的活性所必需的. 一般认为, FLAP除了可能参与5-LOX的活化外, 还可以作为底物转移蛋白结合AA, 再递呈给5-LOX[9]. 近来更深入的研究表明,

p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK), ERK1/2分别通过磷酸化5-LOX上的Ser271, Ser663位点从而活化5-LOX活性, 而PKA对于5-LOX活性的抑制作用主要与其磷酸化Ser523有关[10]. 5-LOX活性的调节还有其他影响因素, 但主要以上述几个为主.

3 5-LOX在恶性肿瘤中的表达及相关性研究

目前有关5-LOX的研究报道较多, 发现5-LOX及其主要下游产物5-HETE和LTB4在各种恶性肿瘤中高表达, 部分癌前病变亦有发现. Hong *et al*[11]在结肠癌, 肺癌, 乳腺癌和前列腺癌多个细胞系中均检测到5-LOX和FLAP的表达, 表达率高达100%. Hennig *et al*[12]通过实验证实胰腺癌细胞系PANC-1, AsPC-1, MiaPaCa2均有5-LOX的表达; 与正常胰腺组织相比, 5-LOX在胰腺癌组织中表达显著增高. 有报道称[13-14], 5-LOX在食管癌组织中表达率为79%, 在所有8种食管癌细胞系中也都有高表达, 5-HETE在食管癌组织中的表达量是正常食管组织的8倍, 5-LOX抑制剂通过诱导凋亡抑制细胞增殖.

Rioux *et al*[15]用5-LOX抑制剂A79175和FLAP抑制剂MK-886作用于小鼠肺癌模型中, 结果发现小鼠肺癌生长明显受到抑制, 经过病理检查发现肿瘤组织出现不同程度的凋亡. Gunning *et al*[16]在大鼠肺癌模型中发现5-LOX和LTB4表达显著增高. 外源性的添加5-HETE可逆转5-LOX抑制剂的抑制作用, 从而促进肿瘤细胞的增殖[17]. 在肾癌细胞系Caki-1和A498中5-LOX抑制剂也表现出显著抗增殖活性[18]. Schwartz *et al*[19]实验证实LTB4受体阻断剂LY293111对肿瘤患者有良好的抗癌效果. 在已经完成的临床Ⅰ期研究中LY293111治疗肿瘤效果显著, 且没有明显毒副作用[20].

这些现象均提示5-LOX在恶性肿瘤的发生、发展及转移中有重要的生理功能, 其表达的增加可能是恶性肿瘤发生的一个早期事件. 通过上述研究, 我们认为5-LOX可能促进恶性肿瘤的生成, 其促癌作用与其下游产物5-HETE和LTB4有关. 因此, 我们认为检测5-LOX的水平可能有助于恶性肿瘤的早期诊断, 抑制5-LOX的表达可能有助于恶性肿瘤的治疗.

4 5-LOX在恶性肿瘤形成中的作用机制

越来越多的研究证实5-LOX代谢途径在人类恶性肿瘤的发生、发展过程中有着深远的影响[21]. 但是5-LOX到底是通过什么途径促进恶性肿瘤细胞的生长呢? 目前的研究表明, 这主要与以下几个方面密切相关:

4.1 细胞增殖和凋亡失衡 5-LOX的过度表达可促进恶性肿瘤细胞过度增殖, 抑制其凋亡, 使细胞增殖和凋亡之间的平衡失调, 从而促进肿瘤恶性行为的发生. 原癌基因Bcl-2是细胞凋亡网络中最重要的基因, 可以阻止或降低放疗或化疗等引起的细胞凋亡, 是一种抗凋亡基因. 上皮细胞中过度表达5-LOX将导致Bcl-2水平升高. 有研究显示, 肿瘤中Bcl-2升高, 而Bax水平下降. 以5-LOX抑制剂处理肿瘤细胞株可显著干扰抗凋亡蛋白(如Bcl-2, Mcl-1)和促凋亡蛋白(Bax)之间的平衡, 使促凋亡蛋白/抗凋亡蛋白比值增高触发线粒体释放细胞色素C, 继而激活Caspase级联反应导致凋亡[22]. Tong *et al*[23]用5-LOX抑制剂Rev-5901干预两种胰腺癌细胞系MiapaCa-2和AsPC-1后, 观察到Bcl-2蛋白和Mcl-1蛋白表达量显著下降, 而Bax蛋白表达增加. 同时也发现Rev-5901显著减少细胞色素C从线粒体释放到细胞质中的量. 干预后Caspase-9, Caspase-7, Caspase-3被激活. 乳腺癌中亦有类似结果[24]. Fan *et al*[25]用5-LOX活化蛋白抑制剂MK-886对胃癌细胞AGS进行干预研究, 发现MK-886通过上调P27和Bax的表达发挥诱导凋亡作用, 不涉及P53, P21, Bcl-2蛋白表达的变化. 同时也发现, MK-886可以释放细胞色素C, 激活Caspase-3, 从而抑制AGS细胞的生长. 因此, 我们猜测5-LOX可能通过影响细胞增殖和凋亡之间的平衡来发挥其促癌作用.

5-LOX也可能通过细胞外调节激酶级联(MEK/ERK)途径促进肿瘤细胞生长. 众所周知MEK/ERK信号传导途径的激活可抑制凋亡, 5-LOX代谢产物5-HETE和LTB4可磷酸化MEK/ERK, 从而发挥抗凋亡作用. Tong *et al*[26]在胰腺癌的研究中发现LTB4可以通过诱导ERK1/2磷酸化, 从而促进胰腺癌细胞增殖. 在胰腺癌裸鼠模型中, 发现采用LTB4受体拮抗剂ly293111进行治疗, 显著抑制肿瘤生长, 经过TUNEL检测发现肿瘤组织上有大量凋亡. 从而进一步证实5-LOX的促癌作用可能与MEK/ERK有关.活化后的ERKs亦能够磷酸化5-LOX, 有助于其产物的合成, 还可以联合p38 MAPK激活5-LOX, 产生信号级联反应, 发生促癌的正反馈作用[27].

5-LOX在细胞增殖和凋亡间的作用也涉及到三磷酸肌醇激酶(PI3K)/Akt级联反应, PI3K/Akt可以通过Bad的磷酸化使细胞免于凋亡. Bad

■ **研发前沿**
目前对5-LOX的研究热点和重点主要集中在5-LOX对靶基因转录调控机制的研究上.

■ 创新盘点
本文注重5-LOX在肿瘤发生、发展过程中的作用. 通过对近几年来相关报道的总结, 发现可以通过调节5-LOX活性来研究适用于临床的抗肿瘤药物.

是Bcl-2家族中的一个促凋亡成员, 可以取代Bax与Bcl-2或Bcl-xl结合导致细胞死亡. Bad磷酸化后从Bad, Bcl-2, Bcl-xl复合物中游离并与细胞浆内14-3-3蛋白结合, 失去促凋亡功能[28-29]. 磷酸化的Akt可以通过抑制IκB(核因子κB的抑制单位), 启动核因子-κB(NF-κB)转录功能, 活化抗凋亡基因维持细胞生存[30]. 另外, Akt也可经过Ras依赖性途径磷酸化前Caspase-9, 使其失去裂解细胞的作用[31]. 已有研究表明, 5-HETE和LTB4均可激活PI3K/Akt级联反应, 从而抗凋亡, 促进恶性肿瘤细胞生长[32].

至今为止, 研究大多认为5-LOX及其产物主要通过以上信号传递通路发挥促癌作用, 不涉及P38激酶, JNK/SAPK, PKC途径, 但也有一些研究结果与上述情况不符, 有待进一步研究.

4.2 促进恶性肿瘤血管生成 恶性肿瘤的生长和转移与肿瘤新生血管形成密切相关. 有证据表明5-LOX产物对血管形成的促进作用主要通过血管源性的蛋白生长因子, 比如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等. 5-HETE也可通过活化PI3K/Akt级联反应诱导bFGF表达, 促进微血管内皮细胞DNA合成. 尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)和Ⅳ型胶原酶是由血管内皮和肿瘤上皮细胞分泌的蛋白水解酶类. 由bFGF和VEGF介导的uPA表达是血管源性刺激下的早期反应, 而5-HETE为bFGF的血管源性功能中重要的第二信使, 说明花生四烯酸的代谢途径也涉及了uPA的表达[33]. 我们知道, VEGF是内皮细胞专一的促有丝分裂因子, 作用强, 特异性高, 与恶性肿瘤血管密度密切相关, 是一个最具普遍意义的肿瘤微血管生成刺激因子. Romano *et al*[34-35]发现在人类恶性间皮瘤中, 5-LOX的代谢产物5-HETE可促进VEGF转录. 在恶性胸膜间皮细胞中用5-LOX反义核苷酸可以显著减少VEGF mRNA水平的表达量, 同时促使细胞发生凋亡. 而用5-LOX cDNA转染正常间皮细胞后, 发现VEGF表达量显著提高. 提示5-LOX及其产物可能通过影响VEGF促进肿瘤血管生成, 从而促进恶性肿瘤发生、发展.

4.3 提高恶性肿瘤发生及转移的潜能, 增加肿瘤细胞的侵袭力 恶性肿瘤对于人体的危害很大程度上与其局部侵袭和远处转移有关. 恶性肿瘤的侵袭和转移除通过促进细胞增殖和新生血管形成等间接因素外还有其他一些因素存在. 恶性肿瘤细胞对细胞外基质的黏附是转移的初始步骤, 是影响转移的重要因素[36]. 研究发现, 采用5-LOX抑制剂AA861, MK886可以显著降低细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达[37]. 众所周知, ICAM-1是一种重要的免疫黏附分子, 主要涉及恶性肿瘤侵袭过程中的细胞间相互作用, 有助于恶性肿瘤细胞通过血管内皮细胞远处转移. 恶性肿瘤组织5-LOX的过度表达与肿瘤侵袭淋巴管和发生淋巴结转移显著相关, 5-LOX过度表达的患者预后较差. 5-LOX促进恶性肿瘤细胞转移的机制除通过促进新生血管形成等间接因素外, 还与其直接上调肿瘤细胞基质金属蛋白酶(MMP)和uPA的表达有关.对血管内皮细胞迁徙起决定作用的是内皮细胞黏附细胞外基质并启动降解基质的能力, 在癌细胞局部组织浸润时也需要如此. 整合素αvβ3是整合素黏附分子家族的一个成员, 可以易化这个黏附过程. 有研究证实细胞表面整合素αvβ3的表达与5-LOX及PKC信号通路存在密切关系. 因此5-LOX可能通过PKC信号通路影响αvβ3的表达, 从而提高恶性肿瘤细胞的侵袭力.

总之, 花生四烯酸代谢途径中两条主要通路的关键酶分别是环氧合酶(cyclooxygenase, COX)和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX), 有关COX在恶性肿瘤中的研究已经十分深入, 相应的药物现已经进入临床应用阶段, 目前研究认为, LOX在恶性肿瘤形成过程中扮演着更为重要的角色. 流行病学和动物学研究发现[38-40], 高脂饮食可大大提高恶性肿瘤患病率, 这主要与高脂饮食增加LOX尤其是5-LOX在人体中的表达有关. 以往对于5-LOX的研究多限于变态反应性和炎症性疾病, 近几年国内外科研人员致力于5-LOX促癌机制方面的研究, 已取得一定成果, 未来研究需要更进一步确定其促癌作用, 并从细胞、分子、基因水平进一步阐明其促癌机制, 以期通过5-LOX抑制剂来抑制恶性肿瘤生长, 为今后在临床上更好的治疗恶性肿瘤患者开辟一个新的途径.

5 参考文献

1 Werz O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 23-44

2 Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3431-3447

3 Hoshiko S, Radmark O, Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9073-9077

4 Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294:

1871-1875
5 Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002; 190: 279-286
6 Werz O, Burkert E, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D. Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 2002; 99: 1044-1052
7 Hammarberg T, Reddy KV, Persson B, Radmark O. Calcium binding to 5-lipoxygenase. *Adv Exp Med Biol* 2002; 507: 117-121
8 Fischer L, Poeckel D, Buerkert E, Steinhilber D, Werz O. Inhibitors of actin polymerisation stimulate arachidonic acid release and 5-lipoxygenase activation by upregulation of Ca^{2+} mobilisation in polymorphonuclear leukocytes involving Src family kinases. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1736: 109-119
9 Peters-Golden M, Brock TG. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 99-109
10 Werz O, Steinhilber D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 327-333
11 Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 1999; 59: 2223-2228
12 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Buchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
13 Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005; 26: 785-791
14 Chen X, Li N, Wang S, Hong J, Fang M, Yousselfson J, Yang P, Newman RA, Lubet RA, Yang CS. Aberrant arachidonic acid metabolism in esophageal adenocarcinogenesis, and the effects of sulindac, nordihydroguaiaretic acid, and alpha-difluoromethylornithine on tumorigenesis in a rat surgical model. *Carcinogenesis* 2002; 23: 2095-2102
15 Rioux N, Castonguay A. Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1393-1400
16 Gunning WT, Kramer PM, Steele VE, Pereira MA. Chemoprevention by lipoxygenase and leukotriene pathway inhibitors of vinyl carbamate-induced lung tumors in mice. *Cancer Res* 2002; 62: 4199-4201
17 Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13182-13187
18 Matsuyama M, Yoshimura R, Mitsuhashi M, Tsuchida K, Takemoto Y, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway. *Oncol Rep* 2005; 14: 73-79
19 Schwartz GK, Weitzman A, O'Reilly E, Brail L, de Alwis DP, Cleverly A, Barile-Thiem B, Vinciguerra V, Budman DR. Phase I and pharmacokinetic study of LY293111, an orally bioavailable LTB4 receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5365-5373
20 Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH Jr, Adrian TE. A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 467-473
21 Ghosh J, Myers CE. Central role of arachidonate 5-lipoxygenase in the regulation of cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells. *Adv Exp Med Biol* 1999; 469: 577-582
22 Steele VE, Holmes CA, Hawk ET, Kopelovich L, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC, Kelloff GJ. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 467-483
23 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 929-935
24 Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 942-948
25 Fan XM, Tu SP, Lam SK, Wang WP, Wu J, Wong WM, Yuen MF, Lin MC, Kung HF, Wong BC. Five-lipoxygenase-activating protein inhibitor MK-886 induces apoptosis in gastric cancer through upregulation of p27kip1 and bax. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 31-37
26 Tong WG, Ding XZ, Hennig R, Witt RC, Standop J, Pour PM, Adrian TE. Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3232-3242
27 Werz O, Burkert E, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J* 2002; 16: 1441-1443
28 del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278: 687-689
29 Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241
30 Kane LP, Mollenauer MN, Xu Z, Turck CW, Weiss A. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5962-5974
31 Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, Varrichio AM, Shorr RG, Haslam RJ, Harley CB. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* 1988; 333: 470-473
32 Szekeres CK, Tang K, Trikha M, Honn KV. Eicosanoid activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human epidermoid carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 38831-38841
33 Zeng ZZ, Yellaturu CR, Neeli I, Rao GN. 5(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesis in human microvascular endothelial cells via activation of Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor 2. *J Biol*

■ **同行评价**

本文作者对5-脂氧合酶(5-LOX)的分子生物学特征、代谢过程、活性的调节做了描述, 同时对其在恶性肿瘤中的表达及其在恶性肿瘤形成中的作用机制进行了探讨. 作者在广范围引证参考文献的前提下, 指出5-LOX在多种恶性肿瘤的发生、发展过程中起了重要作用, 因而提出通过抑制5-脂氧合酶及其产物的表达有可能预防和逆转恶性肿瘤的发生的观点. 文章观点新颖, 具有实际意义.

Chem 2002; 277: 41213-41219
34 Romano M, Catalano A, Nutini M, D'Urbano E, Crescenzi C, Claria J, Libner R, Davi G, Procopio A. 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J* 2001; 15: 2326-2336
35 Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J* 2003; 17: 1986-1995
36 Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336
37 Wang Y, Zhou B, Li J, Cao YB, Chen XS, Cheng MH, Yin M. Inhibitors of 5-lipoxygenase inhibit expression of intercellular adhesion molecule-1 in human melanoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 672-677
38 Horward TJ.Pancreatic adenocarcinoma. *Curr Probl Cancer* 1996;20:281-328
39 Fischer SM, Hagerman RA, Li-Stiles E, Lo HH, Maldve RE, Belury MA, Locniskar MF. Arachidonate has protumor-promoting action that is inhibited by linoleate in mouse skin carcinogenesis. *J Nutr* 1996; 126: 1099S-1104S
40 Clerc P, Bensaadi N, Pradel P, Estival A, Clemente F, Vaysse N. Lipid-dependent proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 3633-3638

电编 李琪 编辑 王瑾晖

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

• 消息 •

技法与经验

《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验. 我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登照片. 写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术
0 引言
1 技术方法
1.1 原理
1.2 适应证
1.3 器材准备
1.4 步骤
1.5 实例
2 结果
3 讨论
3.1 并发症
3.2 优点和缺点
3.3 经验与技巧
4 参考文献

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 805-809
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

AMP-18, 一种新发现的胃黏膜保护因子

陈美娅, 任建林, 潘金水

陈美娅, 任建林, 潘金水, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所. jianlinr@msn.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2006-02-14 接受日期: 2006-02-21

摘要

AMP-18是一种新发现的由胃腺体上皮细胞合成的小分子蛋白质, 独特表达于胃黏膜, 机体其他部位少见, 胃癌组织中表达缺失. AMP-18由185个氨基酸组成, 除去N端信号肽(20个氨基酸)后大小约18 ku, 第54-150个氨基酸组成高度保守的结构域(BRICHOS区域)承担主要的生理功能. AMP-18由胃腺体上皮细胞以胞吐的方式分泌到胃黏液中, 他的合成和分泌与个体生长发育有关, 并受福斯高林、吲哚美辛、地塞米松等药物的影响. 目前发现AMP-18的生理功能主要有促进胃黏膜上皮细胞的有丝分裂, 促进细胞的迁徙, 促胃肠黏膜损伤的修复, 保持胃肠黏膜的完整等.

