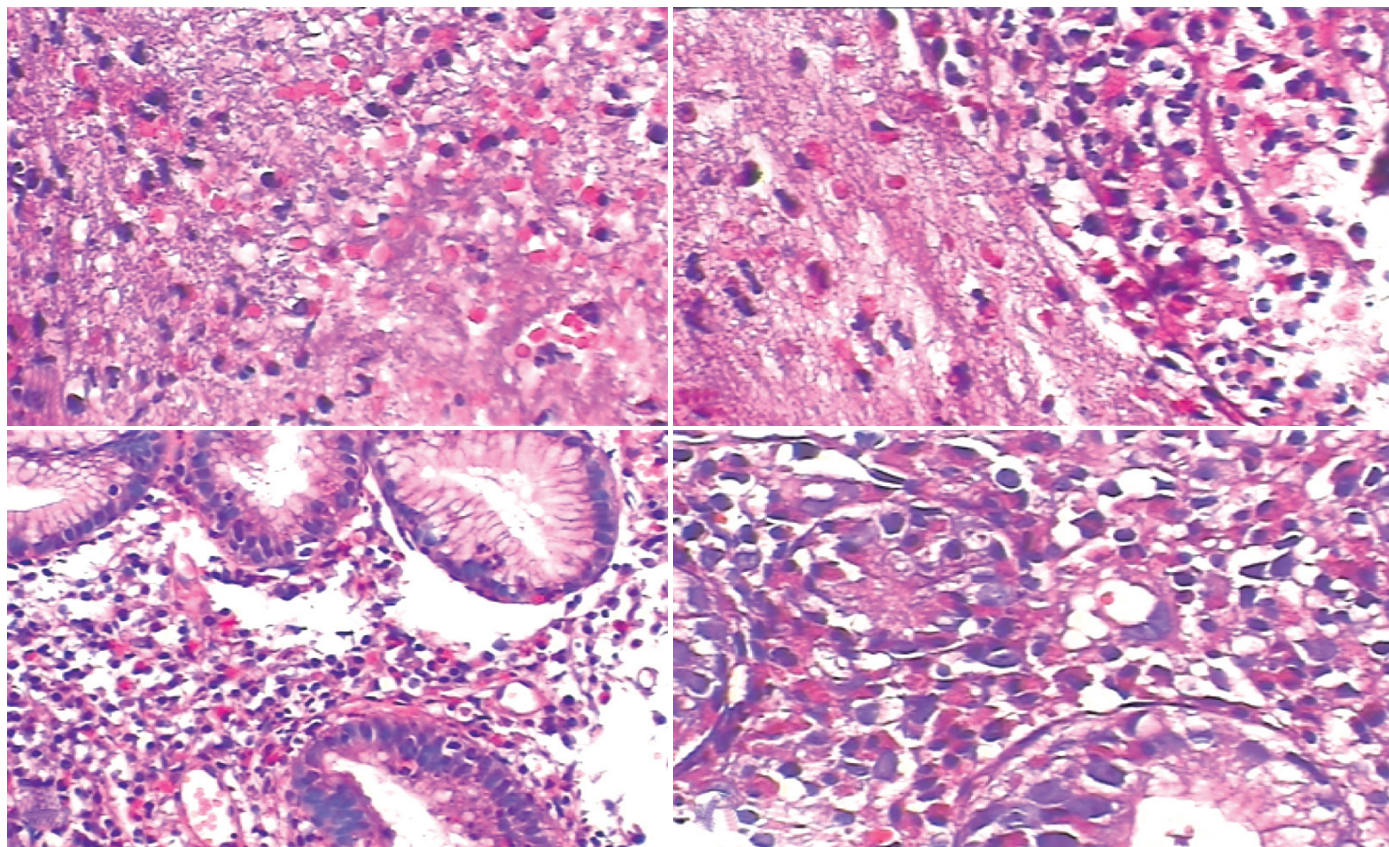


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 12 月 28 日 第 14 卷 第 36 期 (Volume 14 Number 36)



36 / 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
曹浩副教授	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	唐霓副研究员	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	杨林副研究员	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	唐志鹏副研究员	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	屠红副研究员	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 12 月 28 日 第 14 卷 第 36 期 (总第188期)

述 评	3439 Caspase介导的Fas凋亡途径 王玉, 孙黎光, 夏春辉
基 础 研 究	3443 益气活血软坚解毒方含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡过程中部分凋亡调控基因变化 李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 李富玉, 李军艳, 许彦来, 陈美南 3450 非酒精性脂肪肝大鼠肝脏硬脂酰CoA去饱和酶-1表达与ATP浓度之间的关系 陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞 3457 PPAR γ 激动剂干预对大鼠重症急性胰腺炎的影响 徐萍, 李清华, 陈令全, 陈江, 谢勇, 吕农华, 侯晓华
临 床 研 究	3461 E-钙黏素、MMP2和ICAM-1的表达与胃癌中医证型的关系 刘龙, 许玲, 孙大志, 魏品康 3466 双气囊电子小肠镜在小肠狭窄诊断中的作用 戴军, 李晓波, 高云杰, 戈之铮, 胡运彪, 萧树东 3471 LMP2/LMP7基因编码区多态性及单倍体型与胃癌易感无相关性 曹邦伟, 戴悦, 盖郁慧, 柴庆波, 汪欣 3477 Ad-p27mt转染重组腺病毒治疗裸鼠内人胃癌的分子机制 朱金水, 张强, 宋明全, 张卫平, 达炜, 陈金联, 孙群
文 献 综 述	3482 慢性丙型肝炎与代谢综合征 张锦前, 范小玲 3487 蓝氏贾第鞭毛虫感染的免疫学诊断方法 卫茹, 田喜凤, 阎静波, 杨志宏 3493 细胞间隙连接通讯及其通路蛋白与大肠癌发生关系的研究进展 吕丽艳, 关景明, 米丽娜 3500 人肝癌裸鼠移植模型的研究进展 叶翮, 张淑玲, 揭盛华, 董继华
研 究 快 报	3504 氨呼气试验用于幽门螺杆菌感染诊断的可行性 马永健, 刘国卿, 张厚德, 方晴波, 赵海歌 3509 噬菌体表面展示技术筛选隐性肝炎血清蛋白结合蛋白 陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖
临 床 经 验	3513 PBC患者granulysin基因和蛋白的表达及临床意义 邓安梅, 钱琤, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前 3517 胃癌组织中MK、VEGF表达的意义 赵治国, 史飞涛, 周明锴, 崔静, 付刚, 刘占举 3521 结肠癌中P15, P16与MMP-9的表达及相关性 张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉 3525 重组人粒细胞集落刺激因子联合温针灸治疗消化道肿瘤化疗后骨髓抑制的疗效 杨燕艳, 郑红薇, 孙大志 3529 白细胞介素-10基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关系 严艳, 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 刘芳, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉 3534 自身免疫性肝炎临床、免疫学及病理学特征分析142例 李蕴铤, 魏来, 王文冰, 王培之, 张黎颖, 欧蔚妮, 谢雯, 成军

附 录	3539 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	3544 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	3449 中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于2005年世界华人消化杂志指标检索报告 3456 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 3460 中国学术期刊综合引证报告(2006) 3476 《世界华人消化杂志》简介 3486 中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知 3499 世界华人消化杂志在线办公系统 3508 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知 3512 2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表 3516 世界华人消化杂志的同行评议 3520 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 3528 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 3538 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事
封面故事	Wen-Chong Song, Jie-Ping Yu, Lei Shen, Hong Xia, He-Sheng Luo. Endoscopic findings and pathologic characteristics of gastric eosinophilic granuloma: A report of 18 patients. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(46): 7542-7546 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/7542.asp
国际会议	9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

 <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-12-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>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 张焕兰 王晓瑜 电子编辑 张敏 李琪 本期责任编辑 张焕兰</p>	<p>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: wjgd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p> <p>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</p>	<p>《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。</p> <p>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。</p> <p>2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有</p>
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

World Chinese Journal of Digestology

December 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 36

EDITORIAL	<p>3439 Caspase-mediated Fas apoptotic pathway <i>Wang Y, Sun LG, Xia CH</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3443 <i>Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu</i> decoction regulates expression and activity of apoptosis-regulated genes in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 <i>Li DT, Sun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Li FY, Li JY, Xu YL, Chen MN</i></p> <p>3450 Relationship between hepatic stearyl-CoA desaturase-1 expression and adenosine triphosphate content in rats with nonalcoholic fatty liver caused by fat-rich diet <i>Lu YS, Fan JG, Fang JW, Ding XD, Yang ZR</i></p> <p>3457 Effect of pioglitazone on expression of intercellular adhesion molecule-1 in rats with severe acute pancreatitis <i>Xu P, Li QH, Chen LQ, Chen J, Xie Y, Lv NH, Hou XH</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3461 Correlations of E-cadherin, matrix metalloproteinase-2 and intercellular adhesion molecule-1 expression with traditional Chinese medicine classifications of syndrome for gastric carcinoma <i>Liu L, Xu L, Sun DZ, Wei PK</i></p> <p>3466 Value of double-balloon enteroscopy in diagnosis of small intestinal stricture <i>Dai J, Li XB, Gao YJ, Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD</i></p> <p>3471 No association between LMP2/LMP7 gene polymorphisms or haplotypes and gastric cancer <i>Cao BW, Dai Y, Gai YH, Chai QB, Wang X</i></p> <p>3477 Molecular mechanism of recombinant adenovirus Ad-p27mt therapy for human gastric cancer in nude mice <i>Zhu JS, Zhang Q, Song MQ, Zhang WP, Da W, Chen JL, Sun Q</i></p>
REVIEW	<p>3482 Relationship between chronic hepatitis C and metabolic syndrome <i>Zhang JQ, Fan XL</i></p> <p>3487 Immunological diagnosis of <i>Giardia lamblia</i> infection <i>Wei R, Tian XF, Yan JB, Yang ZH</i></p> <p>3493 Research progress on the roles of gap junctional intercellular communication and connexin in the carcinogenesis of colorectal cancer <i>Lv LY, Guan JM, Mi LN</i></p> <p>3500 Research progress of human hepatocellular carcinoma models in nude mice <i>Ye P, Zhang SL, Jie SH, Dong JH</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3504 Feasibility of ammonia breath test in diagnosis of <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>Ma YJ, Liu GQ, Zhang HD, Fang QB, Zhao HG</i></p> <p>3509 Screening of serum protein of cryptogenic hepatitis binding protein by phage display system <i>Chen JL, Wei HS, Liu X, Zhang LY</i></p>

CLINICAL PRACTICE	<p>3513 Expression of granulysin in patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance <i>Deng AM, Qian C, Yao DK, Chen Y, Chen B, Zhou Y, Gu ML, Wu CY, Jiang TW, Zhong RQ</i></p> <p>3517 Expression of midkine and vascular endothelial growth factor and their significances in gastric carcinoma <i>Zhao ZG, Shi FT, Zhou MK, Cui J, Fu G, Liu ZJ</i></p> <p>3521 Expression of P15, P16 and matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer <i>Zhang ZX, Song WQ, Yan QH, Zhou BJ, Cai JH</i></p> <p>3525 Therapeutic effect of myelosuppression with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor combined with warm-needle acupuncture on bone marrow inhibition following chemotherapy for gastrointestinal carcinoma <i>Yang YY, Zheng HW, Sun DZ</i></p> <p>3529 Genetic polymorphism of interleukin-10 in patients with hepatitis B infection <i>Yan Y, Li Z, Li HQ, Li JH, Liu Y, Gou CY, Gao JR, Shan J, Guo XH, Liu F, Yin JM, Liu DJ, Xie XC, Li H</i></p> <p>3534 Clinical, immunological and pathological characterization of autoimmune hepatitis: an analysis of 142 cases <i>Li YR, Wei L, Wang WB, Wang PZ, Zhang LY, Ou WN, Xie W, Cheng J</i></p>
APPENDIX	<p>3539 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>3544 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Song WC, Yu JP, Shen L, Xia H, Luo HS.</i></p> <p>Endoscopic findings and pathologic characteristics of gastric eosinophilic granuloma: A report of 18 patients.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(46): 7542-7546 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/7542.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer</p> <p>20-23 June 2007</p> <p>Barcelona</p> <p>Imedex</p> <p>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 December 28, 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: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

Caspase介导的Fas凋亡途径

王玉, 孙黎光, 夏春辉

王玉, 孙黎光, 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001

王玉, 夏春辉, 齐齐哈尔医学院 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划, No. 1054G070和No. 1055G066

孙黎光, 教授, 博士生导师, 生物化学教研室副主任. 辽宁省生化与分子生物学学会理事及辽宁省血栓病专业委员会副主任委员. 曾在美国从事生长因子与受体作用机制研究, 归国后在国家自然科学基金及省科委资助下着重研究内皮细胞生长因子等受体酪氨酸蛋白激酶特点及相关细胞内信号转导机制.

黑龙江省教育厅科学技术研究项目, No. 10511129

通讯作者: 孙黎光, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室. ydslg@163.com
电话: 024-23256666-5297

收稿日期: 2006-07-28 接受日期: 2006-10-18

Caspase-mediated Fas apoptotic pathway

Yu Wang, Li-Guang Sun, Chun-Hui Xia

Yu Wang, Li-Guang Sun, Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yu Wang, Chun-Hui Xia, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China

Supported by the Plan for the Core Teacher's Innovation Abilities of Common Colleges and Universities in Heilongjiang Province, No. 1054G070, No. 1055G066, and the Scientific Research Foundation from Education Department of Heilongjiang Province, No. 10511129

Correspondence to: Li-Guang Sun, Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. ydslg@163.com

Received: 2006-07-28 Accepted: 2006-10-18

Abstract

Apoptosis is a regulated physiological process leading to cell death. Fas play a pivotal role in the pathogenesis of various diseases and cell apoptosis. Caspases, a family of cysteine acid proteases, are central regulators of apoptosis. Once Caspase-8 and Caspase-10 are activated, these Caspases cleave and the downstream Caspases including Caspase-3, -6 and -7 are activated, which in turn cleave cytoskeletal and nuclear proteins like RB and Bad, further resulting in cell apoptosis. In this article, we discussed the mechanisms of Caspase-3, -8 activation and their roles in Fas-induced cell apoptosis.

Key Words: Caspase family; Fas; Cell apoptosis

Wang Y, Sun LG, Xia CH. Caspase-mediated Fas apoptotic pathway. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(36):3439-3442

摘要

凋亡是导致细胞死亡的调节性生理过程. Fas在各种疾病和细胞凋亡的发生中起到首要作用. Caspase为半胱氨酸蛋白酶家族, 是凋亡的中心调节者, 一旦Caspase-8, 10被激活, 引起Caspase的断裂及激活下游的Caspase-3, 6, 7, 作用于Bcl-2家族某些成员如Bad、一些骨架蛋白和RB蛋白等并使其断裂, 从而导致细胞凋亡. 本文重点讨论了Caspase-3, -8的激活机制及其在Fas诱导细胞凋亡中的作用.

关键词: Caspase家族; Fas; 细胞凋亡

王玉, 孙黎光, 夏春辉. Caspase介导的Fas凋亡途径. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3439-3442

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3439.asp>

0 引言

细胞凋亡现象是20世纪末生命科学的一个重大发现, 他为人类理解生存和死亡这对矛盾在生命中如何统一起来提供了一个崭新的思路, 加深了人类对生命现象的认识. 已有研究表明, 在各种疾病如癌症、自身免疫、不规则的神经变性^[1-2]和生理细胞死亡中, 细胞凋亡起到重要作用如Nagata *et al*^[3]研究中发现, 并且许多因子都卷入死亡信号中. 细胞凋亡又叫细胞程序性死亡, 一般被分为四个阶段: 第一阶段是细胞凋亡的刺激信号, 包括能引起细胞凋亡的物理刺激(如各种射线的照射)、化学刺激(如一些化学药物和血清因子的缺失)、生理性刺激(如细胞环境的改变等); 第二阶段是信号感应和传递, 这一阶段信号可以通过多种途径传递到下一步——中心调控和凋亡发生的效应阶段; 第三阶段是中心控制和效应阶段, 是各种凋亡信号汇集之处, 对信号进行处理并启动细胞凋亡的“发动机”ICE酶类-Caspase(半胱氨酸蛋白酶家族); 第四阶段是细胞死亡阶段, 在这个阶段细胞结构

■背景资料

Fas在各种疾病和细胞凋亡的发生中起到重要作用, 在哺乳动物细胞, Caspase以依赖线粒体和非依赖线粒体两条途径促进细胞凋亡, 在Fas诱导凋亡的过程中, Caspase-3, -8与哪些基因相互作用及其作用途径尚不明确.

■同行评价

凋亡是目前肿瘤研究的热点课题, 本文对Caspase-3, 8的激活机制及其在Fas诱导细胞凋亡中的作用进行了较为全面的阐述, 文中观点引证有据, 内容前沿, 文笔流畅, 有参考价值。

发生变化: 细胞质和染色体浓缩, DNA断裂成200 bp左右的片段, 凋亡小体形成并被临近细胞吞噬。在细胞凋亡的中心控制和效应阶段, 最重要的事件是发生Caspase的活化。Caspase的活化直接或间接引起细胞凋亡结构特征的出现。

1 Fas

细胞表面有多种受体参与细胞凋亡信号的转导, 其中Fas受体尤为重要。Fas受体是跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族, 死亡信号是由Fas配体、Fas抗体或他们的胞外部分脱落蛋白(可溶性)刺激产生的。在正常的鼠和人的肝中, 添加anti-Fas的抗体可导致的鼠或人的肝细胞凋亡^[4]。对于表达Fas的肿瘤细胞, 采用抗Fas抗体可迅速选择性引起细胞凋亡, 不仅对于组织细胞的限制或肿瘤细胞的增殖, 而且对于免疫反应的下游调节来说, Fas/FasL系统是生理性关键。Fas/FasL的反常调节导致各种各样的严重临床紊乱, 如Fas/FasL机能失常可以偶联于淋巴组织增生的和多形核中性粒细胞(PMN)-介导的紊乱^[5]。还有一些证据显示Fas在肝病如肝损伤、肝炎、肝硬化和肝癌等的发病机制上起到一个重要的调节作用。

2 Caspase

对于Fas诱导细胞凋亡的分子机制已经进行了较深入的研究, 其中蛋白激酶以Caspase执行细胞有秩序的死亡而闻名^[6]。Caspase是指(ICE)/CED-3半胱氨酸蛋白酶家族, 目前有14个基因被证实属于Caspase家族, 包括Caspase-1-14, 其中人类有11种: Caspase-1-10, 13, 而Caspase-11, 12具有种属特异性, 仅存在于鼠中, Caspase-14是最近在鼠中被发现的。在哺乳动物细胞, Caspase以依赖线粒体和非依赖线粒体两条途径促进细胞凋亡^[7-8]。

非依赖线粒体途径: 通过膜的死亡受体作用, Caspase可以被细胞外部因子如FasL或Fas抗体激活, 激活的Caspase-8激活下游的Caspase, 从而引起细胞凋亡; 内质网通路: 内质网参与维持细胞内钙离子内环境稳定、膜蛋白的合成、修饰和折叠, 内质网在凋亡信号处理过程中有重要作用^[9]。Caspase-12存在于内质网, 当内质网钙离子动态平衡破坏或过多蛋白积聚于内质网时, 可直接激活Caspase-12。另外, 胞质的Caspase-7可转移到内质网表面, 进一步激活Caspase-12, 激活的Caspase-12可进一步剪切Caspase-3, 而引发细胞凋亡, 此过程由内质网失常引起, 与以膜

或线粒体为靶位点的凋亡信号触发无关。

依赖线粒体途径: Caspase也可以被细胞的内在信号激活, 可以导致细胞色素C和线粒体蛋白Smac/Diablo从线粒体释放, 细胞色素C和线粒体蛋白Smac/Diablo的释放能明显的促进Caspases的活性, 并且增加了依赖Caspase的DNA的断裂^[10]。在死亡受体介导的凋亡途径中, Caspase-8除了直接激活Caspase-3外, 还可直接切割胞质的Bcl-2家族成员Bid前体, 形成截断的Bid (truncated Bid, tBid), 激活的tBid转位到线粒体, 触发bak和bax同源寡聚作用, 启动细胞色素C的释放, 因此Bid将凋亡信号从死亡受体途径传递到线粒体途径, 把死亡受体通路和线粒体通路联系起来, 有效的放大了凋亡信号^[11]。而Bcl-2蛋白对caspase-3有拮抗作用^[29-30]。线粒体通路和内质网通路也有密切的联系。许多情况下, 内质网钙离子释放是线粒体释放细胞色素C的一个早期事件, 即依赖内质网的线粒体内钙离子改变是重要的促进细胞色素C释放的信号^[12]。

3 Caspase与Fas/FasL

通过收缩抗体引起的FasR刺激导致DISC的形成(death inducing signaling complex)(FADD和Caspase-8被叫作DISC)、DISC添补、激活Caspase-8, 一旦其激活, Caspase-8促进Caspase-3的活性, 以非依赖线粒体或独立的模式进行^[7-8]。一些报道显示, Caspase-8在凋亡中起到一个非常重要的作用, Caspase-3是其重要的靶子如Dasmahapatra *et al*^[13]研究发现, Caspase-8激活Caspase-3并使其水解和激活聚合酶, 诱导细胞死亡^[13-15]。在CPP32亚家族中, 对于凋亡细胞的死亡来说, Caspase-3由于其易变的底物的特殊性而尤其重要。在刺囊酸(EA)诱导HepG2凋亡实验中Caspase起到中枢作用如Tong *et al*^[16]研究证实的, Caspase-3被划分为Caspase的执行者, Caspase-8, 9被划分为Caspase的启动者, 并且EA引起的Caspase-8, 9, 3的激活呈时间依赖性, 可以靶向细胞程序性死亡必需的某些基因, 或者激活的Caspase-3转位到核与Rb或Rb-E₂F复合体作用执行凋亡。

Fas诱导的细胞凋亡, 是由于膜FasL、抗Fas-特殊的抗体和块状可溶的FasL的刺激引起的^[31], 重组Fas复合体形成Fas超分子团, 引起随后细胞质内的含调节蛋白的死亡区(FADD)结合到Fas, 然后联合体Fas-FADD恢复FADD-样的白细胞介素-1转换酶, 其含有与Caspase家族蛋白酶相关的蛋白酶区。这个复合体可以诱导蛋

白酶区的自身激活, 其反过来恢复Caspase-8^[17]. Caspase-8是通过二聚化作用而激活的^[18], DISC联合高效的激活的影响因子Caspases, 尤其是Caspase-3, 导致凋亡最终步骤的执行(图1)^[4]. 激活的Caspase断裂他们的死亡底物, 如核纤层蛋白(lamin), 肌动蛋白(actin), 多聚核糖体[poly(ADP-ribose)]聚合酶, DNA-依赖蛋白激酶, 并引起在细胞或核中可以被观察到的凋亡形态变化如DNA梯状降解等. 一个生理性信号通过内源FADD蛋白也可以激活这个途径^[19]. 前列腺和乳腺上皮细胞的行为相似与成纤维细胞, 不可能激活这个途径, 细胞对于死亡抵抗的发生影响着其他的凋亡途径, 显示这是被FADD蛋白诱导的, 并且通过FADD蛋白的不同部分与Caspase-8相互作用, 或者激活Caspase-8, 这使我们认识到凋亡和自溶是被诱导的. FADD的死亡区可以激活细胞的死亡途径, 涉及到凋亡和自溶, 并且在正常细胞无限增殖时, 凋亡和自溶是选择性失活^[19]. 同样的刺激可被TRAIL(肿瘤坏死因子相关的诱导凋亡的配体)受体刺激激活或被FADD突变阻碍, 显示这个途径可被表达的外源FADD容易激活. 在TRAIL的临床模型中, FADD几乎对正常组织无毒性, 但可以杀死肿瘤细胞^[20-21]. TRAIL通过联合两个受体诱导凋亡, 这两个受体维持一个细胞的死亡区(FADD), 结合的配体被认为是导致这种变化的形成的因素, 对于FADD调节蛋白来说其暴露了结合表面^[22], FADD也与Caspase-8结合, 导致Caspase-8二聚体和激活, 甚至导致Caspase激活, 引起依赖Caspase的凋亡, 也可以被Caspase抑制者阻碍, 但如果缺少FADD, 则不能与Caspase-8结合^[23].

一些药物诱导或Fas诱导的凋亡同时伴有RB断裂事件, 显示断裂事件由ICE样蛋白酶催化的, 虽然对断裂的认识没有一致的结果, 但在药物诱导或 α -Fas诱导的不同人类细胞的凋亡中, 一个单一的5 kDa断片从RB的C端断裂下来. C端断片的特点: (1)有凋亡位点; (2)被碘乙酰胺抑制; (3)描绘了一个氨基酸序列作为CED3/CPP32b-样半胱氨酸蛋白激酶的底物; (4)模拟亚磷酸化RB的转移模式; (5)断裂的结果导致增加截断的RB与E2F家族成员的结合^[24]. 药物诱导或Fas诱导的凋亡的初期, C端断裂的关键问题是时间的问题. 例如, 在不可反转的细胞程序性死亡中, RB的端裂是较晚的事件, 反映了激活的半胱氨酸蛋白激酶的活性, 并且在这个过程中起到一个早期生物学作用. RB是细胞生长负性调

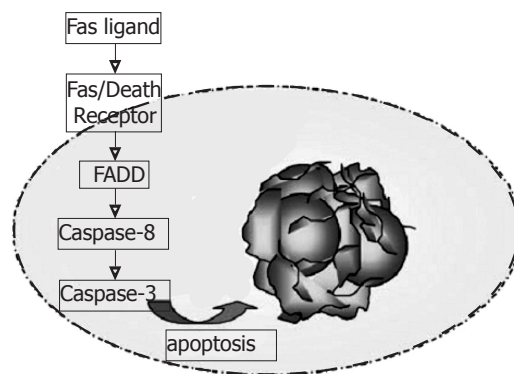


图1 Fas凋亡机制.

节子和肿瘤抑制因子, 在许多癌症中如视网膜母细胞瘤和肺癌、乳腺癌、膀胱癌和前列腺癌等发现RB的失活和缺失^[25]. 一经磷酸化的RB蛋白将结合的转录因子(E2F家族)释放, 这些转录因子活化那些细胞从G₁进入S期所需基因表达. 最近RB蛋白被证明在凋亡发生过程中被水解, 凋亡蛋白酶Caspase家族的一个成员在TNF、叉孢霉素和阿糖胞苷诱导的细胞凋亡中专一裂解RB蛋白, 这种水解作用被ICE类酶的四肽抑制剂所抑制, RB蛋白的破坏可能对于诱发细胞凋亡是必需的.

凋亡逃逸对于癌症的进展是需要的, 逃避哪一条死亡途径还不清楚. 曾经有实验证明一个上皮细胞死亡途径, 在正常细胞中起作用, 但在肿瘤细胞中失活, 暗示在肿瘤进展中可以作为靶子. 这个途径可以被FADD调节蛋白激活, 是通过Caspase-8由FADD诱导的凋亡机制. 展示了一个生理信号(抗-Fas抗体、Fas配体及TRAIL)能杀死正常上皮细胞, 通过内源的FADD蛋白经过神奇的FADD死亡途径, 可以激活凋亡和自溶. 当原代上皮细胞无限增殖时, 选择性抵抗这个途径, 独立于我们所知道的事件(寡聚酶的激活、P53, RB, INK4a和ARF功能的丢失)并且伴随无限增殖. 这些事件证实了一个神奇的死亡途径参与凋亡、自溶, 在上皮癌进展的早期阶段, 这个途径进行选择性失活^[26].

