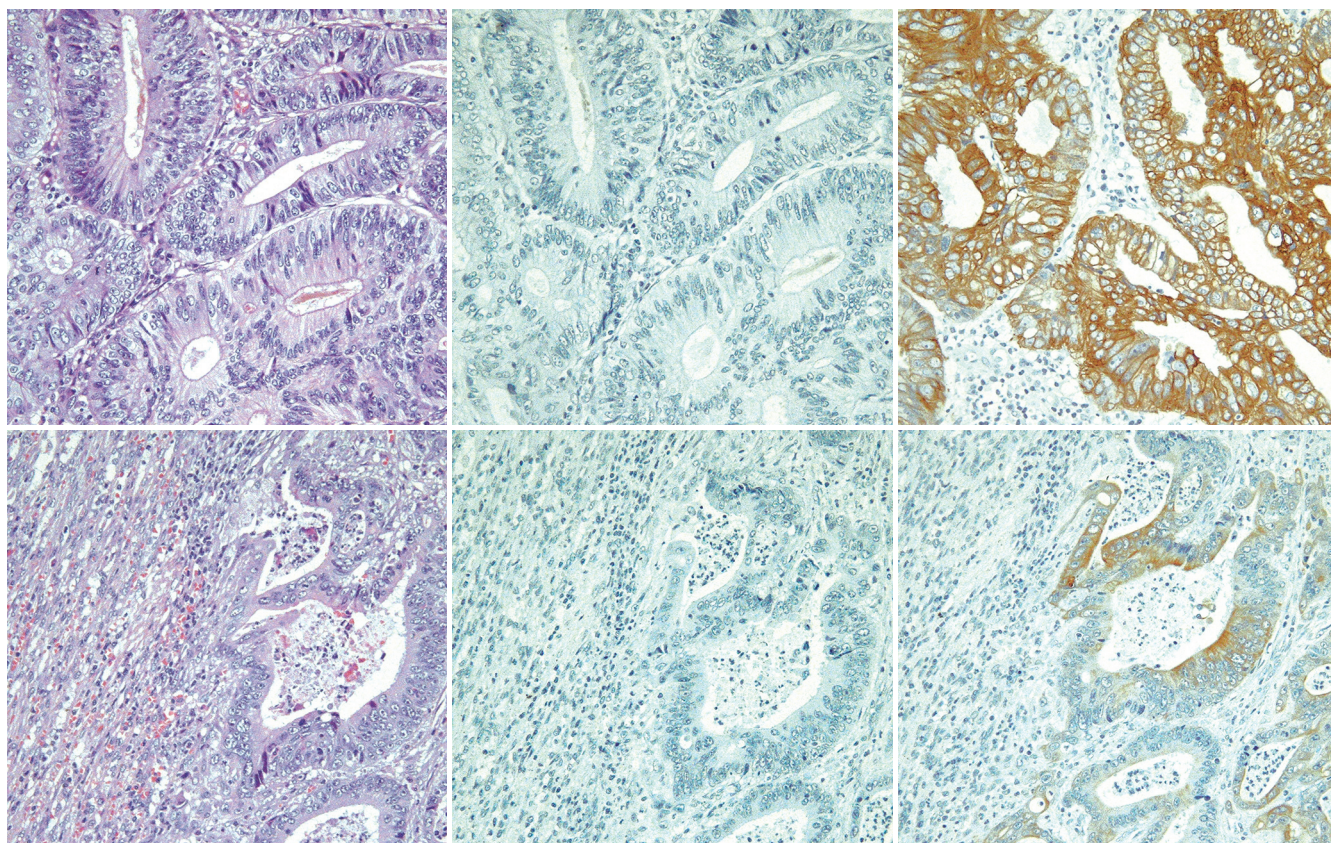


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 11 月 8 日 第 14 卷 第 31 期 (Volume 14 Number 31)



31 / 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®

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
别平教授	重庆
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨
蔡淦教授	上海
蔡开琳副教授	武汉
曹洁副教授	上海
曹志成院士	香港
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
陈凇教授	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
程树群副教授	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
巩鹏副教授	大连
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
郝春秋副教授	西安
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
李军祥教授	北京
李奇林教授	广州
李胜研究员	济南
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李旭副教授	广州
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李瑗教授	南宁
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
林胜璋副教授	温州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘彬彬副研究员	上海
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘纪教授	重庆
刘铁夫教授	哈尔滨
刘颖斌副教授	杭州
刘占举教授	郑州
刘正稳教授	西安
刘作金副教授	重庆
龙致贤教授	北京

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 11 月 8 日 第 14 卷 第 31 期 (总第183期)

述 评

2989 胰腺干细胞在胰腺疾病中的研究进展

郭晓钟

基础 研究

2991 Apoptin基因对人胃癌细胞BGC-823的抑制效应及与凋亡信号转导的关系

李霄, 金宁一, 连海, 陈立刚, 孙丽丽, 李萍

2997 KDR启动子驱动双自杀基因靶向杀伤人胃癌细胞的作用

李强, 黄宗海, 俞金龙, 苏国强, 厉周, 周光军

3002 外源质粒DNA对小鼠肠道基因表达谱的影响

刘建文, 乐国伟, 施用晖

3008 暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降

崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛

3013 转染VEGF₁₆₅的大鼠血管内皮细胞与胰岛共移植对糖尿病大鼠的治疗作用

程颖, 刘永锋, 张佳林, 李铁民, 赵宁

临 床 研究

3020 肝癌组织内类阿片肽LVV-血衍吗啡素-6的作用

周迈, 彭吉润, 钟朝辉, 涂向群, 常迎彬, 焦岗军, 冷希圣

3026 胃癌组织中转化生长因子 α 、表皮生长因子受体和增殖细胞核抗原的表达

王春虹, 刘丽娜, 吕申

3030 克罗恩病危险因素的病例对照研究

王珍

文 献 综 述

3034 终末期肝病模型在肝病中的应用进展

薛冬云, 韩涛

3038 拉米夫定抗乙型肝炎病毒治疗中耐药突变的后续治疗

陈畅, 张文俊, 李兆申

3042 EphB2受体及其配体Ephrin-B在结直肠癌中的研究进展

王永占, 高青

研究 快报

3046 肝门阻断再灌注后脑皮层组织和血清S100 β 蛋白的差异性改变及意义

郑晓春, 陈卫民, 盖成林

临 床 经 验

3050 中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎关系的Meta分析

骆峻, 金安娜, 吴旭东, 喻荣彬

3055 动脉化疗对进展期胃癌CEA mRNA及CK19 mRNA表达的影响

张强, 姚惠香, 孙群, 朱金水

3060 螺旋CT对胃癌淋巴结转移的评价

赵志清, 郑可国, 沈静娴, 王伟, 李子平, 许达生

附 录	3065 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	3070 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2990 国际会议 2996 2006中国结直肠肛门外科学术会议通知 3001 第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知 3007 中国学术期刊综合引证报告(2006) 3019 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 3025 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 3064 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》
封面故事	Kunihiko Hiraiwa, Kyoei Morozumi, Hiroshi Miyazaki, Keiichi Sotome, Akio Furukawa, Makoto Nakamaru, Yoichi Tanaka, Hisami Iri. Isolated splenic vein thrombosis secondary to splenic metastasis: A case report. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(40): 6561-6563 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/6561.asp
国际会议	XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2006-11-08
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 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张敏 李琪
本期审读 张海宁

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
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

November 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 31

EDITORIAL	2989 Research progress on pancreatic stem cells in treatment of pancreatic diseases <i>Guo XZ</i>
BASIC RESEARCH	<p>2991 Anti-tumor effects of Apoptin gene on human gastric carcinoma BGC-823 and its correlation with apoptotic signal transduction <i>Li X, Jin NY, Lian H, Chen LG, Sun LL, Li P</i></p> <p>2997 Adenovirus-mediated double suicide gene driven by KDR promoter selectively kills human gastric adenocarcinoma cell line SGC7901 <i>Li Q, Huang ZH, Yu JL, Su GQ, Li Z, Zhou GJ</i></p> <p>3002 Effect of foreign plasmid DNA on gene expression profile of the intestine in mice <i>Liu JW, Le GW, Shi YH</i></p> <p>3008 Down-regulated expression of intestinal epithelial tight junction protein occludin in mice with fulminant hepatic failure <i>Cui W, Ma L, Wen Y, Liu P</i></p> <p>3013 Co-transplantation of VEGF₁₆₅-transfected vascular endothelial cells and islets in treatment of rats with diabetes <i>Cheng Y, Liu YF, Zhang JL, Li TM, Zhao N</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3020 Role of opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-6 in hepatocellular carcinoma <i>Zhou M, Peng JR, Zhong ZH, Tu XQ, Chang YB, Jiao GJ, Leng XS</i></p> <p>3026 Expression of transforming growth factor-α, epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in human gastric cancer tissues <i>Wang CH, Liu LN, Lv S</i></p> <p>3030 Risk factors of Crohn's disease: A case-control study <i>Wang Z</i></p>
REVIEW	<p>3034 Application progress of advance liver disease model in study of liver diseases <i>Xue DY, Han T</i></p> <p>3038 Additional management of drug-resistant mutation in treatment of hepatitis B virus infection with Lamivudine <i>Chen C, Zhang WJ, Li ZS</i></p> <p>3042 Advance in EphB2 receptor and its ligand Ephrin-B in colorectal cancer <i>Wang YZ, Gao Q</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3046 Alteration of cortex and serum S100β protein in rats undergoing hepatic portal occlusion reperfusion <i>Zheng XC, Chen WM, Gai CL</i></p>

CLINICAL PRACTICE	<p>3050 Meta-analysis on the relationship between HLA-DRB1 gene polymorphism and chronic hepatitis B in Chinese population <i>Luo J, Jin AN, Wu XD, Yu RB</i></p> <p>3055 Effects of artery intervention chemotherapy on mRNA expression of carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 in progressive gastric cancer <i>Zhang Q, Yao HX, Sun Q, Zhu JS</i></p> <p>3060 Evaluation of lymph node metastases in gastric cancer with spiral computed tomography <i>Zhao ZQ, Zheng KG, Shen JX, Wang W, Li ZP, Xu DS</i></p>
APPENDIX	3065 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	3070 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Hiraiwa K, Morozumi K, Miyazaki H, Sotome K, Furukawa A, Nakamaru M, Tanaka Y, Iri H.</i></p> <p>Isolated splenic vein thrombosis secondary to splenic metastasis: A case report.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(40): 6561-6563</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/6561.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx</p> <p>New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org</p> <p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date November 8, 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: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

胰腺干细胞在胰腺疾病中的研究进展

郭晓钟

郭晓钟, 沈阳军区总医院消化内科 辽宁省沈阳市 110016
郭晓钟, 教授, 博士生导师, 现任沈阳军区总医院消化内科主任, 国家自然科学基金第八届学组成员, 中华医学会消化病分会委员, 全军消化疾病专业委员会副主任委员, 辽宁省消化病学会副主任委员、沈阳军区消化病学会主任委员。

通讯作者: 郭晓钟, 110016, 沈阳市沈河区文化路83号, 沈阳军区总医院消化内科. guoxiaozhong1962@163.com
电话: 024-23056230 传真: 024-23056230
收稿日期: 2006-08-08 接受日期: 2006-09-28

摘要

重症坏死性胰腺炎和胰腺癌等胰腺疾病的治疗仍然十分困难, 干细胞的研究为其治疗提供了一种可能性, 但胰腺干细胞缺乏特征, 分子标志物尚缺乏特异性, 通过体外培养与扩增技术成功培养更多的干细胞, 可能为胰腺疾病的治疗开辟新途径。因此, 应该重视干细胞在胰腺疾病基础与临床中的应用价值。

关键词: 胰腺干细胞; 重症坏死性胰腺炎; 胰腺癌; 慢性胰腺炎

郭晓钟. 胰腺干细胞在胰腺疾病中的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(31):2989-2990
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2989.asp>

0 引言

慢性胰腺炎、重症坏死性胰腺炎和胰腺癌其治疗十分棘手。随着对胰腺干细胞的不同发育阶段的表面标志物和胰腺干细胞的发育过程的研究及伴随胰腺外分泌前体细胞增殖培养技术的发展, 将为胰腺疾病的治疗提供新思路。

1 胰腺干细胞的特征和分子标志

干细胞(stem cell, sc)是一种具有多种分化潜能, 自我更新和高度增殖能力的细胞, 能产生出与自身完全相同的子细胞。同时又可以进一步分化成为各种不同的组织细胞, 从而构成机体各种复杂的组织器官。胰腺干细胞属于成体干细胞和单能干细胞。由于胚胎干细胞存在一系列伦理问题, 而成体干细胞自体移植避免了免疫排斥, 所以成体干细胞在将来的再生医学领域中发挥越来越重要的作用。胰腺干细胞是一种

同时具有高度增殖及多向分化能力的多能干细胞。他来源于胚胎期的胚泡细胞团内层, 在一定条件下成为定向祖细胞最终分化成胰腺各类型细胞, 但具体分化调控机制有待研究^[1]。

胰十二指肠同源异盒基因(PDX-1)是胰腺干细胞的发育中表达的第一个分子标记, 胰岛和腺泡细胞来源于整个胚胎期表达PDX-1的前体细胞, 而胰导管来自于大约胚胎10.5 d的PDX-1阳性前体细胞。转基因成年小鼠胰岛管中那些仅表达PDX-1, 但不表达胰岛素的细胞为胰腺干细胞^[2]; 胰腺巢素蛋白(nestin)阳性细胞是一种高分子丝蛋白, 普遍存在于60 d小鼠的胰岛, 导管和泡心区域。胰腺内Nestin+细胞在体外诱导除可分化形成胰腺B细胞, 还可分化为胰腺其他细胞; 神经元素3(Ngn3)是在胰腺发育过程中短暂表达的bHLH家族蛋白。他是胰腺内分泌细胞系的定向因子, 且在成熟胰岛中不存在; 细胞角蛋白(cytokeratin, CK)代表胰族20多个不同的多肽, 表达CK18和CK8, 而分化稍差的导管细胞则表达CK7和CK19, 而CK20是成熟导管细胞的特异标志; 其他如GLUT-2, 酪氨酸羟化酶TH, 葡萄糖激酶GK, 葡萄糖转移体2, P48等, 亦可以作为胰腺干细胞的辅助标志物^[3]。但目前胰腺干细胞缺乏特征, 分子标志物尚缺乏特异性, 因此需要不断的深入研究。

2 胰腺干细胞的体外培养与扩增

由于胰腺干细胞主要来源于导管上皮, 少量来源于胰岛, 因而成功地分离胰腺导管上皮细胞就可获得大量的具有分化潜能的干细胞。但干细胞与其他细胞相比, 在培养方面有其特殊性。胰腺导管上皮是具有干细胞潜能的一类细胞, 其在胰腺中所占比例甚少。目前成人、动物胰腺导管上皮细胞的分离多采用胶原酶消化法。按供者器官切取原则和技术获取胰腺后, 于导管内注入胶原酶消化。由于内、外分泌组织密度不同, 可用密度梯度离心法将他们纯化。离心后, 绝大多数胰岛即与外分泌组织(腺泡细胞和

■背景资料

随着全球工业化程度和人民生活水平的不断提高, 胰腺疾病的发病率有逐渐上升的趋势, 已成为全球范围内严重危害人民身体健康和生命的主要病种之一。胰腺干细胞是胰腺存在和更新的基础, 与许多胰腺疾病有着密切的联系。胰腺干细胞的研究对于深入了解胰腺疾病的发生机制及指导治疗有重要意义。

■名词解释

干细胞: 干细胞是一类具有自我更新和多向分化增生能力的原始细胞, 能产生表现型和基因型与自己完全相同的子细胞, 既具有生理性的更新能力, 又具有对损伤与疾病导致的反应与修复功能的细胞。

导管上皮细胞)分开而得到纯化, 胰岛可用于移植等方面的研究, 而外分泌组织则需进一步处理以便获取导管上皮细胞。在外分泌细胞中绝大多数为腺泡细胞, 少量为导管上皮细胞。根据这2种细胞的不同生物学特征, 几乎可将所有的腺泡细胞在换液时丢弃, 仅留有少量的贴壁细胞即导管上皮细胞生长。早期加入微量霍乱毒素于培养液中则可有效的消除成纤维细胞的生长。加入少量抗真菌的二性毒素B可比较有效的预防真菌的污染。将nestin+细胞培养在含有表皮生长因子和碱性成纤维生长因子的无血清培养基中, 成功地使其在体外培养增生达8 mo以上。而使用含有角质细胞生长因子的无血清培养基也成功的大量扩增了胰腺导管细胞。但寻找更经济, 培养方法简单及稳定的干细胞是我们研究的目标。

3 胰腺干细胞在胰腺疾病治疗中的现状与展望

胰腺干细胞的识别, 新型抗原性标志的发展, 以及干细胞活性检测系统的建立在促进我们对胰腺干细胞发生的了解至关重要, 目前成体干细胞的研究尚局限于动物(小鼠)实验阶段, 将胰腺干细胞真正用于临床治疗尚需要时间^[4]。成体干细胞含量少, 很难分离和纯化, 且数量随年龄增长而降低, 而人胰腺干细胞与其胚胎发育中前

体细胞表达的标记物是否相同和胰腺干细胞的确切标志物还不十分清楚, 很多表达的分子有待进一步肯定。所以如何控制胰腺干细胞在体外可以分化新的导管细胞和再生外分泌细胞等一系列问题需要解决。如果我们充分了解胰腺干细胞及其生长、发育的影响因子, 那么就有可能给慢性胰腺炎和重症坏死性胰腺炎病人使用适宜的生长因子及直接诱导新的胰腺细胞产生。如果我們可以在手术治疗胰腺癌的同时提取患者自身的胰腺干细胞, 再进行体外扩增后回植给病人, 将可造福大量的胰腺癌患者。这方面的研究将是长期和艰巨的^[5]。

4 参考文献

- 1 Soria B, Bedoya FJ, Martin F. Gastrointestinal stem cells. I. Pancreatic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G177-G180
- 2 Koizumi M, Doi R, Toyoda E, Masui T, Tulachan SS, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Gittes GK, Imamura M. Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. *Surgery* 2003; 134: 260-266
- 3 Kume S. The molecular basis and prospects in pancreatic development. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 367-374
- 4 Casu A, Trucco M, Pietropaolo M. A look to the future: prediction, prevention, and cure including islet transplantation and stem cell therapy. *Pediatr Clin North Am* 2005; 52: 1779-1804
- 5 Kume S. Stem-cell-based approaches for regenerative medicine. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 393-402

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

国际会议

XXX Panamerican Congress of Gastroenterology
11-16 November 2006
Cancun
www.panamericano2006.org.mx

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

New York Society for Gastrointestinal Endoscopy
13-16 December 2006
New York
www.nysge.org

Apoptin基因对人胃癌细胞BGC-823的抑制效应及与凋亡信号转导的关系

李霄, 金宁一, 连海, 陈立刚, 孙丽丽, 李萍

李霄, 金宁一, 连海, 李萍, 军事医学科学院全军基因工程重点实验室 吉林省长春市 130062
陈立刚, 吉林大学白求恩医学部第一附属医院消化内科 吉林省长春市 130021
孙丽丽, 吉林大学白求恩医学部第二附属医院耳鼻喉科 吉林省长春市 130041
李霄, 2006年吉林大学博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤基因治疗研究。
国家自然科学基金重大项目资助项目, No. 39893290-4-3
通讯作者: 金宁一, 130062, 吉林省长春市, 军事医学科学院全军基因工程重点实验室. skylee528112@yahoo.com
电话: 0431-6985921 传真: 0431-7983322
收稿日期: 2006-07-09 接受日期: 2006-09-12

Anti-tumor effects of Apoptin gene on human gastric carcinoma BGC-823 and its correlation with apoptotic signal transduction

Xiao Li, Ning-Yi Jin, Hai Lian, Li-Gang Chen, Li-Li Sun, Ping Li

Xiao Li, Ning-Yi Jin, Hai Lian, Ping Li, Chinese PLA Key Laboratory of Genetic Engineering, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Changchun 130062, Jilin Province, China
Li-Gang Chen, Department of Gastroenterology, the First Hospital, Bethune Faculty of Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
Li-Li Sun, Department of Otolaryngology, the Second Hospital, Bethune Faculty of Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China
Supported by the Major Research Plan of National Natural Science Foundation of China, No. 39893290-4-3
Correspondence to: Dr. Ning-Yi Jin, Chinese PLA Key Laboratory of Genetic Engineering, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Changchun 130062, Jilin Province, China. skylee528112@yahoo.com
Received: 2006-07-09 Accepted: 2006-09-12

Abstract

AIM: To investigate the anti-tumor effects of Apoptin gene on human gastric carcinoma BGC-823, and to explore the mechanism of apoptin in the participation of signal transduction pathway.

METHODS: Recombinant plasmid pVAX1-Apoptin was transfected into BGC-823 cells by application of liposome *in vitro*. The anti-tumor effect on BGC-823 cells was measured through

methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and the morphological changes of pVAX1-Apoptin-transfected cells were observed by AO/EB staining. Furthermore, the mitochondrial trans-membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was analyzed by flow cytometry and the release of cytochrome c (Cyto c) was detected by Western blot assay. Colorimetric assay was used to analyze the activities of Caspase-3/9.

RESULTS: pVAX1-Apoptin caused a more powerful cytotoxic effect than pVAX1 did (72 h after 10- μ g plasmid transfection, 23.37% vs 99.61%, $P < 0.01$), and apoptosis was a dominant death style in the pVAX1-Apoptin-transfected cells. Furthermore, in pVAX1-Apoptin-transfected cells, an increase of cytosolic cytochrome c content co-occurred with a loss of trans-membrane potential (compared with pVAX1-transfected BGC-823 cells, $46.7\% \pm 7.26\%$ vs $70.66\% \pm 5.98\%$, $P < 0.01$). In addition, a significant difference was found between pVAX1-Apoptin- and pVAX1-transfected cells in Caspase-9 and Caspase-3 activities (Caspase-9: 0.181 ± 0.032 vs 0.079 ± 0.013 , $P < 0.01$; Caspase-3: 0.242 ± 0.041 vs 0.058 ± 0.023 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: In BGC-823 cells, pVAX1-Apoptin induced collapse of the mitochondrial trans-membrane potential can exert a feedback effect to elicit cytochrome c release, and then lead to the activation. Cytochrome c-dependent Caspase-9 activation stimulates the key downstream factors of apoptotic pathway, exhibiting an inhibitory effect on BGC-823 cells.

Key Words: Apoptin; Gastric carcinoma; BGC-823 cell line; Apoptosis; Anti-tumor effect

Li X, Jin NY, Lian H, Chen LG, Sun LL, Li P. Anti-tumor effects of Apoptin gene on human gastric carcinoma BGC-823 and its correlation with apoptotic signal transduction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):2991-2996

摘要

目的: 探讨Apoptin基因对人胃癌细胞

■背景资料

癌症是威胁人类健康的主要疾病之一,其发生是一个具有极复杂生物生命变化发生机制的过程.肿瘤患者数量庞大,缺乏有效的治疗手段,预后差.目前对恶性肿瘤的治疗多采用手术治疗辅以化疗的方法,但其效果不尽人意,且有严重副作用.基因治疗有别于上述传统方法,他着眼于调动机体自身的抗癌能力,通过增强固有的抗肿瘤机制达到抑制肿瘤细胞及根治肿瘤的目的,因此被认为是最有希望最终攻克癌症的疗法.

■ 研究前沿

细胞凋亡是机体清除变异和恶变细胞的一种主动程序化生理过程。许多刺激因子诱导细胞凋亡依赖P53信号转导途径,但很多肿瘤在其发生过程中常伴随P53突变,从而影响治疗效果。通过基因工程技术导入P53的肿瘤基因治疗药物已经面世并且取得了一定成功。然而,在缺乏导向载体的情况下,这种基因介入方式必然会对正常组织细胞造成损伤。研究表明,来源于鸡贫血病毒病毒的Apoptin基因可有效抑制多种肿瘤,具有以非P53依赖性途径特异性诱导人肿瘤细胞或转化细胞,而非正常细胞发生凋亡的作用,且其凋亡诱导作用不受Bcl-2的抑制,是一种理想的特异性肿瘤基因治疗效应基因。

BGC-823的抑制作用及其参与胞内细胞信号转导的机制。

方法:应用脂质体转染法将重组质粒pVAX1-Apoptin体外转染BGC-823细胞,运用噻唑兰(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)分析法检测重组质粒对BGC-823肿瘤细胞的抑制作用;通过AO/EB染色法对pVAX1-Apoptin转染的肿瘤细胞进行形态学观察;运用流式细胞术检测细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$);通过免疫印迹检测细胞色素c(cytochrome c, Cyto c)释放;应用底物显色法检测Caspase-3/9活性。

结果:pVAX1-Apoptin转染比pVAX1具有更强的抑瘤效应(10 μ g质粒转染72 h后, 23.37% vs 99.61%, $P<0.01$),并且肿瘤细胞的死亡方式以凋亡为主。实验结果显示, pVAX1-Apoptin转染导致细胞线粒体跨膜电位下降,与pVAX1转染BGC-823细胞相比有显著差异(46.7% \pm 7.26% vs 70.66% \pm 5.98%, $P<0.01$);同时伴随细胞色素c的释放。另外, pVAX1-Apoptin和pVAX1转染细胞的Caspase-3/9活性具有显著差异(Caspase-9: 0.181 \pm 0.032 vs 0.079 \pm 0.013, $P<0.01$; Caspase-3: 0.242 \pm 0.041 vs 0.058 \pm 0.023, $P<0.01$)。

结论:pVAX1-Apoptin转染BGC-823肿瘤细胞导致线粒体跨膜电位下降,并刺激释放细胞色素c,从而激活Caspase-9。经细胞色素c激活的Caspase-9进而活化凋亡通路下游关键作用因子,并对BGC-823肿瘤细胞产生抑制效应。

关键词:Apoptin基因;胃癌;BGC-823细胞系;细胞凋亡;抗肿瘤效应

李霄, 金宁一, 连海, 陈立刚, 孙丽丽, 李萍. Apoptin基因对人胃癌细胞BGC-823的抑制效应及与凋亡信号转导的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(31):2991-2996

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2991.asp>

0 引言

凋亡素(Apoptin)是鸡贫血病毒(chicken anemia virus, CAV)VP3基因的编码产物,具有特异性诱导人黑色素瘤、肉瘤、淋巴瘤等多种恶性转化细胞发生凋亡的作用,而对正常细胞没有影响^[1-3]。虽然Apoptin区分恶性细胞和正常细胞的机制尚不清楚,但有研究表明,其凋亡诱导作用与Apoptin的细胞定位有关,正常细胞中Apoptin主要分布于细胞质中,而在恶性转化细胞中则主要定位于细胞核^[4]。另外, Apoptin的凋亡诱导功能不依赖P53分子,而且Bcl-2, Bag-1, Bcr-abl等凋亡抑

制分子不仅对Apoptin的功能没有影响,反而会增强其作用^[5-9]。因此,与依赖上述途径的放化疗等传统疗法相比,存在凋亡基因突变或含有凋亡抑制分子的肿瘤细胞对Apoptin仍然敏感。而且Apoptin基因较小(366 bp),可以插入多种载体,具有成为新的肿瘤基因治疗研究策略的潜力^[10-12]。为探索Apoptin基因在肿瘤基因治疗中的应用,本研究以人胃癌细胞BGC-823为研究对象,探讨了Apoptin基因的抑瘤作用及对凋亡信号转导的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 脂质体Lipofectamine购自Invitrogen公司; RPMI 1640培养液, 胎牛血清购自Gibco公司; Rho123, MTT购自Sigma公司; 小鼠抗人Cyto c单抗, 碱性磷酸酶标记抗小鼠IgG购自Santa Cruz公司; 胞质分离试剂盒和Caspase-3/9检测试剂盒购自BioVision公司; NBT/BCIP购自Promega公司; pVAX1, pVAX1-Apoptin质粒由本室保存; 人胃癌细胞BGC-823购自中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所; 流式细胞仪为美国B-D公司产品; 荧光显微镜及成像系统为日本Olympus产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和质粒转染 BGC-823细胞在RPMI 1640培养液(含100 mL/L胎牛血清, 100 U/L青霉素, 100 U/L链霉素)中, 于37℃, 50 mL/L CO₂条件下, 培养至细胞80%融合, 用25 g/L胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液, 调整细胞浓度至1 \times 10⁸个/L, 分别接种于96孔(150 μ L/孔)和6孔(2 mL/孔)细胞培养板, 于37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养24 h后, 通过脂质体介导法分别将10 μ g重组质粒pVAX1-Apoptin和载体质粒pVAX1转染BGC-823细胞, 同时设空白细胞对照。

1.2.2 MTT检测细胞存活率 质粒转染的BGC-823细胞培养12, 24, 48, 60和72 h后, 于96孔细胞培养板中加入20 μ L/孔MTT(5 g/L), 于37℃, 50 mL/L CO₂条件下继续培养4 h, 吸去培养液, 加入二甲基亚砷(200 μ L/孔), 待紫色结晶充分溶解后, 于490 nm波长检测光吸收值(A), 通过公式^[13]计算细胞生存率, 细胞生存率 = 实验孔平均A值/对照孔平均A值 \times 100%。

1.2.3 AO/EB染色观察细胞形态 收集质粒转染48 h的细胞1 \times 10⁶个, 细胞计数并调整细胞浓度至1 \times 10⁹个/L。取上述细胞悬液25 μ L, 加入

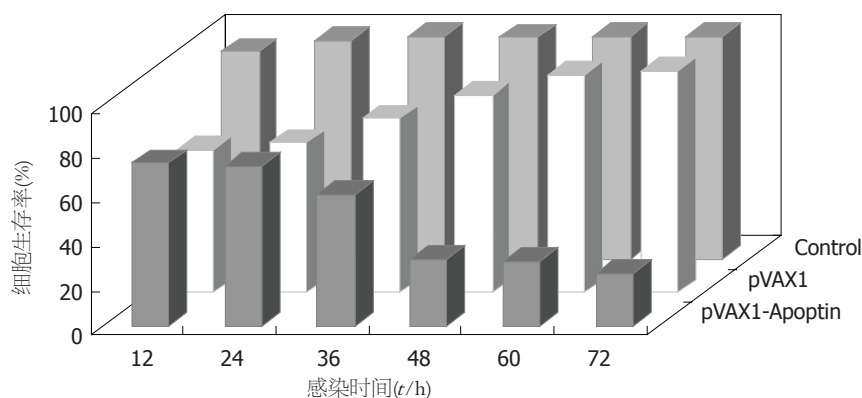


图 1 MTT检测BGC-823细胞生存率.

■创新盘点

本研究将表达Apoptin的质粒重组体体外导入人胃癌细胞BGC-823, 结果表明pVAX1-Apoptin通过作用于线粒体途径相关细胞信号分子诱导肿瘤细胞凋亡, 有效抑制肿瘤细胞的生长.

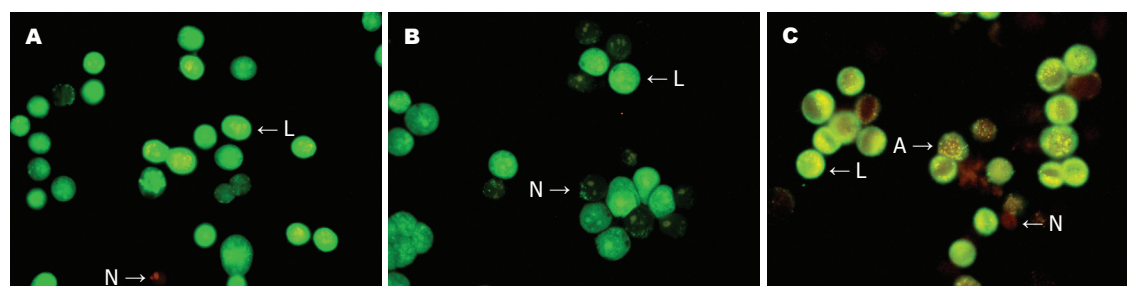


图 2 pVAX1-Apoptin对BGC-823细胞形态的影响. A: 正常BGC-823细胞对照; B: pVAX1转染BGC-823细胞; C: pVAX1-Apoptin转染BGC-823细胞. 图中“L”代表正常细胞; “N”代表坏死细胞; “A”代表凋亡细胞.

2 μ L AO/EB溶液(AO, EB的PBS溶液, 浓度均为100 mg/L), 振荡混匀, 取10 μ L上述细胞置于显微载玻片上, 加盖玻片, 置于荧光显微镜下观察细胞形态.

1.2.4 流式细胞仪检测 $\Delta\Psi_m$ 变化 收集质粒转染48 h的细胞 1×10^6 个, PBS洗涤1次, 加入Rho123 (2 mg/L), 于37 $^{\circ}$ C条件下避光作用30 min, PBS洗涤3次后用流式细胞仪检测荧光阳性细胞百分数.

1.2.5 Western blot检测细胞色素c 收集质粒转染48 h的BGC-823细胞, 应用胞质分离试剂盒对其胞质成份进行分离和浓缩, 并用核酸蛋白检测仪对其中蛋白组份进行定量. 取50 μ g胞质蛋白进行SDS-PAGE电泳, 并电转移至硝酸纤维素膜. 经5%脱脂乳封闭后, 先后与小鼠抗人Cyto c单抗和碱性磷酸酶标记抗小鼠IgG于37 $^{\circ}$ C条件下作用2 h, 并于NBT/BCIP溶液中显色.

1.2.6 Caspase-3/9活性测定 收集质粒转染48 h的BGC-823细胞 1×10^6 个, 于细胞裂解液中冰浴10 min后, 于10 000 g, 4 $^{\circ}$ C条件下离心1 min, 应用核酸蛋白检测仪对上清中的蛋白质成份进行定量, 并应用Caspase-3/9检测试剂对含有100 μ g蛋白质的上清液进行Caspase活性检测(405 nm).

统计学处理 实验所得数据均采用学生氏t检验进行处理, $P < 0.05$ 视为差异显著.

2 结果

2.1 pVAX1-Apoptin对BGC-823细胞的抑制作用 重组质粒pVAX1-Apoptin对BGC-823细胞具有显著的抑制作用($P < 0.01$), 转染72 h后生存率仅为23.37%. 由于脂质体的细胞毒性作用, 载体质粒实验组在转染后呈现一定抑制作用, 但随后逐渐恢复旺盛生长, 72 h后生存率为99.61%. 综合考虑pVAX1-Apoptin抑制作用的时间依赖关系和脂质体的细胞毒性对实验结果的影响, 本研究在细胞水平实验过程中均采用48 h为指标检测时间点(图1).

2.2 pVAX1-Apoptin转染后BGC-823细胞的形态学变化 应用AO/EB染色法鉴定细胞状态时, 正常细胞的细胞膜完整, 只被AO染色呈现均匀的绿色荧光(图2A); pVAX1转染的BGC-823细胞因胞膜遭到破坏, 被EB染色后呈现桔红色的坏死形态(图2B); pVAX1-Apoptin转染的BGC-823细胞发生凋亡, 其膜完整性遭到破坏, 染色质凝聚, 因此细胞膜被AO染色呈现绿色荧光的同时, 核酸物质被EB染色呈现桔红色荧光, 表现出典型的凋亡特征(图2C).

2.3 pVAX1-Apoptin转染对BGC-823细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响 $\Delta\Psi_m$ 下调说明线粒体结构、功能和活性发生改变. 如图3所示, 与空白细胞对照组和pVAX1转染组相比, pVAX1-Apoptin转染显著下

■应用要点

质粒载体安全性高, 制备工艺成熟, 成本低廉, 是基因治疗的理想载体之一; Apoptin具有特异性, 可减少对人体健康组织细胞的损伤, pVAX1-Apoptin具有做为抗肿瘤制剂应用于临床研究和药物开发的潜力。

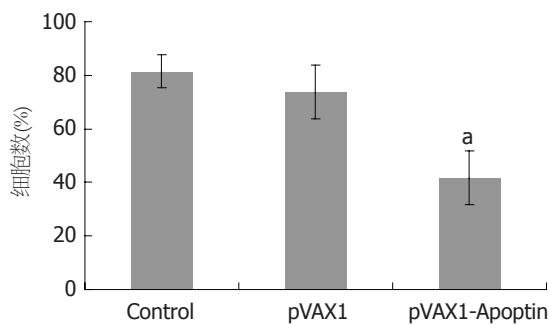


图3 pVAX1-Apoptin对 $\Delta\Psi_m$ 的影响. $^aP<0.01$ vs control, $n=5$.

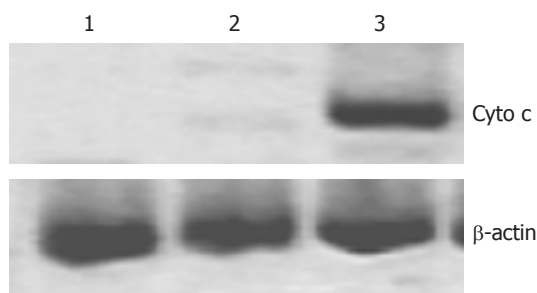


图4 Cyto c释放检测. 1: 正常BGC-823细胞对照; 2: pVAX1转染BGC-823细胞; 3: pVAX1-Apoptin转染BGC-823细胞。

调 $\Delta\Psi_m$ ($P<0.01$). pVAX1转染组 $\Delta\Psi_m$ 虽较对照组低, 可能是由脂质体破坏细胞膜结构完整性所致, 与对照组相比没有显著差异。

2.4 pVAX1-Apoptin转染对BGC-823细胞胞质Cyto c含量的影响 pVAX1-Apoptin转染可明显增加BGC-823细胞质中Cyto c含量, 而对照组则检测不到, pVAX1实验组细胞线粒体遭到脂质体破坏后可能有少量Cyto c释放到胞质中(图4)。

2.5 pVAX1-Apoptin转染对Caspase-3/9活性的影响 与空白细胞对照组和pVAX1实验组相比, pVAX1-Apoptin转染组Caspase-3/9活性显著增高 ($P<0.01$)。由于脂质体的细胞毒性, 转染过程可能非特异性的刺激细胞凋亡程序, 因此pVAX1实验组的Caspase-3/9活性可能会高于对照组, 但差异并不显著(图5-6)。

3 讨论

胃癌是常见的恶性肿瘤, 已成为全球瞩目的人类杀手, 每年将导致60万人失去生命, 中日韩胃癌患者已占全球的2/3。1950年代以来我国胃癌发病率上升了109.4%, 死亡率有日益升高的趋势, 每年有15-18万人死于胃癌, 占有恶性肿瘤死亡率的23%, 并且每年新增胃癌患者人数

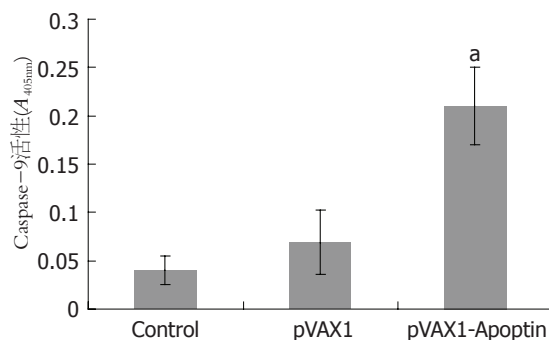


图5 Caspase-9活性检测. $^aP<0.01$ vs control.

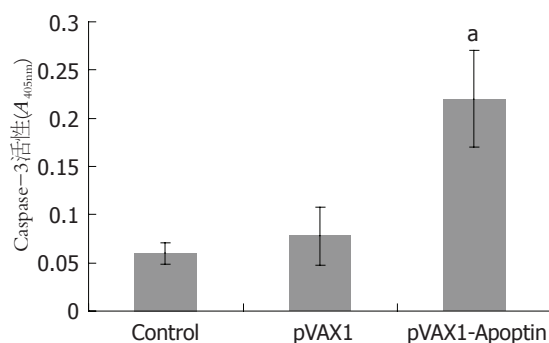


图6 Caspase-3活性检测. $^aP<0.01$ vs control.

在18-20万间。传统手术治疗只能去除恶性肿瘤的原发病灶, 不能杜绝其再生与增殖; 放疗虽能有效杀伤肿瘤细胞, 但往往伴随严重的毒副作用。随着分子生物学和基因工程技术的发展, 特别是治疗性疫苗概念的提出, 为肿瘤的基因治疗提供了新的发展空间。目前, 肿瘤基因治疗药物的应用前景已不仅取决于其杀伤肿瘤细胞的有效性, 而更加侧重于制剂的抑瘤特异性^[14]。Apoptin能够特异性诱导包括肝癌、淋巴瘤、胆管癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌等人类肿瘤发生凋亡, 而对成纤维细胞、角质化细胞、平滑肌细胞等正常没有影响^[15]。Apoptin识别恶性转化细胞的确切机制有待进一步探讨, 但有研究表明Bcl-2家族成员能够促进Apoptin的功能而不是抑制其作用, 说明Apoptin诱导肿瘤细胞凋亡的途径与经典凋亡通路存在差别^[6,16-17]。临床前和临床研究表明, 利用腺病毒表达P53可有效抑制实体肿瘤的生长, 并且P53达到抑瘤剂量时并不对正常细胞构成威胁^[18-21]。然而, 表达外源P53的方法似乎只对P53功能缺陷的肿瘤细胞产生明显作用, 而对P53功能健全的肿瘤细胞没有显著影响^[5]。Apoptin所发挥的凋亡诱导作用不依赖P53功能, 因此使其在肿瘤基因治疗领域具有潜在应用价值。本研究以真

核表达质粒pVAX1为载体, 通过脂质体介导法将Apoptin基因导入人胃癌细胞BGC-823, 探讨了Apoptin基因对BGC-823细胞的抑制作用. 实验结果表明, 虽然脂质体对胃癌细胞BGC-823细胞呈现一定细胞毒性作用, 但24 h后肿瘤细胞便可逐渐恢复旺盛生长, 而Apoptin却可持续发挥作用, 转染72 h后pVAX1-Apoptin实验组肿瘤细胞生存率与pVAX1转染实验组相比显著降低, 说明体外转染真核表达质粒pVAX1-Apoptin能够有效杀伤BGC-823肿瘤细胞. 形态学观察表明, 重组质粒pVAX1-Apoptin主要通过诱导BGC-823细胞发生凋亡发挥其抑瘤作用. 细胞凋亡是机体清除恶性变细胞的一种主动的、程序化的生理过程, 而线粒体功能的变化则是细胞凋亡信号转导过程的关键环节^[22]. 在细胞凋亡过程中, 胞膜、胞质和线粒体等细胞结构中的信号分子被凋亡信号所激活, 通过参与氧化还原反应、能量代谢和Bcl-2家族分子表达的调控等方式激活下游凋亡程序^[23-24]. 线粒体在接受上述信号分子刺激后, 向胞质内释放Cyto c等凋亡信号因子, 最终使细胞发生凋亡^[25]. Cyto c在启动细胞凋亡和维持线粒体氧化还原平衡过程中起重要作用, 在被释放入胞质并与Apaf-1结合后Cyto c能够同Caspase-9形成复合物并使之活化, 继而激活Caspase-3等下游Caspase, 完成凋亡诱导过程^[26-32]. 本研究通过流式细胞术、Western blot和底物显色等方法, 探讨了Apoptin对BGC-823肿瘤细胞 $\Delta\Psi_m$ 、Cyto c和Caspase-3/9等线粒体凋亡途径信号转导关键控制点的影响. 结果显示, 导入Apoptin基因能够下调BGC-823 $\Delta\Psi_m$, 促进线粒体Cyto c向胞质的释放, 激活Caspase-3/9. 结合Apoptin对体外培养BGC-823细胞抑制作用研究结果, 我们认为Apoptin作用于线粒体, 造成ROS和Cyto c的释放, 并依次激活Caspase-9和Caspase-3, 最终通过线粒体凋亡途径诱导BGC-823细胞凋亡, 从而实现对BGC-823细胞的抑制作用.

总之, Apoptin具有不依赖P53的凋亡诱导功能, 不受Bcl-2等凋亡抑制因子限制及无以伦比的特异性等多种其他肿瘤基因治疗策略不具备的优势, 使其具有广泛应用于包括胃癌在内的多种肿瘤治疗研究的潜力.

4 参考文献

- 1 Danen-Van Oorschot AA, Fischer DF, Grimbergen JM, Klein B, Zhuang S, Falkenburg JH, Backendorf C, Quax PH, Van der Eb AJ, Noteborn MH.

- Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5843-5847
- 2 Jeurissen SH, Wagenaar F, Pol JM, van der Eb AJ, Noteborn MH. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cell lines after *in vitro* infection. *J Virol* 1992; 66: 7383-7388
- 3 Rohn JL, Noteborn MH. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes. *Apoptosis* 2004; 9: 315-322
- 4 Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 10-19
- 5 Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, Jochemsen AG, van der Eb AJ, Noteborn MH. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 486-489
- 6 Zhuang SM, Shvarts A, Jochemsen AG, van Oorschot AA, van der Eb AJ, Noteborn MH. Differential sensitivity to Ad5 E1B-21kD and Bcl-2 proteins of apoptin-induced versus p53-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2939-2944
- 7 Danen-Van Oorschot AA, Zhang Y, Erkeland SJ, Fischer DF, van der Eb AJ, Noteborn MH. The effect of Bcl-2 on Apoptin in 'normal' vs transformed human cells. *Leukemia* 1999; 13 Suppl 1: S75-77
- 8 Burek M, Maddika S, Burek CJ, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Los M. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* 2006; 25: 2213-2222
- 9 Danen-Van Oorschot AA, van der Eb AJ, Noteborn MH. BCL-2 stimulates Apoptin-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 245-249
- 10 van der Eb MM, Pietersen AM, Speetjens FM, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Noteborn MH, Hoebe RC. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 53-61
- 11 Olijslagers S, Dege AY, Dinsart C, Voorhoeve M, Rommelaere J, Noteborn MH, Cornelis JJ. Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 958-965
- 12 Pietersen AM, van der Eb MM, Rademaker HJ, van den Wollenberg DJ, Rabelink MJ, Kuppen PJ, van Dierendonck JH, van Ormondt H, Masman D, van de Velde CJ, van der Eb AJ, Hoebe RC, Noteborn MH. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Ther* 1999; 6: 882-892
- 13 Steinwaerder DS, Carlson CA, Lieber A. Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes. *Mol Ther* 2001; 4: 211-216
- 14 Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 187-215
- 15 Oro C, Jans DA. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus. *Curr Drug Targets* 2004; 5: 179-190
- 16 Schoop RA, Kooistra K, Baatenburg De Jong RJ, Noteborn MH. Bcl-xL inhibits p53- but not apoptin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Cancer* 2004; 109: 38-42
- 17 Noteborn MH, Zhang YH, van der Eb AJ. Apoptin

■同行评价

我国胃癌发病率、死亡率有日益升高的趋势, 本研究为肿瘤的基因治疗提供了新的发展空间. 文章设计合理, 结果科学结论较明确, 实验证据较充足, 讨论条理分明, 有较系统的理论分析, 参考文献引用较新, 较好地反映国内外肿瘤基因治疗基础研究的先进水平.