关键词: AMP-18; 胃黏膜保护; 细胞有丝分裂; 细胞迁徙

陈美娅, 任建林, 潘金水. AMP-18, 一种新发现的胃黏膜保护因子. 世界华人消化杂志 2006;14(8):805-809
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/805.asp

0 引言

胃腔内的多种复杂环境, 如食物、胃酸、胃蛋白酶、消化食物时胃腔内的高流量、高渗透压, 这些都对胃黏膜造成不可避免的损伤. 然而, 胃黏膜有一套完整而强有力的防御机制以抵抗这些理化因素的侵袭. 从解剖结构上看, 胃黏膜保护因素可分为5个层次: 第1层次由分泌入胃腔的成分组成, 包括酸、碱、黏液、免疫球蛋白和其他抗菌成分(如乳铁蛋白)、表面活性磷脂(surface active phospholipid, SAPL)等. 第2层次是上皮层, 具有显著的抗酸损伤功能并形成紧密连接防止被动扩散. 如果上皮层连续性破坏, 能够快速修复. 第3层次由黏膜微循环与黏膜、黏膜下感觉传入神经组成. 酸或其他损伤因子逆流入黏膜引起神经介导的胃黏膜血流(gastric mucosal blood flow, GMBF)升高, 这对局部损伤和促进修复有重要意义. 第4层次由黏膜免疫细胞构成, 包括肥大细胞、巨噬细胞, 可感受进入黏膜的异体成分, 产生适当的炎性反应. 第5层次即胃黏膜自身修复机能包括胃腺的生长和重建、外来和内在神经系统的再生、微循环的重建, 许多生长因子在其中发挥了重要的作用[1]. 多年来, 胃黏膜保护的机制一直是学者们研究的热点, 而黏膜保护因子, 如AMP-18、三叶因子(trefoil peptides)[2]、热休克蛋白[3]、防御素(defensin)、表皮生长因子(EGF)等是目前胃黏膜保护研究领域的焦点之一. 学者们从分子水平对这些黏膜保护因子的结构及功能进行了深入的研究. AMP-18是近年来发现的一种具有胃黏膜保护作用的蛋白质. 本文结合近年来的研究成果对这一蛋白质进行初步的阐述.

AMP-18(也称为Gastorkine-1, CA11蛋白, foveolin)是新近发现的一种对胃肠黏膜有保护作用的蛋白质. 这个蛋白质的发现起源于胃泌素的研究过程中, 学者们发现有一种mRNA独特表达于胃窦黏膜, 并且其序列在猪、人类、小鼠中高度保守, 但当时对其编码的蛋白质并无具体了解[4]. 近年来通过对上述这种高度保守的基因(GKN1)在DNA、mRNA水平及其翻译的蛋白质进行了研究, 发现其mRNA及翻译的蛋白质(AMP-18)独特位于胃黏膜(主要位于胃窦黏膜, 其次胃体黏膜), 较少见于Barrett食管的胃黏膜化生、大小肠黏膜损伤修复过程中的溃疡相关细胞谱系、慢性胰腺炎的胰胆管、胰腺癌、卵巢黏液癌中, 其他组织中未见表达[5-6], 提示其对胃肠黏膜的发育、修复有着重要作用.

1 结构, 合成和分泌

1.1 结构 AMP-18基因定位于2p13.3, 长6 407个碱基对, 其mRNA长750个碱基, 翻译出的肽链由185个氨基酸组成, 其氨基酸的排列顺序高度保守(人、猪序列之间的一致性达75.3%, 人、

■背景资料
胃腔内多种复杂因素对胃黏膜不可避免造成损伤, 而胃黏膜自身有一套强有力的保护机制避免这些因素的侵袭. 胃黏膜保护的分子机制如三叶因子、防御素、表皮生长因子等一直是目前研究的热点. AMP-18作为一种新发现的胃黏膜保护因子, 其作用原理对于进一步了解胃黏膜保护机制有重要意义.

■研发前沿
AMP-18作为一种小分子蛋白质, 有促进黏膜细胞增殖、迁徙, 并可稳定紧密连接蛋白, 保护胃肠黏膜的完整, 研究还发现癌变的胃黏膜中AMP-18缺失, 经转染CA11的MKN28细胞集落形成数量减少, 说明其在肿瘤发生中有一定的作用, 但目前具体作用机制尚不明了.

鼠序列之间的一致性为63.9%[5]). N端的20个氨基酸构成信号肽, 经过内质网后被切除[5], 之后21-185个氨基酸构成肽链的主体, 大小约18 ku, 其中第54-150个氨基酸形成一个高度保守的称为BRICHOS的区域[7][为一个螺旋环状结构, 目前推测其功能有: (1)帮助分泌旁路的定位; (2)协助细胞内特定蛋白酶处理系统的工作; (3)可能扮演分子内伴侣的角色, 保护、避免C端富含半胱氨酸的肽段或N端高度疏水肽段的聚集]可能承担着AMP-18主要的生理功能.

1.2 合成和分泌 目前相关研究都认为AMP-18由胃腺体的上皮细胞合成, 但进一步研究发现, AMP-18仅在当胃腺上皮细胞自腺隐窝底部向上移动过程中才逐渐表达, 位于隐窝基底的细胞中并未检出AMP-18[5-6], 提示AMP-18可能是细胞生长分化过程中的一种产物, 并且他产生于细胞有丝分裂期后. Oien *et al*[6]通过运用原位杂交及免疫组织化学的方法, 而Martin *et al*[5]通过免疫电子显微镜检查法均证实了AMP-18聚集成颗粒状主要存在于黏膜细胞顶端细胞膜下方的细胞质中, 这提示了黏膜细胞分泌AMP-18是通过胞吐的方式进行的, 并与胃黏液一同分泌, 存在于胃黏膜表面的弹性胶层中, 构成胃黏液层的一部分. Toback *et al*[8]通过免疫印迹的方法分析狗胃黏液层和胃黏膜细胞中AMP-18和细胞角蛋白-18含量, 发现狗胃黏液层中AMP-18的含量明显高于黏膜细胞中的含量, 而胃黏膜细胞中细胞角蛋白-18的含量反而明显高于胃黏液层, 进一步支持AMP-18是被分泌出来的, 而不是贮存于细胞中, 等细胞脱落、破坏后才被释放出来的. AMP-18的分泌是受多种因素调控的. Toback *et al*[8]通过在狗胃窦黏膜细胞的单细胞层中加入福斯高林(一种CAMP激动剂), 发现细胞中AMP-18含量减少, 这说明CAMP在促AMP-18的分泌中可能起着第二信使的作用. 此外, 给小鼠胃中灌注吲哚美辛, 发现胃黏膜在出现组织学损伤之前就已出现黏膜细胞中AMP-18含量的明显减少, 减少量可达70%, 这可能是因为吲哚美辛促进了AMP-18的被分泌, 但并非所有非甾体类消炎药均能导致黏膜细胞中AMP-18含量的变化, 试验中加入COX-2选择性阻滞剂罗非西布, 并未发现胃黏膜细胞中AMP-18的减少[8], 故可以推测吲哚美辛可能通过阻断COX-1而引起AMP-18分泌的增加. Petri *et al*[9]通过给小鼠注射地塞米松后发现其胃组织中AMP-18的含量明显上升, 提示地塞米松对AMP-18的分泌也有调节作用. 此外, 这一过程被RU-486(糖皮质激素Ⅱ类受体特异性拮抗剂)阻断, 但并不被螺内酯(糖皮质激素Ⅰ类受体特异性拮抗剂)阻断, 提示地塞米松可能通过糖皮质激素Ⅱ类受体来诱导AMP-18的合成.

2 AMP-18的生理作用

2.1 促胃黏膜细胞有丝分裂 Petri *et al*[9]运用Western blots方法测定出生后不同生长阶段小鼠胃组织中AMP-18的含量, 发现出生时AMP-18含量较高, 之后逐渐下降, 生后7 d达低谷水平, 然后逐渐上升, 第15 d再达高峰, 并以这种水平持续至断乳期(20-22 d), 第20 d后下降, 之后稳定保持于整个发育期, 实验中观察到, 在20-22 d左右大部分胃腺体的生长也达到一个高峰阶段, 而贲门腺生长则呈滞后状态, 这提示AMP-18可能有助于胃腺体的发育. AMP-18有促进细胞有丝分裂的功能. Martin *et al*[5]在BSC-1上皮细胞培养基中加入猪或小鼠胃窦黏膜细胞的提取物, 发现细胞数增加, 并且增加幅度为其他促细胞有丝分裂因子如EGF、IGF-I、aFGF、bFGF及vasopressin的2倍, 提示提取物中含有促细胞有丝分裂因子, 而当在上述实验细胞培养基中加入该提取物及3H-thymidine, 发现当逐渐加大提取物的浓度时, 3H-thymidine掺入量增加, 且这种现象能完全被AMP-18的血清抗体所阻断, 这进一步说明了促细胞有丝分裂的物质为AMP-18. 但AMP-18的这种促增殖作用是有细胞特异性的, 在人成纤维细胞、HeLa细胞中均未发现有促细胞有丝分裂效应[8]. Toback *et al*[8]进一步分析AMP-18肽段的不同区域, 发现其促细胞有丝分裂作用定位于第77-97氨基酸, 并且, 发现当在AGS细胞培养基中同时加入EGF和AMP-18第77-97氨基酸肽段, 并使他们促细胞有丝分裂浓度均达最大时, 细胞的增殖率较单种因素作用时明显加强, 这提示了这两种促细胞生长因子的受体可能并不相同, 或者他们的细胞内信号传导途径并不相同. 有趣的是, AMP-18具有耐热的特性, 在65℃下其促细胞有丝分裂作用仍能持续5 min[5]. 曾有报道胃窦黏膜细胞的更新时间很快, 为3 d左右[10], 这可能与胃内多重损伤因素有关, 而胃窦黏膜细胞的快速更新可能与AMP-18的定位、促细胞有丝分裂作用密切相关, 提示他可能作为胃黏膜细胞的一种旁分泌细胞生长因子.

2.2 促细胞迁徙作用 AMP-18还能促进胃黏膜表面创伤部位单细胞层的修复, 这种损伤的修复不

仅通过促细胞的有丝分裂, 而且通过促进细胞的迁徙运动而完成. Toback *et al*[8]在HAE细胞和IEC-18细胞的单细胞层中造成局部缺损, 然后加入AMP-18, 观察损伤边缘细胞的迁移运动, 发现在细胞数增加之前损伤边缘的细胞已有明显的迁移, 并且同样的, AMP-18与EGF的促细胞迁徙作用也有相加性. AMP-18与细胞相结合的部位据推测位于黏膜细胞的两侧, 而非顶端[11]. 当黏膜受损时, 包含AMP-18的胃黏液流动, 接触到损伤黏膜边缘的细胞, AMP-18与细胞侧面的受体结合, 诱导细胞的迁移、增殖, 参与了胃黏膜损伤的迅速修复[12].

2.3 与胃黏膜病变的关系 Oien *et al*[6]通过检测胃黏膜表面AMP-18的含量, 发现他在单纯胃炎(包括HP相关性胃炎)或萎缩性胃炎胃黏膜表面的表达并未见减少. 而关于AMP-18与胃癌的关系, 目前已有多方面报道通过免疫组织化学、差异显示、蛋白质组学等实验方法比较正常胃黏膜及胃癌组织中AMP-18 mRNA及蛋白的含量, 发现两者在胃癌组织中的表达均明显下降或缺失[6,16-19], 并且这种表达缺失见于各种病理类型的胃癌细胞[18]. Shiozaki *et al*[19]发现, 经转染CA11的MKN28细胞其集落形成数量较正常对照组明显下降, 因此, 可以推测CA11与胃癌发生有一定的相关性, 有可能作为抑癌基因的角色抑制胃癌的发生. 因此, AMP-18有可能发展成为一种新的检测手段和治疗方法应用于胃癌的诊断和治疗. 但目前尚未发现AMP-18的表达与肿瘤的组织学分型、浸润深度、淋巴结转移、临床分型等影响预后因素具有相关性[19].

2.4 对肠黏膜的保护作用 最近有研究发现AMP-18对肠黏膜也有保护作用. Walsh-Reitz *et al*[11]给小鼠sc AMP-18后, 发现可明显延迟右旋糖酐硫酸酯钠(DSS)引起的直肠黏膜损伤(如血便发生)的发生并可减少体质量下降的程度. 进一步在细胞水平对上述现象进行研究, 发现氯乙烷、吲哚美辛或DSS黏膜损伤剂能引起人结肠上皮C2细胞单细胞层跨上皮电阻(TER)的下降, 及细胞周围紧密连接蛋白、结合前肌动蛋白(perijunctional actin)含量的减少[11]. 而当在该细胞培养基中预先加入AMP-18后可明显减少黏膜损伤剂引起的TER下降, 并促使TER的回复, 此外, 也能增加细胞周围紧密连接(TJ)相关蛋白(occludin, claudin-5, ZO-1、ZO-2)、上皮细胞钙黏蛋白的积累并减少他们的丢失, 和通过稳定结合前肌动蛋白(perijunctional actin)来保持细胞层的完整性, 由此可见, AMP-18对肠黏膜具有保护作用[11]. 该实验中还发现AMP-18增加细胞周围occludin, ZO-1蛋白不是通过增加合成, 而是把已破坏细胞周围的上述蛋白重定位于未破坏细胞的周围, 并防止其再受破坏, 因为当在细胞培养基中加入cycloheximide(一种蛋白质合成抑制剂)后并没有阻止细胞周围occludin, ZO-1量的增加[11]. occludin, ZO-1蛋白的重聚集是通过酪氨酸磷酸化进行的[13], 因此推测AMP-18可能通过激活酪氨酸激酶使酪氨酸磷酸化, 从而引起occludin, ZO-1蛋白的重聚集. 实验中并未发现加入AMP-18后hsc-73的含量有变化[11], 提示AMP-18的肠黏膜保护作用可能并非通过热休克蛋白70家族[14]来实现. 与AMP-18相比, EGF虽然也有促进细胞增殖和迁徙的作用, 但在Walsh-Reitz *et al*[11]的实验中并未发现他有减少TER下降的作用, 也未发现有促进细胞周围occludin和ZO-1积累的作用. 此外, 三叶因子家族对肠黏膜也有保护作用, 但这种保护作用主要通过与肠黏膜表面的糖蛋白相互作用而实现[15]. 从此也可以看出, AMP-18虽然作为一种胃黏膜独特分泌的蛋白质, 但他的受体可能并不局限于胃黏膜处, 在整个胃肠道甚至其他部位可能都有表达, 血液中也可能存在AMP-18的转运体, AMP-18对整个胃肠道甚至其他器官可能有着极其广泛的生理功能.

与三叶因子、防御素、表皮生长因子、热休克蛋白相比较, AMP-18也具有促进上皮细胞增殖、迁移的功能, 不同的是, 他发挥最大生物学效应所需的浓度远较其他细胞因子低, 并且他的生物学效用并不弱于其他细胞因子. 此外, 在胃癌组织中AMP-18、ITF表达下降[6,16-19,26-27], 而防御素、EGF、热休克蛋白则表达上升[28-30], 提示这些细胞因子可能与胃黏膜的癌变有关(表1). 总的来说, AMP-18作为一种近年来发现的胃黏膜保护因子, 能使胃肠黏膜对各种损伤因子的防御能力增强, 并且对胃肠黏膜保护及损伤后修复具有重要作用. 但目前对于AMP-18的研究尚处于起步阶段, 还有多方面问题尚未阐明, 如AMP-18与受体相互作用方式及其信号传导途径、是否存在其他生理功能, 与胃肠疾患、胃癌发生的具体关系如何等等, 这些尚需进一步探讨. 目前国外已有相关机构着眼于AMP-18的研制, 他有望成为一种有效的新型药物应用于胃肠黏膜损伤如胃溃疡、十二指肠溃疡、炎症性肠病等, 并作为肿瘤诊断及治疗的手段之一.

■创新盘点
本文收集了近年关于AMP-18研究方面的一些进展内容, 对目前发现的AMP-18生理作用做了归纳, 并与其他胃黏膜保护因子相比较, 突出了AMP-18的作用特点.

■应用要点
本文概括了AMP-18对胃肠黏膜的保护作用，提示他有可能作为一种新型药物运用于治疗胃肠黏膜损伤.