尽管Fas作为凋亡诱导者已被认识, 另外还有不依赖凋亡的Fas功能, 包括对T细胞和成纤维细胞增殖的诱导, 肝细胞的再生, 化学因子的产生, 神经突的长出等^[27-28], 然而, 在这些过程中, 大部分Fas信号的分子机制被理解的很少. 在Fas诱导凋亡的研究中, Caspase作为细胞凋亡的调节者已被明确, 证实了FADD, Caspase-8等作为Fas诱导NF- κ B信号的最基本内容, 但是Caspase家族

在Fas诱导的凋亡作用途径有待于进一步阐明。

4 参考文献

- Mountz JD, Wu J, Zhou T, Hsu HC. Cell death and longevity: implications of Fas-mediated apoptosis in T-cell senescence. *Immunol Rev* 1997; 160: 19-30
- Zidar N, Dolenc-Strazar Z, Jeruc J, Stajer D. Immunohistochemical expression of activated Caspase-3 in human myocardial infarction. *Virchows Arch* 2006; 448: 75-79
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456
- Scholz M, Cinatl J. Fas/FasL interaction: a novel immune therapy approach with immobilized biologicals. *Med Res Rev* 2005; 25: 331-342
- Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, Parkes N, Clough LE, Gulbins E, Salmon M, Lord JM. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* 2004; 104: 2557-2564
- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenis J. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 24-35
- Long S, Wilson M, Bengten E, Clem LW, Miller NW, Chinchar VG. Identification and characterization of a FasL-like protein and cDNAs encoding the channel catfish death-inducing signaling complex. *Immunogenetics* 2004; 56: 518-530
- Nomura J, Matsumoto K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Mitochondria-independent induction of Fas-mediated apoptosis by MSSP. *Oncol Rep* 2005; 14: 1305-1309
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent Caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42
- Chiarugi A, Moskowitz MA. Cell biology. PARP-1-a perpetrator of apoptotic cell death? *Science* 2002; 297: 200-201
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501
- McConkey DJ, Nutt LK. Calcium flux measurements in apoptosis. *Methods Cell Biol* 2001; 66: 229-246
- Dasmahapatra G, Almenara JA, Grant S. Flavopiridol and histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 288-298
- Decaudin D, Castedo M, Nemati F, Beurdeley-Thomas A, De Pinieux G, Caron A, Pouillart P, Wijdenes J, Rouillard D, Kroemer G, Poupon MF. Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002; 62: 1388-1393
- Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates proCaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
- Tong X, Lin S, Fujii M, Hou DX. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 539-546
- Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, Caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 2004; 166: 369-380
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG. Insights into the regulatory mechanism for Caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003; 11: 543-549
- Thorburn J, Moore F, Rao A, Barclay WW, Thomas LR, Grant KW, Cramer SD, Thorburn A. Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1189-1199
- Los M, Burek CJ, Stroth C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today* 2003; 8: 67-77
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 66-75
- Bergeron S, Beauchemin M, Bertrand R. Camptothecin- and etoposide-induced apoptosis in human leukemia cells is independent of cell death receptor-3 and -4 aggregation but accelerates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated cell death. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1659-1669
- Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of Caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 725-731
- Chen WD, Otterson GA, Lipkowitz S, Khleif SN, Coxon AB, Kaye FJ. Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. *Oncogene* 1997; 14: 1243-1248
- Tonini T, Gabellini C, Bagella L, D'Andrilli G, Masciullo V, Romano G, Scambia G, Zupi G, Giordano A. pRb2/p130 decreases sensitivity to apoptosis induced by camptothecin and doxorubicin but not by taxol. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8085-8093
- Bhojani MS, Chen G, Ross BD, Beer DG, Rehemtulla A. Nuclear localized phosphorylated FADD induces cell proliferation and is associated with aggressive lung cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 1478-1481
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 118-125
- Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem* 2000; 275: 24357-24366
- 唐文, 蒋明德, 李小安. sp600125对乙酰刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及Caspase-3蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2 263-2265
- 严兴耘, 彭俊华, 张华欣, 张峰, 卞晓红, 王海忠, 赵涛. 槲皮素对结肠癌HT-29细胞增殖及周期的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1071-1076
- 毕蔓茹, 杨宝山, 马英骥, 陈立艳, 王岩, 高峰, 王福祥. 复方甘草酸苷对小鼠暴发性肝衰竭Fas/FasL介导的肝细胞凋亡的保护作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 26-30

电编 张敏 编辑 张焕兰

益气活血软坚解毒方含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞凋亡过程中部分凋亡调控基因变化

李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 李富玉, 李军艳, 许彦来, 陈美南

李东涛, 李富玉, 李军艳, 许彦来, 陈美南, 济南军区青岛第一疗养院中医科 山东省青岛市 266071
孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 中国中医科学院广安门医院肿瘤科 北京市 100053
李东涛, 2003年中国中医科学院医学博士, 博士后, 副主任医师, 主要研究方向中医肿瘤及中医老年病的基础与临床研究工作. 国家科技计划资助项目, No. C03050402
通讯作者: 李东涛, 266071, 山东省青岛市香港西路27号, 济南军区青岛第一疗养院中医科. lidongtao12345@126.com
电话: 0532-83785529
收稿日期: 2006-06-09 接受日期: 2006-10-11

Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction regulates expression and activity of apoptosis-regulated genes in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402

Dong-Tao Li, Gui-Zhi Sun, Ying-Xia Pei, Xin Qi, Jie Li, Fu-Yu Li, Jun-Yan Li, Yan-Lai Xu, Mei-Nan Chen

Dong-Tao Li, Fu-Yu Li, Jun-Yan Li, Yan-Lai Xu, Mei-Nan Chen, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Sanatorium of Ji'nan Military Command, Qingdao 266071, Shandong Province, China
Gui-Zhi Sun, Ying-Xia Pei, Xin Qi, Jie Li, Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100052, China
Correspondence to: Dong-Tao Li, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Sanatorium of Ji'nan Military Command, Qingdao 266071, Shandong Province, China. lidongtao12345@126.com
Received: 2006-06-09 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the effects of *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* (YHRJ) decoction on the expression of apoptosis-related genes Fas, FasL, Bcl-2, Bax, P53 and NF- κ B in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402.

METHODS: Human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells were divided into 6 groups, and treated with normal saline (NS), NS plus cisplatin (DDP), equal-dose YHRJ decoction, YHRJ decoction plus DDP group, high-dose YHRJ decoction, high-dose YHRJ decoction plus DDP, respectively. Flow cytometry, immunohisto-

chemistry, *in situ* hybridization, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to analyze the expression of Fas, FasL, Bcl-2, Bax, P53 and NF- κ B.

RESULTS: Flow cytometry revealed a dramatic increase of Fas expression in the cells treated with NS plus DDP, equal-dose YHRJ and equal-dose YHRJ plus DDP, and high-dose YHRJ plus DDP in comparison with that in the control cells ($30.12\% \pm 22.94\%$, $10.50\% \pm 8.41\%$, $30.35\% \pm 22.98\%$, $32.61\% \pm 26.87\%$ vs $8.77\% \pm 6.93\%$, $P < 0.01$), but not in the cells treated with high-dose YHRJ ($P > 0.05$). The expression of FasL was significantly higher in NS+DDP and YHRJD+DDP treatment group than that in the normal controls ($16.40\% \pm 7.168\%$, $8.41\% \pm 6.74\%$ vs $4.12\% \pm 2.60\%$, $P < 0.01$), but lower in high-dose YHRJ group ($3.05\% \pm 2.53\%$ vs $4.12\% \pm 2.60\%$, $P < 0.01$). Immunohistochemistry showed a significant decrease of P53 expression in all the drug-treated cells (30.2% , 14.6% , 19.8% , 17.3% vs 60.0% , $P < 0.05$) except high-dose YHRJ plus DDP treated ones; The expression of Bax protein in all the drug-treated cells was higher significantly than that in the controls (40.7% , 40.4% , 72.1% , 68.9% , 42.2% vs 30.0% , $P < 0.05$); There was a notable decrease of Bcl-2 expression in NS plus DDP and high-dose YHRJ treated cells (26.3% , 24.4% vs 30.5% , $P < 0.05$) as well as of NF- κ B expression in all the drug-treated cells (40.7% , 40.4% , 72.1% , 68.9% , 42.2% vs 30.0% , $P < 0.05$). *In situ* hybridization also demonstrated that the mRNA expression of NF- κ B was markedly decreased in all the drug-treated groups as compared with that in the control group (30.5% , 13.3% , 21.4% , 17.4% , 53.2% vs 58% , $P < 0.05$). RT-PCR revealed a significant decrease of Bcl-2 mRNA expression in equal-dose YHRJ treated cells (0.717 ± 0.198 vs 1.327 ± 0.097 , $P < 0.001$) as well as a dramatic increase of Bax mRNA expression in DDP, YHRJD, and YHRJG treated cells (46.22 ± 6.22 , 56.19 ± 7.36 , 62.32 ± 11.06 vs 35.22 ± 4.38 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: YHRJ decoction may induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma

■背景资料

益气活血软坚解毒(YHRJ)法是孙桂芝教授通过几十年的中医临床实践总结出来的应用于肝癌患者的主要治则治法. 以往的研究证实, 该法治疗肝癌在临床上取得了抑制肿瘤生长, 提高生活质量, 延长生存期的作用. 本文前期的细胞学实验研究证实YHRJ含药血清有抑制人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞生长并有诱导细胞凋亡作用, 并能促进细胞内 Ca^{2+} 内流与降低线粒体膜电位的作用.

■相关报道

一些中医工作者从不同角度与层面在中药诱导肝癌细胞凋亡方面做了不少工作。刘琳 *et al* 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究及孟志强 *et al* 以健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响都证实中药无论复方, 还是某些单体都可以从诱导细胞凋亡角度对肿瘤产生作用。从总的来看, 不同中药诱导细胞凋亡作用强度不同, 同一种药物对不同细胞作用强度也不同, 因此在临床上应合理选择。

by down-regulating the expression of FasL, up-regulating the expression of Bax and inhibiting the activation of NF- κ B.

Key Words: *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction; Medicated serum; Hepatocellular carcinoma; Cell apoptosis; Gene regulation

Li DT, Sun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Li FY, Li JY, Xu YL, Chen MN. *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction regulates expression and activity of apoptosis-regulated genes in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3443-3449

摘要

目的: 研究益气活血软坚解毒方(YHRJ)含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡调控基因Fas, FasL, Bcl-2, Bax, P53, NF- κ B表达影响。

方法: 将细胞分为对照组(NS)组、NS+DDP(顺氯氮铂)组、YHRJ等剂量组(YHRJD)、YHRJD+DDP组、YHRJ高剂量组(YHRJG)、YHRJG+DDP组, 应用流式细胞术、免疫组化、原位杂交、RT-PCR等方法对用药24, 48 h的Bel-7402细胞凋亡的主要调控基因Fas, FasL, Bcl-2, Bax, P53, NF- κ B mRNA与蛋白表达进行检测。

结果: 流式细胞术检测显示: 与NS组相比, NS+DDP、YHRJD、YHRJD+DDP及YHRJG+DDP组Fas蛋白表达均明显提高($30.12\% \pm 22.94\%$, $10.50\% \pm 8.41\%$, $30.35\% \pm 22.98\%$, $32.61\% \pm 26.87\%$ vs $8.77\% \pm 6.93\%$, $P < 0.01$), YHRJG组效果不明显($P > 0.05$); NS+DDP、YHRJD+DDP组FasL蛋白表达也升高($16.40\% \pm 7.168\%$, $8.41\% \pm 6.74\%$ vs $4.12\% \pm 2.60\%$, $P < 0.01$), 而YHRJG组FasL蛋白表达降低($3.05\% \pm 2.53\%$ vs $4.12\% \pm 2.60\%$, $P < 0.01$)。免疫组化结果显示: 除YHRJG+DDP组外, 其余各组突变型P53蛋白表达明显降低(30.2% , 14.6% , 19.8% , 17.3% vs 60.0% , $P < 0.05$); 各加药组Bax蛋白表达明显增高(40.7% , 40.4% , 72.1% , 68.9% , 42.2% vs 30.0% , $P < 0.05$); NS+DDP组与YHRJG组Bcl-2蛋白表达明显降低(26.3% , 24.4% vs 30.5% , $P < 0.05$), 而YHRJD、YHRJG+DDP、YHRJG+DDP组Bcl-2表达明显升高(41.8% , 39.3% , 45.6% vs 30.5% , $P < 0.05$); 各加药组NF- κ B蛋白表达明显降低(15.9% , 13.3% , 14.1% , 7.8% , 14.6% vs 24.2% , $P < 0.05$)。原位杂交结果显示: 各加药组NF- κ B mRNA表达明显降低(30.5% , 13.3% , 21.4% , 17.4% , 53.2% vs 58% , $P < 0.05$)。RT-PCR结果显示: YHRJ等效剂组凋亡调控基因Bcl-2

mRNA表达明显降低(0.717 ± 0.198 vs 1.327 ± 0.097 , $P < 0.001$); DDP、YHRJD、YHRJG组凋亡调控基因Bax mRNA表达明显增高(46.22 ± 6.22 , 56.19 ± 7.36 , 62.32 ± 11.06 vs 35.22 ± 4.38 , $P < 0.05$)。

结论: YHRJ含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡可能的基因调控机制在于通过抑制凋亡信号转导基因FasL基因蛋白表达, 促进凋亡调控基因Bax基因蛋白表达, 抑制NF- κ B基因mRNA及蛋白表达来实现的。

关键词: 益气活血软坚解毒方; 含药血清; 肝癌; 细胞凋亡; 基因调控

李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 李富玉, 李军艳, 许彦来, 陈美南. 益气活血软坚解毒方含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡过程中部分凋亡调控基因变化. *世界华人消化杂志* 2006;14(36):3443-3449

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3443.asp>

0 引言

益气活血软坚解毒方(YHRJ)是中国中医研究院广安门医院孙桂芝主任医师在总结古代中医与现代中医文献的基础上, 结合几十年的临床实践总结出来的应用于肝癌患者的主要治则治法。以往的研究证实, 以YHRJ法治疗肝癌在临床上取得了抑制肿瘤生长, 提高生活质量, 延长生存期的作用^[1-2], 并能降低甲胎蛋白(AFP)水平, 对失调的细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-18(IL-18)有调节作用^[3]。以此方法组方的肝康冲剂提取物有诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡作用^[4]。我们前期的细胞学实验研究证实YHRJ含药血清有抑制人肝癌细胞系Bel-7402细胞生长并有诱导细胞凋亡作用^[5], 并能促进细胞内Ca²⁺内流与降低线粒体膜电位的作用^[6]。为进一步研究其诱导细胞凋亡的分子机制, 我们对主要的细胞凋亡相关基因进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔12只, ♀, 体质量2.45-2.7 kg, 购于中国药品及生物制品检定所。对数生长期的Bel-7402细胞, 由中国中医研究院广安门医院提供。益气活血软坚解毒方(YHRJ)水煎剂: 组方为生黄芪、炒白术、田三七、水红花子、藤梨根、凌霄花、炮山甲、白花舌蛇草、半枝莲, 常规水提取, 生药浓度3.4 kg/L, 4℃保存备用。YHRJ含药血清的制备: 健康新

新西兰大白兔12只, 随机分为NS, YHRJ等效剂量(YHRJD, 约为人用量的5倍)、YHRJ高剂(YHRJG, 约为人用量的10倍)3组, 每组4只, 8:00, 14:00点各给药1次, 中药每只每次稀释成10 mL灌喂, 重复给药5次, 末次给药前12 h禁食不禁水, 末次给药后1-1.5 h之内分别从耳中央动脉无菌采血10 mL, 室温静置2 h, 冷冻离心机1500 r/min, 离心10 min, 吸取血清, 56℃ 30 min灭活, 22 μ m针式微孔滤膜过滤, -20℃冰箱保存备用. 顺氯氨铂(DDP): 山东齐鲁制药厂产品. RPMI1640完全培养液: RPMI培养干粉(Gibco)内含2 mmol/L谷氨酰胺, 青霉素100 kU/L、链霉素100 mg/L, 应用时加入100 mL/L灭活的小牛血清. RPMI1640完全培养基、碘化丙啶(PI)、RNA酶: 美国Sigma公司产品. Bcl-2, Bax, P53(突变型)免疫组化染色试剂盒、NF- κ B P65原位杂交检测盒: 武汉博士德生物工程有限公司产品. NF- κ B多克隆抗体, Fas(CD95)、FasL(CD173) mAb, 美国Santa Cruz公司产品. 动物总RNA提取试剂盒: 北京鼎国生物技术发展中心产品. TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.2: 宝生物工程(大连)有限公司产品. 引物由赛百盛公司合成. Bax: 上游5'-GCGTCCACCAAGAAGCTGA-3'(159 site), 下游5'-ACCACCCTGGTCTTGGATCC-3'(470 site), Fragment: 312 bp; Refer to GenBank: XM 009093; Bcl-2: 上游5'-CAGCTGCACCTGACGC CCTT-3'(383 site), 下游5'-GCCTCCGTTATCCT GGATCC-3'(613 site), Fragment: 231 bp Refer to GenBank: XM 14745. 内对照 β -actin的引物序列: 北京鼎国生物技术发展中心提供, Fragment: 212 bp. FACSsort流式细胞仪(FCM): 美国Becton-Dickson公司生产. PTC-100TMP-PCR扩增仪: 美国MJ-Research Inc公司产品. UVI凝胶成像系统: 英国UVItec公司.

1.2 方法 处于对数生长期的人肝癌细胞Bel-7402细胞, 经2.5 g/L胰酶消化后, 分瓶, 传代细胞处于对数生长期时分组为NS, NS+DDP, YHRJD, YHRJD+DDP, YHRJG, YHRJG+DDP 6组, 分别加入生理盐水兔血清至终浓度为100 mL/L、生理盐水兔血清至终浓度为100 mL/L+DDP至终浓度4.5 mg/L、YHRJD兔血清至终浓度为100 mL/L、YHRJD兔血清至终浓度为100 mL/L+DDP至终浓度4.5 mg/L、YHRJG兔血清至终浓度为100 mL/L、YHRJG兔血清至终浓度为100 mL/L+DDP至终浓度4.5 mg/L. 50 mL/L湿化的CO₂培养箱中分别孵

育24 h后处理细胞.

1.2.1 间接免疫荧光标记, FCM测定细胞凋亡信号转导基因Fas, FasL蛋白表达 常规消化, PBS液(pH 7.4)离心洗涤2次, 加入FITC标记鼠抗人Fas, FasL mAb 10 μ L; 阴性对照组取肿瘤细胞100 μ L, 加入FITC标记小鼠IgG mAb 10 μ L; 以上两组轻轻混匀室温下避光染色30 min; 离心1500 r/min, 5 min; 弃上清, 每管加PBS缓冲液0.6 mL, 上机测定.

1.2.2 免疫组化法检测细胞凋亡调控基因P53, Bax, Bcl-2, NF- κ B蛋白表达 按免疫组化试剂盒说明操作. 结果判定: P53出现明显的核膜表达, 其余主要为胞质表达. 观察1000个细胞, 计数其阳性细胞数, 根据色泽深浅进行分级, -为阴性表达, +为浅黄, ++为橘黄, +++为棕黄, ++++为褐黄.

1.2.3 原位杂交法检测细胞凋亡调控基因NF- κ B mRNA表达 按原位杂交试剂盒说明进行操作, 观察方法同免疫组化.

1.2.4 RT-PCR检测细胞凋亡调控基因Bax, Bcl-2 mRNA表达 细胞总RNA提取按试剂盒说明操作, 紫外分光光度计测A值计算RNA含量符合要求. RNA电泳, 观察可见18 S, 28 S RNA带. 按以下条件进行反转录反应. 30℃, 10 min; 42℃, 30 min; 99℃, 5 min; 5℃, 5 min. 按以下条件进行PCR反应: 94℃, 2 min, 1次; 94℃ 50 s, 62℃ 50 s, 72℃ 1 min, 循环35次. DNA电泳: 取PCR产物10 μ L与2 μ L的上样缓冲液混合, 用1×TAE缓冲液配制20 g/L琼脂糖进行水平平板电泳, 电压5 V/cm, 电泳40 min, 然后在254 nm波长的紫外灯下观察, 应用UVI凝胶成像系统摄取凝胶图像.

统计学处理 计量资料采用方差分析, 等级资料采用Ridit分析.

2 结果

2.1 对细胞凋亡信号转导基因Fas, FasL蛋白表达影响 间接免疫荧光标记, FCM测定结果显示, 各加DDP组与中药YHRJD组均能明显提高Fas蛋白表达; NS+DDP组同时也提高FasL蛋白表达, 而YHRJG组确能降低FasL蛋白表达(表1).

2.2 对P53, Bax, Bcl-2, NF- κ B蛋白表达的影响 对P53蛋白表达检测结果显示, 与NS组比较, 除YHRJG组+DDP组外, 其余各组明显降低P53突变型基因蛋白表达($P<0.05$); 与DDP组相比, YHRJD, YHRJG与YHRJD+DDP组P53突变型

■应用要点

根据本文实验结果, 中医益气活血软坚解毒综合治法可以被视为肝癌细胞凋亡诱导剂加以应用。

表 1 YHRJ含药血清对Bel-7402细胞转导基因Fas/FasL蛋白表达的影响 (mean ± SD)

分组	Fas		FasL	
	表达百分比(%)	荧光强度	表达百分比(%)	荧光强度
NS	8.77 ± 6.93	15.09 ± 13.83	4.12 ± 2.60	31.03 ± 21.12
NS+DDP	30.12 ± 22.94 ^b	35.07 ± 30.42	16.40 ± 7.17 ^b	45.53 ± 28.47
YHRJD	10.50 ± 8.41 ^b	21.99 ± 20.16	6.24 ± 4.66 ^b	43.09 ± 37.96
YHRJD+DDP	30.35 ± 22.98 ^b	38.49 ± 34.30	8.41 ± 6.74 ^b	76.22 ± 61.06
YHRJG	8.54 ± 6.78	10.51 ± 9.02	3.05 ± 2.53 ^b	8.25 ± 7.71
YHRJG+DDP	32.61 ± 26.87 ^b	34.31 ± 29.99	4.16 ± 3.61	11.62 ± 10.87

^b $P < 0.01$ vs NS组.

表 2 YHRJ含药血清对1000个Bel-7402细胞调控基因P53, Bax, Bcl-2, NF-κB蛋白表达影响

分组		-	+	++	+++	++++	阳性表达率(%)
P53	NS	400	322	225	53	0	60.0
	NS+DDP	698	150	99	53	0	30.2 ^a
	YHRJD	864	92	54	0	0	14.6 ^{ac}
	YHRJD+DDP	792	116	82	0	0	19.8 ^{ac}
	YHRJG	836	112	61	0	0	17.3 ^{ac}
	YHRJG+DDP	455	267	206	72	0	54.5 ^c
Bax	NS	700	105	166	29	0	30.0
	NS+DDP	593	240	93	74	0	40.7 ^a
	YHRJD	596	93	149	113	49	40.4 ^{ac}
	YHRJD+DDP	279	124	182	110	305	72.1 ^{ac}
	YHRJG	311	113	93	282	201	68.9 ^{ac}
	YHRJG+DDP	588	102	149	93	78	42.2 ^{ac}
Bcl-2	NS	695	67	133	105	0	30.5
	NS+DDP	737	70	125	68	0	26.3 ^a
	YHRJD	588	163	136	121	0	41.8 ^{ac}
	YHRJD+DDP	607	156	138	99	0	39.3 ^{ac}
	YHRJG	766	114	62	68	0	24.4 ^{ac}
	YHRJG+DDP	544	134	206	116	0	45.6 ^{ac}
NF-κB	NS	758	118	69	53	0	24.2
	NS+DDP	841	58	73	31	0	15.9 ^a
	YHRJD	867	80	37	13	0	13.3 ^{ac}
	YHRJD+DDP	859	41	81	18	0	14.1 ^{ac}
	YHRJG	922	31	49	0	0	7.8 ^{ac}
	YHRJG+DDP	854	60	16	70	0	14.6 ^{ac}

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

基因蛋白表达也有所降低($P < 0.05$)(表2). 对Bax基因蛋白表达检测结果显示, 与NS组相比, 各加药组明显增强Bax基因蛋白($P < 0.05$); 与DDP组相比, 各中药组也明显增强Bax基因蛋白($P < 0.05$)(表2). 对Bcl-2基因蛋白检测结果显示, 与NS组相比, 只有DDP组与YHRJG组能明显降低Bcl-2基因蛋白($P < 0.05$), 其余各组表达有所增强(表2). 对NF-κB基因蛋白检测结果显示, 与NS

组相比, 各加药组明显降低NF-κB基因蛋白表达($P < 0.05$); 与DDP组比较, 各中药组也明显降低NF-κB基因蛋白表达($P < 0.05$)(表2).

2.3 原位杂交法检测YHRJ含药血清对NF-κB mRNA表达影响 原位杂交法检测NF-κB mRNA表达结果显示, 与NS组相比, 各加药组明显降低NF-κB基因mRNA表达($P < 0.05$); 与DDP组相比, YHRJD、YHRJG及YHRJD+DDP组明显降低

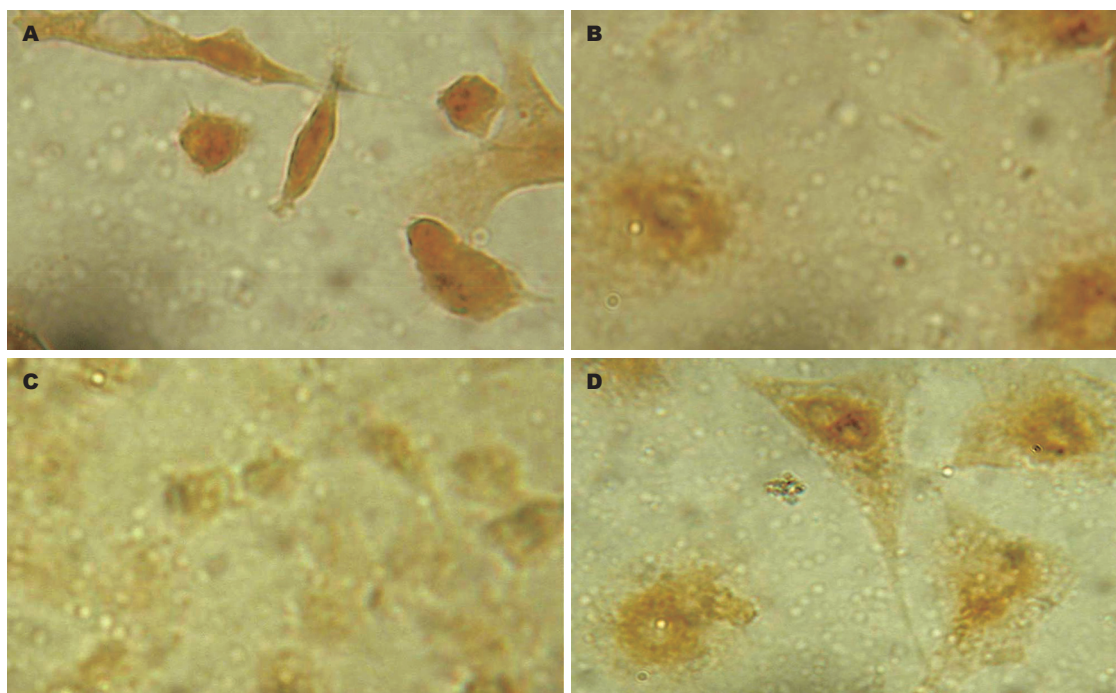


图 1 原位杂交法检测含药血清对细胞凋亡调控基因NF- κ B mRNA表达影响. A: NS组; B: NS+DDP组; C: YHRJG组; D: YHRJG+DDP组.

表 3 YHRJ含药血清对1000个Bel-7402细胞NF- κ B mRNA表达影响

分组	-	+	++	+++	++++	细胞阳性表达率(%)
NS	420	308	272	0	0	58
NSP	695	188	64	53	0	30.5 ^a
YHRJD	867	43	66	24	0	13.3 ^{ac}
YHRJD+DDP	786	89	74	51	0	21.4 ^{ac}
YHRJG	836	85	89	0	0	17.4 ^{ac}
YHRJG+DDP	468	261	206	71	0	53.2 ^{ac}

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

NF- κ B基因mRNA表达($P < 0.05$)(表3, 图1).

2.4 RT-PCR检测YHRJ含药血清对Bax, Bcl-2 mRNA表达影响 YHRJD组明显降低凋亡调控基因Bcl-2 mRNA表达, 与NS组及DDP组比较, 差异显著($P < 0.05$)(表4, 图2A). 与NS组相比, 各加药组明显升高凋亡调控基因Bax mRNA表达, 差异显著($P < 0.05$); 与DDP组相比, YHRJD组Bax mRNA表达也有所增强($P < 0.05$)(表5, 图2B).

表 4 RT-PCR检测YHRJ含药血清对Bel-7402细胞凋亡调控基因Bcl-2 mRNA表达影响(mean \pm SD, $n = 6$)

分组	Bcl-2荧光强度/ β -actin荧光强度
NS	1.327 \pm 0.097
DDP	1.041 \pm 0.311
YHRJD	0.717 \pm 0.198 ^{bd}
YHRJG	1.589 \pm 0.170

^b $P < 0.001$ vs NS组; ^d $P < 0.001$ vs DDP组.

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)是细胞由于内外环境的变化或死亡信号触发以及在基因调控下所引起细胞主动死亡的过程, 是细胞死亡的两种方式之一. 现代医学研究表明, 诱导细胞凋亡是药物发挥抗肿瘤作用的重要机制之一. 在细胞的

凋亡过程中, 许多癌基因、原癌基因和抑癌基因参与了细胞凋亡过程的调控^[7-8], 主要有Fas/FasL、Bcl-2基因家族、P53抑癌基因、NF- κ B基因. 其中Fas属于肿瘤坏死因子/神经生长因子转移膜受体(TNF/NGF)超家族, 当他受到抗

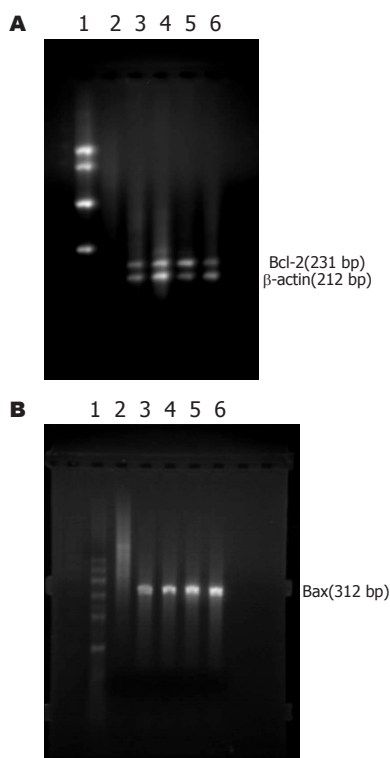


图 2 RT-PCR检测含药血清对细胞凋亡调控基因Bcl-2 mRNA和Bax mRNA表达影响. A: Bcl-2 mRNA; B: Bax mRNA; 1: maker; 2: 阳性对照; 3: NS组; 4: DDP组; 5: YHRJD组; 6: YHRJG组.