- specifically causes apoptosis in tumor cells and after UV-treatment in untransformed cells from cancer-prone individuals: a review. *Mutat Res* 1998; 400: 447-455
- 18 Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 1996; 10: 1945-1952
- 19 Nielsen LL, Maneval DC. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther* 1998; 5: 52-63
- 20 Zhang WW, Alemany R, Wang J, Koch PE, Ordonez NG, Roth JA. Safety evaluation of Ad5CMV-p53 *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 155-164
- 21 Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996; 2: 985-991
- 22 Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003; 88: 212-218
- 23 Zhou BB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 216-225
- 24 Ozawa T. Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 377-390
- 25 Gilmore KJ, Quinn HE, Wilson MR. Pinocytic loading of cytochrome c into intact cells specifically induces caspase-dependent permeabilization of mitochondria: evidence for a cytochrome c feedback loop. *Cell Death Differ* 2001; 8: 631-639
- 26 Sehra S, Dent AL. Caspase function and the immune system. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 133-148
- 27 Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 308-317
- 28 Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1581-1587
- 29 Chen LH, Hsu CY, Weng CF. Involvement of P53 and Bax/Bad triggering apoptosis in thioacetamide-induced hepatic epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5175-5181
- 30 Pust T, Beuers U. Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3487-3495
- 31 Kouroumalis E, Notas G. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis: a unifying model. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2320-2327
- 32 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2006中国结直肠肛门外科学术会议通知

本刊讯 为了加强与世界同行的交流与接轨, 将我国直肠肛门外科的专利化发展到一个新的台阶, 由“中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组”、“中国抗癌协会大肠癌专业委员会”、“中国中医药学会肛肠分会”和“中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会”共同主办的“2006中国结直肠肛门外科学术会议”将于2006-11-09/12在珠海国际会议中心大酒店举行. 届时结直肠肛门外科的专家、同行将共聚一堂, 规划我国结直肠肛门外科协作研究、共同发展的前景. 大会将邀请国际最著名的美国、欧洲、新加坡、日本、香港及台湾的专家和我国外科界、中医界、肿瘤界以及相关领域的专家就本专业进展作专题报告. 大会同时还采用手术录像、提问、讨论、争鸣、答疑、展板等多种方式进行研究交流. 这将是我国结直肠肛门外科学界的一次盛会. 诚邀普通外科、结直肠肛门外科的专家、同行参会, 参会者可获得中华医学会 I 类继续教育学分. 联系电话: 020-87331428, 87332200-86698

KDR启动子驱动双自杀基因靶向杀伤人胃癌细胞的作用

李强, 黄宗海, 俞金龙, 苏国强, 厉周, 周光军

李强, 黄宗海, 俞金龙, 苏国强, 厉周, 周光军, 南方医科大学珠江医院普外科 广东省广州市 510282

李强, 南方医科大学博士生, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤的临床与基础研究.

国家863计划资助项目, No. 2001AA217171

广东省自然科学基金项目, No. 013072

通讯作者: 黄宗海, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院普外科. drhuangzh@yahoo.com.cn

电话: 020-61643213 传真: 020-61643213

收稿日期: 2006-07-21 接受日期: 2006-09-29

Adenovirus-mediated double suicide gene driven by KDR promoter selectively kills human gastric adenocarcinoma cell line SGC7901

Qiang Li, Zong-Hai Huang, Jin-Long Yu,
Guo-Qiang Su, Zhou Li, Guang-Jun Zhou

Qiang Li, Zong-Hai Huang, Jin-Long Yu, Guo-Qiang Su, Zhou Li, Guang-Jun Zhou, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Supported by the Foundation of National "863" Program, No. 2001AA217171, and the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 013072

Correspondence to: Zong-Hai Huang, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. drhuangzh@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-21 Accepted: 2006-09-29

Abstract

AIM: To study effect of adenovirus (Ad)-mediated fusion gene system driven by KDR promoter on the proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC7901.

METHODS: SGC7901 cells (with KDR expression) and HepG2 cells (without KDR expression) were both transfected with AdEasy-KDR-CDglyTK vector, followed by treatment of the prodrugs 5-fluorocytosine (5-FC) and/or ganciclovir (GCV) at different concentrations. The killing and bystander effects on both kinds of cells were evaluated.

RESULTS: The green fluorescent protein (GFP) was observed in 95% of the infected SGC7901 and HepG2 cells when the multiple of infection

(MOI) was 100. No significant difference was found in the characteristics of growth between the transfected and non-transfected SGC7901 cells ($t = 0.224$, $P = 0.823$). In the same time, there was also no significant difference between the transfected and non-transfected HepG2 cells ($t = 0.120$, $P = 0.904$). The infected cells exhibited different sensitivities to the two kinds of prodrugs: SGC7901 cells infected with Ad were highly sensitive to the prodrugs ($F = 109.43$, $P = 0.000$), while the infected HepG2 cells were not. In addition, the killing effect of CDglyTK fusion gene on the target cells was notably stronger than that of either single suicide gene ($F = 162.22$, $P = 0.000$), and a considerable bystander effect was also observed.

CONCLUSION: CDglyTK fusion gene system driven by KDR promoter can selectively kill SGC7901 cells, and there exists an obvious bystander effect during this process.

Key Words: Human stomach adenocarcinoma; KDR promoter; Suicide gene therapy; Adenovirus; Bystander effect

Li Q, Huang ZH, Yu JL, Su GQ, Li Z, Zhou GJ. Adenovirus-mediated double suicide gene driven by KDR promoter selectively kills human gastric adenocarcinoma cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):2997-3001

摘要

目的: 探讨腺病毒介导KDR启动子驱动的双自杀基因体系对人胃癌细胞SGC7901的靶向杀伤作用.

方法: 应用重组腺病毒AdEasy-KDR-CDglyTK体外感染实验组SGC7901细胞株和对照组HepG2细胞株, 并给予不同浓度的前药GCV(ganciclovir)和/或5-FC(5-fluorocytosine), 观察该体系对SGC7901细胞杀伤效应及其旁观者效应.

结果: 携带双自杀基因和报告基因(GFP)的重组腺病毒载体, 感染复数为100时, 95%以上的受感染SGC7901和HepG2细胞中有GFP表达.

■背景资料

为了提高自杀基因的靶向性, 利用肿瘤细胞特异的启动子来调控目的基因, 从而使目的基因在特定的肿瘤组织中表达. 已有许多实验证明, 胃癌、大肠癌等实体瘤与新生血管形成关系密切, 在肿瘤原发灶及远处转移灶中可检测到高水平表达的血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(KDR), 而正常组织表达甚微或不表达. 基于此, KDR可作为肿瘤生物治疗的理想靶点.

■ 研究前沿

以KDR为启动子调控的CD-TK双自杀基因重组腺病毒载体, 转导自杀基因选择性杀伤胃癌细胞和癌组织周围的血管内皮细胞, 一方面通过KDR为启动子介导双自杀基因选择性杀伤肿瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞, 另一方面通过选择性杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤细胞分裂增殖, 减少VEGF的分泌. 通过二者的协同作用达到抑制肿瘤原发灶生长, 阻断VEGF和KDR的结合, 抑制由VEGF引起的KDR的磷酸化及其后的信号传导通路, 从而抑制肿瘤血管生成, 削减肿瘤发生远处转移.

已转染腺病毒的SCG7901和未转染SCG7901的细胞在细胞生长方面无显著性差异($t = 0.224$, $P = 0.823$). 已转染腺病毒的HepG2细胞和未转染HepG2的细胞在细胞生长方面也无显著性差异($t = 0.120$, $P = 0.904$). 在前药应用下, 已转染腺病毒的SCG7901和HepG2细胞表现出对前药不同的敏感性, SCG7901细胞对前药具有较高的敏感性($F = 109.43$, $P = 0.000$). 融合基因的疗效优于单一自杀基因($F = 162.22$, $P = 0.000$). 将感染腺病毒细胞与未感染细胞以不同比例混和培养, 观察到该体系明显的旁观者效应.

结论: KDR基因启动子可以调控融合基因体系选择性地杀伤人胃癌SCG7901细胞, 并存在旁观者效应.

关键词: 人胃癌细胞; KDR启动子; 自杀基因治疗; 腺病毒; 旁观者效应

李强, 黄宗海, 俞金龙, 苏国强, 厉周, 周光军. KDR启动子驱动双自杀基因靶向杀伤人胃癌细胞的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(31):2997-3001

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2997.asp>

0 引言

胃癌的基因治疗逐渐成为近几年研究热点, 其中自杀基因治疗是一种颇具临床应用潜力的治疗策略. 血管内皮细胞生长因子(VEGF)及其受体(KDR)在肿瘤血管形成过程中起着关键作用, 二者高表达于肿瘤新生血管内皮细胞及恶性程度高的肿瘤细胞^[1-3]. 本研究旨在探讨腺病毒介导以KDR为启动子的CDglyTK双自杀基因系统对胃癌细胞杀伤效应及其旁观者效应, 阐述其在胃癌治疗中的应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 重组腺病毒AdEasy-KDR-CDglyTK为珠江医院普外科构建, 胃癌细胞株SCG7901购自中山大学动物试验中心细胞库, 肝癌细胞株HepG2引自南方医科大学肿瘤研究所, DMEM、小牛血清及TRIzol Reagent试剂盒为Gibco公司产品; 转染试剂PolyFect为QIAGEN公司提供; CD-TK引物序列为: 上游P1: 5'AAGCTTAGGC TAGCAATGTCG3', 下游P2: 5'TTAGTTAGCCT CCCCCATCTC3', 由上海英俊生物有限公司合成; GCV为Roche Pharma(Switzerland)公司产品, 5-FU购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒对SCG7901, HepG2细胞感染率的测定 以 2×10^5 个细胞数接种于6孔培养板, 待细胞丰度达约90%, 加入不同感染复数(MOI)的腺病毒, 继续在37℃, 50 mL/L CO₂孵箱内培养, 3 d后在荧光显微镜下计数GFP阳性细胞百分比.

1.2.2 RT-PCR检测转基因细胞CDglyTK基因转录表达 细胞总RNA的提取按照TRIzol Reagent试剂盒说明进行, 然后按照逆转录试剂盒说明合成cDNA, 应用CDglyTK的上下游引物进行PCR反应, 1%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果并拍照.

1.2.3 KDR启动子融合基因腺病毒对SCG7901细胞生长曲线的影响 取对数生长期已转基因的SCG7901细胞, 制成 4×10^3 /mL的细胞悬液, 接种于96孔板培养细胞, 每板接种6孔. 对照组SCG7901细胞同浓度平行接种6孔. 另设空白孔调零. 应用四甲唑蓝(MTT)法检测, 每天测1板, 实验重复3次.

1.2.4 不同浓度的GCV, 5-FU对胃癌SCG7901/CD-TK细胞的作用 SCG7901细胞以 1×10^4 /孔接种于96孔培养板中, 次日丰度达约80%, 用100 MOI的重组腺病毒感染之. 培养24 h后弃去培养液, 将SCG7901/CD-TK和SCG7901分别加入不同浓度的GCV, 使终浓度分别为20, 40, 60, 80, 100, 200 mg/L, 或加入不同浓度的5-FU使终浓度分别为100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 mg/L. 以不加药的未转染细胞作对照, 每实验组设3个复孔, 培养72 h后MTT法测各孔吸光度(A值), 计算细胞生长抑制率 = $(1 - \text{实验组}A\text{值}/\text{对照组}A\text{值}) \times 100\%$. 半数抑制浓度(IC₅₀, 50% inhibitory concentration) $IC_{50} \text{ (mg/L)} = \text{Log}^{-1}[\text{Xm-I}(\Sigma P-0.5)]$.

1.2.5 不同前药对Ad-KDR-CDglyTK感染的SCG7901细胞和HepG2细胞的作用 在96孔板中以 1×10^4 /孔接种SCG7901细胞和HepG2细胞, 次日丰度达约80%, 用100 MOI的重组腺病毒感染. 培养24 h后, 分别加入GCV 60 g/L, 5-FU 1000 g/L以及联合应用GCV 60 g/L+5-FU 1000 g/L, 每个前药设3个复孔, 并设不加前药的对照孔和只有培养液的空白孔. 培养72 h后, 用MTT方法检测细胞生长抑制率.

1.2.6 旁观者效应 分别取对数的转基因和未转基因细胞, 以不同比例进行混合, 以 1×10^4 个细胞/孔接种于96孔培养板中, 48 h后于不同组分别加入GCV 60 g/L, 5-FU 1000 g/L以及两者的混

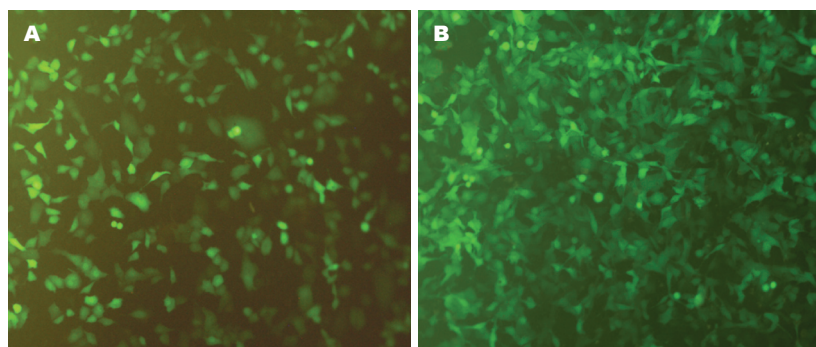


图 1 SCG7901(A × 100)和HepG2(B × 100)细胞感染重组腺病毒后表达绿色荧光蛋白。

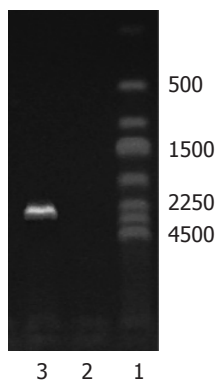


图 2 逆转录-聚合酶链反应检测细胞转染情况。1: Marker 250 bp DNA Ladder; 2: 转染细胞HepG2/CD-TK; 3: 转染细胞SCG7901/CD-TK(2.5 kb阳性条带)。

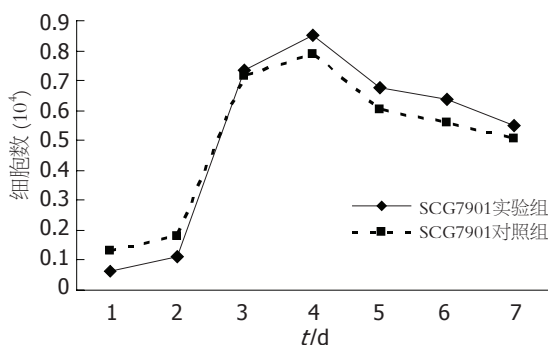


图 3 SCG7901细胞的生长曲线。

合液。72 h以后以MTT法检测细胞的存活率。

统计学处理 应用SPSS 10.0软件进行处理, 采取独立样本 t 检验和单向方差分析(组间多重比较应用S-N-K法)。

2 结果

2.1 重组腺病毒的感染效率和转基因细胞CDglyTK基因表达产物的鉴定 采用不同MOI的重组腺病毒分别感染SCG7901和HepG2细胞, 96 h后观察发现, 细胞的感染率随腺病毒滴度的增加而递增, 当MOI = 1时, 仅少数细胞有荧光; 当MOI = 100时, 95%以上的GFP表达; MOI = 200时, 几乎所有的细胞均被感染。重组腺病毒对两种细胞具有相似的感染效率(图1)。RT-PCR检测结果: 感染Ad-KDR-CdglyTK的

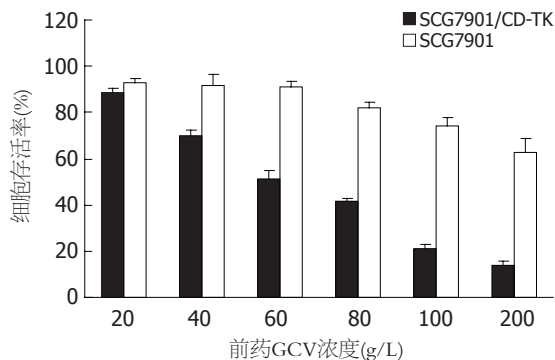


图 4 GCV对SCG7901/CD-TK细胞毒作用。

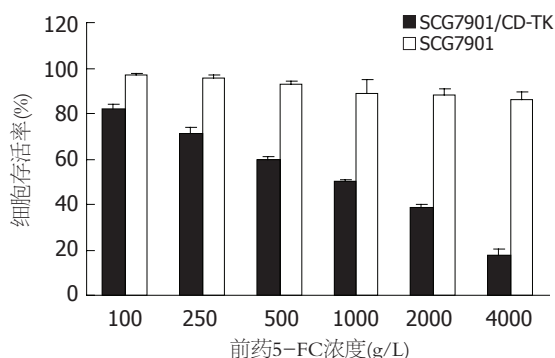


图 5 5-FC对SCG7901/CD-TK细胞毒作用。

SCG7901/CD-TK细胞内可见约2.5 kb阳性条带, 而HepG2/CD-TK细胞内未检测到目的融合基因(CdglyTK)在mRNA水平的表达(图2)。

2.2 重组腺病毒对SCG7901细胞生长曲线的影响 已转基因SCG7901细胞(实验组)和SCG7901细胞(对照组)具有类似的生长状态(图3), 结果显示, 两者无统计学意义($F = 0.048$, $P = 0.823 > 0.05$)。

2.3 不同浓度的前药对SCG7901细胞增殖的影响 由图4-5可见GCV对SCG7901/CD-TK细胞有明显的剂量依赖性细胞毒作用, 根据量效关系计算其半数抑制浓度。IC₅₀为61.89 mg/L, 而GCV对SCG7901细胞IC₅₀为397.8 mg/L, 两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。同样, 5-FC对SCG7901/CD-

■创新盘点

本实验的创新点在于: (1)以胃癌微血管为治疗靶点, 采用KDR为启动子, 靶向杀伤肿瘤血管内皮细胞及肿瘤细胞; (2)该疗法不仅杀伤原发灶肿瘤细胞, 还可抑制肿瘤新生血管形成, 切断瘤体供养, 使原发灶缺血坏死, 并能抑制远处转移灶的形成; (3)可利用自杀基因治疗的“旁观者效应”放大大疗效; (4)利用双自杀基因的协同效应提高疗效并肿瘤的抗药性; (5)采用GFP为报告基因, 检测快速, 方便。

■应用要点

在KDR启动子驱动下, 目的基因可以特异性表达于肿瘤细胞及其血管内皮细胞内。利用KDR启动子对肿瘤新生血管内皮细胞及肿瘤细胞的靶向作用, 驱动CD/5-FC和HSV-TK/GCV两套自杀基因系统特异性杀伤肿瘤细胞及新生血管内皮细胞, 为进一步开展胃癌的靶向治疗研究奠定基础。

■名词解释

1 双自杀基因疗法: 是利用基因工程的技术将两种自杀基因整合在一起, 通过载体转导入肿瘤细胞, 使其在肿瘤细胞内表达融合基因产物, 此产物具有两种自杀基因编码的酶的活性, 然后给予双药物前体治疗, 从而对两类不同的药物前体敏感, 而发挥双功能的杀伤作用。目前双自杀基因多位CD-TK融合基因。

2 自杀基因疗法: 是利用转基因的技术, 将哺乳类动物细胞中的自杀基因转导入肿瘤细胞内, 该基因表达的产物可以将无毒的药物前体转化为有毒的药物, 从而影响肿瘤细胞的遗传物质合成, 引起肿瘤细胞的死亡。

TK细胞的 IC_{50} 为806.48 mg/L, 而对SCG7901细胞生长影响不大。

2.4 不同前药对SCG7901细胞增殖的影响 以 $MOI = 100$ 的重组腺病毒Ad-KDR-CDglyTK感染两种细胞, 加入前药终浓度为: GCV 60 mg/L, 5-FC 1.0 g/L。SCG7901细胞仅有约 $21.5\% \pm 3.15\%$ 存活, 而HepG2细胞存活率仍有 $89.13\% \pm 3.41\%$ ($P < 0.01$)。同时发现, 单用浓度60 mg/L的GCV时, SCG7901细胞的存活率为 $48.46\% \pm 0.75\%$ 。单用浓度为1.0 g/L的5-FC时, 生存率为 $49.50\% \pm 1.87\%$ 。两者联合应用时, 其生存率为 $21.50\% \pm 3.15\%$ ($P < 0.01$, 图6)。

2.6 旁观者效应 将感染腺病毒的细胞与未感染的细胞以不同比例混合培养, 观察到该体系明显的旁观者效应(图7), 当转基因细胞的比率为40%时, SCG7901有11%的存活, 而HepG2细胞的存活率仍在96%, 两者比较均有显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

自Folkman提出肿瘤的生长具有血管形成依赖以来, 对实体瘤的血管形成及其相关微循环的研究及抗肿瘤血管生成已成为当今肿瘤研究的热点之一^[4]。实体肿瘤的生长和转移离不开肿瘤血管的形成, 新生血管一方面提供肿瘤细胞生长所需的氧和养分, 促进肿瘤细胞分裂增殖, 另一方面肿瘤细胞通过新生血管的微循环浸润周围脏器, 发生远处转移。因此以肿瘤血管为靶点, 采用各种途径抑制肿瘤血管的形成, 切断肿瘤的供养, 即能有效抑制肿瘤生长和转移^[5]。已有许多实验证明, 胃癌、大肠癌等实体瘤与新生血管形成关系密切, 在肿瘤原发灶及远处转移灶中可检测到高水平表达的血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(KDR), 因此其在多种肿瘤中分布, 并与肿瘤的恶性转归明显相关, KDR在肿瘤血管及肿瘤组织细胞中均高表达, 且正常组织表达甚微或不表达。因此构建了KDR启动子驱动的双自杀基因体系, 既保证了目的基因转染的靶向性, 又达到针对肿瘤细胞及其血管内皮细胞双重靶向的目的。

为探讨KDR启动子驱动的双自杀基因体系特异性的杀伤作用, 将含目的基因的腺病毒感染表达KDR的胃癌细胞SCG7901和不表达KDR的HepG2, 并分别给以不同浓度的前药5-FC和GCV, 结果发现, 感染Ad-KDR-CDglyTK的细胞株细胞生存率存在差异: 感染Ad-KDR-

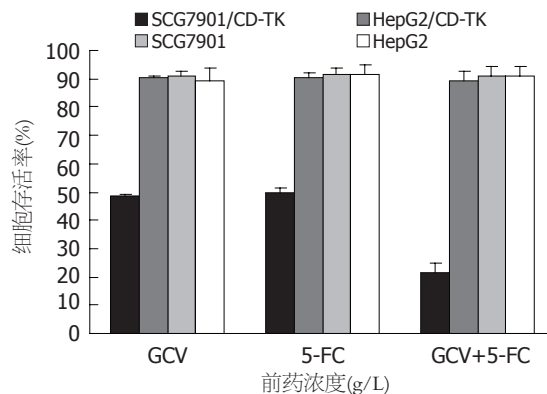


图6 不同疗法对转基因细胞的作用。

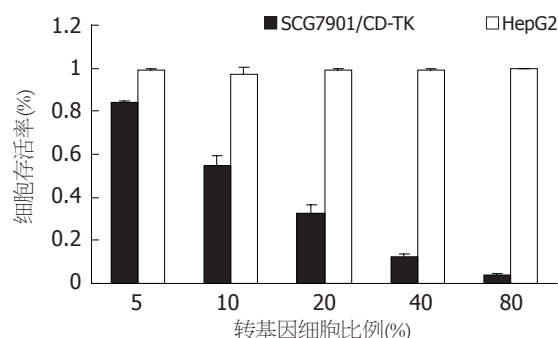


图7 Ad-KDR-CDglyTK体系对细胞杀伤的旁观者效应。

CDglyTK的细胞株SCG7901随前药浓度的增加其生存率递减, 而不表达KDR的细胞HepG2生存率则几乎不受影响。这充分表明KDR基因启动子调控的自杀基因体系的细胞特异性。

本系统应用的CD/5-FC和TK/GCV是目前研究最为深入的两种自杀基因系统, 他们确切的肿瘤杀伤作用已得到证实^[6-7]。尽管如此, 单自杀基因治疗仍存在细胞及组织特异性单一和易产生治疗的耐药性, 因此, 利用各体系不同的作用机制及对各组织不同的敏感性, 本实验构建了CDglyTK融合基因, 通过二者的互补大大提高疗效, 克服自杀基因疗法的肿瘤细胞类型依赖性和最大限度减少肿瘤细胞耐药性。研究进一步证实, 相同浓度的两种前药优于任一单前药的疗效。

目前, 关于旁观者效应机制的研究主要是单自杀基因系统, 其机制涉及到细胞凋亡、缝隙连接、细胞介质等有关学说。有关双自杀基因体系的报告不多。本实验应用KDR启动子驱动双自杀基因靶向杀伤人胃癌细胞的研究, 观察到其对胃癌细胞靶向杀伤的旁观者效应, 该作用特点正好可以弥补体内转基因不足的缺点, 以保证该基因治疗的效果。

可见, 本研究构建的重组腺病毒可高效感染目的细胞, 并且其双自杀基因体系对人胃癌细胞有杀伤作用并存在旁观者效应, CDglyTK基因的应用避免了单自杀基因的不足, KDR基因启动子的引入保证了该治疗的靶向性. 因此, 本实验为双自杀基因靶向治疗胃癌的进一步研究提供了实验依据, 其旁观者效应的机制有待进一步探讨.

4 参考文献

- 1 Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, Weinerman A, Emmenegger U, Ma L, Thorpe P, Davidoff A, Huber J, Hicklin DJ, Kerbel RS. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2004; 64: 6616-6625
- 2 Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, Hilbig A, Wild C, Clauss M, Plate KH, Breier G. Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF receptor-1 mutants. *Int J Cancer* 2004; 111: 348-357
- 3 Schmitz V, Kornek M, Hilbert T, Dzienisowicz C, Raskopf E, Rabe C, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Treatment of metastatic colorectal carcinomas by systemic inhibition of vascular endothelial growth factor signaling in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4332-4336
- 4 Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2003; 63: 812-816
- 5 Knowles HJ, Tian YM, Mole DR, Harris AL. Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res* 2004; 95: 162-169
- 6 Boucher PD, Im MM, Freytag SO, Shewach DS. A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 3230-3237
- 7 Wu DH, Liu L, Chen LH. Antitumor effects and radiosensitization of cytosine deaminase and thymidine kinase fusion suicide gene on colorectal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3051-3055

■同行评价

本文结果显示, 感染Ad-KDR-cdglyTK的SCG7901细胞随前药浓度的增加而生存率明显下降, 而不表达KDR的对照组细胞则无明显变化, 说明KDR基因启动子可调控融合基因体系靶向性地杀伤胃癌SCG7901细胞, 并存在旁观者效应. 本文内容较新, 研究课题重要, 对胃癌的基因治疗提供了有意义的信息, 科学性、创造性与可读性均较好.

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●

第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知

本刊讯 由泰国Chulalongkorn医院承办的第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议将于2006-11-12/14在泰国曼谷举行, 欢迎各国研究幽门螺旋杆菌的学者报名参加.

1 地址

General Secretariat, GI Unit, Department of Medicine, 1873 Prompun Building 1st Floor. Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330 Thailand

2 联系方式

电话: +662-256-4265; 传真: +662-253-8272, +662-652-4219; Email: wphc_2006@mail.com; 网址: www.6wphc2006.com; 联系人: Dr. Duangporn Thong-Ngam

外源质粒DNA对小鼠肠道基因表达谱的影响

刘建文, 乐国伟, 施用晖

■背景资料

人和动物每天都要进食大量的食物, 因此外源DNA首先最有可能接触的是胃肠道。外源质粒DNA进入肠道后可激活肠黏膜免疫细胞, 诱导肠黏膜免疫应答, 引起肠道生理功能发生相应的变化等。我们采用基因芯片来考察外源质粒DNA对肠道基因表达谱的影响, 在基因水平上研究外源质粒DNA的胃肠道代谢及对肠道的作用机制。

刘建文, 乐国伟, 施用晖, 教育部食品科学与安全重点实验室 江南大学食品营养与安全研究所 江苏省无锡市 214036
刘建文, 分子营养学博士, 主要从事分子营养与代谢调控研究, 现任希杰(中国)有限公司技术总监。

国家自然科学基金资助项目, No. 30270970

通讯作者: 刘建文, 200336, 上海虹桥开发区兴义路8号万都中心610室. ljw_ftpt@yahoo.com.cn

电话: 021-52082925 传真: 021-52080290

收稿日期: 2005-03-22 接受日期: 2005-10-09

Effect of foreign plasmid DNA on gene expression profile of the intestine in mice

Jian-Wen Liu, Guo-Wei Le, Yong-Hui Shi

Jian-Wen Liu, Guo-Wei Le, Yong-Hui Shi, the Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Institute of Food Nutrition and Safety, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30270970

Correspondence to: Dr. Jian-Wen Liu, Room 610, Maxdo Centre, 8 Xingyi Road, Hongqiao Development Zone, Shanghai 200336, China. ljw_ftpt@yahoo.com.cn

Received: 2005-03-22 Accepted: 2005-10-09

Abstract

AIM: To explore the influence of foreign plasmid DNA on the intestinal gene expression profile after absorption via the gastrointestinal tract in mice.

METHODS: Balb/c mice were orally administered with 200 µg plasmid pcDNA3 and a length of jejunum was isolated 4 h after oral administration. The total RNA was extracted from the intestine and the gene expression profile of Balb/c mice was analyzed using oligonucleotide array after oral administration of plasmid pcDNA3.

RESULTS: Among 17667 genes obtained from gene expression profile analysis, there were 61 genes differentially expressed from those in GenBank, of which 36 genes were up-regulated and 25 ones were down-regulated after oral administration of foreign plasmid DNA. The differentially expressed genes were mainly related to immune response, anti-oxidation, detoxification function, lipid metabolism, anion transport

protein, apoptosis and signal transduction.

CONCLUSION: Foreign plasmid DNA, administered via the gastrointestinal tract, may widely modulate the expression of many genes in the intestine in mice.

Key Words: Foreign plasmid DNA; Intestine; Gene expression; Oligonucleotide arrays

Liu JW, Le GW, Shi YH. Effect of foreign plasmid DNA on gene expression profile of the intestine in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3002-3007

摘要

目的: 研究外源质粒通过胃肠道途径吸收对小鼠肠道基因表达谱的影响。

方法: 给Balb/c小鼠灌胃质粒pcDNA3 200 µg, 在灌胃后4 h后分离空肠一段, 提取肠组织的总RNA。利用寡核苷酸芯片对灌胃质粒pcDNA3后的Balb/c小鼠肠道进行基因表达谱研究。

结果: 灌胃外源质粒DNA后, 所检测的17667基因中有61条基因产生差异表达, 其中36条基因表达上调, 25条基因表达下调。这些差异表达的基因主要涉及免疫应答、抗氧化及解毒功能、脂质代谢、阴离子转运蛋白、细胞凋亡及信号转导等过程。

结论: 外源质粒DNA通过胃肠道途径可广泛调控肠道多种基因表达。

关键词: 外源质粒DNA; 肠道; 基因表达; 寡核苷酸芯片

刘建文, 乐国伟, 施用晖. 外源质粒DNA对小鼠肠道基因表达谱的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(31):3002-3007
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3002.asp>

0 引言

哺乳动物胃肠道是外源DNA进入机体的主要器官^[1-3], 质粒DNA进入肠道后能够逐渐被肠道核酸酶降解成碎片形式^[4-7]。外源质粒DNA进入肠

道后可能与细菌一样, 与肠道黏膜细胞存在着一种互作关系. 肠道是机体最大的免疫器官, 集中了体内大部分淋巴细胞, 外源质粒DNA可激活肠黏膜免疫细胞, 诱导肠黏膜免疫应答^[8-10]. 外源质粒DNA可能进入细胞核内, 插入到哺乳动物基因组中, 引起基因组的缺失和重排, 宿主基因组会以改变DNA甲基化模式来抵抗外源质粒DNA的入侵^[11-18]. 外源质粒DNA进入肠道后, 势必会引起肠道生理功能发生相应的变化, 生理功能本质上受基因的表达调控. 我们采用基因芯片在mRNA水平上来考察外源质粒DNA对肠道基因表达谱的影响, 为进一步研究外源质粒DNA的胃肠道代谢及作用机制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 T₇-Oligo(dT)₁₅(上海博亚生物技术有限公司), Superscript II (Invitrogen), DNA Polymerase(Invitrogen), T4 DNA polymerase(Invitrogen), RNeasy Mini Kit(Qiagen), Random Primer DNA Labeling Kit (TaKaRa,), T₇ RiboMAX Express Large Scale RNA Production System(Promega), 小鼠Oligo芯片(Qiagen). 6周龄Balbc/C ♂ 小鼠(购自中科院上海实验动物中心)6只, 随机分成2组, 一组为实验对照组, 灌胃200 μ L生理盐水, 另一组给小鼠灌胃1 g/L质粒pcDNA3生理盐水溶液200 μ L, 灌胃后4 h, 眼球采血宰杀小鼠, 在超净台上迅速分离空肠一段, 同组3只小鼠的小肠合并在一起, 置于RNAlater中, 于4℃过夜, -20℃保存.

1.2 方法 TRIzol试剂盒提取小鼠肠道总RNA, 电泳及分光光度计测A260/A280以鉴定总RNA质量. RNA定量, 反转录合成双链cDNA并进行纯化. 用T₇ RiboMAX Express Large Scale RNA Production System(Promega)将双链cDNA进行体外转录合成cRNA. cRNA再次反转录成cDNA, Cy5-dCTP标记实验组cDNA, Cy3-dCTP标记实验组cDNA. 标记的DNA与芯片进行杂交洗涤, 并进行扫描.

统计学分析 采用GenePix Pro 4.0图像分析软件(Axon Instruments公司)对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号; 最后以差异为两倍(Cy5/Cy3)的标准来确定差异表达基因, 其中Cy5/Cy3 \geq 2表示表达显著上调, Cy5/Cy3 \leq 0.5表示表达显著下调.

2 结果

小肠组织芯片杂交, 结果显示在17667条基因

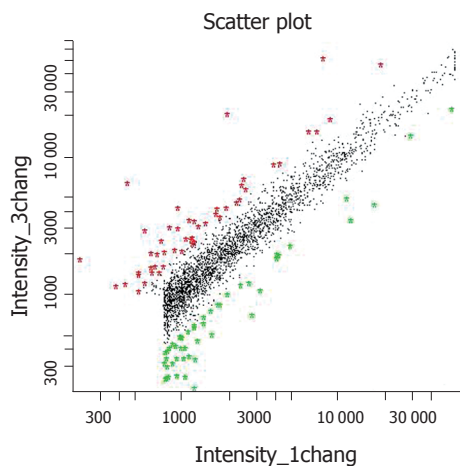


图1 基因芯片杂交信号散点图.

中, 共有4196条基因表达, 其中明显差异表达的基因有61条(图1), 表达上调36条(表1), 表达下调25条(表2). 这些差异表达的基因主要涉及免疫应答、肠道抗氧化及解毒功能、脂质代谢、离子转运蛋白、细胞凋亡及信号转导等过程.

3 讨论

随着人类基因组计划进入后基因组时代, 研究重点也将由基因的发现转向基因的功能. 我们发现肠道中受外源质粒pcDNA3调控的基因有61条, 这些基因中功能较为明确的包括与免疫应答、肠道抗氧化及解毒、脂质代谢、离子转运、细胞凋亡和信号转导等相关基因, 以下就外源质粒pcDNA3调控这些基因的意义进行简要讨论. 许多与免疫应答基因表达发生变化, 其中表达上调的有胰腺炎蛋白(PAP)、淋巴细胞抗原6复合物(Ly6A, Ly6F)、干扰素刺激蛋白(G1P2)、干扰素 γ 诱导因子结合蛋白(IL18bp)、干扰素诱导蛋白3(IFIT3)、黏蛋白(Mucin 3). 表达下调的有肥大细胞蛋白酶(Mast cell protease, pseudogene 1)、免疫球蛋白基因(CD79B)、主要组织相容性抗原基因(H2-EB1)、热休克蛋白86、簇集蛋白、Regenerating islet-derived 3 gamma(Reg3g).

我们发现外源质粒DNA可上调微粒体谷胱甘肽硫转移酶(mGST)、谷胱甘肽过氧化物酶和金属硫蛋白2(MT)的表达. MT是富含半胱氨酸的小分子蛋白, 有使细胞免受氧化损伤的作用. 谷胱甘肽硫转移酶是生物体内的主要解毒系统^[19], 与许多生理及异源物质的排泄有关. 还原型谷胱甘肽(GSH)是mGST主要作用底物. GSH与各种亲脂性和亲电子底物的第二相结合反应, 包括药物, 化疗剂, 致癌物, 致突变物, 氧

■ 研发前沿

生物技术的发展为人类健康与农业生产发展提供了新的契机, 将质粒DNA注入体内达到基因治疗或免疫、代谢调控目的是1990年代才开始的一种新技术, 显示出良好的前景. 同时随着转基因作物、食品的增加, 外源质粒DNA的胃肠道吸收、作用及其基因转移对人类与动物健康可能产生的影响, 也值得研究者的关注.

■应用要点

外源质粒DNA引起肠道差异表达的基因主要涉及免疫应答、抗氧化及解毒功能、脂质代谢、阴离子转运蛋白、细胞凋亡及信号转导等过程。肠道作为抵御外源质粒的第一道防线,肠道基因表达的变化反映了肠道对外源质粒吸收所产生的宿主应答,肠道基因表达的变化也初步反映外源质粒DNA在肠道的吸收机制。

表 1 质粒灌胃后4h肠道中表达上调的基因

GenBank accession	Cy5/Cy3	Symbol	基因名称
NM_023138	2.0063	MAP2K2	丝裂原激活蛋白激酶2
NM_013867	2.0245	BCAR3	Breast cancer anti-estrogen resistance 3
NM_030238	2.0286	DNCHC1	Dynein, cytoplasmic, heavy chain 1动力蛋白
BC006631	2.0361	AL022610	EST AA764025
U70139	2.0372	CCRN4L	Carbon catabolite repression 4 homolog (S. cerevisiae)
NM_010738	2.0667	LY6A	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A淋巴细胞抗原, Ly 抗原
NM_030677	2.0834	GPX2	Glutathione peroxidase 2 谷胱甘肽过氧化物酶 2
NM_019946	2.1065	MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1微粒体谷胱甘肽S转移酶
NM_008530	2.1192	LY6F	Lymphocyte antigen 6 complex, locus F 淋巴细胞抗原, Ly 抗原
NM_010286	2.1292	DSIP1	糖皮质激素诱导的氨基酸链
NM_011068	2.1709	PEX11A	过氧化物酶体生物发生因子11a
NM_015783	2.1765	G1P2	Interferon-stimulated protein (15 kDa) 干扰素刺激蛋白
AK005036	2.2043	1300017K07RIK	RIKEN cDNA 1300017K07 gene
AF110802	2.2327	IL18BP	Interferon gamma inducing factor binding protein 干扰素 γ 诱导因子结合蛋白
NM_008638	2.3244	MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase(NAD+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase 亚甲基四氢叶酸脱氢酶, 次甲基四氢叶酸环水解酶
NM_019810	2.3264	SLC5A1	Solute carrier family 5, member 1 溶质载体家族
NM_011150	2.3762	LGALS3BP	Peptidylprolyl isomerase C-associated protein 肽基脯氨酸异构酶C伴随蛋白
NM_007885	2.4262	SLC26A2	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 溶质载体家族
AY008277	2.4573	CLCA4	Mus musculus calcium-activated chloride channel CLCA4 mRNA, complete cds
NM_021394	2.5322	ZBP1	Tumor stroma and activated macrophage protein DLM-1 肿瘤间质巨噬细胞蛋白
NM_022331	2.7000	HERPUD1	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
NM_007672	2.7677	CDR2	Cerebellar degeneration-related 2 小脑退化基因
NM_010501	2.9068	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 干扰素诱导蛋白
BC013478	3.0711	SLC30A2	Mus musculus, clone IMAGE: 4239648, mRNA
NM_011036	3.1659	PAP	Pancreatitis-associated protein胰腺炎相关蛋白
BC005552	3.3969	ASNS	Asparagine synthetase天冬酰胺合成酶
AK002567	3.4149	MT2	Metallothionein 2金属硫蛋白2
NM_011260	4.2078	REG3G	Regenerating islet-derived 3 gamma 再生基因
AF027131	4.5115	MUC3	Mucin 3, intestinal黏蛋白
BC007173	4.5371	TPP2	Mus musculus, clone IMAGE:3493127, mRNA, partial cds
NM_007769	4.6993	DMBT1	Crp-ductin 候选肿瘤抑制基因
NM_007679	4.7027	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta CCAT增强子结合蛋白
NM_022411	5.3687	SLC13A2	Solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2 溶质载体家族
NM_011470	6.2025	SPRR2D	Small proline-rich protein 2D 小脯氨酸富含蛋白
AK019097	11.7085	2310057M21RIK	RIKEN cDNA 2310057M21 gene
AK016647	20.4069	SLCO6C1	RIKEN cDNA 4933404A18 gene

化应激引起脂质过氧化损伤以及其他异生质(xenobiotic)产生的各种毒性代谢产物在微粒体上是由mGST催化解毒^[20-22]。谷胱甘肽过氧化物酶在清除细胞内过氧化物、保护细胞免受过氧化损伤过程中起重要作用。谷胱甘肽过氧化物酶活性的强弱,直接反映机体清除自由基的能力^[23-24]。Ames(1981)^[25]认为核酸及相关物质均可作为内源自由基清除剂和抗氧化剂,具有VC作用,由于其还原性大于VC,还能避免VC氧化。嘌呤的代谢产物尿酸是体内一些有害活性物质的有效清除剂,其清除内源自由基和抗氧化的能力

最强,在生理浓度和各种pH条件下,具有保护红细胞膜脂质过氧化及由过氧化损伤造成的红细胞破裂作用。饮水中添加DNA能提高老年小鼠血中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,口服核糖核苷酸能够降低体内脂质过氧化物的含量。外源质粒DNA在肠道中具有抗氧化酶活性,实际上就是有清除机体内自由基的效果。环境和食物成分在肠道中主要通过氧化和结合作用(conjugation)进行脱毒^[26],因此认为外源质粒在肠道中能够增强宿主代谢异生质(xenobiotic)和内源毒素的能力。

我们发现肠道中与脂质代谢相关的基因表

表 2 质粒灌胃后4 h肠道中表达下调的基因

GenBank accession	Cy5/Cy3	Symbol	基因名称
X78543	0.0829	MCPT-PS1	肥大细胞蛋白酶
NM_008339	0.1468	CD79B	免疫球蛋白基因
AK008016	0.1705	2010001M09RIK	RIKEN cDNA 2010001M09 gene
NM_009696	0.2125	APOE	Apolipoprotein E载脂蛋白E
NM_011402	0.2243	SLC34A2	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2溶质载体家族
NM_013492	0.2466	CLU	Clusterin簇集蛋白
NM_007398	0.2932	ADA	Adenosine deaminase 腺苷脱氨酶
NM_010382	0.2964	H2-EB1	Histocompatibility 2, class II antigen E beta主要组织相容性抗原基因II
NM_007489	0.3206	ARNTL	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like芳烃受体核移位因子
NM_009042	0.3611	REG1	Regenerating islet-derived 1 再生基因
BC021548	0.3644	0610039P13RIK	RIKEN cDNA 0610039P13 gene
AY030094	0.3734	4932416A11RIK	Mus musculus von Willebrand factor A-related protein (Warp) mRNA, complete cds
NM_011468	0.3760	SPRR2A	富含脯氨酸小蛋白
AK004658	0.3900	HSPCA	热休克蛋白86
BC007144	0.4201	PSCDBP	Expressed sequence C80816
NM_021520	0.4247	SLC28A2	溶质载体家族28
NM_019411	0.4250	PPP2CA	蛋白磷酸酯酶
BC011492	0.4303	9130020G10RIK	RIKEN cDNA 9130020G10 gene
M28739	0.4349	TUBB2	Tubulin, beta 2 微管蛋白
NM_009825	0.4648	SERPINH1	热休克蛋白47
NM_130450	0.4711	ELOVL6	Expressed sequence C77826
NM_009810	0.4712	CASP3	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease
NM_009984	0.4725	CTSL	组织蛋白酶
NM_023114	0.4757	APOC3	Apolipoprotein CIII 载脂蛋白C III

■名词解释

1 谷胱甘肽硫转移酶(mGST): 是一类具有多种生理功能的同功酶, 他不仅是生物体内一种重要的II相解毒酶, 而且具有抗氧化损伤作用。

2 丝裂原激活蛋白激酶(MAP2K2): 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。研究证实, MAPKs信号转导通路存在于大多数细胞内, 在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。

达受到抑制, 包括载脂蛋白E、载脂蛋白C III和簇集蛋白, 说明外源质粒DNA影响肠道脂蛋白的吸收。簇集蛋白与HDL颗粒结合使细胞胆固醇外流, 起脂质运输作用, 并参与局部组织环境脂质平衡, 去除细胞凋亡及损伤时过多的脂质。ApoE主要存在于乳糜微粒和极低密度脂蛋白以及他们的残基和某些HDL亚型中, 作为脂蛋白的配体发挥作用, 通过受体介导途径参与机体脂质代谢的调节^[27]。ApoE的生成与细胞内游离胆固醇含量相关, ApoE对巨噬细胞对脂质的聚集和动脉粥样硬化形成有关, 因此, 有人发现CpG可影响泡沫细胞和动脉粥样硬化的形成^[28]。

我们发现外源DNA可影响一些肠道阴离子转运蛋白的表达。其中表达上调的有Solute carrier family 5, member 1、Solute carrier family 26、Solute carrier family 13; 表达下调的有Solute carrier family 34、Solute carrier family 28。质粒pcDNA3是一种带有负电荷的阴离子, 推测可能Solute carrier family作为外源质粒DNA在肠道中的转运蛋白介导质粒DNA的吸收。这些阴离子转运蛋白在机体代谢中也发挥重要的作用。如Solute carrier family 13(SLC13A2)是一种钠依赖二羧酸协同转运蛋白, 是一类介导琥珀酸、枸橼

酸及α酮戊二酸等三羧酸循环中间产物转运的有机阴离子转运蛋白。在正常肾脏、脑、肝脏及小肠等组织均有较高表达。SLC13A2可为肾脏细胞提供能量代谢的底物、参与氨基酸及神经递质的合成, 并可能参与机体酸碱平衡的调节, 与肾结石的形成和衰老有关。

实验发现Caspase 3表达下调。Caspases是一种与细胞凋亡关系极为密切的一组蛋白酶。目前认为Caspases是细胞凋亡的执行者。正常情况下他是以无活性的酶原形式存在。在某些凋亡启动诱导因素的作用下, 在一定基因的调节下借助于细胞膜上的某些受体蛋白质使凋亡的信号传递至Caspases, 并使其层层激活-“瀑布式”激活。当Caspase3活化后可直接切割并激活DNA断裂因子(一种45 kDa蛋白值)引起DNA降解。由于Caspase3能活化一种碱性核酶, 后者能在DNA上识别一定序列并使其断裂, 致使琼脂糖凝胶电泳时呈现梯形条带。Daniel Rachmilewicz(2002)^[29]发现免疫刺激DNA序列可降低DSS诱导的结肠组织Caspase 3活性, 原因是ISS-ODN能够活化NF-κB, 诱导Bcl-xl基因的转录, 这些因素促成ISS-ODN活化DNA-PK, 从而在黏膜位点抑制细胞的凋亡。本实验发现

■同行评价

近几年,随着生物技术的高速发展,转基因食品越来越多,其安全性问题始终是全球人们关注的问题.因此本项目的立题不仅内有重要的应用意义,并且具有较好的新颖性.本论文采用基因芯片技术研究外源质粒DNA在肠道中的吸收机制及对肠道生理功能的影响,方法先进,技术路线合理,是一篇优秀的论文.

Caspase3基因表达下调,说明外源质粒DNA可抑制肠黏膜细胞凋亡.

我们发现丝裂原激活蛋白激酶基因(MAP2K2)发生上调,说明外源质粒DNA可能通过MAPK途径激活肠黏膜细胞.丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)是细胞内一类重要的信号分子. MAPK的激活由MAPKK(又名Mek)完成,不同的Mek激活不同的MAPK,而Mek的激活需在其Ser残基上磷酸化,即需要MAPKKK催化激活. MAP2KKK、MeK、MAPK 这一酶促级联反应系统构成哺乳动物多种信号传导途径中的共同通路,介导了细胞生长、发育、分裂、死亡等多种生理反应过程.除激活NF- κ B外, CpG DNA还可激活不同的MAPK通路.迄今,通过CpG DNA刺激不同的免疫细胞,已发现有3个MAPK超家族成员发生磷酸化:细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)、c-jun氨基末端激酶(JNK)和p38. MAP2K2催化MAPK激酶上的苏氨酸和酪氨酸残基,使其磷酸化,催化ERK1和ERK2激酶. MAPK的活化能将细胞生长因子等丝裂原信号传递到细胞核内诱导大多数真核细胞增生分化.现在已经确定哺乳动物细胞中MAPKs途径大致分为4种: ERK1/2途径、ERK5途径、JNK途径、p38途径.细胞外信号调节激酶(ERK1/2)为分裂原激活的MAPK通路,主要介导细胞增生和分化的信号转导^[30].因此说明外源质粒DNA通过ERK途径激活肠道免疫细胞.