表 1 AMP-18与三叶因子、防御素、表皮生长因子、热休克蛋白比较

	三叶因子Trefoil Peptides (ITF, pS2, SP)	防御素 (α, β)	AMP-18	表皮生长因子 (EGF)	热休克蛋白 (HSPs)
蛋白质长度	60 aa (ITF)	29 – 42 aa	165 aa	53 aa	640–650 aa左右
合成部位	胃肠黏膜杯状细胞	小肠潘氏细胞	胃窦黏液细胞	唾液腺、十二指肠腺、胃肠道潘氏细胞、胰腺、肾脏	体内的一切细胞
是否分泌到黏膜表面黏液中	是	是	是	部分	无
发挥最大生物活性所需浓度	1–5 g/L – 150 –750 μmol/L[8]	600 mg/L – 140 μmol/L (防御素α)[8]	0.5–1 μg AMP peptide/mL[8]	10–50 μg/L[8,20]	尚无报道
是否促进上皮细胞的迁移	是[21]	尚无发现	是	是[22]	是[23]
是否诱导氯离子分泌	尚无发现	是 (防御素α)[24]	尚无发现	尚无发现	尚无发现
是否促进细胞分裂	可能没有	尚无发现	是	是[22]	是[23]
是否介导黏膜免疫	未发现	有[25]	未发现	未发现	可能有[26]
与胃癌组织的关系	ITF在胃癌组织中表达下降[27–28]	增加 (防御素β)[29]	缺失	表达增加[30]	表达增加[31]

3 参考文献

1 任建林, 卢雅丕, 潘金水. 胃黏膜保护的基础与临床研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2521-2529
2 Bi LC, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense: an integrated protective response. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 526-532
3 Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 1-9
4 Powell CT. Characterization of a Novel Messenger RNA and Immunochemical Detection of its Protein From Porcine Gastric Mucosa (PhD dissertation). Chicago IUoCP, 1987
5 Martin TE, Powell CT, Wang Z, Bhattacharyya S, Walsh-Reitz MM, Agarwal K, Toback FG. A novel mitogenic protein that is highly expressed in cells of the gastric antrum mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G332-G343
6 Oien KA, McGregor F, Butler S, Ferrier RK, Downie I, Bryce S, Burns S, Keith WN. Gastrokine 1 is abundantly and specifically expressed in superficial gastric epithelium, down-regulated in gastric carcinoma, and shows high evolutionary conservation. *J Pathol* 2004; 203: 789-797
7 Sanchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 329-332
8 Toback FG, Walsh-Reitz MM, Musch MW, Chang EB, Del Valle J, Ren H, Huang E, Martin TE. Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G344-G353
9 Petri MK, Lee PC. Effects of dexamethasone on antral mucosal protein and gastric development in postnatal rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 461-466
10 Lee ER. Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: III. Ultrastructure and renewal of pit cells. *Am J Anat* 1985; 172: 225-240
11 Walsh-Reitz MM, Huang EF, Musch MW, Chang EB, Martin TE, Kartha S, Toback FG. AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G163-G171
12 Lacy ER, Morris GP, Cohen MM. Rapid repair of the surface epithelium in human gastric mucosa after acute superficial injury. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17: S125-S135
13 Tsukamoto T, Nigam SK. Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am J Physiol* 1999; 276: F737-F750
14 Musch MW, Sugi K, Straus D, Chang EB. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 1999; 117: 115-122
15 Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 1995; 109: 516-523
16 Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res* 2004; 14: 491-499
17 He QY, Cheung YH, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Chiu JF. Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics* 2004; 4: 3276-3287
18 Yoshikawa Y, Mukai H, Hino F, Asada K, Kato I. Isolation of two novel genes, down-regulated in

gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 459-463
19 Shiozaki K, Nakamori S, Tsujie M, Okami J, Yamamoto H, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Furukawa H, Hiratsuka M, Kasugai T, Ishiguro S, Monden M. Human stomach-specific gene, CA11, is down-regulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 701-707
20 Coskun S, Lin YC. Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 311-317
21 Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* 1994; 94: 376-383
22 Tarnawski AS, Jones MK. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. *J Clin Gastroenterol* 1998; 27: S12-S20
23 Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1291-1301
24 Lencer WI, Cheung G, Strohmeier GR, Currie MG, Ouellette AJ, Selsted ME, Madara JL. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptdins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8585-8589
25 Ouellette AJ. IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. *Am J Physiol* 1999; 277: G257-G261
26 Gastpar R, Gross C, Rossbacher L, Ellwart J, Riegger J, Multhoff G. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *J Immunol* 2004; 172: 972-980
27 Beckler AD, Roche JK, Harper JC, Petroni G, Frierson HF Jr, Moskaluk CA, El-Rifai W, Powell SM. Decreased abundance of trefoil factor 1 transcript in the majority of gastric carcinomas. *Cancer* 2003; 98: 2184-2191
28 Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-588
29 Markeeva N, Lisovskiy I, Lyzogubov V, Usenko V, Soldatkina M, Merentsev S, Zaitsev S, Kondratskii Y, Tofan A, Osinskiy S, Pogrebnoy P. Expression of beta-defensin-2 in human gastric tumors: a pilot study. *Exp Oncol* 2005; 27: 130-135
30 Yoshida K, Kyo E, Tsujino T, Sano T, Niimoto M, Tahara E. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor genes in human gastric carcinomas; implication for autocrine growth. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 43-51
31 Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, Myong NH, Hwang CH, Lee GS, Yom HC. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 505-509

■同行评价
内容新颖, 清楚地表达了AMP-18的结构, 功能以及与其他保护因子的作用, 有指导意义.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第十五次全国中西医结合肝病学术会议

本刊讯 第十五次全国中西医结合肝病学术会议将于2006-09在天津举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-06-15截稿

2 联系方式

上海中医药大学 胡义扬; 邮编: 201203

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 810-813
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平

李永哲, 孙可歆, 赵 臣

■背景资料
Foxp3是新近发现的一个转录因子, 介导$CD4^+CD25^+$ T调节细胞的发育、表达及功能维持. Foxp3基因减低会导致$CD4^+CD25^+$ T调节细胞数量下降, 免疫调节功能缺陷, 可诱发严重的自身免疫反应, 因此, Foxp3对机体免疫自稳起着决定性作用. 溃疡性结肠炎(UC)是一种病因未明的自身免疫性疾病, 研究Foxp3与UC活动性的关系有利于疾病的诊断及开展新的免疫治疗方法.

李永哲, 孙可歆, 赵臣, 中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科 北京市 100730
国家自然科学基金资助项目, No. 30471617
国家高技术研究发展技划(863计划)重大专项基金资助项目, No. 2002AARZ2011
通讯作者: 李永哲, 100730, 东城区帅府园1号, 中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科.
yongzhelipumch@yahoo.com.cn
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416
收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-08

Expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood monocytes of patients with ulcerative colitis

Yong-Zhe Li, Ke-Xin Sun, Chen Zhao

Yong-Zhe Li, Ke-Xin Sun, Chen Zhao, Department of Laboratory, Hospital of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471617, and the Key Special Foundation of National 863 Project, No. 2002AARZ2011
Correspondence to: Yong-Zhe Li, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
Received: 2006-01-11 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To investigate the level of Foxp3 mRNA in the peripheral blood monocytes (PBMCs) of patients with ulcerative colitis (UC), and its relationship with activity of UC.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine Foxp3 mRNA expression in the PBMCs from 22 cases with UC in active stage, 20 cases at stable stage, and 30 normal controls.

RESULTS: Foxp3 mRNA expression was lower in patients with UC at active stage than that in the controls (1.58 ± 0.31 *vs* 3.27 ± 0.40, $P < 0.05$), while Foxp3 mRNA expression in UC at stable stage was not significantly different from that in the controls ($P = 0.104$). The level of Foxp3 mRNA in the PBMCs in active UC was negatively correlated with the Walmsley renal scoring ($r = -0.756$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: Foxp3 mRNA expression in the PBMCs may be involved in the pathogenesis and activity of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Foxp3; Peripheral blood monocytes

Li YZ, Sun KX, Zhao C. Expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood monocytes of patients with ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):810-813

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA表达及其与疾病活动性的关系.

方法: 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测42例UC患者(活动期22例、缓解期20例)和30例正常对照组外周血单个核细胞Foxp3 mRNA的表达水平.

结果: UC患者急性期Foxp3 mRNA水平低于正常人, 差异有显著性(1.58±0.31 *vs* 3.27±0.40, $P<0.05$); 缓解期Foxp3 mRNA水平与正常人差异无显著性($P = 0.104$); PBMC中Foxp3 mRNA表达水平与Walmsley评分标准有相关性, 且呈负相关.

结论: UC患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA表达水平显著低于正常人, 其参与了UC的发病过程并与疾病的活动性有关.

关键词: 溃疡性结肠炎; 转录因子Foxp3; 外周血单个核细胞

李永哲, 孙可歆, 赵臣. 溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平. 世界华人消化杂志 2006;14(8):810-813
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/810.asp

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病

因未明慢性非特异性的结肠炎症. 其发病可能与免疫、遗传、感染等因素有关, 并可伴有多发结节性红斑、关节炎、Graves病等自身免疫性肠外表现. 随着实验技术的进步, 越来越多的研究发现细胞免疫在IBD的发病中起了非常重要的作用. Foxp3是新近发现的一个转录因子, 属于foxhead家族成员, 组成性表达于机体的$CD4^+CD25^+$ T调节细胞, 介导$CD4^+CD25^+$ T调节细胞在胸腺的发育、外周表达及功能维持. 研究发现Foxp3基因突变或敲除的小鼠, 其体内$CD4^+CD25^+$ T调节细胞数量下降, 调节功能缺陷, 可诱发严重的自身免疫反应, 因此, Foxp3对机体免疫自稳起着决定性作用[1]. 本文对在UC患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达及疾病活动性关系进行研究, 以明确Foxp3在发病中的作用, 并为疾病的诊断及新的免疫学疗法的开展提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 北京协和医院2005-04/10门诊和住院诊断明确的40例患者, 其中男34例, 女6例, 年龄26-68岁, 平均年龄47岁. 全部病例符合1993年太原全国非感染性肠道学术会议制定的《溃疡性结肠炎的诊断及疗效标准》. UC活动性按Walmsley评分标准进行评价[2], <4分为缓解期; 5-8分为中度活动期; 9分以上为重度活动期. 其中活动期22例, 缓解期18例(经内科治疗缓解者). 30例健康体检者为正常对照组.

1.2 方法

1.2.1 PBMC的分离 正常对照组和UC患者分别取肘静脉血3 mL, 肝素抗凝, 稀释后的血液缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液(Ficoll)中, 2 000 r/min离心20 min, 分离出PBMC, 再加入5倍体积9 g/L生理盐水, 2 000 r/min离心10 min, 洗涤2次, 加入Trizol(Invitrogen公司)后, −80℃保存.

1.2.2 总RNA的提取 从-80℃冰箱中取出PBMC, 彻底混匀, 室温静置5 min; 加入0.2 mL氯仿, 剧烈振动15 s, 室温静置2 min; 4℃ 12 000 *g*离心15 min, 轻吸出上层水相至另一EP管, 加等体积异丙醇, 混匀静置10 min; 4℃ 12 000 *g*离心10 min; 弃上清, 加入1 mL 750 mL/L乙醇洗涤沉淀, 4℃ 7 500 *g*离心5 min; 吸干乙醇, 空气中干燥; 加入20 μL无RNA酶水溶解RNA.

1.2.3 RNA纯度和含量的测定 取5 μL抽提的RNA样品上样电泳, 在12 g/L普通琼脂糖凝胶图谱中显示28 S, 18 S两条带, 且28 S带亮度为18 S带亮度二倍者入选. 紫外分光光度计检测RNA在260 nm, 280 nm波长处的吸光度值, 并计算A_{260}/A_{280}比值和RNA浓度(浓度μg/mL = A_{260} ×40×稀释倍数)(图1).

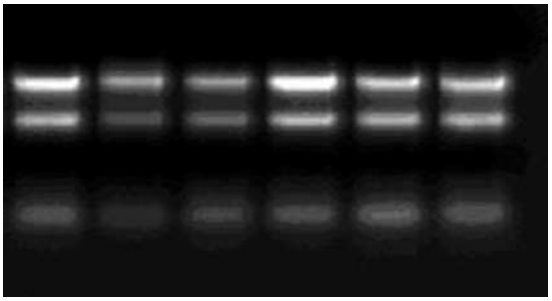


图 1 总RNA电泳图.

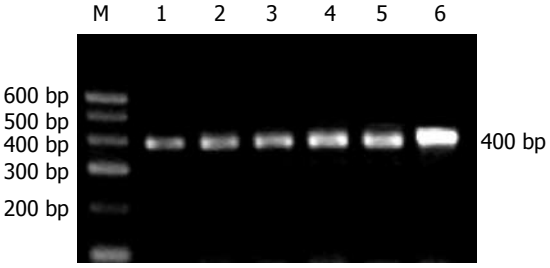


图 2 UC患者PBMC中Foxp3基因RT-PCR扩增结果. M: Marker; 1−6: 扩增条带400 bp; 1−2: UC活动期患者; 3−4: UC缓解期患者; 5−6: 正常对照.

1.2.4 cDNA的合成 20 μL逆转录反应体系中包括样品总RNA 2-4 μg, M-MLV逆转录酶200 U, Rnasin 50 U, 4×dNTP 2 μL, Oligo(dT) 26 U, DTT 1 μL, 5×反应缓冲液4 μL和无RNA水9 μL. 反应条件为37℃ 1 h, 然后95℃ 5 min灭活逆转录酶.

1.2.5 DNA扩增(PCR) PCR反应仪为Promega公司产品. 25 μL DNA反应体系中包括cDNA 2.5 μL, TaqDNA聚合酶0.5 μL, 上游引物1 μL, 下游引物1 μL(上海生物工程公司合成), dNTP 0.5 μL, $MgCl_2$ 2.0 μL, 10×反应缓冲液2.5 μL和无RNA水15 μL. 以肌动蛋白(β-actin)为内参照, 实验中所用引物序列、反应条件及片段长度如下: β-actin上游引物5'-GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3', 下游引物5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGG-3', 320 bp; Foxp3上游引物5'-ACACCACCCACCACCGCCACT-3', 下游引物5'-TCGGATGATGCCACAGATGAAGC-3', 400 bp. 反应条件94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 45 s, 72℃ 7 min, 4℃ 5 min (图2-3).

1.2.6 RT-PCR产物的检测 取5 μL PCR产物置于20 g/L琼脂糖凝胶中80 mV, 40 mA电泳25 min

■研发前沿
近年来关于$CD4^+CD25^+$ T调节细胞与Foxp3转录因子的研究日益成为研究热点.

■**创新盘点**
近年来关于CD4+CD25+T调节细胞与Foxp3转录因子的研究日益成为研究热点, 已有研究表明二者与自身免疫性疾病密切相关, 本研究证实Foxp3参与调控CD4+CD25+T调节细胞的功能, 并与UC的活动性呈明显负相关.

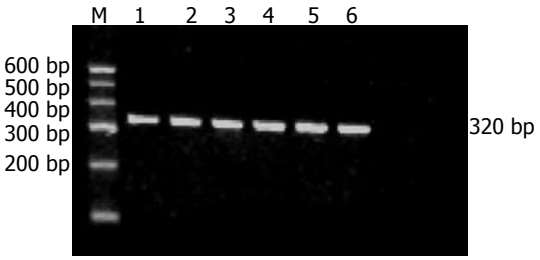


图 3 UC患者及正常对照组β-actin内参照电泳图. M: marker; 1-6: 内参照 β-actin 320 bp.

表 1 正常人、活动期和缓解期UC患者PBMC中Foxp3 mRNA表达水平及Walmsley评分 (mean ± SD)

组别	*n*	Walmsley评分	Foxp3/β-actin
正常对照组	30		3.27 ± 0.40
活动期UC	22	7.45 ± 1.44	1.58 ± 0.31
缓解期UC	18	3.15 ± 0.75	3.09 ± 0.37

观察. 电泳后凝胶置于紫外光可见分析装置中, 用Gel Doc 2000 Bio-Rad公司(美国)图像分析系统进行扫描拍照, 并检测各电泳条带的*A*值, 计算Foxp3/β-actin, 从而得到Foxp3的相对含量.

统计学处理 采用SPSS 11.0软件, 先对原始资料进行正态性检验, 服从正态性分布用完全随机设计的方差分析.

2 结果

2.1 细胞总RNA抽提结果 RNA纯度检测结果: A_{260}/A_{280}比值均在1.651-1.928之间, 提示RNA较纯. RNA浓度在330-1 700 μg/mL之间.

2.2 正常人、活动期和缓解期UC患者PBMC中的Foxp3 mRNA水平见表1 活动期Foxp3 mRNA水平低于正常人, 差异有显著性(P<0.05); 活动期Foxp3 mRNA水平低于缓解期, 差异有显著性(P<0.05); 缓解期Foxp3 mRNA水平与正常人无显著差异(P = 0.104).

2.3 UC活动指数Walmsley评分与Foxp3 mRNA表达的相关性 活动期UC患者Walmsley评分与目的基因Foxp3的表达呈显著负相关(r = -0.756, P = 0.000). 缓解期UC患者Walmsley评分与目的基因Foxp3的表达无相关性(P = 0.813).

3 讨论

炎症性肠病(IBD)是一种病因未明、侵及胃肠道的自身免疫性疾病, 包括溃疡性结肠炎(UC)和克隆恩病(CD). 近年来, UC的患病率呈逐渐上升趋势[2], 目前认为免疫因素在UC中具有重要作用, 且已成为研究的热点. Foxp3基因定位于Xp11.23, 含有84个氨基酸残基的foxhead结构域, GH2锌指结构和一个亮氨酸拉链, 该基因家族编码蛋白具有相似的保守结构, 均通过其Foxhead结构域与DNA特定位点结合, 调节目的基因的活化和表达[3]. 最近研究发现CD4+CD25+ T调节细胞异常表达是导致自身免疫性疾病的主要原因, Foxp3是CD4+CD25+ T调节细胞的特异性标志[4-5]. 人类Foxp3基因可有多种突变, 包括点突变、mRNA剪切缺陷及亮氨酸拉链区改变, 导致类似的系统性自身免疫病-IPEX(新生儿糖尿病、炎症性肠炎、内分泌综合征等), 而且Ⅰ型糖尿病、克隆恩病也与Foxp3基因改变有关[6-7]. Hori *et al*[8]已经证实正常人类和小鼠胸腺及外周血中CD4+CD25+ T调节细胞特异性表达Foxp3, 逆转录该基因可以转化初始型T细胞, 使其成为具有调节功能的T调节细胞. Maul *et al*[9]采用流式细胞术和real-time PCR分析CD4+CD25+ T调节细胞、Foxp3表达水平, 结果表明IBD患者外周血中CD4+CD25+ T调节细胞保持了他们的抑制活性, 疾病活动期CD4+CD25+调节细胞和Foxp3下降, 但疾病缓解期和对照组比率上升, CD4+CD25+ T调节细胞可能参与IBD的发病机制. 我们采用半定量RT-PCR方法检测UC患者PBMC中Foxp3 mRNA的表达水平, 研究结果显示: UC患者活动期Foxp3 mRNA表达水平显著低于缓解期和正常对照组, 而缓解期与正常对照组无显著差异, 表明可能由于CD4+CD25+ T调节细胞数量减少, 从而使Foxp3 mRNA表达水平降低, 调节功能缺陷, 诱发严重自身免疫反应. 提示Foxp3是CD4+CD25+ T调节细胞中主要的调控基因, Foxp3可能通过以下几种途径参与T调节细胞的功能维持: Foxp3能竞争结合与细胞活化相关基因, 以间接抑制效应基因的转录, 同时也可直接抑制效应基因的表达; Foxp3可作为一种转接蛋白招募其他具有抑制功能的效应分子与目的基因结合. 我们的研究还对UC患者Walmsley评分与Foxp3/β-actin灰度比值进行相关分析, 结果二者之间呈明显负相关(P<0.001), 也就是说, 活动指数越高, 目的基因的表达量越小; 相反, 活动指数越小, 目的基因的表达量越高.