体及配体FasL的刺激时诱导细胞凋亡^[9]. Bcl-2和Bax同为Bcl-2家族成员, Bax能促进细胞凋亡, Bcl-2能抑制细胞凋亡, 在促凋亡因素刺激下, Bcl-2/Bax比值将决定细胞的死活^[10-11]. P53基因与肿瘤关系最为密切, 60%以上的人类肿瘤细胞中存在P53基因的突变失活, 野生型P53能抑制肿瘤发生, 是抗癌基因, 而突变型则反而促进肿瘤发生, 成为癌基因^[12-13]. NF-κB是由Rel蛋白家族中的成员以同源或异源二聚体形式组成的一类蛋白蛋, 以非活性形式存在于胞质. 一旦接受刺激信号, NF-κB活化并易位核内, 调节下游基因的表达. 最近发现, 许多诱导细胞凋亡的因子, 如化疗药物、电离辐射在诱导肿瘤细胞凋亡的同时, 由于活化了NF-κB, 会使其诱导凋亡的作用下降, 因此NF-κB活化的抑制已成为肿瘤治疗研究的热点之一^[14].

现代中药药理研究发现, 许多中药具有诱导肝癌细胞凋亡的作用^[15-16]. 如周振华 *et al*^[17]研究发现, 健脾理气方有促进小鼠HAC肝癌细胞凋亡作用, 能上调肿瘤细胞bax基因蛋白表达. 郭伟剑 *et al*^[18]研究发现, 健脾理气药对肝癌细胞株SMMC-7721具一定的诱导凋亡及抑制肝癌细胞

表 5 RT-PCR检测YHRJ含药血清对Bel-7402细胞凋亡调控基因Bax mRNA表达影响

分组	n	Bax荧光强度(I)值
NS	6	35.22 ± 4.38
DDP	6	46.22 ± 6.22 ^a
YHRJD	6	56.19 ± 7.36 ^{ac}
YHRJG	6	62.32 ± 11.06 ^{ac}

^aP<0.05 vs NS组; ^cP<0.05 vs DDP组.

效应, 能上调P53, P21WAF1/CIP1基因的表达, 且对肿瘤细胞端粒酶活性有抑制作用. 杨雁 *et al*^[19]研究发现, 黄芪总甙具有诱导肝癌细胞株HepG2细胞和Bel-7402细胞凋亡的作用, 能上调肝癌细胞的wtP53表达. 以上说明, 在抑制肝癌生长方面, 中药可能主要是通过诱导细胞凋亡实现的. 前期的研究结果显示, YHRJ对人肝癌细胞系Bel-7402细胞具有诱导细胞凋亡作用^[5]. 从对诱导凋亡信号转导基因(Fas/FasL)、凋亡相关蛋白(Bax/Bcl-2)等检测结果得到的数据显示, 中药YHRJ可能主要从以下方面来诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡: (1)调节凋亡信号转导基因Fas/FasL表达水平. 体外实验结果显示, YHRJ含药血清能抑制人肝癌细胞系Bel-7402肿瘤凋亡信号转导基因FasL基因蛋白表达. 降低FasL表达, 能增强机体T淋巴细胞对其的免疫监视作用, 减少由于肝癌细胞过度表达FasL导致CTL细胞凋亡使肿瘤细胞免疫逃逸^[20]; (2)调节凋亡相关调控基因Bax/Bcl-2, NF-κB的表达. 从实验结果看, YHRJ含药血清能促进凋亡调控基因Bax基因蛋白表达, 抑制NF-κB基因mRNA及蛋白表达. Bax/Bcl-2是调节细胞凋亡的重要相关基因, Bcl-2高表达, 可提高细胞凋亡的阈值, 抑制细胞凋亡, 而Bax的高表达则可促进细胞凋亡. NF-κB是TNF死亡途径中重要的抑制凋亡的基因, 其高表达的作用可以产生高浓度的IAP, 进而下降caspase而阻断细胞凋亡^[21]. 中药复方的特点是多成分、多系统、多器官、多效应, 因此作用机制可能是多方面^[22-28]. 以上研究表明, YHRJ对肝癌细胞凋亡的多个环节均有一定影响, 是中医复方多种有效成份相互作用的结果.

4 参考文献

- 1 孙桂芝, 李东涛, 李杰. 益气活血软坚解毒法治疗中晚期原发性肝癌临床疗效观察. 中医杂志 2005; 46: 598-599, 607
- 2 李杰, 孙桂芝, 朴炳奎, 陈长怀, 宋莉. 肝康冲剂配合肝

- 动脉介入治疗原发性肝癌的临床研究. 医学理论与实践 1998; 11: 341-343
- 3 李东涛, 孙桂芝. 益气活血软坚解毒法对肝癌患者免疫因子的影响. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 226-228, 232
- 4 李杰, 孙桂芝, 朴炳奎, 陈长怀, 刘玉琴, 顾蓓, 薛克勋, 高进, 苑景春, 李江, 陆丽珠. 肝康冲剂抑瘤作用观察及机理探讨. 中国实验方剂杂志 1998; 4: 32-35
- 5 李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生. 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞的凋亡. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2217-2221
- 6 李东涛, 裴迎霞, 祁鑫, 孙桂芝. 益气活血软坚解毒方含药血清诱导BEL-7402细胞内 Ca^{2+} 线粒体膜电位的变化. 第二军医大学学报 2005; 26: 667-670
- 7 曾小莉, 涂植光. 细胞凋亡基因调控机制研究进展. 国外医学临床生物化学及检验学分册 1999; 20: 80-82
- 8 石运伯, 王若翔, 时玉舫. 细胞凋亡的分子机理. 生命科学 1996; 8: 8-12
- 9 王文恭, 童坦君. 小鼠成纤维细胞凋亡过程中P53与bcl-2表达的时序性. 中国生物化学与分子生物学报 1998; 14: 318-322
- 10 Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 1998; 5: 372-380
- 11 Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 1995; 26: 592-594
- 12 Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427-428
- 13 黄韧敏, 袁淑兰, 宋毅, 黄光琦. 丹参酮诱导HL-60细胞分化及凋亡的流式细胞术分析. 中国肿瘤临床 1997; 24: 500-503
- 14 史剑慧, 许小平. NF- κ B活化在放化疗诱导肿瘤细胞凋亡中的作用. 中华国际医学杂志 2003; 3: 155-158
- 15 陈坚. 中药诱导肝癌细胞凋亡的实验研究进展. 中西医结合学报 2004; 2: 301-303
- 16 程卫东, 徐瑞峰, 赵健雄. 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展. 甘肃中医 2004; 17: 44-47
- 17 周振华, 宋明志, 于尔辛, 朱雄增. 健脾理气方对小鼠HAC肝癌细胞凋亡和bax基因蛋白表达影响的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000; 8: 78-79, 82
- 18 郭伟剑, 于尔辛, 郑颂国, 沈兆忠, 罗建明, 吴国华, 夏士安. 健脾理气药诱导人肝癌细胞SMMC7721凋亡的研究. 世界华人消化杂志 2000; 8: 52-55
- 19 杨雁, 陈敏珠. 黄芪总苷对肝癌细胞凋亡及wtp53基因表达的影响. 中国药理学通报 2001; 17: 447-451
- 20 李海民, 窦科峰, 李韧, 周景师, 帝振宇, 张福琴. 肝癌组织中Fas和FasL mRNA表达水平的变化及其意义. 中国普外基础与临床杂志 2005; 12: 284-286
- 21 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 55
- 22 李东涛, 孙桂芝. 中医药治疗原发性肝癌研究进展. 中医杂志 2003; 44: 470-472
- 23 李东涛, 孙桂芝, 吴志奎. 中医药治疗原发性肝癌作用机理实验研究进展. 中国中医基础医学杂志 2002; 8: 72-74
- 24 李东涛, 王灿, 孙桂芝. 中药与介入结合治疗原发性肝癌研究进展. 中国中医药信息杂志 2001; 8: 27-28
- 25 范恒, 邱明义, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1119-1124
- 26 刘坚, 谢红东, 李瀚旻, 晏雪生, 明安萍, 彭亚琴. 中药复方搏癌丸对人肝癌细胞周期及bax、bcl-2、p53基因表达调控的影响. 中西医结合肝病杂志 2004; 14: 152-157
- 27 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 367-369
- 28 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000; 8: 879-882

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 •

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

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位. 2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46. (世界胃肠病学杂志社2006-12-18)

非酒精性脂肪肝大鼠肝脏硬脂酰CoA去饱和酶-1表达与ATP浓度之间的关系

陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞

■背景资料

对高脂饮食引起的脂肪肝动物模型的研究发现, 非酒精性脂肪性肝病病变大鼠血浆游离脂肪酸水平升高, 造成肝细胞功能障碍和炎症反应。同时, 脂肪沉积的肝脏ATP储存能力下降, 导致肝细胞对氧应激的反应下降, 加重游离脂肪酸对肝细胞的损伤。硬脂酰CoA去饱和酶-1(SCD1)是肝脏VLDL合成的限速酶, 影响肝脏内脂肪的排出并与游离脂肪酸的增加有关。研究SCD-1和肝ATP含量之间的关系将给临床非酒精性脂肪肝的预防和治疗提供理论指导。

陆元善, 上海交通大学附属第一人民医院检验科 上海市200080

范建高, 方继伟, 丁晓东, 上海交通大学附属第一人民医院消化科 上海市200080

杨兆瑞, 上海交通大学附属第一人民医院病理科 上海市200080

陆元善, 1998年上海医科大学硕士, 主任技师, 主要从事血脂及其相关疾病研究。

通讯作者: 陆元善, 200080, 上海市虹口区武进路85号, 交通大学附属第一人民医院检验科, luyuanshan@126.com

电话: 021-63240090-4306

收稿日期: 2006-08-26 接受日期: 2006-09-20

Relationship between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 expression and adenosine triphosphate content in rats with nonalcoholic fatty liver caused by fat-rich diet

Yuan-Shan Lu, Jian-Gao Fan, Ji-Wei Fang, Xiao-Dong Ding, Zhao-Rui Yang

Yuan-Shan Lu, Department of Laboratory, the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Jian-Gao Fan, Ji-Wei Fang, Xiao-Dong Ding, Department of Gastroenterology, the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China
Zhao-Rui Yang, Department of Pathology, the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Yuan-Shan Lu, Department of Laboratory, the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 85 Wujin Road, Hongkou District, Shanghai 200080, China. luyuanshan@126.com

Received: 2006-08-26 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To explore the relationship between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) expression and adenosine triphosphate (ATP) content in nonalcoholic fatty liver caused by fat-rich diet.

METHODS: A total of 30 Sprague Dawley rats were divided into group A and B. The rats in group B were fed with fat-rich diet, consisting of 10% lard oil and 2% cholesterol, while those in group A served as controls. The rats were sacri-

ficed at the 8th, 16th, and 24th week, respectively. The hepatic histological changes were evaluated by microscopy and transmission electron microscopy. The ATP contents of hepatic cell were measured by luminescent-fluorescein method. The ratio of hepatic SCD-1 mRNA to β -actin mRNA was analyzed by real-time fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The hepatocytes, stained with Haematoxylin & Eosin, in group B were filled with fat under microscope and met the diagnostic standard of fatty liver at the 8th week. Simple fatty liver was observed at the 8th week, and steatohepatitis came into formation from the 16th to 24th week. Marked abnormal morphological changes, including swelling, rounding, loss of cristae, and stacks of intramitochondrial paracrystalline inclusion bodies, were observed in the hepatocytic mitochondrion in group B. SCD-1 expression was lower in group B than that in group A, and the ratio of SCD-1 mRNA to β -actin mRNA was significantly different (8 wk: 0.39 ± 0.18 vs 0.83 ± 0.28 , $P < 0.05$; 16 wk: 0.44 ± 0.17 vs 0.81 ± 0.30 , $P < 0.05$; 24 wk: 0.47 ± 0.23 vs 0.88 ± 0.22 , $P < 0.01$) at the 8th, 16th and 24th week, respectively. The contents of ATP were also significantly different between group B and A (8 wk: 2.40 ± 0.54 vs 2.96 ± 0.43 , $P > 0.05$; 16 wk: 2.26 ± 0.55 vs 3.00 ± 0.42 , $P < 0.05$; 24 wk: 1.74 ± 0.45 vs 2.79 ± 0.40 , $P < 0.01$). There was a positive correlation between SCD-1 expression and hepatic ATP content ($r = 0.45$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Fat-rich diet may decrease the expression of hepatic SCD-1 mRNA, which may result in excessive fat deposition and formation of nonalcoholic fatty liver. Meanwhile, it may increase free saturated fatty acid concentration, impair mitochondrial structure and function, and decrease the capability of ATP synthesis and storage.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver; Stearoyl-CoA desaturase-1; Adenosine triphosphate; Real-time

fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction

Lu YS, Fan JG, Fang JW, Ding XD, Yang ZR. Relationship between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 expression and adenosine triphosphate content in rats with nonalcoholic fatty liver caused by fat-rich diet. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3450-3456

摘要

目的: 研究非酒精性脂肪肝大鼠肝脏SCD-1表达及ATP含量之间的关系。

方法: SD大鼠30只分成正常组、高脂组, 在实验的第8, 16和24周分批处死, 观察肝脏组织学改变, 荧光素酶-荧光素法测定肝脏ATP含量, RT-PCR实时荧光分析大鼠肝SCD-1 mRNA与 β -actin mRNA的比值。

结果: 肝组织HE染色显示高脂组大鼠肝脏内有弥漫性肝细胞脂肪变性, 8 wk达到脂肪肝诊断标准。8 wk表现为单纯性脂肪肝, 16-24 wk进展为脂肪性肝炎。电镜下发现实验组与对照组相比, 肝细胞线粒体肿胀、增大, 部分内膜嵴粒脱落, 16 wk发现线粒体内有类圆形结晶样物质沉积。实验组肝SCD-1 mRNA表达下降, 8, 16和24 wk的测定值分别为 0.39 ± 0.18 vs 0.83 ± 0.28 ($P < 0.05$)、 0.44 ± 0.17 vs 0.81 ± 0.30 ($P < 0.05$)和 0.47 ± 0.23 vs 0.88 ± 0.22 ($P < 0.01$); 每克肝匀浆ATP含量(10^{-8} $\mu\text{mol/L}$)减低(2.40 ± 0.54 vs 2.96 ± 0.43 , $P > 0.05$, 2.26 ± 0.55 vs 3.00 ± 0.42 , $P < 0.05$ 和 1.74 ± 0.45 vs 2.79 ± 0.40 , $P < 0.01$)。肝SCD-1 mRNA表达与ATP含量呈正相关($r = 0.46$, $P < 0.05$)。

结论: 长期高脂饮食引起肝SCD-1的表达下调, 促使脂肪在肝内蓄积形成非酒精性脂肪肝。同时使肝细胞内饱和和游离脂肪酸增加, 线粒体结构和功能受损, 使ATP的合成和储存下降, 加重氧化应激对肝细胞的打击和肝脏的炎症反应。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 硬脂酰CoA去饱和酶-1; 三磷酸腺苷; 实时荧光RT-PCR

陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞. 非酒精性脂肪肝大鼠肝脏硬脂酰CoA去饱和酶-1表达与ATP浓度之间的关系. *世界华人消化杂志* 2006;14(36):3450-3456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3450.asp>

0 引言

硬脂酰CoA去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase,

SCD, E.C. 1.14.99.5)是单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)生物合成的限速酶, 是瘦素作用目的基因之一, 在脂肪酸代谢及能量平衡中起重要的调节作用^[1]。MUFA从其前体饱和脂肪酸经NADH依赖的黄素蛋白细胞色素b5还原酶、细胞色素b5和SCD 3种物质组成的酶系催化, 无氧化而来。SCD催化硬脂酰和软脂酰CoA形成油酰和棕榈油酰CoA。生成的油酰和棕榈油酰CoA是细胞内合成三酰甘油、胆固醇酯和膜磷脂MUFA的主要来源^[2-4]。油酸是肝合成三酰甘油和胆固醇酯的必需脂肪酸, 三酰甘油和胆固醇酯是肝内装配和分泌VLDL的重要成份。非酒精性脂肪肝主要是由于中性脂肪在肝脏中沉积所引起, 而高脂饮食是非酒精性脂肪肝形成的原因之一。对高脂饮食引起的脂肪肝动物模型的研究发现, 非酒精性脂肪性肝脏病变大鼠血浆游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)水平升高^[5], FFA增加诱发脂凋亡, 造成肝细胞功能障碍和炎症反应。同时, 脂肪肝是能量过剩所在肝脏的表现, 对非酒精性脂肪肝患者及动物实验研究发现, 脂肪沉积的肝脏ATP储存能力下降^[6-7], 导致肝细胞对氧应激的反应下降, 加重FFA对肝细胞的损伤^[8-9]。本文旨在通过对引起FFA增加的SCD-1和肝ATP含量之间关系的研究, 给临床非酒精性脂肪肝的预防和治疗提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠, 购自于中科院上海实验动物中心斯莱克公司, 体质量150 g左右(140-160 g)。胆固醇纯品, 上海生化试剂商店。猪油, 自备。Taq DNA聚合酶、dNTP及逆转录试剂均为Promega产品。荧光素酶-荧光素、标准ATP粉剂和荧光素酶缓冲液均购自中科院上海植物生理研究所。FG-100型发光光度计、透射电子显微镜、MJ扩增仪、低温离心机和全自动酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 非酒精性脂肪肝模型的建立 30只大鼠正常喂养1 wk后, 随机分成2组, 对照组15只, 高脂组15只。对照组以普通饲料喂养, 高脂组以2%胆固醇、10%猪油和88%标准大鼠饲料构成的高脂饲料喂养。于实验开始后第8, 16和24周分别处死5只对照组和5只高脂组大鼠。大鼠以0.1 g/kg体质量氯胺酮予以麻醉, 腹主动脉采血。称取肝湿质量后, 迅速从肝右叶固定部位切取1块肝组

■同行评价

本文通过对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏SCD-1表达与ATP含量之间关系的研究, 为临床非酒精性脂肪肝的预防和治疗提供理论指导。实验设计合理, 结论可靠, 具有较高的理论水平和临床实用价值。

织,以40 g/L的中性甲醛固定后制备成石蜡切片,剩余肝组织经标记后投入液氮罐中冷冻保存备用,并取2 mm³的肝脏组织投入戊二醛中固定,送电镜检查。

1.2.2 RT-PCR 从液氮中取出肝组织,称取0.1 g,放入Eppendorf管中,加入1 mL TRIzol,研磨匀浆。匀浆中加入0.2 mL氯仿,剧烈震荡15 s,室温孵育5 min, 4℃, 10 000 g,离心15 min,将无色水相移至另一Eppendorf管。加入0.5 mL异丙醇,室温孵育15 min,再4℃ 10 000 g离心10 min,弃上清。沉淀加入750 mL/L乙醇1 mL,洗涤沉淀物。4℃ 7500 r/min离心5 min,弃上清。沉淀用20 μL DEPC水溶解。取1 μL溶解好的RNA溶液,DEPC水稀释至100 μL,微量分光光度计检测RNA纯度和浓度。

按产品说明书操作。取总RNA 2 μg,加入随机引物2 μL,用无RNA酶去离子水添至总体积12 μL, 70℃, 5 min。取出立即置冰中,快速冷却。然后加入10 mmol/L dNTP 0.8 μL, 10×缓冲液2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, RNA酶抑制剂0.7 μL和逆转录酶0.5 μL, 37℃, 20 min, 42℃, 30 min, 最后95℃, 3 min, 4℃, 5 min。产物cDNA -80℃保存备用。

取10×缓冲液2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 10 mmol/L dNTP 0.8 μL, cDNA 2 μL, 25 μmol/L引物各0.5 μL, Taq DNA聚合酶1 U, 20×SYBR green I 1.25 μL, 去离子水加至25 μL。按95℃, 3 min变性,然后95℃, 20 s, 56℃, 30 s和72℃, 30 s, 40个循环。β-actin的引物为: 5'-AACCCTAAGGCAACCGTGAAAAG-3'和5'-TCATGAGTAGTCTGTCTCAGGT-3'; SCD-1的引物为: 5'-TGCTGATGTGCTTCATCCTG-3'和5'-GGGAAACCAGGATATTCTCC-3'。

1.2.3 ATP测定 所有试剂均用重蒸馏水配制。测定时,模型组和对照组各个时期均取5个标本,共30个标本。腺苷酸提取液(Tris·HCl 20 mmol/L, MgSO₄ 2 mmol/L)。荧光素酶缓冲液:每支粉剂用50 mL重蒸水溶解,内含 50 mmol/L甘氨酸(pH 7.6)、10 mmol/L MgSO₄、1 mmol/L EDTA缓冲液。将ATP配成 1×10^{-10} ~ 5×10^{-5} mmol/L的6管应用液进行测定,以相对荧光强度的log值与ATP浓度的log值绘制标准曲线(图1)。将从液氮罐中冷冻的肝脏组织0.15~0.35 g加入1 mL腺苷酸提取液中,电动匀浆,再放入沸水中加热3 min,消耗并灭活肝脏组织中的ATP酶,然后以4000 r/min离心3 min,取上清液0.4 mL待检测。

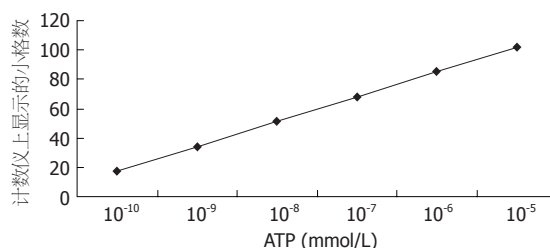


图1 ATP测定标准曲线。

取代检液0.1 mL加入0.1 mL重蒸水稀释,将混合液吸入2 mL的比色杯中,然后从FG-200型发光光度计的暗室盖的小孔中快速注入0.8 mL荧光素酶缓冲液,记录发光曲线的初始峰值,该峰值即为标准或检测样品的荧光强度,测定温度为25℃,测定电压0.5 mV,查标准曲线求得检测标本的ATP含量。

统计学处理 8, 16及24 wk的对照组与高脂组对应指标用*t*检验, SCD-1 mRNA水平与ATP含量之间的相关性统计用非参数的Spearman相关分析,统计软件为SPSS 9.0。

2 结果

2.1 一般情况及肝脏病理 实验过程中未发生大鼠死亡,两组大鼠体质量均呈进行性增长。8, 16及24 wk高脂组大鼠的体质量、肝脏湿质量和腹腔内脂肪均显著高于对照组(表1)。

肝脏大体观察,对照组大鼠肝脏形态、质地、颜色均正常;高脂组大鼠的肝脏体积增大,外形饱满圆钝,色泽灰黄,切面油腻,质地较脆。光镜下,肝组织HE染色显示高脂组大鼠肝脏内有弥漫性肝细胞脂肪变,8 wk达到脂肪肝诊断标准。16 wk时,大鼠肝脏内往往数个坏死灶融合成片,汇管区炎症较严重。24 wk高脂组呈中重度脂肪肝,肝脏炎症程度较重。

扫描电镜下,模型组肝脏中看到其内充满大量脂滴,肝细胞内线粒体结构异常,表现为线粒体增大、肿胀、内嵴粒脱落、减少,而且随着造模时间延长,线粒体损害加重,部分线粒体内可以看到类圆形高密度结晶样物质沉积(图2A-D)。在24 wk电镜下肝脏内发现胶原纤维沉积(图2E),肝细胞核被胞质内积聚的大脂滴推挤,从肝细胞中央区被推到细胞的周边(图2F)。

2.2 对照组与高脂组肝脏SCD-1 mRNA水平及ATP含量比较 SCD-1和β-actin的扩增产物分别为201 bp和241 bp。实验组大鼠的肝脏SCD-1 mRNA水平及ATP含量均较同期的对照组低。

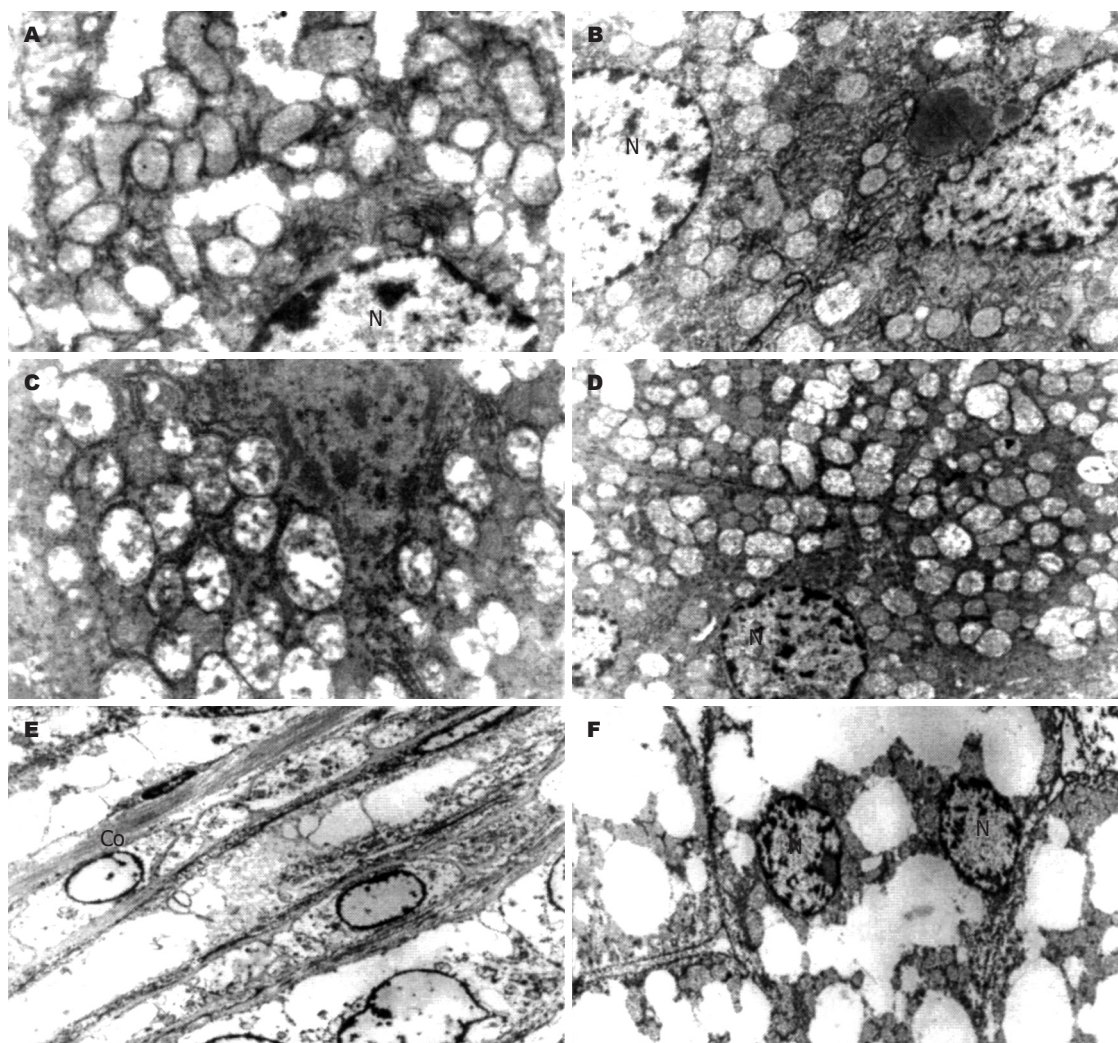


图 2 各组大鼠肝脏的扫描电镜结果. A: 正常大鼠($\times 16\,800$); B: 12 wk实验组($\times 16\,800$); C: 16 wk实验组($\times 9\,600$); D: 24 wk实验组($\times 7\,600$); E: 24 wk实验组(Co: collagen)($\times 5\,700$); F: 24 wk实验组($\times 5\,700$).

表 1 大鼠体重、肝湿质量、腹腔内脂肪、SCD-1/ β -actin mRNA比值及肝ATP含量(mean \pm SD, $n = 5$)

分组	体重(g)	肝湿质量(g)	脂肪质量(g)	SCD-1/ β -actin比值	ATP($\times 10^{-8}$ μ mol/L)
N 8 wk	372.00 \pm 12.55	11.46 \pm 0.82	12.78 \pm 0.71	0.83 \pm 0.28	2.96 \pm 0.43
H 8 wk	421.00 \pm 29.66 ^b	15.22 \pm 2.41 ^a	13.90 \pm 0.77 ^a	0.39 \pm 0.18 ^a	2.40 \pm 0.54
N 16 wk	490.00 \pm 50.50	13.50 \pm 0.61	14.02 \pm 2.10	0.81 \pm 0.30	3.00 \pm 0.42
H 16 wk	550.00 \pm 35.07 ^a	16.16 \pm 1.47 ^b	19.20 \pm 3.56 ^a	0.44 \pm 0.17 ^a	2.26 \pm 0.55 ^a
N 24 wk	496.44 \pm 22.05	12.66 \pm 1.34	14.28 \pm 3.46	0.88 \pm 0.22	2.79 \pm 0.40
H 24 wk	563.90 \pm 32.89 ^a	17.98 \pm 1.95 ^b	19.52 \pm 1.02 ^b	0.47 \pm 0.23 ^b	1.74 \pm 0.45 ^b

N: 正常组; H: 高脂组; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

(表1).

2.3 肝SCD-1 mRNA水平与ATP含量之间的相关性 SCD-1 mRNA水平与每克肝匀浆ATP含量之间的Spearman相关系数为0.46($P < 0.05$). 随着喂养时间的延长, 大鼠肝脏SCD-1的表达与ATP含量表现为同步下降, 两者之间呈正相关(表1).