总之,本研究利用基因芯片技术发现灌胃质粒DNA 4 h后,大量与免疫应答的基因表达发生变化,说明外源质粒DNA进入胃肠道后首先引起肠道黏膜免疫应答,质粒DNA的免疫刺激性主要归因于非甲基化的CpG序列,同时肠道的一些生理功能也发生相应的变化,包括抗氧化、解毒功能、脂质代谢、离子转运、细胞凋亡及细胞转导等.本研究为深入全面地探讨外源质粒DNA胃肠道吸收和作用机制提供了许多有价值的研究线索,在此基础上对这些差异表达基因展开研究,可望对外源质粒DNA胃肠道代谢机制有更深入的了解.

4 参考文献

- Doerfler W. Foreign DNA in mammalian systems. New York: Wiley-VCH, 2000
- Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubbert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev Biol (Basel)*

2001; 106: 89-97; discussion 143-160

- Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hosel M, Renz D, Auerochs S, Brondke H, Doerfler W. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 2003; 270: 201-215
- Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 961-966
- 刘建文,施用晖,乐国伟. 外源质粒DNA经小鼠肠道的吸收代谢动力学. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1108-1113
- Schubbert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* 1998; 259: 569-576
- Hohlweg U, Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* 2001; 265: 225-233
- Watson JL, McKay DM. The immunophysiological impact of bacterial CpG DNA on the gut. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 1-11
- 刘建文,施用晖,乐国伟. 外源质粒DNA经胃肠道途径对小鼠免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2614-2617
- 刘建文,乐国伟,施用晖. 外源质粒DNA经胃肠道途径对小鼠免疫基因的调控作用. *细胞与分子免疫学杂志* 2005; 21: 548-552
- Remus R, Kammer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol* 1999; 73: 1010-1022
- Doerfler W, Hohlweg U, Muller K, Remus R, Heller H, Hertz J. Foreign DNA integration-perturbations of the genome-oncogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 276-288
- Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem* 2001; 276: 14271-14278
- Beever DE, Kemp CF. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutri Abstr Rev* 2000; 70: 175-182
- Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Schock HB, Zhang H, Faris JE, Way PA, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)* 2000; 104: 33-43
- Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 2000; 43: 258-272
- Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, Griffiths TG 2nd, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Pacchione SJ, Wang Z, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid

- DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 2000; 43: 273-281
- 18 Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Ciliberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 2004; 11: 711-721
- 19 庞战军, 陈媛, 周玫. 谷胱甘肽硫转移酶基因表达的调控. *生物化学与生物物理进展* 1997; 24: 401
- 20 Andersson C, Mosialou E, Weinander R, Morgenstern R. Enzymology of microsomal glutathione S-transferase. *Adv Pharmacol* 1994; 27: 19-35
- 21 Peng RX, Wang H, Wang YS, Fu LS, Ding H. Glutathione-related enzyme activities in human fetal adrenal, liver, and kidney. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1998; 19: 167-171
- 22 Jakobsson PJ, Mancini JA, Riendeau D, Ford-Hutchinson AW. Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *J Biol Chem* 1997; 272: 22934-22939
- 23 Morbitzer M, Herget T. Expression of gastrointestinal glutathione peroxidase is inversely correlated to the presence of hepatitis C virus subgenomic RNA in human liver cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 8831-8841
- 24 Kasperczyk S, Kasperczyk A, Ostalowska A, Dziwisz M, Birkner E. Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol Trace Elem Res* 2004; 102: 61-72
- 25 Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6858-6862
- 26 Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-884
- 27 Ishibashi S, Yamada N, Shimano H, Mori N, Mokuno H, Gotohda T, Kawakami M, Murase T, Takaku F. Apolipoprotein E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 1990; 265: 3040-3047
- 28 胡振林, 万斌, 周凤娟, 王静, 王庆敏, 孙树汉. CpG-寡核苷酸对免疫细胞基因表达的影响. *第二军医大学学报* 2003; 24: 1086-1089
- 29 Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, Hayashi T, Leider-Trejo L, Lee J, Leoni LM, Raz E. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1428-1441
- 30 Lee KH, Hyun MS, Kim JR. Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction in uPA synthesis. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 499-505

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 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降

崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛

■背景资料

暴发性肝衰竭时存在肠黏膜屏障的损伤, 其机制尚不清楚。肠上皮细胞间具有完整的紧密连接, 是肠黏膜屏障最重要的物质基础。那么暴发性肝衰竭时肠黏膜屏障的损伤是否是由于紧密连接的破坏而造成的呢? 本文就这一问题研究了暴发性肝衰竭时肠上皮紧密连接中最重要的结构蛋白occludin表达的变化。

崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛, 中国医科大学附属盛京医院感染科辽宁省沈阳市 110004

崔巍, 讲师, 中国医科大学附属盛京医院感染科博士在读, 主要从事肝脏病的临床和科研工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30670947

通讯作者: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. sylupei2003@yahoo.com.cn
电话: 024-83956962 传真: 024-83956451

收稿日期: 2006-08-21 接受日期: 2006-09-12

Down-regulated expression of intestinal epithelial tight junction protein occludin in mice with fulminant hepatic failure

Wei Cui, Li Ma, Ying Wen, Pei Liu

Wei Cui, Li Ma, Ying Wen, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30670947

Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn

Received: 2006-08-21 Accepted: 2006-09-12

Abstract

AIM: To observe the changes of intestinal epithelial tight junction protein occludin in mice with fulminant hepatic failure (FHF), and explore the mechanisms of spontaneous bacterial peritonitis (SBP).

METHODS: A total of 150 male BALB/c mice were divided into group A, B, C and D. The mice in group D were intraperitoneally injected with lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/kg) and D-galactosamine (GalN, 800 mg/kg) to induce the model of FHF, while the mice in group A, B and C were intraperitoneally injected normal saline, LPS, and GalN, respectively. At the end of the 2nd, 6th, and 9th h, the mice were killed for the collection of liver and intestinal specimens. Immunohistochemistry, Western blot and quan-

titative real time polymerase chain reaction (QRT-PCR) were used to detect the distribution and expression of intestinal epithelial tight junction protein occludin.

RESULTS: Tight junction protein occludin was localized along the apical region of the lateral plasma membrane representing the region of tight junctions in surface and crypt epithelial cells. In mucosal tissues from mice with FHF 6 and 9 h after injection, occludin-positive staining was gradually weakened. Western blot demonstrated consistent and significant reduction of occludin expression in mice with FHF at the 6th (0.48 ± 0.07) and 9th h (0.36 ± 0.05) ($P < 0.05$), which was significantly lower than that in group A (0.71 ± 0.09) ($P < 0.05$). Furthermore, the expression of occludin mRNA was decreased starting from the 2nd h (0.85 ± 0.12), and reached the lowest level at 6th h (0.72 ± 0.04), significantly lower than that in group A. At the 9th h, occludin mRNA expression almost restored (0.93 ± 0.10) to the normal level.

CONCLUSION: The expression of tight junction protein occludin is decreased at both protein and mRNA level in intestinal epithelial cells of mice with FHF.

Key Words: Mice; Fulminant hepatic failure; Intestinal barrier; Tight junction protein; occludin

Cui W, Ma L, Wen Y, Liu P. Down-regulated expression of intestinal epithelial tight junction protein occludin in mice with fulminant hepatic failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3008-3012

摘要

目的: 研究暴发性肝衰竭小鼠大肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达的变化。

方法: BALB/c小鼠150只随机分为生理盐水对照组($n = 30$)、内毒素(LPS)对照组($n = 30$)、D-氨基半乳糖(D-GalN)对照组($n = 30$)和暴发性肝衰竭(LPS+GalN)组($n = 60$)。采用

D-GalN和LPS联合ip制备暴发性肝衰竭小鼠动物模型. 应用免疫组织化学技术、Western blot及实时定量PCR检测暴发性肝衰竭进程中, 小鼠大肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin的定位、表达及mRNA的变化.

结果: occludin蛋白主要沿小鼠大肠黏膜上皮细胞膜的顶端呈线状分布, 在暴发性肝衰竭组小鼠, 6 h时occludin的阳性染色开始减少, 9 h时更为明显. Western blot结果与免疫组织化学结果相一致, 6 h时开始下降(0.48 ± 0.07), 9 h达到最低值(0.36 ± 0.05), 与生理盐水对照组(0.71 ± 0.09)相比差异显著($P < 0.05$). 实时定量PCR结果显示, 暴发性肝衰竭小鼠2 h时occludin mRNA即开始下降(0.85 ± 0.12), 6 h时达到最低值(0.72 ± 0.04), 与生理盐水对照组(1.00 ± 0.05)相比有明显差异($P < 0.05$), 9 h时有所恢复(0.93 ± 0.10).

结论: 在暴发性肝衰竭过程中, 大肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降, 其mRNA也呈下调趋势.

关键词: 小鼠; 暴发性肝衰竭; 肠黏膜屏障; 紧密连接蛋白; occludin

崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛. 暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3008-3012
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3008.asp>

0 引言

自发性腹膜炎是暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)时常见的并发症^[2], 其发生与肠道黏膜屏障功能的损伤及细菌移位有关. 肠道黏膜屏障最重要的结构是肠上皮细胞间的紧密连接, 我们研究了暴发性肝衰竭小鼠肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达的变化, 以进一步揭示自发性腹膜炎的发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ BALB/c小鼠150只, 6-8 wk, 体质量18-22 g, 由中国医科大学实验动物中心提供. D-氨基半乳糖(D-galactosamine, GalN), 内毒素LPS(Ecoli O127 : B8), 美国Sigma公司; 兔抗occludin多克隆抗体, 美国Zymed公司; SP免疫组化试剂盒, 北京中杉金桥公司; RNA PCR试剂盒, T7体外转录试剂盒, quantitative Real time PCR试剂盒, 大连宝生物工程有限公司.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 参照文献[1]制备FHF小鼠动物模型. 动物随机分为4组, 1组: 生理盐水对照组30只; 2组: LPS对照组30只; 3组: GalN对照组30只; 4组: 暴发性肝衰竭组(LPS+GalN)60只, 每组分为3个时间点(2 h, 6 h, 9 h), 每个时间点取10只小鼠断头处死, 取大肠组织部分置于甲醛中固定制备石蜡标本, 部分置于Eppendorf管中-80℃保存以提取蛋白, 部分置于TRIzol液中-80℃保存以提取RNA.

1.2.2 occludin免疫组织化学染色 采用SABC法, 石蜡切片常规脱蜡至水, H₂O₂孵育, 胃蛋白酶K 37℃ 30 min抗原修复, 正常山羊血清封闭, 兔抗小鼠多克隆occludin抗体(1 : 50)4℃过夜, 生物素标记的羊抗兔-IgG抗体37℃ 20 min, SABC, 37℃ 20 min, DAB显色, 镜下控制显色时间, 苏木素复染, 常规脱水透明, 树胶封片. PBS液代替一抗做空白对照.

1.2.3 Western blot分析 取大约100 mg大肠组织置于0.5 mL蛋白裂解液中, 于冰上超声波粉碎机下将组织粉碎, 匀浆置于4℃冰箱过夜, 12 000 g, 4℃, 离心1 h, 取上清即为膜蛋白. 采用BCA法对蛋白样品进行定量, 用蒸馏水将蛋白样品调成相同浓度, 加入相同体积上样缓冲液, 沸水煮5 min进行蛋白变性. 取50 μg总蛋白进行80 g/L SDS-PAGE凝胶电泳, 电压100 V, 90 min; 电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 电压50 V, 2 h; 脱脂奶粉封闭2 h, 加入兔抗小鼠多克隆occludin抗体(1 : 1000)4℃过夜; 然后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔-IgG抗体(1 : 2000)室温2 h, BCIP/NBT显色液显色, 约10 min, 蒸馏水终止反应. 以β-actin作为内参. 结果通过天能图像分析系统进行分析, occludin蛋白含量 = 样本occludin蛋白灰度值/同一样本β-actin灰度值.

1.2.4 实时定量PCR 用TRIzol一步法提取大肠组织RNA. 采用SYBR Green I 荧光染料嵌合法检测occludin mRNA. 先构建目的基因(occludin基因)和管家基因(GAPDH)的RNA标准品, 制作标准曲线, 利用标准曲线对样品中的目的基因和管家基因分别进行定量. 通过管家基因的校正, 检测各组大肠组织中occludin目的基因的相对表达量. occludin mRNA的相对表达量 = occludin基因拷贝数/GAPDH基因拷贝数, 校正结果以生理盐水对照组为1, 其余组与之相比较. PCR反应体系的组成参照说明书进行, 反应条件为逆转录反应42℃ 10 min, 95℃ 2 min, PCR扩增

■研究前沿

暴发性肝衰竭时肠黏膜屏障损伤已经证实, 但其发生机制是目前研究的热点, 而且, 其与细菌穿透的因果关系尚无定论.

■创新点

目前关于暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达变化的文章尚未见报道。暴发性肝衰竭时肠黏膜屏障损伤的研究主要集中在肠上皮细胞的凋亡, 其他原因引起的肠黏膜屏障损伤有报道LPS可引起紧密连接蛋白表达下降。

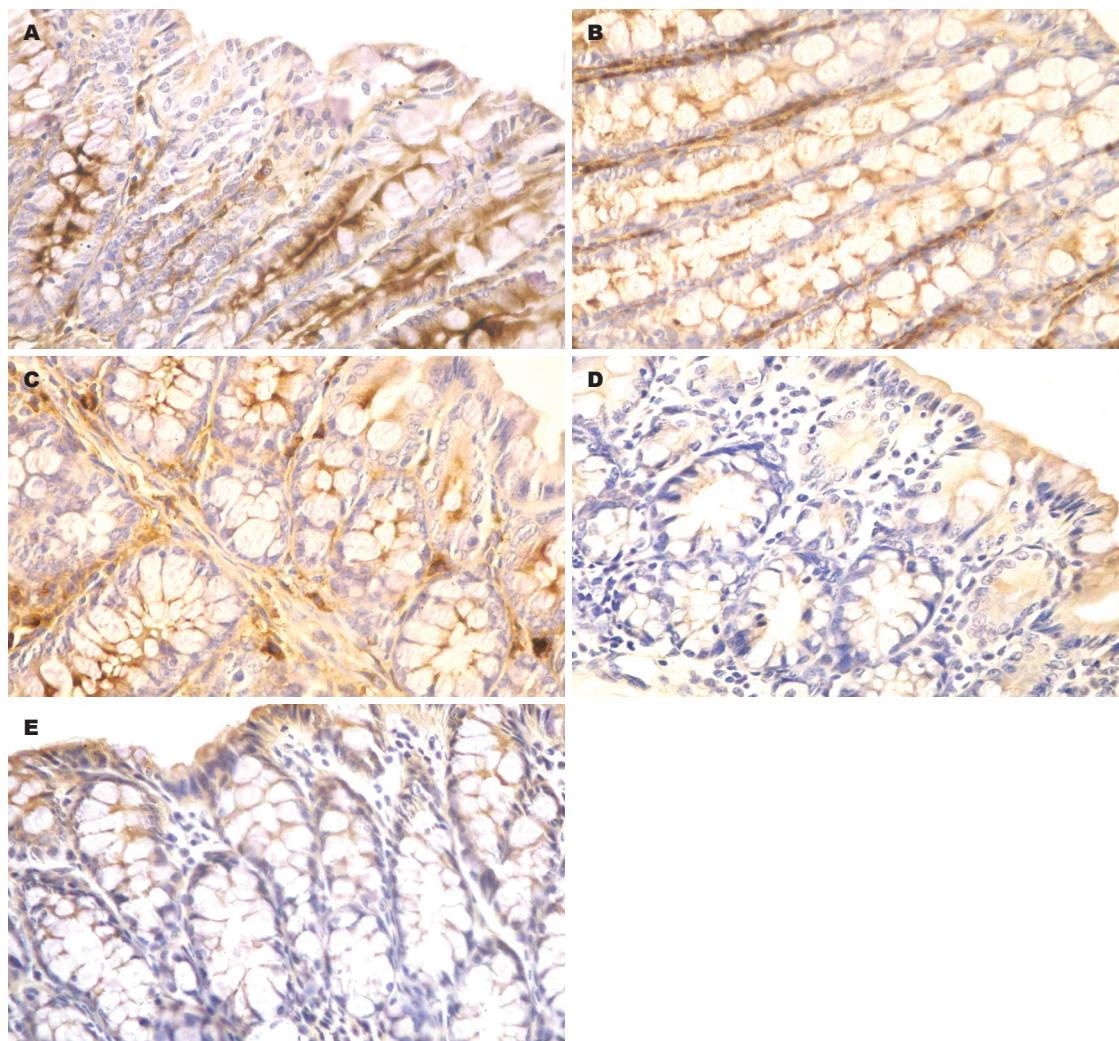


图1 各组小鼠肠黏膜上皮细胞occludin蛋白的免疫组织化学染色($\times 400$)。A: 生理盐水对照组; B: LPS对照组; C: GalN对照组; D: 暴发性肝衰竭组小鼠6 h; E: 暴发性肝衰竭组小鼠9 h。

95℃ 10 s, 1个循环, 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 45个循环。occludin和GAPDH引物序列如下: Ocln-F5'-GCTTATCTTGGGAGCCTGGACA-3'; Ocln-R5'-GTCATTGCTTGGTGCATA ATGATTG-3'; GAPDH-F5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'; GAPDH-R5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'。occludin产物片段108 bp, GAPDH产物片段144 bp。

统计学处理 以mean \pm SD表示, 应用SPSS 10.0对各组间数据进行方差分析。

2 结果

本实验中暴发性肝衰竭组小鼠总死亡率达68% (34/50), 肝脏HE染色可见成片的出血坏死区, 内有较多炎细胞浸润, 证明本实验动物模型成功, 可以应用。

2.1 occludin免疫组织化学染色 在第1, 2, 3组的

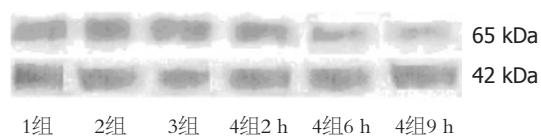


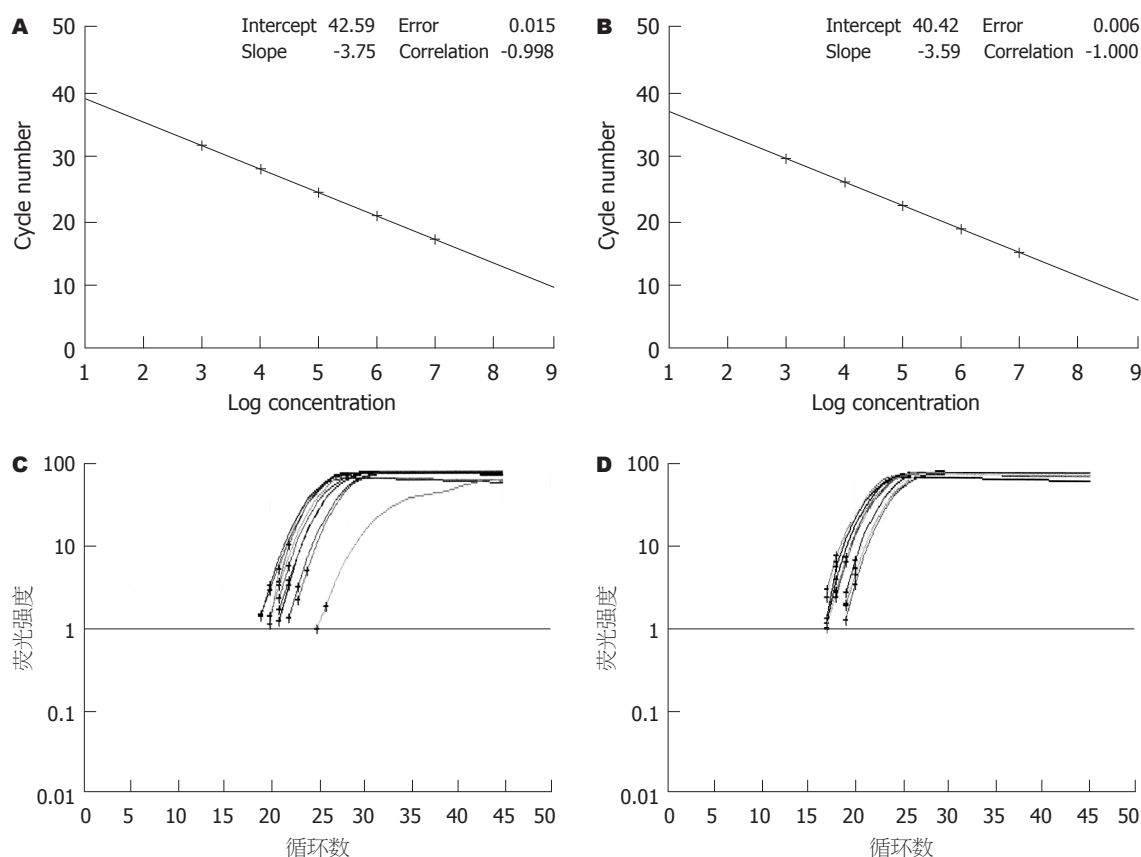
图2 各组小鼠肠道occludin蛋白表达的变化。65 kDa为occludin蛋白; 42 kDa为 β -actin。

大肠组织切片中, occludin主要沿肠黏膜上皮细胞膜的顶端分布, 呈表达很强的棕褐色线状信号, 在整张切片上均可见到。在第4组, occludin的定位与前3组没有明显区别, 但6 h时可以发现棕褐色阳性信号开始减弱, 9 h时更为明显, 且阳性细胞数明显减少(图1)。

2.2 Western blot分析 各组在65 kDa处均可见特异性的蛋白条带(图2), 对各条带进行灰度分析发现第1, 2, 3组occludin的表达无明显差异, 第4组2 h时occludin表达与前3组差异不大, 6 h时oc-

■应用要点

发现暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降, 为进一步深入研究肠黏膜屏障损伤的机制提供了帮助。



■ 名词解释

紧密连接存在于各类上皮细胞及血管内皮细胞间的顶端, 形成一个顶端闭锁结构且发挥“屏障”和“防御”功能, 以控制细胞间的通透性和保持细胞的极性。紧密连接由多种紧密连接蛋白组成, 包括Claudin, occludin以及ZO-1, ZO-2, ZO-3等, 在不同的组织结构, 各种紧密连接蛋白的表达亦存在差别。

图3 各组小鼠肠道occludin mRNA表达的变化。A: occludin RNA标准品标准曲线图; B: GAPDH RNA标准品标准曲线图; C: 样品occludin扩增曲线图; D: 样品GAPDH扩增曲线图。

cludin表达开始下降(0.48 ± 0.07), 9 h时达到最低值(0.36 ± 0.05), 与生理盐水对照组(0.71 ± 0.09)相比有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 实时定量PCR 第1, 2, 3组occludin的mRNA水平没有差异, 第4组2 h时occludin mRNA开始下降(0.85 ± 0.12), 6 h时达到最低值(0.72 ± 0.04), 与生理盐水对照组(1.00 ± 0.05)相比有显著性差异($P < 0.05$), 9 h时有所恢复(0.93 ± 0.10), 但仍低于对照组(图3)。

3 讨论

自发性腹膜炎是FHF患者常见的并发症之一^[2-4], 死亡率较高, 在48%-57%^[5]。但到目前为止, FHF并发自发性腹膜炎的机制仍不十分清楚, 多数学者认为细菌移位是SBP的发生中占据重要位置^[6-11], 而其发生与肠黏膜屏障的损伤有着密切关系^[12-14]。大肠杆菌直径大约3 μm , 正常情况下由于肠黏膜上皮细胞间形成完整的连接复合体封锁住了细胞旁间隙^[15-17], 使得大肠杆菌不能穿过肠壁进入腹膜腔, 但在病理情况下大肠杆菌可以穿过肠黏膜上皮层及固有层, 进入肠系膜

淋巴结和肠外组织, 发生细菌移位。但是这一过程是如何完成的并不清楚。一般来说大分子物质穿过肠黏膜上皮细胞, 无外乎两种途径, 一种是通过上皮细胞的胞饮作用, 另一种是通过细胞旁间隙^[18-19], 而后者发生则依赖于细胞间连接完整性的破坏。肠上皮细胞间的连接, 从顶端到基膜依次为紧密连接(TJ)、黏附连接、桥粒和缝隙连接。其中TJ是构成肠黏膜机械屏障最重要的结构, 由Claudin蛋白、occludin蛋白、JAM、ZOs(zonula occludins)等结构蛋白及各类连接蛋白分子共同组成^[20-22]。occludin蛋白是TJ中最重要的结构蛋白, 他不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭, 还能与不同的分子结合, 参与TJ形成的信号调节^[23-24]。有研究表明, 缺乏occludin蛋白的成纤维细胞不能形成典型的TJ结构^[25]。

我们前期的研究观察到, 在电镜下暴发性肝衰竭小鼠肠黏膜上皮细胞间紧密连接发生断裂, 且断裂区域可以看到以囊泡形式存在的细菌。因此我们推论FHF时, 肠黏膜上皮细胞间的紧密连接受到破坏, 大肠杆菌得以通过细胞旁

■同行评价

本文探讨暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin的定位和表达的水平,发现在暴发性肝衰竭过程中,大肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降,其mRNA也呈下调趋势,这是比较前沿的研究。

间隙进入肠壁,参与SBP的形成。那么TJ的断裂是怎样发生的呢?是否与紧密连接蛋白表达的异常有关?为了证实这一问题,我们从蛋白及mRNA水平观察了暴发性肝衰竭小鼠肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达的变化。结果表明,FHF组小鼠6 h时免疫组织化学染色即发现大肠上皮细胞的occludin表达减少,9 h时更为明显,Western blot结果与免疫组织化学结果相吻合,且这一时间点也与我们前期观察到的细菌穿透肠壁的时间点一致。这证实了FHF时,大肠上皮细胞间的紧密连接蛋白occludin减少,从而使紧密连接的完整性受到破坏,为细菌的穿透提供了可能。进一步我们从转录水平探讨了occludin mRNA表达的变化,结果显示,FHF小鼠2 h时occludin mRNA即开始下降,6 h时达到最低值,9 h时有所恢复,其变化的时间点要早于蛋白水平,提示occludin蛋白的减少极可能是在转录水平进行调节的。

4 参考文献

- 吕飒, 宋红丽, 王静艳, 刘沛. 急性肝坏死小鼠血脑屏障通透性的改变. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1346-1348
- Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Sharma AK, Singh K. Natural history and risk factors in fulminant hepatic failure. *Arch Dis Child* 2002; 87: 54-56
- Thanopoulou AC, Koskinas JS, Hadziyannis SJ. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP): clinical, laboratory, and prognostic features. A single-center experience. *Eur J Intern Med* 2002; 13: 194-198
- Franca AV, De Souza JB, Silva CM, Soares EC. Long-term prognosis of cirrhosis after spontaneous bacterial peritonitis treated with ceftriaxone. *J Clin Gastroenterol* 2001; 33: 295-298
- Dhiman RK, Makharia GK, Jain S, Chawla Y. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis in fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 233-238
- Garcia-Tsao G. Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *J Hepatol* 2001; 34: 150-155
- Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23: 217-244
- Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, Pascual S, Solà-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazon JM, Perez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36: 135-141
- Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 145-150
- Chang CS, Yang SS, Kao CH, Yeh HZ, Chen GH. Small intestinal bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 92-96
- Sola R, Soriano G. Why do bacteria reach ascitic fluid? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 351-354
- 武金宝, 王继德, 张亚历. 肠黏膜屏障研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 619-623
- Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000; 49: 306-313
- Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 145-153
- 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002; 10: 3-6
- Yap AS, Mullin JM, Stevenson BR. Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes. *J Membr Biol* 1998; 163: 159-167
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293
- Nusrat A, Parkos CA, Liang TW, Carnes DK, Madara JL. Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair. *Gastroenterology* 1997; 113: 1489-1500
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G851-857
- 宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1303-1306
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127
- Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1227-1237
- Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 2000; 275: 29816-29822
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 1998; 141: 397-408

电编 张敏 编辑 王晓瑜

转染VEGF₁₆₅的大鼠血管内皮细胞与胰岛共移植对糖尿病大鼠的治疗作用

程颖, 刘永锋, 张佳林, 李铁民, 赵宁

程颖, 刘永锋, 张佳林, 李铁民, 赵宁, 中国医科大学附属第一医院器官移植科 辽宁省沈阳市 110001

程颖, 2005年中国医科大学博士, 助理研究员, 主要从事胰岛移植、器官保存方面的研究。

高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20050159010

通讯作者: 程颖, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院器官移植科. chengying75@sina.com
电话: 024-83282452

收稿日期: 2006-07-03 接受日期: 2006-09-01

Co-transplantation of VEGF₁₆₅-transfected vascular endothelial cells and islets in treatment of rats with diabetes

Ying Cheng, Yong-Feng Liu, Jia-Lin Zhang, Tie-Min Li, Ning Zhao

Ying Cheng, Yong-Feng Liu, Jia-Lin Zhang, Tie-Min Li, Ning Zhao, Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by the Doctoral Program Foundation of Ministry of Education, China, No. 20050159010

Correspondence to: Ying Cheng, Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. chengying75@sina.com

Received: 2006-07-03 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To observe whether the elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, induced by VEGF₁₆₅-transfected vascular endothelial cells (VEC), can affect the angiogenesis and function of the grafts.

METHODS: The diabetic rats were divided into 3 groups, named group A, B and C, respectively. The rats in group A received 300-IEQ islets transplantation under the capsule of the kidney. The rats in group B underwent VEC and islets transplantation, while those in group C were transplanted with islets and VEC transfected by pIRES2-EGFP/VEGF₁₆₅ plasmid. The levels of blood glucose and insulin were evaluated after operation every other day. Intravenous glucose

tolerance test (IVGTT) was performed 10 d after transplantation. HE and immunohistochemical staining was used to detect the expression of insulin-6, VEGF and CD34 in the rat kidney. The microvessel density (MVD) was also calculated.

RESULTS: The blood glucose and insulin in group C restored to the normal level 3 d after transplantation. In contrast, diabetic rats in group A and B displayed moderate hyperglycemia, and no significant difference was found between the two groups. IVGTT showed both the K value in group C was 2.69, which was significantly higher than that in group A or B (K = 1.9 or 1.87). HE and immunohistochemical staining showed that a large amount of islet grafts were observed under the capsule of the kidney in group C, which were positively stained by insulin-6Ab and VEGF Ab. In the mass of the cells, the VEC positively stained by CD34 were observed. The similar mass was observed in group A and B, but with few positive cells stained by insulin-6 Ab and CD34 Ab. No positive cells stained by VEGF appeared in group A and B. The MVD in group C was markedly higher than that in group A or B (74.3 ± 6.74 vs 11.43 ± 2.22 , 10.9 ± 2.45 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: VEGF₁₆₅-transfected VEC-induced expression of VEGF can stimulate the angiogenesis and reduce the mortality of the grafts, and further improve the outcome of islet transplantation.

Key Words: Islet transplantation; revascularization; Vascular endothelial growth factor 165; Gene transfection; Vascular endothelial cell

Cheng Y, Liu YF, Zhang JL, Li TM, Zhao N. Co-transplantation of VEGF₁₆₅-transfected vascular endothelial cells and islets in treatment of rats with diabetes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3013-3019

摘要

目的: 探讨VEGF₁₆₅转染大鼠血管内皮细胞诱

■背景资料

胰岛移植是治疗糖尿病的有效手段之一,但供胰量大、移植长期存活率低仍是阻碍胰岛移植发展的“瓶颈”。造成这种现象的主要原因之一是胰岛分离纯化过程中破坏了其内部的微循环系统,导致移植后无法象胰腺移植那样立即恢复血运。移植后早期(7-14 d)内近70%移植胰岛因缺血、缺氧死亡。在移植早期,胰岛的存活率在很大程度上依赖于再血管化的时间和程度。

■ 研究前沿

以往关于胰岛移植的研究多数集中在改进胰岛分离、纯化过程,建立低毒高效的免疫抑制剂方案方面。近年来人们开始意识到胰岛微循环的重要性,其不仅是胰岛生存的必需环境,也是发挥生理功能的必要条件。移植早期迅速重建移植胰岛微循环,将有助于降低胰岛移植早期死亡率,提高存活率,减少供胰用量。

导移植胰岛再血管化及对功能的影响。

方法:受体糖尿病大鼠随机分为3组,对照组于肾被膜下移植300当量(1当量相当于1个直径为150 μm 的胰岛)胰岛,转染组和内皮细胞组分别加入 1×10^6 转染质粒pIRES2-EGFP/VEGF₁₆₅的血管内皮细胞和正常血管内皮细胞。移植后监测血糖及血清胰岛素水平。术后10 d行静脉糖耐量实验(IVGTT)。术后14 d,取受者肾脏HE染色及Insulin-6, VEGF和CD34免疫组化染色,计算微血管密度。

结果:实验组大鼠于移植术后3 d血糖及胰岛素水平恢复正常。对照组和内皮细胞组虽有所改善,但未恢复到正常水平。IVGTT显示实验组K值($K = 2.69$)与正常大鼠相似,对照组和内皮细胞组K值分别为1.9和1.87,两组间无明显差异,而与实验组有明显差异($P < 0.05$)。实验组大鼠肾被膜下可见成团胰岛,Insulin-6免疫组化呈阳性,周围及内部有大量内皮细胞。VEGF₁₆₅免疫组化及CD34免疫组化染色呈阳性。对照组和内皮细胞组肾被膜下的细胞团中心细胞较少,部分被纤维组织代替,内部仅有少量CD34染色阳性的内皮细胞。Insulin-6免疫组化仅有少量细胞染成棕黄色。VEGF₁₆₅免疫组化呈阴性。对照组(11.43 ± 2.22)和内皮细胞组MVD(10.9 ± 2.45)无显著差异,而与实验组间(74.3 ± 6.74)有明显差别($P < 0.05$)。

结论:VEGF₁₆₅转染大鼠血管内皮细胞可以诱导移植胰岛新生血管生成,促进再血管化,降低移植胰岛早期死亡率,减少供胰用量。

关键词:胰岛移植;再血管化;血管内皮生长因子165;基因转染;血管内皮细胞

程颖,刘永锋,张佳林,李铁民,赵宁. 转染VEGF₁₆₅的大鼠血管内皮细胞与胰岛共移植对糖尿病大鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3013-3019

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3013.asp>

0 引言

胰岛移植是治疗糖尿病的有效手段之一,但供胰量大、移植物长期存活率低仍是阻碍胰岛移植发展的“瓶颈”。造成这种现象的主要原因之一是胰岛分离纯化过程中破坏了其内部的微循环系统,导致移植后无法象胰腺移植那样立即恢复血运^[1]。移植后早期(7-14 d)内近70%移植胰岛因缺血、缺氧死亡^[2]。在移植早期,胰岛的存活率依赖于再血管化的时间和程度^[3]。本实验拟将转染VEGF₁₆₅的大鼠血管内皮细胞与胰岛

共同移植到糖尿病大鼠肾被膜下,在胰岛移植的部位造成局部高VEGF环境诱导移植胰岛再血管化,改善微循环,降低胰岛移植早期死亡率,减少供胰用量。

1 材料和方法

1.1 材料 供受者均采用♂ Wistar大鼠(中国医科大学动物中心提供),体质量 150 ± 20 g。受者大鼠于移植前14 d,采取链尿霉素化学灼伤法^[4](20 g/L STZ, 65 mg/kg, ip)造成糖尿病大鼠模型(连续3 d在非禁食情况下,血糖 > 16.8 mmol/L)。根据移植不同随机分为3组($n = 10$),实验组:胰岛与转染VEGF₁₆₅的大鼠血管内皮细胞共同移植;内皮细胞组:胰岛与正常大鼠血管内皮细胞共同移植;对照组:仅进行胰岛移植。pIRES2-EGFP/VEGF₁₆₅质粒经扩增、鉴定后,采用层析法大量提纯,回收。采用胶原酶消化贴片法培养大鼠血管内皮细胞。取2-5代细胞备用,采用脂质体法转染,转染72 h后收集备用,采用明尼苏达大学改良方法分离纯化胰岛^[2]。供鼠经戊巴比妥麻醉开腹后,逆行胆管插管,缓慢灌注含消化酶(胶原酶V型, 1.5 mg/kg)的Hanks缓冲液10-12 mL,使胰腺完全膨胀。完整切取胰腺后置入含相同浓度胶原酶的缓冲液中,37℃水浴消化15-20 min。消化的胰腺组织离心,经80目不锈钢筛网过滤后,采用250, 230, 205, 110 g/L Ficoll和Hanks液梯度密度离心(4℃, 3000 r/min \times 10 min),于230, 110 g/L层交界间吸取胰岛细胞。经Hanks液洗3次,备用。

1.2 方法 收集正常血管内皮细胞和转染VEGF₁₆₅血管内皮细胞,计数 1×10^6 细胞离心去除上清备用。将纯化后的胰岛离心,弃上清,取锥形离心管底部的沉淀。倒置显微镜下手检计数300当量胰岛,与上述血管内皮细胞混合。将细胞移植至大鼠右肾被膜下。

1.2.1 移植胰岛功能检测 移植术后24 h开始尾静脉采血血糖仪检测大鼠空腹血糖,以血糖 < 7.8 mmol/L判定移植存活,移植有效。空腹条件下,隔天采尾静脉血,采用化学发光免疫方法(美国雅培AXSYM)检测血清胰岛素水平。于移植术后10 d行静脉糖耐量实验(IVGTT)。大鼠禁食12 h后,戊巴比妥麻醉,于尾静脉快速注射500 g/L葡萄糖溶液(0.5 g/kg),以开始注射至注射完毕之间的任何时间为0点,在注射后1, 5, 10, 15, 30, 60及90 min,于尾静脉采血检测血糖。将5 min至30 min范围内测得的血糖值取自然对数,

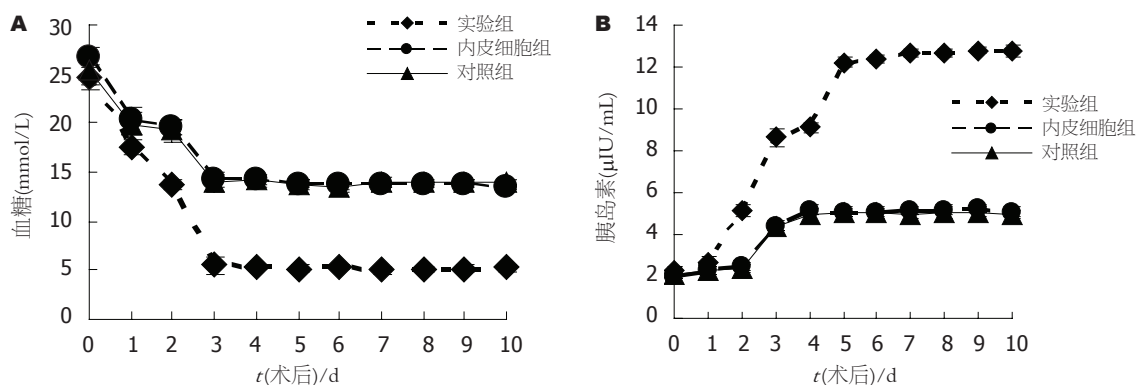


图1 大鼠胰岛移植术后血糖和胰岛素水平. A: 血糖; B: 胰岛素.

并进行直线回归, 通过回归系数计算T1/2(即从该范围内某一血糖值下降到其一半时的时间), 再按公式: $K = (0.69/T1/2) \times 100$ 算出K值^[5].

1.2.2 组织形态学检查 于移植后14 d, 切取糖尿病受者大鼠肾脏标本, HE及Insulin-6, VEGF, CD34免疫组化染色, 光镜下观察组织形态学变化. 微血管呈棕黄色, 计数方法为盲法下每张切片在移植胰岛部位选择5个血管最高的区域, 在200倍下由3个病理医生独立计数, 求微血管密度(microvascular density, MVD)平均数. 微血管判定标准: 凡染成棕黄色的数个内皮细胞或内皮细胞簇均为一个血管计数, 管腔大于8个红细胞大小, 有较厚肌层的血管不计数^[6].

统计学处理 所用数据以平均数±标准差表示, 采取方差分析 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异, 所有数据均由SPSS 10.0软件处理.

2 结果

2.1 胰岛功能 实验组大鼠于移植术后3 d空腹血糖恢复正常. 对照组和内皮细胞组于术后3 d血糖有所下降, 但未能恢复到正常水平, 平均波动在13-14 mmol/L之间. 对照组和内皮细胞组的血糖值与术后同一时间的实验组相比有显著差异($P < 0.05$), 但这两组相比无显著性差异($P > 0.05$, 图1A), 实验组大鼠于移植术后2 d胰岛素分泌水平开始上升, 3-4 d后恢复正常水平. 对照组和内皮细胞组于术后2 d胰岛素分泌有所增加, 但幅度不大, 未达到正常水平. 对照组和内皮细胞组的胰岛素水平与术后同一时间的实验组相比有显著差异($P < 0.05$), 但这两组相比无显著性差异($P > 0.05$, 图1B). 于术后10 d行IVGTT发现移植组糖耐量曲线与正常大鼠相似. 而对照组和内皮细胞组大鼠注射高糖溶液后, 血糖升高明显, 在90 min后仍未恢复正常. 实验组、内皮细胞组和

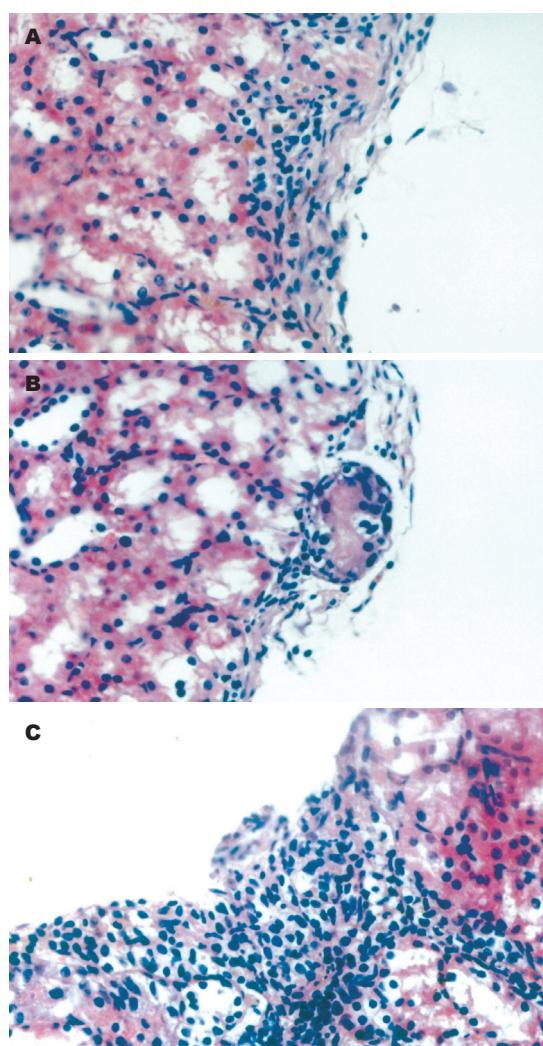


图2 肾被膜下移植胰岛(HE × 400). A: 对照组; B: 内皮细胞组; C: 实验组.

对照组K值分别为2.69, 1.9和1.87. 内皮细胞组和对照组在血糖水平和动力学方面与实验组有明显差异, 但这两组之间无明显差异.

2.2 病理学检查 实验组大鼠肾被膜下可见有成团的核深染细胞, 不同于肾小球和肾小管细胞,

■ 相关报道

许多研究试图在局部造成VEGF高浓度环境, 包括: 直接注射入重组VEGF; 应用VEGF的蛋白制剂; 在移植部位应用VEGF缓释系统持续给药等. 但VEGF在体内半衰期极短, 直接注射和应用蛋白制剂难以在移植局部维持足够的浓度, 且受到移植部位的限制. 改良微囊、应用VEGF缓释系统虽然有一定效果, 但受到微囊的生物相容性、释放浓度、持续时间等多种不确定因素的影响.

■创新盘点

本实验并不以胰岛细胞作为直接的靶细胞,而创新性采用同源的大鼠血管内皮细胞作为载体,在不增加异种抗原的基础上在移植局部高浓度表达 VEGF,促进再血管化进程。

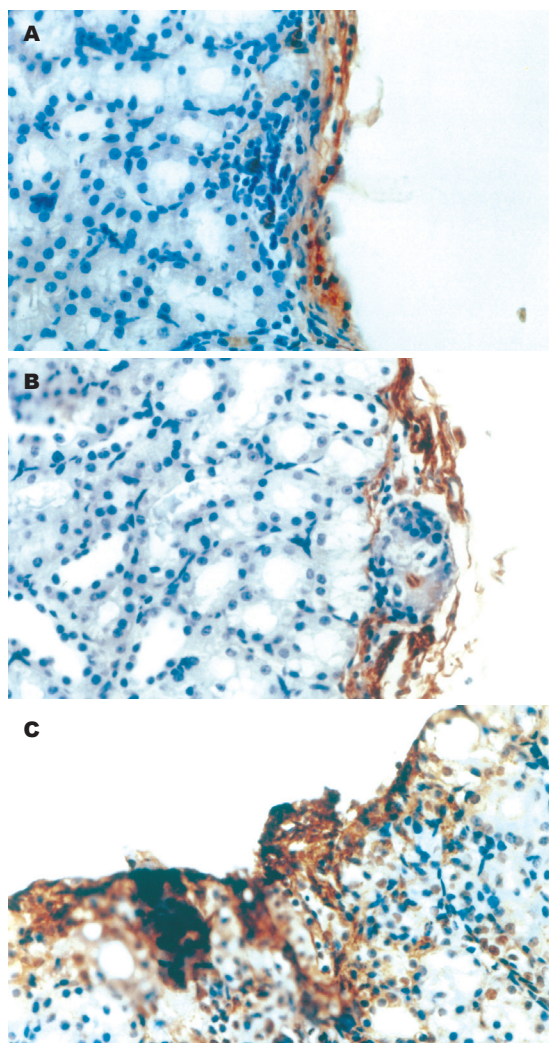


图 3 肾被膜下移植胰岛Insulin-6(SABC × 400). A: 对照组; B: 内皮细胞组; C: 实验组.

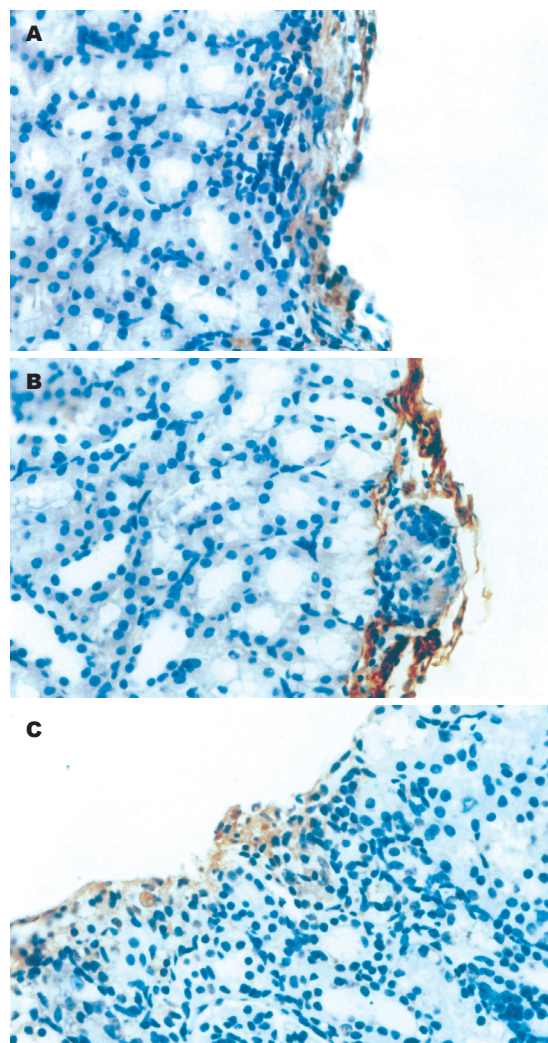


图 4 肾被膜下移植胰岛VEGF(SABC × 400). A: 对照组; B: 内皮细胞组; C: 实验组.