总之, Foxp3在免疫调节中起着重要作用, 了解在疾病发病中的作用及活动性关系, 以辅助临床, 为溃疡性结肠炎的诊断和治疗提供新

的思路.

4 参考文献

1 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337

2 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205

3 Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003; 55: 149-156

4 Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 298: 1395-1401

5 Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19: 165-168

6 Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, Lachaux A, Bridges NA, Cheetham TD, Pearce SH. Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 6034-6039

7 Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002; 39: 537-545

8 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061

9 Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory $CD4^+$ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878

■同行评价

UC患者急性期Foxp3 mRNA水平明显低于正常人, 缓解期表达水平与正常人无差异, 活动期表达水平亦明显低于缓解期; 并证实了PBMC中的Foxp3 mRNA表达水平与Wal-msley评分标准呈负相关关系. 本研究题目新颖, 设计合理, 采用技术手段先进, 为UC的诊断和治疗提供了重要的参考. 因此, 本文研究内容也具有重要的实用意义.

电编 张敏 编辑 王瑾晖

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

• 消息 •

第十届全军普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办, 南京军区福州总医院承办的“第十届全军普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行. 会议采用院士论坛、专题报告等形式, 对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论. 欢迎军内外普通外科医师参加会议.

1 征文内容

征文内容包括: 有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容.

2 征稿要求

征稿要求包括: (1) 要求中文全文(4 000字以内)及摘要(500字以内)各1份. 稿件请寄软盘(Word 格式), 欢迎用电子邮件方式投稿. (2) 来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“会议征文”字样.

来稿请寄: 350025, 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈收. E-mail地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn, 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 814-818
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

记忆合金支架捆绑碘-125粒子治疗食管癌的临床应用

金安琴, 黄晓俊, 王 祥, 樊 红

■背景资料
消化管晚期肿瘤患者往往因腔管梗阻而导致死亡. 以往常采用姑息性改管手术来解除梗阻, 而这类患者多因身体虚弱不能耐受手术, 或因手术后许多并发症而使其生存期缩短、生活质量降低. 为解决以上困难, 近年来国内外开展起了各种腔管记忆合金支架置入术, 取得了较满意的治疗效果. 食管支架为近年来广泛应用于因食管癌造成的食管狭窄或梗阻的治疗, 但是食管支架对肿瘤本身的发展进程没有影响.

金安琴, 黄晓俊, 王祥, 樊红, 兰州大学第二医院消化内科 甘肃省兰州市 730030
甘肃省中青基金资助课题, No. YS-011-A23-20
通讯作者: 黄晓俊, 730030, 甘肃省兰州市城关区翠英门82号, 兰州大学第二医院消化内科. huangxj62@163.com
电话: 0931-8942615
收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-19

Clinical application of self-expandable medical memorial metallic stent with iodine-125 seeds in treatment of esophageal carcinoma

An-Qin Jin, Xiao-Jun Huang, Xiang Wang, Hong Fan

An-Qin Jin, Xiao-Jun Huang, Xiang Wang, Hong Fan, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Supported by the Foundation for the Youth of Gansu Province, No. YS-011-A23-20
Correspondence to: Dr. Xiao-Jun Huang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Lanzhou University, 82 Cuiyingmen, Chengguan District, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. huangxj62@163.com
Received: 2005-12-08 Accepted: 2005-12-19

Abstract

AIM: To analyze the curative effect of self-expandable medical memorial metallic stent with iodine-125 seeds in the treatment of esophageal carcinoma at advanced stage.

METHODS: Forty-five patients with esophageal carcinoma at advanced stage were divided into group A and B. The patients in group A were treated with normal self-expandable stents, while those in group B received the stents with iodine-125 seeds. After the operation, the patients were followed up and their complications and survival time were analyzed.

RESULTS: The stents were successfully implanted in all the 45 patients. The patients were obviously relieved from their difficulties in swallowing. The survival time of patients in group A were 90-300 d, with an average of 171 ± 56 d, and those in group B were 120-450 d, with an average of 316 ± 116 d. There was significant difference between them (t = -3.385, P < 0.05).

CONCLUSION: Self-expandable stent with iodine-125 seeds can obviously alleviate the symptoms of difficulty in swallowing, improve the patients' life quality and survival time.

Key Words: Esophageal carcinoma; Iodine-125 seed; Stent; Brachytherapy

Jin AQ, Huang XJ, Wang X, Fan H. Clinical application of self-expandable medical memorial metallic stent with iodine-125 seeds in treatment of esophageal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):814-818

摘要

目的: 探讨附有碘-125粒子的医用记忆合金食管支架置入对晚期食管恶性狭窄的疗效.

方法: 45例晚期食管癌按患者是否愿意接受碘-125粒子支架而将其分为A、B两组, A组为普通自膨式支架, B组为附有碘-125粒子的自膨式食管支架进行治疗. 术后随访并发症及生存期.

结果: 45例患者支架全部顺利置放, 支架置入成功率100%, 患者吞咽困难均得到明显缓解. A组患者生存时间90-300 d, 平均171±56 d. B组患者生存时间120-450 d, 平均316±116 d, 两者比较有统计学意义(t = −3.385, P<0.05). 两组均未出现严重并发症.

结论: 附有碘-125粒子的自膨式食管支架能明显缓解吞咽困难症状, 明显提高患者生活质量及生存期, 且无严重并发症发生.

关键词: 食管癌; 碘-125粒子; 支架; 近距离放射疗法

金安琴, 黄晓俊, 王祥, 樊红. 记忆合金支架捆绑碘-125粒子治疗食管癌的临床应用. 世界华人消化杂志 2006;14(8):814-818
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/814.asp

0 引言

食管支架为近年来广泛应用于因食管癌造成的

食管狭窄或梗阻的治疗, 结果表明食管支架可以解决患者的吞咽困难问题[1-6]. 但是食管支架对肿瘤本身的发展进程无任何影响. 能否将放射粒子捆绑于食管支架上置入到病变部位, 从而达到既解决患者吞咽困难又能抑制肿瘤生长的目的, 我院2004-06/2005-05应用附有碘-125粒子的自膨式食管支架治疗了20例中晚期食管癌患者, 取得了初步结果, 现报管如下.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 45例患者, 男35例, 女10例, 年龄55-85岁, 平均69岁. 全部病例均经食管钡餐、胃镜及活检证实为食管癌. 吞咽困难程度采用stooler分级标准[7]. 按患者是否愿意接受碘-125粒子支架治疗而将其分为A、B两组. A组放置普通自膨式支架, B组置入附有碘-125粒子的自膨式食管支架. A组25例, 其中男19例, 女6例, 平均年龄68.9岁, 病理类型鳞癌18例, 腺癌7例, 病变长度4.0-7.0 cm, Ⅲ级16例、Ⅳ级9例, 吞咽困难记分平均为3.36. B组20例, 其中男16例, 女4例, 平均年龄69.4岁, 病理类型鳞癌15例, 腺癌5例, 病变长度4.0-9.0 cm, 吞咽困难Ⅲ级12例、吞咽困难Ⅳ级8例, 吞咽困难记分平均为3.40. 两组患者的吞咽困难及病理类型分级无统计学意义. 所有患者因年迈体弱或伴有心肺疾患或肿瘤转移, 不宜或拒绝外科手术治疗, 均未行放(化)疗等特殊治疗.

1.1.2 放射粒子 选用北京原子高科核技术应用股份有限公司生产的碘[^{125}I]密封籽源, 粒子呈圆柱状, 长4.5 mm, 圆柱直径0.8 mm. 其半衰期为59.43 d, 通过电子捕获而衰减并放出特征性的光子和电子. 电子由碘[^{125}I]密封籽源的钛管壁所吸收. 光子主要发射能量为27.4 kEV和31.4 kEV的X射线及35.5 kEV的γ射线, 同时激活的银棒也可以发射22.1 kEV和25.2 kEV的荧光X射线. 表面活度为0.3 -1.0 mCi.

1.1.3 内照射支架的研制 根据患者食管病变的长度和狭窄程度, 选择合适带膜记忆合金食管支架(南京微创医学科技有限公司生产), 由该公司于支架的外周先“固定”特制的、可用于包容放射粒子的鞘, 根据病变的长度和病变特征, 术前将放射粒子用镊子装入到特制鞘中, 使用前将内照射支架装进食管支架推送器内即可.

1.1.4 器械 日本PENTAX公司生产的EG-2930K电子胃镜、日本OLYMPUS公司生产的GIF-Q260电子胃镜, 使用南京微创医学科技有限公司生产的国产镍钛记忆合金支架及其原配置入器, 食管支架规格为16-20 mm×80-140 mm. 德国SIEMENS数字胃肠X光机、常州智业医疗责任有限公司生产的Savary Gilliard食管扩张器.

图 1 安装好的粒子支架.

■研发前沿
碘-125粒子是疗效肯定的低能放射粒子, 可使肿瘤细胞失去增殖能力, 对肿瘤产生持续、强大的杀灭作用. 将放射粒子捆绑于食道支架上置入到病变部位, 从而达到既解决患者吞咽困难又能抑制肿瘤生长的目的.

1.2 方法

1.2.1 普通支架置入法 25例患者均行X线监视下置入法. 常规插入胃镜至狭窄口, 通过胃镜活检孔管放置引导钢丝至胃窦部. 选择适当型号的Savary Gilliard食管扩张探条由细至粗沿导引钢丝逐级扩张狭窄食管, 使狭窄部扩张至13 mm以上. 再次插入胃镜在镜下确认病灶的远端、近端, 并在X线监视下以铅字分别标记之, 退出胃镜. 根据两铅字之间距离选择合适长度的支架(病变长度加3-4 cm)并置入支架释放器内. 沿引导钢丝将释放器放置在病灶部位, 在X线监视下确认位置并进行准确释放. 支架置入后, 再次进镜以确认支架位置、扩张程度及有无活动性出血后结束手术.

1.2.2 放置附有碘-125粒子的自膨式食管支架置入法 根据患者食管病变的长度和狭窄程度, 定制合适带膜记忆合金食管支架, 于支架的外周先“固定”特制的、可用于包容放射粒子的鞘, 根据病变的长度和病变特征, 由放射性技术人员将碘-125粒子安装在支架上, 安装前先确定安装碘-125粒子的层数, 一般每1.5 cm安装一层碘-125粒子, 每层放置3-4粒, 按90-120°角度间隔安装在同一平面内, 2层之间的碘-125粒子相互交错. 将放射粒子用镊子装入到特制鞘中(图1), 使用前将内照射支架装进食管支架推送器内即可. 碘-125粒子自膨式支架手术过程同普通自膨式支架置入法(图2-4).

1.2.3 术后随访 支架置入后第3 d做食管泛影葡胺造影, 观察支架位置和扩张情况. 然后分别于1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 mo时, 门诊或电话随访患

■应用要点
食道内照射支架临床初步应用是安全、有效的. 能有效抑制食道恶性肿瘤的生长, 并能明显改善吞咽困难症状, 提高生活质量, 延长患者生存期, 值得临床进一步推广和实践.

图 2 粒子支架置入.

图 3 粒子支架释放后.

图 4 粒子支架置入后内镜像.

表 1 支架置入前后吞咽困难程度 (stooler) 分级对比表

支架置入	0	I	II	III	IV	*P*值
普通支架置入前	0	0	0	16	9	*P*<0.01
普通支架置入后1 wk	8	10	7	0	0	
粒子支架置入前	0	0	0	12	8	*P*<0.01
粒子支架置入后1 wk	7	8	5	0	0	

者支架通畅情况及生活情况. 对支架有堵塞症状的患者给予及时处理, 对死亡患者的死亡原因及死亡时支架通畅情况进行详细记录. 对附有碘-125粒子的食管支架在上述随访同时术后2 mo复查胃镜并行胸部CT、摄片了解粒子有无脱落、肿瘤生长情况.

统计学处理 所有数据采用SPSS 10.0统计学软件进行统计学处理, 计量资料用mean±SD表示, 计数资料用频数表示, χ^2检验和*t*检验、秩和检验.

2 结果

2.1 支架释放情况 两组自膨式支架均一次成功释放, 释放过程顺利, 释放过程中未出现碘-125粒子脱落现象. 支架置入成功率均为100%.

2.2 缓解吞咽困难效果 术后1 wk两组吞咽困难均较术前明显改善(表1). A组吞咽困难评分平均从3.36级减至0.96级, 较术前明显改善(Wilcoxon W = 325.000, *P*<0.01). B组吞咽困难评分平均从3.4级减至0.90级, 较术前明显改善(Wilcoxon W = 210.000, *P* <0.01), 普通支架置入与粒子支架置入两种方法改善吞咽困难比较无统计学意义(*P*>0.05).

2.3 术中及术后并发症 (1)胸骨后及上腹部疼痛: A组25例患者中20例术后有胸骨后及上腹部疼痛, 进食时加重, 发生率为80%. B组20例患者中18例术后有胸骨后及上腹部疼痛, 进食时加重, 发生率为90%. (2)出血: A组6例、B组2例患者术后出现黑粪. (3)反流性食管炎: A组8例术后有反食、反酸、胸骨后烧灼等症状, 发生率33.3%, B组6例, 发生率30%. (4)支架堵塞: 随访期间A组7例(32%)术后再次出现梗阻症状, 胃镜检查发现1例患者为进食大块未嚼碎的羊肉所致的支架堵塞, 异物钳取出后症状解除; 另6例为肿瘤侵入食管所致, 经在梗阻部分再次置入另一支架后症状缓解, B组2例(10%)术后再次出现梗阻症状, 胃镜检查发现患者为进食枣核堵塞支架远端防反流瓣, 异物钳取出后症状解除. 1例为肿瘤侵入食管所致. (5)其他: 均未出现穿孔、支架移位及与支架置入导致的死亡. B组亦无白细胞减少、胃肠管反应等与放疗有关的并发症.

2.4 相关随访结果

2.4.1 生存时间 45例患者均进行了术后随访. 临床随访30-540 d. 生存时间见表2. A组有3例生存至今, 已平均生存184 d, B组有7例生存至今, 已平均生存336 d. 统计学分析示: B组患者生存时间明显长于A组($t = -3.385$, $P<0.05$), 加上尚生存7例, 平均生存时间将更长.

2.4.2 死亡原因 A组17例死于肿瘤全身转移和衰竭; 3例死于肺部感染; 2例死于消化管大出血. B组9例死于肿瘤全身转移和衰竭; 2例死于心血管疾病, 2例死于消化管大出血.

2.4.3 其他 复查所有患者未出现支架移位和脱落, 无消化管穿孔, 碘-125粒子支架未发现放射粒子的丢失.

表 2 两种支架置入后患者生存时间比较 (mean ± SD)

支架类型	*n*	生存时间 (d)	*P*
普通支架	22	171 ± 56	*P*<0.05
粒子支架	13	316 ± 116	

3 讨论

食管恶性梗阻是引起吞咽困难的主要原因, 咽下疼痛, 不能进食, 造成患者极大的痛苦, 且由于多种原因外科手术的危险性大, 疗效差, 术后复发率高. 采用内支架可以改善患者的吞咽困难和进食能力, 增强患者战胜疾病的信心和自身的抗病能力, 从而大大地提高患者的生活质量, 延长了生存期. 食管支架置入可使狭窄的食管充分扩张, 有效缓解患者的症状, 临床疗效满意. 本组普通支架置入后1 wk吞咽困难评分平均从3.36级减至0.96级, 平均生存时间171±56 d, 与国内外报管相近[3,8].

自膨式食管金属支架可以解决患者的吞咽困难问题, 但是对肿瘤本身的发展进程无任何影响. 在我国, 80%食管癌患者确诊时已属中晚期, 放疗为其主要治疗手段, 其5 a生存率约10%[9]. 外放疗目前仍为中晚期食管癌放疗的主要手段, 疗效确定, 但并发症高, 有报管达14.9%[10], 包括食管气管瘘、放射性肺炎、食管狭窄、食管溃疡等, 且任何一种并发症均可能造成严重后果, 甚至死亡. 碘-125粒子是疗效肯定的低能放射粒子, 可使肿瘤细胞失去增殖能力, 对肿瘤产生持续、强大的杀灭作用[11-14]. 但单纯置入碘-125粒子对进展期食管癌患者, 缓解吞咽困难疗效慢, 且操作复杂, 在肿瘤坏死过程中有脱落之嫌[15]. 我们将放射粒子捆绑于食管支架上置入到病变部位从而达到既解决患者吞咽困难又能抑制肿瘤生长的目的. 我们由放射性专业人员装填碘-125粒子, 在装填粒子过程中避免用手指直接接触放射粒子. 将装填好碘-125粒子的内照射支架装进食管支架推送器内, 理论上讲在支架外周固定了放射粒子, 增加了压缩后支架的直径、增大了支架和推送器壁之间的摩擦力, 从而影响支架释放. 然而我们发现, 附有碘-125粒子支架完全可以用普通食管支架推送器推送, 而且与普通食管支架释放过程一样, 没有因为放射粒子的存在而影响支架的释放. 20例患者支架释放均达到准确到位, 释放过程顺利, 无粒子脱落现象, 与普通支架置入比较, 未出现严重并发症, 有2例胸痛明显, 经对症治疗后好转. 生存时间比较置入附有碘-125粒子支架明显长于置入普通支架患者. 前者患者平均316±116 d, 后者平均171±56 d. 前者尚有35%的患者存活, 本研究组患者平均生存期还会延长.

本组20例患者2 mo后复查胃镜和胸部CT, 结果显示食管病灶13例缩小, 4例无明显变化, 3例增大(均为低分化腺癌), 这可能与所置入的粒子剂量和肿瘤病理类型有关. 本组1例见肿瘤侵入食管生长, 而置入普通支架组有6例肿瘤向支架内生长及阻塞支架两端. 这一结果可以说明放射性粒子对食管肿瘤是有明显抑制作用的.