3 讨论

最近的研究表明, SCD是脂质代谢和体质量调节的关键控制点. 在 ob/ob 小鼠中, SCD-1功能缺乏可通过增加AMP激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的磷酸化和肉毒碱棕榈酰转移酶(carnitine palmitoyltransferase

I, CPT I)mRNA水平和活性, 提高 β -氧化的速率. 同时, 降低丝氨酸棕榈酰转移酶(serine palmitoyltransferase, SPT)的mRNA水平及活性, 降低神经酰胺的合成, 发挥抗脂毒性作用^[10]. 对SCD-1^{-/-}小鼠的研究发现, AMPK的激活可能是SCD-1缺乏小鼠能量消耗增加的原因^[11-12], 尽管脂毒性与细胞内三酰甘油的含量相关, 但脂质诱导的组织损伤可能并不是由三酰甘油引起^[13-15], 而是非氧化的棕榈酰CoA的衍生物——神经酰胺的可能性最大^[15-16]. 神经酰胺在细胞的休止、分化和凋亡中起作用^[17-19]. 在不同的胰岛素抵抗啮齿类动物模型中, 神经酰胺诱导抑制Akt的活性^[20-22], 在脂毒性中发挥重要作用. 神经酰胺与发生在Zucker糖尿病大鼠及过度表达酰基-CoA合成酶的心梗转基因小鼠的胰岛 β -细胞^[23]和心脏^[24]等非瘦素化组织的脂毒性有关^[25], 内源性产生的神经酰胺是软脂酸诱导的胰岛素抵抗^[26]和凋亡所必需的^[23]. 在正常SD大鼠肝脏中表现如何? 本研究希望通过对高脂饮食喂养的SD大鼠肝脏组织学改变、SCD-1表达和ATP含量检测, 研究SCD-1与肝脏能量代谢之间的关系.

我们发现, 高脂饮食喂养可成功的塑造非酒精性脂肪肝模型. 大鼠体质量增加、腹腔内脂肪增多, 肝脏明显增大, 肝细胞内有脂肪颗粒沉积, 肝细胞的超微结构特别是线粒体受到不同程度的损坏^[27]. 同时发现, 经一段时间喂养高脂饮食大鼠肝SCD-1 mRNA水平下降, SCD-1 mRNA水平下降可能与高脂喂养引起的内源性高瘦素血症有关^[1,28], 瘦素是由脂肪细胞分泌的抑制进食、刺激能量消耗、维持体质量防止脂毒性对非脂肪组织损伤的激素^[29-32]. Cohen *et al*^[1]最近研究显示, SCD-1基因是瘦素信号的靶基因, 瘦素通过转录因子SREBP^[33]或神经肽(neuropeptide Y, NPY)^[34-35]发生作用, 抑制SCD-1基因的表达. 本研究发现, 高脂饮食喂养SD大鼠肝脏SCD-1的表达下调在8 wk就表现出显著性差异, 而肝脏ATP含量及电镜下线粒体结构的改变在16 wk有显著差异, 可能与SCD-1的表达下调引起细胞内棕榈酰CoA水平升高, 神经酰胺的合成增加有关. 对中国昌鼠卵巢细胞的研究发现, SCD的主要产物油酸在细胞内神经酰胺的合成起重要的调节作用^[13]. 细胞内神经酰胺的水平升高通常发生在线粒体凋亡阶段之前^[36-37]. 线粒体是神经酰胺介导的凋亡的靶器官, 在细胞凋亡中起主要的调节作用^[38-39]. 神经酰胺的合成位于胞质内的内质网表面^[40-41], 可通过内质网膜与

线粒体膜的近距离接触直接由内质网输入^[42-43], 或由线粒体合成^[44-45]. 对线粒体的亚结构成份的研究发现, 其内、外膜均具有合成神经酰胺的能力^[46]. 神经酰胺形成在线粒体结构上的分布决定了其功能上的差异^[19], 线粒体内膜生成神经酰胺的能力和神经酰胺作为膜的固有成份^[47], 线粒体内膜的神经酰胺可通过抑制呼吸链的复合物 I^[48]和III^[49], 或增加过氧化氢的生成^[50], 直接与线粒体的电子传递链相互作用, 降低ATP的合成和能量储存.

通过在大鼠普通饲料中添加脂肪, 经一段时间喂养后可成功的塑造非酒精性脂肪肝模型. 高脂饮食使大鼠肝脏SCD-1 mRNA水平下降, 使脂肪在肝内蓄积形成非酒精性脂肪肝. 同时, SCD-1 mRNA水平下降, 游离脂肪酸增加, 对线粒体产生脂毒性, 引起线粒体结构和功能损伤, ATP生成减少, 加重了氧化应激对肝细胞的损伤. SCD-1在高脂饮食引起的非酒精性脂肪肝的形成和治疗中起中枢调节作用, 有望成为临床非酒精性脂肪肝的预防和药物开发的一个较为合适的监测指标.

4 参考文献

- 1 Cohen P, Miyazaki M, Succi ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002; 297: 240-243
- 2 Heinemann FS, Ozols J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 68: 123-133
- 3 Miyazaki M, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 68: 113-121
- 4 Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 59-64
- 5 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343-1351
- 6 范建高, 丁晓东, 王国良, 徐正婕, 田丽艳, 郑晓英. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏解偶联蛋白2表达及其与能量贮备的关系. *中华肝病杂志* 2005; 13: 374-377
- 7 丁晓东, 范建高, 徐正婕, 郑晓英, 田丽艳, 王国良. 高脂饮食性脂肪性肝炎大鼠肝脏线粒体损伤和ATP储备改变. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1524-1528
- 8 窦爱霞, 陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1197-1202
- 9 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 371-375
- 10 Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency

- reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing beta-oxidation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E599-607
- 11 Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6409-6414
 - 12 Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 1-17
 - 13 Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3077-3082
 - 14 Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16309-16313
 - 15 Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 398-403
 - 16 Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 2002; 53: 319-336
 - 17 Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 73-80
 - 18 Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 1998; 335 (Pt 3): 465-480
 - 19 van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* 2003; 369: 199-211
 - 20 Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1, 2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat *in vivo*. *J Biol Chem* 1990; 265: 16880-16885
 - 21 Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5457-5464
 - 22 Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kato Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7522-7527
 - 23 Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem* 1998; 273: 32487-32490
 - 24 Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1784-1789
 - 25 Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, Saffitz JE, Schaffer JE. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001; 107: 813-822
 - 26 Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 10297-10303
 - 27 Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2045-2049
 - 28 陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞. 瘦素及硬脂酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2327-2331
 - 29 Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404: 632-634
 - 30 Cohen P, Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J Nutr* 2004; 134: 2455S-2463S
 - 31 Larsson H, Elmstahl S, Berglund G, Ahren B. Evidence for leptin regulation of food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4382-4385
 - 32 Harris RB, Mitchell TD, Hebert S. Leptin-induced changes in body composition in high fat-fed mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 24-32
 - 33 Kakuma T, Lee Y, Unger RH. Effects of leptin, troglitazone, and dietary fat on stearoyl CoA desaturase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 1259-1263
 - 34 Asilmaz E, Cohen P, Miyazaki M, Dobrzyn P, Ueki K, Fayzikhodjaeva G, Soukas AA, Kahn CR, Ntambi JM, Succi ND, Friedman JM. Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J Clin Invest* 2004; 113: 414-424
 - 35 Wang H, Storlien LH, Huang XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E1352-1359
 - 36 Perry DK, Carton J, Shah AK, Meredith F, Uhlinger DJ, Hannun YA. Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 9078-9084
 - 37 Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47: 444-450
 - 38 Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 (Pt 2): 233-249
 - 39 Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 151-165
 - 40 Merrill AH Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 25843-25846
 - 41 Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* 1992; 267: 11144-11148
 - 42 Ardail D, Gasnier F, Lerme F, Simonot C, Louisot P, Gateau-Roesch O. Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 1993; 268: 25985-25992
 - 43 Marsh BJ, Mastronarde DN, Buttler KF, Howell KE, McIntosh JR. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2399-2406

- 44 Shimeno H, Soeda S, Sakamoto M, Kouchi T, Kowakame T, Kihara T. Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction. *Lipids* 1998; 33: 601-605
- 45 El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA. Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 21508-21513
- 46 Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 2004; 382: 527-533
- 47 Ardail D, Popa I, Alcantara K, Pons A, Zanetta JP, Louisot P, Thomas L, Portoukalian J. Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 2001; 488: 160-164
- 48 Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry* 2000; 39: 6660-6668
- 49 Gudz TI, Tserng KY, Hoppel CL. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem* 1997; 272: 24154-24158
- 50 Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 1997; 272: 11369-11377

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 •

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。

PPAR γ 激动剂干预对大鼠重症急性胰腺炎的影响

徐萍, 李清华, 陈令全, 陈江, 谢勇, 吕农华, 侯晓华

徐萍, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022

徐萍, 李清华, 陈令全, 陈江, 谢勇, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化科 江西省南昌市 330006

李清华, 江西省景德镇市第二人民医院消化内科 江西省景德镇市 333000

通讯作者: 徐萍, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科. yfyxp@yahoo.com.cn

电话: 0791-8692540

收稿日期: 2006-09-29 接受日期: 2006-10-18

Effect of pioglitazone on expression of intercellular adhesion molecule-1 in rats with severe acute pancreatitis

Ping Xu, Qing-Hua Li, Ling-Quan Chen, Jiang Chen, Yong Xie, Nong-Hua Lv, Xiao-Hua Hou

Ping Xu, Xiao-Hua Hou, the Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Ping Xu, Qing-Hua Li, Ling-Quan Chen, Jiang Chen, Yong Xie, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Qing-Hua Li, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Jingdezhen City, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Ping Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwai Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyxp@yahoo.com.cn

Received: 2006-09-29 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To investigate the changes in intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression after pioglitazone treatment in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: A total of 54 Sprague Dawley rats were randomly and averagely divided into 3 groups, named group A, C and I. Group A and C served as SAP model and sham operation group, respectively. The rats in group I were treated with pioglitazone, an agonist of peroxisome proliferator activated receptor. The modified Aho's method was used to reproduce SAP models, and the expression of ICAM-1 in pancreatic tissues was determined by immunohisto-

chemical staining.

RESULTS: The histological examination revealed obvious necrosis, hemorrhage, as well as inflammatory cell infiltration in pancreatic tissues after SAP model was induced, but the above pathological changes were alleviated in group I. After modeling, the expression of ICAM-1 was persistently increased from the 3rd hour. In group A, the expression of ICAM-1 was 0.73 ± 0.27 , 0.93 ± 0.41 , and 1.36 ± 0.54 at the 3rd, 6th, and 12th hour, respectively, and there was significant difference between those at the 12th and 3rd hour ($P < 0.05$). In group I, ICAM-1 expression was 0.57 ± 0.21 , 0.86 ± 0.40 , and 0.80 ± 0.53 at the 3rd, 6th, and 12th hour, respectively, and there was marked difference at the 12th hour between group A and I ($P < 0.05$). ICAM-1 expression was weakly positive in group C, and faded away as the time increased.

CONCLUSION: ICAM-1 is involved in the inflammatory response of SAP, while pioglitazone can inhibit the expression of ICAM-1 in SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Pioglitazone; Intercellular adhesion molecule-1

Xu P, Li QH, Chen LQ, Chen J, Xie Y, Lv NH, Hou XH. Effect of pioglitazone on expression of intercellular adhesion molecule-1 in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3457-3460

摘要

目的: 探讨PPAR γ 激动剂吡格列酮对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织ICAM-1表达的影响并探讨其意义。

方法: SD大鼠54只随机分成SAP组($n = 18$)、假手术组($n = 18$)和吡格列酮干预组($n = 18$)。采用改良的Aho法制作SAP模型, 通过免疫组织化学方法动态观察3组大鼠胰腺组织中ICAM-1的表达, 同时观察胰腺组织病理变化。

结果: 病理观察显示, SAP组大鼠胰腺组织有明显坏死、出血及炎症细胞聚集, 而吡格列酮干预组炎症反应明显减轻。从造模后3 h起, 胰

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)的发病机制十分复杂, SAP发病后病情加重的核心问题主要涉及单核巨噬细胞、中性粒细胞(PMN)、血管内皮细胞(VEC)等的参与介入, 其释放的多种细胞因子和炎性介质如ICAM-1在SAP的病情演变过程中起着至关重要的作用。PPAR γ 途径在体外实验及动物模型中具有抑制单核/巨噬细胞系统活化, 减少炎症细胞积聚和炎症因子释放等发挥抗炎作用。

■研发前沿

近年来国内外研究表明, 过氧化酶体增殖因子活化受体 γ (PPAR γ)参与机体的炎症反应过程, 其激活可导致NF- κ B活性下调, 减少炎症介质的产生。PPAR γ 与多种细胞因子、黏附分子基因的转录和表达关系密切, 并借此影响急、慢性炎症的发生、发展。PPAR γ 激动剂有可能成为急性胰腺炎一种有效的治疗手段。

■相关报道

Hashimoto对AP大鼠干预性应用15d-PGJ₂后, ICAM-1, IL-6表达下调, NF- κ B活性下降, 胰腺组织学改变减轻, 认为15d-PGJ₂发挥效应是通过抑制抑制蛋白(inhibitory κ B, I κ B)的降解而实现。Cuzzocrea对AP小鼠的研究也得出类似结果。这些研究均提示PPAR γ 激动剂有可能成为一种有效的治疗手段。

腺组织中ICAM-1即持续上调, 呈时间依赖性, SAP组3, 6, 12 h表达分别为 0.73 ± 0.27 , 0.93 ± 0.41 , 1.36 ± 0.54 , 12 h与3 h比较差异显著($P < 0.05$); 干预组ICAM-1在3, 6, 12 h的表达分别为 0.57 ± 0.21 , 0.86 ± 0.40 , 0.80 ± 0.53 , 12 h时显著低于SAP组($P < 0.05$); 假手术组呈弱阳性表达, 并随时间延长而消失。

结论: ICAM-1参与了大鼠SAP的炎症反应, 吡格列酮对ICAM-1的表达有抑制作用。

关键词: 重症急性胰腺炎; 吡格列酮; 细胞间黏附分子-1

徐萍, 李清华, 陈令全, 陈江, 谢勇, 吕农华, 侯晓华. PPAR γ 激动剂干预对大鼠重症急性胰腺炎的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3457-3460

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3457.asp>

0 引言

急性胰腺炎(AP)是临床常见的急腹症, 近年来, 发病率有所增高^[1]. 大量的临床及实验研究表明, 重症急性胰腺炎(SAP)发病后病情加重的核心问题主要涉及单核巨噬细胞、中性粒细胞(PMN)、血管内皮细胞(VEC)等的参与介入, 其释放的多种细胞因子和其他炎性介质在SAP的病情演变过程中起着至关重要的作用. 近年来越来越多的研究发现, SAP时激活的PMN参与胰腺及胰外组织的损伤, 是SAP时胰腺局部及远隔器官功能损伤的重要病理因素. 我们采用免疫组化方法, 观察SAP时细胞间黏附分子-1(ICAM-1)在胰腺的表达情况, 同时观察吡格列酮干预前后ICAM-1的表达情况的差异, 探讨ICAM-1与SAP时组织损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 δ SD大鼠(南昌大学医学院动物部提供)54只, 体质量160-200 g. 随机分成SAP组(A组, $n = 18$)、假手术组(C组, $n = 18$)和干预组(I组, $n = 18$). SAP模型制作参照Aho法并加以改良: 大鼠术前禁食不禁水12 h; 术前2 h ip无菌100 g/L DMSO溶液(10 mL/kg); 50 g/L盐酸氯胺酮(0.1 g/kg) ip麻醉, 开腹后沿十二指肠内侧找到胆胰管开口, 用5.5号穿刺针在近十二指肠开口端逆行刺入胆胰管, 以2枚血管夹分别夹住肝门部胆管和穿刺针; 以0.1 mL/min速度向胰管内匀速注射50 g/L牛磺胆酸钠(1 μ L/g); 观察胰腺变化后连续缝合关腹. 假手术组: 开腹后不注射

50 g/L牛磺胆酸钠溶液, 只翻动胰腺并以钝器轻划胰腺3次. 以2 g/L DMSO-吡格列酮(20 mL/kg)代替100 g/L DMSO, 作为干预组. 分别于术后3, 6, 12 h 3个时段经腹主动脉放血将大鼠处死, 每个时段每组各取6只大鼠. 取胰头部组织用40 g/L中性甲醛固定后送检。

1.2 方法 胰腺组织经固定、包埋、常规HE染色制片, 依据Kusske^[2]标准进行评分. 胰腺组织ICAM-1的表达检测情况如下: 切片常规脱蜡至水, 微波修复抗原, 30 g/L过氧化氢-甲醇阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗, 加兔抗ICAM-1 (1:50), 湿盒内4 $^{\circ}$ C冰箱过夜, 加非生物素化的二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS冲洗, DAB显色, 苏木素复染、中性树胶封片. PBS代替一抗为阴性对照. 胞质或胞膜呈棕黄色为阳性. 阳性积分计算方法^[3]: 随机观察3个高倍视野, 分别计算阳性细胞数 N_1 、总细胞数 N ; 同时进行阳性细胞着色强度(F)判断: 浅黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分, 最终的阳性积分 = $N_1/N \times F$.

统计学处理 数据采用mean \pm SD表示, 采用SPSS 11.5软件包进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学观察 A组胰腺明显水肿, 小叶间隔增大, 间质内充斥大量淡红色水肿液, 部分腺泡呈孤岛状; 术后3 h即有炎症细胞从血管壁游出, 随时间延长炎症细胞浸润明显; 术后3和6 h腺泡细胞颗粒样变性或空泡变性, 实质内可见散在的灶状凝固性坏死, 术后12 h胰腺大片坏死, 腺小叶排列紊乱, 坏死区腺泡结构消失, 细胞萎缩、胞核溶解消失; 综合评分以12 h点改变最明显. I组镜下表现与A组大体相似, 亦呈现出不同程度的组织水肿、炎症细胞浸润、腺泡细胞的变性坏死等特征, 但与A组同时段相比病变程度轻; I组病理评分与A组同时段比较, 术后3 h差异无统计学意义($P > 0.05$), 在6和12 h两个时段两组差异均有显著性($P < 0.01$). C组胰腺间质仅见轻度充血水肿, 小叶结构存在, 间质清晰, 间质内偶见炎症细胞浸润, 但随时间延长病理改变逐渐减轻, 与I, A组同时段相比差异均有显著性($P < 0.01$)(表1).

2.2 ICAM-1的表达 阳性染色定于胰腺腺泡细胞的胞膜、胞质及血管内皮细胞(图1): C组仅有少量弱阳性表达于腺泡细胞和血管内皮细胞, 随时间延长阳性染色消失; 术后3 h, A组ICAM-1在

■创新盘点

近年研究显示, 噻唑烷二酮类药物可通过激活PPAR γ 而调控炎症反应. 目前, 国内外对PPAR γ 配体与急性胰腺炎之间关系的研究主要集中在15d-PGJ₂和罗格列酮, 有关吡格列酮对AP作用的研究尚无相关报道。

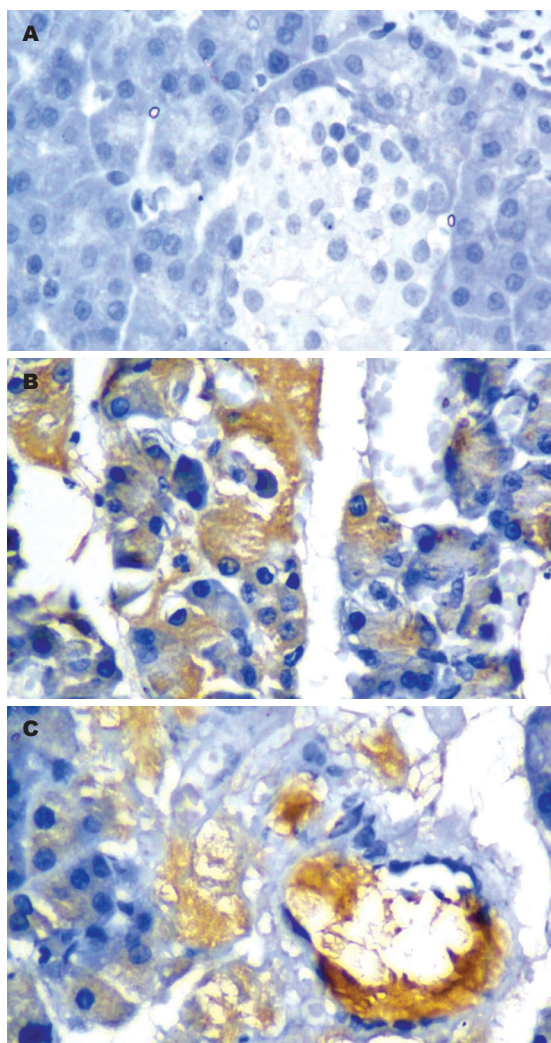


图 1 各组大鼠术后6 h ICAM-1免疫组化染色($\times 400$)。A: C组; B: I组; C: A组。

胞质或血管内皮有较强表达, 此后表达持续增强, 12与3 h比较差异有统计学意义($P<0.05$); I组各时段均见阳性染色, 但较同时段A组弱, 阳性表达于6 h达高峰, 不同时段之间差异无统计学意义($P>0.05$); A组与C组同时段相比差异均有显著性($P<0.01$); I组与C组同时段相比, 在3, 6 h点两组差异有显著性($P<0.01$), 12 h点差异有统计学意义($P<0.05$); A组与I组比较, 术后12 h差异有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

3 讨论

ICAM-1又称CD54, 是一条单链跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白家族中的主要代表。生理条件下ICAM-1仅低量表达于内皮细胞和上皮细胞表面^[4], 炎症反应时, 炎症部位常见大量ICAM-1表达^[5]。AP时PMN自循环血液中游出并在炎症区域募集是引起和加重胰腺损伤及导致远隔器官

表 1 三组大鼠胰腺组织学评分变化(mean \pm SD)

分组	时段(h)		
	3	6	12
C	1.67 \pm 2.16	0.50 \pm 0.55	0.50 \pm 0.55
I	8.83 \pm 1.94 ^b	7.83 \pm 0.75 ^b	7.50 \pm 1.05 ^b
A	9.67 \pm 1.37 ^b	10.33 \pm 1.21 ^{bd}	11.33 \pm 1.75 ^{bd}

^b $P<0.01$ vs C组; ^d $P<0.01$ vs I组。

表 2 三组大鼠胰腺腺泡细胞ICAM-1比较

分组	时段(h)		
	3	6	12
C	0.19 \pm 0.10	0.24 \pm 0.21	0.11 \pm 0.12
I	0.57 \pm 0.21 ^b	0.86 \pm 0.40 ^b	0.80 \pm 0.53 ^a
A	0.73 \pm 0.27 ^b	0.93 \pm 0.41 ^b	1.36 \pm 0.54 ^{bce}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs C组; ^c $P<0.05$ vs I组; ^e $P<0.05$ vs 3 h点。

并发症的中心环节^[6]。PMN的游出与募集又需要多种黏附分子的参与, 其中ICAM-1介导的PMN稳定黏附和穿越内皮细胞向炎症部位的游出起关键作用^[7]。且ICAM-1表达的时态及表达量是影响白细胞黏附、迁移并释放损伤性炎性介质的重要因素^[8]。因此, 阻断ICAM-1的表达, 亦即阻断了白细胞聚集与浸润, 打断细胞因子连锁反应, 是治疗SAP的有效手段。不论是急性水肿性胰腺炎(acute edematous pancreatitis, AEP)还是SAP, ICAM-1表达大多显著上调。本研究发现, SAP大鼠胰腺组织中可见ICAM-1表达, 随时间推移表达增强, 组织炎症加重, 12与3 h比较ICAM-1表达明显上调, 提示ICAM-1参与了胰腺组织的炎症过程。

PPAR γ 是细胞增殖和炎症反应的调节剂, 可调节炎症相关基因的表达, 参与机体的炎症反应过程, 且抗炎作用广泛而强大。最先报道的PPAR γ 合成配体是噻唑烷二酮类药物, 包括吡格列酮、环格列酮、曲格列酮、罗格列酮等, 对PPAR γ 有高度选择性, 在毫微克分子浓度水平即可激活PPAR γ , 临床上主要用于2型糖尿病的治疗; 但近年研究显示, 该类药物可通过激活PPAR γ 而调控炎症反应。目前, 国内外对PPAR γ 配体与AP之间关系的研究主要集中在15d-PGJ₂和罗格列酮, 有关吡格列酮对AP作用的研究尚无相关报道。Hashimoto *et al*^[9]对AP大鼠干预性应用15d-PGJ₂后, 大鼠COX-2, ICAM-1, IL-6表

■应用要点

SAP的发病机制十分复杂, 迄今为止, 其具体机制仍未完全明确, 目前尚无特异治疗手段。因此, 如何有效的防治SAP成为当今医务人员面临的挑战。用吡格列酮干预治疗可减轻大鼠SAP炎症程度, 为PPAR γ 激动剂用于临床治疗SAP提供了实验依据。

■名词解释

1 过氧化物酶体增殖剂激活受体(PPAR): 属于II型核受体超家族成员, 是配体激活转录因子。因能被一类脂肪酸样化合物过氧化物酶体增殖剂(PP)激活, 被命名为PP激活受体。

2 ICAM-1(细胞间黏附分子-1)又称CD54, 是一条单链跨膜糖蛋白, 是最早发现的免疫球蛋白超家族黏附分子之一。

■同行评价

本文探讨PPAR γ 激动剂吡格列酮对SAP大鼠胰腺组织ICAM-1表达的影响, 结果提示, 吡格列酮可能通过抑制ICAM-1的表达而减轻急性胰腺炎的炎症程度, 表明PPAR γ 激动剂有可能成为一种有效的治疗手段, 这对于急性胰腺炎时全身炎症反应综合征的防治有一定意义, 文章有一定学术价值。

达下调, NF- κ B活性下降, 胰腺组织学改变减轻, 认为15d-PGJ₂发挥效应是通过抑制抑制蛋白(Inhibitory κ B, I κ B)的降解而实现, 第一次体内实验证明, PPAR γ 配体可能是AP的治疗靶点. 本研究首次采用吡格列酮对AP大鼠施实干预后表明, 干预组胰腺ICAM-1表达降低, 高峰提前至6 h, 病理评分改善, 与Cuzzocrea *et al*^[10]采用罗格列酮干预治疗的结果一致, 且ICAM-1下调与组织学评分减低之间具有一致性, 提示吡格列酮可能通过抑制ICAM-1的表达而减轻AP的炎症程度, 表明PPAR γ 激动剂有可能成为一种有效的治疗手段。

4 参考文献

- 1 Goldacre MJ, Roberts SE. Hospital admission for acute pancreatitis in an English population, 1963-98: database study of incidence and mortality. *BMJ* 2004; 328: 1466-1469
- 2 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 3 Sasaki H, Nio M, Iwami D, Funaki N, Sano N, Ohi R, Sasano H. E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in biliary atresia: correlation with apoptosis and cell cycle. *Pathol Int* 2001; 51: 923-932
- 4 van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996; 74: 13-33
- 5 Marcus BC, Wyble CW, Hynes KL, Gewertz BL. Cytokine-induced increases in endothelial permeability occur after adhesion molecule expression. *Surgery* 1996; 120: 411-416; discussion 416-417
- 6 Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701
- 7 Berney T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, Vermeulen B, Morel P. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas* 1999; 18: 371-377
- 8 Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991; 65: 961-971
- 9 Hashimoto K, Ethridge RT, Saito H, Rajaraman S, Evers BM. The PPARgamma ligand, 15d-PGJ₂, attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: 58-66
- 10 Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Britti D, Patel NS, Di Paola R, Genovese T, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute pancreatitis induced by cerulein. *Intensive Care Med* 2004; 30: 951-956

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 •

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].

E-钙黏素、MMP2和ICAM-1的表达与胃癌中医证型的关系

刘龙, 许玲, 孙大志, 魏品康

刘龙, 许玲, 孙大志, 魏品康, 第二军医大学长征医院中医科
上海市 200003

刘龙, 第二军医大学2004级博士, 主要从事中西医结合防治消化系肿瘤的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271626

通讯作者: 许玲, 200003, 上海市黄浦区凤阳路415号, 第二军医大学长征医院中医科. czzyk@smmu.edu.cn

电话: 021-63610109-73406 传真: 021-63520020

收稿日期: 2006-08-30 接受日期: 2006-10-14

Correlations of E-cadherin, matrix metalloproteinase-2 and intercellular adhesion molecule-1 expression with traditional Chinese medicine classifications of syndrome for gastric carcinoma

Long Liu, Ling Xu, Da-Zhi Sun, Pin-Kang Wei

Long Liu, Ling Xu, Da-Zhi Sun, Pin-Kang Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271626

Correspondence to: Dr. Ling Xu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. czzyk@smmu.edu.cn

Received: 2006-08-30 Accepted: 2006-10-14

Abstract

AIM: To investigate the expression of E-cadherin (E-Cad), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in different traditional Chinese medicine (TCM) classifications of syndrome for gastric carcinoma, and explore their relationships with syndromic classifications of gastric cancer.

METHODS: A total of 59 gastric cancer cases, including the types of incoordination between liver and stomach ($n = 10$), insufficiency of spleen and stomach ($n = 10$), stomach heat due to yin deficiency ($n = 9$), stagnation of phlegm-damp ($n = 10$), retention of blood stasis toxin in the interior ($n = 10$) and exhaustion of both qi and blood ($n = 10$). The expression of E-Cad, MMP2, and ICAM-1 mRNA was determined by

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the diversities were analyzed between the different syndromic types.