核深染、胞质较少,排列成团但并不形成管腔,也不具备肾小球的囊壁结构,周围可见大量核呈细长状的内皮细胞,并可见部分细胞伸入到细胞团内部.对照组和内皮细胞组也可见类似结构,但细胞团中心细胞较少,部分被纤维组织代替.对照组细胞团周围无内皮细胞围绕,而内皮细胞组周围虽然可见内皮细胞,但细胞团内部未发现类似细胞(图2).胰岛素免疫组化实验组大鼠肾被膜下可见上述成团的细胞染成棕黄色,呈颗粒状,证实确为有功能的胰岛.对照组和内皮细胞组上述类似细胞团仅有少量细胞染成棕黄色,证明上述细胞可能是移植胰岛但功能丧失(图3). VEGF₁₆₅免疫组化实验组大鼠肾被膜下可见有抗胰岛素抗体免疫组化染色呈阳性的细胞团同样抗VEGF免疫组化染色也呈阳性.而对照组和内皮细胞组无阳性染色(图4). CD34免疫组化实验组大鼠肾被膜下可见有抗胰岛素

抗体免疫组化染色呈阳性的细胞团同样抗CD34免疫组化染色也呈阳性,胰岛细胞团内部可见有大量细胞胞质染成棕黄色.而对照组和内皮细胞组胰岛细胞团周围虽有阳性细胞,但内部仅有少量阳性细胞染色,于实验组之间有明显差异(图5). MVD实验组大鼠肾被膜下胰岛内部MVD平均为 74.3 ± 6.74 ,对照组和内皮细胞组MVD分别为 11.43 ± 2.22 和 10.9 ± 2.45 ,两组与实验组间有明显差别($P < 0.05$),而对照组和内皮细胞组两组间无明显差别($P > 0.05$).

3 讨论

胰岛移植与胰腺移植相比具有对全身干预小、手术简单、并发症少等优点.但供胰需求量大、移植物生存率和胰岛素不依赖率低等制约了胰岛的广泛应用.近期研究发现,胰岛移植在移植后早期(7-14 d内)有近70%的胰岛失功^[7].

导致失功的原因有很多, 主要包括胰岛入血后即刻发生的血液介导的炎症反应、移植早期供胰岛血管尚未阶段造成的缺血缺氧损伤以及免疫攻击等^[8-10]。近年来, 移植胰岛再血管化问题受到人们的普遍关注, 认为移植胰岛的存活在很大程度上, 尤其是在早期取决于其血管化的程度和速度。胰岛的血运十分丰富, 血流占胰腺的10%, 具有密集的毛细血管网以保证足够的组织供氧^[11]。胰岛内门脉系统具有特殊的血流灌注顺序, B细胞→A细胞→D细胞和PP细胞, 这也是胰岛细胞内相互联系和激素分泌调节的基本条件^[12]。本实验采用肾被膜下将大鼠血管内皮细胞或VEGF₁₆₅转染的大鼠血管内皮细胞与胰岛共同移植, 观察内皮细胞及VEGF₁₆₅诱导移植胰岛再血管化及对功能影响。肾被膜下胰岛移植模型, 属于异位胰岛移植, 移植胰岛限于肾被膜下形成细胞团, 便于观察血管形成情况。本实验移植300当量胰岛, 对于大鼠来说, 该数量为边缘数量, 即不能完全满足糖尿病大鼠的需求, 以便于术后利用大鼠血糖水平变化监测移植胰岛功能以及实验因素对胰岛功能的影响。本实验表明, 单纯接受移植胰岛的大鼠术后虽然血糖有所下降但未降到正常水平, 证明移植胰岛存在死亡现象。病理学观察也证实胰岛中心的B细胞已经被大量结蒂组织代替, 仅有少量细胞残留被抗胰岛素抗体染成棕黄色。

胰岛分离纯化过程中破坏了其内部的微循环系统, 原有的血管内皮细胞连续性遭到破坏需要进行微循环重建, 异体胰岛移植再血管化较晚。Furuya *et al*^[13]研究发现, 移植在肾被膜下的胰岛原有的血管内皮细胞逐渐减少, 至移植术后第5天完全消失, 至术后第7-14天才开始从周边逐渐形成毛细血管雏形, 4 wk后方能完全重建特有的灌注系统。本实验也观察到术后14 d, 单纯接受胰岛移植组的移植内部的内皮细胞几乎完全消失, 周围虽有内皮细胞, 但未向内部延伸, 表明再血管化尚未开始。血流系统重建依赖于结构基础和微环境基础。有人认为在胰岛分离纯化过程中胰岛内部原有的内皮细胞被破坏是导致微循环系统重建延迟的重要原因^[14]。本实验将血管内皮细胞与胰岛共同移植, 为再血管化提供了良好的结构基础, 但实验结果表明虽然血管内皮细胞存活, 但处于静止状态, 并没有向胰岛内皮生长延伸, 没有形成血窦。与单纯胰岛移植组相比, 胰岛功能无明显改善。因此我们认为胰岛内原有的供体血管内皮细胞

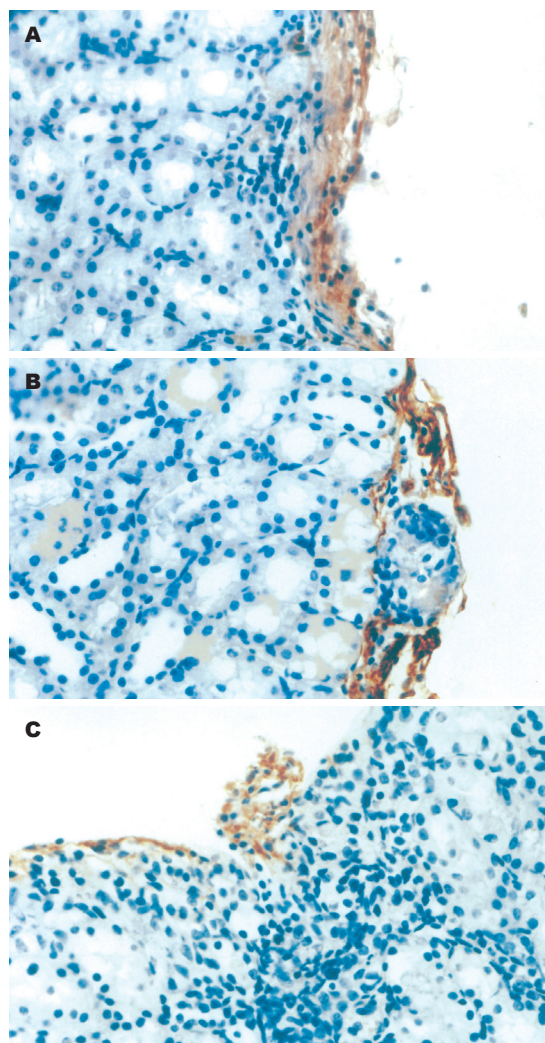


图5 肾被膜下移植胰岛CD34(SABC × 400)。A: 对照组; B: 内皮细胞组; C: 实验组。

及受体内的毛细血管和毛细血管后小静脉已经构成了血管新生的良好的结构基础。因此微环境基础, 即各种促血管生成因子才是再血管化的关键因素。

VEGF₁₆₅是VEGF家族中发挥生物学效应的主要成分, 可高效特异地作用于血管内皮细胞, 有强烈的促分裂和趋化作用, 并可增强微血管通透性, 促进血浆纤维蛋白外渗, 为血管形成过程中多种细胞迁移提供一个纤维网络^[15-16]。可以通过内皮细胞上的两个特殊受体flt和flk(KDR)作用, 直接刺激内皮细胞增殖并产生纤维蛋白溶酶原激活剂和胶原酶, 促进内皮细胞移动和血管生成^[17]。目前已经广泛应用于缺血性疾病的治疗^[18]。组织在受到缺血缺氧刺激时, 内源性VEGF表达会有所增加^[19], 但不足以尽快恢复内皮细胞的完整性。这在移植胰岛中也得到了证明^[20]。许多研究致力于给予移植胰岛外源性

■应用要点

胰岛分离纯化提高后, 胰岛移植并未出现所预料的大幅度进步, 胰岛早期大量死亡又成为制约胰岛移植发展的主要障碍和难以突破的“瓶颈”。通过本研究可为这一问题提供解决途径, 减少供胰用量, 为临床大量开展胰岛移植增加可行性、奠定基础。

■名词解释

血管内皮生长因子(VEGF)可高效特异地作用于血管内皮细胞,有强烈的促分裂和趋化作用,并可增强微血管通透性,促进血浆纤维蛋白外渗,为血管形成过程中多种细胞迁移提供一个纤维网络,可以直接刺激内皮细胞增殖并产生纤维蛋白溶酶原激活剂和胶原酶,促进内皮细胞移动和血管生成。目前广泛用于治疗缺血性疾病。

VEGF, 试图在局部造成VEGF高浓度环境, 其途径包括: 直接注射人重组VEGF^[21]; 应用VEGF的蛋白制剂; 在移植部位应用VEGF缓释系统(在胰岛微囊上包被VEGF)持续给药等。但VEGF在体内半衰期极短(<6 min), 直接注射和应用蛋白制剂难以在移植局部维持足够的浓度, 必须反复大剂量给药, 往往带来很大不便。且受到移植部位的限制(只能在皮下等容易注射的部位进行治疗), 临床应用前景较差^[22]。改良微囊、应用VEGF缓释系统虽然有一定效果, 但受到微囊的生物可容性、释放浓度、持续时间等多种不确定因素的影响, VEGF在体内持续时间仍较短, 仅1-3 d左右, 不能满足移植胰岛的需要^[23]。因此, 寻找一种能够在移植胰岛局部持续高表达VEGF的方法是促进血管生长的关键。

本实验利用基因转染技术, 以VEGF基因为目的基因, 使VEGF以旁分泌和自分泌的形式在移植局部形成高浓度, 为新生血管形成创造良好的微环境, 诱导移植组织再血管化。但胰岛本身是一种不具有分化能力的细胞, 一般的转染效率很低, 有实验成功的利用腺病毒载体^[24]和改良于HIV病毒的lenti病毒载体转染胰岛^[25], 但病毒载体存在一些潜在危险, 如在宿主体内过度复制, 对机体基因组DNA产生不良影响等。鉴于以上原因, 本实验并不以胰岛细胞作为直接的靶细胞, 而采用同源的大鼠血管内皮细胞作为载体, 在不增加异种抗原的基础上在移植局部高浓度表达VEGF, 促进再血管化进程。血管内皮细胞既是再血管化的必需的结构基础, 也是VEGF₁₆₅作用的靶细胞, 且具有取材方便, 便于培养等优点, 是一种良好的中介细胞。本实验证明VEGF₁₆₅转染的大鼠血管内皮细胞于移植后14 d在局部仍能表达较高浓度的VEGF。同时, CD34免疫组化染色显示共同移植的胰岛内部内皮细胞明显增多, 出现了明显的血窦。移植胰岛功能得到明显改善, 虽然移植边缘数量的胰岛, 但术后3 d血糖水平以及胰岛素分泌水皮恢复正常, 说明移植胰岛早期因为缺血缺氧而导致死亡的现象得到改善, 死亡数量减少, 供胰需求量明显减少。胰岛分离纯化提高后, 胰岛移植并未出现所预料的大幅度进步, 胰岛早期大量死亡又成为制约胰岛移植发展的主要障碍和难以突破的“瓶颈”。通过本研究可为这一问题提供解决途径, 减少供胰用量, 为临床大量开展胰岛移植增加可行性、奠定基础。

参考文献

- 1 Stagner JL, Samols E. Altered microcirculation and secretion in transplanted islets. *Transplant Proc* 1994; 26: 1100-1102
- 2 Shapiro AM, Ryan EA, Lakey JR. Diabetes. Islet cell transplantation. *Lancet* 2001; 358 Suppl: S21
- 3 Boker A, Rothenberg L, Hernandez C, Kenyon NS, Ricordi C, Alejandro R. Human islet transplantation: update. *World J Surg* 2001; 25: 481-486
- 4 Dehghani GA, Sotoodeh M, Omrani GR. Trophic effects of vanadium on beta-cells of STZ-induced insulin dependent diabetic rats & evidence for long-term relief of diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 1999; 110: 70-75
- 5 Russell JC, Graham SE, Dolphin PJ. Glucose tolerance and insulin resistance in the JCR:LA-corpulent rat: effect of miglitol (Bay m1099). *Metabolism* 1999; 48: 701-706
- 6 Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2004; 11: 948-953
- 7 Fontaine MJ, Fan W. Islet cell transplantation as a cure for insulin dependent diabetes: current improvements in preserving islet cell mass and function. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 170-179
- 8 Ozmen L, Ekdahl KN, Elgue G, Larsson R, Korsgren O, Nilsson B. Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation. *Diabetes* 2002; 51: 1779-1784
- 9 Gainer AL, Suarez-Pinzon WL, Min WP, Swiston JR, Hancock-Friesen C, Korbitt GS, Rajotte RV, Warnock GL, Elliott JF. Improved survival of biologically transfected mouse islet allografts expressing CTLA4-Ig or soluble Fas ligand. *Transplantation* 1998; 66: 194-199
- 10 Fotiadis C, Xekouki P, Papalois AE, Antonakis PT, Sfiriadakis I, Flogeras D, Karampela E, Zografos G. Effects of mycophenolate mofetil vs cyclosporine administration on graft survival and function after islet allotransplantation in diabetic rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2733-2738
- 11 Jansson L, Carlsson PO. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 2002; 45: 749-763
- 12 Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 587-597
- 13 Furuya H, Kimura T, Murakami M, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. Revascularization and function of pancreatic islet isografts in diabetic rats following transplantation. *Cell Transplant* 2003; 12: 537-544
- 14 Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC. Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes* 2004; 53: 1318-1325
- 15 Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997; 79:

- 233-269
- 16 Shimizu H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7254-7260
- 17 Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y. A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor, VEGF 115. *J Biol Chem* 1998; 273: 3033-3038
- 18 Wu JC, Chen IY, Wang Y, Tseng JR, Chhabra A, Salek M, Min JJ, Fishbein MC, Crystal R, Gambhir SS. Molecular imaging of the kinetics of vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic myocardium. *Circulation* 2004; 110: 685-691
- 19 Okuda T, Azuma T, Ohtani M, Masaki R, Ito Y, Yamazaki Y, Ito S, Kuriyama M. Hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1535-1539
- 20 Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L. Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12: 627-635
- 21 Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, Dakhil N, Spilman S, Goris ML, Strauss HW, Quattermous T, Alitalo K, Rockson SG. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002; 16: 1985-1987
- 22 Ishikawa M, Fjii M, Iuchi M, Miyauchi T, Tashiro S. Effect of intrahepatic omental implantation on angiogenesis in rat liver with hepatic artery ligation. *Clin Exp Med* 2001; 1: 27-33
- 23 Mahgoub MA, Ammar A, Fayed M, Edris A, Hazem A, Akl M, Hammam O. Neovascularization of the amniotic membrane as a biological immune barrier. *Transplant Proc* 2004; 36: 1194-1198
- 24 Cheng K, Fraga D, Zhang C, Kotb M, Gaber AO, Guntaka RV, Mahato RI. Adenovirus-based vascular endothelial growth factor gene delivery to human pancreatic islets. *Gene Ther* 2004; 11: 1105-1116
- 25 Okitsu T, Kobayashi N, Totsugawa T, Maruyama M, Noguchi H, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Tanaka N. Lentiviral vector mediated gene delivery into non-dividing isolated islet cells. *Transplant Proc* 2003; 35: 483

■同行评价

本研究采用VEGF₁₆₅转染大鼠血管内皮细胞,探讨诱导移植胰岛再血管化及对功能影响,具有一定的科研和临床意义。

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●

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会,并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班。

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展。征文要求: 来稿请附800字论文摘要,并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员。参加学习班者授予国家继续教育学分12分; 在大会论文报告者另授继续教育学分6分。

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658。

肝癌组织内类阿片肽LVV-血衍吗啡素-6的作用

周迈, 彭吉润, 钟朝辉, 涂向群, 常迎彬, 焦岗军, 冷希圣

■背景资料

由于每种组织都包含一系列特定蛋白, 这些蛋白完成功能后被蛋白裂解酶降解, 从而产生一大族肽, 这类肽被定义为“组织特异性肽池”。组织特异性肽池中各种肽的含量和组成是组织状态的重要特征, 机体的病变常常可以导致组织特异性肽池的变化。血红蛋白的降解产物, 如血衍吗啡素, 是肽池重要的组成部分, 目前相关的研究尚不多见, 且主要集中在神经系统和内分泌领域。LVV-血衍吗啡素-6, 是本文在对HCC细胞表面的抗原表位进行鉴定时, 无意中发现的, 虽然本实验通过体外试验, 对该肽与HCC细胞的作用机制进行了初步探讨, 但对其尚缺乏全面深入的了解, 特别该肽是在体内的作用机制方面。

周迈, 涂向群, 常迎彬, 焦岗军, 民航总医院普外科 北京市100025

钟朝辉, 彭吉润, 冷希圣, 北京大学人民医院肝胆外科 北京市100044

周迈, 2005北京大学第二临床医学院研究生毕业, 医学博士, 主治医师, 主要从事肝癌免疫治疗的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 3020071

通讯作者: 周迈, 100025, 北京市朝阳区高井甲1号, 民航总医院普外科. zhoulmai109@yahoo.com.cn

电话: 010-85762244-2382

收稿日期: 2006-06-15 接受日期: 2006-08-14

Role of opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-6 in hepatocellular carcinoma

Mai Zhou, Ji-Run Peng, Zhao-Hui Zhong, Xiang-Qun Tu, Ying-Bin Chang, Gang-Jun Jiao, Xi-Sheng Leng

Mai Zhou, Xiang-Qun Tu, Ying-Bin Chang, Gang-Jun Jiao, Department of General Surgery, General Hospital of Civil Aviation Administration of China, Beijing 100025, China

Zhao-Hui Zhong, Ji-Run Peng, Xi-Sheng Leng, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 3020071

Correspondence to: Dr. Mai Zhou, Department of General Surgery, General Hospital of Civil Aviation Administration of China, 1 Gaojingjia, Chaoyang District, Beijing 100025, China. zhoulmai109@yahoo.com.cn

Received: 2006-06-15 Accepted: 2006-08-14

Abstract

AIM: To assay the content differences of hemorphins between hepatocellular carcinoma (HCC) and normal liver tissues, and to explore the role of hemorphins in HCC.

METHODS: The tissue samples were obtained from 12 patients with HCC, and peptides were isolated by mild acid elution from the surfaces of hepatocarcinoma and normal hepatic cells. The mixtures of peptides were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometer (MS). A differential comparison was made on the fractions of peptides between HCC and normal liver cells to screen some tumor-specific peptides. Finally, human hepatocarcinoma cell line HLE was treated with different concentrations of the obtained peptides

(0, 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} mol/L), and the growth and apoptosis of HLE cells were detected by MTT assay and flow cytometry (FCM), respectively.

RESULTS: An opioid peptide Leu-Val-Val (LVV)-hemorphin-6 with $M_r 1160.76$ was identified on the surfaces of HCC cells in 7 patients. LVV-hemorphin-6 inhibited the growth of HLE cells at different concentrations, especially at 10^{-7} and 10^{-8} mol/L (24 h: 10^{-7} vs 10^{-8} : $P = 0.044$, 10^{-8} vs 10^{-9} : $P = 0.047$; 48 h: 10^{-7} vs 10^{-8} : $P = 0.031$, 10^{-8} vs 10^{-9} : $P = 0.040$). Meanwhile, LVV-hemorphin-6 induced apoptosis of HLE cells and the apoptosis rates were $0.38\% \pm 0.09\%$, $20.23\% \pm 1.25\%$, $12.64\% \pm 2.15\%$, $1.65\% \pm 0.34\%$, when 0, 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol/L LVV-hemorphin-6 were used, respectively. However, naloxone could inhibit the above effect and the apoptosis rates were $0.41\% \pm 0.11\%$, $1.23\% \pm 0.45\%$, $0.98\% \pm 0.55\%$, $1.34\% \pm 0.43\%$, when the corresponding concentrations were used. The apoptosis rates were significantly different between the two groups ($P < 0.05$) as 10^{-7} and 10^{-8} mol/L LVV-hemorphin-6 were used.

CONCLUSION: LVV-hemorphin-6 may be a product in the pathophysiological process of hepatocellular carcinoma, and it has suppressive effects on HCC cells by activating opiate receptors.

Key Words: Hemorphin; Hepatocellular carcinoma; Tissue-specific peptide pool; Apoptosis

Zhou M, Peng JR, Zhong ZH, Tu XQ, Chang YB, Jiao GJ, Leng XS. Role of opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-6 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3020-3025

摘要

目的: 分析肝癌组织与正常肝组织中血衍吗啡素类肽含量的差异并探究其意义。

方法: 肝癌患者12例, 利用弱酸洗涤法从肝癌细胞和肝细胞表面提取肽段, 然后用高压液相(HPLC)和质谱分析这些肽段并进行差异比

较, 筛选肿瘤特异性肽段. 用这些肽段($0, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}$ mol/L)处理人肝癌细胞株HLE, 采用MTT法、流式细胞仪法观察其对肝癌细胞的生长、细胞凋亡的影响.

结果: 从7例患者的肝癌细胞表面成功检测出一条天然的类阿片肽——Leu-Val-Val(LVV)-血衍吗啡素-6(M_r 1160.76). 不同浓度LVV-血衍吗啡素-6均对HLE细胞有抑制作用, 并且当浓度为 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L时有显著意义(24 h: 10^{-7} vs 10^{-8} : $P = 0.044$, 10^{-8} vs 10^{-9} : $P = 0.047$; 48 h: 10^{-7} vs 10^{-8} : $P = 0.031$, 10^{-8} vs 10^{-9} : $P = 0.040$). 同时, LVV-血衍吗啡素-6可诱导HLE细胞发生凋亡(浓度为 $0, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ mol/L时的凋亡率分别为 $0.38\% \pm 0.09\%$, $20.23\% \pm 1.25\%$, $12.64\% \pm 2.15\%$, $1.65\% \pm 0.34\%$), 而阿片受体阻断剂naloxone能够逆转这种抑制效应(以上对应浓度时凋亡率分别为 $0.41\% \pm 0.11\%$, $1.23\% \pm 0.45\%$, $0.98\% \pm 0.55\%$, $1.34\% \pm 0.43\%$). 两组在LVV-血衍吗啡素-6浓度为 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L时有显著差异($P < 0.05$).

结论: LVV-血衍吗啡素-6为肝癌细胞的病理产物, 可激活阿片受体对肝癌细胞产生抑制作用.

关键词: 血衍吗啡素; 肝细胞癌; 组织特异性肽池; 细胞凋亡

周迈, 彭吉润, 钟朝辉, 涂向群, 常迎彬, 焦岗军, 冷希圣. 肝癌组织内类阿片肽LVV-血衍吗啡素-6的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3020-3025

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3020.asp>

0 引言

阿片类物质有着多种生物学活性, 他们对细胞的生长和死亡有着重要影响^[1]. 血衍吗啡素(hemorphins)是近年发现的一个具有阿片样活性的肽家族, 他们的序列结构相近, 都是由血红蛋白降解产生. 该家族中, 具有生物活性的最小肽段是Tyr-Pro-Trp-Thr(hemorphin-4), 他是人类血红蛋白 β 链的残余片段. 家族的其他成员均是以这段序列为核心, 向C端和/或N端增加氨基酸而成^[2-5]. 组织蛋白酶(cathepsin)等是其主要生成酶. 在正常情况下血衍吗啡类肽的分布具有组织特异性, 即不同组织中血衍吗啡素类肽的种类和含量均不同^[2-3]. 肿瘤、炎症等病变可以引起组织或细胞状态发生改变, 导致组织中蛋白降解片段的种类和含量的改变^[2-3, 6-7], 血衍吗啡素类肽的含量也会发生变化. 因此, 组织中血衍吗啡

素类肽的变化常常可以反应出机体的某些病变.

已有证据提示血衍吗啡素类肽可能与肿瘤的病理生理过程存在某种关联, 实验发现在肺癌、嗜铬细胞瘤等肿瘤组织中hemorphin-7含量增高^[4, 8]. 有学者甚至认为血清中hemorphin-7的水平可以作为判断乳癌预后的一项指标^[6]. 多数学者认为血衍吗啡素的增高与肿瘤组织中组织蛋白酶的活性和含量增加有关^[4, 9]. 但血衍吗啡素类肽在肿瘤中的作用机制尚不明确. 我们分析肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织与正常肝组织中血衍吗啡素类肽含量的差异, 并探讨其意义.

1 材料和方法

1.1 材料 柠檬酸、 Na_2HPO_4 和NaOH购自北京化学公司. 色谱级三氟乙酸、乙睛购自Sigma公司. 超滤离心管(Centriplus YM-3型)购自美国Millipore公司. C-18 Spe-Pak柱(经典型)购自美国Waters公司. 噻唑蓝(MTT)、碘化吡啶(PI)、纳洛酮(naloxone)系美国Sigma公司产品. RPMI 1640为Gibco公司产品. 人肝癌细胞株HLE, HepG2购自中国科学院上海细胞所. 人工合成肽LVVYPWTQR购自北京华大科技公司. 男性肝癌患者12例, 分别切取肿瘤组织和等量周围无瘤肝组织(<30 g 4例, $30-50$ g 7例, >100 g 1例). 切下的组织立即用 0°C PBS冲洗. 使用机械法分离肿瘤细胞和肝细胞: 组织用剪刀绞碎, 然后在金属网上轻轻研磨, 500 r/min $\times 5$ min离心3次, 共获得肿瘤细胞 1×10^9 - 6×10^9 和肝细胞 1×10^9 - 8×10^9 .

1.2 方法 用弱酸洗涤法从肿瘤和肝细胞表面提取结合肽, 肽混合液分别用反相HPLC系统(安捷伦, HP1100型)进行分馏. 样品注入C18柱(4.6 mm \times 150 mm, Waters), 进行梯度洗脱, B液为 $0-1000$ g/L乙睛, A液为 1 g/L三氟乙酸, 梯度设置如下: 0 to 0 B 10 min, 0 to 600 g/L B 60 min, 600 g/L to 1000 g/L B 10 min, 1000 g/L to 1000 g/L B 10 min, 流速 1 mL/min. 紫外检测 215 , 254 and 280 nm. 每分钟收集一个馏分, 冻干, -20°C 保存. 将肿瘤细胞和肝细胞的色谱图进行比较, 挑选肿瘤特异的峰段. 将含有肿瘤特异峰段的馏分, 注入带有电喷雾离子源的Micromass Q-TOF型串联质谱仪(Waters)中. 质谱仪的扫描范围 $500-15\ 000$, 用于测定每个样品中肽段的分子质量和质荷比. 为了对天然肽进行MS测序, 每个肽段的撞击诱导解离(CID)的质谱结果都按单

■应用要点

对血衍吗啡素及组织特异性肽池进行深入的研究将有助于更好地了解机体与肿瘤间的相互作用, 并有可能为我们提供新的肿瘤诊断、治疗途径.

■同行评价

本研究证明HCC细胞存在LVV-血衍吗啡素-6, 并且发现LVV-血衍吗啡-6体外可抑制人肝癌细胞株HLE生长, 诱导其凋亡, 并证明此抑制作用通过阿片受体介导, 研究具有创新性与科学性。

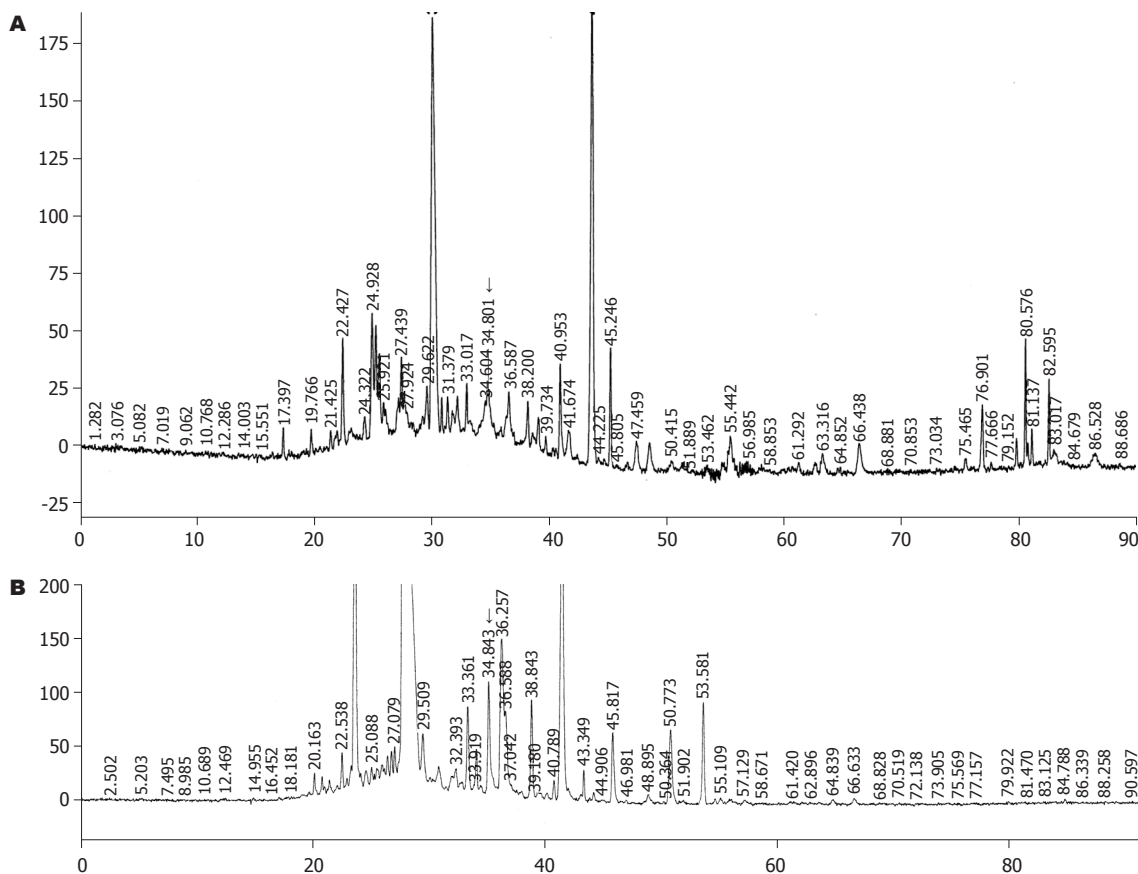


图1 HCC细胞HPLC分馏图谱, 箭头标记的峰段位于34.8附近, 包含肽LVVYPWTQR. A: 患者a肝癌细胞HPLC分馏图谱; B: 患者b肝癌细胞HPLC分馏图谱。

电荷的离子形式记录. 肽段的序列对比利用互联网上的序列查询软件(NCBI-Blast)进行。

1.2.1 MTT比色试验 人肝癌HLE细胞株在37℃, 50 mL/L CO₂条件下, 用含100 mL/L胎牛血清和青霉素、链霉素各100 kU/L的RPMI 1640液培养2-3 d, 取对数生长期细胞用于实验. 将肝癌细胞稀释成 1×10^7 /L, 以每孔200 μ L接种于4块96孔板, 分为实验组、纳洛酮组, 每组设5个复孔. 培养24 h后更换培养液, 实验组加入不同浓度的合成LVV-血衍吗啡素-6; 纳洛酮组先加入 10^{-7} mol/L纳洛酮与细胞培养1 h, 再加入不同浓度的合成LVV-血衍吗啡素-6; 对照组不加药. 分别于加药后24, 48 h, 加入MTT 20 μ L, 继续培养4 h, 加入DMSO 150 μ L震荡溶解10 min, 用酶联免疫检测仪测定每孔吸光度值(A值), 代表活细胞数量。

1.2.2 流式细胞仪检测 将肝癌细胞接种于12孔板, 分为对照组和实验组, 每组设5个复孔. 实验组加入合成LVV-血衍吗啡素-6, 浓度分别为 10^{-7} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-9} mol/L, 纳洛酮组和对照组同前. 培养48 h后, 收集细胞, 用PBS洗2

遍, 700 mL/L预冷乙醇固定, 4℃过夜. 用PBS洗涤, 调整细胞浓度为 10^9 /L, 加入RNase和PI, 避光30 min, 用流式细胞仪进行细胞凋亡测定。

统计学处理 结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS软件进行分析, 相关变量采用t检验. $P < 0.05$ 为差异有显著性标准。

2 结果

2.1 HPLC馏分的差异比较 弱酸洗涤法从细胞表面分离所得肽混合物分别用带有C18柱的反相HPLC进行分馏, 用215, 254, 280 nm进行紫外监测. HCC的HPLC色谱图与相应的肝细胞色谱图进行比对, 一些肿瘤特异性峰段被发现. 这一现象提示, 在组织特异性肽池内发生了一些肿瘤诱导的改变. 我们发现, 在12例HCC患者的样品中, 有7例在34-35时段内出现一特异性峰段(图1)。

2.2 LVV-血衍吗啡素-6的鉴定 对上述肿瘤细胞特异峰段进行质谱分析, 有一条质量相同的肽段被检出, 而且仅出现于HCC样品中, 在肝细胞的相应峰段中没有发现. 这条肽经质谱测序为

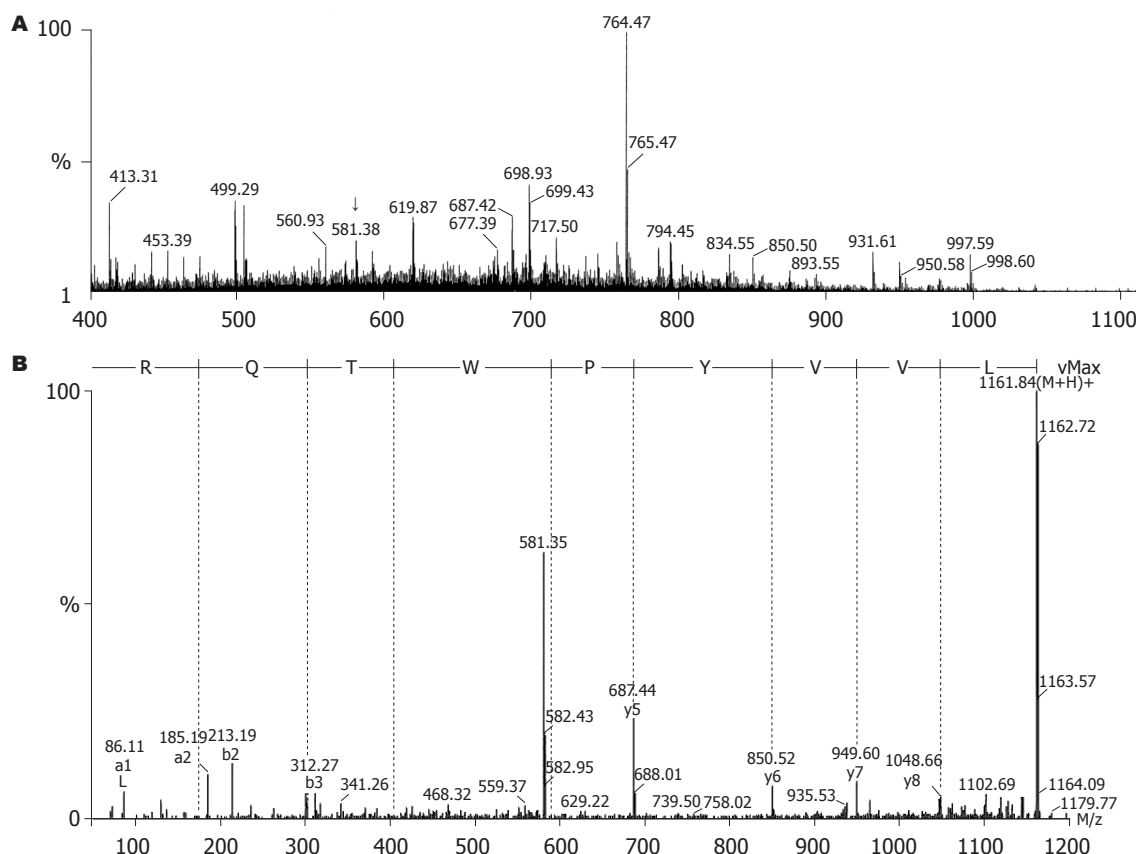


图 2 肝癌细胞HPLC馏分34的质谱图, 该馏分包含峰36.587(图1). A: 在质谱图中发现一个M/z为581.38的[M+2H]²⁺离子(箭头); B: M/z为581.38[M+2H]²⁺的离子的质谱测序图.

表 1 LVV-血衍吗啡素-6对人肝癌细胞HLE生长的影响(4值, mean ± SD, n = 5)

浓度 (mol/L)	24 h		48 h	
	实验组	naloxone组	实验组	naloxone组
(1)0	1.110 ± 0.231	1.212 ± 0.232	1.212 ± 0.212	1.224 ± 0.230
(2)10 ⁻⁷	0.638 ± 0.225 ^a	0.911 ± 0.205	0.598 ± 0.211 ^a	0.861 ± 0.247
(3)10 ⁻⁸	0.714 ± 0.198 ^a	0.908 ± 0.233	0.688 ± 0.267 ^a	0.890 ± 0.211
(4)10 ⁻⁹	0.857 ± 0.301	0.898 ± 0.222	0.841 ± 0.255	0.915 ± 0.291
(5)10 ⁻¹⁰	0.879 ± 0.213	0.864 ± 0.231	0.941 ± 0.198	0.914 ± 0.221
(6)10 ⁻¹¹	0.874 ± 0.301	0.926 ± 0.251	0.823 ± 0.316	0.962 ± 0.253
(7)10 ⁻¹²	0.884 ± 0.261	0.952 ± 0.314	0.891 ± 0.321	0.889 ± 0.356

^aP<0.05 vs naloxone组.

LVVYPWTQR(M_r 1160.76或[M+2H]²⁺的m/z为581.38). 经序列对比证实他源自β-血红蛋白, 并与LVV-血衍吗啡素-6完全吻合(图2).

2.3 LVV-血衍吗啡素-6对肝癌细胞HLE的生长抑制 分别用不同浓度的LVV-血衍吗啡素-6(10⁻¹²-10⁻⁷ mol/L)作用肝癌细胞HLE, 结果表明LVV-血衍吗啡素-6对肝癌细胞有抑制作用. 该作用与浓度密切相关, 当培养基中LVV-血衍吗啡素-6浓度大于10⁻⁸ mol/L时, 能产生明显的抑制

效应[实验组24 h (2) vs (3), P = 0.044; (3) vs (4), P = 0.047; 48 h (2) vs (3), P = 0.031; (3) vs (4), P = 0.040]. 但阿片受体阻断剂naloxone能够逆转这种抑制效应(表1).

2.4 LVV-血衍吗啡素-6对人肝癌细胞HLE凋亡的影响 用流式细胞仪分析, 用不同浓度的LVV-血衍吗啡素-6作用肝癌细胞HLE后, 凋亡率随浓度的增加而逐渐上升, 表明随着LVV-血衍吗啡素-6浓度的增大, 凋亡细胞也明显增多[实验组(2)

vs (3), $P = 0.035$; (3) vs (4), $P = 0.044$]. 但naloxone能够明显减少细胞的凋亡率(表2).

3 讨论

目前尚未见到有关HCC与血衍吗啡素的研究报道, 但大量研究表明, 在HCC组织中cathepsin D表达量普遍增高^[10-11], 该酶主要生成血衍吗啡素-6, 血衍吗啡素-7等类似肽^[12], 故可以推断LVV-血衍吗啡素-6及其类似肽在HCC组织中含量增加是具有普遍性的. 本结果也证实了上述推断. 血衍吗啡素在肿瘤组织中的作用目前尚不明确. 有学者认为, 血衍吗啡素可能通过抑制血管紧张素转换酶, 而增加肿瘤组织的血流量, 促进肿瘤生长^[4]. 另有研究表明, 血衍吗啡素是具有阿片样活性的, 而许多肿瘤细胞都高密度表达阿片受体^[2-3], 那么在HCC组织中, 血衍吗啡素是否会通过阿片受体介导而发挥其相应活性? 这就首先需要明确HCC细胞表面是否结合有血衍吗啡素(阿片受体均位于细胞膜的表面). 因此本实验没有象以往实验那样只是检测组织中血衍吗啡素的含量, 而是先将肝癌组织和癌旁肝组织进行处理, 分离纯化出HCC细胞和肝细胞, 利用弱酸洗涤法^[13-14]提取细胞表面所有的结合肽, 然后利用HPLC和MS进行纯化和筛选. 结果我们在HCC细胞表面分离、鉴定出天然肽LVVYPWTQR(LVV-血衍吗啡素-6), 而在对照的肝细胞表面却没有发现, 从而证明HCC细胞表面确实结合有LVV-血衍吗啡素-6. 在随后的实验中我们发现, LVV-血衍吗啡素-6能够在体外抑制人肝癌细胞株HLE的生长, 诱导其凋亡, 这两种作用均表现出一定的剂量依赖性, 而阿片受体阻断剂naloxone能够逆转这种抑制效应, 从而证实LVV-血衍吗啡素-6对HCC细胞的抑制作用是通过阿片受体介导.

许多实验证明, 内外源性阿片类物质可以抑制肿瘤细胞的增生, 并其诱导凋亡^[15-17]. 阿片类物质的抗肿瘤作用主要通过阿片受体(μ , δ , κ)途径介导, 并可与其他膜受体系统(如生长抑素受体、肾上腺素能受体)交叉作用^[18-19]. 近来研究提示阿片类物质的抗肿瘤机制与抑制转录因子NF- κ B和激活转录因子AP-1有关, NF- κ B活性的降低与AP-1的活化可以诱导凋亡和抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因的表达^[20-21]. 阿片类物质的抗肿瘤作用在体内研究也得以证实^[22], 尽管机制尚未完全明确, 但阿片肽系统在细胞癌变过程中所起的作用已日益受到人们的重视^[23-25].

表 2 各浓度LVV-血衍吗啡素-6作用HLE细胞48 h后的凋亡率(mean \pm SD, %, $n = 5$)

浓度(mol/L)	naloxone组	实验组
(1)0	0.41 \pm 0.11	0.38 \pm 0.09
(2) 10^{-7}	1.23 \pm 0.45	20.23 \pm 1.25 ^a
(3) 10^{-8}	0.98 \pm 0.55	12.64 \pm 2.15 ^a
(4) 10^{-9}	1.34 \pm 0.43	1.65 \pm 0.34

^a $P < 0.05$ vs naloxone组.

本实验不但首次从HCC细胞表面分离出血衍吗啡素类肽, 而且还证实其对HCC细胞具有一定的抑制作用, 提示血衍吗啡素, 这一类天然的内源性阿片肽可能在肿瘤治疗方面所具有潜在的应用价值, 对该领域进行深入的探索和研究将有助于我们更好地了解机体与肿瘤间的相互作用.

4 参考文献

- 1 Tegeder I, Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 351-369
- 2 Karelin AA, Blishchenko EYu, Ivanov VT. A novel system of peptidergic regulation. *FEBS Lett* 1998; 428: 7-12
- 3 Fruitier I, Garreau I, Lacroix A, Cupo A, Piot JM. Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: hemorphins. *FEBS Lett* 1999; 447: 81-86
- 4 Duethman D, Dewan N, Conlon JM. Isolation of the opioid peptide Leu-Val-Val-hemorphin-7 from bronchoalveolar lavage fluid of a patient with non-small cell lung cancer. *Peptides* 2000; 21: 137-142
- 5 Dagouassat N, Garreau I, Sannier F, Zhao Q, Piot JM. Generation of VV-hemorphin-7 from globin by peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 1996; 382: 37-42
- 6 Cohen M, Fruitier-Arnaudin I, Sauvan R, Birnbaum D, Piot JM. Serum levels of Hemorphin-7 peptides in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2003; 337: 59-67
- 7 Blishchenko EY, Sazonova OV, Kalinina OA, Yatskin ON, Philippova MM, Surovoy AY, Karelin AA, Ivanov VT. Family of hemorphins: co-relations between amino acid sequences and effects in cell cultures. *Peptides* 2002; 23: 903-910
- 8 Poljak A, McLean CA, Sachdev P, Brodaty H, Smythe GA. Quantification of hemorphins in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Res* 2004; 75: 704-714
- 9 Rochefort H, Garcia M, Glondou M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, Roger P. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 157-170
- 10 Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Ruggeri I, Gebbia N. Cathepsin D serum mass concentrations in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis. *Eur J Clin Chem*

- Clin Biochem* 1996; 34: 555-560
- 11 Huang XF, Wang CM, Dai XW, Li ZJ, Pan BR, Yu LB, Qian B, Fang L. Expressions of chromogranin A and cathepsin D in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 693-698
 - 12 Fruitier I, Garreau I, Piot JM. Cathepsin D is a good candidate for the specific release of a stable hemorphin from hemoglobin *in vivo*: VV-hemorphin-7. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 719-724
 - 13 Sugawara S, Abo T, Kumagai K. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods* 1987; 100: 83-90
 - 14 Storkus WJ, Zeh HJ 3rd, Salter RD, Lotze MT. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother* 1993; 14: 94-103
 - 15 Kampa M, Papakonstanti EA, Alexaki VI, Hatzoglou A, Stournaras C, Castanas E. The opioid agonist ethylketocyclazocine reverts the rapid, non-genomic effects of membrane testosterone receptors in the human prostate LNCaP cell line. *Exp Cell Res* 2004; 294: 434-445
 - 16 McLaughlin PJ, Levin RJ, Zagon IS. Opioid growth factor (OGF) inhibits the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck transplanted into nude mice. *Cancer Lett* 2003; 199: 209-217
 - 17 Lin X, Chen Q, Xue LY, Ma XJ, Wang R. Endomorphins, endogenous opioid peptides, induce apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 1018-1025
 - 18 Wu WR, Zheng JW, Li FY, Li Y, Zhang KR, Bai HQ. Involvement of mu-opioid receptors and alpha-adrenoceptors in the immunomodulatory effects of dihydroetorphine. *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 79-85
 - 19 Cadet P, Rasmussen M, Zhu W, Tonnesen E, Mantione KJ, Stefano GB. Endogenous morphinergic signaling and tumor growth. *Front Biosci* 2004; 9: 3176-3186
 - 20 Diao CT, Li L, Lau SY, Wong TM, Wong NS. kappa-Opioid receptor potentiates apoptosis via a phospholipase C pathway in the CNE2 human epithelial tumor cell line. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1499: 49-62
 - 21 Sueoka E, Sueoka N, Kai Y, Okabe S, Suganuma M, Kanematsu K, Yamamoto T, Fujiki H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 566-570
 - 22 Zagon IS, Hytrek SD, Smith JP, McLaughlin PJ. Opioid growth factor (OGF) inhibits human pancreatic cancer transplanted into nude mice. *Cancer Lett* 1997; 112: 167-175
 - 23 Fichna J, Janecka A. Opioid peptides in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 351-366
 - 24 Spadaro A, Ajello A, Luigiano C, Morace C, Resta ML, Berlinghieri G, Campo S, Scisca C, Alibrandi A, D'Arrigo G, Alessi N, Ferrau O, Freni MA. Low utility of plasma Nociceptin/orphanin FQ in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4716-4720
 - 25 Szalay F, Hantos MB, Horvath A, Lakatos PL, Folhoffer A, Dunkel K, Hegedus D, Tekes K. Increased nociceptin/orphanin FQ plasma levels in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 42-45

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 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(世界胃肠病学杂志社2006-11-08)

胃癌组织中转化生长因子 α 、表皮生长因子受体和增殖细胞核抗原的表达

王春虹, 刘丽娜, 吕 申

■背景资料

肿瘤的发生、发展是一个十分复杂的生物学现象,受到许多复杂因素的影响和制约,其中也包括TGF- α , EGFR, PCNA的表达。目前较多研究认为, TGF- α 过量表达,引起细胞失控性生长,从而形成癌。EGFR阳性表达与胃癌发生有关。PCNA可作为一项评估细胞增殖状态的指标。本研究观察TGF- α , EGFR, PCNA在胃癌组织中的表达,研究三者对胃黏膜上皮细胞增殖的作用及与癌变的关系。

王春虹, 本溪市本钢总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000
刘丽娜, 大连医科大学附属一院消化内科 辽宁省大连市 116011
吕申, 大连医科大学附属二院中心实验室 辽宁省大连市 116023
王春虹, 2005年大连医科大学硕士, 副主任医师, 主要从事胃癌病理与临床的研究。
通讯作者: 王春虹, 117000, 辽宁省本溪市, 本溪市本钢总医院消化内科。chunhong1970@126.com
电话: 0414-2215138
收稿日期: 2006-05-31 接受日期: 2006-09-01

Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in human gastric cancer tissues

Chun-Hong Wang, Li-Na Liu, Shen Lv

Chun-Hong Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital, Bengang Iron and Steel Corporation, Benxi 117000, Liaoning Province, China
Li-Na Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Shen Lv, Center Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province
Correspondence to: Chun-Hong Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital, Bengang Iron and Steel Corporation, Benxi 117000, Liaoning Province, China. chunhong1970@126.com
Received: 2006-05-31 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To observe the expression of transforming growth factor- α (TGF- α), epidermal growth factor receptor (EGFR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as well as their correlations in gastric carcinoma.