但碘-125粒子虽然被封于特制的鞘内, 长时间处于食管的酸碱环境中会不会造成泄漏? 郭金和 *et al*[16]通过术后复查ECT显像来了解放射粒子辐射范围, 有无异位显影以及检验碘-125粒子有无泄漏, 结果显示碘-125粒子未发生泄漏.

本研究虽然开展时间较短、病例数少、随访时间短, 但研究显示食管内照射支架在技术上是可行的, 临床初步应用是安全、有效的. 能有效抑制食管恶性肿瘤的生长, 并能明显改善吞咽困难症状, 提高生活质量, 延长患者生存期, 值得临床进一步推广和实践.

■同行评价

本文具有一定的科学性、创新性和可读性, 能反映我国胃肠病学临床研究水平.

4 参考文献

1 钟燕, 吴艳环, 叶震世, 郭明玉, 蔡志萍, 陈凌. 中晚期食管癌支架治疗影响因素探讨. 中国内镜杂志 2000; 6: 50-52

2 朱明星, 韦华, 王朝富, 张华, 邵淑娟, 袁丽达. 食管恶性狭窄的内支架治疗. 贵州医药 2000; 24: 688-689

3 Cordero JA Jr, Moores DW. Self-expanding esophageal metallic stents in the treatment of esophageal obstruction. *Am Surg* 2000; 66: 956-958

4 Weigel TL, Frumiento C, Gaumintz E. Endoluminal palliation for dysphagia secondary to esophageal carcinoma. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 747-761

5 张俊文, 王顺文, 陶小红. 胃镜监视下食管内支架置入术. 重庆医科大学学报 2003; 28: 353-354

6 李晓林, 智发朝, 王福泉, 徐唐丽, 梁碧云, 付茁. 胃镜直视下放置金属内支架治疗恶性食管梗阻. 广东医学 2005; 26: 982-983

7 吴云林. 胃肠病学临床进展. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999: 152-153

8 曹彬, 王平平, 徐子山, 付永庆. 内镜直视下放置记忆合金覆膜支架治疗恶性食管贲门狭窄. 现代医学 2003; 31: 206

9 Fritz P, Wannenmacher M. Radiotherapy in the multimodal treatment of esophageal carcinoma. *Strahlenther Onkol* 1997; 173: 295-308

10 Okawa T, Dokiya T, Nishio M, Hishikawa Y, Morita K. Multi-institutional randomized trial of external radiotherapy with and without intraluminal bra-chytherapy for esophageal cancer in Japan. Japanese Society of Therapeutic Radiology and Oncology (JASTRO) Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 623-628

11 罗开元, 李波, 杨嵘, 王明春, 刘文卓, 曹卫弘, 黄明龙.

^{125}I粒子组织间放射治疗恶性肿瘤的临床应用. 中华医学杂志 2001; 81: 754-755
12 文黎明, 王洪州, 黄春, 陈先菊, 蒋涛, 赵世泉, 陈晓辉. 记忆合金支架捆绑125-碘粒子在治疗食管癌狭窄中的临床应用. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 410-411
13 周祝谦, 王子彬, 李桂杰, 张在建, 朱景润. 食管内照射支架治疗食管癌的临床研究. 中国中西医结合影像学杂志 2005; 3: 24-26
14 李士光, 朱世军. 食管内照射支架与普通支架临床应用的初步效果对比. 放射学实践 2005; 20:1014-1016
15 苏鲁, 梁武, 潘洪珍, 徐艺华, 洪梅燕, 赖雪珍, 陈芳. 碘-125粒子支架治疗晚期食管癌的疗效研究. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 316-318
16 郭金和, 滕皋军, 何仕诚, 邓钢, 杜明华, 方文, 朱光宇. 食管内照射支架的研制及临床应用的初步结果. 中华放射学杂志 2004; 38: 916-918

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者（包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail）

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 819-822
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

直肠癌手术后患者48例生存质量评定

陈 静, 赵 嫚, 谢 强, 孙玉华, 梁 健

陈静, 赵嫚, 谢强, 孙玉华, 梁健, 中国医科大学附属第四医院普通外科 辽宁省沈阳市 110005
通讯作者: 陈静, 110005, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院普通外科. chenjing0407@126.com
电话: 024-23390457
收稿日期: 2005-12-30 接受日期: 2006-02-21

Assessment of life quality of patients after rectal carcinoma operation

Jing Chen, Man Zhao, Qiang Xie, Yu-Hua Sun, Jian Liang

Jing Chen, Man Zhao, Qiang Xie, Yu-Hua Sun, Jian Liang, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China
Correspondence to: Jing Chen, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. chenjing0407@126.com
Received: 2005-12-30 Accepted: 2006-02-21

Abstract
AIM: To evaluate the changes of life quality of patients with rectal cancer before and after operation.

METHODS: The life qualities of 48 patients (Dixon: n = 25; Miles: n = 23) with rectal cancer were assessed using gastrointestinal quality of life index (GIQLI) before and 1, 6, 12 mo after operation.

RESULTS: The mean preoperative GIQLI score of all the patients was 104.21. The scores were 91.97 (P < 0.05), 105.65 (P > 0.05), and 113.95 (P < 0.05), respectively, 1, 6 and 12 mo after operation. The GIQLI score of Dixon's group was slightly lower than that of Miles' group 1 mo after operation (P > 0.05), but significantly higher than 6 and 12 months after operation (107.30 ± 10.57 *vs* 103.85 ± 11.03, P < 0.05; 116.35 ± 12.64 *vs* 111.34 ± 13.65, P < 0.05).

CONCLUSION: The life quality of patients with rectal cancer falls in the early period after operation due to the damage of operation and complication, but it is significantly improved in the long period, which is related to the operation style.

Key Words: Rectal carcinoma; Quality of life; Questionnaire

Chen J, Zhao M, Xie Q, Sun YH, Liang J. Assessment of life quality of patients after rectal carcinoma operation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):819-822

摘要
目的: 探讨直肠癌患者手术前后生存质量的变化.

方法: 采用GIQLI生存质量指标测定48例直肠癌手术患者术前及术后1, 6, 12 mo的生存质量值.

结果: 直肠癌患者手术前平均GIQLI指数104.21分, 术后1 mo平均GIQLI指数91.97分(P<0.05), 术后6 mo平均GIQLI指数105.65分(P>0.05), 术后12 mo平均GIQLI指数113.95分(P<0.05). Dixon手术后1 mo平均GIQLI指数略低于Miles组(P>0.05), 术后6, 12 mo平均GIQLI指数高于Miles组(107.30±10.57 *vs* 103.85±11.03, P<0.05; 116.35±12.64 *vs* 111.34±13.65, P<0.05).

结论: 直肠癌患者手术近期生存质量下降, 与手术创伤和手术并发症有关, 手术远期患者的生存质量明显提高, 生存质量与手术方式有关.

关键词: 直肠肿瘤; 生存质量; 生存质量评定问卷

陈静, 赵嫚, 谢强, 孙玉华, 梁健. 直肠癌手术后患者48例生存质量评定. 世界华人消化杂志 2006;14(8):819-822
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/819.asp

0 引言
直肠癌是外科常见的恶性肿瘤之一, 直肠癌根治术是其主要的治疗方法. 目前医疗技术的发展使直肠癌术后生存率逐渐提高, 然而随着社

■背景资料
直肠癌是外科常见的恶性肿瘤之一, 直肠癌根治术是其主要的治疗方法. 近年来, 生存质量在肿瘤学治疗评定成果中已成为一个越来越重要的参数, 目前除了传统观点如肿瘤复发率和生存率作为一个重要成果测量, 还包括生存质量的评估.

■应用要点
本研究观察了直肠癌术后患者生存质量及其主要影响因素, 对外科工作者在今后工作中如何采取最佳的外科治疗手段既能提高患者的生存率又能改善生存质量具有积极的指导作用.

表 1 直肠癌患者手术前后生存质量评分结果 (mean ± SD, 分)

GIQLI指数	术前	术后1 mo	术后6 mo	术后12 mo
总分	104.21 ± 11.28	91.97 ± 77.13[a]	105.65 ± 9.80	113.95 ± 7.82[a]
自觉症状	58.43 ± 3.22	56.19 ± 2.98[a]	59.54 ± 3.69[a]	113.90 ± 57.82[a]
躯体生理功能状态	16.02 ± 1.76	13.01 ± 1.81[a]	15.44 ± 1.54[a]	18.49 ± 3.21[a]
日常和社会活动	13.11 ± 2.56	5.56 ± 1.76[a]	10.80 ± 2.45[a]	14.71 ± 4.32
心理情绪状态	16.65 ± 3.31	17.21 ± 3.01	19.20 ± 3.38[a]	19.41 ± 4.55[a]
Miles组	103.98 ± 10.59	92.66 ± 8.45[a]	103.85 ± 11.03[c]	111.34 ± 13.65[c]
Dixon组	104.42 ± 12.64	91.22 ± 7.34[a]	107.30 ± 10.57[a]	116.35 ± 12.64[a]

[a]P<0.05 *vs* 术前; [c]P<0.05 *vs* Dixon组.

会的进步和人民生活水平的提高, 人们对生存质量的要求也越来越高. 生存质量作为全面反映患者健康状况的一个指标可望更全面更客观地评价治疗的效果. 我院近年来收治直肠癌患者48例, 观察直肠癌术后患者的生存质量如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 1999-05/2004-08我院术前经肠镜活检确诊行根治术, 无严重躯体性疾病和术后并发症, 具有一定文化水平, 且自愿接受问卷调查直肠癌患者48例, 男31例, 女17例; 年龄39-83(平均63)岁. 腺癌30例, 黏液腺癌13例, 未分化癌3例, 息肉恶变2例. Dixon 25例, Miles 23例.

1.2 *方法* 胃肠生存质量指标(gastrointestinal quality of life index, GIQLI)包括生理功能状态、症状学、社会活动和日常生活能力、精神状态等5个方面, 共有36项调查问卷项目, 每项计0-4分, 总分144分, 正常人群为125.8分[1], 测定时间为术前、术后1, 6, 12 mo. 42例采用信函随访的方式, 6例在来院复诊时由调查者请患者或家属填写问卷表. 对手术前后GIQLI评分结果进行比较.

统计学处理 采用SPSS12.0分析软件对收集到的数据进行处理, 所有结果都用mean±SD表示, 用配对t检验进行自身显著性检验.

2 结果

2.1 *手术前患者生存质量指数* GIQLI指数63-125(平均104.21)分. 影响患者生存质量的主要因素有: 大便改变48例(100%), 大便次数增多、便血、便急32例(67%), 腹胀20例(42%), 体力下降28例(58%), 腹痛10例(21%), 疲劳12例(25%), 对疾病感到伤心31例(65%)和害怕32例(67%), 44%的患者有不同程度的劳动工作能力丧失.

2.2 *手术后患者生存质量指数变化* 术后1 mo GIQLI指数52-111(平均91.97)分, 与术前相比具有显著统计学意义(P<0.05, 表1). 其中主要影响因素为切口疼痛、大便次数增加、体力减退、生活和活动能力障碍, 而心理情绪状态评分有所提高(P>0.05). 在此期间手术方式对生存质量改变无明显影响(表1). 术后12 mo GIQLI指数62-132(平均113.95)分, 比术前提高(P<0.05). 总体生存质量比术前明显提高, 在此期间手术方式对生存质量改变有明显影响, Dixon组在日常和社会活动及心理情绪状态方面评分明显高于Miles组. 其中主要影响因素为患者外表发生明显改变、感到不舒服及性生活明显受限、正常业余活动受限.

3 讨论

生存质量评定作为一种新的生命状态评价技术被引入医学领域, 广泛应用于评价个体的生理、心理和社会生活情况[2]. 现代医学工作者不能只靠测量患者的生存时间长短来评价医疗效果, 而应同时顾全整个机体, 包括患者的心理、精神及社会适应能力, 即强调患者生存质量的改善. 近年来, 生存质量在肿瘤学治疗评定成果中已成为一个越来越重要的参数, 目前除了传统观点如肿瘤复发率和生存率作为一个重要成果测量, 还包括生存质量的评估，生存质量评定多采用评定表的方法, 由被测试者填写, 目前测量生存质量的量表非常多, 一般分为两类: 总量表和特殊量表, 总量表又分为健康问卷和实用测量，特殊量表集中于生存质量的特殊方面, 并与特殊的疾病相对应. 如Eypasch *et al*[1]设计的GIQLI, 专用于测量消化系统疾病患者的生存质量, 我们应用GIQLI测量直肠癌患者手术前后生存质量的变化, 效果比较满意.

目前, 直肠癌的根治性治疗方法仍首推外科手术治疗, 但手术后常有肠运动功能紊乱, 如排便次数增多等, 特别是对于肠造口患者不仅带来身体上的不适，更造成巨大的心理压力, 使部分患者生存质量下降. 术后效果传统上被评价为生存率或疾病相关症状的改善, 然而他们并没有强调手术本身给患者主观上带来的痛苦或幸福感, 有时侯对于生存质量也很难区分是疾病本身的影响还是治疗的干预[3], 手术作为一种创伤性治疗手段, 短时间内可大大降低患者生存质量. 目前有研究胃肠返流性疾病外科治疗后对生存质量的影响[4-5], 也有部分人研究关于胃癌和大肠癌的生存质量评估[6-9], 只有少部分人研究患者的主观感受对手术成功的评价[10-11], 因此, 强调手术的成功与否不仅在于提高生存率, 还应包括生存质量的改善. Rasanen *et al*[3]分析了131例胃肠疾病手术前后患者的生存质量, 他指出对于胆道疾病和年龄在60岁以下的患者术后2 mo生存质量即有提高, 所有的患者在术后12 mo生活质量均有提高, 年龄大于60岁的患者外科治疗效果差于小于60岁的患者, 另有研究结肠癌患者生存质量无明显改善, 因为结肠癌治疗后3 a内患者的生存质量都有所下降. 有关直肠癌患者生存质量现在国外也已有许多报道[12-17], 报道显示直肠癌术后1 mo内生存质量明显下降, 但这种下降是可逆的[14-15], 术后6 mo后可逐渐恢复正常[18-19], 不同手术方式对患者生存质量影响不同, Dixon手术后生存质量明显好于Miles手术[16-17], 腹腔镜手术明显好于开腹手术[20], 不同性别、不同年龄对直肠癌术后生存质量影响亦不同[21-22], 直肠癌患者术后适当体育锻炼有助于生存质量恢复[23], 国内此方面报道较少[24]. 本组研究显示, 直肠癌患者术前生存质量明显低于正常人群, 表明直肠癌能够严重影响患者生存质量, 主要表现在自觉症状及心理情绪方面, 而躯体生理功能及日常社会活动影响不大, 这表明大部分患者就诊时还没有出现上述2方面的改变. 术后1 mo全部患者均有明显生存质量下降, 主要原因考虑为手术创伤及术后一定的并发症造成生存质量明显下降. 但是, 随着时间的推移, 手术本身的影响因素会越来越弱, 此时期心理情绪状态评分略有提高, 术后6 mo患者生存质量已恢复至术前, 其中心理情绪状态方面评分明显提高, 这可能与术前患者对疾病的恐惧和担心及对手术的惧怕有关, 术后患者的恐惧心理明显下降有关, 术后12 mo生存质量明显提高, 主要表现在症状和躯体生理功能的明显改善, 而体力方面恢复略慢, 此时期情绪状态变化不大. 本组资料还显示, 生存质量与患者年龄、病期及手术方式有一定关系, 年龄的差异在生存质量上主要表现为性生活评分及心理情绪状态评分, 表明老年人有更好的心理承受能力, 而癌症对年轻患者的影响更大. 不同病期患者生存质量略有不同, D期患者较A, B, C期有更差的生存质量, 表明癌症病期越晚对患者生存质量影响越大. 不同手术方式对生存质量影响不同, 有报道显示直肠癌造口患者生存质量明显低于非造口患者[25], 但近来报道有一些例外[22,26]. 本研究显示, Dixon组和Miles组术后1 mo生存质量无显著性差异, 因为在此时期主要是手术本身的影响占主导地位, 术后6 mo及12 mo Miles组生存质量明显低于Dixon组, 表现在社会活动及心理情绪状态方面, 而其他方面影响不大, 这表明Miles手术对患者生存质量影响大于Dixon手术, 而影响因素主要是由造口带来的, 因此, 目前保肛手术在直肠癌手术中逐渐占据主导地位, 不仅体现了手术方式的改进, 更注重了患者生存质量的改善.

■名词解释

1 生存质量: 指一个人在其生活的文化和价值系统的背景下, 对其所处的地位和状况的感觉, 他与个人的目标、期望、标准和所关心的事物等有关. 他是一个范围很广的概念, 是一个人的机体健康、心理状态、独立生活水平、社会关系、个人信念以及与明显的环境特征有关的复杂内容的集合.