RESULTS: Evident diversity was noted in the different syndromic types. The expression of E-Cad was significantly different between the types of stomach heat due to yin deficiency and exhaustion of both qi and blood (0.58 ± 0.11 vs 0.89 ± 0.25 , $P = 0.026$). The level of MMP2 expression was markedly lower in the types of incoordination between liver and stomach, stomach heat due to yin deficiency, and insufficiency of spleen and stomach than that in the type of retention of blood stasis toxin in the interior (0.78 ± 0.26 , 0.86 ± 0.22 , 0.86 ± 0.22 vs 1.27 ± 0.44 ; $P = 0.006$, $P = 0.024$, $P = 0.020$) or exhaustion of both qi and blood (0.78 ± 0.26 , 0.86 ± 0.22 , 0.86 ± 0.22 vs 1.30 ± 0.59 , $P = 0.004$, $P = 0.016$, $P = 0.013$). The expression of ICAM-1 was not evidently diversified between the six syndromic types.

CONCLUSION: The metastatic mechanism of gastric cancer is diversified between the different syndromic classifications, in which the differences of gene expression may play important roles.

Key Words: E-cadherin; Matrix metalloproteinase 2; Intercellular adhesion molecule-1; Traditional Chinese Medicine types of syndrome; Gastric carcinoma

Liu L, Xu L, Sun DZ, Wei PK. Correlations of E-cadherin, matrix metalloproteinase-2 and intercellular adhesion molecule-1 expression with traditional Chinese medicine classifications of syndrome for gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3461-3465

摘要

目的: 通过检测E-钙黏素(E-Cad)、MMP2和ICAM-1在胃癌不同证型的表达, 探讨基因表达与胃癌中医证型的关系。

方法: 胃癌标本59例, 其中肝胃不和型10例、脾胃虚寒型10例、胃热伤阴型9例、痰湿凝结型10例、瘀毒内阻型10例和气血双亏型10例; 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测六型

■背景资料

证本质的研究是目前中医现代化研究中的热点和难点, 临床发现, 不同证型的胃癌之间, 转移情况存在着一定的差异。近年来, 随着分子生物学研究的深入开展, 发现肿瘤转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程, E-钙黏素(E-Cad), MMP2和ICAM-1在此过程中发挥着重要的作用。

胃癌组织E-Cad、MMP2和ICAM-1 mRNA的表达水平,并对各基因在不同证型的表达情况以及证型与基因的关系进行分析。

结果: 3种目的基因在6种证型中的表达均有很大差异,其中,E-Cad在胃热伤阴型与气血双亏型中的表达有显著性差异(0.58 ± 0.11 vs 0.89 ± 0.25 , $P = 0.026$),MMP2在肝胃不和型与瘀毒内阻、气血双亏两型有显著性差异(0.78 ± 0.26 vs 1.27 ± 0.44 , $P = 0.006$; 0.78 ± 0.26 vs 1.30 ± 0.59 , $P = 0.004$),胃热伤阴型与瘀毒内阻、气血双亏两型有显著性差异(0.86 ± 0.22 vs 1.27 ± 0.44 , $P = 0.024$; 0.86 ± 0.22 vs 1.30 ± 0.59 , $P = 0.016$),脾胃虚寒型与瘀毒内阻、气血双亏两型有显著性差异(0.86 ± 0.22 vs 1.27 ± 0.44 , $P = 0.020$; 0.86 ± 0.22 vs 1.30 ± 0.59 , $P = 0.013$);ICAM-1在各证型间无显著差别,但已有组间差别的趋势。

结论: 不同证型胃癌的转移机制存在一定的差异,基因表达的差异可能是形成不同证型的物质基础之一。

关键词: E-钙黏素;基质金属蛋白酶-2;细胞间黏附分子-1;中医证型;胃癌

刘龙, 许玲, 孙大志, 魏品康. E-钙黏素、MMP2和ICAM-1的表达与胃癌中医证型的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3461-3465
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3461.asp>

0 引言

辨证论治是中医理论特色之一,证作为疾病某一阶段病因、病位、病性以及邪正关系的综合概括,在中医临床中占有举足轻重的地位.临床发现,不同证型的胃癌之间,转移情况存在着一定的差异.近年来,随着分子生物学研究的深入开展,发现肿瘤转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程,E-钙黏素(E-Cad),MMP2和ICAM-1在此过程中发挥着重要的作用.有关E-Cad,MMP2和ICAM-1与胃癌的分期、病理分型、浸润转移以及预后的研究已非常深入,但与胃癌中医证型之间的关系尚鲜见报道,我们就二者之间的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-12/2003-12长征医院普外科经确诊为胃癌并于次日手术的患者.标本于切除后半小时内放入-70℃冰箱保存备用,共收集到胃癌组织标本59例,男性38例,女性21例,平均年

龄 60.37 ± 9.84 岁. DEPC(焦碳酸二乙酯): Sigma公司产品; TRIzol: 上海生工生物工程技术有限公司产品; M-MLV Reverse Transcriptase(反转录酶): Promega公司产品; Oligo dT, dNTP和Ribonuclease Inhibitor: TaKaRa公司产品; Taq DNA Polymerase: MBI公司产品。

1.2 方法 患者手术前1 d,由两名主治医师进行床边辨证,并详细记录与辨证相关的症状、体征、舌苔和脉象等.辨证标准根据我科前期循证研究结果,并参照1978年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的6型分法辨证^[1-4].其中肝胃不和10例、脾胃虚寒10例、胃热伤阴9例、痰湿凝结10例、瘀毒内阻10例、气血双亏10例,共59例。

采用RT-PCR方法半定量检测: (1)总mRNA提取: 用TRIzol、氯仿、异丙醇等提取癌组织中RNA,紫外分光光度计测定总RNA, A_{260}/A_{280} 鉴定mRNA纯度,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定mRNA的完整性,并将RNA稀释至1 g/L; (2) cDNA合成: 总反应体系20 μ L,在微量离心管中加入RNA Sample 1 μ L, Oligo dT primer 1 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L,用DEPC处理过的双蒸水补足体积至11.5 μ L, 72℃加热2 min,冰浴2 min,上述体系内加入5×Buffer 4 μ L, 10×dNTPmix 2 μ L, M-MLV反转录酶0.5 μ L, DTT 2 μ L, 42℃加热60 min,冰浴2 min; (3)引物合成: 上海生工生物工程技术有限公司合成引物(表1); (4)PCR扩增: 总反应体系25 μ L. cDNA模板6 μ L, 10×Buffer 2.5 μ L, 12.5 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.0 μ L, 顺向、反向引物各0.5 μ L, Taq酶0.3 μ L(最后加),双蒸水13.7 μ L(表2); (5)图像分析: PCR产物在15 g/L琼脂糖凝胶上电泳,0.5 mg/L EB染色,出现与扩增产物大小相等的电泳条带为阳性,结果采用Gis凝胶图像处理软件进行分析,用内参基因的灰度值校正目的基因产物的灰度值,进行半定量分析。

统计学处理 应用SPSS11.5软件包,计量资料结果皆以均数±标准差(mean±SD)表示,采用方差分析ANOVA,组间两两比较。

2 结果

2.1 各基因在不同证型中的表达 内参在各证型中的表达无差别,E-Cad在6种证型中的表达为气血双亏型>肝胃不和型>脾胃虚寒型>痰湿凝结型>瘀毒内阻型>胃热伤阴型,其中胃热伤阴型与气血双亏型有显著性差异($P < 0.05$); MMP2

表 1 PCR反应引物设计与扩增片段长度

扩增基因	引物设计	扩增片段长度
GADPH	顺向: 5'TTAGCACCCCTGGCCAAGG3' 反向: 5'CTTACTCCTTGGAGGCCATG3'	540 bp
E-Cad	顺向: 5'CTGAAGTGACTCGTAACGACG3' 反向: 5'CATGTCAGCCAGCTTCTTGAAG3'	286 bp
MMP2	顺向: 5'GGCCCTGTCACTCCTGAGAT3' 反向: 5'GGCATCCAGGTTATCGGGGA3'	477 bp
ICAM-1	顺向: 5'CGGAAGGTGTATGAACTGAGCA3' 反向: 5'ATTGGCTCCATGGTGATCTCTC3'	323 bp

表 2 PCR反应条件

扩增基因	预变性	变性	退火	延伸	循环数
GADPH	95℃ 5 min	94℃ 30 s	55℃ 30 s	72℃ 40 s	28
E-Cad	95℃ 5 min	94℃ 30 s	57℃ 30 s	72℃ 20 s	33
MMP2	95℃ 5 min	94℃ 30 s	56℃ 30 s	72℃ 30 s	33
ICAM-1	95℃ 5 min	94℃ 30 s	55℃ 30 s	72℃ 20 s	35

在6种证型中的表达为气血双亏型>瘀毒内阻型>痰湿凝结型>脾胃虚寒型 = 胃热伤阴型>肝胃不和型, 其中, 肝胃不和型与瘀毒内阻型、气血双亏型均有显著性差异($P<0.01$), 胃热伤阴型与瘀毒内阻型、气血双亏型均有显著性差异($P<0.05$), 脾胃虚寒型与瘀毒内阻型、气血双亏型有显著性差异($P<0.05$); ICAM-1在6种证型中的表达为瘀毒内阻型>胃热伤阴型>痰湿凝结型>气血双亏型>脾胃虚寒型>肝胃不和型, 各证型间无显著性差异, 但已有组间差异的趋势(表3, 图1)。由于各目的基因在转移的不同步骤发挥作用, 结合实验结果, 提示同一基因在不同证型中发挥的作用不同, 不同证型的转移机制存在着一定的差异。

2.2 各证型中不同基因的表达 肝胃不和型中各基因的表达为E-Cad>MMP2>ICAM-1; 胃热伤阴型中各基因的表达为MMP2>ICAM-1>E-Cad; 脾胃虚寒型中各基因的表达为MMP2>E-Cad>ICAM-1; 痰湿凝结型中各基因的表达为MMP2>ICAM-1>E-Cad; 瘀毒内阻型中各基因的表达为MMP2>ICAM-1>E-Cad; 气血双亏型中各基因的表达为MMP2>E-Cad>ICAM-1; 不同证型3种基因的表达情况既有相同之处, 又存在一定差异, 提示, 目的基因在mRNA水平表达的差异可能是形成不同证型的内在物质基础之一。

同行评价

本文利用现代分子生物学技术, 通过对胃癌组织中3种基因检测, 探讨胃癌不同中医证型的分子机制, 研究将传统中医与现代基础医学理论和技术紧密结合, 立题与结果均有一定新意, 且具有科学性, 可读性。

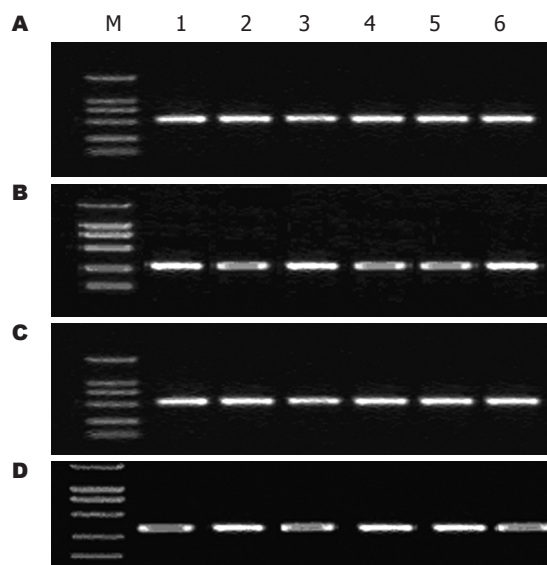


图 1 各证型胃癌组织中GADPH, E-Cad, MMP2, ICAM-1的mRNA表达. A: GADPH; B: E-Cad; C: MMP2; D: ICAM-1; M: Mark; 1: 肝胃不和; 2: 胃热伤阴; 3: 脾胃虚寒; 4: 痰湿凝结; 5: 瘀毒内阻; 6: 气血双亏。

讨论

肿瘤的浸润转移过程大致分为以下几个步骤: (1)癌细胞间黏附能力下降, 从原发瘤脱落, 这是肿瘤转移的先决条件^[5]; (2)脱落的癌细胞黏附于细胞外基质(ECM), 释放多种水解酶类, 使ECM降解; (3)癌细胞以主动方式侵入循环管道, 形成栓子; (4)在特定器官的毛细血管滞留并黏着, 再

表 3 目的基因mRNA在不同证型的表达情况(mean ± SD)

辨证分型	肝胃不和	胃热伤阴	脾胃虚寒	痰湿凝结	瘀毒内阻	气血双亏
E-cad	0.84 ± 0.31	0.58 ± 0.11 ^c	0.79 ± 0.29	0.67 ± 0.17	0.63 ± 0.45	0.89 ± 0.25
MMP-2	0.78 ± 0.26 ^b	0.86 ± 0.22 ^a	0.86 ± 0.22 ^a	0.98 ± 0.35	1.27 ± 0.44	1.30 ± 0.59
ICAM-1	0.49 ± 0.30	0.72 ± 0.35	0.57 ± 0.23	0.70 ± 0.25	0.74 ± 0.28	0.63 ± 0.28

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 瘀毒内阻组与气血双亏组; ^c*P*<0.05 vs 气血双亏组。

次穿过血管壁并定居、增殖,形成转移灶,肿瘤转移是这样一个多步骤、连续的主动过程,受多种因素的影响。

E-Cad是介导同质细胞间黏附的一组跨膜糖蛋白,与细胞骨架蛋白、肌动蛋白等结构黏附连接,是建立与保持上皮细胞极性与细胞间紧密连接的关键分子。当其表达减少或功能障碍时将无法相互黏连,这对于肿瘤来说意味着浸润生长与转移^[6]。近年来,从分子水平上对肿瘤细胞的黏附功能进行了较深入的研究,显示多种癌细胞系或癌组织在早期常有E-Cad表达的下降和功能障碍存在,癌细胞因此获得一定的自由,向癌肿周围浸润性生长,到后期更为明显,癌细胞可以完全脱离癌组织,呈游离状态,随血流播散形成转移癌, E-Cad介导的黏附系统已被公认为“浸润抑制系统”^[7], E-Cad表达的下调还与胃癌的生长方式、浸润深度及转移有关^[8-14]。结合本实验结果,提示E-Cad表达的减少在胃热伤阴、痰湿凝结和瘀毒内阻3型的转移过程中作用更重要。癌细胞在穿过基底膜和ECM的过程中,基质金属蛋白酶(MMPs)发挥了重要的作用,其中,又以MMP2在肿瘤侵袭转移中的作用最为重要^[15]。MMP2以前酶原的形式由结缔组织细胞产生,降解IV, V型胶原及明胶等,在体内主要的作用是在炎症细胞迁移和肿瘤浸润中降解ECM和基底膜。胃癌细胞MMP2主要表达于细胞膜,其前体在细胞表面的激活主要参与了局部基质的降解,这种局部降解对于癌细胞的迁移具有决定性作用,即胃癌细胞扩散与血管侵犯的关键环节。MMP2不仅通过降解ECM促进肿瘤侵袭转移,还通过刺激毛细血管内皮细胞增生、新生血管形成等促进肿瘤生长和扩散^[16-17]。研究发现, MMP2表达的增高与胃癌侵袭、淋巴结转移以及分化密切相关^[18-21]。本实验中我们发现瘀毒内阻与气血双亏两型的表达明显增加,提示MMP2表达的增加与此两型的转移关系密切。

ICAM-1是免疫球蛋白超家族成员之一,是白血球整合黏蛋白受体及淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)拮抗受体^[22],通过促进异源细胞间的相互黏附,从而导致肿瘤的转移。肿瘤细胞通过ICAM-1表达的增加与白细胞黏附,进而黏附到血管内皮并渗出血管外,播散到其他部位^[23]。而且,可溶性ICAM-1(s ICAM-1)还可通过促进肿瘤血管的生成和伪装癌细胞使其逃避机体的免疫监视,而促进肿瘤的转移^[24]。研究发现, ICAM-1的表达与胃癌淋巴结转移和TNM分期有显著相关性^[25-30]。本实验中,各证型之间ICAM-1的表达无显著性差异,但胃热伤阴、痰湿凝结和瘀毒内阻三型的表达有增高趋势,说明胃热伤阴型、痰湿凝结型和瘀毒内阻型发生转移与ICAM-1表达增加关系更密切一些。通过本实验我们发现,在mRNA水平, E-Cad, MMP2与ICAM-1在6种证型中的表达都有一定的差异,而且各基因分别在肿瘤转移的不同步骤发挥作用,因而本结果可以提示,不同证型,其转移机制可能存在一定的差异。由于各基因在转移过程的不同步骤、不同部位发挥作用,因此,临床中可以有的放矢的针对不同靶点进行治疗,而这恰恰从基因水平验证了中医辨证施治理论的正确性,而且为其他治疗方法的研究也提供了新的依据。

证本质的研究是目前中医现代化研究中的热点和难点,随着分子生物学的飞速发展,证本质的研究内容不断被充实,通过本实验我们还发现,每个证型之间,基因的表达情况既有相同之处,同时也存在一定的差异,根据中医“有诸内者必形诸外”的理论,各基因在mRNA层次表达的差异可能也是形成不同证型的内在物质基础之一。

4 参考文献

- 1 许玲,魏品康,秦志丰,孙大志,姜林娣,施俊,刘龙,陆焯. 胃癌中医证候特点分析767例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1804-1808
- 2 施俊,许玲,何金,孙大志. 胃癌中医证型p53与nm23

- 基因蛋白表达性别差异分析. 世界华人消化杂志 2005; 13: 940-944
- 3 施俊, 魏品康, 许玲, 何金, 孙大志. 胃癌证型与肿瘤增殖的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 863-868
- 4 许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 魏品康. 胃癌同证型中肿瘤转移相关基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2782-2787
- 5 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113: 173-185
- 6 李晓玲, 杨雪飞, 吴东瑛, 张素敏, 辛彦. E-钙黏蛋白及PTEN基因编码蛋白与胃癌浸润转移. 中国肿瘤临床 2003; 30: 349-352
- 7 Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996; 77: 1605-1613
- 8 Wu ZY, Zhan WH, Li JH, He YL, Wang JP, Lan P, Peng JS, Cai SR. Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3139-3143
- 9 周辉, 翟博, 郑向民, 胡志前, 王毅. 胃癌中E-cadherin/catenins复合物的表达. 第二军医大学学报 2005; 26: 432-435
- 10 陈秀娇, 郑建盛, 陈建阳. E-钙黏素和基质金属蛋白酶-9与胃癌浸润转移的关系. 山西医科大学学报 2004; 36: 424-426
- 11 Liu YC, Shen CY, Wu HS, Hsieh TY, Chan DC, Chen CJ, Yu JC, Yu CP, Harn HJ, Chen PJ, Hsieh CB, Chen TW, Hsu HM. Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2168-2173
- 12 Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Nakashima S, Hokita S, Baba M, Takao S, Aikou T. Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 158-162
- 13 吴泽宇, 詹文华, 李靖华, 何裕隆, 汪建平, 蔡世荣. 胃癌淋巴结微转移与E-钙黏附素表达的关系. 中华实验外科杂志 2005; 22: 60-62
- 14 钱贤忠, 张浩, 罗建生, 杜金林, 陈凯, 施红旗. CD_{44v6}和E-cadherin表达与胃癌转移及预后的关系. 肿瘤研究与临床 2005; 17: 23-24
- 15 陈洪雷, 刁路明, 刘铭球, 唐志佼, 夏东, 王敏, 陈德基. MMP2、TIMP2、bFGF在大鼠肺鳞癌变过程中的动态表达. 肿瘤 2002; 22: 375-378
- 16 林炳煌, 王进胜, 陈甘章, 陈红琴, 杨艺宏, 李红. 基质金属蛋白酶MMP2表达与乳腺癌转移及预后的关系. 中国肿瘤临床 2002; 29: 322-324
- 17 李杰茹, 齐凤英, 李丽. MMP-2在食管癌中的表达及其与血管生成的相关性. 中华肿瘤杂志 2005; 27: 96-98
- 18 钟华, 徐灿霞, 文锋. MMP2、TIMP2与胃癌淋巴结转移关系的探讨. 中国医学杂志 2004; 2: 241-243
- 19 Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2941-2944
- 20 Lou G, Gao Y, Ning XM, Zhang QF. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5032-5036
- 21 Ji F, Chen YL, Jin EY, Wang WL, Yang ZL, Li YM. Relationship between matrix metalloproteinase-2 mRNA expression and clinicopathological and urokinase-type plasminogen activator system parameters and prognosis in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3222-3226
- 22 Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002; 22: 146-167
- 23 Tanabe K, Alexander JP, Steinbach F, Campbell S, Novick AC, Klein EA. Retroviral transduction of intercellular adhesion molecule-1 enhances endothelial attachment of bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25: 401-405
- 24 Gho YS, Kim PN, Li HC, Elkin M, Kleinman HK. Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 2001; 61: 4253-4257
- 25 Zhao ZQ, Yu PW, Zhao YL, Shi Y. Expressions of RhoC, CD44v6 and ICAM-1 in human gastric cancer and its clinicopathological significance. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2005; 8: 352-355
- 26 Ke JJ, Shao QS, Ling ZQ. Expression of E-selectin, integrin beta1 and immunoglobulin superfamily member in human gastric carcinoma cells and its clinicopathologic significance. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3609-3611
- 27 Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P, Rosenberg T, Diamantis T. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 478-485
- 28 Polychronidis AC, Tsaroucha AK, Samolis SP, Botaitis SK, Perente SS, Simopoulos CE. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis in gastric cancer. *Folia Med (Plovdiv)* 2003; 45: 20-24
- 29 刘展, 周会新, 王双喜, 张明亮. P-选择素及ICAM-1在胃癌组织中的表达及临床意义. 湖南师范大学学报(医学版) 2005; 2: 31-33
- 30 王根和, 沈志祥, 沈磊. 胃癌中黏附分子ICAM-1、LFA-1的表达及与TNM分期关系的研究. 中国肿瘤临床与康复 2001; 8: 30-32

电编 张敏 编辑 王晓瑜

双气囊电子小肠镜在小肠狭窄诊断中的作用

戴军, 李晓波, 高云杰, 戈之铮, 胡运彪, 萧树东

■背景资料

小肠疾病的诊断历来是临床实践的难点之一, 传统的小肠镜、全消化道钡餐及胶囊内镜等检查均不尽人意, 误漏诊率较高。双气囊电子小肠镜是近年来开展应用的全新的小肠疾病诊治方法, 能否成为小肠疾病诊断的首选需在临床实践中进一步研究和观察。

戴军, 李晓波, 高云杰, 戈之铮, 胡运彪, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所上海市 200001

戴军, 1989年上海第二医科大学医学系学士, 在读硕士, 从事内镜方面的研究。

上海市重点学科建设项目资助, No. Y0205

通讯作者: 戈之铮, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所。

zhizhengge@yahoo.com.cn

电话: 021-58752345-3219 传真: 021-63200879

收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-10-17

Value of double-balloon enteroscopy in diagnosis of small intestinal stricture

Jun Dai, Xiao-Bo Li, Yun-Jie Gao, Zhi-Zheng Ge, Yun-Biao Hu, Shu-Dong Xiao

Jun Dai, Xiao-Bo Li, Yun-Jie Gao, Zhi-Zheng Ge, Yun-Biao Hu, Shu-Dong Xiao, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Affiliated to Medical college of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China

Supported by the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipality, No. Y0205

Correspondence to: Zhi-Zheng Ge, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. zhizhengge@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-25 Accepted: 2006-10-17

Abstract

AIM: To evaluate the clinical safety and efficacy of double-balloon enteroscopy in the diagnosis of small intestinal strictures.

METHODS: Totally, 76 patients with suspected intestinal diseases received double-balloon enteroscopic examinations via mouth or anus. For those patients with negative results, another enteroscopic examination was suggested some other day. Of them, 13 patients with suspected strictures underwent barium-meal examination. The screening rates and diagnostic rates between the two different methods were comparatively analyzed.

RESULTS: Of the 13 patients with suspected intestinal strictures, the numbers of patients undertaking enteroscopy via mouth, via anus,

via both mouth and anus were 8, 3 and 2, respectively. The mean time of examination was 74 min (55-120 min). The screening rate of strictures via enteroscopy was 84.6% (11/13), including 6 cases of intestinal neoplasms, 3 cases of Crohn's diseases, and 2 cases of inflammatory strictures, while the diagnostic rate was 69.2% (9/13). There were no serious adverse reactions and complications in all patients received enteroscopy. Of the 13 patients with suspected strictures, the screening rate via barium-meal examination was 53.8 (7/13), including 3 cases of intestinal neoplasms, 2 cases of Crohn's diseases, and 2 cases of inflammatory strictures, while the diagnostic rate was 30.1% (4/13). Furthermore, among those 6 patients with negative results via barium-meal examination, 4 patients were diagnosed with intestinal diseases by double-balloon enteroscopy. There were 3 patients with incorrect diagnosis via barium-meal examination, but they were correctly diagnosed by enteroscopy. The screening rate and diagnostic rate of double-balloon enteroscopy were significantly higher than those of barium-meal examination ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Besides no serious adverse reaction and complication, double-balloon enteroscopy has higher screening rate and diagnosis rate for intestinal strictures, and can be regarded as the first choice for suspected intestinal stricture patients.

Key Words: Double-balloon enteroscopy; Intestinal stricture; Barium-meal examination; Diagnosis

Dai J, Li XB, Gao YJ, Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD. Value of double-balloon enteroscopy in diagnosis of small intestinal stricture. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3466-3470

摘要

目的: 比较双气囊电子小肠镜及小肠钡灌检查在疑有小肠狭窄患者中病变的检出率和诊断率, 评价双气囊电子小肠镜在小肠狭窄诊断中的价值及安全性。

方法: 疑患小肠疾病患者76例, 行双气囊电子

小肠镜检查,分别经口或经肛进镜,对未检出病灶者建议择期改换进镜方式再行检查;其中疑小肠狭窄患者13例均行小肠钡灌检查.比较2种检查方法在疑小肠狭窄患者中病变的检出率、诊断率.

结果:疑有小肠狭窄患者13例中有8例经口、3例经肛、2例分别经口和经肛行双气囊电子小肠镜检查,检查所用平均时间74(55-120) min,小肠狭窄病变检出率为84.6%(11/13),其中小肠肿瘤6例,克罗恩病3例,炎性狭窄2例.检出病变中双气囊电子小肠镜诊断率为69.2%(9/13),所有患者均未发生严重不良反应和并发症.疑小肠狭窄患者小肠钡灌检查的病变检出率为53.8%(7/13),其中小肠肿瘤3例,克罗恩病2例,炎性狭窄2例.在小肠钡灌检查未发现异常的6例病变中有4例在双气囊电子小肠镜检查中发现病变;3例未能正确诊断的病例在双气囊电子小肠镜检查中均得到正确诊断.双气囊电子小肠镜在小肠狭窄中的病变检出率和诊断率均明显高于小肠钡灌检查,二者均有显著差异($P<0.05$).

结论:双气囊电子小肠镜对小肠狭窄有较高的病变检出率和诊断率,无严重不良反应和并发症,可作为首选检查方法.

关键词:双气囊电子小肠镜;小肠狭窄;小肠钡灌检查;诊断

戴军,李晓波,高云杰,戈之铮,胡运彪,萧树东.双气囊电子小肠镜在小肠狭窄诊断中的作用.世界华人消化杂志 2006;14(36):3466-3470
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3466.asp>

0 引言

小肠长约4-6 m,肠管排列盘曲折叠,小肠疾病的诊断是临床上的难点^[1].小肠狭窄是小肠常见的病征,需快速正确诊断和治疗,而治疗方法的选择最重要的是确定狭窄是否由肿瘤引起.全消化道钡餐、小肠钡灌、血管造影等常规检查在小肠疾病中的诊断率较低^[2],误漏诊率较高^[3].推进式小肠镜因操作性较差或仅能插至近端空肠^[4],诊断率亦较低;胶囊内镜对小肠疾病有较高的诊断率,为诊断小肠疾病的最主要方法^[5],但无活检和治疗功能且不能用于小肠疑有不全狭窄患者的诊断^[6],亦有局限性.双气囊电子小肠镜是近年来开展应用的全新的小肠疾病诊治方法^[7-8],理论上可观察小肠的任何部位并能对病变进行定位和活检^[9].本研究通过比较双气囊

电子小肠镜和小肠钡灌检查对疑有小肠狭窄患者病变的检出率和诊断率,评价双气囊电子小肠镜在小肠狭窄诊断中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2006-01经B超、胃镜、结肠镜或上消化道钡餐、钡剂灌肠、CT/MRI、血管造影、核素扫描等检查未能明确病因疑有小肠疾病的患者76例,包括不明原因消化道出血33例和腹痛、腹泻待查患者43例,在我院内镜中心行双气囊电子小肠镜检查.其中有明显腹痛和/或呕吐且腹部平片、CT/MRI等检查高度怀疑小肠狭窄的患者13例,男7例,女6例,平均年龄47.6(20-68)岁,均行小肠钡灌检查.采用富士能EN450P5型双气囊电子小肠镜,包括内镜、外套管、主机和气泵.内镜长度200 cm,外径9 mm.镜身前端有可装卸的乳胶气囊,充气后直径2.5 cm,压力6 kPa.同样带有气囊的柔软外套管长度135 cm,外径12 mm,气囊充气后直径5 cm,压力6 kPa.通过气泵控制气囊充气和放气.经专用活检钳钳取病理标本.双气囊电子小肠镜由术者和助手配合进行操作.