METHODS: Immunohistochemical staining (SP method) was used to detect the expression of TGF- α , EGFR and PCNA in specimens from 62 gastric carcinoma patients, and the pathological characteristics were comparatively analyzed.

RESULTS: The positive rates of TGF- α , EGFR and PCNA expression in normal gastric mucosa were significantly lower than those in gastric carcinoma ($\chi^2 = 10.090, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.373, P < 0.05$; $\chi^2 = 31.230, P < 0.05$), while their positive expression rate were markedly higher in the lowly-differentiated adenocarcinoma and mucosal carcinoma than those in the highly- and moderately-differentiated one ($\chi^2 = 15.290, P < 0.05$; $\chi^2 = 7.779, P < 0.05$; $\chi^2 = 10.895, P < 0.05$). A positive correlation was observed between TGF- α and PCNA expression ($\chi^2 = 5.158, P < 0.05$) as well as between EGFR and PCNA expression ($\chi^2 = 5.322, P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of TGF- α , EGFR and PCNA play important roles in the carcinogenesis and progression of gastric carcinoma, and they may help to evaluate the prognosis of gastric cancer patients.

Key Words: Transforming growth factor- α ; Epidermal growth factor receptor; proliferating cell nuclear antigen; Gastric carcinoma

Wang CH, Liu LN, Lv S. Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in human gastric cancer tissues. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(31):3026-3029

摘要

目的: 观察TGF- α , EGFR, PCNA在胃癌组织中的表达, 研究三者对胃黏膜上皮细胞增殖的作用及与癌变的关系。

方法: 采用免疫组织化学SP法分别检测TGF- α , EGFR, PCNA在正常胃黏膜34例、胃癌62例中的表达, 分析不同病理组织学分型的TGF- α , EGFR, PCNA表达差异。

结果: TGF- α , EGFR, PCNA在正常胃组织阳性表达率均明显低于胃癌组织的阳性表达率($\chi^2 = 10.090, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.373, P < 0.05$; $\chi^2 = 31.230, P < 0.05$)。

= 31.230, $P < 0.05$). TGF- α , EGFR, PCNA在胃低分化腺癌阳性表达均明显高于高中分化腺癌($\chi^2 = 15.290$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 7.779$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 10.895$, $P < 0.05$), 低分化腺癌与黏液癌之间阳性表达无显著性差异($P > 0.05$). 胃癌组织中TGF- α 与PCNA表达呈正相关($\chi^2 = 5.158$, $P < 0.05$). 胃癌组织中EGFR与PCNA表达呈正相关($\chi^2 = 5.322$, $P < 0.05$).

结论: TGF- α , EGFR和PCNA与胃癌发生相关, 可能与胃癌的恶性程度有关, 对判断预后有帮助.

关键词: 转化生长因子 α ; 表皮生长因子受体; 增殖细胞核抗原; 胃癌

王春虹, 刘丽娜, 吕申. 胃癌组织中转化生长因子 α 、表皮生长因子受体和增殖细胞核抗原的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3026-3029
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3026.asp>

0 引言

转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α)是作用于上皮细胞的重要生长因子之一, 与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)结合后可促使细胞增殖和发生转化^[1]; EGFR是原癌基因c-erbB-1的表达产物, 在生理状态下对细胞的生长和分化产生调节作用, 而他的过度表达与细胞的增殖和癌变有关^[2]; 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)对细胞由G₁期向S期过渡起着重要的调节作用^[3], 是反映细胞增殖活性的良好指标. 本研究应用免疫组化法观察胃癌组织中TGF- α , EGFR, PCNA的表达情况, 从细胞增殖状态的角度探讨三者与胃癌发生、发展的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-12/2004-10经PENTAX-EG2940电子胃镜检查诊断并经病理组织学证实的胃癌患者62例, 男性43例, 女性19例, 年龄36-75岁. 正常对照为经胃镜检查诊断并经病理组织学证实的胃黏膜基本正常患者34例, 男13例, 女21例, 年龄32-67岁. 所有研究对象受检前均未经放化疗等治疗.

1.2 方法 活检标本经40 g/L中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片. 采用免疫组化SP法常规步骤操作, 分别进行TGF- α , EGFR, PCNA免疫组化染色, 苏木素复染. TGF- α 主要

表达于细胞质, 阳性结果为细胞质呈棕黄色. 在正常胃黏膜组织中, TGF- α 染色阳性很少, 散在分布. 在胃癌组织中, TGF- α 染色阳性细胞呈广泛分布(图1); EGFR主要表达于细胞膜和细胞质, 阳性结果为细胞膜和细胞质为棕黄色. 在正常胃黏膜中, 该细胞数很少, 颜色浅, 在胃癌组织中, EGFR染色阳性细胞分布广泛(图2); PCNA染色阳性部位主要在细胞核, 呈棕黄色. 在正常胃黏膜中, PCNA阳性细胞很少, 散在分布. 在胃癌组织中, PCNA染色阳性细胞呈广泛分布(图3). 染色结果分级参照Shimizu *et al*^[4]评分方法. 每张切片均观察整体染色情况, 选择5个有代表性的区域, 每区计算200个细胞. 阳性细胞数计分: 阳性数 $\leq 5\%$ 为0; 阳性数 $> 5\%$, 但 $\leq 35\%$ 为1; 阳性数 $> 35\%$, 但 $\leq 70\%$ 为2; 阳性数 $> 70\%$ 为3. 着色强度计分: 不着色为0, 弱着色(呈淡棕黄色)为1, 强着色(呈明显的棕黄色)为2. 阳性分级: 以上两项相加, 1分为(-), 2分为(\pm), 3分为(+), 4分为(++), 5分为(+++); +-+++计为阳性, -- \pm 计为阴性.

统计学处理 用SPSS 11.5统计软件分析, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

TGF- α 在正常胃黏膜组织和胃癌组织阳性率分别为32.4%和66.1%, 两者比较有显著性差异($\chi^2 = 10.090$, $P < 0.05$); EGFR在正常胃黏膜和胃癌中阳性率分别为26.5%和48.4%, 两者比较有显著性差异($\chi^2 = 4.373$, $P < 0.05$); PCNA在正常胃黏膜和胃癌组织中阳性率为26.5%和83.9%, 两者比较有显著性差异($\chi^2 = 31.230$, $P < 0.05$). TGF- α 在高中分化腺癌、低分化腺癌和胃黏液癌阳性率分别为26.3%, 82.8%和85.7%, 胃低分化腺癌阳性表达明显高于高中分化腺癌, 二者比较有显著性差异($\chi^2 = 15.290$, $P < 0.05$), 低分化腺癌与黏液癌之间TGF- α 阳性表达无显著性差异($\chi^2 = 0.061$, $P = 0.806$); EGFR在高中分化腺癌、低分化腺癌和胃黏液癌阳性率分别为21.0%, 62.1%和57.1%, 胃低分化腺癌阳性表达明显高于高中分化腺癌, 二者比较有显著性差异($\chi^2 = 7.779$, $P < 0.05$), 低分化腺癌与黏液癌之间EGFR阳性表达无显著性差异($\chi^2 = 0.096$, $P = 0.757$); PCNA在高中分化腺癌、低分化腺癌和胃黏液癌阳性率分别为52.6%, 96.6%和100%, 胃低分化腺癌阳性表达明显高于高中分化腺癌, 二者比较有显著性差异($\chi^2 = 10.895$, $P < 0.05$), 低分化腺癌与黏液癌之间PCNA阳性表达无显著性差异($\chi^2 = 0$,

■ 相关报道

梁复新 *et al*研究认为胃黏膜炎症时, 组织修复、增殖, TGF- α 有过量表达, TGF- α 过量表达又可使其配体EGFR mRNA表达增加, TGF- α 与EGFR结合后, 可形成一种自泌循环, 即细胞本身分泌生物因子, 作用于自身的膜受体, 形成了刺激其自身增殖的环路, 从而引起细胞失控性生长, 从而形成癌; Inada *et al*认为, 分化程度好的胃癌的PCNA表达高于分化差的胃癌. 这些研究均提示TGF- α , EGFR, PCNA与胃癌发生有关, 可能与胃癌的恶性程度有关.

■ 创新盘点

本文观察了TGF- α , EGFR, PCNA在胃癌组织中的表达, 研究三者对胃黏膜上皮细胞增殖的作用及与癌变的关系, 而且探讨了三者在胃癌中表达的相关性, 为临床评估胃癌的恶性程度、判断预后及指导治疗提供了更有价值的指标.

■应用要点

本研究从细胞增殖状态的角度探讨胃癌的发生、发展,其结论对于评估胃癌的恶性程度、判断预后及指导治疗有一定的临床意义。

$P = 1.0$). 在62例胃癌中TGF- α 阳性者的PCNA阳性表达显著高于TGF- α 阴性者的PCNA阳性表达,分别为92.7%(38/41)及66.7%(14/21),二者呈正相关($\chi^2 = 5.158, P < 0.05$). 在62例胃癌中EGFR阳性者的PCNA阳性表达显著高于EGFR阴性者的PCNA阳性表达,分别为96.7%(29/30)及71.9%(23/32),二者呈正相关($\chi^2 = 5.322, P < 0.05$).

3 讨论

许多学者认为,细胞增殖和凋亡的平衡维持着组织中细胞总数的相对恒定,细胞增殖失控与肿瘤的发生密切相关,一种组织中细胞增殖易感性决定于多种增殖相关基因表达产物的水平和相互作用^[5]. TGF- α 最早是由Delarco *et al*于1978年从鼠肉瘤病毒转化的3T₃细胞培养液中分离得到,是一种多肽促细胞分裂剂. 他与受体EGFR结合后,激活受体上的酪氨酸激酶,促使细胞内的DNA的合成,致细胞增殖、分化^[6]. 本文用免疫组化方法检测发现,胃癌组织中TGF- α 表达率较正常胃黏膜组织明显增高,表明胃癌发生过程中存在着TGF- α 的变化,可能有TGF- α 参与作用;胃低分化腺癌TGF- α 阳性表达明显高于高中分化腺癌,二者比较有显著性差异;低分化腺癌与黏液癌之间TGF- α 阳性表达无显著性差异,表明TGF- α 阳性表达与胃癌分化程度有关,分化愈低,表达愈高,与某些报道一致. 国内Luan *et al*^[7]通过对癌周正常黏膜、肠化生、不典型增生组织中EGFR蛋白的表达的研究,认为胃黏膜炎症时,组织修复、增殖, TGF- α 有过量表达, TGF- α 过量表达又可使其配体EGFR mRNA表达增加^[8], TGF- α 与EGFR结合后,可形成一种自泌循环,即细胞本身分泌生物因子,作用于自身的膜受体,形成了刺激其自身增殖的环路,从而引起细胞失控性生长,从而形成癌,进一步说明胃癌发生与细胞增殖异常有关^[9].

EGFR是原癌基因c-erbB-1的表达产物,广泛分布于哺乳类动物的细胞膜上. EGFR基因位于7号染色体,成熟的人EGFR是一个由1186个氨基酸搭配组成的单链跨膜糖蛋白, M_r 为 17×10^3 . 其结构分细胞外区、跨膜区和细胞内区三部分,细胞内区有酪氨酸蛋白激酶活性. 当EGF或TGF- α 与EGFR结合后,能引起自身磷酸化和细胞内酪氨酸残基磷酸化、激活酪氨酸激酶,继而触发细胞分裂信号、引起细胞分裂^[10]. EGFR的突变能使他在配体不存在的情况下保持激酶活性而具有致癌潜能^[11]. 本文研究结果发

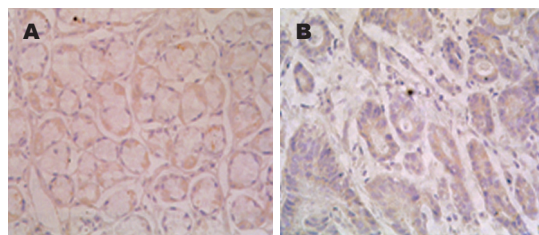


图1 胃黏膜TGF- α 的表达(SP $\times 400$). A: 正常; B: 高分化腺癌.

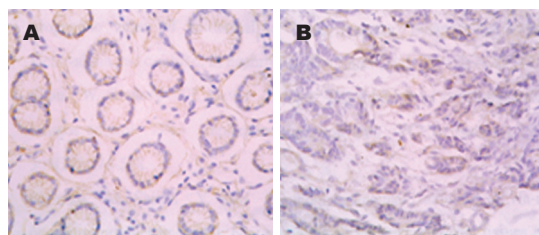


图2 胃黏膜EGFR的表达(SP $\times 400$). A: 正常; B: 中分化腺癌.

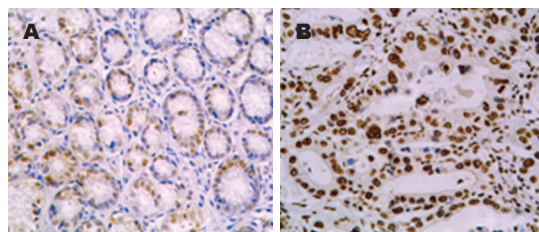


图3 胃黏膜PCNA的表达(SP $\times 400$). A: 正常; B: 高分化腺癌.

现,胃癌组织中EGFR表达率较正常胃黏膜组织明显增高;胃低分化腺癌EGFR阳性表达明显高于高中分化腺癌,二者比较有显著性差异;而低分化腺癌与黏液癌之间EGFR阳性表达无显著性差异,提示EGFR阳性表达不但与胃癌发生有关,而且与胃癌恶性程度有关. Yasui *et al*^[12]报道EGFR代表恶性程度较高的弥漫型胃癌,其阳性率显著高于恶性程度较低的肠型胃癌. 王献松^[13]报道分化差的低分化腺癌或印戒细胞癌比分化好的管状腺癌高,统计学处理均有显著性差异,与本文结果一致.

PCNA是DNA多聚酶的辅助蛋白,存在于细胞核中,在DNA的合成中起重要作用. 肿瘤细胞增殖活跃, DNA复制加速, PCNA表达明显增强,与细胞增殖状态明显相关,是伴随细胞增殖而表达的一种核内蛋白. PCNA可作为一项评估细胞增殖状态的指标. PCNA在增殖细胞中的含量变化有明显的周期性,在G₀期基本无表达, G₁晚期开始增加,至S中期达到高峰, G₂, M期迅速降低^[14],这种变化与细胞内DNA复制的时相变化一致,说明两者间存在着密切联系. 本实验结果

显示, 胃癌组织中PCNA表达率较正常胃黏膜组织明显增高; PCNA表达与胃癌的分化程度显著相关, 低分化胃癌中PCNA表达明显高于高中分化胃癌, 表明癌细胞的生长调节失控, DNA合成加速, 而且肿瘤分化越幼稚, 增殖越活跃, 进一步提示PCNA可能成为反映胃癌恶性程度的参考指标. 有关PCNA与胃癌临床病理特征之间的关系, 目前尚未存在一个统一的结论. Inada *et al*^[15]认为, 分化程度好的胃癌的表达高于分化差的胃癌; 也有人认为分化程度差的胃癌的表达高于分化好的胃癌^[17]; Maeda *et al*^[16]则认为, 两者间无明显关系. 各家研究结果尚存较大差异, 有待于进一步深入研究, 也说明胃癌发生过程中多因子参与及其相互作用的复杂性.

TGF- α 、EGFR分别与PCNA表达存在如下3点一致性: (1)均在正常胃黏膜较低; (2)均在胃癌中增高; (3)均在低分化腺癌中高于中-高分化腺癌, 在黏液腺癌有高于中-高分化腺癌的倾向. 另外, 胃癌中TGF- α 阳性者的PCNA阳性表达显著高于TGF- α 阴性者的PCNA阳性表达; 胃癌中EGFR阳性者的PCNA阳性表达显著高于EGFR阴性者的PCNA阳性表达, 分别呈正相关. 以上结果提示三者的表达与肿瘤的恶性程度相关, 三者的表达增高与胃癌发生、发展关系密切, 三者协同可能使肿瘤细胞获得更大的生长优势.

4 参考文献

- 1 de-Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner RD, Gnarr JR, Pause A, Lee S. Role of transforming growth factor- α in von Hippel-Lindau (VHL)^{-/-} clear cell renal carcinoma cell proliferation: A possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1387-1392
- 2 Ghanem MA, Van Der Kwast TH, Den Hollander JC, Sudaryo MK, Mathoera RB, Van den Heuvel MM, Noordzij MA, Nijman RJ, van Steenbrugge GJ. Expression and prognostic value of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- α , and c-erb B-2 in nephroblastoma. *Cancer* 2001; 92: 3120-3129
- 3 Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578
- 4 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612
- 5 Ishii HH, Gobe GC, Pan W, Yoneyama J, Ebihara Y. Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: associations with c-myc and p53 protein expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 966-972
- 6 Narita T, Taga T, Sugita K, Nakazawa S, Ohta S. The autocrine loop of epidermal growth factor receptor-epidermal growth factor / transforming growth factor- α in malignant rhabdoid tumor cell lines: heterogeneity of autocrine mechanism in TTC549. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 269-278
- 7 Luan F, Wang M, You W. The correlation of TGF- α , EGFR in precancerous lesions and carcinoma of stomach with PCNA expression. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1997; 26: 31-34
- 8 Filipe MI, Osborn M, Linehan J, Sanidas E, Brito MJ, Jankowski J. Expression of transforming growth factor α , epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor in precursor lesions to gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995; 71: 30-36
- 9 Jones C, Pritchard-Jones K. MIB-1 and p27Kip1 expression in nephroblastoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7785-7786
- 10 何双梧. 表皮生长因子及其受体与胃癌的关系. *中国普外基础与临床杂志* 1997; 4: 53-55
- 11 Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002; 7 Suppl 4: 2-8
- 12 Yasui W, Hata J, Yokozaki H, Nakatani H, Ochiai A, Ito H, Tahara E. Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1988; 41: 211-217
- 13 王献松. 表皮生长因子及其受体在胃癌中的表达. *中国肿瘤* 2004; 13: 184-185
- 14 Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309: 374-376
- 15 Inada T, Imura J, Ichikawa A, Ogata Y, Shimamura K. Proliferative activity of gastric cancer assessed by immunostaining for proliferating cell nuclear antigen. *J Surg Oncol* 1993; 54: 146-151; discussion 151-152
- 16 Maeda K, Chung YS, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Yamada N, Kondo Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* 1994; 73: 528-533
- 17 戴林, 张学庸, 陈宝军, 王剑波, 张惠中, 樊代明. 增殖细胞核抗原与胃癌淋巴结转移的关系. *第四军医大学学报* 1996; 17: 169-171

■同行评价

本文应用免疫组化SPF方法观察了胃癌组织中转化生长因子 α 、表皮生长因子受体和增殖细胞核抗原的表达情况, 从细胞增殖状态角度深入探讨了三者与胃癌发生、发展的内在关系, 有一定的学术价值, 对于评估胃癌恶性程度及预后也有一定的临床意义. 文章内容较新颖, 设计合理, 数据客观可信, 论据充分.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

克罗恩病危险因素病例对照研究

王珍

■背景资料

克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种亚型, CD的病因尚不明确, 一些研究表明, CD在最近几十年出现发病率显著上升, 而且这种发病率的显著上升是在一个静止期之后出现的上升, 出现这种上升趋势的原因还不太清楚, 发病率的增高可能是从症状发作到诊断的间隔期缩短, 也可能是由于对该病的认识提高, 减少了一些病例的误诊, 但都不能很好的解释在发病率方面的显著提高, 最有可能的解释就是CD的发病率确实在增加, 遗传因素不可能导致发病率方面这么快的改变, 环境因素可能在疾病的发病方面起了相当大的作用. 为此, 本文进行了CD与饮食因素关系的研究.

王珍, 湖州师范学院医学院预防医学系 浙江省湖州市 313000

王珍, 2005年苏州大学流行病学与卫生统计专业硕士, 讲师, 主要从事卫生统计及流行病学教学.

通讯作者: 王珍, 313000, 浙江省湖州市, 湖州师范学院医学院预防医学系. wangzhen@hutc.zj.cn

电话: 0572-3192025

收稿日期: 2006-08-06 接受日期: 2006-09-01

Risk factors of Crohn's disease: A case-control study

Zhen Wang

Zhen Wang, Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Huzhou Teachers' College, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Zhen Wang, Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Huzhou Teachers' College, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China. wangzhen@hutc.zj.cn

Received: 2006-08-06 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To evaluate the potential risk factors of Crohn's disease (CD) associated with diets.

METHODS: A matched case-control (1:4) study was designed, including 41 CD patients and 164 controls. Chi-square test, *t* test, conditional Logistic regression and Cox regression model were used to comparatively analyze the dietary factors (including milk, fish, bean, egg, poultry, fruits, fruit peeling, vegetables, preserved food, processable oil, sweet foods, cold drink and tea) between CD patients and the controls.

RESULTS: According to the general feature analysis between CD patients and the controls, the proportions of fish, bean, poultry, fruit peeling, processable oil, sweet food and tea were significantly different. Single factor Logistic regression analysis showed that there were significant differences in fish ($OR = 0.48$, 95%CI: 0.25-0.93), bean ($OR = 0.46$, 95%CI: 0.24-0.87), sweet food ($OR = 2.30$, 95%CI: 1.11-4.48) between the two groups ($P < 0.20$). Multiple factor Logistic regression analysis showed that there were significant differences in fish ($OR = 0.460$, 95%CI:

0.217-0.974) and sweet foods ($OR = 2.292$, 95%CI: 1.063-4.959) between the two groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The diets, such as bean and sweat food, are protective and risk factors for CD, respectively.

Key Words: Crohn's disease; Risk factors; Case control

Wang Z. Risk factors of Crohn's disease: A case-control study. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(31):3030-3033

摘要

目的: 探讨国内克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者与饮食有关的可能危险因素.

方法: 本研究采用1:4配对病例对照研究, 对比分析CD患者和对照人群的饮食因素, 采用条件Logistic回归进行单因素与多因素分析.

结果: 特征分析, 鱼类、豆类、禽类、水果是否削皮、色拉油、甜食、茶类在两组的构成情况有差异. 单因素分析具有统计学显著性的变量有3个($P < 0.20$): 鱼类($OR = 0.48$, 95%CI: 0.25-0.93)、豆类($OR = 0.46$, 95%CI: 0.24-0.87)、甜食($OR = 2.30$, 95%CI: 1.11-4.48); 多因素回归分析得到具有统计学意义的相关因素有两个($P < 0.05$): 豆类($OR = 0.460$, 95%CI: 0.217-0.974)和甜食($OR = 2.292$, 95%CI: 1.063-4.959).

结论: 单因素分析和多因素分析都具有统计学显著性的变量有鱼类、甜食, 前者可能为一保护性因素, 而后者可能为一危险性因素.

关键词: 克罗恩病; 危险因素; 病例对照

王珍. 克罗恩病危险因素的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3030-3033

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3030.asp>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者是炎症性

肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种亚型, 是一种慢性透壁性炎症性(transmural inflammation)疾病, 该病可累及肠黏膜至浆膜层, 临床表现以腹痛与腹泻症状最为常见, 并往往有肠梗阻与肠道瘘管形成等并发症发生, 病变可累及从口腔到肛门, 最典型的病变部位在回肠、结肠(包括回盲部)和(或)肛周, 其肠道病变多呈特征性的不对称性与节段性分布特点。CD的病因尚不明确, 一些研究表明, CD在最近几十年出现发病率的显著上升, 而且这种发病率的显著上升是在一个静止期之后出现的上升, 出现这种上升趋势的原因还不太清楚, 发病率的增高可能是从症状发作到诊断的间隔期缩短, 也可能是由于对该病的认识提高, 减少了一些病例的误诊, 但都不能很好的解释在发病率方面的显著提高, 最有可能的解释就是CD的发病率确实在增加。遗传因素不可能导致发病率方面这么快的改变, 环境因素可能在疾病的发病方面起了相当大的作用。国外在CD危险因素的探索性研究方面做了大量的工作。已报道的文献表明, 一些与环境有关的因素包括吸烟、饮食、药物、社会因素、应激、肠道菌群等可能与CD有关。我国至今为止尚未进行CD危险因素的探索, 为此, 我们进行了CD与饮食因素关系的研究。

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例均来自2002-10/2004-10苏州市第三人民医院的门诊与住院确诊病例共41例, 诊断标准: 2000年成都全国炎症性肠病会议修改的对炎症性肠病诊治规范建议的诊断标准和世界卫生组织(WHO)推荐的CD的诊断要点。所有对照均来源于苏州市三香新村社区居民以及居住在社区的打工者共164例, 纳入标准: 选择年龄、性别、民族相一致、与患者无血缘关系且无消化系统疾病社区人群、愿意参加本研究。在获得研究对象的知情同意后, 对其进行调查。

1.2 方法

1.2.1 调查表的设计 通过查阅国外有关CD发病因素的文献, 自制《克罗恩病危险因素调查表》, 该表的内容包括: 调查对象的一般资料、危险因素的调查(基本情况、本人及家庭成员及本人的健康状况、饮食情况)、变量的赋值情况(表1)。

1.2.2 资料的整理和分析 整理调查表, 调查表资料经过专业人员的统一审核和编码, 并进行

逻辑检查。采用SPSS 10.0统计软件包录入数据。统一编码的调查表由两个研究人员双重录入, 以便校对。在正式分析前, 对数据库进行了预处理, 对一些在数据结构方面存在缺陷的变量, 将其进行数据转换(如连续性资料转换为等级资料, 分类变量转换为亚变量, 等级资料中单元格数据较少的进行合并), 如果采用上述转换仍然不能进行分析, 无法估计回归系数, 在正式分析时将不在纳入分析。研究对象的一般特征计数资料采用的SPSS 10.0/Analyse/Descriptive Statistics/Crosstabs模块进行分析, 构成比检验采用 χ^2 检验。计量资料采用 t 检验。采用条件Logistic回归进行单因素与多因素分析, 具体使用的模块为Cox回归模型, 以OR值及95%可信区间(95%CI)对危险因素作用进行评价并对可能存在的混杂因子采用多因素分析的方法进行调整。本研究作为一种探索性分析, 将检验水准定为($\alpha = 0.20$)。本研究作为一探索性的研究, 尽管样本量较小, 还是尝试了将单因素分析和分组多因素分析得到的具有统计学显著性($P < 0.20$)的变量按($P < 0.05$)进行多因素条件Logistic回归分析。

1.2.3 质量控制和偏倚的考虑 预试验: 主要研究人员2名、通过培训的访谈员3名在不同的时间(相差一个半月)调查同一对象, 共50例(患者10例, 对照40例), 3位访谈者之间的一致率及 κ 值80%-85%之间。本研究病例与对照的选择属于医院病例与社区人群对照的类型, 比医院病例和医院对照类型的研究有更好的代表性。

2 结果

2.1 一般特征 研究纳入与饮食相关的因素共有12个, 分别为奶类、鱼类、豆类、蛋类、禽类、水果、水果是否削皮、蔬菜、腌渍类食品、食用油(设了3个亚变量)、甜食、冷饮以及茶类。根据表2两组特征分析, 鱼类、豆类、禽类、水果是否削皮、色拉油、甜食、茶类在两组构成情况有差异。

2.2 单因素分析研究结果 单因素分析具有统计学显著性的变量有3个($P < 0.20$): 鱼类($OR = 0.48$, 95%CI: 0.25-0.93)、豆类($OR = 0.46$, 95%CI: 0.24-0.87)、甜食($OR = 2.30$, 95%CI: 1.11-4.48)(表3)。

2.3 多因素分析研究结果 多因素回归分析得到具有统计学意义的相关因素有豆类($OR = 0.460$, 95%CI: 0.217-0.974)和甜食($OR = 2.292$, 95%CI: 1.109-4.481)(表4)。

■应用要点

要明确哪些食物及其成分与CD相关, 只有通过标准化的方法, 对那些符合疾病诊断标准的新发病例病前饮食情况进行量化, 才能得出较为肯定性的结论。开展饮食相关的因素研究, 无论是对该病的发病机制的研究还是保护健康人群发生类似疾病的危险, 均具有较为重要的意义。

■名词解释

克罗恩病是炎症性肠病的一种亚型,是一种慢性透壁性炎症性疾病,该病可累及肠黏膜至浆膜层,临床表现以腹痛与腹泻症状最为常见,并往往有肠梗阻与肠道瘘管形成等并发症发生,病变可累及从口腔到肛门,最典型的病变部位在回肠、结肠(包括回盲部)和(或)肛周,其肠道病变多呈特征性的不对称性与节段性分布特点。

表 1 克罗恩病影响因素调查项目及赋值

可疑因素	赋值
年龄	连续性变量
性别	1 = 男 0 = 女
牛奶	1 = 常吃(每周3次以上) 0 = 少吃或不吃
鱼类	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
豆类	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
蛋类	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
水果	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
削皮	1 = 是 0 = 否
蔬菜	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
腌渍类食品	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
禽类	1 = 常吃 0 = 少吃或不吃
食用油	分类变量
色拉油	1 = 以色拉油为主 0 = 其他
菜子油	1 = 以菜子油为主 0 = 其他
混合油	1 = 以混合油为主 0 = 其他
甜食	1 = 常吃甜食 0 = 少吃或不吃
冷饮	1 = 常吃冷饮(季节性) 0 = 少吃或不吃
茶类	1 = 常饮茶类(绿茶、花茶、红茶) 0 = 少或不

表 2 病例组与对照组特征比较

变量	病例组	对照组	P值
牛奶(经常吃/少吃或不吃)	24/17	90/74	0.673
豆类(经常吃/少吃或不吃)	19/22	112/52	0.009
鱼类(经常吃/少吃或不吃)	16/25	98/66	0.017
蛋类(经常吃/少吃或不吃)	24/17	106/58	0.468
水果(经常吃/少吃或不吃)	35/16	150/14	0.245
水果削皮(是/否)	22/19	106/58	0.194
蔬菜(经常吃/少吃或不吃)	39/2	153/11	1.000
腌渍类食品 (经常吃/少吃或不吃)	24/17	100/64	0.775
禽类(经常吃/少吃或不吃)	27/14	88/76	0.159
色拉油(以色拉油为主/其他)	10/31	59/105	0.160
菜子油(以菜子油为主/其他)	21/20	72/92	0.400
混合油(以混合油为主/其他)	10/31	34/130	0.610
甜食(经常吃/少吃或不吃)	29/12	81/83	0.014
冷饮(经常吃/少吃或不吃)	23/18	82/82	0.485
茶类(经常吃/少吃或不吃)	13/28	77/87	0.079

表 3 饮食类因素与CD关系单因素条件Logistic回归结果

相关因素	偏回归系数(β)	B的标准误	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI
牛奶	0.129	0.329	0.154	0.695	1.138	0.597-2.169
鱼类	-0.733	0.334	4.811	0.028	0.480	0.249-0.925
豆类	-0.787	0.330	5.700	0.017	0.455	0.238-0.868
蛋类	-0.228	0.334	0.466	0.495	0.796	0.414-1.532
水果	-0.593	0.517	1.316	0.250	0.553	0.201-1.522
水果削皮	-0.400	0.330	1.472	0.225	0.670	0.351-1.279
蔬菜	0.355	0.806	0.194	0.660	1.426	0.294-6.919
腌渍食品	-0.090	0.333	0.072	0.788	0.914	0.476-1.758
禽类	0.451	0.344	1.716	0.190	1.570	0.799-3.085
色拉油	-0.500	0.381	1.725	0.189	0.607	0.288-1.279
菜子油	0.257	0.327	0.618	0.432	1.293	0.681-2.457
混合油	0.187	0.388	0.233	0.629	1.206	0.564-2.578
甜食	0.801	0.356	5.058	0.025	2.229	1.109-4.481
冷饮	0.218	0.332	0.433	0.510	1.244	0.649-2.384
茶类	-0.720	0.388	3.449	0.063	0.487	0.228-1.041

3 讨论

CD的发生与饮食习惯的关系研究目前国内未见报道,国外关于这方面的研究较多,有研究表明,CD系由牛奶变态反应所致,也有认为CD的腹痛与腹泻症状,可能与肠低乳糖酶症(hypolactasia)有关,但一些重复性的研究并没有证明这两者与CD的发病有关^[1],本研究也将牛奶摄入情况作为一可能的危险因子加以研究,但没有得出具有统计学显著性的结论。另有研究表明,碳水

化合物尤其是精制糖与CD的发生之间存在着明显的相关性,高精制糖摄入,低新鲜蔬菜和水果摄入促使CD的发生^[2-4]。本研究也纳入了是否喜欢吃甜食、蔬菜摄入、是否喜吃水果这3个变量,其中喜吃甜食具有统计学显著性的结论($OR = 2.292$, 95%CI: 1.063-4.959)。还有研究表明,omega-3脂肪酸(豆油中富含)与IBD的发生之间关系较为密切,可能与这种脂肪酸影响花生四烯酸的代谢,且具有抗炎性有关^[4],本研究也将

表 4 饮食类因素与CD关系多因素条件Logistic回归结果

相关因素	偏回归系数(β)	B的标准误	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI
鱼类	-0.623	0.385	2.615	0.106	0.536	0.252-1.141
豆类	-0.777	0.383	4.117	0.042	0.460	0.217-0.974
水果	-1.389	0.839	2.739	0.098	0.249	0.048-1.292
水果削皮	-0.561	0.404	1.929	0.165	0.570	0.258-1.260
禽类	0.526	0.392	1.801	0.180	1.693	0.785-3.651
甜食	0.831	0.393	4.475	0.034	2.292	1.063-4.959
茶类	-0.791	0.469	2.851	0.091	0.453	0.181-1.136

豆类的食用情况纳入分析,得出具有统计学显著性的结论($OR: 0.460, 95\%CI: 0.217-0.974$),并且为CD的一种可能的危险因素。在鱼类消费量较高的日本,IBD的发病率较低,但是通过调查问卷的形式获取omega-3脂肪酸的消费量的准确信息是非常困难的。本研究也将鱼类的摄入情况纳入分析,单因素分析结果具有统计学的显著性($OR: 0.48, 95\%CI: 0.25-0.93$),而多因素分析并没有得出具有统计学显著性的结论。

除此之外,本研究也将一些动物性食物因素(蛋类、禽类)、腌渍食品、冷饮以及茶类因素纳入了分析,均未得出具有统计学显著性的结论。饮食因素肯定促成了IBD的发生,因为炎症发生在消化道,一些消化道内的抗原,包括食物残渣、代谢物质、肠道菌群都参与了疾病的发生^[5]。然而,目前还没有明确那些食物及其成分与CD相关。要解决此类问题,只有通过标准化的方法,对那些符合疾病诊断标准的新发病例病前饮食情况进行量化,才能得出较为肯定性

的结论。开展饮食相关的因素研究,无论是对该病的发病机制的研究还是保护健康人群发生类似疾病的危险,均具有较为重要的意义。

致谢: 感谢苏州市市立医院北区消化科主任、博士生导师郑家驹老师、苏州大学放射与公共卫生学院流行病学与卫生统计学教授、硕士生导师郭志荣老师对我的研究的大力支持。

4 参考文献

- 1 郑家驹,高志昕. 炎症性肠病临床、内镜与病理学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2004: 262-296
- 2 Jarnerot G, Jarnmark I, Nilsson K. Consumption of refined sugar by patients with Crohn's disease, ulcerative colitis, or irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1983; 18: 999-1002
- 3 Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754-760
- 4 Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988; 41: 161-171
- 5 Montgomery SM, Ekblom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2002; 18: 416-420

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

国内关于克罗恩病危险因素病例对照研究很少,因此本研究对探讨饮食因素在克罗恩病中的作用有一定意义。目前还没有明确那些食物及其成分与CD相关,虽然本研究通过标准化的方法对那些符合疾病诊断标准的新发病例病前饮食情况进行量化,但结论有待于进一步探讨。

终末期肝病模型在肝病中的应用进展

薛冬云, 韩涛

■背景资料

中国是肝病的高发区, 为了对肝病患者肝功能储备及预后作出判断, 学者们对肝功能作出了分级或量化研究. 目前公认评判一个模型好的标准为指标较少、容易获得, 且客观、易于推广. 现使用较多的Child-Pugh分级主要针对肝硬化患者, 且因其主观性强而引起争议. 终末期肝病模型以血清胆红素、肌酐和INR等3个生化变量为依据, 具有简便可行、重复性好、客观性强等特点, 而逐渐引起大家的重视和应用.

薛冬云, 天津医科大学2004级消化系统在读研究生 天津市300170

韩涛, 天津市第三中心医院 天津市300170

通讯作者: 韩涛, 300170, 天津市, 天津市第三中心医院肝内科.
hantaomd@126.com

电话: 022-84112298

收稿日期: 2006-08-02 接受日期: 2006-09-01

摘要

终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)是近年来新创立的判断晚期肝病病情的方法, 最初他是用于评估行经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)后患者的生存率, 目前已被广泛应用于肝移植、终末期肝病患者预后、评估肝癌患者术后(手术切除癌灶或局部治疗等)生存率等方面, 现认为MELD模型可以有效的预测终末期肝病患者的预后, 能准确的反映病情的危急程度.

关键词: MELD模型; 终末期肝病; 肝移植; 肝癌

薛冬云, 韩涛. 终末期肝病模型在肝病中的应用进展. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3034-3037

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3034.asp>

0 引言

慢性肝病, 尤其是终末期肝病, 并发症较多, 进展较快, 迫使我们寻找一个较完善的评分指标来确定病情的严重程度, 帮助选择治疗方式, 并预测接受治疗后患者的生存率. 虽然目前评估肝功能的方法很多(如Child-Pugh等), 但因其大多存在由经验所得, 且分辨率低, 主观性较强等不足, 尚不能满足准确反映肝病严重程度的要求. 而MELD是2000年由美国Mayo Clinic的Malinchoc和Kamath *et al*提出, 最初是用来判断为预防出血和治疗腹水而行TIPS术的肝硬化患者的预后情况, 国外经过近年来的临床验证, 证明MELD在判断肝病预后、指导肝移植方面起到一定的作用, 由于其简单、易于计算而在肝病诊治中广泛应用. 本文就MELD的产生及应用进展作一综述.

■研发前沿

MELD模型不仅可以用于预测失代偿期肝硬化患者的生存率, 还可用于预测重型肝炎、肝癌、肝移植术后患者的生存率, 其应用面较广, 但是否可以替代Child-Pugh分级在肝病中的应用, 尚需进一步研究.

1 MELD产生

2000年, Malinchoc *et al*^[1]对1991-1995年共231名为治疗肝硬化腹水和预防门静脉高压出血而行TIPS术患者进行跟踪随访至少3 mo, 术前24 h内收集患者的统计学资料, 包括年龄、病因、生化指标、Child-Pugh分级等, 分别将统计资料进行Cox比例风险回归的统计学处理, 将 $P < 0.01$ 的变量保留, 并将所得变量取自然对数后乘以回归系数, 即得到MELD评分原型: $MELD = 0.378 \ln[BIL(mg/dL)] + 1.12 \ln(INR) + 0.957 \ln[Cr(mg/dL)] + 0.643$ (病因: 胆汁性或酒精性为0, 其他为1), 该模型最初用来判断TIPS术后肝硬化患者的预后情况. 为了应用方便, 2001年Kamath *et al*^[2]将公式变为: $MELD = 3.8 \ln[BIL(mg/dL)] + 11.2 \ln(INR) + 9.6 \ln[Cr(mg/dL)] + 6.4$ (病因: 胆汁性或乙醇性为0, 其他为1), 结果取四舍五入后的整数. MELD积分越高说明患者病情越重, 预后越差, 生存率越低.

2 临床应用

MELD模型有以下优点: (1)MELD分级是由前瞻性分析统计资料所得, 因而具有更好的预测作用; (2)MELD模型中无腹水、肝性脑病等主观性指标; (3)MELD分值是连续的, 无上限和下限, 能较好的区分出病情的轻重; (4)MELD模型中使用的3个指标在各实验室之间差别并不是很大, 而且容易获取、可以重复测定. 虽然MELD评分最初是用于评估行TIPS治疗的患者的预后, 但由于MELD评分系统对病情判断的准确性较高, 而逐渐被应用于其他领域, 进一步拓展了其应用范围.