2 GIQLI: 他是用于测定消化系统疾病患者生存质量的量表, 该表包括生理功能状态、症状学、社会活动和日常生活能力、精神状态等5个方面, 共有36项调查问卷项目, 每项计0-4分, 总分144分, 正常人群为125.8分.

4 参考文献

1 Eypasch E, Williams JI, Wood-Dauphinee S, Ure BM, Schmulling C, Neugebauer E, Troidl H. Gastrointestinal Quality of Life Index: development, validation and application of a new instrument. *Br J Surg* 1995; 82: 216-222

2 Spitzer WO. State of science 1986: quality of life and functional status as target variables for research. *J Chronic Dis* 1987; 40: 465-471

3 Rasanen JV, Niskanen MM, Miettinen P, Sintonen H, Alhava E. Health-related quality of life before and after gastrointestinal surgery. *Eur J Surg* 2001; 167: 419-425

4 Glise H, Hallerback B, Johansson B. Quality-of-life assessments in evaluation of laparoscopic Rosetti fundoplication. *Surg Endosc* 1995; 9: 183-188

5 Velanovich V. Comparison of symptomatic and quality of life outcomes of laparoscopic versus open antireflux surgery. *Surgery* 1999; 126: 782-788

6 Ramsey SD, Andersen MR, Etzioni R, Moinpour C, Peacock S, Potosky A, Urban N. Quality of life in survivors of colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 1294-1303

7 Sprangers MA, Taal BG, Aaronson NK, te Velde A. Quality of life in colorectal cancer. Stoma vs. nonstoma patients. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 361-369

8 Ramsey SD, Berry K, Moinpour C, Giedzinska A, Andersen MR. Quality of life in long term survivors of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1228-1234

9 Kitagawa Y, Kitano S, Kubota T, Kumai K, Otani Y, Saikawa Y, Yoshida M, Kitajima M. Minimally invasive surgery for gastric cancer-toward a

■同行评价
本文作者应用胃肠生存质量指标探讨了直肠癌患者手术前后生存质量变化, 表明手术近期生存质量下降, 与手术创伤有关, 而手术远期生存质量明显提高, 并且与手术方式有关, 研究方法得当, 但如果在以后的研究中能增加病例数, 结果将更加可信.

confluence of two major streams: a review. Gastric *Cancer* 2005; 8: 103-110

10 Velanovich V. Laparoscopic vs open surgery: a preliminary comparison of quality-of-life outcomes. *Surg Endosc* 2000; 14: 16-21

11 Weeks JC, Nelson H, Gelber S, Sargent D, Schroeder G. Short-term quality-of-life outcomes following laparoscopic-assisted colectomy vs open colectomy for colon cancer: a randomized trial. *JAMA* 2002; 287: 321-328

12 Camilleri-Brennan J, Steele RJ. Prospective analysis of quality of life and survival following mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1617-1622

13 Engel J, Kerr J, Schlesinger-Raab A, Eckel R, Sauer H, Holzel D. Quality of life in rectal cancer patients: a four-year prospective study. *Ann Surg* 2003; 238: 203-213

14 Rauch P, Miny J, Conroy T, Neyton L, Guillemin F. Quality of life among disease-free survivors of rectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 354-360

15 Schwenk W, Neudecker J, Haase O, Raue W, Strohm T, Muller JM. Comparison of EORTC quality of life core questionnaire (EORTC-QLQ-C30) and gastrointestinal quality of life index (GIQLI) in patients undergoing elective colorectal cancer resection. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 554-560

16 Schmidt CE, Bestmann B, Kuchler T, Kremer B. Factors influencing sexual function in patients with rectal cancer. *Int J Impot Res* 2005; 17: 231-238

17 Guren MG, Eriksen MT, Wiig JN, Carlsen E, Nesbakken A, Sigurdsson HK, Wibe A, Tveit KM. Quality of life and functional outcome following anterior or abdominoperineal resection for rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 735-742

18 Yoo HJ, Kim JC, Eremenco S, Han OS. Quality of life in colorectal cancer patients with colectomy and the validation of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Colorectal (FACT-C), Version 4. *J Pain Symptom Manage* 2005; 30: 24-32

19 Kopp I, Bauhofer A, Koller M. Understanding quality of life in patients with colorectal cancer: comparison of data from a randomised controlled trial, a population based cohort study and the norm reference population. *Inflamm Res* 2004; 53 : S130-S135

20 Korolija D, Sauerland S, Wood-Dauphinee S, Abbou CC, Eypasch E, Caballero MG, Lumsden MA, Millat B, Monson JR, Nilsson G, Pointner R, Schwenk W, Shamiyeh A, Szold A, Targarona E, Ure B, Neugebauer E. Evaluation of quality of life after laparoscopic surgery: evidence-based guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery. *Surg Endosc* 2004; 18: 879-897

21 Schmidt CE, Bestmann B, Kuchler T, Longo WE, Rohde V, Kremer B. Gender differences in quality of life of patients with rectal cancer. A five-year prospective study. *World J Surg* 2005; 29: 1630-1641

22 Rauch P, Miny J, Conroy T, Neyton L, Guillemin F. Quality of life among disease-free survivors of rectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 354-360

23 Courneya KS, Friedenreich CM, Quinney HA, Fields AL, Jones LW, Fairey AS. A randomized trial of exercise and quality of life in colorectal cancer survivors. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2003; 12: 347-357

24 陈增蓉, 李卡, 印义琼, 王艳红. 120例直肠癌结肠造口病人生存质量的分析. 四川大学学报(医学版) 2005; 36: 445-446

25 Engel J, Kerr J, Schlesinger-Raab A, Eckel R, Sauer H, Holzel D. Quality of life in rectal cancer patients: a four-year prospective study. *Ann Surg* 2003; 238: 203-213

26 Pachler J, Wille-Jorgensen P. Quality of life after rectal resection for cancer, with or without permanent colostomy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004:

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

2006广州肝病防治研究新进展学术报告会

本刊讯 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会将于2006-07-01/05在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

要求摘要和正文各一份,并附软盘或寄到电子信箱

2 联系方式

广州市广州大道北1838号南文医科大学南方医院消化病研究所(510515), 白岚教授收. 电话: 020-61641658; E-mail: gdsgzbxh@163.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 823-826
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

联合检测CA19-9和CA125鉴别良恶性腹水

缪应雷, 施丕华, 段丽平

缪应雷, 段丽平, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650031
施丕华, 昆明医学院 云南省昆明市 650032
通讯作者: 缪应雷, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科. myldu@sina.com.cn
电话: 0871-6468574
收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2006-01-21

Value of combined detection of CA19-9 and CA125 in differential diagnosis between benign and malignant ascites

Ying-Lei Miao, Pi-Hua Shi, Li-Ping Duan

Ying-Lei Miao, Li-Ping Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Pi-Hua Shi, Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Correspondence to: Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical college, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com.cn
Received: 2005-11-30 Accepted: 2006-01-21

Abstract

AIM: To investigate the significance of cancer antigen-125 (CA-125) and CA19-9 combined detection in the differential diagnosis of benign and malignant ascites.

METHODS: A total of 59 patients were included in the study and divided into two groups based on the benignancy and malignancy. The levels of CA-125 and CA19-9 were detected in serum and ascitic fluid by protein chip technique.

RESULTS: The levels of CA125 and CA19-9 in ascitic fluid were 602.03 ± 405.72 and 370.65 ± 490.01 in malignant group, which were significantly higher than those in benign group (P <0.05). The level of serum CA125 was not markedly different between malignant and benign group, while CA19-9 level in malignant group (65.80 ± 117.45) was significantly higher than that in benign group (P < 0.05). The specificity, sensitivity and accuracy of ascitic CA19-9 in the diagnosis of malignant diseases were 66.7%, 46.2%, 57.7%, and those of ascitic CA125 were 57.6%, 61.5% and 59.3%, respectively. The specificity, sensitivity and accuracy of combined detection of CA19-9 and CA125 were 57.6%, 84.6% and 69.5%, respectively, and the sensitivity was significantly higher than that of CA19-9 (P < 0.01) or CA125 (P < 0.05) alone.

CONCLUSION: It is helpful to detect ascitic CA19-9 combined with CA125 in the differential diagnosis of malignant diseases.

Key Words: Protein chip; Tumor markers; Ascites

Miao YL, Shi PH, Duan LP. Value of combined detection of CA19-9 and CA125 in differential diagnosis between benign and malignant ascites. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(8):823-826

摘要

目的: 联合检测患者血清或腹水CA125和CA19-9, 以提高对肿瘤诊断与病情判断的准确性.

方法: 59例腹水患者以照良、恶性分为2组. 利用蛋白质芯片技术检测两组CA125和CA19-9含量, 并进行统计学分析.

结果: 恶性组腹水CA125和CA19-9分别为602.03±405.72和370.65±490.01, 均明显高于良性组, 差异有显著性(P<0.01); 恶性组血清CA125为213.30±251.36, 与良性腹水组相比, 没有显著性差异(P>0.05), 而血清CA19-9的测定值为65.80±117.45, 显著高于良性腹水组(P<0.05). CA19-9检测恶性腹水的特异性、敏感性和准确性分别为66.7%、46.2%、57.7%; CA125的特异性、敏感性和准确性分别为57.6%、61.5%和59.3%; 而联合检测腹水CA19-9和CA125的特异性、敏感性和准确性分别为57.6%、84.6%和69.5%, 其中敏感性明显高于单独检测CA125(P<0.05)或CA19-9(P<0.01).

结论: 联合检测CA19-9和CA125诊断恶性腹水的敏感性和准确性可提高.

关键词: 蛋白质芯片; 肿瘤标志物; 腹水

■背景资料
腹水是一种常见的临床体征, 病因很多, 鉴别诊断困难. 良性和恶性腹水的预后不同, 因此对良、恶性腹水的鉴别极为重要. 血清及腹水肿瘤标志物测定是临床上鉴别良、恶性腹水的重要方法之一, 具有敏感性及特异性高、简单且无创的优点.

■研发前沿
肿瘤标志物还没有统一的标准检测方法, 目前得出的结果大多数在还处于研究观察阶段. 将来可能有望在肿瘤临床中成为诊断、预后判断及调整治疗方案的工具. 理想的肿瘤标志物应具有高度敏感性及特异性, 并能用于进行病程追踪和治疗反应, 对预后进行评估, 并有助于早期发现转移和复发, 至今没有任何一个标志物有如此优越的特点. 但是同一种肿瘤可能有不止一种标志物, 同一种标志物也可能会在不同的肿瘤中出现. 这一特点为临床选择高灵敏度或高特异性检测某类肿瘤提供了灵活而多样的结合方式. 对于某一特定的肿瘤方法测定, 可同时选定几种特异性较高的指标, 互相补充, 提高诊断的阳性率.

缪应雷, 施丕华, 段丽平. 联合检测CA19-9和CA125鉴别良恶性腹水. 世界华人消化杂志 2006;14(8):823-826
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/823.asp

0 引言

腹水是常见的临床表现之一, 良恶性腹水的鉴别诊断在临床上具有极其重要的意义, 尤其是恶性腹水的早期诊断相对更困难. 目前大多数的诊断技术还不能够完成早期诊断的要求. 长期以来, 人们致力于寻找一种能够尽早(发生在转移之前)检出恶性肿瘤的指标, 其中包括对肿瘤标志物的研究. 我们采用蛋白质芯片对患者血清或腹水CA125, CA19-9进行联合检测, 以期提高对肿瘤诊断与病情判断的准确性.

1 材料和方法

1.1 材料 腹水59例分为恶性组和良性组.

1.2 方法 二组均在治疗前同步抽取空腹静脉血及腹水各5 mL, 离心取标本储存于-20℃冰箱待测. 将各待测标本及不同浓度的标准品混合液各100 μL滴加到不同的芯片分格内; 将检测液A和B等体积混合, 打开蛋白芯片, 在膜表面加入30 μL已混合的检测液, 反应30 s, 经洗涤4次后, 用生物芯片检测仪读取蛋白芯片数据, 使用设定的软件对CA125(<35 kU/L)和CA19-9(<35 kU/L)进行数据分析.

2 结果

恶性腹水26例, 男15例, 女11例, 年龄30-62(平均45.2±10.6)岁, 原发性肝癌12例, 卵巢肿瘤4例, 胃癌3例, 结肠癌3例, 胰腺癌2, 腹水中查到恶性肿瘤细胞2例, 均经病理学证实; 良性腹水组33例, 男21例, 女12例, 年龄35-78(平均54.6±10.4)岁, 肝炎后肝硬化15例、酒精性肝硬化5例、其他原因致肝硬化3例、结核性腹膜炎8例、心源性腹水2例. 两组间年龄、性别均无显著性差异(P>0.05).

恶性腹水组腹水CA125和CA19-9分别为602.03±405.72和370.65±490.01, 均明显高于良性腹水组, 差异有显著性(P<0.01); 恶性腹水组血清CA125为213.30±251.36, 与良性腹水组血清测得值相比, 没有显著性差异(P<0.05), 而血清CA19-9的测得值为65.80±117.45, 显著高于良性腹水组(P<0.05, 表1).

腹水CA19-9检测恶性腹水的特异性、敏感性和准确性分别为66.7%, 46.2%和57.7%; 腹水CA125的特异性、敏感性和准确性分别为57.6%, 61.5%和59.3%; 而联合检测腹水CA19-9和CA125的特异性、敏感性和准确性分别为57.6%, 84.6%和69.5%, 其中敏感性明显高于单独检测CA125(P<0.05)或CA19-9(P<0.01, 表2).

表 1 良恶性腹水患者CA19-9和CA125的测得值

	恶性腹水组		良性腹水组	
	血清	腹水	血清	腹水
CA19-19	66±117	371±490	16±22	23±53
CA125	213±251	602±406	201±192	161±98

表 2 腹水CA19-9和CA125诊断恶性腹水

		恶性腹水组	良性腹水组
CA19-9	阳性	12	11
	阴性	14	22
CA125	阳性	16	14
	阴性	10	19
CA125/CA19-9	阳性	22	14
	阴性	4	19

金标准: 组织病理学. 特异性 = 57.6%; 敏感性 = 84.6%; 准确性 = 69.5%.

3 讨论

肿瘤生物学标志物由肿瘤细胞产生并进入血液循环, 在正常人或良性疾病患者中大多数肿瘤标志物的含量很低, 故利用肿瘤标志物测定来诊断肿瘤越来越广泛应用于临床. CA19-9是Koprowski *et al*[1]应用结肠癌细胞株Sw Ⅱb免疫BalB/c纯种小鼠和骨髓瘤细胞杂交得到的一株编号为1165N51929的mAb. 他是一种黏蛋白的糖类位点, 也是一种单涎酸神经节苷酯. 这种由癌细胞产生的肿瘤相关抗原经胸导管引流到血液循环, 进一步引起血清CA19-9增高. CA19-9在血清中以唾液黏蛋白形式存在, 分布于胎儿胰腺、胆囊、肝、肠和正常人胰、胆管上皮等处, 是存在于血循环中的胃肠癌相关抗原[2], 也是常用的肿瘤免疫诊断指标. CA19-9在胰腺癌的阳性率为85%-95%, 胆囊癌、胆管癌的阳性率约为85%. CA19-9对胰腺、胃及肝胆管癌具有高度敏感性, 故也是胰腺癌较为可靠的指标.

CA125是糖蛋白, 是卵巢癌相关抗原. 血CA125升高有助于卵巢癌的诊断, 其敏感性与卵巢癌分期及组织学类型有关, 中晚期患者显著升高, 浆液性癌的CA125水平升高明显. 而卵巢

癌患者腹水CA125值也增高, 且腹水CA125值预测临床完全缓解患者的体内残存癌比血CA125值更敏感. 国内外均有文献报道结核性腹膜炎、肝硬化患者CA125也有一定程度的增高[3-4], 但增高程度不及卵巢癌、腹膜癌等恶性肿瘤显著.

采用多肿瘤标志物蛋白质芯片技术对腹水患者的血清及腹水进行检测分析, 结果表明, 恶性腹水组患者腹水CA19-9, CA125均较良性腹水组患者高, 表明肿瘤生物学标志物尤其是CA19-9、CA125系由恶性肿瘤细胞合成、分泌并释放入血液或体液中的生物活性物质, 通过测定其含量对肿瘤有辅助诊断价值, 有助于恶性腹水的诊断. 同时我们还发现CA19-9诊断恶性腹水的特异性为66.7%, 敏感性为46.2%, 准确性为57.7%; CA12-5诊断恶性腹水的特异性为57.6%, 敏感性为61.5%, 准确性为59.3%; 而联合检测腹水CA19-9和CA125诊断恶性腹水的特异性、敏感性和准确性分别为57.6%, 84.6%和69.5%. 对二种肿瘤标志物组合分析显示, 以其中二项之一阳性作为诊断标准, 不但敏感性大大提高, 特异性也能保持较高水平. 本研究良性腹水组患者血清和腹水CA125分别为201±192和161±98 kU/L, 明显增高, 与文献[5-7]报道一致. 我们还发现恶性腹水组腹水CA19-9和CA125测定值371±490, 602±406 kU/L比血清的测得值66±117, 213±251 kU/L高(二组相比, $P<0.05$), 似乎更有意义. 在部分患者腹水里已发现许多恶性肿瘤细胞, 腹水中CA19-9和CA125明显升高, 而血清肿瘤标志物水平正常或低于腹水中的水平. 主要的原因可能是: 由于血清中检测肿瘤标志物可能受到抗原不分泌或极少分泌入血, 以及抗原分泌入血后经肝脏被分解代谢等多因素干扰, 故通过检测体液(腹水)的肿瘤标志物可提高阳性率. 另有人认为, CA125、CA19-9等是较大分子量的糖蛋白, 在腹水中形成后不易进入血循环被肝破坏分解, 故恶性腹水中CA125和CA19-9等含量较血清的高[8]. 可见在良、恶性腹水的鉴别诊断中, 同时检测腹水和血清CA125和CA19-9的浓度具有较高的临床应用价值. 值得注意的是: 腹水CA125和CA19-9的适界值可能不同于血清, 还需进一步研究.

迄今为止, 良恶性腹水的鉴别诊断仍是临床中的一个难题, 亟待早期做出正确的诊断. 腹水病因的诊断除结合病史、体格检查及影像学、内镜等特殊检查外, 腹水化验检查(尤其是肿瘤标志物等)具有重要的临床价值, 且检测肿瘤标志物更敏感、特异; 而且简单、无创. 蛋白质芯片技术是1990年代出现的一种高通量、高灵敏度、高特异性和微型化的蛋白质分析技术, 是当今生命科学研究领域发展最快的技术之一[9], 国内外已有多项研究[10-15]表明腹水与血清肿瘤标志物联合检测及腹水或血清多项肿瘤标志物联合检测均可提高诊断恶性腹水的敏感性. 因此, 该技术作为一种无创的肿瘤辅助诊断技术, 具明显的优越性. 选用与消化系统疾病所致的良恶性腹水密切相关的两个肿瘤标志物(CA19-9和CA125)作为观察指标, 旨在提示检测其在血清和腹水中的量有助于良、恶性腹水的鉴别, 临床上应给予高度重视; 尤其对那些影像学阴性及未能行病理检查的患者, 更有临床意义. 因此, 联合检测血清与腹水肿瘤标志物对良恶性腹水鉴别具有一定意义. 另外研究中良性腹水组也出现了阳性病例, 复检亦证实为阳性, 可能是由于感染或肝功能受损. 文献报道CA19-9在合并胆道感染、肝硬变患者血清中明显较无胆道感染的肝硬变患者高, 并认为此升高可能是由于胆管上皮细胞增多和由于胆固醇沉着所致清除减少的结果. 此外, 利尿、腹穿放液也可影响肿瘤标志物的血清水平. 但上述情况很少出现腹水和血清肿瘤标志物同时升高, 说明肿瘤标志物的检测也有助于分析良性腹水合并感染的原因. 大部分肿瘤标志物是多组织或特异组织产生, 受体内多因素的影响, 肿瘤标志物不仅在癌变时产生, 在部分正常组织和良性病变时也会产生. 一种肿瘤可有一种或多种肿瘤标志物. 因此合理选择一些肿瘤标志物合并多种组合检测某种肿瘤, 有助于良、恶性腹水的鉴别诊断.