1.2 方法 检查前1 d流质饮食,检查前8 h禁食,经肛方式检查者检查前4 h以温水2000 mL冲服复方聚乙二醇电解质溶液(含聚乙二醇118 g)以清洁肠道.检查方式包括经口和/或经肛.怀疑空肠疾病或病变部位难以判断时先考虑经口方式,怀疑回肠疾病时则考虑先经肛方式.经口检查时当小肠镜到达空回肠交界处或回肠上段仍未发现病灶,即在黏膜下注射10 g/L靛胭脂2 mL,作为另侧进镜后会合的标记,在患者同意情况下,择期选择另侧进镜检查.在小肠狭窄患者检查中,如发现病灶,则同样在病灶处黏膜下注射10 g/L靛胭脂2 mL,作为外科手术的明确定位.整个操作过程均在静脉内异丙酚镇静麻醉下进行,有2位麻醉科医师负责麻醉操作和监护.

统计学处理 相关资料采用 χ^2 检验进行分析, $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

在13例疑小肠狭窄患者中有10例首选经口进镜,3例首选经肛进镜,2例首选经口进镜检查阴性者择期从另侧进镜检查.小肠镜均达到病灶处或空回肠交界处,部分深达回肠中下段,均未能到达回盲部.平均检查时间74(55-120) min.双气囊电子小肠镜对13例疑小肠狭窄患者的检

■创新盘点

本文首次报道双气囊电子小肠镜在疑有小肠狭窄患者中病变的检出率和诊断率,并与小肠钡灌进行比较.目前尚无密切相关文献发表.

应用要点

通过双气囊电子小肠镜对小肠狭窄性疾病的研究,表明该检查对于早期诊断小肠的肿瘤性疾病有良好的临床意义,同时小肠镜下狭窄部位靛胭脂注射,可作为外科手术的明确定位。

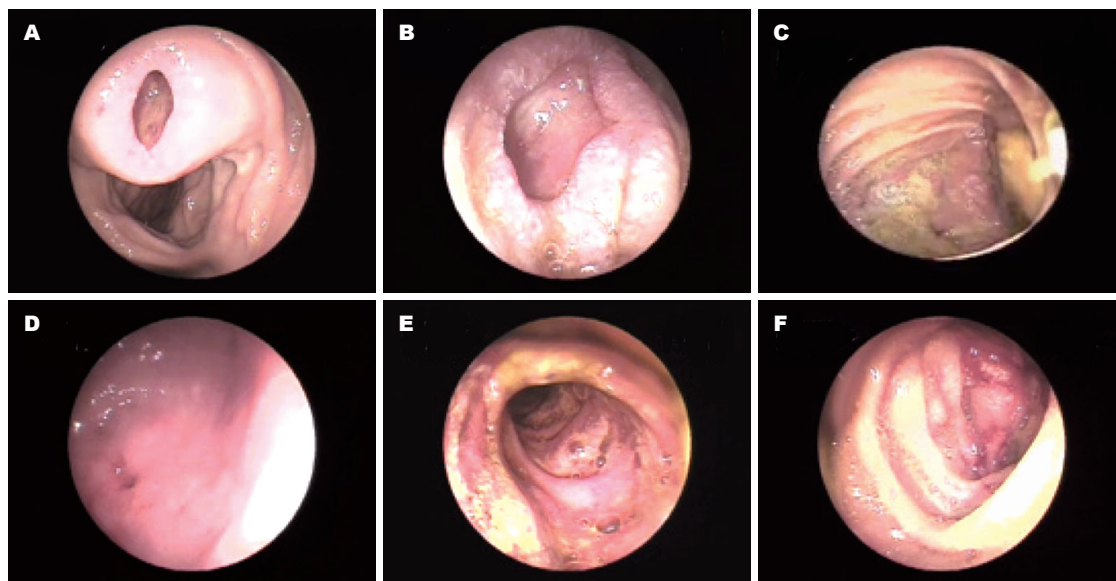


图1 双气囊电子小肠镜(经口进镜)检查结果. A: 十二指肠降部间质细胞瘤; B: 回肠上段炎性包块; C: 空肠上段淋巴瘤; D: 空-回肠交界处死亡钙化血吸虫卵沉积; E: 回肠中段克罗恩病; F: 空肠上段腺瘤。

表1 双气囊电子小肠镜及小肠钡灌对小肠狭窄病变的检出结果

患者	年龄 (岁)	性别	进入通道	指征	钡灌检查 诊断	双气囊小肠镜 诊断	活检和/或 手术病理	部位
1	34	男	经口	腹痛黑便	炎性狭窄	多发性糜烂	非特异性炎症	空肠中段
2	64	男	经口	腹痛	小肠肿瘤	恶性肿瘤	腺瘤 ¹	空肠上段
3	41	女	经口	腹痛呕吐	炎性狭窄	淋巴瘤	B细胞淋巴瘤 ¹	空肠下段
4	48	女	经口	黑便		淋巴瘤	B细胞淋巴瘤 ¹	空肠上段
5	49	男	经肛	呕吐	克罗恩病	多发糜烂及溃疡	死亡钙化血吸虫卵沉积 ¹	空-回肠交界
6	55	女	经口经肛	腹痛	小肠肿瘤	恶性肿瘤	多发溃疡引起的炎性包块 ¹	回肠上段
7	68	女	经肛	腹痛呕吐		克罗恩病	符合克罗恩病	回肠下段
8	68	男	经口	腹痛	小肠肿瘤	恶性肿瘤	恶性间质细胞瘤 ¹	十二指肠降段
9	56	男	经口	黑便		淋巴瘤	T细胞淋巴瘤 ¹	空肠上段
10	20	女	经口经肛	腹痛黑便		克罗恩病	符合克罗恩病	回肠下段
11	52	男	经肛	腹痛		克罗恩病	符合克罗恩病 ¹	回肠中段
12	36	男	经口	腹痛呕吐		未见异常		回肠上段
13	45	女	经口	腹痛呕吐	克罗恩病	未见异常	符合克罗恩病 ¹	回肠下段

¹手术后病理。

查结果见表1, 其中11例患者发现有不同程度的小肠狭窄及引起狭窄的病变, 小肠狭窄病变检出率为84.6%(11/13)。检出病变中诊断小肠肿瘤6例, 5例经手术或术后病理证实, 1例手术证实为多发性溃疡形成的炎性包块, 小肠肿瘤占小肠总检出病变的45.4%(5/11), 双气囊电子小肠镜对引起小肠狭窄的小肠肿瘤的诊断为83.6%(5/6)。非肿瘤性病变中3例为克罗恩病, 2例手术或病理证实; 2例为炎性狭窄, 其中1例手术或病理证实为血吸虫虫卵沉积, 各种病变双

气囊电子小肠镜下表现见图1。双气囊电子小肠镜对小肠狭窄病变的诊断率为69.2%(9/13)。11例发现病变的病例均取活检, 其中8例手术, 活检病理与手术后病理只有5例符合, 活检病理准确率为62.5%(5/8)。2例未发现病变的患者均为经口进镜, 均只到达回肠上段(患者拒绝另侧进镜检查)。

疑小肠狭窄患者小肠钡灌检查的病变检出率为53.8%(7/13), 诊断率仅为30.1%(4/13)。检出病变中诊断小肠肿瘤3例, 1例手术证实为多发

性溃疡形成的炎性包块; 克罗恩病2例, 1例手术证实为血吸虫虫卵沉积; 炎性狭窄2例, 1例手术后证实为淋巴瘤(表1). 在小肠钡灌检查未发现异常的6例病变中4例在双气囊电子小肠镜检查中发现病变; 3例未能正确诊断的病例在双气囊电子小肠镜检查中均得到正确诊断; 另外1例在双气囊电子小肠镜(经口进镜)检查中未发现病变的患者经小肠钡灌检查诊断为克罗恩病, 病变位于回肠下段, 后经手术证实. 双气囊电子小肠镜在小肠狭窄中的病变检出率和诊断率均明显高于小肠钡灌检查, 二者均有显著差异($P<0.05$).

双气囊电子小肠镜操作过程因均在静脉镇静麻醉下进行, 所以无明显不适反应; 操作结束后大部分患者有咽喉部不适和轻度疼痛、头晕、腹胀、轻微腹痛、恶心和呕吐等不良反应, 但均能自行缓解; 未见与操作相关的消化道出血、急性胰腺炎、消化道穿孔和其他并发症.

3 讨论

狭窄是小肠常见的病征, 一旦怀疑小肠狭窄, 就应尽快为治疗提供准确的病变情况描述和正确的诊断. 然而由于医师没有选择正确的检查方法导致诊断经常被延误, 平均达8.2 mo^[10], 所以如何首选正确的检查方法, 对小肠疾病尤其是小肠狭窄的诊断和治疗极其重要. 小肠长约4-6 m, 肠管排列盘曲折叠, 所以小肠疾病的诊断相对比较困难, 传统的各种检查方法因敏感性和特异性较低, 均无法满足临床诊断要求. 小肠钡剂灌肠对占位性和狭窄性病变有一定的诊断能力, 但操作者的经验和方法对检查结果有明显影响, 其对小肠疾病的整体阳性率仅在20%左右^[11]; 传统的推进式小肠镜具有活检功能, 且不受肠腔狭窄的限制, 是诊断小肠狭窄的常用方法, 但他仅可到达屈氏韧带下80-100 cm而不能观察整个小肠; 胶囊内镜的开展应用使小肠疾病的诊断有了很大程度的改善^[12-13], 但胶囊可能存在滞留, 因此不能用于小肠狭窄的诊断.

双气囊电子小肠镜是近年来开展的小肠诊治新技术, 有着其他检查手段无可比拟的优势^[7]. 与推进式小肠镜相比, 双气囊电子小肠镜通常情况下可抵达空回肠交界处, 部分可深达回肠中下段, 通过经口和经肛相结合甚至可完成全小肠检查; 对小肠疾病的检出率也显著高于前者(79% vs 31%)^[14]. 本研究双气囊电子小肠镜发现的11例病变中有7例病灶位于空肠中段

或以下, 为推进式小肠镜较难到达的区域. 多项研究显示, 胶囊内镜在不明原因消化道出血的小肠病变检出率和诊断率高于双气囊电子小肠镜^[15-16], 且可指导双气囊电子小肠镜进镜方式的选择, 减少盲目检查所带来的不良后果^[17], 但对肿瘤等疾病的诊断率则显著低于后者^[18]. 小肠肿瘤是引起小肠狭窄的重要病因, 治疗前小肠狭窄病变部位的确定和病理标本的取得非常重要, 他有助于决定治疗方法的选择. 本研究检出病变中诊断小肠肿瘤6例, 其中5例经手术或术后病理证实, 小肠肿瘤占小肠总检出病变的45.4%(5/11), 双气囊电子小肠镜对引起小肠狭窄的小肠肿瘤的诊断率为83.6%(5/6); 同时我们在这些患者的狭窄部位通过小肠镜预先在黏膜下注射10 g/L靛胭脂2 mL, 作为外科手术的明确定位, 因此手术中, 病变部位很容易找到. 另外双气囊电子小肠镜具有胶囊内镜所缺乏的诸多优点, 如充气、吸引、冲洗、反复观察、取活检标本和内镜下治疗等. 所以双气囊电子小肠镜可作为诊断疑小肠狭窄特别是肿瘤引起的小肠狭窄疾病的首选检查方法.

本研究共13例疑小肠狭窄患者进行双气囊电子小肠镜检查, 其中11例患者发现有不同程度的小肠狭窄及引起狭窄的病变, 双气囊电子小肠镜对小肠狭窄病变检出率为84.6%(11/13), 对小肠狭窄病变的诊断率为69.2%(9/13); 同时对疑小肠狭窄患者行小肠钡灌检查, 小肠钡灌检查对小肠狭窄病变检出率为53.8%(7/13), 诊断率仅为30.1%(4/13). 在小肠钡灌检查未发现异常的6例患者中4例在双气囊电子小肠镜检查中发现病变; 3例未能正确诊断的病例在双气囊电子小肠镜检查中均得到正确诊断. 双气囊电子小肠镜在小肠狭窄中的病变检出率和诊断率均明显高于小肠钡灌检查, 二者均有显著差异($P<0.05$).

对于双气囊电子小肠镜检查阴性的患者, 可能与病变系非小肠源性疾病或病变位于小肠镜所到范围之外等因素有关. 双气囊电子小肠镜虽在常规情况下经口能抵达空回肠交界处, 但对于未抵达回盲瓣且不愿择期再行经肛检查的患者, 还留有相当一部分小肠未行检查. 本研究2例未发现病变的患者经口进镜, 均只到达回肠上段, 其中1例后经小肠钡灌检查诊断为克罗恩病并由病理证实, 主要因为病变位于回肠下段. 因此在不同时间进行经口和经肛相结合的小肠镜检查, 能使相当一部分患者整个小肠得

■同行评价

本文就双气囊电子小肠镜对小肠的狭窄性疾病进行研究, 并与小肠钡灌进行比较, 有良好的临床意义及一定的创新性.

到完整、全面的检查;再结合小肠钡灌检查等辅助检查,将大大降低双气囊小肠镜在疑小肠狭窄疾病中的漏诊率,提高病变检出率。

本研究中,活检病理与手术病理结果的符合率较低,仅为62.5%(5/8),可能由于所用的活检钳较小(钳道直径2.2 mm,活检钳直径1.8 mm),导致部分标本组织过小引起,因此改进活检钳,增大活检标本组织将有助于提高活检病理的诊断符合率。双气囊电子小肠镜在小肠狭窄患者中的镜下治疗是他的另一优越性。国外一项研究显示,对非肿瘤性小肠狭窄包括克罗恩病、外伤或手术后黏连及炎性狭窄的患者在双气囊电子小肠镜下进行扩张术后取得很好效果^[9]。由于目前国内尚无双气囊小肠镜相应的治疗器械供应,我们尚未能开展镜下治疗。

经镇静麻醉的双气囊电子小肠镜操作过程无任何不适感觉;操作结束后大部分患者有咽喉部不适和轻度疼痛、头晕、腹胀、轻微腹痛、恶心和呕吐等不良反应,均能自行缓解;未见与操作相关的消化道出血、急性胰腺炎、消化道穿孔和其他并发症。

总之,双气囊电子小肠镜对小肠狭窄有较高的病变检出率和诊断率,无严重不良反应和并发症,可作为疑小肠狭窄者的首选检查方法,同时随着各种镜下治疗的开展和发展,相信他对小肠狭窄的治疗将起到更大的作用。

4 参考文献

- 1 张德中. 小肠出血的病因与诊治原则. 胃肠病学 2002; 7: 96-98
- 2 May A, Nachbar L, Ell C. Double-balloon enteroscopy (push-and-pull enteroscopy) of the small bowel: feasibility and diagnostic and therapeutic yield in patients with suspected small bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 62-70
- 3 Friedman S. Comparison of capsule endoscopy to other modalities in small bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2004; 14: 51-60
- 4 Yamamoto H, Kita H. Double-balloon endoscopy. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 573-577
- 5 Lewis BS, Eisen GM, Friedman S. A pooled analysis to evaluate results of capsule endoscopy trials.

- Endoscopy* 2005; 37: 960-965
- 6 Yamamoto H, Kita H. Enteroscopy. *J Gastroenterol* 2005; 40: 555-562
- 7 Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Yano T, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Ajibe H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of double-balloon endoscopy for the diagnosis and treatment of small-intestinal diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1010-1016
- 8 Ell C, May A, Nachbar L, Cellier C, Landi B, di Caro S, Gasbarrini A. Push-and-pull enteroscopy in the small bowel using the double-balloon technique: results of a prospective European multicenter study. *Endoscopy* 2005; 37: 613-616
- 9 Sunada K, Yamamoto H, Kita H, Yano T, Sato H, Hayashi Y, Miyata T, Sekine Y, Kuno A, Iwamoto M, Ohnishi H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of enteroscopy using the double-balloon method for strictures of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1087-1089
- 10 戈之铮, 刘文忠. 小肠病学-基础与临床. 上海: 世界图书出版公司, 2005: 315
- 11 Costamagna G, Shah SK, Riccioni ME, Foschia F, Mutignani M, Perri V, Vecchioli A, Brizi MG, Piccicocchi A, Marano P. A prospective trial comparing small bowel radiographs and video capsule endoscopy for suspected small bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 999-1005
- 12 Iddan G, Meron G, Glukhovsky A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000; 405: 417
- 13 Ersoy O, Sivri B, Arslan S, Batman F, Bayraktar Y. How much helpful is the capsule endoscopy for the diagnosis of small bowel lesions? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3906-3910
- 14 Matsumoto T, Moriyama T, Esaki M, Nakamura S, Iida M. Performance of antegrade double-balloon enteroscopy: comparison with push enteroscopy. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 392-398
- 15 Hadithi M, Heine GD, Jacobs MA, van Bodegraven AA, Mulder CJ. A prospective study comparing video capsule endoscopy with double-balloon enteroscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 52-57
- 16 Nakamura M, Niwa Y, Ohmiya N, Miyahara R, Ohashi A, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Preliminary comparison of capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2006; 38: 59-66
- 17 李晓波, 戈之铮, 戴军, 高云杰, 刘文忠, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜检查对双气囊小肠镜进镜方式选择的指导作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1828-1832
- 18 钟杰, 张晨莉, 马天乐, 金承荣, 吴云林, 江石湖. 双气囊小肠镜与胶囊内镜诊断小肠出血病因比较. 中华消化杂志 2004; 24: 741-744

电编 张敏 编辑 潘伯荣

LMP2/LMP7基因编码区多态性及单倍体型与胃癌易感无相关性

曹邦伟, 戴悦, 盖郁慧, 柴庆波, 汪欣

曹邦伟, 北京大学第一医院抗感染病房, 北京大学临床药理研究所 北京市 100034

戴悦, 盖郁慧, 柴庆波, 北京大学第一医院输血科 北京市 100034

汪欣, 北京大学第一医院普外科 北京市 100034

曹邦伟, 2005年北京大学医学部博士, 主要从事分子遗传学的研究。

通讯作者: 汪欣, 100034, 北京市西城区大红罗厂街1号, 北京大学第一医院普外科. wangxinbeida@126.com

电话: 010-66123261 传真: 010-66123261

收稿日期: 2006-09-19 接受日期: 2006-11-10

No association between LMP2/LMP7 gene polymorphisms or haplotypes and gastric cancer

Bang-Wei Cao, Yue Dai, Yu-Hui Gai, Qing-Bo Chai, Xin Wang

Bang-Wei Cao, Department of Anti-infection; Institute of Clinical Pharmacology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Yue Dai, Yu-Hui Gai, Qing-Bo Chai, Department of Blood Transfusion, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Xin Wang, Department of General Surgery, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Correspondence to: Xin Wang, Department of General Surgery, the First Hospital of Peking University, 1 Dahongluochang Street, Western District, Beijing 100034, China. wangxinbeida@126.com

Received: 2006-09-19 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To elucidate whether LMP2/LMP7 polymorphisms or haplotypes were associated with the occurrence of gastric cancer in Han Chinese.

METHODS: The genome DNA was extracted from the peripheral blood of 145 gastric cancer patients and 152 cancer-free controls, and the LMP2-codon60/LMP7-codon145 genotypes were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The software PHASE1.0 was used to construct the haplotypes of each individual. The unconditional Logistic regression model was applied to analyze the statistical differences of genotypes or haplotypes between the two groups.

RESULTS: PCR-RFLP showed that the polymorphisms were found at both codon60 and codon145 loci of LMP2/LMP7 gene in 297 Chinese individuals, and chi-square test demonstrate that the distributions of LMP2/LMP7 genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. After statistical analysis, we found the frequencies of LMP2/LMP7 gene polymorphisms and the four haplotypes were not significantly different between gastric cancer patients and cancer-free controls (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The polymorphisms and haplotypes of LMP2-codon60/LMP7-codon145 gene may not contribute to the genetic susceptibility of gastric cancer in the Han nationality of China.

Key Words: Low molecular weight proteasome; Gastric cancer; Haplotype; Susceptibility

Cao BW, Dai Y, Gai YH, Chai QB, Wang X. No association between LMP2/LMP7 gene polymorphisms or haplotypes and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3471-3476

摘要

目的: 探讨中国汉族人群中肿瘤抗原递呈的限制基因LMP2/LMP7单核苷酸多态性与胃癌的遗传易感性关联。

方法: 提取145例胃癌患者及152例健康献血员外周血基因组DNA, 用PCR-RFLP方法检测两组人群中LMP2-codon60/LMP7-codon145两个多态性位点的基因型; 并采用PHASE1.0软件构建这两个多态性位点的个体单倍体型, 以非条件Logistic回归校正混杂因素, 并进行多态性与胃癌患者风险关联的统计学分析。

结果: PCR-RFLP检测结果显示: LMP2-codon60与LMP7-codon145处的多态性在中国人群中普遍存在, LMP2/LMP7多态性位点的各自的等位基因频率分布符合Hardy-Weinberg平衡定律; 最后的统计分析表明: 在145例胃癌患者与152例健康对照人群中

■背景资料

肿瘤的免疫逃逸机制是目前肿瘤分子生物学研究的一个热点, LMP2/LMP7基因多态性可改变所编码氨基酸的性质, 对肿瘤抗原处理和递呈过程起到了限制性作用, 从而影响着宿主对肿瘤的易感性。目前已有研究表明, LMP基因的多态性与肿瘤或者一系列免疫相关性疾病发生有着密切关联。

■应用要点

虽然本文研究没有得到阳性的研究结果,但本研究的重要意义在于,为以后对胃癌发生的其他免疫逃逸机制的遗传学研究提供了一个颇为重要的理论线索,为将来进一步寻找胃癌的其他遗传易感性位点的研究提供了一个较为明确的参考信息。

LMP2/LMP7两个多态性位点的基因型频率,以及所构建的4个单倍体型频率均没有统计学差异(P 值均大于0.05)。

结论: 在中国汉族人群中, LMP2/LMP7基因编码区两个位点的多态性以及单倍体型与胃癌易感无相关性。

关键词: 低分子量蛋白酶体; 胃癌; 单倍体型; 易感

曹邦伟, 戴悦, 盖郁慧, 柴庆波, 汪欣. LMP2/LMP7基因编码区多态性及单倍体型与胃癌易感无相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3471-3476

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3471.asp>

0 引言

低分子量蛋白酶体(low molecular weight proteasome, LMP)是于1982年Monaco^[1]在分析鼠MHC-II类分子的免疫沉淀复合物时得到的产物。在机体内肿瘤细胞的免疫清除中,其作用在于能够水解肿瘤抗原成为适合的肽段,经转运后于与MHC-I类分子连接,并表达于细胞表面为CD8⁺T淋巴细胞所识别,从而清除异己的肿瘤细胞。因此LMP对于肿瘤细胞的抗原免疫应答有着极为重要的作用^[2]。他包括LMP2和LMP7两个基因,分别编码产生LMP2与LMP7两种蛋白质产物,组成一种非溶酶体的蛋白水解酶复合体。LMP2/LMP7基因多态性的重要性在于能够改变其水解后肽段的长度或者裂解片段的模式,从而能够有利或者不利于与MHC-I类分子连接,继而激发机体对肿瘤细胞的免疫清除^[3-4],因此LMP被认为是肿瘤易感性重要的候选基因。目前已有研究表明, LMP基因的多态性与肿瘤或者一系列免疫相关性疾病发生有着密切关联^[5-8],但目前国内外的研究尚未有与胃癌易感性关联的报道,为此我们选取LMP2/LMP7基因中具有氨基酸改变的两个多态性位点,对中国汉族正常人群及胃癌患者进行了其多态性位点的检测,并同时进行了易感性的关联分析。

1 材料和方法

1.1 材料 病例组选自2003-05/2005-07在北京大学血液标本库(北大医院医院输血科)留存的胃癌血液样本145例,其中男82例,女63例,平均年龄 50.10 ± 8.49 岁。所有病例临床资料完整,血液标本采集前均未有输全血或其他成分输血记录,每例患者均经术后组织病理学确诊,其中胃窦部105例、贲门部31例、胃体部9例,所有患

者均无其他自身免疫系统疾病或者恶性肿瘤合并存在。对照组为北京大学血液标本库健康人血液样本152例,其中性别、年龄等均与病例组相匹配,其中男84例,女68例,平均年龄 49.53 ± 6.52 岁。两组人群均系中国汉族人群,个体之间均无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA抽提 采集静脉全血2 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,常规蛋白酶K消化后苯酚/氯仿提取基因组DNA^[9],总共提取胃癌患者、健康正常人外周血DNA 297例,提取的DNA溶解于TE中, -20℃保存。

1.2.2 多态性位点的选择及引物设计 LMP2/LMP7基因位于染色体6p21.3区域,我们根据文献选择上述两基因各自位于第二外显子的两个SNP位点^[10]: LMP2-codon60处多态位点的存在使得所编码的精氨酸(Arg)置换为半胱氨酸(Cys); LMP7-codon145处位点则为谷氨酰胺(Gln)置换为赖氨酸(Lys),每个多态性位点的详细资料见表1。在GenBank(GenBank accession number: AF027865)中检索到LMP2/LMP7基因的全长序列,利用Generunner3.05(<http://www.generunner.com>)软件,设计针对LMP2/LMP7中每个位点的PCR扩增引物,引物由上海申友生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

1.2.3 PCR反应体系及反应条件程序 PCR扩增体系及程序如下: ddH₂O 40.5 μL, 10×PCR缓冲液(含1.5 mmol/L Mg²⁺) 5 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, Taq酶5 U(Promega Company, USA), 上、下游引物各1 μL (20 μmol/L), DNA模板1 μL (500 ng)。PCR扩增采用程序: 94℃预变性2 min, 94℃变性40 s→退火40 s, 温度依次为56.5℃(LMP2-codon60)、57.5℃(LMP7-codon145)→72℃延伸40 s, 共30个循环,最后在72℃条件下延伸10 min(PE Biosystems, USA), PCR产物采用Multiscreen-PCR纯化板(Millipore Company, USA)进行纯化。

1.2.4 RFLP判断病例组LMP2/LMP7基因型 PCR产物经纯化后,分别采用限制性内切酶Hha I 和 Bsm I (New England Biolabs Beverly, Ma, USA)对LMP2-codon60, LMP7-codon145这两个位点进行酶切基因分型。每个反应体系为20 μL,其中DNA约1 μg、内切酶5 U、加各自内切酶相应的10×Buffer 2 μL、最后加ddH₂O至20 μL,分别在37℃和65℃下水浴4 h。酶切完成后进行琼脂糖(20 g/L)电泳(Agarose-1000; Gibco BRL,

表 1 LMP2/LMP7基因多态性位点的确认及引物设计					
多态位点	氨基酸置换	PCR引物	扩增长度	复性温度	酶切片段(bp)
LMP2-codon60	Arg→Cys	FW: 5'-CTCCACTTTACAGATGCAGA-3' R: 5'-ACTTGGTGACTGTTGACTCC-3'	330 bp	56.5℃	Hha I (79+251)
LMP7-codon145	Gln→Lys	FW: 5'-TCATGGCGCTACTAGATGTATG-3' R: 5'-AACTCTTTGTCTAACTTGCAC-3'	351 bp	57.5℃	Bsm I (146+205)

FW: 上游引物; R: 下游引物.

表 2 一般资料的描述及等位基因的统计分析结果				
类别	病例组	对照组	<i>P</i>	OR (95%CI)
平均年龄(a)(±SD)	50.10(±8.49)	49.53(±6.52)	0.95 ¹	
性别 <i>n</i> (%)				
男	82(56.55)	84(55.26)	0.82 ²	
女	63(43.45)	68(44.74)		
吸烟 <i>n</i> (%)				
否	97(66.90)	106(69.74)	0.60 ²	
是	48(33.10)	46(30.26)		
饮酒 <i>n</i> (%)				
否	108(74.48)	104(68.42)	0.25 ²	
是	37(25.52)	48(31.58)		
LMP2 <i>n</i> (%)				
Arg	233(80.35)	245(80.59)	0.94 ²	0.98(0.66-1.48)
Cys	57(19.65)	59(19.41)		
LMP7 <i>n</i> (%)				
Gln	195(67.24)	203(66.78)	0.90 ²	1.02(0.73-1.44)
Lys	95(32.76)	101(33.22)		

¹ Mann-Whitney Test; ² χ^2 -Test.

Rockville, MD, USA), 根据电泳条带数判断每一个体LMP2/LMP7的基因型, 并选取3组不同基因型的个体进行结果测序验证.

1.2.5 LMP2/LMP7多态性位点的单倍型构建 基于LMP2与LMP7两个基因位于同一条染色体, 之间相距约10 kb, 并且相互毗邻, 故而对于其两个多态性位点在297个体中的基因型, 利用以贝叶斯算法(Bayesian algorithm)为基础的PHASE软件(Phase1.0)软件进行逐个个体单倍体的构建^[11].

统计学处理 以Mann-Whitney检验比较病例组与对照组之间年龄分布的差异; 以Chi-square (χ^2 -Test)检验两组之间性别、吸烟、饮酒、等位基因位点等的分布差异, 以及验证基因型频率是否符合Hardy-Weinberg平衡定律; 多态性、单倍型与胃癌风险之间的相关性以OR值(odds ratio)及其95%CI(confidence intervals)表示; OR值及其95%CI以非条件Logistic回归模型分析,

均经年龄、性别、吸烟、饮酒等混杂因素校正后取得. 所有的统计检验均为双侧概率检验, $P<0.05$ 表示具有统计学意义, 统计学分析使用SPSS11.5软件(SPSS11.5 for Windows, Chicago, IL).