2.1 MELD评分在肝移植方面的应用 (1)评估候肝患者生存率及调配肝移植顺序: 在MELD问世之前, 肝病患者一般是根据等候供肝的时间长短、是否伴有腹水、肝性脑病以及地区获得肝源的多少来决定肝移植的先后, 由于候肝时间的长短并不代表病情的轻重, 则易导致供肝的分配不合理, 并致使肝功能较好的患者因等待时间过长而失去移植机会, 从而增加候肝期

患者的死亡率。由于MELD评分可评估病情的轻重, 2002年被美国器官共享联合网络(UNOS)将其确定为选择肝移植患者的新标准。Wiesner *et al*^[3]采用前瞻性研究方法对3437例有完整实验室资料的准备肝移植的晚期肝病患者进行MELD评分, 预测其3 mo生存期, 并对其正确性作了验证, 发现患者生存与否与MELD分值高低有直接关系, MELD分值<6的患者病死率是1.9%, 而>40的患者病死率为71.3%, 提示MELD评分可准确的评估患者病情的轻重, 并可以预测患者3 mo的死亡率。根据患者病情的轻重来决定肝移植的顺序, 可减少候肝期患者的死亡率, 所以MELD评分可被应用于肝源的调配。而对于MELD积分相同的患者可以动态监测其MELD分值变化(如每隔30 d监测一次), 分值升高的患者即可优先行移植手术, 分值不变或者降低的患者提示病情稳定或好转, 可暂不予移植。自从MELD被UNOS正式作为肝移植的标准之后, 致使肝移植器官分配方案由先前的以“时间先后”为基础转向以“病情轻重”为基础, 从而最大限度的避免了以等待时间长短作为移植顺序造成的器官分配欠合理的问题, 提高了患者的生存率; (2)评估移植术后患者的生存率: MELD评分对肝移植疗效的预测能力也受到广泛的关注和评价, 肝移植能否增加患者的生存率以及MELD分值较低的终末期肝病患者行肝移植术后能否增加其生存时间开始为大家所重视。Onaca *et al*^[4]对669例肝硬化患者移植术后2 a的死亡率进行研究, 根据移植前的评分患者被分为<15, 15-24, >25 3个层面, 发现术后3, 6, 12, 18及24 mo生存率与MELD评分有明显的关系, 分值越高患者移植后生存率越低, 因此移植前行MELD评分对预测肝移植术后患者生存率有一定的意义。这是否意味着将有限的肝源移植给病情最重的患者将是一种资源和经济上的浪费, 移植前死亡率减少所带来的收益有可能被移植后增高的死亡率所抵消? 由于肝移植时MELD积分高的患者是被优先考虑的, 致使移植对象向不良预后的人群倾斜, 那么对移植后的结果可能有负面影响。Ravaioli *et al*^[5]则对1987例肝移植术后患者进行MELD评分, 发现25分以下者5 a生存率为58.6%, 而25分以上者为27.8%, 提示术后行MELD评分可预测患者的生存率。Merion *et al*^[6]研究发现, MELD积分<15行肝移植的患者术后死亡率明显比分值相同未行肝移植的患者同期死亡率高, 他们认为, 移植前死亡风

险较小的患者(MELD<15)不宜盲目行移植手术, 以防缩短生存期。所以在相对较轻或特别重的患者中, 其价值的高低有待进一步评估; (3)儿童肝移植: 由于MELD评分系统是基于成年患者的资料建立起来的, 而未成年患者有继续生长等因素, 于是在MELD基础上人们开始尝试建立适合未成年人的肝移植模式。2001年Wiesner *et al*^[7]对884例患有慢性肝病的儿童进行跟踪随访, 随访终点为患者死亡、行肝移植术或转入重症监护室。结果发现, 与患者病情密切相关的5个指标为: 年龄、血清白蛋白浓度(g/dL), 血清总胆红素浓度(mg/dL), INR以及生长延滞指数; 并在此5个指标的基础上建立了儿童终末期肝病模型(Pediatric end-stage liver disease, PELD), 作为儿童肝移植的标准, 认为PELD模型用于儿童肝移植具有特异性, 并且即使处于与成人MELD分值相同的情况下, 儿童应比成人优先得到肝移植; (4)MELD评分在肝癌肝移植中的应用: 随着肝移植应用于肝癌的治疗, MELD评分在肝癌肝移植中的研究也越来越多。由于某些肝癌患者肝功能代偿良好, 虽然其MELD积分较低, 但肝癌进展较快, 他们可能等不到肝移植就失去机会, 因此在肝源不足的情况下, 需要一个较好的评价系统来指导其和终末期肝病之间的移植顺序。在使用MELD之后, UNOS统计T₁期肝癌患者的死亡率约为15%, 与这个死亡率相对应的MELD分值为24分; T₂期肝癌患者的死亡率约为30%, 相对应的MELD分值为29分^[8], 早期肝癌既有了其相当的MELD分值, 那么就可以依据其分值的高低而等待肝移植。经临床统计, MELD积分实施后, 接受肝移植的HCC患者占全部行肝移植患者的比值从7%增加到22%^[9-10], 而且肝癌患者的候肝时间从2.3 a缩短到0.6 a, 移植前5 mo内患者从候肝名单退出率降低, 使肝癌患者的移植率明显增加。由于术后病理检查显示, 22%的被诊断为肝癌的患者并无患肝癌的证据, 考虑HCC患者在肝移植中有过度优先的可能, UNOS于2003年对肝癌患者的MELD分值作了调整: T₁期肝癌的MELD分值调为20分, T₂期的MELD分值调为24分, 以控制HCC患者的移植率, 调查表明此举虽增加了候肝期肝癌患者的概率, 但没有增加肝癌患者的退出率^[10]。Sharma *et al*^[9]研究发现, MELD系统的实施, 使I, II期HCC患者与肝病失代偿患者相比更有优先权, 移植前HCC患者死亡率从15%降至8%, 等待肝移植的人数增多, 等待肝移植时间明显缩短, 1 mo内接受肝

■相关报道

虽然MELD评分避免了Child-Pugh分级中的很多缺点, 但MELD模型本身也存在一些问题, 比如模型中所使用的血清肌酐除受肝病本身影响肾脏功能外, 还受患者的营养状况、血容量状态、利尿剂、非甾体类药物、是否存在原发性肾脏病变等的影响, Kamath *et al*指出, 为了避免肝外因素造成的血清肌酐波动影响MELD分级的准确性, 在利用MELD模型判断病情时, 应在患者血流动力学稳定和充分补液的基础上使用; 如使用血清肌酐清除率代替血清肌酐, 将使MELD模型更准确的反映肝功能变化。

■创新盘点

本文较系统地论述了MELD评分系统在肝病中的应用及其进展, 尤其对肝癌患者在肝移植中的优先顺序进行了论述, 并加进了△MELD的应用, 可使读者对患者的病情进行纵向观察, 更准确的预测预后。文中提到血钠是反映病情的一个重要指标, 故可以尝试将血钠加入MELD模型中, 以明确能否提高MELD的预测能力。

■应用要点

MELD模型不仅可用于调控肝移植的优先顺序、预测终末期肝病患者的生存率,还可以用于评估人工肝治疗及其肝癌术后生存率的大小,可以协助我们选择合适的治疗对象,期望达到资源最优化。

■名词解释

1 Child-Pugh分级:最初用来评价肝硬化门体分流手术前的肝功能状况,目前也常用于一般肝硬化患者的临床评价,是最常用的肝功能分级指标之一。由白蛋白、总胆红素、凝血酶原时间、腹水和肝性脑病五项指标组成,可用于评估肝硬化患者病情的严重程度。

2 肝功能衰竭:是由多种因素引起的肝细胞的严重损害,导致其合成、解毒、生物转化等功能发生严重障碍,出现以黄疸、凝血功能障碍、肝性脑病和腹水等为主要表现的一种临床综合征。

移植的T₁期HCC患者为27%, T₂期为45%, 3 mo内接受肝移植的患者超过87%, 明显改善了HCC患者等待肝移植期间的5 mo生存率。

2.2 MELD评分在终末期肝病预后判断方面的应用 为明确MELD模型是否普遍应用于判断晚期慢性肝病病情, 2001年Kamath *et al*^[2]选取了4组独立患者的资料:肝硬化失代偿住院患者、非胆汁淤积性肝硬化门诊患者、原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者和80年代非选择性肝硬化患者进行验证, 结果是在失代偿肝硬化住院患者中, MELD分值小于9的患者3 mo的死亡风险是4%, 而大于40时死亡风险为100%, MELD评分受试者运行曲线(receiver operating characteristic graph, ROC)下的面积(area under the curve, AUC)是0.87, 而Child-Pugh分级是0.84; 其他3组患者随MELD分值的增加, 死亡风险也随之增加, AUC也均大于0.8, 并发现MELD超过40分者3 mo死亡率为100%。这表明MELD在判断肝病病情尤其是终末期肝病病情方面, 具有极好的价值。Botta *et al*^[11]对129名终末期肝病患者跟踪随访至少1 a, 结果是随着MELD分值逐渐增高, 患者的死亡风险也随之增高, 提示, MELD在预测患者中短期死亡风险方面是一个很好的指标。后来Kamath *et al*^[2]研究发现, 30 d内MELD评分的变化(Δ MELD)有重要意义, 最初MELD分值相同者, 如 Δ MELD>0表明疾病在进展, 而若 Δ MELD = 0或者<0表明疾病处于相对平稳期或者在好转, 提示 Δ MELD更能反映病情的轻重。2004年, Said *et al*^[12]将MELD应用于非肝移植的慢性肝病患者中, 在对1611例不同类型慢性肝病患者的研究中, MELD预测1 a生存率的c统计值达0.75以上, 3 mo和6 mo的更高, 这就把MELD从应用终末期肝病扩展到慢性肝病的范围, 使MELD的应用更广泛。我国肝病以病毒性肝病为主, 在病毒感染的基础上易并发重型肝炎, MELD评分对重型肝炎是否也适用呢, 我国学者开始对其进行不断的验证。赵燕芹 *et al*^[13]则对156例慢性重型肝炎患者进行MELD评分, 结果显示, MELD分值与实际病死率呈正相关, 即分值越高, 实际死亡率越高, 分值大于40分者预计死亡率为100%, 提示MELD评分与终末期肝病患者病情严重程度及预后有关, 可以准确的反映重型肝炎患者的病情; 另外分别对生存组和死亡组治疗前后(不包括人工肝治疗)进行MELD评分, 结果显示, MELD的动态变化更能反映病情程度, 评分逐渐下降的患者的危险性

小, 评分逐渐增长的患者的危险性大, 治疗前后评分增长超过25分者其死亡危险性是MELD评分增长缓慢患者的3倍以上。因此根据不同病情或MELD评分定期进行MELD的再测定, 更能反映病情的严重程度, 更有利于判断预后。

2.3 评估HCC患者术后生存率 早期肝癌常合并慢性肝病或者肝硬化, 在行手术切除癌灶或局部治疗后早期由于药物的损伤其肝功能常迅速恶化, 自MELD系统实施后, 研究发现他也可以用于评估肝癌患者术后生存率。Cucchetti *et al*^[14]对154例行手术切除癌灶的肝癌患者进行MELD评分, 来预测其短期生存率及其并发症的发生率, 并运用ROC分析来判断MELD评分系统的准确性, 结果显示, MELD评分 ≥ 11 的患者术后并发肝衰竭而导致死亡或进行肝移植的机率较高, ROC分析显示其敏感度为82%, 特异度为89%; MELD评分 ≥ 9 的患者术后至少并发1个并发症, ROC分析示其敏感度为87%, 特异度为63%; 而MELD评分<9的患者术后全部没有发生肝衰, 且术后并发症的发生率也极低, 仅为8.1%。说明MELD评分可以准确的预测HCC患者术后肝衰和并发症的发生率, 我们可以根据他们评分的高低来选择行手术切除的最佳对象, 以避免术后死亡率的增加。Huo *et al*^[15]观察192例行经动脉栓塞化疗(transarterial chemoembolization, TACE)或经皮肝内注射乙酸(percutaneous acetic acid injection therapy, PAI)治疗的原发性肝癌患者(无肝外转移, 且因肝功能差而无手术切除的机会), 分别统计其术前、术后2 wk、术后8 wk的MELD分值, 发现在术后2, 8 wk MELD评分均较术前有升高趋势, 但以术后2 wk升高明显, 术前MELD分值>15者术后预后较差, 经单因素分析发现MELD为评估预后的一个独立危险因素, 说明MELD评分系统可用来监测患者的肝功能储备情况, 并可以用来预测行局部治疗的肝癌患者的预后。

3 现状及展望

虽然MELD模型能较准确的反映患者病情, 但该模型并没有包含所有对预后有影响的因素, 而联合MELD和其他指标共同反映病情能提高其准确性。Giannini *et al*^[16]将99例乙型和丙型肝炎病毒相关性肝硬化患者的AST/ALT比值分别与MELD分值结合以预测患者1 a内的死亡风险, 结果显示, 两者结合后预测死亡风险的敏感性和特异性均较单独使用MELD增加, 提示将AST/

ALT和MELD结合可提高预测患者短期死亡率的准确性。Sheth *et al*^[17]发现, 患者的MELD>11或有腹水, 血清胆红素>136.8 $\mu\text{mol/L}$ 时, 短期的死亡率也明显增加。Ruf *et al*^[18]对262例终末期肝病患者的随访发现3 mo内死亡的患者中有63%的合并低钠血症, 而生存组患者合并低钠血症者仅占13%, 两组相比 $P<0.001$, 差异显著。运用c-统计方法发现低钠血症和MELD均为影响死亡率的危险因素, 其c-统计值分别为0.753和0.894, 而低钠血症联合MELD预测死亡率的c-统计值为0.908, 表明低钠血症是反映病情的1个重要指标, 他们认为低钠血症可以作为难治性腹水的替代者, 联合MELD评分更能准确地判断患者预后。

虽然MELD评分对终末期肝病的严重程度进行了划分, 但是由于其大多数研究数据来自晚期肝硬化患者, 因此MELD用于中早期肝硬化预后评估的价值尚需进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31: 864-871
- 2 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470
- 3 Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-96
- 4 Onaca NN, Levy MF, Sanchez EQ, Chinnakotla S, Fasola CG, Thomas MJ, Weinstein JS, Murray NG, Goldstein RM, Klintmalm GB. A correlation between the pretransplantation MELD score and mortality in the first two years after liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: 117-123
- 5 Ravaioli M, Grazi GL, Ercolani G, Cescon M, Varotti G, Del Gaudio M, Vetrone G, Lauro A, Ballardini G, Pinna AD. Efficacy of MELD score in predicting survival after liver retransplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 2748-2749
- 6 Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, Freeman RB, Port FK, Wolfe RA. The survival benefit of liver transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 307-313
- 7 Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, Krom RA, Kim WR. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver Transpl* 2001; 7: 567-580
- 8 Yao FY, Bass NM, Nikolai B, Merriman R, Davern TJ, Kerlan R, Ascher NL, Roberts JP. A follow-up analysis of the pattern and predictors of dropout from the waiting list for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: implications for the current organ allocation policy. *Liver Transpl* 2003; 9: 684-692
- 9 Sharma P, Balan V, Hernandez JL, Harper AM, Edwards EB, Rodriguez-Luna H, Byrne T, Vargas HE, Mulligan D, Rakela J, Wiesner RH. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the MELD impact. *Liver Transpl* 2004; 10: 36-41
- 10 Wiesner RH, Freeman RB, Mulligan DC. Liver transplantation for hepatocellular cancer: the impact of the MELD allocation policy. *Gastroenterology* 2004; 127: S261-267
- 11 Botta F, Giannini E, Romagnoli P, Fasoli A, Malfatti F, Chiarbonello B, Testa E, Risso D, Colla G, Testa R. MELD scoring system is useful for predicting prognosis in patients with liver cirrhosis and is correlated with residual liver function: a European study. *Gut* 2003; 52: 134-139
- 12 Said A, Williams J, Holden J, Remington P, Gangnon R, Musat A, Lucey MR. Model for end stage liver disease score predicts mortality across a broad spectrum of liver disease. *J Hepatol* 2004; 40: 897-903
- 13 赵燕芹, 胡肖兵, 李粤平, 周颖. 慢性重型肝炎MELD评分分析. 现代临床医学生物工程杂志 2004; 10: 396-397
- 14 Cucchetti A, Ercolani G, Vivarelli M, Cescon M, Ravaioli M, La Barba G, Zanella M, Grazi GL, Pinna AD. Impact of model for end-stage liver disease (MELD) score on prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Liver Transpl* 2006; 12: 966-971
- 15 Huo TI, Lee PC, Huang YH, Wu JC, Lin HC, Chiang JH, Lee SD. The sequential changes of the model for end-stage liver disease score correlate with the severity of liver cirrhosis in patients with hepatocellular carcinoma undergoing locoregional therapy. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 543-550
- 16 Giannini E, Botta F, Testa E, Romagnoli P, Polegato S, Malfatti F, Fumagalli A, Chiarbonello B, Risso D, Testa R. The 1-year and 3-month prognostic utility of the AST/ALT ratio and model for end-stage liver disease score in patients with viral liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2855-2860
- 17 Sheth M, Riggs M, Patel T. Utility of the Mayo End-Stage Liver Disease (MELD) score in assessing prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *BMC Gastroenterol* 2002; 2: 2
- 18 Ruf AE, Kremers WK, Chavez LL, Descalzi VI, Podesta LG, Villamil FG. Addition of serum sodium into the MELD score predicts waiting list mortality better than MELD alone. *Liver Transpl* 2005; 11: 336-343

■同行评价

应用终末期肝病模型(MELD)于肝病诊治预防, 指导肝移植, 肝癌术后愈合, 在原有的肝功能评估及预后指标系统外, 增加一套评估的系统, 互相补充, 更能准确反映疾病实体, 引用材料较新, 评述恰当。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

拉米夫定抗乙型肝炎病毒治疗中耐药突变的后续治疗

陈 畅, 张文俊, 李兆申

■背景资料

全球慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者多达3.6亿,我国占1.2亿,以拉米夫定为代表的核苷类似物开创了HBV治疗的新时代。然而,随着其在国内外广泛临床应用,HBV耐药突变因发生率高,后果严重而成为令临床医师棘手的问题。尽管目前尚无统一的治疗方案,但国内外学者在新一代核苷类似物药物的开发研制,多种药物的联合应用以及中医药治疗方面,进行了广泛研究并已经取得了突破性进展。

陈畅, 宜昌市第一人民医院消化内科 湖北省宜昌市 443000
张文俊, 李兆申, 第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

通讯作者: 张文俊, 200433, 上海市, 第二军医大学长海医院消化内科. wjzhang@chxh.com

电话: 021-25074759

收稿日期: 2006-07-03 接受日期: 2006-08-10

摘要

拉米夫定(lamivudine)抗乙型肝炎病毒治疗中耐药突变发生率高,文献报道在拉米夫定治疗1, 2, 3, 4, 5 a时分别为14%, 38%, 49%, 66%, 69%。耐药突变可导致血清HBV DNA水平阳转或明显上升,肝功能严重受损,甚至病情恶化死亡。关于拉米夫定抗乙型肝炎病毒治疗中耐药突变的后续治疗目前国内外尚无统一用药方案,单药治疗(如:继续使用拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦)在临床使用中已经取得了一定疗效,联合抗病毒治疗和中医药治疗是今后研究的方向。

关键词: 拉米夫定; 耐药突变; 乙型肝炎病毒; 治疗

陈畅, 张文俊, 李兆申. 拉米夫定抗乙型肝炎病毒治疗中耐药突变的后续治疗. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3038-3041

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3038.asp>

0 引言

拉米夫定(lamivudine)是全球被批准的第一个治疗慢性乙型肝炎的口服药,随着其在国内外广泛临床应用,乙型肝炎病毒(HBV)耐药突变(resistant mutation)成为一个令临床医师棘手的问题。耐药突变不同于未经拉米夫定治疗的HBV自然发生的酪氨酸-蛋氨酸-天门氨酸-天门氨酸(tyrosine-methionine-aspartate-aspartate, YMDD)变异^[1-2],而是拉米夫定治疗期间,在药物选择压力下发生的HBV DNA聚合酶YMDD基因序列变异。目前认为突变的发生可能有以下机制:(1)选择学说:治疗前HBV野生株和YMDD突变株同时存在,治疗过程中野生株迅速受到抑制,而突变株耐拉米夫定,故突变株才得以选择并成为优势株^[3]。(2)诱变学说:即在拉米夫定的作用下HBV出现新的突变品种YIDD,

YVDD, YI/VDD[蛋氨酸被缬氨酸取代(M552V)称为YVDD变异;被异亮氨酸取代(M522I)称为YIDD变异]。文献[4-6]报道除YIDD, YVDD外,可能存在其他部位的变异或多重位点的突变。YMDD变异多发生于拉米夫定治疗6 mo后^[7]。在亚洲进行的一项研究^[8]中,基因耐药性在拉米夫定治疗1 a时为14%,而在2, 3, 4, 5 a时高达38%, 49%, 66%, 69%。治疗期间发生YMDD变异后患者临床表现形式多样。最初表现为突破感染(breakthrough infection),即血清HBV DNA水平下降或阴转后继续治疗时阳转或明显上升,部分患者可无临床症状、丙氨酸转氨酶正常,类似免疫耐受;也有部分患者出现轻度乏力、恶心等症状,ALT升高,甚至病情恶化导致死亡。本文就拉米夫定抗HBV治疗中出现病毒耐药突变的后续治疗作一综述。

1 后续治疗概况

对于拉米夫定治疗过程中发生耐药突变患者,当前欧洲肝病学会(EASL)和美国肝病学会(AASLD)推荐的处理方法^[9]是:(1)如HBV DNA和ALT水平低于治疗前水平,则继续使用拉米夫定;(2)无肝硬化基础或免疫抑制患者可以中断拉米夫定治疗;(3)改用阿德福韦治疗或联合阿德福韦治疗。亚洲太平洋地区慢性乙型肝炎处理的共识(2005年最新报告中)指出,考虑到拉米夫定治疗的患者出现YMDD变异株的不良后果^[10],以及发现一些YMDD变异株复制缺陷的完全回复,建议停用拉米夫定。他们认为继续应用拉米夫定无好处^[11],且停药后是较安全的,在耐药突变的患者中断拉米夫定治疗与肝炎复发和失代偿发生并没有关联^[12]。如有阿德福韦供应,可加用或改用阿德福韦。如不能取得“挽救治疗”药物,可选择停用拉米夫定及密切监测。2004年拉米夫定临床应用专家共识^[13]提出,可改用或联合使用阿德福韦治疗,对于肝功能失代偿或肝硬化患者不宜随意停用拉米夫定。以上三个机构推荐处理原则基本一致。具体用药方法如下。

■研发前沿

如何及时发现耐药突变,以便及时调整治疗方案耐药的诊断,包括有无突变、突变株量的多少、所占比例大小等,是当前拉米夫定治疗中迫切需要解决的问题。耐药突变与患者病情加重之间的机制尚未明确,肝脏基础病变和肝脏的代偿能力可能是重要影响因素,还有待于进一步研究。

2 单药治疗

2.1 拉米夫定 拉米夫定治疗中出现耐药突变后是否继续拉米夫定治疗, 其结果如何, 目前尚未达成共识。有学者^[14]证实了拉米夫定耐药后继续使用拉米夫定治疗患者能够获得组织学、生化甚至病毒学好转或稳定。国内近期研究^[15]显示, 发生拉米夫定耐药后, 无论继续使用或停用拉米夫定(改用保肝药物)都是相对安全的, 并没有出现病情恶化的病例。然而台湾学者Liaw *et al*^[11]在对134例出现乙肝病毒rt M204I/V变异的患者进行为期1 a的观察后发现, 66例继续拉米夫定治疗的患者与68例中断拉米夫定治疗的患者比较肝炎复发、失代偿率和HBeAg血清转换率分别为54%, 7%, 19%和67%, 11%, 35%; 两组间差异均无统计学意义。得出当发生rt M204I/V变异, 拉米夫定耐药后继续用药与不用药临床结局没有明显区别的结论。笔者认为, 由于野生病毒比变异病毒的复制能力更强, 停用拉米夫定后野生病毒恢复复制并抑制变异病毒, 随后成为优势病毒, 恢复对拉米夫定的敏感性, 拉米夫定再治疗时有效。一般停药间隔的时间约6 mo; 应在经检测证实耐药病毒株消失后实施再治疗; 再治疗过程中, 耐药突变的时间可能提前、比例可能更高, 应密切加强对患者病情的随访观察。

2.2 阿德福韦(adeфовир) 为腺嘌呤核苷类似物, 2002-09在美国批准用于治疗慢性乙型肝炎, 2005-04在中国批准上市。Peters *et al*^[16]研究发现, 采用单用阿德福韦10 mg与阿德福韦联合拉米夫定和继续单用拉米夫定100 mg治疗拉米夫定耐药代偿性慢性乙型肝炎患者, 48 wk时HBV DNA阴转率及ALT复常率在阿德福韦单用组或阿德福韦和拉米夫定联合组疗效相当。认为出现耐药患者继续用拉米夫定无益处应改用阿德福韦治疗。因此, 2004年AASLD最新的乙型肝炎建议中指出, 对拉米夫定耐药突变的代偿性肝病, 不需在改用阿德福韦后继续拉米夫定治疗, 但建议两药同时应用2-3 mo以减少转换期肝炎复发的危险^[17]。国外已有许多采用阿德福韦后续抗病毒治疗的成功报道^[18]。最新Yeon *et al*^[19]研究了67例对拉米夫定耐药且接受阿德福韦治疗的慢性乙肝患者耐阿德福韦病毒变异体的表型和基因型特点。在对拉米夫定耐药的患者的中, 阿德福韦治疗出现阿德福韦变异体的时间早、频率高。由于样本量少, 还有待与进一步比较研究。阿德福韦的缺点是潜在肾毒性, 大于48 wk的长期使

用者和肾毒性药物使用者须定期检测肾功能。

2.3 恩替卡韦(enticavir) 恩替卡韦是环戊基鸟苷类似物, 口服吸收后经细胞内激酶磷酸化生成活性形式恩替卡韦三磷酸盐, 竞争性抑制HBV DNA聚合酶, 作用于病毒逆转录的3个环节: 启动、逆转录、DNA依赖性合成。于2005-03在美国获准上市。2006年初, 获准在我国上市。目前3项有关恩替卡韦的全球范围内最大规模的慢性乙型肝炎患者多中心III期临床实验^[20-22]已经完成。患者来自全球五大洲, 共计1600余例(其中有近900例在我国)。该临床试验显示了恩替卡韦对初治或者拉米夫定失效的患者的良好临床疗效, 在组织学、病毒学、生化学等各项指标的改善上均明显优于拉米夫定, 同时具有良好的安全性和耐受性。慢性乙型肝炎患者接受恩替卡韦治疗过程中, 对于初治患者尚未发现耐药株, 在对拉米夫定耐药的患者的中, 极少数产生耐药。总之, 恩替卡韦具有高效选择性抗病毒作用, 对拉米夫定耐药患者有强效的抗病毒疗效, 优于拉米夫定。然而其高昂的价格(39元/天)将限制恩替卡韦的广泛应用。

2.4 其他 特洛福韦(tenоfovir)是一种无环簇核苷类逆转录酶抑制剂, 为阿德福韦的同类药物。体外研究显示^[23], 特洛福韦对野生型HBV和耐拉米夫定变异株HBV均具有抗病毒效应。最新研究^[24]中对53例HBV DNA滴度较高(>6 log₁₀拷贝/mL)的拉米夫定耐药患者应用阿德福韦和特洛福韦治疗48 wk时, 阿德福韦组中仅有44%的患者HBV DNA水平低于10⁵ 拷贝/mL, 而特洛福韦组为100%(*P*<0.001)。两组患者均未发生严重副作用。在长期治疗中(最高达130 wk)特洛福韦组中未发现有病毒抵抗的表型出现。从而证明在治疗对拉米夫定耐药的HBV感染患者时, 特洛福韦有可能成为一种有效的替代品。除此之外, 还有多种核苷类药物处在II-III期临床研究阶段, 如汰比夫定(telbivudine)、克来夫定(clevudine)、恩曲他滨(emtricitabine)、洛布卡韦(lobucavir)等。

3 联合治疗

鉴于拉米夫定长期治疗耐药突变逐年增加, 阿德福韦延长疗程后发生耐药突变的报道也逐渐增多, 在核苷类似物治疗慢性乙型肝炎中, 联合治疗必然是未来的发展方向。联合抗病毒治疗的目标是提高持续应答率和预防或减少耐药突变。目前国际上并无推荐临床使用的联合治疗

■创新盘点

目前系统全面阐述拉米夫定抗HBV治疗中耐药突变的后续治疗的文献尚不多见。本文较详细地阐述了拉米夫定抗HBV治疗中出现病毒耐药突变的后续治疗的概况, 单药治疗, 联合治疗及中医药治疗。总结和概括了国内外最新治疗进展。

■应用要点

本文中对于拉米夫定治疗乙型肝炎病毒过程中耐药突变的后续治疗进行了详尽的阐述,具体到用药原则、适应症、药物配伍、用法用量、疗效评价与比较,具有较强实用价值,可指导相关临床医生科学、合理的治疗乙型肝炎患者。

方案。拉米夫定联合其他核苷类似物,如泛昔洛韦、阿德福韦、洛布卡韦、特比夫定(telbivudine)等的体外实验、动物实验和临床试验研究均有报道。有研究^[25]表明,泛昔洛韦(famciclovir)不能克服拉米夫定的耐药,联合用药可能并不减少耐药发生率,但在抗乙肝病毒的试验中与拉米夫定有协同作用。研究表明,阿德福韦+拉米夫定^[26]、胸腺肽+氧化苦参碱^[27]对拉米夫定相关的乙型肝炎病毒YMDD变异具有明显抗病毒效应,而且改善患者肝功能指标的效果,较单独继续使用拉米夫定明显。而干扰素+拉米夫定^[28]、阿德福韦以及中药乙肝解毒汤+拉米夫定^[29]抗病毒效果与继续使用拉米夫定无明显差别,但对肝功能复常率阿德福韦优于继续单独使用拉米夫定,干扰素+拉米夫定^[28]对肝功能复常率远期疗效较好。总体来看,乙肝病毒YMDD变异后,阿德福韦+拉米夫定、氧化苦参碱联合胸腺肽等疗法的抗病毒作用及生化指标改善均优于继续单独使用拉米夫定。但以上研究样本量偏少,有待扩大样本进一步研究。并且还应根据药品费用高低、药物不良反应大小、是否药物相互作用、是否使用方便、患者依从性如何等诸多因素进行综合评价。

4 中医药治疗

目前公认的对慢性乙型肝炎治疗有效的中药制剂是苦参素注射液。苦参素注射液是从苦豆子中分离提取的氧化苦参碱溶液,具有抗病毒、免疫调节、抗肝纤维化及保肝、退黄、降酶的作用。胡国启 *et al*^[30]将其应用于拉米夫定耐药治疗的初步结果表明,该药可有效地应用于拉米夫定耐药的治疗,具有良好的耐受性。关于中药防治YMDD变异的研究报道多为中药或中成药与西药联合使用,如:中药+拉米夫定^[31]中药乙肝解毒汤+拉米夫定^[29]。陈泽雄 *et al*^[32]对104例慢性乙型肝炎患者用拉米夫定治疗半年后随机分为治疗组和对照组,治疗组联用中药,对照组则继续单用拉米夫定,第52周时观察并比较两组患者血清YMDD、HBV DNA、e系统、ALT等指标,发现YMDD检出率分别为9.6%, 25%($P<0.05$); HBV DNA阴转率分别为86.5%, 69.2%($P<0.05$)。认为中药与拉米夫定联用对提高慢性乙型肝炎的疗效、减少YMDD变异的产生有一定的作用。最近研究发现^[33]对拉米夫定耐药的乙型肝炎患者在继续使用拉米夫定的基础上加用银杏叶片2片, 3次/天,其生物化学应

答,血清免疫学应答,病毒学应答及综合疗效与继续服用单一拉米夫定比较均有显著或非常显著差异($P<0.05$ 及 $P<0.01$)。中药与拉米夫定联合治疗可能是通过中药的预处理增强了拉米夫定的敏感性,中药的多靶点抗病毒作用与拉米夫定的协同作用,弥补拉米夫定用药间歇期达不到有效作用浓度的不足,但此机制尚需进一步研究证实。中药价廉、方便、患者容易接受。中医强调辨证论治和整体观,针对患者的不同情况,辨证用药,这一优点也是西医所无法比拟的。但这些研究也存在样本量偏少、具体用药量化困难、缺乏多种方案对照等问题。关于中药抗HBV DNA YMDD耐药突变的机制等基础研究还有待进一步深入。

总之,随着拉米夫定抗乙肝病毒治疗的普及,治疗中出现病毒耐药突变已经引起国内外医学研究人员的广泛关注。拉米夫定与其他药物(包括中药在内)的联合治疗,以及发展新的抗病毒药物来延缓耐药毒株的出现,可能为拉米夫定抗HBV治疗水平中产生耐药性提供可行的治疗对策。我们期待一系列系统而规范的病毒耐药突变后治疗的临床指南的推出,为抗乙肝病毒治疗带来新的希望。

5 参考文献

- 1 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586
- 2 Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, Toyama T, Minami M. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002; 37: 259-265
- 3 Mutimer D, Pillay D, Shields P, Cane P, Ratcliffe D, Martin B, Buchan S, Boxall L, O'Donnell K, Shaw J, Hubscher S, Elias E. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus infection in the liver transplant recipient. *Gut* 2000; 46: 107-113
- 4 Peters MG, Singer G, Howard T, Jacobsmeier S, Xiong X, Gibbs CS, Lamy P, Murray A. Fulminant hepatic failure resulting from lamivudine-resistant hepatitis B virus in a renal transplant recipient: durable response after orthotopic liver transplantation on adefovir dipivoxil and hepatitis B immune globulin. *Transplantation* 1999; 68: 1912-1914
- 5 Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condeelis L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
- 6 Bozdayi AM, Uzunalimoglu O, Turkyilmaz AR, Aslan N, Sezgin O, Sahin T, Bozdayi G, Cinar K,

- Pai SB, Pai R, Bozkaya H, Karayalcin S, Yurdaydin C, Schinazi RF. YSD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003; 10: 256-265
- 7 Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714-1722
- 8 Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 172-180
- 9 EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol* 2003; 38: 533-540
- 10 Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, Tanwandee T, Tao QM, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray DF, Sabbat J. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-1531
- 11 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT. No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther* 2004; 9: 257-262
- 12 Wong VW, Chan HL, Wong ML, Tam JS, Leung NW. Clinical course after stopping lamivudine in chronic hepatitis B patients with lamivudine-resistant mutants. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 323-329
- 13 拉米夫定临床应用专家组. 2004年拉米夫定临床应用专家共识. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 425-428
- 14 Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Saitoh S, Tsubota A, Suzuki F, Kobayashi M, Akuta N, Someya T, Miyakawa Y, Kumada H. Histological improvements after a three-year lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B in whom YMDD mutants did not or did develop. *Intervirology* 2003; 46: 164-170
- 15 陆德云, 赵连三, 王甦. 拉米夫定耐药的乙肝患者继续使用拉米夫定治疗的临床疗效. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1475-1478
- 16 Peters MG, Hann HW, Martin P, Heathcote EJ, Buggisch P, Rubin R, Bourliere M, Kowdley K, Trepo C, Gray Df D, Sullivan M, Kleber K, Ebrahimi R, Xiong S, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2004; 126: 91-101
- 17 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861
- 18 Westland CE, Yang H, Delaney WE 4th, Wulfsohn M, Lama N, Gibbs CS, Miller MD, Fry J, Brosgart CL, Schiff ER, Xiong S. Activity of adefovir dipivoxil against all patterns of lamivudine-resistant hepatitis B viruses in patients. *J Viral Hepat* 2005; 12: 67-73
- 19 Yeon JE, Yoo W, Hong SP, Chang YJ, Yu SK, Kim JH, Seo YS, Chung HJ, Moon MS, Kim SO, Byun KS, Lee CH. Resistance to adefovir dipivoxil in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil. *Gut* 2006; 55: 1488-1495
- 20 Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, DeHertogh D, Wilber R, Colonna R, Apelian D. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1001-1010
- 21 Lai CL, Shouval D, Lok AS, Chang TT, Cheinquer H, Goodman Z, DeHertogh D, Wilber R, Zink RC, Cross A, Colonna R, Fernandes L. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1011-1020
- 22 Sherman M, Yurdaydin C, Sollano J, Silva M, Liaw YF, Cianciara J, Boron-Kaczmarzka A, Martin P, Goodman Z, Colonna R, Cross A, Denisky G, Kreter B, Hindes R. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2006; 130: 2039-2049
- 23 van Bommel F, Wunsche T, Schurmann D, Berg T. Tenofovir treatment in patients with lamivudine-resistant hepatitis B mutants strongly affects viral replication. *Hepatology* 2002; 36: 507-508
- 24 van Bommel F, Wunsche T, Mauss S, Reinke P, Bergk A, Schurmann D, Wiedenmann B, Berg T. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1421-1425
- 25 黄爱龙, 齐珍元, 郭树华, 陈压西. 拉米夫定联合泛昔洛韦抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 209-211
- 26 Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, Willems B, Leung N, Lee WM, Moorat A, Gardner S, Woessner M, Bourne E, Brosgart CL, Schiff E. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004; 126: 81-90
- 27 方广强, 甄中锋. 氧化苦参碱联合胸腺肽治疗拉米夫定所致YMDD变异后的慢性乙型肝炎疗效观察. *传染病信息* 2002; 15: 139-140
- 28 吴国祥, 查雁生, 郑剑, 王永忠, 周国平. 干扰素联合拉米夫定治疗YMDD变异株慢性乙型肝炎. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 752-753
- 29 郭朋, 孔伟. 乙肝解毒汤抗乙肝病毒YMDD变异的临床观察. *山东中医药大学学报* 2003; 27: 203-204
- 30 胡国启, 张学武, 周敏. 苦参素治疗拉米夫定耐药性乙型肝炎的临床研究. *肝脏* 2002; 7: 184-185
- 31 周飞, 王灵台, 陈建杰, 张斌, 赵钢, 高月求. 拉米夫定和补肾方联合应用治疗慢性乙型肝炎的疗效及对YMDD区域的影响. *中国中西医结合杂志* 2003; 23: 417-420
- 32 陈泽雄, 张诗军, 胡洪涛. 中药预防慢性乙型肝炎YMDD变异的临床观察. *中西医结合肝病杂志* 2005; 15: 168-170
- 33 陈炎, 陈亚蓓, 陶荣芳. 银杏叶片治疗拉米夫定耐药慢性乙型肝炎的临床研究. *世界感染杂志* 2006; 6: 46-48, 57

同行评价

本文选题具有较强的理论和实践意义, 可有力指导相关临床医生科学、合理的治疗乙型肝炎患者. 文章概念论述清晰, 层次分明, 重点突出, 阐明了该领域的最新进展.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

EphB2受体及其配体Ephrin-B在结直肠癌中的研究进展

王永占, 高青

■背景资料

大肠癌是常见的恶性肿瘤, 占消化道恶性肿瘤的第2位, 发病率逐年上升。回顾过去30 a, 尽管大肠癌以手术治疗为主的综合治疗得到认同并取得一定成效, 但总体上其预后没有得到根本改善, 术后5 a生存率始终徘徊在50%左右。最近研究发现受体EphB2及其配体Ephrin-B在肠上皮细胞的多步癌变过程中发挥了重要的抑制作用, 使其很有可能成为预防和治疗结肠癌的一个新的分子靶点。

王永占, 高青, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市400016

通讯作者: 高青, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院消化内科. gaoqing27@yahoo.com.cn
电话: 023-89012929 传真: 023-89012929
收稿日期: 2006-09-03 接受日期: 2006-09-28

摘要

EphB2受体及其配体Ephrin-B系统的功能失调将导致肠上皮具有增殖能力细胞沿着隐窝-鞭毛轴杂乱排列; 而且在结直肠癌患者癌组织中, EphB2的表达越低, 浸润深度越深, 分化越差, 远处转移越多, 存活率越低; 体外实验也证明其高表达在癌细胞菌落形成实验可抑制癌细胞的生长, 配体Ephrin-B对EphB2受体的激活可降低肿瘤细胞的侵袭性。在本文中我们将就EphB2/Ephrin-B系统关于肠上皮干细胞迁徙导向的调控, 及其在大肠癌的多步癌变过程中的抑制作用的最新研究进展加以综述。

关键词: 受体酪氨酸激酶EphB2; 结直肠癌; 肿瘤形成

王永占, 高青. EphB2受体及其配体Ephrin-B在结直肠癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3042-3045
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3042.asp>

0 引言

众所周知, 肿瘤的发生及其演变与细胞信号转导的异常有着密切的关系。其中酪氨酸蛋白激酶受体(receptor tyrosine kinase, RTK)信号传导途径在细胞信号传导中的作用尤为重要。生促红素人肝细胞(Erythropoietin-producing hepatoma cell line, Eph)受体是酪氨酸蛋白激酶受体家族最大的分支, EphB2是其中的一员, 与其配体Ephrin-B之间的信号传递介导了许多重要的生理过程, 在胚胎形成, 神经元的迁移定向, 轴突路径引导, 血管形成等方面有着重要的作用。对于EphB2受体和Ephrin-B的病理作用, 以往的研究普遍认为他们参与的信号传导扮演了促癌角色, 但最近研究^[1-3]发现EphB2受体及其配体Ephrin-B不仅调控了肠上皮具有增殖能力细胞的迁移导向和正确的定位, 而且在肠上皮细胞的多步癌变过程中发挥了重要的抑

制作用。这些研究进展使得受体EphB2及其配体Ephrin-B很有可能成为预防和治疗结肠癌的一个新的分子靶点。现就EphB2受体及其配体Ephrin-B的结构、功能以及在肠上皮细胞癌变中的作用加以总结。

1 EphB和Ephrin-B的命名、结构和生理功能

Eph的命名源自该亚族的最早的成员Eph, 是用非严谨杂交技术以vfps的酪氨酸激酶区序列为探针从人肝细胞癌细胞株cDNA文库中克隆得到(现命名EphA1)。人Eph基因定位于第7号染色体, 编码3.5 kb mRNA, 在进化上高度保守, 用人Eph cDNA探针可从小鼠、大鼠、鸡和黑腹果蝇中检测到其特异的DNA条带。Eph受体被分成2个亚群EphA和EphB。EphB2是1994年Kiyokawa *et al*^[4]从构建的胃癌组织cDNA文库中筛选出来的Eph亚类新基因产物, 其胞外区有一个富含20个半胱氨酸的结构域、一个N端球状结构域及两个纤黏连蛋白III同源区(FN III), 胞内区包括具有酪氨酸蛋白激酶活性的结构域、SAM(sterile alpha motif)结构域和C端的PDZ(post-synaptic density protein, discs large, zona occludens)结构域结合序列。与EphB2受体结合的主要是跨膜配体Ephrin-B类。Ephrin-B类配体有3种, 分别为Ephrin-B1, Ephrin-B2和Ephrin-B3。其结构可分为4个区即信号区、结合区、spacer区和疏水区。Ephrin-B类配体的显著特征是其高度保守的C端尾, 在该区有5个潜在的酪氨酸磷酸化位点和1个C端PDZ-结构域结合基序。研究表明, Ephrin-B类配体可与多个受体以不同亲和力交叉结合发挥不同作用。

EphB受体作为酪氨酸蛋白激酶家族中的成员, 被其配体Ephrin-B激活而导致细胞内蛋白磷酸化, 在胚胎发育、神经轴突导向、血管生成等方面具有重要作用。最近研究发现EphB2受体和Ephrin-B配体系统共同调控了具有增殖能力的细胞的迁移导向和正确定位; 这些功能的实现主要是通过EphB2受体与邻近细胞表面的Ephrin-B配体相互作用而实现的, 他们的结

■研究前沿

对于EphB2受体和Ephrin-B的病理作用, 以往的研究普遍认为他们参与的信号传导扮演了促癌角色, 但最近研究发现EphB2受体及其配体Ephrin-B不仅调控了肠上皮具有增殖能力细胞的迁移导向和正确的定位, 而且在肠上皮细胞的多步癌变过程中发挥了重要的抑制作用。这些研究进展为我们预防、治疗大肠癌提供了新的方向。

合将启动双向细胞信号通道传递(即Ephrin-B配体也能实现细胞信号传递功能), 从而导致两个细胞之间的排斥^[5-6]. EphB2受体和Ephrin-B配体系统通过这种接触排斥来调控细胞的迁徙和黏附, 从而维持组织和细胞正常的空间排列和形态, 这些功能对于维持生物体胚胎的正常发育和成熟组织的生理功能具有非常重要的作用. 例如在许多胚胎组织的发育过程中, EphB2受体和Ephrin-B配体系统可限制临近细胞群的混杂, 使胚胎组织发育过程井然有序. Xu *et al*^[7]的研究证明了这一点, 他们的实验表明在胚胎发育过程中EphB2受体和Ephrin-B配体系统对后脑的形成发挥了重要作用, 他们阻止相互临近部分比如神经脊的主干细胞和菱脑原节的细胞混杂, 从而维持后脑组织的正常结构. 同样, EphB2受体的接触排斥机制在成熟组织中也发挥了重要的作用. 肠道黏膜是体内更新最快的组织之一, 位于肠黏膜隐窝的干细胞分化出来的各种前体细胞沿着隐窝-鞭毛轴迁徙而替代死亡的肠黏膜细胞. 对于调控这种更新的机制仍未具体阐明. 最近的研究^[1,8-9]发现在肠道黏膜组织中, EphB2受体和Ephrin-B配体的表达呈相反的排列趋势, 在黏膜隐窝中具有增殖能力的干细胞高度表达EphB2受体, 与此相反Ephrin-B1和Ephrin-B2配体却高度表达于由成熟细胞构成的鞭毛部分, 即由隐窝-鞭毛轴EphB受体的表达是逐渐降低的, 而EphrinB的表达是逐渐升高的. EphB2受体和Ephrin-B配体表达在隐窝-鞭毛轴的相反的排列趋势, 加上其接触排斥的功能, 提示了他们参与了对肠道黏膜细胞的正确定位和可分化细胞迁移导向的调控. 进一步的研究^[1]肯定了这种作用, 在EphB2受体表达缺陷的小鼠的肠道黏膜中观察到具有增殖和分化能力的各种前体细胞迁移定位导向错乱, 不能到达正确的位置, 吸收细胞、杯状细胞以及潘式细胞的前体细胞沿着隐窝-鞭毛轴混乱排列, 同种细胞相互聚集. EphB2表达缺失导致的肠道黏膜细胞排列紊乱, 改变了各种细胞生存的内环境, 对细胞代谢一定会产生影响, 这些影响在肠道肿瘤发病中所起的作用是一个值得进一步研究的课题. 我们推测在肿瘤组织中, 细胞正常的空间排序和接触抑制等特性的丧失可能与EphB2受体和Ephrin-B配体表达异常或二者表达失衡有关.

2 受体EphB2及其配体Ephrin-B与结直肠肿瘤的关系

2.1 在结直肠肿瘤中的表达 以往的研究^[4,10-13]

发现EphB家族高表达于多种肿瘤细胞, 如乳腺癌、脑膜瘤、直肠癌、肺癌; 高表达的EphB2被认为能够通过提升癌细胞的运动、侵袭、转移能力和促进血管的形成, 从而在肿瘤的形成和发展过程中发挥促进作用, 因而把EphB2基因作为一种原癌基因. 但是这些实验在对比EphB2在正常组织和癌组织中的表达差异时, 忽略了在正常组织中成熟细胞EphB2是低表达的, 只有在为数较少的干细胞中EphB2受体表达是升高的^[11,8]; 而且没有就EphB2受体在不同肿瘤分期中的表达进行对比. 在认识到这些局限的基础上, 近期的研究有了巨大的进展, 有了完全不同于以往的发现: Huusko *et al*^[14]发现在前列腺癌组织中EphB2受体的表达随着恶性程度的升高而降低, 并且通过转染野生型的EphB2基因到缺乏EphB2基因表达的前列腺癌细胞株中抑制了肿瘤细胞的生长和肿瘤菌落的形成. Battle *et al*^[2,15]检测了EphB2受体在正常肠隐窝干细胞、肠腺瘤细胞、肠原位癌细胞、肠癌淋巴结转移细胞和肝转移细胞中的表达, 发现EphB2受体在他们中的表达呈递减趋势; 为进一步证明, Battle *et al*在小鼠结直肠癌模型中, 使用基因工程干扰了癌细胞EphB2受体的表达, EphB2受体的缺失加快了结直肠肿瘤的形成. 这项新研究提示, 大多数大肠癌细胞在(良性)腺瘤和(恶性)肿瘤之间的过渡阶段失去EphB2受体的表达, 并且EphB2表达的多少与肠癌的浸润深度和远处转移密切相关, EphB2的表达越低, 肿瘤分化越差, 浸润程度越深, 远处转移越多. 这些实验结果在其他的独立实验中得到了进一步的支持, Guo *et al*^[16]也证明了EphB2从肠隐窝干细胞到不同恶性程度肠道癌细胞中的表达呈递减趋势; 并且在结肠癌细胞株的体外实验中证明了过度表达的EphB2受体能够抑制肿瘤细胞的生长、黏附和转移. Jubb *et al*^[17]和Lugli *et al*^[18]也发现EphB2受体的表达和结直肠癌患者的生存率表现出正相关, EphB2受体表达越高存活率越高. 以上实验证明了在一些肿瘤中, 尤其大肠癌, EphB2受体的表达和肿瘤的浸润深度以及远处转移呈负相关, 与肿瘤组织的分化程度以及存活率呈正相关, 提示EphB2对于肿瘤的生长起抑制作用, 对EphB2在肿瘤形成中扮演的致癌角色提出了置疑, 为寻找新的预防和治疗结肠癌的方法提供了新的方向.

目前对配体Ephrin-B在大肠癌中表达情况资料尚少. Liu *et al*^[3]发现配体Ephrin-B在大肠癌

■创新盘点

本文与其他相关文章的不同点在于本文关注了EphB2受体和Ephrin-B不仅调控了肠上皮具有增殖能力细胞的迁移导向和正确的定位, 而且注意到了其在大肠癌多步癌变过程中的抑制作用, 对近年来有关EphB2受体及其配体Ephrin-B的生理学、病理学方面的最新进展做了全面的总结.

■应用要点

EphB2受体及其配体Ephrin-B的表达及活化影响结直肠癌肿瘤的形成及进展。为我们预防、治疗大肠癌提供新的方向,而且随着对受体EphB和配体Ephrin-B抑制肿瘤生长机制的进一步深入了解,EphB2受体和配体Ephrin-B很有可能成为治疗结肠癌的一个新的分子靶点。

中呈高表达,并且高表达的配体Ephrin-B对大肠癌起抑制作用。但他们未就配体Ephrin-B在不同肿瘤分期中的表达进行对比。值得关注的是,在胃癌和胰腺癌等消化道肿瘤中,配体Ephrin-B的表达与受体EphB在大肠癌中的表现相反,配体Ephrin-B的表达随着肿瘤恶性程度的升高而增加^[19]。对于配体Ephrin-B的表达是否在大肠癌中也呈这种趋势需要实验进一步验证。

2.2 抑制结直肠肿瘤的作用机制 EphB2受体和Ephrin-B配体系统主要是通过影响癌细胞的浸润和生存能力从而发挥对肿瘤的抑制作用。肿瘤恶性程度的升高是癌细胞浸润能力提高的结果。肿瘤组织能够由原发灶向周围和远处组织浸润是通过增强自身的运动能力和改变自身黏附性来完成的。研究^[1,9,20]表明EphB2的抑癌作用与减低癌细胞的运动能力和改变其黏附性有相关性:这些实验发现癌细胞在EphrinB-Fc活性配体的刺激使细胞形态由便于游走的多角形向圆形转变使得细胞的运动能力下降,同时也使得癌细胞黏附细胞外基质的能力降低,从而减弱肿瘤细胞的浸润能力。Etienne-Manneville *et al*^[21-22]通过实验证明了EphB2是通过Rho/Rock1通道调控细胞的运动能力的,细胞的形态和运动能力的调节与Rho/Rock1通道密切相关,他们通过调控细胞骨架动力装置所给予的驱动力与肌动蛋白细胞骨架介导的黏附所提供的锚定力之间的协调运作调控细胞的运动,在实验中通过使用Rho/Rock1通道拮抗剂能抑制EphB2导致的细胞形态的改变和活动能力的降低。同时Batlle *et al*^[1]和Guo *et al*^[16]的研究也表明,EphB2受体和Ephrin-B配体系统减低癌细胞黏附性的机制与EphB2对细胞膜黏附斑FAK酶活性的影响密切相关。高表达的EphB2受体也能够降低癌细胞的存活率。实验^[16]中发现运用基因转染技术把EphB2-pcDNA质粒转染入低表达EphB2的SW480细胞,从而得到高表达EphB2的结肠癌细胞株,然后使用不同浓度的EphrinB-Fc活性配体作用与该细胞株,通过与未转染EphB2-pcDNA质粒的细胞株对比后发现转染后癌细胞与未转染癌细胞的存活率有明显的差异。但他们使用3H-TdR渗入法却发现EphrinB-Fc活性对于癌细胞的增殖没有影响,从而推测EphB2对于肿瘤细胞生存能力的影响主要归咎于其对细胞代谢和细胞凋亡的作用,当然这有待于实验进一步的证明。

2.3 参与的大肠癌肿瘤形成过程中的信号传

导机制 在生理情况下,受体EphB2被配体Ephrin-B2激活,使细胞内蛋白发生酪氨酸磷酸化,磷酸化的蛋白与RasGTPase激活蛋白RasGAP和含SH2/SH3结构域的蛋白形成复合物,从而参与细胞生长的调控。跨膜配体Ephrin-B兼具受体样信号转导分子功能,即配体Ephrin-B兼具受体样信号分子功能,接受受体EphB刺激后发生逆向(reverse)信号传递调节细胞反应^[23]。受体EphB2及其配体Ephrin-B的信号转导是通过与其跨膜或聚集型配体结合而启动的,需要细胞间接触而被活化,进而发生受体自身磷酸化以及下游大量胞内底物蛋白质分子的磷酸化,启动不同信号途径将信号逐级传递,参与细胞迁移导向、血管形成等生理过程的调节。

在病理情况下,尤其是在大肠癌的多步癌变过程中,EphB2和配体EphrinB信号通道扮演的角色目前仍未彻底阐明。大肠癌的发生演变是一个多步骤、多基因、多阶段的过程。其中,正常上皮组织突变为腺瘤是关键性的第一步,WNT信号转导途径失调是腺瘤发生的早期事件^[24-25]。APC或者 β -catenin的突变导致WNT信号通道的激活,可以使加速细胞增殖和抑制细胞凋亡的基因表达增加,这其中就包括EphB2受体^[2,26],而且大肠腺瘤细胞的EphB2受体免疫组化检测也提示他们呈高表达,说明在从正常肠上皮细胞到腺瘤的形成过程中EphB2受体和配体Ephrin-B扮演了重要的角色。但在由腺瘤向癌恶变的过程中,大多数人类结直肠细胞在(良性)腺瘤和(癌变)恶性肿瘤之间的过渡阶段失去EphB2的表达,说明在这个过程有其他调控机制的参与导致了EphB2表达的降低。很多研究^[2,16,27]均表明导致EphB2表达减低的调控机制发生在转录阶段,但具体的调控机制有待进一步研究。

人类结直肠癌在(良性)腺瘤和(癌变)恶性肿瘤之间的过渡阶段中,EphB2的表达的减少促进了肿瘤的发生和发展;一系列的体内体外实验也证明过度表达的EphB2受体在配体Ephrin-B激活下对肿瘤有明显的抑制作用。综合这些研究发现,受体EphB2受体和配体Ephrin-B的表达及活化影响结直肠癌肿瘤的形成及进展,为我们预防、治疗大肠癌提供新的方向。但导致EphB2的表达在从腺瘤到癌变过程中表达减弱的原因不明,以及受体EphB和配体Ephrin-B抑制肿瘤生长的机制等都是有待进一步研究的课题。我们相信随着EphB2与结肠癌关系研究的进一步深入,EphB2受体和配体Ephrin-B很有可能成

为治疗结直肠癌的一个新的分子靶点.