■**应用要点**
采用蛋白质芯片联合检测患者血清或腹水CA125和CA19-9, 可提高对肿瘤诊断与病情判断的准确性.

4 参考文献

1 Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears H. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 1981; 212: 53-55

2 Sari R, Yildirim B, Sevinc A, Bahceci F, Hilmioglu F. The importance of serum and ascites fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA 19-9, and CA 15-3 levels in differential diagnosis of ascites etiology. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1616-1621

3 Wang IK, Chuang FR, Lee KF, Lin CL, Chang HY, Huang CK. Tuberculous peritonitis in a haemodialysis patient with elevated serum CA 125 and hypercalcaemia. *Int J Clin Pract Suppl* 2005; 56-59

4 Gomez Rubio M, de Cuenca Moron B, Dominguez M. Tumoral markers in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol* 2005; 28: 308

5 杨锦林, 吴俊超, 郭震. 四种肿瘤标志物联合检测对

消化系恶性肿瘤的诊断价值. 华西医学 2003; 18: 535-536
6 许亚辉. 血清肿瘤标志物联合检测对消化系统良恶性疾病的诊断价值. 中国误诊学杂志 2003; 3: 518-519
7 李宇清, 江素华, 曾波航, 张永健. 消化道恶性肿瘤患者多种肿瘤标志物检测的临床意义. 广东医学 2002; 23: 33-34
8 付极, 刘建生, 费正权. 腹水与血清中肿瘤标志物对腹水病因诊断价值探讨. 医师进修杂志 1999; 22: 30-31
9 孙玉萍, 申红. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统在胃癌诊断和病情监测中的价值. 肿瘤防治杂志 2004; 11: 703-705
10 郭旭霞, 段满乐, 杜肖刚, 纪爱芳, 郭金英. 蛋白质芯片技术检测肿瘤标志物及临床应用. 临床检验杂志 2004; 22: 224
11 Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5882-5890
12 Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* 2005; 65: 10613-10622
13 Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X. Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8380-8385
14 Sun Z, Fu X, Zhang L, Yang X, Liu F, Hu G. A protein chip system for parallel analysis of multi-tumor markers and its application in cancer detection. *Anticancer Res* 2004; 24: 1159-1165
15 Koopmann J, Zhang Z, White N, Rosenzweig J, Fedarko N, Jagannath S, Canto MI, Yeo CJ, Chan DW, Goggins M. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 860-868

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第二届全国小肠疾病学术会议

本刊讯 第二届全国小肠疾病学术会议将于2006-08-23/27在太原举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文, 结构式摘要(1 000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-31截稿.

2 联系方式

山西省太原市双塔东街29号山西少人民医院内镜中心 陈星; 邮编:030012;电话:0351-4960028; E-mail: senj29@163.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 827-829
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

腹腔镜在直肠癌手术治疗中的临床应用

周保军, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉, 刘 津, 张国建, 段国强, 任鹏涛

周保军, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉, 刘津, 张国建, 段国强, 任鹏涛, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000
河北省科技攻关项目资助, No. 052761001D-26
通讯作者: 周保军, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科. zhoubaojun67@hotmail.com
电话: 0311-87222983
收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-08

摘要

目的: 探讨腹腔镜手术治疗直肠癌的方法和可行性.

方法: 2005-02/12共开展腹腔镜直肠癌手术31例, 其中Dixon手术20例, Miles手术9例, 乙状结肠袢式造口术2例.

结果: 手术均获成功, 无中转开腹, 手术时间平均200 min, 术中平均出血量80 mL, 术后肠功能恢复时间平均30 h, 术后1例Dixon手术患者出现吻合口瘘, 经保守治疗痊愈.

结论: 腹腔镜直肠癌手术具有创伤小、手术出血少、术后痛苦小、肠道功能恢复快等特点, 是可行的、安全有效的手术方法.

关键词: 腹腔镜; 直肠肿瘤; 根治术; 外科学

周保军, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉, 刘津, 张国建, 段国强, 任鹏涛. 腹腔镜在直肠癌手术治疗中的临床应用. 世界华人消化杂志 2006;14(8):827-829
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/827.asp

0 引言

自1990年开展了腹腔镜胃肠道手术以来, 经过十余年来的发展, 腹腔镜技术在胃肠道疾病的治疗方面的应用越来越广泛, 腹腔镜结直肠癌根治手术因其创伤小、痛苦少、恢复快、并发症少、疗效好, 成为结直肠癌治疗的新方式, 我科2005-02/12共施行腹腔镜直肠癌手术31例, 结果满意, 总结分析报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组31例, 男13例, 女18例, 年龄18-83岁, 平均年龄60.8岁, 术前均进行电子结肠镜检查与活组织病理检查证实为直肠腺癌, 根据术后切除标本病理结果将患者进行Dukes分期: A期1例, B期10例, C1期11例, C2期7例, D期2例. 术中探查肿瘤盆腔广泛转移行乙状结肠袢式造口术, 肿瘤下缘距肛缘小于5 cm的患者行Miles手术, 其余患者均行Dixon手术.

1.2 方法

1.2.1 麻醉方法及体位 患者均采用全身麻醉, 体位采用截石位, 手术过程中根据操作的需要对体位进行适当调整.

1.2.2 手术设备 采用Wolf 10 mm 30° 腹腔镜, 美国强生公司超声止血刀, 强生公司腹腔镜用直线切割缝合器(Endo-GIA ATB45), CDH33型管状吻合器.

1.2.3 手术方法 手术者站立于患者的右侧操作, 助手站立于术者对侧, 扶镜助手位于术者左侧, 于脐下缘做长约1 cm弧形切口, 成功建立气腹, 气腹压力维持12-15 mmHg(1.6-2.0 kPa), 置入10 mm Trocar, 进腹腔镜探查, 确定肿瘤的位置和转移情况. 在腹腔镜的监视下于右下腹麦氏点置入10 mm或12 mm Trocar作为主操作孔, 手术结束时利用此戳口放置腹腔引流管. 于左侧麦氏点内上方约3 cm处置入10 mm Trocar作为副操作孔, 利用此戳口扩大为乙状结肠造瘘口或标本取出切口. 在左、右下腹Trocar的外上方约10 cm处分别再安置5 mm Trocar作为副操作孔, 以帮助暴露手术野及协助操作. 对女性患者我们不采取悬吊子宫的方法, 而是通过左下腹10 mm Trocar用抓钳将子宫提起或挑起充分显露盆腔完成手术操作. (1)乙状结肠袢式造口术: 术中探查直肠肿瘤腹腔广泛转移, 不能行根治性切除或肿瘤侵及盆壁或周围脏器不能切除时, 用超声刀或电刀充分游离乙状结肠, 将左下腹Trocar取出, 将此戳口扩大为直径3 cm圆形切口, 把乙状结肠提出腹腔外行袢式造口, 以解决术后直肠梗阻的问题. 患者术后腹部仅仅有一个造瘘口和2-3个直径5-10 mm戳口, 微创效果十分明显, 极大地减少患者的痛苦, 充分展现腹

■背景资料
腹腔镜胃肠道手术开始于1990年, 经过十多年的发展, 腹腔镜器械有了极大的改进和创新, 腹腔镜技术水平也有了长足的进步, 腹腔镜手术从治疗胃肠道良性疾病扩展到恶性疾病的治疗, 腹腔镜结直肠癌的手术治疗成为目前外科领域研究的热点和重点内容.

■同行评价
本文对腹腔镜手术治疗直肠癌的各种方式进行尝试和研究, 对腹腔镜在直肠癌手术治疗中的临床应用做了探讨, 方法阐述详尽, 具有较好的可读性, 对腹腔镜技术在直肠癌治疗中的实际应用有较好的指导价值.

腔镜手术的优势. (2)Dixon手术: 用超声刀或电剪刀切开左侧结肠旁沟的腹膜, 向上游离至降结肠, 向下游离至直乙交界部位, 显露左侧输尿管及精索血管或卵巢血管, 同样方法切开乙状结肠系膜根部的腹膜, 于肿瘤近端10 cm处用布条将肠管及直肠下动静脉一起结扎, 用超声刀游离乙状结肠系膜, 解剖肠系膜下动脉、静脉至根部, 清除周围淋巴结, 在血管根部用丝线结扎或钛夹夹闭血管后切断. 向上牵引乙状结肠及直肠, 超声刀锐性切开直肠两侧腹膜至盆底腹膜返折部位会师. 将乙状结肠及系膜挑起, 在直视下沿直肠固有筋膜和骶前筋膜间疏松结缔组织间隙进行锐性游离, 达到尾骨尖, 保留下腹下神经和盆腔神经丛. 沿此间隙向直肠两侧扩展, 用超声刀锐性切断两侧直肠侧韧带, 至盆底肛提肌, 最后分离直肠前方, 在Denonvillier筋膜前方进行锐性解剖. 按照全直肠系膜切除(TME)的要求在肿瘤下缘至少5 cm处切断直肠系膜, 将肿瘤下缘2-3 cm处直肠“裸化”至直肠肌层. 用Endo-GIA切割缝合器横断直肠, 将左下腹的戳口扩大为长4-6 cm的斜切口, 在自制塑料保护套的保护下将直肠残端提出体外, 在肿瘤上缘10 cm处离断肠管、修剪系膜, 移走标本. 近端直肠置入钉砧头, 荷包缝合后将肠管还纳腹腔, 缝合切口, 重建气腹. 扩肛后将CDH33型圆形吻合器经肛门伸至直肠闭合端, 在腹腔镜直视下钻钉自直肠闭合端中心偏背侧顶起戳出, 对合钉砧头、旋紧吻合器击发, 完成吻合, 于骶前放置橡皮引流管一根, 利用右下腹戳口引出体外. 男性患者骨盆狭窄, 当肿瘤小、位置低, 腹腔镜下不能确定肿瘤下缘时, 为了保证肿瘤切除的充分完全, 有时需要术者左手通过左下腹的切口进入盆腔协助直肠系膜的处理和肠管的切断. (3)Miles手术: 乙状结肠和直肠的游离及肠系膜下血管的处理同Dixon手术, 在腹腔镜下用超声刀处理乙状结肠系膜至预切断处, 使用Endo-GIA切断乙状结肠. 把左下腹戳口扩大至直径3 cm切口将乙状结肠近残端提出腹腔外造人工肛门. 或利用此切口在腹腔外切断乙状结肠, 将远残端还纳腹腔, 将乙状结肠近端与皮肤缝合造人工肛门, 会阴部仍采用常规手术方法, 在直视下进行肛管直肠游离, 与腹腔贯通后将标本从会阴取出, 会阴放置引流管一根, 缝合会阴伤口.

所有恶性肿瘤患者手术结束时常规给予大量蒸馏水加5-FU冲洗手术区域, 术后合理配合化疗.

2 结果

手术均获成功, 无中转手术者. 手术时间最短40 min, 最长为300 min, 平均200 min. 术中出血最少20 mL, 最多250 mL, 平均80 mL. 手术过程中均未输血. 一般患者在术后24-48 h内恢复肠蠕动功能, 出现肛门排气或排便, 平均时间30 h, 部分腹会阴联合直肠切除患者使用硬膜外置管持续镇痛, 其肠蠕动功能的恢复要较无置管者迟12-24 h. 除Miles手术患者外其他患者术后48 h内均可自行下床活动, 所有患者术后均未使用止痛药口服或肌肉注射. 术后并发症: 1例Dixon手术患者术后出现吻合口瘘, 经过保守治疗痊愈. 患者术后均获得随访, 至今未发现穿刺口种植和局部复发.

3 讨论

自1990年Flower及Jacobs先后用腹腔镜行乙状结肠切除获得成功[1]后, 经过十余年来的发展, 伴随腹腔镜技术的不断提高和腹腔镜器械不断改进, 腹腔镜手术几乎已经涉及整个传统的外科领域, 而影响腹腔镜下结直肠癌切除手术开展的主要因素是他比腹腔镜胆囊切除术复杂, 需要娴熟的腹腔镜操作技术及较昂贵的器械. 对于腹腔镜手术的临床效果, 国内外有学者研究表明: 腹腔镜与开腹结直肠癌切除术在手术切除肠段长度、淋巴结清扫情况、生存率与复发率以及TME患者直肠系膜完整性和淋巴结清扫数目是一样的[2-3]. 腹腔镜手术成败的关键取决于手术医生是否严格按照无瘤原则操作, 病灶的切除范围与淋巴组织的清除是否彻底. 只要手术者手术中严格执行肿瘤手术原则, 腹腔镜手术可以达到和开腹手术同样手术效果, 当然这与手术者的腹腔镜技术掌握程度及经验也有比较密切的关系. 腹腔镜手术是通过器械操作, 术者缺乏手的触觉和灵敏性, 当直肠肿瘤比较小时, 在腹腔镜下定位要比开腹定位困难, 这时需要手助或术中结肠镜定位. 应用腹腔镜探查腹腔可以清楚的观察到肝脏表面情况, 通过体位的改变可明确肠道肿瘤的腹腔转移情况, 在微创的前提下可以了解患者能否进行根治或姑息手术, 本组病例有2例直肠癌患者用腹腔镜探查, 确定为Dukes D期, 行腹腔镜乙状结肠袢式造口, 避免了患者腹部较大的切口, 极大的减少了术后患者的痛苦.

我们体会腹腔镜TME具有下列优势: 腹腔

镜手术空间大、视野宽阔, 而且能将手术野放大数倍, 术者对组织及器官观察更加清楚, 手术操作比开腹更加精细, 对盆筋膜脏壁两层之间疏松结缔组织间隙的判断和入路的选择更准确; 腹腔镜可抵达狭窄的小骨盆并放大局部视野, 对盆腔植物神经丛的识别和保护更确切. 超声止血刀的应用, 能以锐性解剖和极少的出血, 沿盆筋膜间隙更完整的切除含脏层盆筋膜的直肠系膜. 术中对肿瘤的挤压明显减轻、对盆腔脏器的骚扰降低到最大限度. 当然进行腹腔镜手术也需要遵守开放手术的手术原则, 目前多数学者认为TME适用于肿瘤下缘距离肛门缘5-10 cm的中下段直肠癌, 我们也同意这种观点, 本组患者有两例肿瘤下缘距肛缘距离是5 cm, 吻合完成后吻合口位于齿状线附近.

应用腹腔镜进行腹会阴联合直肠切除术相对于开腹进行腹会阴手术而言有独特的优势, 由于腹部手术是在腹腔镜下完成, 手术结束后腹部没有切口, 只有几个0.5-1.0 cm戳口和1个造瘘口, 患者术后腹部没有明显的疼痛, 而且避免了开腹手术后由于人工肛门排便污染, 腹部切口导致切口感染的问题. 此术式没有特殊的器械消耗, 患者的医疗费用没有明显的增加, 而且手术操作较Dixon手术简单, 手术并发症少, 是开展腹腔镜结直肠手术早期比较适合的术式.

关于腹腔镜直肠癌手术适应证, 我们认为对于有经验的专业腹腔镜医师凡是适合传统开腹手术的直肠癌患者, 只要其身体状况能够耐受全麻和人工气腹, 均可进行腹腔镜手术, 根据术中探查的不同情况采取不同的手术方式进行治疗, 如: 乙状结肠袢式造口术、Dixon手术或Miles手术等.

腹腔镜手术为直肠癌的治疗提供了一种创伤小、恢复快、对腹腔及整个机体内平衡干扰较少的治疗技术, 腹腔镜直肠癌根治术是可行的安全有效的方法, 但需要术者有良好的腹腔镜操作基础和丰富的开腹手术经验, 同时要严格遵循无瘤操作规程和TME原则.

4 参考文献

1 Jacobs M, Verdeja JC, Goldstein HS. Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy). *Surg Laparosc Endosc* 1991; 1: 144-150

2 陈志勇, 彭翔, 周永辉. 腹腔镜结直肠癌根治术中淋巴结清扫. 医学临床研究 2002; 19: 101-103

3 Nelson H. Laparoscopic colectomy for colon cancer--a trial update. *Swiss Surg* 2001; 7: 248-251

电编 张敏 编辑 王瑾晖

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

• 消息 •

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿.

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 830-831
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

贲门失弛缓症术后并发食管旁疝致胃底绞窄坏死1例

尹 勇, 王中林, 陆一民

■背景资料
贲门失迟缓症术后食管裂孔疝相比滑动性食管裂孔疝病情表现多种多样, 临床上易误诊, 病情进展可致胃扭转、血运障碍、绞窄坏死甚至发生严重胸、腹腔感染和中毒性休克, 因此早期诊断和及时恰当的处理十分重要.

尹勇, 王中林, 陆一民, 苏州大学附属第三医院外科 江苏省常州市 213003
通讯作者: 尹勇, 213003, 江苏省常州市局前街185号, 苏州大学附属第三医院外科. yinyong1973@163.com
电话: 0519-6180071
收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-03-17

摘要
介绍1例贲门失弛缓症Heller术后16 a并发食管旁疝致胃底绞窄坏死的病例. 报告本例患者的详细病历资料和诊治经过. 患者起病5 d后剖胸探查, 发现胃底疝入左侧胸腔并绞窄坏死, 行近端胃大部切除, 修复食管裂孔. 术后随访1 a无复发. 食管旁疝发生嵌顿时, 应立即插入胃管减压, 如减压不成功或症状不改善, 应急诊手术探查.