2 结果

2.1 一般资料的统计学检验 Mann-Whitney检验比较病例组与对照组之间年龄分布的差异 $P=0.95$, 差异没有显著性; 在病例与对照组的研究中, 性别、吸烟、饮酒等均无统计学差异 ($P>0.05$)(表2).

2.2 LMP/LMP7多态性位点等位基因频率与基因型频率 145例胃癌患者与152例健康对照人群中两个多态性位点经PCR-RFLP检测结果显示, LMP2-codon60与LMP7-codon145处的多态性在我们检测的样本中存在(图1); 同时分别进

■同行评价
本文结果显示了在肿瘤抗原的免疫呈递过程中, 作为限速步骤的LMP2/LMP7基因的多态性与胃癌的发生不相关, 这为以后对胃癌发生的其他免疫逃逸机制的遗传学研究提供了一个较为重要的实验依据. 实验设计合理, 图表清晰, 表达通顺.

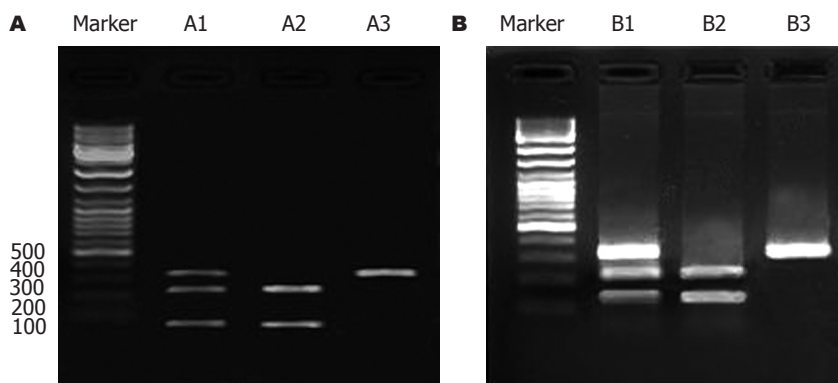


图1 LMP2/LMP7基因多态性位点的PCR-RFLP基因型鉴定. A: LMP2-codon60; A1: Arg/Cys; A2: Cys/Cys; A3: Arg/Arg; B: LMP7-codon145; B1: Gln/Lys; B2: Lys/Lys; B3: Gln/Gln.

行LMP2/LMP7多态性位点的各自3种基因型数据读取与统计, 经检验 $P>0.05$, 等位基因的频率分布符合Hardy-Weinberg平衡定律. LMP2-codon60位点多态性在正常人群与胃癌患者之间等位基因频率差异没有显著性($P=0.94$), $OR=0.98(95\%CI: 0.66-1.48)$, LMP2-codon145位点多态性在两组人群之间差异亦没有显著性 $P=0.90$, $OR=1.02(95\%CI: 0.73-1.44)$ (表2). 对于LMP2/LMP7两个点多态性位点, 分别统计其野生型纯合、杂合、多态性纯合基因型频率在正常人群与胃癌患者两组间差异亦没有显著性(P 均 >0.05)(表3).

2.3 LMP2/LMP7多态性位点单倍体型频率统计分析 针对于病例与对照组LMP/LMP7基因多态性位点的基因型, 用PHASE1.0软件进行每个个体单倍体的构建, 结果共有4种单倍体组合: Arg-Gln, Arg-Lys, Cys-Lys, Cys-Gln(表4). 对每个个体(总297例)逐一进行了--/--, --/Haplotype, Haplotype/Haplotype 3种单倍体型的统计, 鉴于Haplotype/Haplotype纯合单倍体型出现的频率相对较低, 我们的统计分析均将--/Haplotype, Haplotype/Haplotype合并. 结果表明, 4种单倍体型在胃癌与对照组人群之间均无统计学意义($P=0.87, P=0.76, P=0.08, P=0.79$, 表4).

3 讨论

LMP2/LMP7基因多态性对于肿瘤发生研究的临床意义在于, LMP基因编码的蛋白酶体水解肿瘤抗原所得肽段末端氨基酸的性状不同, 其中LMP2能增强酶体对碱性氨基酸残基后肽键的切割, 而不影响中性氨基酸残基后的切割; LMP7则能增强酶体对碱性、中性氨基酸残基后切割, 但不影响酸性残基后切割, 而在基因位点改变后所编码的LMP蛋白酶体水解所得到的肽段羧基末端多为酸性氨基酸残基^[12]. 研

表3 LMP2/LMP7多态性的基因型与胃癌的相关性分析

基因型	病例组 <i>n</i> (%)	对照组 <i>n</i> (%)	P^1	OR^1 (95%CI)
LMP2				
Arg/Arg	93(64.14)	95(62.50)	---	1.00
Arg/Cys	47(32.41)	55(36.18)	0.52	0.85(0.52-1.39)
Cys/Cys	5(3.45)	2(1.32)	0.23	2.79(0.52-14.87)
LMP7				
Gln/Gln	63(43.45)	59(38.82)	---	1.00
Gln/Lys	69(47.58)	85(55.92)	0.26	0.76(0.47-1.23)
Lys/Lys	13(8.97)	8(5.26)	0.38	1.54(0.59-4.01)

¹Logistic回归分析, 经性别、年龄、吸烟、饮酒等因素调整.

究发现, 碱性及疏水性氨基酸残基与MHC-I类分子结合力强, 而酸性氨基酸残基与MHC-I类分子结合力弱, 故LMP2/LMP7基因多态性可决定肽段羧基端氨基酸的性质, 进而对肿瘤抗原处理和递呈过程起到了限制性作用, 使得在后一步由TAP1/TAP2(transporter of antigen presenting, TAP)介导的抗原肽至内质网递呈过程中成为重要的限速步骤, 因而是肿瘤的易感与发生关键因素之一^[13-14]. Kang *et al*^[15]曾在其研究中报道LMP2/LMP7在胃癌细胞系的表达是明显减低的, 同时LMP7的低表达与胃癌细胞系中MHC-I分子的低表达明显相关. 在以往的一系列的研究中发现, LMP2-codon60或者LMP7-codon145编码位点的多态性与自身免疫性疾病及食管癌的发生有着明显的易感关联^[5-8]. 而我们的此次研究发现, LMP2基因codon 60位点(Arg→Cys)在检测的人群中, 无论是等位基因频率($P=0.94$), 还是基因型频率($P=0.52, P=0.23$)在两组人群中均无显著性差异; 同样, LMP codon145位点(Gln→Lys)多态性在胃癌患者和正常人群中, 等位基因频率($P=0.90$), 基因型频

表 4 LMP2/LMP7基因多态性位点构建的单倍体型与胃癌相关性分析

单倍体型	病例组 <i>n</i> (%)	对照组 <i>n</i> (%)	<i>P</i> ¹	<i>OR</i> ² (95%CI)
A = Arg-Gln				
² -/-	89(61.38)	92(60.53)	---	1.00
-/A+A/A	56(38.62)	60(39.47)	0.87	1.04(0.65-1.67)
B = Arg-Lys				
-/-	114(78.62)	117(76.97)	---	1.00
-/B+B/B	31(21.38)	35(23.03)	0.76	1.09(0.63-1.90)
C = Cys-Lys				
-/-	18(12.41)	10(6.58)	---	1.00
-/C+C/C	127(87.59)	142(93.42)	0.08	0.48(0.21-1.09)
D = Cys-Gln				
-/-	120(82.76)	128(84.21)	---	1.00
-/D+D/D	25(17.24)	24(15.79)	0.79	0.92(0.50-1.71)

¹ Logistic回归分析, 经性别、年龄、吸烟、饮酒等因素调整; ² -表示任何一种其他单倍体, 例如: -/A表示单倍体A与其他任何3种单倍体之一的组合。

率($P = 0.26$, $P = 0.38$)也没有统计学差异, 因此我们的结果提示, LMP2/LMP7基因的两个多态性位点可能与中国汉族人群中胃癌的发生无遗传易感性关联。

相对于遗传易感因素来说, 每个多态性位点的存在对于疾病的发生与发展并不只是起到一个孤立的作用, 其相互之间亦存在一定的内在关联与作用^[16-18], 单倍型的则是这种遗传关联的体现, 所以对于单倍型的研究能够揭示多个SNP与疾病易感的关联^[19-21]。我们进一步的研究进行了LMP2/LMP7基因两个多态性位点的每个个体的单倍型的构建, 并以此进行分析与胃癌的关联。在我们的研究中, 两个多态性位点共构建的4种单倍体: Arg-Gln, Arg-Lys, Cys-Lys, Cys-Gln, 统计学结果表明, 这4种单倍体对于胃癌的发生均没有易感关联($P > 0.05$)。因此我们的结果表明, LMP2/LMP7基因的两个SNP不仅单独存在, 而且作为单倍型存在时, 与中国汉族人群中胃癌的发生没有遗传易感性的关联。虽然我们基于LMP2/LMP7基因多态性对于胃癌遗传易感性的研究没有提供阳性的研究结果, 但本研究的重要意义在于, 在肿瘤抗原的免疫呈递过程中, 作为重要的限速步骤的LMP2/LMP7基因, 其多态性并不与胃癌的发生所相关, 这一点为以后对胃癌发生的其他免疫逃逸机制的遗传学研究提供了一个颇为重要的理论线索, 并为将来进一步寻找胃癌的其他遗传易感性多态位点的研究提供了一个较为明确的参考信息。

4 参考文献

- Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 1992; 13: 173-179
- Imanishi T, Kamigaki T, Nakamura T, Hayashi S, Yasuda T, Kawasaki K, Takase S, Ajiki T, Kuroda Y. Correlation between expression of major histocompatibility complex class I and that of antigen presenting machineries in carcinoma cell lines of the pancreas, biliary tract and colon. *Kobe J Med Sci* 2006; 52: 85-95
- Piccinini M, Rinaudo MT, Anselmino A, Ramondetti C, Buccinna B, Fiano V, Ghimenti C, Schiffer D. Characterization of the 20S proteasome in human glioblastomas. *Anticancer Res* 2005; 25: 3203-3210
- Palmowski MJ, Gileadi U, Salio M, Gallimore A, Millrain M, James E, Addey C, Scott D, Dyson J, Simpson E, Cerundolo V. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol* 2006; 177: 983-990
- Casp CB, She JX, McCormack WT. Genes of the LMP/TAP cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo. *Genes Immun* 2003; 4: 492-499
- Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, Zhao Y, Zhang C, Shi X, Chen D, Shen Y, Ke Y. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1280-1284
- Ding HL, Cheng H, Fu ZZ, Deng QL, Yan L, Yan T. The relationship of *Imp2* and *DR3* genes with susceptibility to type I diabetes mellitus in south China Han population. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 111-114
- Dissemond J, Goette P, Moers J, Lindeke A, Goos M, Ferrone S, Wagner SN. Immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 downregulation in primary malignant melanoma lesions: association with lack of spontaneous regression. *Melanoma Res* 2003; 13: 371-377

- 9 Lu XM, Zhang YM, Lin RY, Arzi G, Wang X, Zhang YL, Zhang Y, Wang Y, Wen H. Relationship between genetic polymorphisms of metabolizing enzymes CYP2E1, GSTM1 and Kazakh's esophageal squamous cell cancer in Xinjiang, China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3651-3654
- 10 Vargas-Alarcon G, Gamboa R, Vergara Y, Rodriguez-Zepeda JM, de la Pena A, Izaguirre R, Zuniga J, Ruiz-Morales JA, Granados J. LMP2 and LMP7 gene polymorphism in Mexican populations: Mestizos and Amerindians. *Genes Immun* 2002; 3: 373-377
- 11 Cox DG, Crusius JB, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Pena AS, Canzian F. Haplotype of prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 is involved in the susceptibility to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6003-6008
- 12 Lankat-Buttgereit B, Tampe R. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* 2002; 82: 187-204
- 13 Heink S, Fricke B, Ludwig D, Kloetzel PM, Kruger E. Tumor cell lines expressing the proteasome subunit isoform LMP7E1 exhibit immunoproteasome deficiency. *Cancer Res* 2006; 66: 649-652
- 14 Shen YQ, Zhang JQ, Miao FQ, Zhang JM, Jiang Q, Chen H, Shan XN, Xie W. Relationship between the downregulation of HLA class I antigen and clinicopathological significance in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3628-3631
- 15 Kang JK, Yoon SJ, Kim NK, Heo DS. The expression of MHC class I, TAP1/2, and LMP2/7 gene in human gastric cancer cell lines. *Int J Oncol* 2000; 16: 1159-1163
- 16 Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res* 2003; 526: 53-61
- 17 Kim KJ, Lee HJ, Park MH, Cha SH, Kim KS, Kim HT, Kimm K, Oh B, Lee JY. SNP identification, linkage disequilibrium, and haplotype analysis for a 200-kb genomic region in a Korean population. *Genomics* 2006; 88: 535-540
- 18 Bahlo M, Stankovich J, Speed TP, Rubio JP, Burfoot RK, Foote SJ. Detecting genome wide haplotype sharing using SNP or microsatellite haplotype data. *Hum Genet* 2006; 119: 38-50
- 19 Li LM, Kim JH, Waterman MS. Haplotype reconstruction from SNP alignment. *J Comput Biol* 2004; 11: 505-516
- 20 Stumpf MP. Haplotype diversity and SNP frequency dependence in the description of genetic variation. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 469-477
- 21 Ke X, Durrant C, Morris AP, Hunt S, Bentley DR, Deloukas P, Cardon LR. Efficiency and consistency of haplotype tagging of dense SNP maps in multiple samples. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2557-2565

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 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。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2001071号。《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》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。

Ad-p27mt转染重组腺病毒治疗裸鼠内人胃癌的分子机制

朱金水, 张强, 宋明全, 张卫平, 达伟, 陈金联, 孙群

朱金水, 张强, 宋明全, 张卫平, 达伟, 陈金联, 孙群, 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: 2006-03-04 接受日期: 2006-03-29

Molecular mechanism of recombinant adenovirus Ad-p27mt therapy for human gastric cancer in nude mice

Jin-Shui Zhu, Qiang Zhang, Ming-Quan Song, Wei-Ping Zhang, Wei Da, Jin-Liang Chen, Qun Sun

Jin-Shui Zhu, Qiang Zhang, Ming-Quan Song, Wei-Ping Zhang, Wei Da, Jin-Liang Chen, Qun Sun, Department of Gastroenterology, the Six People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Six People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com
Received: 2006-03-04 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To explore the effect of recombinant adenovirus Ad-p27mt on the apoptosis of human gastric cancer cells and its correlative mechanism.

METHODS: The recombinant adenovirus Ad-p27mt was constructed and then transfected into human gastric cancer cell line SGC-7901. The apoptotic peak of hypodiploid chromosomes in SGC-7901 cells was measured by flow cytometry, and the apoptosis of SGC-7901 cells was detected by TUNEL method.

RESULTS: Ad-p27mt was successfully constructed and the infection efficiency reached 100%. After 18-h infection, the apoptotic peak of hypodiploids appeared before G₁-S phase and the bands with apoptotic characteristics were shown by DNA electrophoresis. The apoptotic rate of SGC-7901 cells detected by TUNEL method was 89.4%±3.12% (Ad-p27mt group) and 3.12%±0.13% in Ad-p27mt-transfected cells and controls, respectively, and there existed significant

difference between the two groups ($P<0.01$).

CONCLUSION: Human mutant p27 can induce the apoptosis of human gastric cancer cells *in vitro*.

Key Words: Gastric cancer; Human mutant p27; Cell apoptosis

Zhu JS, Zhang Q, Song MQ, Zhang WP, Da W, Chen JL, Sun Q. Molecular mechanism of recombinant adenovirus Ad-p27mt therapy for human gastric cancer in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3477-3481

摘要

目的: 研究Ad-p27mt转染重组腺病毒对人胃癌细胞凋亡的作用及机制。

方法: Ad-p27mt转染重组腺病毒导入胃癌细胞株SGC-7901内; 流式细胞仪检测凋亡染色体亚二倍体峰值, 了解Ad-p27mt对人胃癌组织凋亡的作用; TUNEL法检测DNA片断, 在Ad-p27mt组和Ad-LacZ组中分析细胞的凋亡。

结果: Ad-p27mt成功转入人胃癌细胞SGC-7901内, 转化率达100%。流式细胞仪检测发现在感染后18 h出现G₁-S相前出现凋亡染色体亚二倍体峰值, 并且DNA电泳出现凋亡特征性的条带; TUNEL法检测Ad-p27治疗组与对照组的凋亡率分别是92.3%±3.76%和2.01%±0.15%, 两组的差异有显著性($P<0.01$)。

结论: 重组腺病毒转染的人p27突变基因能诱导裸鼠体内人胃癌细胞SGC-7901的凋亡。

关键词: 胃癌; 人突变基因p27; 细胞凋亡

朱金水, 张强, 宋明全, 张卫平, 达伟, 陈金联, 孙群. Ad-p27mt转染重组腺病毒治疗裸鼠内人胃癌的分子机制. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3477-3481
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3477.asp>

0 引言

凋亡在各种恶性肿瘤细胞的发展过程中占有十分重要的地位。目前已证实各种抗肿瘤药物

■背景资料

凋亡在各种恶性肿瘤细胞的发展过程中占有十分重要的地位。同其他恶性肿瘤一样, 胃癌不仅存在细胞增殖和分化的异常, 同时也存在凋亡的异常。目前晚期胃癌尚缺乏有效的治疗方法。因此如何诱导胃癌细胞凋亡是目前的研究重点。

■应用要点

本研究提示重组腺病毒转染人p27基因具有显著抑制裸鼠体内人胃癌细胞SGC-7901的作用。p27的积累对胃癌细胞周期的中止机制起着重要作用,利用p27mt上调p27的表达促进肿瘤细胞的凋亡,可能形成一种新型的抗胃癌治疗途径。

如细胞毒性药物、激素或者一些重组基因、药物等能诱导肿瘤的凋亡率增高。同其他恶性肿瘤一样,胃癌不仅存在细胞增殖和分化的异常,同时也存在凋亡的异常。目前晚期胃癌尚缺乏有效的治疗方法。因此如何诱导胃癌细胞凋亡是目前的研究重点。人突变基因p27表达产物(T187A)是一种多功能细胞因子依赖性酶抑制剂(CDKI),通过抑制细胞从G₀/G₁期向S期转化起负向调节作用^[1-2]。基于前一阶段的研究,我们检测经过p27基因突变重组并种植于裸鼠的人胃癌细胞的凋亡指数,将重组腺病毒Ad-P27mt转化胃癌细胞SGC-7901,研究其对胃癌细胞凋亡的影响并探讨相关的抗肿瘤机制,从而寻求对晚期胃癌治疗的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料 30只6-7周龄BALB/c^{nu/nu}鼠(体质量18-22 g)和人胃癌细胞株SGC-7901均来自上海肿瘤研究所。裸鼠皮下种植SGC-7901细胞。RPMI1640培养液和TRIzol总RNA提取试剂盒购自Gibco BRL公司。鼠抗人p27 kip1多抗体购自Transduction Laboratories公司。脂质体,胰酶,DMEM培养液,200 bp DNA梯度,dNTP,Taq酶和限制性内切酶均购自华美生物公司。pORF₉-hp27mt质粒(含人p27突变基因)来自Invivogen公司。*E. coli* BJ5183购自Stratagene公司。重组腺病毒和Ad-LacZ(为重组腺病毒的中介)由美国休斯顿大学Robert教授提供。Western blot检测仪器为:TMB system western blot kit, KPL USA。人胃癌细胞株SGC-7901在加入100 mL/L胎牛血清(FCS),100 kU/L青霉素,100 mg/L链霉素和2 mmol/L谷氨酸盐的RPMI1640培养液中生长,于37℃,50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养。胃癌细胞长满培养瓶80%-90%后即可进行实验处理。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒质粒的制备和鉴定 基因hp27mt自pORF₉-hp27mt质粒中经Age I 和Nhe I 酶切后,回收619 bp的片段的片段,亚克隆入经Xma I 和Xba I 酶切的pBluescript II SK(+)中,pBluescript-hp27mt质粒经Not I 和Kpn I 酶切,回收619 bp的目的基因片段,插入到经同样酶切的穿梭质粒pShuttle-CMV中,构建成转移质粒pShuttle-CMV-hp27mt。用腺病毒骨架质粒pAdeasy-1转化感受态*E. coli*,根据pAdeasy-1的

氨苄抗性基因挑取含pAdeasy-1的BJ5183菌,大量扩增后制备含pAdeasy-1的超感受态BJ5183。含pAdeasy-1的超感受态BJ5183菌经Pme I 酶切和碱性磷酸酶去磷酸化后,转化含Adeasy-1的超感受态BJ5183。小量抽提转化克隆菌质粒DNA,根据琼脂糖电泳质粒大小,选择可疑重组腺病毒质粒DNA,经Pac I 酶切鉴定正确后,大量扩增,采用脂质体PolyFect介导转染Ad293细胞,完成人重组腺病毒Ad-hp27mt的制备。重组腺病毒的扩增、鉴别、及滴度测定同前^[3]。

1.2.2 X-gal染色 SGC-7901细胞在15 cm培养瓶中生长,分别感染MOI为20, 40, 50和100的Ad-lacZ,温孵48 h后用5 mL/L的戊二醇固定15 min, PBS液清洗3次,加入X-gal染色液(20:1),在37℃ 50 mL/L CO₂的培养箱中温孵4-24 h。被染为蓝色的细胞是表达LacZ基因的阳性细胞,在显微镜下观察并计数阳性细胞比率。

1.2.3 p27mt基因表达的检测 SGC-7901细胞在75 cm培养瓶中培养,分别感染Ad-p27mt和Ad-LacZ。在相同条件下温孵48 h后分别用0.5 g/L胰酶消化。细胞用PBS液冲洗2次。PCR鉴定的引物序列如下:引物1: 5'-CCTAGAGGGCAAGTACGAGTG-3';引物2: 5'-GAAGAATCGTCGGTTGCAGGTCGCT-3';引物3: 5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3';引物4: 5'-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3'。细胞经裂解液裂解后用Western blot检测。

1.2.4 流式细胞仪检测感染Ad-p27mt的细胞 SGC-7901细胞在75 cm培养瓶中培养,感染Ad-p27mt。温孵48 h后在0.5 g/L的胰酶中消化。收集细胞并在PBS液中冲洗两次。加PBS液调整细胞浓度至10⁹/L。取出100 μL细胞悬液与DNA-PREP™ LPR 200 μL混合。检测细胞周期和凋亡。Ad-LacZ组和正常空白组(无腺病毒感染)作为对照组。

1.2.5 DNA片段分析 SGC-7901感染Ad-p27mt和Ad-LacZ 48 h后离心去上清,在剩余细胞沉淀中加500 μL的细胞裂解液(10 g/L Np40, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5))和10 μL蛋白酶K。在56℃水浴中加热1-2 h,用苯酚和氯仿提取,然后用脱水酒精沉淀DNA。在700 mL/L酒精洗涤一次后加入200 μL TE。然后再加入RNA酶(最终浓度为50 mL/L),37℃下过夜。然后在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,在紫外灯下观察结果。

1.2.6 TUNEL法检测细胞凋亡 1×10⁴细胞悬液

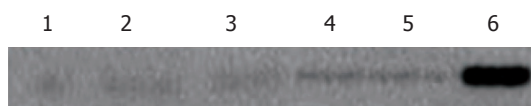


图1 Ad-p27mt Western blot检测结果. 1, 2: control; 3, 4: Ad-LacZ; 5, 6: Ad-p27mt; 1, 3, 5: 0 h; 2, 4, 6: 24 h.

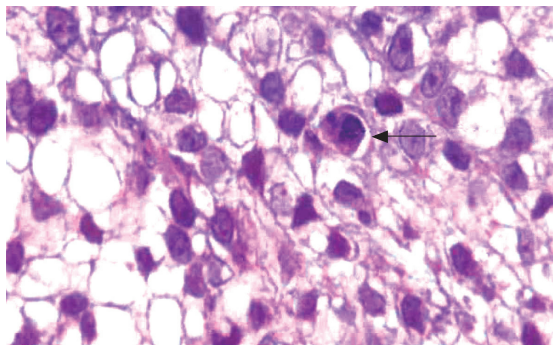


图2 TUNEL法在Ad-p27mt组中检测到细胞的凋亡。(←表示apoptotic cell).

在60 mm培养皿中温孵, 覆盖盖玻片(清洗并高温消毒). Ad-p27mt组和正常对照组每个均温孵6张玻片, 每张玻片温孵24 h. 然后将玻片取出, 用1×PBS液冲洗2次, 用甲醇: 冰醋酸(3:1)固定30 min. 根据按说明书操作, 每一玻片上计数1000个细胞, 计算平均凋亡细胞数目. 并按每100个癌症细胞多少凋亡细胞来计算凋亡指数.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件分析所有数据, 进行 t 检验, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 通过PCR技术辨识p27mt基因重组腺病毒 收集和溶解有病理反应的多药抗药性SGC-7901细胞及其培养液, 如此反复3次. 然后离心, 得到5 mL的悬浊液, 将其取出, 加入1 mg蛋白酶K, 10 g/L SDS, 10 mmol/L EDTA 和20 mmol/L Tris-HCl溶解. 等待2 h, 加入脱水酒精沉淀, 得到病毒DNA, 然后加入正逆转录引物, 开始进行PCR反应. 最后275 bp的目的基因得到放大, 并显示出重组腺病毒已经被成功导入p27mt基因.

2.2 X-gal染色已感染Ad-LacZ的SGC-7901细胞 通过X-gal染色来测量腺病毒介导的基因转换率. 结果显示: 只要MOI大于50, 感染效率就能接近100%. 这表明在体外实验中重组腺病毒可以有效的将基因转入SGC-7901细胞.

2.3 p27mt基因表达的检测结果 用重组腺病毒Ad-p27mt (MOI 100)感染SGC-7901细胞, 24 h后, 分析p27蛋白的表达量. 首先搜集细胞, 然后用1×

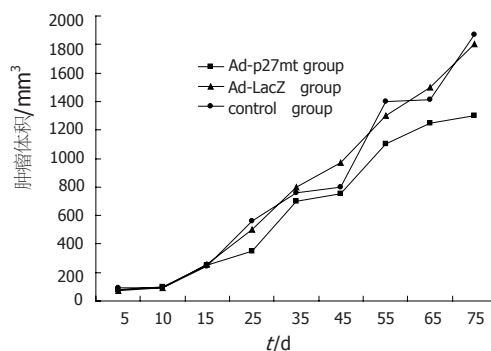


图3 人胃癌细胞株SGC-7901细胞株在裸鼠体内的生长曲线.

SDS×PAGE细胞溶解液加以溶解. 加热到100℃持续5 min, 离心, 取上清. 接着用Western blot测定蛋白. 在TMB染色后, 数据显示在Ad-p27mt组中有大量的27 kDa蛋白表达, 而在Ad-LacZ组和正常对照组中只检测到少量的蛋白表达(图1). 这表明在目前的实验中人类p27突变基因重组腺病毒可以在SGC-7901细胞中正确的表达并生成大量的相关蛋白.

2.4 流式细胞仪检测结果 三组SGC-7901细胞分别经过Ad-p27mt, Ad-LacZ和无病毒的处理, 24 h后, Ad-p27mt激发了胃癌细胞的程序性凋亡. 通过流式细胞仪测量, 重复6次. 亚二倍体的平均值分别是: Ad-p27mt组41.0%, Ad-LacZ组4.67%和未感染组1.96%. Ad-p27mt组比较Ad-LacZ组, Ad-p27mt组比较未感染组, $P<0.01$; Ad-LacZ组比较未感染组, $P>0.05$. 统计分析表明: 实验数据在Ad-p27mt组和Ad-LacZ组, 未感染组之间存在着显著性差异.

2.5 探测DNA片段结果 DNA电泳结果显示: 在Ad-LacZ组和正常对照组中基因条带是完整的, 而在Ad-p27mt组中却有明显180-200 bp的双重梯形带. 这跟典型的细胞凋亡变化是吻合的, 通过TUNEL法在Ad-p27mt组和Ad-LacZ组中分析细胞的程序性凋亡. 凋亡细胞的细胞核在显微镜下呈蓝色; 而在正常对照组中, 凋亡细胞的细胞核在显微镜下观测不到(图2).

2.6 裸鼠皮下种植的SGC-7901细胞随时间延长肿瘤体积的变化 转染Ad-p27mt的重组腺病毒感染人胃癌细胞株SGC-7901细胞, 绘制该细胞株在裸鼠体内的生长曲线, 并与对照组比较, 肿瘤生长曲线显示Ad-P27mt基因治疗组裸鼠体内肿瘤生长第20天后体积与生理盐水、Ad-LacZ对照组比较显著降低, 证实转染人Ad-P27mt基因的重组腺病毒对裸鼠体内人胃癌有显著抑制作用(图3).

表 1 Ad-p27mt对SGC-7901细胞周期的影响(mean \pm SD, %)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
未感染	25.29 \pm 1.04	41.12 \pm 1.19	33.34 \pm 1.55
Ad-lacZ	27.57 \pm 0.45	38.21 \pm 0.44	34.22 \pm 0.92
Ad-p27mt ^a	77.96 \pm 2.20	8.98 \pm 0.17	13.06 \pm 2.35

^a*P* < 0.05 vs Ad-LacZ组, 未感染组.

2.7 TUNEL法检测细胞凋亡 染色后的凋亡细胞核呈黑色或者棕黑色, 细胞质浓缩, 细胞皱缩. Ad-P27mt组和对照组的凋亡率分别是92.3% \pm 3.76%和2.01% \pm 0.15%, 两者比较具有显著差异 (*P* < 0.01), 且对裸鼠内人胃癌SGC-7901的细胞周期影响有差异 (*P* < 0.05).