3 参考文献

- 1 Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111: 251-263
- 2 Batlle E, Bacani J, Beghtel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 2005; 435: 1126-1130
- 3 Liu W, Jung YD, Ahmad SA, McCarty MF, Stoeltzing O, Reinmuth N, Fan F, Ellis LM. Effects of overexpression of ephrin-B2 on tumour growth in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 1620-1626
- 4 Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M, Iwase T, Suzuki M, Xiang YY, Naito Y, Yamada K, Sugimura H, Kino I. Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 3645-3650
- 5 Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 400-408
- 6 Orioli D, Klein R. The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet* 1997; 13: 354-359
- 7 Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG. *In vivo* cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 1999; 399: 267-271
- 8 Hafner C, Meyer S, Langmann T, Schmitz G, Bataille F, Hagen I, Becker B, Roesch A, Rogler G, Landthaler M, Vogt T. Ephrin-B2 is differentially expressed in the intestinal epithelium in Crohn's disease and contributes to accelerated epithelial wound healing *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4024-4031
- 9 Dail M, Richter M, Godement P, Pasquale EB. Eph receptors inactivate R-Ras through different mechanisms to achieve cell repulsion. *J Cell Sci* 2006; 119: 1244-1254
- 10 Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM. Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 26-33
- 11 Tang XX, Evans AE, Zhao H, Cnaan A, London W, Cohn SL, Brodeur GM, Ikegaki N. High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1491-1496
- 12 Nakada M, Niska JA, Miyamori H, McDonough WS, Wu J, Sato H, Berens ME. The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3179-3185
- 13 Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD, Ellis LM. Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 934-939
- 14 Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, Kiefer JA, Azorsa DO, Tuzmen S, Weaver D, Robbins C, Moses T, Allinen M, Hautaniemi S, Chen Y, Elkahouloun A, Basik M, Bova GS, Bubendorf L, Lugli A, Sauter G, Schleutker J, Ozcelik H, Elowe S, Pawson T, Trent JM, Carpten JD, Kallioniemi OP, Mousset S. Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 979-983
- 15 Clevers H, Batlle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2-5
- 16 Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY, Chen X. Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 2006; 27: 454-464
- 17 Jubb AM, Zhong F, Bheddah S, Grabsch HI, Frantz GD, Mueller W, Kavi V, Quirke P, Polakis P, Koeppen H. EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5181-5187
- 18 Lugli A, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kiefer J, Huusko P, Azorsa D, Terracciano L, Sauter G, Kallioniemi OP, Mousset S, Tornillo L. EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: high levels of expression in gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6450-6458
- 19 陈立波, 杨炼, 王春友. Ephrin-B2在人胰腺癌的表达. *中华实验外科杂志* 2003; 20: 557-558
- 20 Miao H, Strebhardt K, Pasquale EB, Shen TL, Guan JL, Wang B. Inhibition of integrin-mediated cell adhesion but not directional cell migration requires catalytic activity of EphB3 receptor tyrosine kinase. Role of Rho family small GTPases. *J Biol Chem* 2005; 280: 923-932
- 21 Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629-635
- 22 Hafner C, Meyer S, Hagen I, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T. Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4511-4518
- 23 Bruckner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997; 275: 1640-1643
- 24 Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005; 15: 28-32
- 25 李琳娜, 袁守军. Wnt/ β -catenin信号通路与大肠癌的始发和防治策略. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 201-206
- 26 Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ. Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; 18: 1385-1390
- 27 Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Konrad L, Laiho P, Espin E, Armengol M, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Arango D. Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 10170-10173

同行评价

本文内容新颖, 论文撰写流畅, 思路清晰, 全面系统地综述了EphB2受体及其配体Ephrin-B在结直肠癌中的研究进展, 有较大的参考价值.

电编 张敏 编辑 张焕兰

肝门阻断再灌注后脑皮层组织和血清S100 β 蛋白的差异性改变及意义

郑晓春, 陈卫民, 盖成林

■背景资料

肝门长时间阻断后再灌注不仅加剧肝脏和肠道损伤,也可伤及远隔脏器,严重时可导致多器官功能衰竭。其机制目前仍然未明,可能与氧自由基, NO, 缓激肽, 前列腺素以及其他一些细胞因子等相关,自主神经系统可能也有重要作用。脑的缺血再灌注损伤的研究倍受重视,但远隔器官I/R损伤对中枢神经系统的影响及机制研究却鲜有报道。

■研究前沿

机体作为整体,远隔脏器间的相互作用日益受到重视。肝门阻断后再灌注过程中肠道因素是肝外脏器损伤的重要引擎,该领域的热点主要集中在作用机制研究,但尚未有明确结论。

郑晓春, 陈卫民, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110001

郑晓春, 福建省立医院麻醉科 福建省福州市 350001

盖成林, 中国人民解放军第230医院麻醉科 辽宁省丹东市 118001

通讯作者: 陈卫民, 110001, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科, chenwm@cmu2h.com

电话: 024-83955029 传真: 024-83955029

收稿日期: 2006-05-13 接受日期: 2006-07-10

Alteration of cortex and serum S100 β protein in rats undergoing hepatic portal occlusion reperfusion

Xiao-Chun Zheng, Wei-Min Chen, Cheng-Lin Gai

Xiao-Chun Zheng, Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xiao-Chun Zheng, Department of Anesthesiology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Cheng-Lin Gai, Department of Anesthesiology, the 230th Hospital Chinese PLA, Dandong 118001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenwm@cmu2h.com

Received: 2006-05-13 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To explore the alterations of neuroglia cell reactivity and central nervous system (CNS) injury in rats undergoing hepatic portal occlusion (HPO) reperfusion using S100 β protein tissue content and serum concentration respectively.

METHODS: A total of 38 Wistar rats were anesthetized by isoflurane inhalation. HPO model was produced by hepatic portal interruption (Pringle' maneuver) for 30 min with a clamp, followed by 6-, 12-, and 24-h reperfusion after removal of the clamp. The animals were randomly divided into group A ($n = 8$) and B ($n = 30$). Group A served as the sham operation group, while HPO model was induced in group B. The

pH values, Ca²⁺ and K⁺ concentrations of portal vein blood sample were measured by blood-gas analysis, and the brain cortex content and serum concentration of S100 β protein were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: As compared with that in group A, the pH value of portal vein blood in group B was significantly decreased after HPO, but gradually recovered after reperfusion. Simultaneously, K⁺ concentration was remarkably increased and lasted to 6-h reperfusion, while Ca²⁺ concentration was decreased gradually and lasted to 12-h reperfusion ($P < 0.05$). The cortex S100 β protein content in group B was elevated significantly after 12- and 24-h reperfusion in comparison with that in group A (12.04 ± 3.29 , 14.81 ± 8.04 vs 2.71 ± 3.9 , $P < 0.01$ and $P < 0.05$). The serum concentration of S100 β protein was not markedly different between group A and B ($P > 0.05$). However, it was noticed that the number of patients with S100 β concentration higher than $0.2 \mu\text{g/L}$ was higher in group B.

CONCLUSION: Reperfusion after HPO can activate the reactivity of neuroglia cells and increase the cortex content of S100 β protein, but S100 β protein over-express can result in brain injury, which may be one of the mechanisms for the neurological complications after liver transplantation.

Key Words: Hepatic portal occlusion; Liver reperfusion injury; Brain injury; S100 β protein; Wistar rat

Zheng XC, Chen WM, Gai CL. Alteration of cortex and serum S100 β protein in rats undergoing hepatic portal occlusion reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3046-3049

摘要

目的: 通过观察肝门阻断(hepatic portal occlusion, HPO)再灌注后脑损伤特异性标志物S100 β 蛋白在中枢和外周的变化趋势,研究HPO再灌注对中枢神经系统(CNS)的影响。

方法: 成年Wistar大鼠异氟烷(isoflurane)吸入麻醉后随机分成对照组(A组, $n = 8$): 开腹但不阻断肝血流; 全肝血流阻断组(B组, $n = 30$): Pringle'法阻断门脉、肝动脉及胆总管, 全肝缺血30 min后恢复肝血供. 再灌注后6, 12和24 h取材. 血气分析测定门脉血pH值、 $[K^+]$ 和 $[Ca^{2+}]$, ELISA比较组织和血清S100 β 蛋白水平.

结果: HPO期间门静脉pH显著降低, $[K^+]$ 升幅超过1倍, 但开放后逐渐恢复; $[Ca^{2+}]$ 于再灌注后持续下降至12 h. 和A组比较, B组皮层S100 β 蛋白含量再灌注12和24 h时升高显著(12.04 ± 3.29 , 14.81 ± 8.04 vs 2.71 ± 3.9 , $P < 0.01$, $P < 0.05$). 但各时点的血清S100 β 蛋白的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 再灌注后浓度超过0.2 $\mu\text{g/L}$ 的例数显著高于A组. 两种来源的S100 β 蛋白未见相关性.

结论: HPO再灌注刺激皮层神经胶质细胞的保护反应, S100 β 蛋白表达显著增加, 但表达过度可致脑损伤, 这可能是肝移植病例术后出现神经精神改变的机制之一.

关键词: 肝门阻断; 再灌注损伤; S100 β 蛋白; 脑损伤; Wistar大鼠

郑晓春, 陈卫民, 盖成林. 肝门阻断再灌注后脑皮层组织和血清S100 β 蛋白的差异性改变及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3046-3049

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3046.asp>

0 引言

肝移植和肝肿瘤等手术过程中常规需要肝门阻断(hepatic portal occlusion, HPO)以期减少出血, HPO后缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤是不可避免的一个病理生理过程. 肝脏和肠道IR损伤后血流动力学、凝血功能、电解质、酸碱平衡等发生重大改变. 可致急性肺损伤和心功能不全等肝外脏器功能改变^[1-4], 甚至累及中枢神经系统(central nervous system, CNS), 文献报道肝移植术后神经精神功能紊乱发生率达7%-40%^[5], 一般认为与免疫抑制剂的大剂量应用有关, 本实验通过观察HPO再灌注后脑损伤特异性标志物S100 β 蛋白在中枢和外周的变化趋势, 研究HPO再灌注对CNS影响. 探讨肝移植术后精神功能紊乱的发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年 δ Wistar大白鼠(体质量200 \pm 50g), 由中国医科大学附属盛京医院实验动

物中心提供. 动物术前禁食12 h. 异氟烷吸入麻醉. 尾静脉静注肝素500 U/kg. 常规备皮消毒后取腹部正中切口入腹, 离断肝周韧带以消除肝脏侧支循环. 尾动脉监测平均动脉压(MAP)和脉搏(RBP-1B型大鼠血压计, 中日友好临床医学研究所), 缺血期间根据血流动力学变化间断应用少量新福林保持MAP在80 mmHg以上. 半导体温度传感器(Datex多功能监测仪, 芬兰)监测直肠温度, 灯烤保温. 保持直肠温36-37 $^{\circ}\text{C}$. 术毕关腹前腹腔内注入含青霉素200 kU的温生理盐水1 mL. 皮肤缝合后即停止吸入麻醉, 保温至苏醒后归笼饲养, 术后自主饮用100 g/L葡萄糖水. 至预定时间点取材. 术中失血量超过2 mL者弃用. 血气分析仪为PHILIP M3562A(德国), 测试条为IRMA TRUTOINT(美国), 批号139903. ELISA试剂盒购自大连泛邦生化公司. 酶标仪为ELX-800(Bio-Tech Instrument, 美国).

1.2 方法 所有实验对象随机分成两组: A组(假手术对照组): $n = 8$, 经腹正中切口入腹, 切断全部肝周韧带, 不作肝血流的阻断; B组(全肝血流阻断组): $n = 30$, 于肝十二指肠韧带处用无创伤微血管夹完全阻断门脉、肝动脉及胆总管(Pringle'法^[6]), 使全肝缺血, 暂时关腹. 30 min后原路入腹松开血管夹恢复肝血供. 每组各有8例个体分别于再灌注后6, 12和24 h处死. A组的门脉血作为未阻断的基础值对照, B组再另取6只测定HPO再灌注前的血气分析.

1.2.1 门脉血pH, $[K^+]$ 和 $[Ca^{2+}]$ 在各时间点放血处死前取门静脉血1 mL送检血气分析.

1.2.2 S100 β 蛋白测定 血清标本: 由颈内静脉取血2 mL, 室温静置30 min后3000 rpm离心15 min, 取上清于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待测. 脑皮层组织标本: 大鼠处死后剪开颅骨取出大脑, 分离左右半球, 取左脑皮层组织约100 mg于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待测. 测定时精确称重后在冰面上加PBS(PH: 7.4)10倍(W/V)稀释后以内切式匀浆机8000 r/s匀浆, 3000 r/s离心15 min后取上清. 考马斯蛋白定量. S100 β 蛋白测定均采用双抗体夹心法-酶联免疫吸附法(ELISA)测定. 生物素标记, 检测波长450 nm, 单位分别以 $\mu\text{g/L}$ 和 pg/mg.prot 表示.

统计学处理 所得数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析.

2 结果

2.1 两组大鼠年龄、体重、体温、饲养环境等 没有差别. 缺血期间的MAP均在80 mmHg以

■ 相关报道

研究已经证实脑IR后可引起肝损害, 而短时间的肠道IR却能为脑提供预适应保护, 提示脑和肠道存在反射轴(Brain-Gut Axis). 还有肝IR损伤后出现血清S100 β 蛋白升高并持续24 h, 以及严重的肢体IR损伤后致脑损害等的相关报道.

■ 创新盘点

远隔脏器相互作用的研究尚少, 本研究以S100 β 蛋白为损伤标志物探讨HPO后IR损伤对大脑皮层的影响, 并且同步比较中枢和外周的S100 β 蛋白变化趋势.

■应用要点

HPO后脑损伤可能是肝移植术后后神经精神紊乱并发症的原因之一, 研究提示防治的要点可以从减轻始发脏器的IR损伤和保护脑细胞等多方面考虑。

表 1 门脉阻断前后门静脉血中酸碱度和电解质 (mean \pm SD)

指标	阻断前 (A组, $n=8$)	再灌注前 0 h ($n=6$)	再灌注后 (B组, $n=30$)		
			6 h ($n=8$)	12 h ($n=8$)	24 h ($n=8$)
pH值	7.11 \pm 0.15	6.53 \pm 0.12 ^a	6.93 \pm 0.11	6.94 \pm 0.13	7.11 \pm 0.15
[K ⁺](mmol/L)	6.4 \pm 0.4	13.1 \pm 3.6 ^b	7.2 \pm 1.4	6.7 \pm 1.2	6.6 \pm 2.1
[Ca ²⁺](mmol/L)	1.66 \pm 0.13	1.47 \pm 0.11	1.12 \pm 0.15 ^a	1.12 \pm 0.21 ^a	1.23 \pm 0.22 ^a

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 阻断前。

表 2 两组血清和组织S100 β 蛋白含量的比较 ($n=8$, mean \pm SD)

指标	A组	B组再灌注后		
		6 h	12 h	24 h
组织含量(pg/mg.prot)	2.71 \pm 3.9	3.98 \pm 4.56	12.04 \pm 3.29 ^{bd}	14.81 \pm 8.04 ^{ac}
血清浓度(μ g/L)	0.05 \pm 0.07	0.09 \pm 0.15	0.09 \pm 0.14	0.23 \pm 0.36
血清浓度超0.2 μ g/L的例数	0(8)		4(24) ^a	

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs A组, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs B组6 h。

上。HPO后肝脏颜色变浅, 门静脉怒张, 肠道淤血, 肠系膜动脉搏动逐渐减弱, 脾脏充血。随着阻断时间延长, 肠道淤血加重。动脉搏动消失。复流后动脉搏动逐渐转强, 肠道颜色变红, 肠管张力恢复, 脾脏体积减少, 肝脏色泽变为深红, 体积增大, 有的出现明显的淤血斑块。动物苏醒后A组呼吸与术前无明显差异, 反应良好, 能自主喝水并清洁毛发; B组呼吸明显增快, 频率60-115 bpm, 末梢苍白, 萎顿, 对刺激反应差。

2.2 血气分析 B组HPO后, 再灌注前门脉血中酸性物质堆积, pH值降低, [K⁺]升高, 和阻断前比较差异明显($P<0.05$, $P<0.01$), 再灌注后6, 12和24 h均和阻断前水平接近($P>0.05$); B组的[Ca²⁺]再灌注后即逐渐下降, 12 h时最低, 24 h时略有回升但仍小于阻断前($P<0.05$, $P<0.01$)(表1)。

2.3 皮层组织及血清中S100 β 蛋白和A组比较, B组再灌注6 h时S100 β 蛋白组织含量未见差异, 2 h和24 h时升高显著($P<0.01$, $P<0.05$)。和A组比较, B组再灌注后各时点的差异无统计学意义(均 $P>0.05$), 且组内比较也未见显著差异(均 $P>0.05$)。但是再灌注后各组可见数例出现异常高值, 血清浓度超过0.2 μ g/L的例数显著高于A组, 两种来源的S100 β 蛋白未见相关性(表2)。

3 讨论

严重的肢体缺血再灌注损伤后可出现脑损害^[7]。体外循环后也常见神经精神功能异常。这类远隔脏器IR损伤对中枢神经系统的作用机制并未明确, 多数认为和再灌注后释放的介质有关, 而大

脑由于血流和神经细胞能量代谢的特点, 也对缺血缺氧等敏感。兴奋性氨基酸及其受体激活后引发的细胞内Ca²⁺超载而致神经细胞损伤是广泛认可的一种学说^[8]。血清S100 β 蛋白为小分子量酸性钙结合蛋白, 其 β 亚基对于CNS是高度特异性的。是脑损伤的特异性生化标志物^[9], 正常时不能通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB), 浓度不受年龄、溶血、温度、肝素等的影响, 正常值 ≤ 0.2 μ g/L。当脑组织受损后, 脑脊液的S100 β 蛋白通过受损BBB进入血液, 其浓度变化和神经系统损伤的程度呈正相关, 实验中HPO后24 h内血清S100 β 蛋白浓度均值较高, 但统计学上和对照组比较未见显著差异, 主要是由于结果中标准差较大所致。但是组内各时点均有异常高值的个例出现, 24 h时甚至可达临界值的5倍(1 μ g/L), 而且组中超过0.2 μ g/L的动物显著大于对照组, 提示有脑损伤的个例出现, 文献^[5]中肝移植后神经精神功能紊乱的发生率为7%-40%, 这种远隔脏器的影响有可能是以一定概率出现的, 因此其临床意义大于统计学含义。外周血中S100 β 蛋白的检出和BBB的完整性密切相关, 仅当超阈值的再灌注损伤使BBB通透性增加后, 血中该蛋白检测值才显著升高, 实验中血清与细胞内S100 β 蛋白含量的相关性并不明显。新的研究发现肝、脂肪细胞等也可分泌S100蛋白^[10-11], 脑脊液中的S100 β 蛋白或有更高特异性。本实验研究其上游的细胞内S100 β 蛋白含量, 在脑皮层中该蛋白主要存在于星型胶质细胞(astrocytes)中, 和受体相互作用后的糖化作用终产物是神经细胞存活所

必需的. 近年来认识到胶质细胞还是神经元间信息联系和反应的关键^[12]. HPO后肝和肠道IR损伤出现自由基增加、钙超载^[1,13]等, S100蛋白大量表达以保护神经元细胞, 是胶质细胞对病理因素的应激性反应. 实验中HPO后脑组织的S100 β 蛋白含量有升高并能持续24 h. 由于S100 β 的半衰期只有2 h, 说明再灌注后皮层胶质细胞反应性持续增强, 机体处于保护进程中, 是CNS应激性生化反应. 但是, S100 β 蛋白的过度表达却和多种CNS疾患相关. 高浓度S100 β 蛋白可致细胞凋亡^[14]. 而且CNS损伤后的主要结果之一-反应性神经胶质细胞增多症(Reactive astrocytosis)也是经由S100 β 蛋白介导的, 这些对应激后神经细胞的存活并不利. 减少这种现象可能成为减轻CNS损伤的一种思路. Asano *et al*^[15]阻止S100 β 蛋白的过度表达可以减轻缺氧性脑损害. 同时有研究表明, 再灌注损伤能激活BBB的小胶质细胞(microglia), 释放蛋白酶和谷酰胺等, 和胶质细胞一样对缺血等低氧性侵袭敏感, 适当抑制小胶质细胞的功能可以保护BBB, 减轻脑水肿^[16]. 提示在伤害性因子持续刺激下, 胶质细胞反应后S100 β 蛋白的过度分泌则可取消保护作用, 造成神经细胞的器质性损伤. 由于肝病患者术前病情复杂, 多并存不同程度的脑损害病理生理基础, 而且围术期的病生改变远大于模型动物, 肝移植中长时间的HPO有可能出现或加重CNS损害, 产生神经精神症状, 影响预后和转归.

总之, HPO再灌注后剧烈的病理生理改变刺激神经胶质细胞的保护反应, S100 β 蛋白表达显著升高, 但表达过度可致脑损伤, 这可能是肝移植病例术后出现神经精神改变的机制之一.

4 参考文献

- 1 郑晓春, 陈彦青, 黄风怡, 彭玲, 于荣国, 林丽珊, 吴晓丹. 抗坏血酸对肠缺血再灌注损伤后大鼠肺的保护作用. 中华麻醉学杂志 2005; 25: 606-607
- 2 Liu P, Xu B, Hock CE. Inhibition of nitric oxide synthesis by L-name exacerbates acute lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Shock* 2001; 16: 211-217
- 3 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 2029-2032
- 4 张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭. 肝门阻断对大鼠肠道肌间神经丛内NOS阳性神经元的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 87-91
- 5 Padovan CS, Sostak P, Straube A. Neurological complications after organ transplantation. *Nervenarzt* 2000; 71: 249-258
- 6 Imamura H, Kokudo N, Sugawara Y, Sano K, Kaneko J, Takayama T, Makuuchi M. Pringle's maneuver and selective inflow occlusion in living donor liver hepatectomy. *Liver Transpl* 2004; 10: 771-778
- 7 史中立, 凌亦凌, 姚玉霞, 张爱子, 周君琳, 谷振勇, 黄新莉. 大鼠肢体缺血再灌注所致脑损伤及其机制探讨. 中国病理生理杂志 2001; 17: 451-454
- 8 Mahura IS. Cerebral ischemia-hypoxia and biophysical mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection effects. *Fiziol Zh* 2003; 49: 7-12
- 9 Shirasaki Y, Edo N, Sato T. Serum S-100b protein as a biomarker for the assessment of neuroprotectants. *Brain Res* 2004; 1021: 159-166
- 10 Pelinka LE, Harada N, Szalay L, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S. Release of S100B differs during ischemia and reperfusion of the liver, the gut, and the kidney in rats. *Shock* 2004; 21: 72-76
- 11 Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R, Goncalves CA. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 2006; 37: 683-686
- 12 Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626-640
- 13 黄昌州, 张宗明, 裘法祖. 缺血再灌注损伤对大鼠肝细胞钙池操纵的钙通道电流的影响及药物拮抗. 世界华人消化杂志 2005; 13: 739-742
- 14 Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637-668
- 15 Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, Yada N, Katsumata S, Matsuda S, Kagamiishi Y, Tateishi N. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 127-142
- 16 Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline *in vivo* and *in vitro*. *Stroke* 2006; 37: 1087-1093

■名词解释

S100 β 蛋白为小分子量酸性钙结合蛋白, 血清浓度不受年龄、溶血、温度、肝素等的影响. 正常时不能通过血脑屏障, 脑组织损伤后可通过受损BBB进入血液, 其浓度变化可反映神经系统损伤的程度. 大脑皮层中S100 β 蛋白主要由星型胶质细胞分泌, 和受体结合后的糖化作用终产物是神经细胞存活所必需的. 但S100 β 蛋白的过度表达却和多种CNS疾患相关.

电编 李琪 编辑 王晓瑜

中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎关系的Meta分析

骆 峻, 金安娜, 吴旭东, 喻荣彬

■背景资料

机体感染HBV后的转归主要取决于机体的免疫反应状况, HLA等位基因的高度多态性是决定宿主免疫应答能力的最重要的遗传因素, 其差异将影响个体免疫应答的强度。近年来, 国内有关HLA-II类抗原中DRB1基因上各位点多态性与慢性乙型肝炎(CHB)相关性报道较多, 但由于各研究样本量均较小等原因, 不同研究得出的结论不尽相同, 甚至相反。

骆峻, 喻荣彬, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系 江苏省南京市 210029

骆峻, 金安娜, 吴旭东, 江苏职工医科大学医学微生物学教研室 江苏省南京市 210029

国家自然科学基金资助课题, No. 30200232

通讯作者: 喻荣彬, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学流行病学与卫生统计学系, rongbinyu@njmu.edu.cn

电话: 025-86862815 传真: 025-86527613

收稿日期: 2006-07-23 接受日期: 2006-09-20

Meta-analysis on the relationship between HLA-DRB1 gene polymorphism and chronic hepatitis B in Chinese population

Jun Luo, An-Na Jin, Xu-Dong Wu, Rong-Bin Yu

Jun Luo, Rong-Bin Yu, Department of Epidemiology and Biostatistics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Jun Luo, An-Na Jin, Xu-Dong Wu, Department of Medical Microbiology, Jiangsu Staff Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30200232

Correspondence to: Rong-Bin Yu, Department of Epidemiology and Biostatistics, University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. rongbinyu@njmu.edu.cn

Received: 2006-07-23 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To assess the associations of HLA-DRB1 gene polymorphism with chronic hepatitis B in Chinese population.

METHODS: A comprehensive search for articles from 1998 to 2006 was conducted from Chinese BioMedical Literature Database on disc (CBM-disc), VIP and Medline databases. A total of 8 epidemiological case-control studies on the relationship between gene polymorphism of HLA-DRB1 and chronic hepatitis B were performed and the results were analyzed using RevMan 4.2 software.

RESULTS: A total of 501 patients with chronic hepatitis B and 855 uninfected healthy controls

were included from the 8 studies. HLA-DRB1*03 and HLA-DRB1*08 alleles were the risk factors of CHB, the values of pooled odds ratio were 2.44 (95%CI: 1.65-3.61, $P < 0.00001$) and 1.57 (95%CI: 1.08-2.28, $P = 0.02$), respectively. HLA-DRB1*13 and HLA-DRB1*15 alleles were the protection factors against CHB, and the values of pooled odds ratio were 0.40 (95%CI: 0.21-0.79, $P = 0.008$) and 0.64 (95%CI: 0.46-0.90, $P = 0.01$), respectively.

CONCLUSION: The occurrence of CHB is associated with the gene polymorphism of HLA-DRB1 in Chinese population.

Key Words: Chronic hepatitis B; Human leukocyte antigen II; HLA-DRB1; Gene Polymorphism; Meta-analysis

Luo J, Jin AN, Wu XD, Yu RB. Meta-analysis on the relationship between HLA-DRB1 gene polymorphism and chronic hepatitis B in Chinese population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3050-3054

摘要

目的: 用Meta分析的方法综合评价中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎的关系。

方法: 检索中国生物医学文献数据库、维普数据库和Medline数据库, 依据选择标准收集所有相关的病例对照研究, 应用RevMan 4.2软件对符合条件的研究结果进行Meta分析。

结果: 符合纳入标准的共8篇文献, 包含慢性乙型肝炎组501例和正常对照组855例。经综合分析: HLA-DRB1*03和HLA-DRB1*08可能为中国人群慢性乙型肝炎的易感性基因型($OR = 2.44$, 95%CI: 1.65-3.61, $P < 0.00001$; $OR = 1.57$, 95%CI: 1.08-2.28, $P = 0.02$); HLA-DRB1*13和HLA-DRB1*15可能是我国人群慢性乙型肝炎的保护性基因型($OR = 0.40$, 95%CI: 0.21-0.79, $P = 0.008$; $OR = 0.64$, 95%CI: 0.46-0.90, $P = 0.01$)。

结论: 中国人群慢性乙型肝炎的发生与HLA-DRB1基因的多态性有关, 与其他国家人群既有相同点, 也有其自身特点。

关键词: 慢性乙型肝炎; 人类白细胞抗原 II; HLA-DRB1; 基因多态性; Meta分析

骆峻, 金安娜, 吴旭东, 喻荣彬. 中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎关系的Meta分析. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3050-3054

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3050.asp>

0 引言

乙型肝炎(HB)是我国最为广泛流行的传染病, 我国约6.9亿人感染过乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV), 约1.2亿人为HBsAg携带者^[1], 严重地威胁着人们的健康. 研究表明, 不同个体感染HBV后的转归各不相同, 疾病表现与HBV本身无关, 而主要取决于个体的免疫反应状况, 即由个体免疫应答能力所决定^[2-3]. HLA等位基因的高度多态性是决定宿主免疫应答能力的最重要的遗传因素, 其差异将影响个体免疫应答的强度^[4]. 国外许多学者系统地研究了HLA等位基因多态性和HBV感染之间的相关性, 如Almarri *et al*^[5]发现, HLA-I 和 II 类抗原的多态性明显影响了HBV的感染免疫应答过程. 近年来, 随着多聚酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)技术的成熟, 国内学者也开始用该实验方法来研究HLA-II 类抗原中DRB1上各等位基因位点基因型与慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)发生的相关性, 但由于各研究样本量均较小等原因, 不同研究得出的结论不尽相同, 甚至相左. 因此, 有必要采用Meta分析方法进行综合评价, 以明确我国人群HLA-DRB1基因多态性与CHB的关系, 为进一步研究提供线索或依据.

1 材料和方法

1.1 材料 检索中国生物医学文献数据库(CBMdisc)和重庆维普数据库(VIP), 检索式: “DRB1 and (慢性乙型肝炎 or CHB)”, 并检索MEDLINE数据库发现国内研究者在非中文期刊上发表的相关文献, 共检出文献25篇. 检索时限为1998-2006年, 最后检索日期2006-03-31. 根据纳入和排除标准的筛选后, 合计选中8篇病例对照研究.

1.2 方法

1.2.1 选择标准 纳入标准: (1)原始资料为已公开

发表的有关CHB与HLA-DRB1基因多态性相关性的研究文献; (2)原始文献研究类型为病例对照研究, 并设立CHB组和正常对照组; (3)观察指标为HLA-DRB1基因各多态性位点分布频数, 且数据描述清楚. 排除标准: (1)研究未设立对照组; (2)具体数据描述不清; (3)数据重复报道的取其—; (4)以HBV感染、肝硬化、肝癌、HBV自限清除、治疗反应性、疫苗反应性与HLA-DRB1基因多态性相关性的研究.

1.2.2 资料收集和分析 由两位评阅人按照上述文献纳入和排除标准筛选文献, 意见不一致时通过讨论达成一致. 对原始文献记录数据的收集也由两位评阅人独立收集数据资料.

1.2.3 纳入文献的一般特征描述 在本研究中: (1)纳入分析的各篇文献均为病例对照研究设计, 研究对象均为中国汉族人群; (2)CHB的诊断标准均依据中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》, 除文献1为1995年版外, 其他均为2000-09西安修订版; (3)HLA-DRB1基因的检测方法均为多聚酶链反应-序列特异性引物法(PCR-SSP), 但所用试剂和引物的来源不同; (4)在8篇文献中, 共对HLA-DRB1*01, 02, 03, 04, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17共计15个基因型做了报道, 但涉及HLA-DRB1*02和*17的分别只有一篇文献, 因此未做分析.

统计学处理 (1)采用Review Manager 4.2 (Cochrance Collaboration, Oxford, UK)软件, 整理相关资料, 对全部入选的文献数据进行异质性检验, 检验统计量为 χ^2 和 P 值, P 值以0.05为界, $P>0.05$ 为异质性不显著, $P\leq 0.05$ 为异质性显著. 根据检验结果选用固定效应模型(fixed effect model)或随机效应模型(random effect model), 对各研究的效应进行加权合并, 估计综合效应(合并OR值)及其95%可信区间. 若各独立研究结果具有同质性, 采用固定效应模型(F), 反之则采用随机模型(R); 对合并OR值进行Z检验, $P\leq 0.05$ 为有统计学意义; (2)采用SAS 9.0(SAS Institute, Cary, NC, USA)软件用倒漏斗图分析法(funnel plot)描述发表偏倚, 用线性回归模型(Egger's test)检验倒漏斗图的对称性, 若线性回归方程的截距a的95%CI包括0, 检验统计量 t 对应的 P 值大于0.1, 可推断漏斗图是对称的, 否则为不对称^[6].

2 结果

2.1 纳入本研究的文献基本情况(表1).

■创新盘点

本文对8篇文献报道的资料, 就中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎关系进行统计学分析, 由于Meta方法的科学性和系统性, 使得分析结果有较高的可靠性, 获得的结果有一定新意.

■应用要点

本研究利用Rev-Man软件的综合分析功能,合并国内各研究机构的报道,克服了单个研究样本量小的局限性,得出中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎之间关系的结论,为进一步研究提供了科学依据。

表 1 纳入本次研究的8篇病例对照研究文献基本情况

文献编号	作者	研究地点	刊名	发表年份	CHB组(n)	正常组(n)
1	刘建平 ^[7]	重庆	第三军医大学学报	2000	40	120
2	蒋业贵 ^[8]	重庆	World J Gastroenterol	2003	52	106
3	孔建新 ^[9]	安徽	安徽医学	2004	51	51
4	章晓鹰 ^[10]	上海	中国医学检验杂志	2004	56	146
5	韩永年 ^[11]	上海	上海医学	2004	69	200
6	杨桂涛 ^[12]	陕西	解放军医学杂志	2005	54	108
7	周彬 ^[13]	甘肃	临床荟萃	2005	53	48
8	褚瑞海 ^[14]	山东	World J Gastroenterol	2005	126	76

表 2 CHB组与对照组HLA-DRB1等位基因分布频率的Meta分析结果

位点	文献数	CHB组(n/N)	对照组(n/N)	异质性检验P值	选用模型F/R	OR (95%CI)	P值
DRB1*01	7	10/375	20/779	0.91	F	0.99 (0.46-2.13)	0.98
DRB1*03	7	73/432	54/655	0.13	F	2.44 (1.65-3.61)	<0.00001
DRB1*04	6	62/322	171/731	0.92	F	0.76 (0.54-1.06)	0.10
DRB1*07	8	112/501	113/855	0.02	R	1.62 (0.96-2.73)	0.07
DRB1*08	6	55/322	83/731	0.09	F	1.57 (1.08-2.28)	0.02*
DRB1*09	7	131/448	247/807	0.88	F	0.99 (0.76-1.29)	0.94
DRB1*10	6	12/335	15/659	0.78	F	1.49 (0.69-3.19)	0.31
DRB1*11	5	44/282	82/611	0.02	R	1.15 (0.54-2.43)	0.72
DRB1*12	7	98/461	312/735	0.65	F	0.82 (0.62-1.10)	0.19
DRB1*13	6	11/335	53/659	0.96	F	0.40 (0.21-0.79)	0.008
DRB1*14	5	30/282	62/611	0.77	F	1.07 (0.67-1.71)	0.79
DRB1*15	6	65/408	158/687	0.56	F	0.64 (0.46-0.90)	0.01
DRB1*16	5	20/282	44/611	0.13	F	0.97 (0.56-1.69)	0.93

2.2 异质性分析及模型的选择 根据异质性检验结果:本次分析中DRB1*07和*11等位基因的分析采用随机效应模型(R),其余均采用固定效应模型(F)(表2)。

2.3 CHB与HLA-DRB1基因多态性关系的Meta分析结果 CHB组与对照组HLA-DRB1等位基因分布频率的Meta分析结果见表2。其中,HLA-DRB1*03和HLA-DRB1*08的合并OR值,95%CI及P值分别为2.44(1.65-3.61), $P<0.00001$ 和1.57(1.08-2.28), $P=0.02$;HLA-DRB1*13和HLA-DRB1*15的合并OR值,95%CI及P值分别为0.40(0.21-0.79), $P=0.008$ 和0.64(0.46-0.90), $P=0.01$,差异均具有统计学意义。

2.4 发表偏倚的评估 经SAS软件分析显示,DRB1*04,*08,*09,*10,*14和*16等位基因的报道结果均可能存在发表偏倚。

3 讨论

HLA是由位于人类第6号染色体短臂上的一组

紧密连锁的具有高度多态性的基因所编码的抗原系统。HLA等位基因的高度多态性是机体最重要的遗传因素,个体遗传背景的差异将影响T细胞识别抗原的能力和宿主免疫应答的强度;与某些疾病的遗传易感性或抵抗性密切相关^[15]。HLA-II类基因区靠近染色体着丝点,长约1000 kb,该区域基因多与细胞免疫反应有关,每个座位上的基因结构高度相似,主要包括HLA-DR、DQ和DP 3个亚区。近年来,国内外学者对HLA-II类基因多态性和HBV感染结局关系的研究相对较多。在既往有关HLA-DRB1基因与CHB相关性的研究中,各研究显示的结果并不一致,Karan *et al*^[16]在土耳其人中研究显示,HLA-DRB1*13等位基因为HB相关疾病的高危因素,而Thio *et al*^[17]在白种人中的研究显示,HLA-DRB1*13与HBV的清除有关,是保护性基因。近年来,国内学者也对HLA-DRB1基因与CHB的关系进行了一些研究,不同的研究所得结果存在一定一致性,但不尽相同。

Meta分析能够通过科学、系统的方法, 将研究目的相同的多个研究结果进行定量合并分析和综合评价, 以提高统计检验功效, 解决研究结果不一致的问题, 使研究结论更全面可靠^[18]. 本研究采用Review Manager 4.2软件, 综合评价中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎的关联性. 本次分析显示, 在8篇文献中有4篇显示HLA-DRB1*03等位基因是CHB发生的易感基因, 经过综合分析后得出结论, 带有该基因表型的HBV感染者发生CHB的危险性是一般人群的2.44(1.65-3.61)倍, $P < 0.00001$. Strettell *et al*^[19]在英国对86例自身免疫性肝炎患者的研究中发现, HLA-DRB1*03等位基因频率显著升高(RR = 4.5). HLA-DRB1*08等位基因经Meta分析也显示为CHB的易感基因, 合并OR值为1.57(1.08-2.28), $P = 0.02$. 在其他人群中的相关研究中, 未见报道该等位基因为易感或保护性基因. HLA-DRB1*13等位基因和CHB的关联在8篇文献中无一显示有显著性, 但Meta分析显示其为CHB发生的保护性基因, 合并OR = 0.40(0.21-0.79), $P = 0.008$, 这一结果与Ahn *et al*^[20]在韩国、Cao *et al*^[21]在欧洲以及Amarapurpar *et al*^[22]在印度人群中的研究报道相吻合. Cotrina *et al*^[23]在西班牙对CHB和急性自限性HB患者的HLA-DRB1的基因型进行分析, 发现DRB1*13有利于清除HBV, 避免HB慢性化. HLA-DRB1*13等位基因似乎已成为较多人群中发现的较为明确的保护性基因. 但有数据显示, 中国人群中该等位基因的分布频率低于西方人群^[24], 因此, 文献4中指出: HLA-DRB*13在中国人群中的低频率分布可能是中国人感染HBV后易于形成慢性化的原因之一. HLA-DRB1*15等位基因在文献6中报道为保护因素, 经综合分析CHB有相关性, 合并OR值为0.64(0.46-0.90), $P = 0.01$. 与程元桥 *et al*^[25]在HB后肝硬化人群中的报道结果一致, Amarapurpar *et al*^[22]的研究也指出, DRB1*15等位基因可能是CHB感染的保护基因. 而Cotrina *et al*^[23]在西班牙人中发现, DRB1*04和*06为CHB易感基因, Thio *et al*^[26]在非洲裔美国人中发现, HBV持续感染与HLA-DRB1*1102等位基因正相关的现象, 在本次综合分析结果中并未见相同结果. 文献7和文献8报道HLA-DRB1*07在CHB组中显著高于正常对照组, 为危险因素, 钱毅 *et al*^[27]亦报道, 在我国广东慢性HBV携带的汉族人中DRB1*07等位基因显著升高, 而文献5则报道, 该基因型为上海

地区人群CHB的保护性基因型, 且经综合分析尚不能确定其统计学意义, 因此, HLA-DRB1*07的作用还应继续观察. 研究表明, 机体在感染HBV后, HLA- I类分子将抗原肽递呈给CD8⁺的细胞毒T淋巴细胞(CTL), HLA- II类分子则将抗原肽递呈给CD4⁺T淋巴细胞, 主要是Th1型淋巴细胞. 病毒特异性的CD8⁺ CTL能直接杀伤感染HBV的肝细胞, 这是清除肝细胞内病毒的最主要方式, 但CD4⁺T淋巴细胞对CTL功能的发挥起着重要的支持作用. 因此, HLA- I类分子限制性CD8⁺ CTL与HLA- II类分子限制性CD4⁺ Th1细胞免疫功能直接影响着机体免疫功能的强弱, 最终影响HBV感染的种种转归. 不同的HLA基因型所介导的免疫识别和激活能力各不相同, 所以, 宿主某些特殊HLA基因型可能与乙肝的免疫病理反应和转归有着密切关系^[10,28]. Diepolder *et al*^[29]发现, HLA- II类分子DRB1位点表现为*13等位基因者有较强的CD4⁺T细胞应答, 而非*13等位基因者则弱得多; 因此推测: CD4⁺T细胞应答的增强可能是由于DRB1*13等位基因表达的分子具有更精确的抗原递呈作用, 也可能与DRB1*13相邻的免疫调节基因连锁的多态性相关.

总之, 经Meta分析认为HLA-DRB1*03和*08等位基因可能是我国人群的易感基因, 而HLA-DRB1*13和*15等位基因可能是我国人群的保护基因. 该结论与国外人群的研究结果有相同之处, 也有相异之处, HLA-DRB1*13等位基因在各类人群中的保护作用均有显著性. 本研究利用RevMan软件的综合分析功能, 合并国内各研究机构的报道, 克服了单个研究样本量小的局限性, 得出中国人群HLA-DRB1基因多态性与CHB之间关系的结论, 为进一步研究提供了科学依据.

4 参考文献

- 1 王晓军, 张荣珍, 胡苑笙, 梁晓峰. 我国病毒性肝炎流行现状研究. 疾病监测 2004; 19: 290-292
- 2 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 3 Thursz M. Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis. *Antiviral Res* 2001; 52: 113-116
- 4 de Andrade DR Jr, de Andrade DR. The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46: 119-126
- 5 Almarri A, Batchelor JR. HLA and hepatitis B infection. *Lancet* 1994; 344: 1194-1195
- 6 Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315: 629-634

■名词解释

HLA: 人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是由位于人类第6号染色体短臂上的一组紧密连锁的具有高度多态性的基因所编码的抗原系统. 传统上可分为 I 类、II 类和 III 类, 其中 II 类包括 DR, DQ, DP 等 3 个亚区. HLA 不仅是人类遗传标志物, 并且在器官移植, 亲子鉴定, 抗原的加工、递呈, 免疫应答调控等方面发挥重要作用.

■同行评价

本文方法科学,对8篇中国人HLA与乙肝相关性资料的Meta分析,认为HLA-DRB1*03和*08等位基因可能是我国人群的易感基因,而HLA-DRB1*13和*15等位基因可能是我国人群的保护基因,为进一步研究中国人HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎之间的关系提供了一定依据。

- 7 刘建平, 林辉, 宋建勇. 乙型肝炎病毒感染者HLA-DRB基因分型及其相关性研究. 第三军医大学学报 2000; 22: 354-356
- 8 Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2221-2225
- 9 孔建新, 王保龙. 慢性乙型肝炎与HLA-DRB1等位基因的相关性研究. 安徽医学 2004; 25: 358-360
- 10 章晓鹰, 陈建杰, 陈兰羽. 慢性乙型肝炎患者HLA-A、DRB1基因多态性检测意义. 中国医学检验杂志 2004; 5: 270-272
- 11 韩永年, 杨金龙, 郑水根, 汤群, 游龙英, 张工梁, 杨影. 人类白细胞抗原 II 基因对乙型肝炎病毒易感性和干扰素抗病毒治疗的影响. 上海医学 2004; 27: 417-420
- 12 杨桂涛, 刘杰, 徐德忠, 阎永平, 谢华红, 杜玉蕾. 陕西地区汉族人慢性乙型肝炎与HLA-DRB1基因的相关性研究. 解放军医学杂志 2005; 30: 910-912
- 13 周彬, 李文凡, 居军, 马惠民. 兰州地区慢性乙型肝炎与人类白细胞抗原-DRB1等位基因关系的初探. 临床荟萃 2005; 20: 307-309
- 14 Chu RH, Ma LX, Wang G, Shao LH. Influence of HLA-DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4753-4757
- 15 Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, Patwardhan B. HLA and disease. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 475-488
- 16 Karan MA, Tascioglu NE, Ozturk AO, Palanduz S, Carin M. The role of HLA antigens in chronic hepatitis B virus infection. *J Pak Med Assoc* 2002; 52: 253-256
- 17 Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-12087
- 18 但汉雷, 白杨, 张亚历, 聂军. Meta分析方法及其医学科研价值与评价. 中华医学科研管理杂志 2003; 16: 12-15
- 19 Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Czaja AJ, Williams R. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 2028-2035
- 20 Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; 31: 1371-1373
- 21 Cao T, Desombere I, Vanlandschoot P, Sallberg M, Leroux-Roels G. Characterization of HLA DR13-restricted CD4(+) T cell epitopes of hepatitis B core antigen associated with self-limited, acute hepatitis B. *J Gen Virol* 2002; 83: 3023-3033
- 22 Amarapurkar DN, Patel ND, Kankonkar SR. HLA class II genotyping in chronic hepatitis B infection. *J Assoc Physicians India* 2003; 51: 779-781
- 23 Cotrina M, Buti M, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Campins M, Esteban R, Guardia J. Study of HLA-II antigens in chronic hepatitis C and B and in acute hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 115-118
- 24 曹孟德, 秦东春, 孙含笑. HLA分子生物学及临床应用. 第1版. 河南: 河南医科大学出版社, 1998: 34-46
- 25 程元桥, 林菊生, 黄丽红, 田德英, 熊平. 人类白细胞抗原DRB1等位基因与乙肝后肝硬化遗传易感性的研究. 中华医学遗传学杂志 2003; 20: 247-249
- 26 Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999; 179: 1004-1006
- 27 钱毅, 周祎, 章廉. HLA-DRB1*07与广东汉族人慢性乙型肝炎相关性的研究. 解放军医学杂志 2003; 28: 148-150
- 28 Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7302-7307
- 29 Diepolder HM, Jung MC, Keller E, Schraut W, Gerlach JT, Gruner N, Zachoval R, Hoffmann RM, Schirren CA, Scholz S, Pape GR. A vigorous virus-specific CD4+ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 244-251

电编 张敏 编辑 王晓瑜

动脉化疗对进展期胃癌CEA mRNA及CK19 mRNA表达的影响

张强, 姚惠香, 孙群, 朱金水

张强, 姚惠香, 孙群, 朱金水, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233
通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com
电话: 021-64369181-8969 传真: 021-64837019
收稿日期: 2006-08-26 接受日期: 2006-09-15

Effects of artery intervention chemotherapy on mRNA expression of carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 in progressive gastric cancer

Qiang Zhang, Hui-Xiang Yao, Qun Sun, Jin-Shui Zhu

Qiang Zhang, Hui-Xiang Yao, Qun Sun, Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2006-08-26 Accepted: 2006-09-15

Abstract

AIM: To explore the values of carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19 (CK19) mRNA expression in the evaluation of artery intervention chemotherapy for progressive gastric cancer.