关键词: 贲门失弛缓症; 食管旁疝; 并发症

尹勇, 王中林, 陆一民. 贲门失弛缓症术后并发食管旁疝致胃底绞窄坏死1例. 世界华人消化杂志 2006;14(8):830-831
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/830.asp

0 引言
贲门失迟缓症术后食管裂孔疝的发生率约为5%-10%, 常因裂孔结构及其支持组织遭到破坏所致[1]. 本院最近收治1例贲门失弛缓症Heller术后16 a并发食管旁疝致胃底绞窄坏死的病例, 现将诊治经过报告如下.

1 病例报告
患者女, 56岁, 16 a前因贲门失迟缓症行Heller手术, 近年常出现返酸、胸骨后烧灼样痛. 3 d前劳动时突发左胸部持续性剧痛, 活动及深呼吸时尤甚, 伴胸闷、恶心、上腹不适, 他院胸部CT提示“左侧胸腔积液”, 经抗感染治疗胸痛未见缓解转入我院. 查体: 体温37.9℃, 脉搏100次/min, 呼吸24次/min, 血压16/10 kPa(120/75 mmHg), 痛苦貌, 左胸中下部语颤减弱, 叩诊呈浊音, 叩击痛(+), 呼吸音减低, 未闻及啰音. 腹部平坦, 剑突下压痛(+), 无反跳痛及肌紧张, 肠鸣音正常. 血常规: WBC 14.7×10^9/L, N 0.84, RBC 3.74×10^{12}/L, Hb 105 g/L. 胸片: 左下肺大片致密影, 中等量胸腔积液. B超定位下行胸腔穿刺抽出不凝血. 抗感染、止血等保守治疗2 d, 病情加重, BP降至9.8/6.6 kPa(74/50 mmHg), 呼吸急促, 表情淡漠, 气管稍右偏, 左肺听诊几乎无呼吸音. 复查血常规: WBC 19.2×10^9/L, N 0.85, RBC 3.5×10^{12}/L, Hb 98 g/L. 积极抗休克治疗, 同时行左侧胸腔闭式引流, 当即引出500 mL暗红色血性液, 1 h后又引出300 mL血性液, 复查胸片: 左胸大片高密度影, 纵隔右移. 考虑左胸活动性出血, 急诊剖胸探查. 术中见食管下段肌层切开松解完全, 胃底及大网膜经膈食管膜薄弱区疝入左侧胸腔, 胃壁绞窄坏死几乎穿孔, 胸腔内血性液、血块及坏死组织1 500 mL, 肺表面被覆较厚纤维板, 肺与胸壁、膈肌黏连紧密, 行近端胃大部切除、食管-残胃胸内吻合、纤维板剥脱术, 重新修复食管裂孔. 术后患者一度出现左侧包裹性脓胸、肺不张, 经积极抗感染、营养支持、多次引流排脓等治疗, 1.5 mo后痊愈出院. 术后随访1 a无复发.

2 讨论
食管旁疝又称滚入性食管裂孔疝, 相比滑动性食管裂孔疝少见, 但却有重要临床意义. 当胃食管接合部的膈肌脚结构及裂孔支持组织薄弱或遭到破坏时, 腹腔脏器尤其邻近的胃底可通过筋膜裂孔疝入胸腔, 由于膈食管膜不能限制胃体向上移动, 加之腹内压高于胸内压, 病情进展可致胃大弯与部分胃体甚至全胃疝入胸腔, 而贲门仍被部分膈食管膜所固定位于膈下, 此时可出现胃扭转、血运障碍、绞窄坏死、穿孔, 发生严重胸、腹腔感染和中毒性休克. 本例患者贲门失弛缓症术后16 a突发左胸剧痛, 并伴有活动性血胸征象, 由于我们对Heller术后食管旁疝致胃绞窄坏死缺乏足够的认识, 加之胸腔大量积血将疝囊内嵌顿的胃底包裹, CT扫描显示不清, 术前误将血胸归结为黏连胸膜组织撕裂所致, 以致延误诊断. 因此凡Heller术后出现胸骨后不适、胸闷、气急或突发胸腹部剧痛者, 均应积极行X线食管-胃造影检查, 如发现食管末段位于腹腔内、贲门固定、

部分或大部分胃位于膈肌上方后纵隔下部, 应考虑为食管旁疝. 食管旁疝发生嵌顿时, 应立即插入胃管减压, 如减压不成功或症状不改善, 应急诊手术探查[2].

3 参考文献

1 王吉甫. 胃肠外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 43-45

2 李福年, 周荣详, 李杨. 腹壁与疝外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 387-390

■同行评价

贲门失迟缓症术后并发食管旁疝少见, 本文对该疾病的诊治有一定的参考意义.

电编 李琪 编辑 张海宁

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

• 消息 •

第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”. 本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨. 会议邀请国内外著名外科专家, 对热点问题做专题演讲, 参会代表进行学术交流, 经验介绍、开展讨论.

1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等.

2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份, 并附拷贝软盘, 寄到100034, 北京西城区阜内大街133号 齐老师 收, 联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“普外会议征文”字样. 参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分. (3)截稿日期: 2006-06-30.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 832-833
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

儿童恶性胃肠道间质瘤1例

金仁顺, 朴东明, 姜 颍

■背景资料
GIST分为梭型细胞型、上皮样细胞型和混合细胞型, 儿童中少见, 胃GIST主要是上皮样细胞型. 本文报道1例儿童上皮样细胞型胃GIST.

金仁顺, 朴东明, 延边大学医院病理科 吉林省延吉市 133000
姜颍, 敦化市医院病理科 吉林省敦化市 133700
通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医院病理科. pdm11172000@yahoo.com.cn
电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610
收稿日期: 2006-02-07 接受日期: 2006-02-13

摘要
患者, 女, 12岁, 无意中发现上腹部包块而就诊. 经手术探察, 行胃大部切除后, 经病理证实为儿童恶性胃肠道间质瘤. 发生在儿童的胃肠道间质瘤罕见, 且多为恶性, 因此早期发现和完整、完全切除, 对患者的预后有重要意义.

关键词: 儿童; 胃肠道间质瘤

金仁顺, 朴东明, 姜颍. 儿童恶性胃肠道间质瘤1例. 世界华人消化杂志 2006;14(8):832-833
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/832.asp

0 引言
胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是消化道最常见的间叶组织来源的肿瘤, 绝大多数病例发生在成人, 儿童中罕见, 我们遇见1例, 现报告如下.

1 病例报告
薛某, 女, 12岁. 2 mo前无意中发现上腹部有鸡蛋大肿物, 最近有时上腹部疼痛. 查体: 上腹部扪及约手拳大肿物, 表面光滑, 活动良好, 随呼吸上下活动, 无压痛. 彩色B超检查: 肝、胃间有45.7 mm×38.4 mm混合性肿物回声, 其间可见囊腔. 术中见胃小弯角切迹处有5.0 cm×4.0 cm×3.0 cm实性肿物, 边缘清楚, 表面光滑, 触之囊性感, 移动性良好, 与胃小弯紧密黏连, 肿物周围无肿大淋巴结, 行胃次全切除术. 病理所见: 胃小弯黏膜见直径1.5 cm的表浅溃疡, 黏膜下有5.3 cm×4.0 cm×3.5 cm肿物, 切面灰褐色, 质较硬, 形成1.5 cm×1.2 cm×1.0 cm囊腔, 内含黏稠的咖啡色液体. 镜下所见: 瘤细胞呈多边形, 胞质淡染或空泡状, 核呈圆型、椭圆型, 巢状或片状瘤细胞肌层内浸润生长, 偶见病理核分裂,淋巴管内见瘤栓形成(图1), 部分处黏液变性. 免疫组织化学染色: CD117(+)、CD34(-)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)灶状(+)、Desmin(-)、S-100(+), 病理诊断: 胃小弯恶性胃肠道间质瘤(上皮样细胞型, 图2).

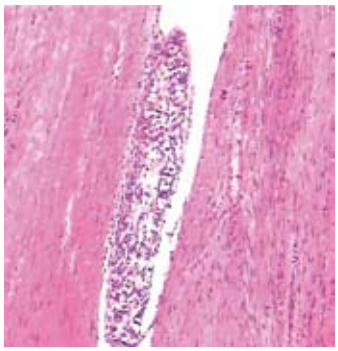


图 1 淋巴管内瘤栓 (HE × 100).

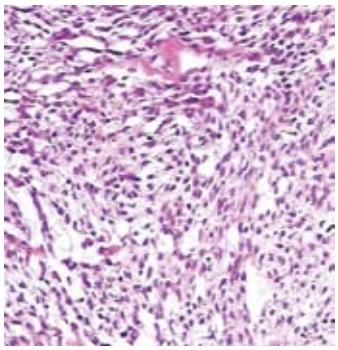


图 2 胃肠道间质瘤 (HE × 200).

2 讨论
GIST是原发于胃肠道、大网膜和肠系膜的c-kit(CD117)染色阳性的梭形细胞或上皮样细胞的间质肿瘤, 占全部胃肠道肿瘤的0.1%-3%. GIST常发生于胃(60%-70%), 最常见的症状是腹痛和黑便. GIST绝大多数发生在成人, 儿童中罕见, 且发生在儿童的病例多为恶性. 最近国外陆续报道儿童中发生的GIST[1-2]. GIST组织学表现分为3型: 梭型细胞型、上皮样细胞型和混合细胞型. 儿童中发生的胃GIST主要是上皮样细胞形态[2], 本例的组织学类型也是上皮样细胞型. WHO将GIST的性质分为良性、未确定潜在恶性和恶性三类, 如何准确判断其良恶性是病理诊断的一个难题. 国内学者提出只要具备下

述一项指征即提示恶性[3]: (1)术中播散和转移; (2)肌层、黏膜或周围组织浸润; (3)脉管浸润或瘤栓形成; (4)肿瘤性坏死; (5)核分裂≥10个/50 HPF(high power field); (6)瘤细胞围绕血管簇状排列; (7)细胞密集且明显异型. 本例瘤细胞浸润肌层, 血管内形成瘤栓, 属恶性GIST.

GIST的免疫表型中大约95%的GIST表达kit(CD117), 其他标志物的染色有较多的变异, 如bcl-2阳性表达为80%, α-SMA为50%, CD34为70%, SMA为35%, S-100为10%, Desmin为5%[4]. 对于GIST外科手术切除是最主要的治疗手段[5]. 本病术后30%出现转移, 46%出现局部复发, 因此首次手术是否完整、完全切除是关键.

3 参考文献

1 Kuroiwa M, Hiwatari M, Hirato J, Suzuki N, Tsuchida Y, Shimada A, Shitara T, Taki T, Hayashi Y. Advanced-stage gastrointestinal stromal tumor treated with imatinib in a 12-year-old girl with a unique mutation of PDGFRA. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1798-1801

2 Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1373-1381

3 侯英勇, 朱雄增. 胃肠道间质瘤诊疗新进展. 中国现代手术学杂志 2005; 9: 164-167

4 Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3813-3825

5 万德森. 胃肠道间质瘤的治疗–外科医生的观点. 中国现代手术学杂志 2005; 9: 161-163

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 消息 •

第十二届全国胆道外科学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会外科学分会胆道外科学组拟定于2006-07在辽宁省沈阳市召开第12届全国胆道外科学术会议. 此次会议由全国胆道外科学组委托中国医科大学附属第二医院(盛京医院)承办, 中国实用外科杂志社协办. 大会将全面展示我国胆道外科近年来的新进展、新成果. 届时将邀请国内外知名肝、胆外科专家作专题演讲. 凡参会者均颁发国家级继续教育学分证书. 现将征集论文的有关事宜通知如下:

1 征文内容

征文内容包括: (1)胆道外科学基础研究(胆道解剖与胆道疾病、胆石成因、胆道感染、胆道肿瘤、胆胰管结合部异常与胆道先天性疾病). (2)胆道外科的临床研究(胆囊、胆管结石、胆道肿瘤、意外性胆囊癌、胆道损伤、肝移植后胆道狭窄等). (3)胆道外科诊断与治疗的新技术、新方法(腹腔镜技术、内镜技术、介入技术、影像技术等). (4)胆道外科疾病的其他诊疗经验等.

2 征文要求

征文要求包括: (1)请寄论文全文及800字以内的摘要各一份. 4号字打印, 附电子稿件. 无摘要者恕不受理. (2)论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精炼且未经发表者. 论文须由作者所在单位审查盖章同意, 并请在信封正面注明会议征文字样. (3)截稿时间: 2006-05-08(当地邮戳为准). 稿件邮寄地址: 辽宁省沈阳市和平区三好街36号 中国医科大学附属第二医院 第一微创、胆道外科; 邮政编码: 110004. 联系人: 吴硕东. 投稿E-mail: wushuodong@yahoo.com.cn.

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 834-838
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版. 世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 世界华人消化杂志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(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、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. 2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01. 世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号.

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. 专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

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

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或T^1_2, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000(M大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用分子质量, 其单位是ku, “原子量”应改为相对原子质量, 即*A*r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在＋、－、±及-后列出. 如37.6±1.2℃, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d.3.56±0.27 pg/ml 应为3.56±0.27 ng/ L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2℃. BP用kPa, RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^9/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、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_1、维生素B_2、维生素B_6、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_{12}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; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外*uv*, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/ L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L 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=45×10^{-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.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*υ*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP <0.05, ^bP <0.01(P >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^cP <0.05, ^dP <0.01; 第三套为^eP <0.05, ^fP <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

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1 000-1 500 kg, 3.5±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±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±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±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±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→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤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. 完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 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).

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 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”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:
METHODS:
RESULTS:
CONCLUSION:
Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006; 14:

3.8 *中文摘要* 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值), 中文摘要格式如下:

摘要
目的:
方法:
结果:
结论:
张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. 世界华人消化杂志 2006;14:

3.9 *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. 正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 *引言* 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 *材料和方法* 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 *结果* 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 *讨论* 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表 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: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *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*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 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 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 *参考文献* 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣 *et al*[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

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. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In:Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 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)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 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》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》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.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年3月18日; 14(8): 839
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

海宁信箱

世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息

编者按 世界华人消化杂志自创刊已有14 a历史, 目前已经发展成为旬刊. 2006年本刊开辟了“海宁信箱”专栏, 旨在促使形成作者、读者、编者互动的局面, 适应我国消化病事业的飞速发展, 创办高质量的学术期刊, 进一步活跃学术界. 本专栏面向作者、读者、以及编委征集反馈信息, 希望借用大家的力量来引导杂志向更高的质量迈进. 反馈信息包括对杂志的总体评价、事实纠错、文字更正、解释说明, 编辑部会如实地将这些信息以公开或匿名的方式刊登在每期的固定位置. 反馈信息可以通过Email发送至h.n.zhang@wjgnet.com, 也可以发送手机短信至13910684938.

1 反馈信息

1.1 世界华人消化杂志办刊严谨, 服务理念强. 需要指出的是, 14卷1期, 109页文章《腹部外科脓毒症临床救治258例》中"死亡率" 应为病死率. 死亡率指一定时期内(通常为1年)死亡人数与同期平均人口数之比, 说明该时期人口的死亡强度. 病死亡指一定时期内患某病的全部病人中因该病而死亡者的比例, 是衡量确诊疾病的死亡概率, 反映疾病严重度和医疗水平的. 110页左栏顺数第17行中"长达22 a的临床与实验研究, 在12 a间, ……"a是否为"年"; "22"为何后面又成了"12"? (四川大学华西医院中西医结合科 唐文富)

1.2 世界华人消化杂志14卷1期基础研究栏目中, 有的文章与消化系疾病研究的国际前沿问题接轨(如骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用); 有的在分子水平研究胃癌发生和幽门螺旋杆菌引起胃炎的分子机制, 有较大的参考价值. 慢性乙型肝炎患者血清脂质水平与病理分级的关系一文, 因为有肝活检材料作为金标准, 其价值远超过其他同类研究.

2006年14卷4期江学良 *et al*所撰"骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用"一文的图1中, 荧光显微照片的放大倍数似有疑问, A、B是×250, C、D、E、F是×400, 但A、B中所示细胞体积显得过小, 放大250倍的细胞与放大400倍的细胞极不成比例. 同一期洪永孟 *et al*著一文中, 不足的是病理分级、分期与血脂各指标之间没有进行相关分析. (复旦大学上海医学院病理学系 张锦生)

编辑回应

首先, 对所有关注和支持本刊的读者、作者、以及编委表示衷心感谢, 对他们的批评我们一定虚心接受. 经核查, 除“年(a)”是本刊统一用法外, 其余属实. 在此我们对广大读者和作者表示郑重道歉. 我们保证在以后的工作中一定加强监督、规范工作流程, 尽最大努力避免此类错误的再次发生. 其次, 有了这些高度敬业、严肃对待学术的读者、作者、以及编委, 我们有信心将本刊进一步推向更高的发展领域.

2006年, 《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通, 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号 电话: 010-85381901 http://www.wjgnet.com/wcjd/index.jsp.

• 致谢 •

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！

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈治水 教授
黑龙江省哈尔滨市中国人民解放军第211医院中医科

邓长生 教授
武汉大学中南医院消化内科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

龚国忠 教授
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

郝俊鸣 副主任医师
中国康复研究中心北京博爱医院功能检查科

何振平 教授
第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

李靖 副教授
第三军医大学新桥医院肝胆外科

李晓宇 主任医师
北京航天中心医院消化内科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

陆云飞 教授
广西医科大学第一附属医院胃肠外科

彭心宇 教授
新疆石河子大学医学院第一附属医院普外一科

秦成勇 教授
山东省立医院消化内科

邱双健 副教授
复旦大学附属中山医院肝癌研究所

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所

万军 教授
中国人民解放军总医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

吴君 主任医师
贵阳医学院附属医院感染科

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

伊力亚尔•夏合丁 教授
新疆医科大学第一附属医院胸外科

赵新泰 研究员
上海市肿瘤研究所细胞与分子免疫学研究所

张绪清 副教授
第三军医大学西南医院

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心

邹小明 教授
哈医大附属第二医院胃肠乳腺外科