METHODS: A total of 30 gastric patients ($n = 3, 15, \text{ and } 12$, respectively, for stage II, III, and IV) were included in this study. Peripheral blood samples were collected 2-3 d before and 2-3 wk after EAP interventional chemotherapy. Automated immunoassay was used to measure the level of serum CEA and tissue polypeptide antigen (TPA), and reverse transcription-polymerase chain reaction was performed to detect the expression of CEA and CK19 mRNA. Endoscopic ultrasound (EUS) combined with computed tomography (CT) was applied to assess the efficacy of chemotherapy.

RESULTS: The expression of CEA and CK19 mRNA in peripheral blood cells were significantly different before and after interventional chemotherapy [CEA: 60.0% (18/30) vs 33.3% (10/30), $\chi^2 = 4.29, P < 0.05$; CK19: 73.3% (22/30) vs 46.7% (14/30), $\chi^2 = 4.34, P < 0.05$]. The positive rate of CEA and CK19 mRNA combined detection was also markedly different before and after chemotherapy [90.0% (27/30) vs 50.0% (15/30), $\chi^2 = 8.52, P < 0.05$]. Imaging diagnosis showed that the positive number of patients received CEA and CK19 mRNA combined detection were 16 and 5 respective, before and after chemotherapy ($\chi^2 = 8.86, P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression levels of CEA and CK19 mRNA are down-regulated in peripheral blood cells after EAP chemotherapy, and combined detection of them is more sensitive than that of serum CEA and TPA combined detection. Combined detection of CEA and CK19 mRNA can reflect the changes of tumor size after chemotherapy.

Key Words: Gastric carcinoma; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Carcinoembryonic antigen; Cytokeratin 19; Interventional chemotherapy; Radiotherapy

Zhang Q, Yao HX, Sun Q, Zhu JS. Effects of artery intervention chemotherapy on mRNA expression of carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 in progressive gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3055-3059

摘要

目的: 探讨外周血细胞CEA mRNA, CK19mRNA水平与胃癌EAP方案介入化疗近期疗效相关意义。

方法: 选择30例中晚期胃癌患者(Ⅱ期3例, Ⅲ期15例, Ⅳ期12例), 于EAP(VP-16+ADM+CBP)介入化疗前2-3 d及化疗后2-3 wk取外周血, 全自动发光免疫法检测血清CEA及TPA, 逆转录聚合酶链反应检测CEA及

■背景资料

肿瘤标志物检测在临床肿瘤治疗中日益受到关注, 尤其是对于预后的连续随访, 有其简便易行、准确度较高的特点。用RT-PCR法进行外周血CEA mRNA与CK19 mRNA联合检测, 目前还难以在临床上广泛推广。

■应用要点

本研究揭示了在敏感性和特异性上RT-PCR方法优于传统手段,随着技术的进步、发展,RT-PCR方法必将更加完善、成熟,从而成为临床肿瘤治疗新的有力工具。

CK19 mRNA. 用超声内镜(EUS)结合CT测量肿块对化疗的有效率(CR+PR)情况。

结果: 介入化疗前后外周血CEA及CK19 mRNA均有显著差异[CEA: 60.0%(18/30) vs 33.3%(10/30), $\chi^2 = 4.29$, $P < 0.05$; CK19: 73.3%(22/30) vs 46.7%(14/30), $\chi^2 = 4.34$, $P < 0.05$]. CEA及CK19 mRNA联合检测阳性率在介入化疗前后也有显著差异[90.0%(27/30) vs 50.0%(15/30), $\chi^2 = 8.52$, $P < 0.05$]. 影像学诊断显示, 外周血CEA mRNA, CK19 mRNA联合检测阳性患者治疗前后分别为16例及5例($\chi^2 = 8.86$, $P < 0.05$).

结论: 外周血细胞CEA mRNA、CK19 mRNA水平在EAP方案介入化疗后阳性率显著下降, CEA mRNA、CK19 mRNA联合检测的敏感性高于血清CEA、TPA联合检测, 可反应EAP方案介入化疗后肿瘤体积的变化情况。

关键词: 胃肿瘤; 逆转录聚合酶链反应; 角蛋白19; 癌胚抗原; 介入化疗; 放疗

张强, 姚惠香, 孙群, 朱金水. 动脉化疗对进展期胃癌CEA mRNA及CK19 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3055-3059

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3055.asp>

0 引言

抗肿瘤药常用以辅助胃癌手术治疗, 在术前术中及术后使用, 以抑制癌细胞的扩散和杀伤残存的癌细胞, 从而提高手术效果, 中晚期胃癌能被手术切除者亦必须给化疗, 凡未做根治性切除的患者或不能施行手术者, 可试用联合化疗. 常用的化疗剂有5-氟尿嘧啶(5-FU)、丝裂霉素(MMC)、阿霉素(ADM)、亚硝脲类(如CCNU)和顺铂(DDP)、VP-16, 羟喜树碱, 以及紫杉醇类等. EAP方案是常用的疗效较好的化疗方案, 可使21%的局部进展性病变, 4%的远处转移病例获无瘤生存3 a以上, 但该方案副作用较大, 患者常常难以耐受^[1]. 经股动脉插管到相应动脉支进行介入性动脉化疗, 药物的不良反应较全身用药者为小. 进行EAP方案介入性动脉化疗, 是近年来提高胃癌治疗效果的努力方向之一. 本实验研究联合检测外周血CEA mRNA, CK19mRNA水平在中晚期胃癌EAP介入化疗前后的变化情况, 为进一步研究其指导临床治疗的价值提供依据^[2].

1 材料和方法

1.1 材料 30例中晚期患者来自2002-01/2005-07

本院收治病例, 其中男性17例, 女性13例, 年龄46-77(中位59)岁, 均由手术或胃镜活检, 由病理组织学检查确诊, 其中腺癌25例, 未分化癌5例, 按WHO分期II期3例, III期15例, IV期12例. 上述患者在本实验期间均未行EAP介入化疗以外的其他抗肿瘤治疗. 于EAP介入化疗前2-3 d及化疗后2-3 wk, 取外周血2 mL和8 mL分离血清备用. 试剂为RNA抽提剂(TriBlue), 氯仿, 异丙醇, 无水乙醇, 焦碳酸二乙酯(DEPC), 淋巴细胞分离液, Hank's液(无Ca²⁺、Mg²⁺), 100 mL/L小牛血清RPM I 1640, 2 g/L台盼兰染色液, 琼脂糖: 由上海申能博彩生物科技有限公司提供, 10×PCR Reaction Buffer with 15 mmol/L Mg: Eversun Biogene Molecular Diagnostics Co. 2.5 mmol/L dNTPmix 100 μL: Promega, Taq DNA Polymerase(recombination)5×10⁶ U/L: Fermentas, PCR Markers: Fermentas, 逆转录试剂盒(protoscript)等. CEA mRNA巢式PCR, 设计3个引物, 由上海生物工程研究中心合成. 引物序列如下: Primer A 5'-TCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGG3'; Primer B 5'-TGTAAGCTGTTGCAAATGCTTTAA GGAAGAAGC3'; Primer C 5'-GGGCCACTGTG GGCATCATGATTGG3'. CK19 mRNA引物由博亚公司合成, 片断大小: 1.2 kb. 序列如下: CK19上游: 5' AATAAATAGGATCCATGCAGGACT GTGGAAAAGA 3'; CK19下游5' TTTTAATGAA TTCAGTAGATAGTAATCTCCTCCTC 3'; βactin: 371 bp上海申能博彩生物科技有限公司提供. 上游: 5'ACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATC 3', 下游: 5'GTAGCCGCGCTCGGTGAGGATCTT CAT 3'.

1.2 方法

1.2.1 血清CEA, TPA的测定 于EAP介入化疗前2-3 d及化疗后2-3 wk, 取外周血2 mL分离血清, 保存于-20℃备用. 血清CEA检测采用全自动发光免疫法(abbott architect system), 阳性判定标准为>15 μg/L. 血清TPA检测采用全自动发光免疫法(liaison system), 阳性判定标准为>75 IU/L.

1.2.2 外周血CEA, CK19 mRNA表达水平的测定 细胞的收集及总RNA的抽提. 逆转录反应合成cDNA. 取逆转录反应产物CK19 mRNA 1 μL行第一轮PCR. 反应体系中引物为PrimerA, B和βactin (各0.2 mol/L), 另有10×Buffer, 10×dNTP, RNA酶抑制剂等. 反应条件: 97℃变性5 min, 冰浴冷却, 加入Taq酶(0.5U). 95℃变性1 min, 72℃退火及延伸2 min, 循环30次, 72℃延伸10 min. 取第一轮

PCR反应产物1 μ L行第二轮PCR, 引物为Primer C, B和 β actin (各0.2 mol/L), 反应条件: 97℃变性5 min, 冰浴冷却, 加入Taq酶(0.5U). 95℃变性1 min, 72℃退火及延伸2 min, 循环30次, 72℃延伸10 min后中止反应. 取出PCR终产物5 μ L, 70 V, 在20 g/L的琼脂糖凝胶电泳50 min, 溴化乙啶染色, 将凝胶置于TANON成像系统内拍摄, 呈现131 bp和371 bp条带的即为CEA mRNA阳性. CK19 mRNA的扩增及处理: 在冰浴微量离心管按MJ公司说明书加入25 μ L体系, 轻轻混匀, 按不同退火温度(Tm)进行PCR循环23次. PCR产物5 μ L, 加入10 \times Buffer, 80 V, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳50 min, 溴化乙啶染色, TANON凝胶扫描分析仪, 拍照, 呈现1200 bp和371 bp条带的即为CK19 mRNA阳性.

Quantity One 1-D 分析软件(Bio-Rad, USA)半定量分析, 根据荧光强度分为+, ++, +++, +++++4级. 其灰度值分别为内参 β actin条带灰度值的0%-25%, 25%-50%, 50%-75%, 75%-100%.

1.2.3 EAP介入化疗方法 患者仰卧位, 常规消毒、铺巾后, 采用Philips V3000 DSA, 以Seldinger法经股动脉插管, 用Cobra导管, RH导管或胃左动脉导管, 经股深动脉分支逆行插入主动脉至第9-11胸椎平面的腹腔动脉起始部后, 依据肿瘤部位, 再尽量选择性插入胃左动脉, 胃十二指肠动脉, 胃右动脉, 然后将VP16 200 mg/m²+ADM 60 mg/m²+CBP 200 mg/m²用生理盐水溶后15 min内推注完毕. 注毕拔出导管, 压迫穿刺点15 min后加压包扎, 术后卧床24 h. 分别于治疗前及治疗后2-3 wk通过超声内镜(OLYMPUS EU -M)测量治疗前后的病灶变化情况, 同时结合CT诊断, 以全国胃癌协作组制定的疗效评定标准分级.

统计学处理 数据统计分析用SAS 6.12软件包, 统计检验方法包括: *t*检验、方差分析、 χ^2 检验和Ridit检验.

2 结果

介入化疗后影像学诊断为缓解(CR)或部分缓解(PR)的病例数为16例, 治疗有效率为53.3%. 所有患者均能耐受治疗过程, 主要的副反应为胃肠道反应及II-III级骨髓抑制, 对症治疗后均能缓解.

2.1 血清CEA, TPA及CEA, CK19 mRNA的检测 结果 治疗前CEA, TPA检测值(mean \pm SD, $n=30$)为41.04 \pm 113.67 μ g/L, 63.50 \pm 53.74 IU/L. 治疗

表 1 治疗前后两种方法检测阳性例数 ($n=30$)

分组	治疗前	治疗后
CEA	12	10
TPA	11	7
CEA+TPA	18	15
CEA mRNA	24	10 ^a
CK19 mRNA	22	14 ^a
CEA mRNA+CK19 mRNA	27	15 ^a

治疗前后比较的卡方检验, ^a $P<0.05$.

表 2 化疗前后CEA mRNA+CK19mRNA检测阳性例数分级结果($n=30$)

组别	治疗前				治疗后			
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
CEA mRNA ($P=0.2639$)	10	7	6	1	5	5	0	0
CK19mRNA ^a ($P=0.0175$)	9	5	6	1	11	3	0	0
CEA mRNA+ CK19mRNA ^a ($P=0.019$)	11	8	7	1	12	5	0	0

治疗前后, Ridit检验, ^a $P<0.05$.

后CEA, TPA检测值(mean \pm SD, $n=30$)为12.79 \pm 30.72 μ g/L, 41.46 \pm 32.95 IU/L.

2.2 影像学诊断为有效之病例的2种方法检测结果 介入化疗后影像学诊断为缓解(CR)或部分缓解(PR)的病例数为16例, 其中血清CEA、TPA 联合检测阳性例数治疗前为13例, 治疗后为10例, $\chi^2=0.63$, $P>0.05$; 外周血CEA mRNA, CK19 mRNA联合检测阳性例数治疗前为16例, 治疗后为5例, 有显著差异($\chi^2=8.86$, $P<0.05$)(表1-2).

2.3 化疗前后CEA mRNA, CK19 mRNA检测阳性病例的荧光强度分级变化结果 化疗前后CK19 mRNA组, CEA mRNA+CK19 mRNA组检测结果有显著性差异.

3 讨论

肿瘤标志物蛋白免疫法检测存在明显的局限性, 因为肿瘤标志物不仅在发生癌变时产生, 在正常的和良性疾病情况下也有不同程度表达, 肿瘤标志物产生还受到机体一些生物活性因子的影响. 这使得我们不得不把目光投向新的检测原理和方法^[3-5]. 恶性肿瘤在病变发展过程中癌细胞经常进入淋巴流和血流, 再经血循环至全身各组织脏器, 因而可能在外周血检测到肿瘤细胞或其相关物质的mRNA^[6-7].

Mori *et al*对13例大肠癌患者的117个淋巴

■同行评价

本文检测指标有一定创新, 采用前后实验对照的设计, 合理可靠, 统计学处理方法的使用恰当. 结论较明确, 实验证据较充足.

结进行了CEA mRNA检测,发现88个常规检测阴性的患者淋巴结有47个淋巴结CEA mRNA阳性^[8],还对65例消化道肿瘤及乳腺癌患者的406个淋巴结进行CEA mRNA的RT-PCR检测并进行了随访,微转移率为40.1%,有淋巴转移的15例患者6例复发,29例有微转移的患者4例复发.21例无微转移患者无复发,这进一步说明了CEA mRNA的敏感性和重要性^[9].Guadagni *et al*应用RT-PCR检测结直肠癌患者外周血CEA mRNA值,结果在所有不同分期的肿瘤患者中CEA mRNA阳性占69%,而血清CEA阳性率为35%.术前后对比外周血CEA mRNA含量呈直线下降.而异常升高均反映肿瘤复发及转移,因为恶性肿瘤血行转移与循环肿瘤细胞数量有关^[10].由上述文献可见,CEA mRNA是适合检测循环肿瘤细胞的标记物^[11].

细胞角蛋白(CK)是一个多基因家族,主要在上皮细胞表达. Soeth *et al*用巢式RT-PCR监测了57例大肠癌患者的骨髓CK20 mRNA表达,阳性率为65%^[12]. CK19作为乳腺癌淋巴结的转移指标也取得了较好的结果,10个常规切片阳性的淋巴结CK19 mRNA也为阳性,而53个阴性淋巴结中有5个CK19 mRNA为阳性,表示有微小转移. CK19 mRNA作为微转移检测的基因标记有较高的应用价值, Peck *et al*的定量RT-PCR实验结果显示,抗肿瘤治疗效果的好坏与肿瘤患者外周血CK19 mRNA表达量的多少有良好的一致性^[13].当然也有相反意见, Wyld *et al*在实验中发现,正常血标本中有CK20 mRNA表达,从而怀疑他的特异性^[14]. Jung *et al*发现正常粒细胞中也有CK20 mRNA表达^[15]. Majima *et al*^[16]认为许多实验用同一种标志物却得出不同的阳性率,可能的原因为肿瘤细胞间歇入血,不同的时间点采血所得结果不同,所用的方法无统一标准.也可能由于肿瘤标志物在不同肿瘤细胞中表达差异或低表达引起^[17].

近年来国内外的临床实验研究显示,高选择动脉插管化疗治疗胃癌由于药物直接进入肿瘤血管,局部浓度高,且能避免常规静脉化疗时药物同血浆蛋白结合失去抗癌活性,故可明显提高抗癌效果,且毒副作用低,能提高手术切除率,对防止术中瘤细胞医源性扩散、种植及术后复发也有重要的临床意义. Tao *et al*^[18]对110例胃癌随机行术前局部动脉化疗(PRACT),其肿瘤细胞的凋亡指数(12.5 ± 4.33)高于未行该治疗的组(7.1 ± 3.43),且肿瘤细胞增生指数($33.8 \pm 8.8\%$)低于未行PRACT组($43.6 \pm 12.8\%$),

实验证明PRACT主要通过抑制肿瘤细胞的增生并诱导其凋亡而抑制胃癌的生长,能提高胃癌患者的预后,其5 a生存率明显高于未行PRACT的患者.并且近几年的临床研究显示,对已诊断为晚期胃癌合并邻近脏器(如胰、肝脏等)及淋巴结转移或侵入,不能行手术切除的患者,行全身(CDDP 和UFT)及局部(5-FU, DXR 和 MMC)动脉灌注化疗,结果显示患者的生存时间延长并在治疗中保持一个较好的生活质量^[19].目前肿瘤治疗进展日新月异,其中剂量密集治疗的理论尤为令人关注.剂量密集治疗就是指在单药或联合用药剂量不变的情况下,缩短用药间隔,这符合肿瘤的生物特点:即化疗能减少肿瘤细胞的数量,同时残留的处于G₀期的肿瘤细胞就会迅速进入生长周期,从而使化疗间期的细胞再生长率上升,但生长周期的细胞对化疗是敏感的,如能尽可能缩短每次化疗用药间隔将大大增加对肿瘤细胞的杀灭.我们了解每次化疗后肿瘤负荷变化,及时调整用药方案,就显得格外重要^[20-21].然而个体化的治疗方案更依赖于影像学,组织病理学和肿瘤标志物检验方法给我们提供丰富而完整的肿瘤动态信息.肿瘤标志物测定以外周血为样品,简便易行,本实验在化疗结束后2 wk进行外周血CEA mRNA与CK19 mRNA联检,就是为了得到化疗后早期肿瘤变化的信息,国内外尚未见报道外周血单核细胞中CEA mRNA, CK19 mRNA水平联检与胃癌介入化疗后疗效的关系.本实验证实用RT-PCR法进行外周血CEA与CK19 mRNA联检后,方便了对胃癌EAP方案介入化疗近期疗效的评判,为进一步制定治疗计划提供了可靠依据.

RT-PCR方法是目前检测外周血中肿瘤细胞较成熟,较敏感的方法,但有不足之处就是可能出现假阳性及假阴性.实验因素造成外周血中mRNA阳性表达可能的因素有:上皮细胞污染;假基因的干扰等.临床上可以通过取第二管血,跟踪检测来控制上皮细胞的污染,或通过严格设计引物、优化反应条件等以解决假基因干扰的问题.而假阴性的原因有:由于肿瘤细胞异质所致,有些靶基因在肿瘤细胞中表达缺乏或不足,可采用多个靶基因联合检测来提高阳性检测率.肿瘤细胞进入血循环是间断性的,因此可采取多次采血以提高阳性检出率^[22-23].动物实验表明仅0.01%的循环肿瘤细胞能达到下一器官并发展成显性转移,而大部分肿瘤细胞则被机体的免疫系统所杀灭,因此能否发展成临床意义的肿瘤团块存在争议^[24].如果能通过体

外培养分离得到肿瘤细胞, 再通过体内体外实验分析其侵袭潜能, 测试其对不同药物的敏感性, 人们就有希望方便而有针对性地用基因治疗、放射治疗、化疗、手术等多种方法来达到治愈肿瘤的目的^[25-26].

4 参考文献

- 1 孙燕. 内科肿瘤学. 北京: 人民卫生出版社, 2001; 563-571
- 2 Pritzker KP. Cancer biomarkers: easier said than done. *Clin Chem* 2002; 48: 1147-1150
- 3 Sakakura C, Takemura M, Hagiwara A, Shimomura K, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Takagi T, Kin S, Nakase Y, Fujiyama J, Hayasizaki Y, Okazaki Y, Yamagishi H. Overexpression of dopa decarboxylase in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastases with real-time RT-PCR. *Br J Cancer* 2004; 90: 665-671
- 4 Kojima N, Kunieda K, Matsui K, Kato H, Saji S. Evaluation of carcinoembryonic antigen mRNA in living, necrotic, and apoptotic gastric cancer cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Surg Today* 2003; 33: 839-846
- 5 Sumikura S, Ishigami S, Natsugoe S, Miyazono F, Tokuda K, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M, Hokita S, Aikou T. Disseminated cancer cells in the blood and expression of sialylated antigen in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 200: 77-83
- 6 Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF, Rosai J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1195-1200
- 7 Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Bocchino ML, Ponticelli A, Barra E, Vitale D, Bariffi F, Sacchetti L, Salvatore F. Lung cancer metastatic cells detected in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot analysis. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3388-3393
- 8 Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995; 55: 3417-3420
- 9 Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 128-132
- 10 Guadagni F, Kantor J, Aloe S, Carone MD, Spila A, D'Alessandro R, Abbolito MR, Cosimelli M, Graziano F, Carboni F, Carlini S, Perri P, Sciarretta F, Greiner JW, Kashmiri SV, Steinberg SM, Roselli M, Schlom J. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res* 2001; 61: 2523-2532
- 11 Funaki NO, Tanaka J, Kasamatsu T, Ohshio G, Hosotani R, Okino T, Imamura M. Identification of carcinoembryonic antigen mRNA in circulating peripheral blood of pancreatic carcinoma and gastric carcinoma patients. *Life Sci* 1996; 59: 2187-2199
- 12 Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69: 278-282
- 13 Peck K, Sher YP, Shih JY, Roffler SR, Wu CW, Yang PC. Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58: 2761-2765
- 14 Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79: 288-293
- 15 Jung R, Petersen K, Kruger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer* 1999; 81: 870-873
- 16 Majima T, Ichikura T, Mochizuki H. Clinical significance of detecting circulating cancer cells in patients with solid malignancies. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001; 28: 769-775
- 17 Zippelius A, Pantel K. RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors. An overview. *Ann NY Acad Sci* 2000; 906: 110-123
- 18 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 451-454
- 19 Kobayashi M, Kasakura Y, Fujii M, Mochizuki F, Kochi M, Eguchi T, Imai S. Curative resection of advanced gastric cancer responding to preoperative chemotherapy-a case report. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001; 28: 527-530
- 20 Zhu JS, Wang L, Cheng GQ, Li Q, Zhu ZM, Zhu L. Apoptosis mechanisms of human gastric cancer cell line MKN-45 infected with human mutant p27. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7536-7540
- 21 Ajani JA, Winter K, Okawara GS, Donohue JH, Pisters PW, Crane CH, Greskovich JF, Anne PR, Bradley JD, Willett C, Rich TA. Phase II trial of preoperative chemoradiation in patients with localized gastric adenocarcinoma (RTOG 9904): quality of combined modality therapy and pathologic response. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3953-3958
- 22 冯玉梅, 郝希山, 于永, 王立梅, 李希. CK19作为微转移癌检测基因标志的假基因干扰及解决方法. *中华肿瘤杂志* 2001; 23: 330-331
- 23 Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 870-879
- 24 Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H, Aihara T, Kasugai T, Tamura S, Imaoka S, Koyama H, Iwanaga T. Detection of gastric cancer micrometastases in lymph nodes by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 650-654
- 25 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- 26 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198

螺旋CT对胃癌淋巴结转移的评价

赵志清, 郑可国, 沈静娴, 王伟, 李子平, 许达生

■背景资料

淋巴结转移是胃癌的主要转移方式, 因而术前影像学判断有无淋巴结转移具有重要的临床意义。文献报道螺旋CT判断有无淋巴结转移主要是依靠淋巴结最大直径、短轴与长轴之比、增强时有无强化等为标准。

赵志清, 郑可国, 王伟, 李子平, 许达生, 中山大学附属第一医院放射科 广东省广州市 510080

沈静娴, 中山大学附属肿瘤医院放射科 广东省广州市 510080

通讯作者: 赵志清, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院放射科。zzq4480@yahoo.com.cn

电话: 0755-27722241-3808

收稿日期: 2006-08-01 接受日期: 2006-08-15

Evaluation of lymph node metastases in gastric cancer with spiral computed tomography

Zhi-Qing Zhao, Ke-Guo Zheng, Jing-Xian Shen, Wei Wang, Zi-Ping Li, Da-Sheng Xu

Zhi-Qing Zhao, Ke-Guo Zheng, Wei Wang, Zi-Ping Li, Da-Sheng Xu, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sun University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Jing-Xian Shen, Department of Radiology, the Affiliated Tumor Hospital of Sun Yat-Sun University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zhi-Qing Zhao, Department of Radiology, Sha Jing people's hospital, Shenzhen 518104, Guangdong Province, China. zzq4480@yahoo.com.cn

Received: 2006-08-01 Accepted: 2006-08-15

Abstract

AIM: To investigate the manifestation characteristics of spiral computed tomography (SCT) for lymph nodes metastases in gastric cancer, and to provide the evidence for clinicians to make appropriate treatment strategies and prognosis analysis.

METHODS: The SCT findings for lymph nodes in 45 gastric cancer patients with or without metastasis were confirmed by surgical pathology, and then retrospectively analyzed.

RESULTS: A total of 267 lymph nodes (positive 123, negative 144) were detected by SCT and confirmed by pathology in metastasis-positive or metastasis-negative patients. If the attenuation values, more than or equal to 25 Hu in plain scan or 70 Hu in arterial phase or 80 Hu in venous phase, were used as the threshold to detect the metastasis-positive lymph nodes, the sensi-

tivity, the positive predictive value, the negative predictive value and the specificity were 98.4%, 70.0%, 97.9% and 69.3%, respectively.

CONCLUSION: SCT is valuable in judging the metastasis in gastric cancer. The application of attenuation values more than or equal to 25 Hu in plain scan or 70 Hu in arterial phase or 80 Hu in venous phase can dramatically improve the diagnosis for lymph node metastasis in gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Spiral computed tomography; Lymph node metastasis

Zhao ZQ, Zheng KG, Shen JX, Wang W, Li ZP, Xu DS. Evaluation of lymph node metastases in gastric cancer with spiral computed tomography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3060-3064

摘要

目的: 探讨胃癌淋巴结转移的螺旋CT特征, 从而指导临床合理地制订治疗方案和进行预后分析。

方法: 回顾性分析经手术病理证实的45例胃癌全阴组 and 全阳组淋巴结的影像资料, 并与病理进行对照研究。

结果: 螺旋CT检出病理诊断为全阳组 and 全阴组的各组淋巴结共267个, 其中阳性淋巴结有123个, 阴性淋巴结有144个。如以平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准, 则阳性淋巴结的敏感性高达98.4%, 阳性预测值为70.0%; 特异性为69.3%, 阴性预测值为97.9%。

结论: 螺旋CT对判断胃癌有无淋巴结转移有重要作用。如以平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准, 则将大大提高对淋巴结转移的诊断。

关键词: 胃癌; 螺旋CT; 淋巴结转移

赵志清, 郑可国, 沈静娴, 王伟, 李子平, 许达生. 螺

螺旋CT对胃癌淋巴结转移的评价. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3060-3064
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3060.asp>

0 引言

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤, 根治性手术仍是其主要的治疗手段^[1-5], 能否彻底清除已有转移的淋巴组织是决定患者预后的主要因素之一, 但如果广泛切除无转移的淋巴结, 可能影响到机体的免疫功能, 增加手术创伤, 无益于手术疗效的提高^[6-10]. 因此术前确定胃癌淋巴结转移存在与否对胃癌的术前分期、临床治疗方案的制订、估计预后等有着非常重要的意义^[11-13]. 我们对45例胃癌患者螺旋CT检查与临床手术病理结果进行对照分析, 探讨胃癌淋巴结转移的螺旋CT特征.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-2004年我院胃癌患者45例, 男31例, 女14例. 年龄30-78(平均56.6)岁. 所有病例术前均经胃镜活检证实, 并于螺旋CT检查后10 d行根治性手术, 术后病理报告均为腺癌. 手术摘取的淋巴结按照日本胃癌研究会淋巴结部位分类法标记其位置、大小与数目, 送病理科检查, 并报告淋巴结转移阳性或阴性. CT检查采用的是东芝Xpress/sx螺旋CT机.

1.2 方法 CT检查前患者禁食8-12 h, 扫描前口服饮用水800-1000 mL, 扫描层厚0.5 cm, 扫描条件120 kV, 250 mAs, 矩阵512×512, 螺距为1. 先行平扫然后行双期增强扫描, 对比剂用碘普胺注射液, 浓度为300 g/L, 总量按1.5 mL/kg, 采用ENVISION CT高压注射器, 流率3 mL/s, 经肘静脉注射对比剂后27 s开始动脉期扫描, 60 s开始静脉期扫描. 术后选择病理报告为全阴组或全阳组的淋巴结作为观察对象, 由2位腹部放射学高年资医师在PACS系统终端(安科公司)上对位于相应组的所有淋巴结测量, 测量时先对CT图像进行放大, 再进行测量(尤其是对小淋巴结进行测量时), 力求所得数据准确可靠, 内容包括淋巴结短径、长径、平扫CT值、增强后动脉期及静脉期CT值, 探讨淋巴结转移的CT征象. 由于CT观察到的淋巴结与病理证实的淋巴结完全一一对应较困难, 但同一组淋巴结CT与术后病理对应则较准确, 本研究设定如果术后病理报告手术切除的同一组淋巴结转移为全阴或全阳, 则在CT图像上观察到的对应组的所有淋巴结转移亦

为全阴或全阳.

统计学处理 测量所得的数据用SPSS 11.0统计学软件进行处理, 各组间的数据以mean±SD表示, 计量资料各组间均数比较用 t 检验, 计数资料的比较用R×C表资料的 χ^2 检验, 以 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

本组45例胃癌行根治性手术共摘取淋巴结869个. 病理证实淋巴结转移阳性308个, 阳性率为35.4%. CT共检出493个淋巴结, 其中术后病理诊断为全阳性和全阴性的各组淋巴结共267, 阳性123个(46.1%), 阴性144个(53.9%). 阳性和阴性淋巴结的短径、长径、平扫CT值、增强后动脉期CT值、静脉期CT值的范围和均数见表1, 阳性和阴性淋巴结的短径、长径、平扫CT值、增强后动脉期CT值、静脉期CT值均数间的差别都有统计学意义($t = 6.83, 6.09, 11.6, 11.72, 11.62, P<0.01$), 而阳性和阴性淋巴结的短长径比均数间的差异没有统计学意义($t = 0.74, P>0.01$).

2.1 淋巴结的大小 本组267个淋巴结中长径<1.0 cm的淋巴结有198个(74.2%), 其中阳性有74个(37.4%), 阴性124个(62.6%); 长径≥1.0 cm的淋巴结共有69个(25.8%), 其中阳性有49个(71%), 阴性有20个(29%), 两者之间的差异有统计学意义($\chi^2 = 23.3, P<0.01$).

2.2 淋巴结平扫CT值 平扫CT值<25 Hu的淋巴结有136个(51%), 其中阳性有20个(14.7%), 阴性有116个(85.3%); CT值≥25 Hu的淋巴结有131个(49%), 其中阳性有103个(78.6%), 阴性有28个(21.4%), 两者之间的差异有统计学意义($\chi^2 = 109.73, P<0.01$). 平扫CT值<5 Hu的淋巴结有45个(16.85%), 全为阴性.

2.3 增强后动脉期淋巴结的CT值 增强后动脉期CT值<70 Hu的共有139个(52.1%), 其中阳性有28个(20.1%), 阴性有111个(79.9%)(图1A); CT值≥70 Hu的淋巴结有128个(47.9%), 其中阳性有95个(74.2%)(图1B), 阴性有33个(25.8%), 两者之间的差异有统计学意义($\chi^2 = 78.43, P<0.01$). 增强后动脉期CT值<40 Hu的淋巴结有51个(19.1%), 全为阴性.

2.4 增强后静脉期淋巴结的CT值 增强后静脉期CT值<80 Hu的共有143个(53.6%), 其中阳性有34个(23.8%), 阴性有109个(76.2%)(图1C); 增强后静脉期CT值≥80 Hu的淋巴结有124个(46.4%), 其中阳性有89个(71.8%)(图1D), 阴性有

■应用要点

本文旨在探讨胃癌淋巴结转移的螺旋CT特征, 以提高胃癌淋巴结转移的CT诊断符合率. 该文结果显示在平扫CT值≥25 Hu、动脉期CT值≥70 Hu、静脉期CT值≥80 Hu时, 判断胃癌淋巴结转移的敏感性最高.

■同行评价

本文通过回顾性对比病理证实全组阴性或全组阳性淋巴结的术前螺旋CT图像,探讨胃癌淋巴结转移的螺旋CT特征,有一定的价值,具有可读性。

表 1 阳性淋巴结与阴性淋巴结的对照 ($n = 267$)

淋巴结	阳性		阴性	
	范围	均数	范围	均数
短径(cm)	0.36–2.8	0.90 ± 0.52^b	0.2–1.2	0.59 ± 0.18
长径(cm)	0.37–4.4	1.09 ± 0.71^b	0.3–1.4	0.71 ± 0.23
平扫CT值(Hu)	5–60	33.94 ± 10.11^b	–50–54	10.06 ± 20.85
动脉期CT值(Hu)	43–135	84.84 ± 20.37^b	–24–124	48.38 ± 29.03
静脉期CT值(Hu)	45–144	91.21 ± 18.05^b	–6–127	56.97 ± 28.1
短长比	0.55–1	0.86 ± 0.12	0.42–1	0.84 ± 0.16

^b $P < 0.01$ vs 阴性淋巴结。



图 1 经病理证实的胃癌淋巴结转移的螺旋CT表现。A: 阴性淋巴结, 动脉期, 淋巴结轻度强化, CT值约为–24 Hu; B: 阳性淋巴结, 动脉期, 淋巴结明显强化, CT值约为135 Hu; C: 阴性淋巴结, 静脉期, 淋巴结轻度强化, CT值约为–6 Hu(与A同一病例); D: 阳性淋巴结, 静脉期, 淋巴结明显强化, CT值约为144 Hu(与B同一病例)。

35个(28.2%), 两者之间的差异有统计学意义($\chi^2 = 61.58, P < 0.01$)。增强后静脉期CT值 < 45 Hu的淋巴结有48个(18%), 全为阴性。

2.5 阳性、阴性淋巴结的病理与CT结果对照 本组267个淋巴结中平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu的淋巴结共有173个, 其中阳性有121个(69.9%), 阴性有52个(31.1%), 两者之间的差异有统计学意义($\chi^2 = 112.7, P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

淋巴结转移是胃癌的主要转移方式, 也是影响胃癌分期、手术方式选择和预后的一个重要因素, 因而术前影像学判断有无淋巴结转移具有重要的临床意义^[3-16]。文献报道螺旋CT判断有无淋巴结转移主要是依靠淋巴结最大直径、短轴

表 2 阳性、阴性淋巴结的病理与CT结果对照 ($n = 267$)

病理	CT		共计
	阳性淋巴结	阴性淋巴结	
阳性淋巴结	121 ^b	2	123
阴性淋巴结	52	92	144
共计	173	94	267

^b $P < 0.01$ vs 阴性淋巴结。

与长轴之比、增强时有无强化等为标准。多数以淋巴结直径 ≥ 1.0 cm为阳性标准, 亦有以淋巴结直径 ≥ 0.5 cm为标准者^[10-19], 事先设定淋巴结的直径大于一定的阈值为转移, 再评价胃癌淋巴结的转移情况。众所周知, 标准以上的淋巴结不全是转移, 而标准以下的淋巴结亦不全是阴性。为了提高胃癌淋巴结转移的CT诊断符合率, 本研究对病理诊断为全阳性和全阴性的各组淋巴结进行回顾性多因素分析。

淋巴结的大小是判断淋巴结有无转移的主要指标, 也是影响淋巴结能否检出的主要因素, 随着淋巴结直径的增加, 转移率明显升高。本组267个淋巴结如以淋巴结长径1.0 cm为阈值, 则阳性淋巴结的敏感性为39.8%(49/123), 阳性预测值为71%(49/69), 阴性预测值为62.6%(124/198), 特异性为86.1%(124/144), 阳性淋巴结的误诊率为60.2%(74/123)。显然, 单纯依据淋巴结直径(≥ 1.0 cm)诊断有无转移, 无法同时保证敏感性和特异性, 是不全面、不可取的。因此, 在淋巴结转移的诊断中, 不能只注重直径较大的淋巴结, 亦应重视小淋巴结转移的问题, 这对于提高诊断的敏感性和特异性有重要意义。另外, 本组267个淋巴结中, 阳性淋巴结与阴性淋巴结的短长径之比均数之间的差异没有统计学意义($t = 0.74, P > 0.01$)。与Fukuya *et al*^[20]报道

的不一致, 这可能是因为本组淋巴结中短长径之比为1的个数太多的原故(共169个)。

正常淋巴结中因含脂肪成分较多, 密度相对较低, 可为负值, 与周围脂肪组织的密度差别小, 且体积亦相对较小, 不易被CT检出, 当出现炎性反应或癌转移等时其密度相对增高, 且不均匀, 体积增大或融合, 易被CT检出^[16-22]。本组267个淋巴结如以平扫CT值25 Hu为域值, 则阳性淋巴结的敏感性为83.7%(103/123), 阳性预测值为78.6%(103/131); 阴性预测值为85.3%(116/136), 特异性为80.6%(116/144), 阳性淋巴结的误诊率为16.3%(20/123), 各项指标均较理想。故判断胃癌淋巴是否结转移, 就平扫CT值而言, 建议以25 Hu为标准。

一般认为, 正常淋巴结血供不丰富, 增强后表现为轻度强化或无强化。而当发生转移时, 因血供相对较丰富, 增强后的强化多较明显, 且密度不均匀^[20-25]。本组267个淋巴结如以动脉期CT值70 Hu为域值, 则阳性淋巴结的敏感性为77.2%(95/123), 阳性预测值为74.2%(95/128); 阴性预测值为79.9%(111/139), 特异性为77.1%(111/144), 阳性淋巴结的误诊率为22.8%(28/123), 各项指标均较理想。因此, 判断胃癌淋巴是否有转移, 就增强后动脉期CT值而言, 建议以70 Hu为标准。

胃癌淋巴结转移增强后静脉期对比动脉期, 淋巴结多进一步强化, 且阳性淋巴结多强化更加明显, 其强化特征在门脉期显示更为清楚^[23-27]。本组267个淋巴结如以静脉期CT值80 Hu为域值, 则阳性淋巴结的敏感性为72.4%(89/123), 阳性预测值为71.8%(89/124); 阴性预测值为76.2%(109/143), 特异性为75.7%(109/144), 阳性淋巴结的误诊率为27.6%(34/123)。因此, 判断胃癌淋巴是否转移, 就增强后静脉期淋巴结的CT值而言, 建议以80 Hu为标准。

由此可见, 以单一的标准判断胃癌淋巴结转移阳性和阴性, 螺旋CT的敏感性、特异性均不理想。因此, 我们试图通过多因素综合判断胃癌淋巴结的转移情况。我们由表2可知, 本组267个淋巴结如以平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准, 则阳性淋巴结的敏感性高达98.4%(121/123), 阳性预测值为70%(121/173); 阴性预测值高达97.9%(92/94), 特异性为69.3%(92/144), 阳性淋巴结的误诊率仅为1.6%, 各项指标均较理想。因此, 判断胃癌有无淋巴

结转移, 以平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准, 各项指标较为理想, 值得推广。

4 参考文献

- 1 Takahashi I, Maehara Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Oshiro T, Baba H, Kohnoe S, Okamura T, Uike N, Matsusaka T, Kume K, Sugimachi K. Role of surgery in the patients with stage I and II primary gastric lymphoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 877-882
- 2 Kim JP. Surgical results in gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 1999; 17: 132-138
- 3 Kim JP, Yu HJ, Lee JH. Results of immunochemosurgery for gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1227-1230
- 4 Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10 783 patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1998; 1: 125-133
- 5 Alici S, Kaya S, Izmirli M, Tuncer I, Dogan E, Ozbek H, Sayarlioglu H. Analysis of survival factors in patients with advanced-stage gastric adenocarcinoma. *Med Sci Monit* 2006; 12: CR221-229
- 6 Yokota T, Ishiyama S, Saito T, Teshima S, Narushima Y, Murata K, Iwamoto K, Yashima R, Yamauchi H, Kikuchi S. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 380-384
- 7 Kendal WS. Lymph node-based prognostics: limitations with individualized cancer treatment. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 298-304
- 8 Ichikura T, Tomimatsu S, Okusa Y, Uefuji K, Tamakuma S. Comparison of the prognostic significance between the number of metastatic lymph nodes and nodal stage based on their location in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1894-1900
- 9 Tunaci M. Carcinoma of stomach and duodenum: radiologic diagnosis and staging. *Eur J Radiol* 2002; 42: 181-192
- 10 Lim JS, Yun MJ, Kim MJ, Hyung WJ, Park MS, Choi JY, Kim TS, Lee JD, Noh SH, Kim KW. CT and PET in stomach cancer: preoperative staging and monitoring of response to therapy. *Radiographics* 2006; 26: 143-156
- 11 Kunisaki C, Shimada H, Nomura M, Matsuda G, Otsuka Y, Ono H, Akiyama H. Distribution of lymph node metastasis in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 468-472
- 12 Yoo CH, Noh SH, Kim YI, Min JS. Comparison of prognostic significance of nodal staging between old (4th edition) and new (5th edition) UICC TNM classification for gastric carcinoma. International Union Against Cancer. *World J Surg* 1999; 23: 492-497
- 13 Sohn KM, Lee JM, Lee SY, Ahn BY, Park SM, Kim KM. Comparing MR imaging and CT in the staging of gastric carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174: 1551-1557
- 14 Motohara T, Semelka RC. MRI in staging of gastric cancer. *Abdom Imaging* 2002; 27: 376-383
- 15 Yun M, Lim JS, Noh SH, Hyung WJ, Cheong JH, Bong JK, Cho A, Lee JD. Lymph node staging of gastric cancer using (18)F-FDG PET: a comparison

- study with CT. *J Nucl Med* 2005; 46: 1582-1588
- 16 Tatsumi Y, Tanigawa N, Nishimura H, Nomura E, Mabuchi H, Matsuki M, Narabayashi I. Preoperative diagnosis of lymph node metastases in gastric cancer by magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10. *Gastric Cancer* 2006; 9: 120-128
- 17 Rossi M, Broglia L, Maccioni F, Bezzi M, Laghi A, Graziano P, Mingazzini PL, Rossi P. Hydro-CT in patients with gastric cancer: preoperative radiologic staging. *Eur Radiol* 1997; 7: 659-664
- 18 Gamon Giner R, Escrig Sos J, Salvador Sanchis JL, Ruiz del Castillo J, Garcia Vila JH, Marcote Valdivieso E. Helical CT evaluation in the preoperative staging of gastric adenocarcinoma. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 593-600
- 19 Matsushita M, Oi H, Murakami T, Takata N, Kim T, Kishimoto H, Nakamura H, Okamoto S, Okamura J. Extraserosal invasion in advanced gastric cancer: evaluation with MR imaging. *Radiology* 1994; 192: 87-91
- 20 Fukuya T, Honda H, Hayashi T, Kaneko K, Tateshi Y, Ro T, Maehara Y, Tanaka M, Tsuneyoshi M, Masuda K. Lymph-node metastases: efficacy for detection with helical CT in patients with gastric cancer. *Radiology* 1995; 197: 705-711
- 21 Lee DH, Seo TS, Ko YT. Spiral CT of the gastric carcinoma: staging and enhancement pattern. *Clin Imaging* 2001; 25: 32-37
- 22 Cereceda Perez CN, Urbasos Pascual MI, Romero Castellanos C, Carreira Gomez C, Pinto Varela JM. Helical CT of the stomach: differentiation between benign and malignant pathologies, together with the staging of gastric carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 601-612
- 23 de Manzoni G, Verlato G, di Leo A, Guglielmi A, Laterza E, Ricci F, Cordiano C. Perigastric lymph node metastases in gastric cancer: comparison of different staging systems. *Gastric Cancer* 1999; 2: 201-205
- 24 Habermann CR, Weiss F, Riecken R, Honarpisheh H, Bohnacker S, Staedtler C, Dieckmann C, Schoder V, Adam G. Preoperative staging of gastric adenocarcinoma: comparison of helical CT and endoscopic US. *Radiology* 2004; 230: 465-471
- 25 Chen F, Ni YC, Zheng KE, Ju SH, Sun J, Ou XL, Xu MH, Zhang H, Marchal G. Spiral CT in gastric carcinoma: comparison with barium study, fiberoptic gastroscopy and histopathology. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1404-1408
- 26 Ichikura T, Furuya Y, Tomimatsu S, Okusa Y, Ogawa T, Mukoda K, Mochizuki H, Tamakuma S. Relationship between nodal stage and the number of dissected perigastric nodes in gastric cancer. *Surg Today* 1998; 28: 879-883
- 27 Tschmelitsch J, Weiser MR, Karpeh MS. Modern staging in gastric cancer. *Surg Oncol* 2000; 9: 23-30

电编 张敏 编辑 张焕兰

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 2007 年《世界华人消化杂志》

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

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

世界华人消化杂志投稿须知

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, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《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。

《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.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{\max} , C_{\max} , 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或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 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°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/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、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 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值的文句中, 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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

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*v*; (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^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; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如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 \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 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 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

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)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

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

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。

《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。

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. wjgd@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: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。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 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

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角码号。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 gas-troenterology. *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>

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。

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!

陈红松 副研究员
北京大学人民医院、北京大学肝病研究所

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院全军感染病研究所

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

何振平 教授
第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

黄颖秋 主任医师
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

江学良 主任医师
上海市第二军医大学长海医院消化科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二医院普通外科

李军祥 主任医师
北京中医药大学附属东方医院消化内科

刘彬彬 副研究员
复旦大学附属中山医院

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

宋世兵 主任医师
北京大学第三医院

宋振顺 教授
第四军医大学西京医院肝胆外科

屠红 副研究员
上海市肿瘤研究所

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

王志刚 副主任医师
上海交通大学附属上海市第六人民医院普外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

杨刚毅 副教授
重庆医科大学附属第二医院内分泌科

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

喻荣彬 副教授
南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张绪清 副教授
第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

朱春兰 主任医师
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科