SGC-7901细胞经不同处理后流式细胞仪检测细胞周期结果(表1). Ad-LacZ及空白对照组G₁/G₀期比例逐渐下降, S期比例上升, 表明G₀/G₁ \rightarrow S的过程非常迅速, 细胞增殖活跃. 而Ad-P27mt组G₁/G₀期比例较高, S期比例则下降, 与对照组相比差异有显著性 (*P* < 0.05), 细胞发生G₁期阻滞, 细胞增殖受到抑制. 流式细胞仪检测的对照组与Ad-P27mt组的凋亡峰见图4.

3 讨论

人突变基因p27表达蛋白是一种热稳定蛋白, 最早由Polyak *et al*^[4]在一项用TGF- β 研究细胞接触抑制的实验中发现. 1994年p27基因可以被克隆后, 人们发现p27主要抑制细胞周期因子E-CDK2复合体的活性, 同时也能抑制细胞周期因子D-CDK4和细胞周期因子A-DK2复合体. 另外, p27还能下调细胞周期因子B的表达. 由外源性信号诱导引起p27表达产物堆积导致细胞在G₀/G₁期停留与肿瘤生成和p27基因的转位, 缺失和突变以及p27的表达水平、蛋白活性相关^[5-6]. 如果p27mt的表达水平下调, 对细胞周期因子E-CDK2复合物的抑制作用也会下降, 从而使DNA损伤细胞能从G₁期直接进入S期.

p27蛋白的降解主要由受泛醌介导的第187位苏氨酸磷酸化引起的^[7-9]. Kudo *et al*^[10]发现如果p27表达受p27蛋白影响的话, 他会明显抑制细胞生长. 并且在p27突变型比在p27野生型的抑制效果更明显. 这种抑制作用是由于CDK的磷酸化位点受阻引起的. 构建携带p27mt的复制缺陷型重组腺病毒, 研究胃癌细胞株MNK45的凋亡, 我们希望能发现治疗胃癌的更有效的p27基因^[11]. Koguchi *et al*^[12]报道当腺病毒携带

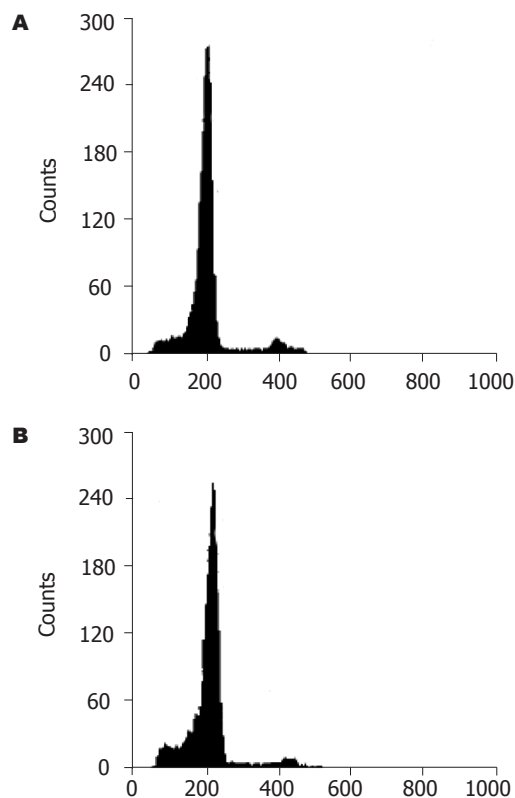


图 4 流式细胞仪检测的对照与Ad-p27mt的凋亡峰. A: 空白对照组; B: Ad-p27mt组.

的外源性基因p27转染星形胶质细胞后这些细胞的生存能力下降. Zhang *et al*^[13]报道由维甲酸诱导的p27表达上调能显著抑制卵巢肿瘤细胞的生长. Koh *et al*^[4]对来源于子宫颈鳞状肿瘤细胞的SUN-1066, SUN-1041, SUN-1076细胞系进行检测, 将这些细胞转染由重组腺病毒携带的p27kip1后发现, p27的高表达能提高表达这些细胞周期因子D1和细胞周期因子E增高, 同时肿瘤细胞的增殖明显受抑. 在该研究中, 细胞周期分析显示胃癌细胞主要停留在G₁-S相. 以上各项研究显示在肿瘤发生发展过程中p27是对肿瘤产生、进展和预后都具有十分重要影响的基因.

目前, 功能性重组抗肿瘤基因是肿瘤基因治疗的有效途径. Sasaki *et al*^[14]发现用腺病毒诱导的p27mt和p27wt转染胆管癌细胞系TFK-1和HuCCT-1, p27mt比p27wt有更强的促进凋亡和诱导细胞增殖作用. Park *et al*^[15-16]用腺病毒将p27mt和p27wt转染肺癌细胞株NCIH460, NCIH1264, NCIH358和NCIH15和胶质细胞系后也获得了相同的结果. 在我们的研究中, p27mt转染胃癌细胞系SGC-7901, 用p27mAb证实该基因的高表达, 结果显示携带重组p27mt的腺病毒能将目标基因导入源自人胃腺癌组织种植于裸鼠并能表达内

源性p27的肿瘤细胞内. 利用流式细胞仪, 在Ad-p27mt组中凋亡率上升至41.0%, 与对照组相比有显著差异. DNA分析显示存在180-200 bp的DNA梯度.

SGC-7901细胞用不同方法处理后检测各组细胞周期. 从表1中可见Ad-LacZ组和空白对照组G₀/G₁细胞数有所下降, 而S相细胞比率增高, 这一现象说明细胞周期各相的转化时间缩短, 细胞增殖活跃. 然而在Ad-P27mt组中G₀/G₁相细胞数增多, 细胞周期停顿在G₀/G₁相, 与空白组和Ad-LacZ对比具有显著差异. TUNEL法显示Ad-P27mt诱导裸鼠体内人胃癌细胞SGC7901的凋亡率达到92.4%, 并且与正常对照组相比具有显著差异. 以上结果说明p27基因与胃癌的发生具有密切相关性. 下调p27表达是细胞增殖失调和凋亡失调的主要原因. 利用p27mt上调p27的表达促进肿瘤细胞的凋亡, 从而形成一种新型的抗胃癌治疗途径. 细胞周期分析显示通过p27mt抑制细胞周期/CDK激酶的活性, 肿瘤细胞分裂中止于G₁期. Winteringham *et al*^[17]认为p27的积累在细胞增殖启动中对胃癌细胞周期的中止机制中起着重要作用. 但是其他一些在该过程中起作用的凋亡因子仍需要进一步探讨.

近期研究显示NM-3以及其他一些基因治疗能成功诱导胃癌细胞凋亡^[18-19], 但是在裸鼠胃癌模型中由Ad-p27mt导入腺病毒对裸鼠体内人胃癌细胞SGC-7901的分子凋亡作用尚未报道, 本研究提示重组腺病毒转染人p27基因具有显著抑制裸鼠体内人胃癌作用, 这一方法的有效性及凋亡机制为其治疗晚期胃癌提供了重要的实验依据.

4 参考文献

- Nan KJ, Jing Z, Gong L. Expression and altered subcellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor P27Kip1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1425-1430
- Bryja V, Pachernik J, Faldikova L, Krejci P, Pogue R, Nevrriva I, Dvorak P, Hampl A. The role of P27(Kip1) in maintaining the levels of D-type cyclins *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1691: 105-116
- Koh TY, Park SW, Park KH, Lee SG, Seol JG, Lee DW, Lee CT, Heo DS, Kim KH, Sung MW. Inhibitory effect of P27KIP1 gene transfer on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck* 2003; 25: 44-49
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. P27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22
- Bryja V, Cajanek L, Pachernik J, Hall AC, Horvath V, Dvorak P, Hampl A. Abnormal development of mouse embryoid bodies lacking P27Kip1 cell cycle regulator. *Stem Cells* 2005; 23: 965-974
- Liu E, Li X, Yan F, Zhao Q, Wu X. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J Biol Chem* 2004; 279: 17283-17288
- Takeda A, Osaki M, Adachi K, Honjo S, Ito H. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines. *Pancreas* 2004; 28: 353-358
- Guo W, Shang F, Liu Q, Urim L, West-Mays J, Taylor A. Differential regulation of components of the ubiquitin-proteasome pathway during lens cell differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1194-1201
- Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG Jr. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 2004; 428: 194-198
- Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. Transfection of P27(Kip1) threonine residue 187 mutant type gene, which is not influenced by ubiquitin-mediated degradation, induces cell cycle arrest in oral squamous cell carcinoma cells. *Oncology* 2002; 63: 398-404
- Hurteau JA, Brutkiewicz SA, Wang Q, Allison BM, Goebel MG, Harrington MA. Overexpression of a stabilized mutant form of the cyclin-dependent kinase inhibitor P27(Kip1) inhibits cell growth. *Gynecol Oncol* 2002; 86: 19-23
- Koguchi K, Nakatsuji Y, Nakayama K, Sakoda S. Modulation of astrocyte proliferation by cyclin-dependent kinase inhibitor P27(Kip1). *Glia* 2002; 37: 93-104
- Zhang D, Holmes WF, Wu S, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids and ovarian cancer. *J Cell Physiol* 2000; 185: 1-20
- Sasaki T, Katayose Y, Suzuki M, Yamamoto K, Shiraso S, Mizuma M, Unno M, Takeuchi H, Lee CT, Matsuno S. Adenovirus expressing mutant P27kip1 enhanced apoptosis against cholangiocarcinoma than adenovirus-P27kip1 wild type. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 68-75
- Park KH, Seol JY, Kim TY, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Lee CT. An adenovirus expressing mutant P27 showed more potent antitumor effects than adenovirus-P27 wild type. *Cancer Res* 2001; 61: 6163-6169
- Park KH, Lee J, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Kim SK, Wang KC, Cho BK, Lee CT. Application of P27 gene therapy for human malignant glioma potentiated by using mutant P27. *J Neurosurg* 2004 Sep; 101: 505-510
- Winteringham LN, Kobelke S, Williams JH, Ingley E, Klinken SP. Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* 2004; 23: 5105-5109
- Kawada M, Yoshimoto Y, Minamiguchi K, Kumagai H, Someno T, Masuda T, Ishizuka M, Ikeda D. A microplate assay for selective measurement of growth of epithelial tumor cells in direct coculture with stromal cells. *Anticancer Res* 2004; 24: 1561-1568
- Zhu JS, Shen B, Chen JL, Chen GQ, Yu XH, Yu HF, Zhu ZM. Molecular action mechanisms of NM-3 on human gastric cancer SGC-7901 cells *in vivo* or *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2366-2369

慢性丙型肝炎与代谢综合征

张锦前, 范小玲

■背景资料

自发现丙型肝炎病毒(HCV)后人们通过研究发现其感染除与肝脏损害及肝细胞癌有关之外, 还与肝外组织的损害表现密切相关。国内外已经进行了有关HCV感染与脂肪性肝病的大量临床和实验方面的机制研究, 认识到慢性丙型肝炎也是一种代谢性疾病。

张锦前, 范小玲, 北京地坛医院 北京市 100011

国家自然科学基金资助课题, No. 30600524

通讯作者: 张锦前, 100011, 北京市, 北京地坛医院。

jingwanghou@yahoo.com.cn

电话: 010-64211031-2457

收稿日期: 2006-09-03 接受日期: 2006-09-25

Relationship between chronic hepatitis C and metabolic syndrome

Jin-Qian Zhang, Xiao-Ling Fan

Jin-Qian Zhang, Xiao-Ling Fan, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Supported by National Science Foundation of China, No. 30600524

Correspondence to: Jin-Qian Zhang, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. jingwanghou@yahoo.com.cn

Received: 2006-09-03 Accepted: 2006-09-25

Abstract

Besides liver injury and hepatocellular carcinoma (HCC), hepatitis C virus (HCV) infection is also closely related with damages of extrahepatic tissues. Studies from home and abroad confirmed that fatty degeneration had been one of the pathogenic mechanisms of chronic hepatitis C, which suggested that chronic hepatitis C was a kind of metabolic disease. HCV is closely associated with metabolic syndrome. Fatty degeneration of liver and insulin resistance may be the central link in the HCV-induced metabolic syndrome, and the molecular mechanism is the virus-induced metabolic disorder of fat in liver. Further study is need in the future.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatitis C virus; Metabolic syndrome; Chronic hepatitis C

Zhang JQ, Fan XL. Relationship between chronic hepatitis C and metabolic syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3482-3486

摘要

丙型肝炎病毒感染除引起肝脏损害、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)有相关性

之外, 还与肝外组织的损害表现密切相关。国内外研究证实慢性丙型肝炎发病机制之一是肝脏脂肪变性, 提示是一种代谢性疾病, 丙型肝炎病毒与代谢综合征(metabolic syndrome, MS)密切相关, 肝脏脂肪变性及胰岛素抵抗可能是丙型肝炎病毒致代谢综合征的中心环节, 其分子生物机制可能是病毒致脂代谢紊乱, 但是其更加深入而确切的机制仍不完全知晓, 还有待深入研究。

关键词: 肝癌; 丙型肝炎病毒; 代谢综合征; 慢性丙型肝炎

张锦前, 范小玲. 慢性丙型肝炎与代谢综合征. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3482-3486

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3482.asp>

0 引言

自1989年发现丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)以来, 人们通过研究发现, HCV感染除引起肝脏损害并与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)有相关性外, 还与肝外组织的损害表现密切相关。近年来我们已经认识到肝脏脂肪变性是慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的发病机制之一, 这提示CHC也是一种代谢性疾病^[1]。随着代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的提出和诊断标准的确定, 认识到脂肪肝与高血糖是MS的部分表现。CHC合并脂肪肝和糖尿病的高发病率在国内外已有大量报道。大量的研究证实, HCV与MS密切相关, 肝脏脂肪变性及胰岛素抵抗可能是HCV引发MS的中心环节, 其分子生物机制是病毒致脂代谢紊乱。HCV慢性感染患者所伴有的非酒精性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)与MS有着极大的相关性, 而且也是进展至肝纤维化的危险因素。

1 代谢综合征(MS)

MS是多种病态组合现象的一个名称。随着生活方式和生活结构的明显变化, 主要是人体摄入

能量过多, 脂肪摄入比例增大, 活动量减少, 致使肥胖或超重、血脂紊乱、糖耐量异常及高血压的患病率显著增加. 这些成为一种因果关系的综合体, 被称之为MS. 这些病态现象常存于同一人, 且发现这类人群的一个主要病理生理基础是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 因此又称之为IR综合征^[2]. 这种病态现象随着年龄的增大, 发生率逐步增高. 目前, 随着人口平均寿命不断的增加(有些发达国家已到80岁), MS在老年人群中的发生率可高达70%以上, MS已成为普遍存在于人类的一个现象, 在我国MS的发病率为15.1%, 已经成为威胁人体健康的重要因素^[3-4].

虽然肥胖、糖代谢紊乱和高血压是MS的主要组成成分, 但MS并不等同于单纯的原发性高血压、糖尿病、血脂紊乱和肥胖症, 也不是几种疾病简单相加. 其可初步分为遗传相关性MS; 增龄性MS; 环境因素诱导性MS, 后者是构成MS患者群的主体; 甚至有学者认为2型糖尿病可能为MS的一个亚型. 1988年Reaven *et al*^[5]最早提出MS的概念. 但直到1999年WHO才公布了MS的诊断标准. 中华医学会糖尿病学分会参考国际标准, 结合国人的信息数据, 在2004年提出一个MS的建议诊断标准: 符合以下4个组成成分中的3个或全部者: (1)超重或肥胖: 体质量指数 $\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$; (2)高血糖: 空腹血糖 $\geq 6.1 \text{ mmol/L}$ 和/或餐后2 h血糖 $\geq 7.8 \text{ mmol/L}$, 和/或已确诊糖尿病并治疗者; (3)高血压: 收缩压/舒张压 $\geq 140/90 \text{ mmHg}$, 和/或已确诊为高血压并治疗者; (4)血脂紊乱: 空腹TG $\geq 1.70 \text{ mmol/L}$ 和/或空腹血HDL-C男 $<0.9 \text{ mmol/L}$, 女 $<1.0 \text{ mmol/L}$. MS的发病机制十分复杂, 遗传和环境因素的相互作用对MS发病有重要影响. 目前研究主要集中在以下几方面: (1)腹型肥胖和脂毒性的作用: 研究显示, 腹型肥胖和血脂代谢异常是MS的重要的病理生理基础, 也是导致IR重要原因. 也有学者认为仅用脂毒性作用解释MS的病理生理特征过于简单, 炎症反应、氧化应激、PPARs、AMPK、瘦素和皮质醇等也在MS发病中起重要作用. (2)IR: 传统上认为IR是MS的中心环节, 许多研究者认为, IR在MS发病机制上的重要性大于肥胖, 但区别二者的因果关系十分困难. 不同组织和不同病理状态下所产生的IR也有所区别, 在胰岛素敏感组织存在IR, 而胰岛素非敏感组织的胰岛素信号通路仍正常, 甚至作用增强. 因此, 对MS而言, 存在IR和胰岛素敏感共存现象.

目前有学者认为, 脂肪组织既是能量储存中心, 又具有强大的内分泌功能, 可分泌多种蛋白

激素如瘦素、脂联素、抵抗素(resistin)以及众多细胞因子(如TNF- α 、某些白介素)、血管活性分子(如血管紧张素原、PAI-1、NO)和脂质成分如游离脂肪酸(FFA)、前列环素等, 这些脂肪因子通过内分泌、旁分泌和自分泌途径参与维持机体众多生理功能, 包括调节胰岛素作用、糖脂代谢和能量平衡, 调节血管活性、血压、免疫、炎症反应及凝血机制, 共同维护内环境的稳定. 脂肪细胞释放FFA水平升高可致高胰岛素血症和IR已被证实. 近来有研究发现, 血液中的FFA增加可促进氧化应激和炎症反应. 内脏型肥胖时IR又进一步造成脂肪分解, FFA释放增加, 导致炎症和IR的恶性循环. 以脂肪因子为切入点MS的发病机制也已成为当前热点.

2 CHC与MS的关系

HCV感染, 除了与急性丙型肝炎、CHC, 肝纤维化(liver fibrosis, LF)、HCC的发生、发展密切相关之外, 还存在肝外临床表现或综合征, 这可能是机体异常免疫反应所致, 包括类风湿性关节炎、干燥性结膜角膜炎、扁平苔藓、肾小球肾炎、混合型冷球蛋白血症、B细胞淋巴瘤和迟发性皮肤卟啉症等. 说明HCV感染的致病机制与其他类型的肝炎病毒截然不同. 近年的研究证实, HCV感染与糖尿病的发生、移植后糖尿病、地中海贫血患者伴发糖尿病或糖代谢紊乱都有相关性.

HCV感染的一个重要的病理学特征是肝脏脂肪变, CHC患者存在IR. 而且, 美国AHA、心肺及血液研究所和ADA联合召开的顶级专家会议讨论后认为, IR是MS 3种可能的发病机制之一. 因此认为, CHC与MS可能存在较为密切的相关性. 从CHC患者的肝脏活检病理特点来看, 肝脏脂肪变是CHC的一个重要的病理学特征^[6-8]. Castera *et al*^[8-9]对于558例CHC患者进行分析, 发现54%CHC患者合并脂肪肝, 其中重度为10%, 是LF的独立相关因素. Jarmay *et al*^[10]对于114例CHC患者进行分析, 约74%CHC患者合并脂肪肝, 合并脂肪肝的患者血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平显著升高.

目前, HCV感染引起的肝脏脂肪变的分子生物学机制尚无定论, 但是推测HCV的结构蛋白和非结构蛋白对于肝脏细胞脂类代谢的干扰, 甚至是HCV RNA与肝细胞脂类代谢物质的结合, 可能是肝脏脂肪变形成的主要原因^[11-13]. 通过对重组的E1/E2包膜蛋白与LDL(低密度脂蛋白)、极低密度脂蛋白(VLDL)和高密度脂蛋白

■ 研发前沿

随着代谢综合征(MS)的提出和诊断标准的确定, 人们认识到脂肪肝与高血糖是MS的部分表现. 慢性丙型肝炎(CHC)合并脂肪肝和糖尿病的高发病率在国内外已有大量报道. HCV与代谢综合征密切相关, 肝脏脂肪变性及胰岛素抵抗可能是丙型肝炎病毒引发代谢综合征的中心环节.

■应用要点

目前HCV与脂质系统的关系的研究还刚刚开始,其相关作用关系及机制并不清楚,本文理顺了慢性丙型肝炎的一些研究成绩,总结之后有利于确定进一步的研究方向,并为相关疾病的治疗提供一定的依据。

(HDL)结合的分子特性进行的研究,得出这样的假设: HCV进入血液后与脂滴结合形成复合物,通过LDL受体(LDL-R)进入肝脏,进行复制,其产物与肝细胞中合成的载脂蛋白相互作用影响脂肪代谢,形成脂肪肝等病理表现^[14-17]。HCV可能通过其核心蛋白引起肝脏脂肪变性,而脂肪变性是CHC致肝脏损伤进展的主要因素。另外,近年以研究证实,在CHC患者的人群中存在血脂障碍、糖尿病及IR。国内研究报道,筛选HCV结构和非结构蛋白结合的肝细胞蛋白,证实HCV核心蛋白可以结合肝细胞中的两种载脂蛋白(APO-A1和APO-A2)之外,还可以结合人类胚胎载脂蛋白A1前体基因、载脂蛋白B-100等^[18-19]。同时还发现,80%的胚胎小鼠肝脏、诱导HCV结构基因表达的小鼠肝脏、肾脏等器官,都有不同程度的脂肪变性^[20-21]。提示, HCV感染引起的肝脏脂肪变具有其发病的分子生物学基础; HCV感染也可导致脂肪酸代谢失调,而FFA水平与MS有着重要的相关性。

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是指病理上与酒精性肝炎相类似但无过量饮酒史的临床综合征,患者通常存在IR及其相关代谢紊乱。当代谢性肝病的病理学特征不明或泛指整个脂肪性肝病类疾病时,通常使用NAFLD这一术语,后者尚包括单纯性肝脂肪变、脂肪变伴小叶内炎症但没有肝细胞气球样变和纤维化、孤立性门静脉周围纤维化、以及无明显脂肪性肝炎的隐源性肝硬化等情况^[22-25]。HCV可能通过其核心蛋白引起肝脏脂肪变性,而脂肪变性是CHC致肝脏损伤进展的主要因素。NASH有如下4步进展模式^[26]: (1)胰岛素促进的再次脂肪变性; (2)坏死诱导细胞内的脂肪毒性和脂肪酸过氧化反应; (3)大量脂肪酸从肝细胞中释放出后进入肝组织间质,并导致直接的和炎性肝门静脉系统损伤; (4)继发于萎缩的静脉堵塞以及最终的纤维分隔形成和纤维化^[27]。在CHC患者的人群中存在血脂障碍、糖尿病及IR。IR是CHC患者近期伴发NASH并且随之出现脂肪代谢受损的重要危险因素^[28]。在有关NAFLD的研究中发现, CHC患者伴发NAFLD与代谢综合征密切相关,而且是肝纤维化进展的危险因素。这些患者的肝纤维化进展与体质量、是否患糖尿病、是否存在肝细胞气球样变及其程度有关^[21]。肝脏脂肪变性的程度和肝脏纤维化及存在伴发的脂肪变性的程度之间的关系与纤维化的进展有关^[22]。MS与NAFLD密切相

关,当患者患有NAFLD时需要注意揭开代谢综合征的其他现象。相反,患有MS的患者必需进行肝脏疾病评估^[29-30]。

HCV患者易于发生II型糖尿病(diabetes mellitus, DM)的机制不明确, MS的发病机制亦不明确,但都有一个共同的现象: 即是患者存在IR。而IR可能是防止脂肪堆积的适应性机制,目前已证实IR是MS发病机制中相关因素的中心环节。IR诱导自由脂肪酸由脂肪组织中的流出并增加其在肝脏中的重新合成。而且更为重要的是,有证据证实HCV感染促进了IR的进展。IR和脂肪变性的相互影响非常明显, IR诱导自由脂肪酸由脂肪组织中的排出,并在肝脏组织增加脂肪酸的重新合成,并致甘油三酯在肝细胞内堆积。

临床流行病学资料显示, HCV感染是DM发生的重要危险因素之一。DM患者的HCV感染率增高,而CHC患者的DM发生率较高,认为HCV感染与DM之间高度相关,尤其是HCV 2a亚型的感染尤其如此。北京地坛医院曾对北京2303例慢性肝炎调查发现, 236例合并MD, 慢性肝炎患者发生DM的危险是普通人群的3倍。本组资料中, 糖尿病患者81.4%为HBV感染者, 6.4%为HCV感染者。结果提示, 糖尿病的发生可能与HBV感染和HCV感染有关。Arao *et al*^[31]报道, HCV基因3型和严重的LF是糖尿病发生的危险因素; 在糖尿病患者致死率的相关危险因素中肝硬化远远大于心血管疾病; 同时存在肝脏脂肪变性和糖尿病会促进LF的进展, 促发HCC和动脉硬化; 干扰素治疗可以改善糖耐量。他们认为, CHC引起糖尿病可能是以下3种机制: 胰岛素抵抗和脂肪变性; HCV直接导致胰岛细胞功能受损; 与HCV引发的自身免疫紊乱有关。台湾学者研究得出如下结论, 即台湾籍CHC患者中存在的肝脏脂肪变性与MS的特征密切相关^[3]。基因1型感染的患者与MS和胰岛素有关。HCV基因3型会引发与体质量指数无关的脂肪变性, 且与肝脏脂肪变性更相关。脂肪变性主要是HCV基因3型病毒引发的^[23]。在基因3型的患者中, 对抗病毒治疗的持续病毒应答反应可以改善肝脏的脂肪变性情况^[25]。

3 CHC合并MS的治疗

MS是一组复杂的代谢紊乱, 其病理生理学机制尚不完全清楚, 专家意见有3种可能: 肥胖和脂肪组织功能异常, IR, 一些独立危险因素的共聚, 如遗传和环境等因素都发挥作用。因此也应

有针对性的考虑多途径的联合治疗,即采用减肥、降血脂、降血压、控制血糖及改善IR等综合性治疗方法。但是,在CHC合并MS的患者的治疗方案中,要同时兼顾二者,避免和减少治疗中的相互矛盾和影响。认真评估所存在疾病的严重程度,合理选择和使用相应的药物^[32-33]。HCV与LDL、VLDL干扰脂肪代谢确是事实,今后可利用此种作用设计治疗方案,作为抗病毒治疗的补充。目前,已有人把HCV与脂类的关系应用于临床, Schettler *et al*^[34]用丙型肝炎病毒与载脂蛋白B(APO-B)结合的特性,以及H.E.L.P-LDL血浆置换术可以清除脂蛋白中的载脂蛋白B,应用这样的理论进行血浆置换,结果显示,HCV RNA明显减少,但是此种数量的减少不与LDL清除相关。CHC合并NAFLD的患者,应用病毒治疗后更可能出现病毒的无效应答。实验室研究已证实了在抗病毒治疗前治疗胰岛素抵抗及NAFLD的价值。

总之, HCV与脂质系统的关系的研究还刚刚开始,为什么HCV与脂质系统的关系如此密切,为什么HCV会利用宿主受体, LDL受体是不是HCV的真正受体,还是其受体中的一个, HCV对脂质代谢的影响到底有多大,是怎么影响的,有多少生物学、医学意义还不清楚。目前虽有这方面研究,但还处于初级阶段,还需加强。关于中西医结合治疗脂肪肝,我们国家也积累了一些经验,相信中西医结合进行肝脏脂肪变的治疗,也会进一步提高抗病毒治疗的疗效,最终提高CHC的治疗效果。既然肝脏脂肪变是CHC患者肝脏纤维化的独立相关因素,那么在抗肝脏脂肪变的治疗在预防肝纤维化方面的相关性,也是值得关注的问题。

研究者已认定了HCV与MS的相关性,但其更加深入而确切的机制仍不完全为我们所知晓,还有待我们共同努力研究。

4 参考文献

- 1 Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: Implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33: 145-150
- 2 Bahrami H, Daryani NE, Mirmomen S, Kamangar F, Haghpanah B, Djalili M. Clinical and histological features of nonalcoholic steatohepatitis in Iranian patients. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 27
- 3 Tsang SW, Ng WF, Wu BP, Chow DA, Li ET, Wong TC. Predictors of fibrosis in Asian patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 116-121
- 4 Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk

factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42: 44-52

- 5 Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607
- 6 成军. 慢性病毒性肝炎发病的分子生物学机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 125-128
- 7 Stephen Locarnini. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000; 15: 46
- 8 Castera L, Hezode, Roudot-Thoraval. Effect of antiviral treatment on evolution of over steatosis in patients with chronic hepatitis C: evidence for a role of hcv genotype3 in steatosis. 2003 EASL Conference Summary of Abstracts on Hepatitis C
- 9 Castera L, Chouteau P, Hezode C, Zafrani ES, Dhumeaux D, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus-induced hepatocellular steatosis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 711-715
- 10 Jarmay K, Karacsony G, Nagy A, Schaff Z. Changes in lipid metabolism in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6422-6428
- 11 Cortez-Pinto H. Concluding remarks: metabolic syndrome, liver and HCV. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 83-85
- 12 Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, Chen LS, Wu HM, Huang CC, Yen MF, Chen TH. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10). *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 794-799
- 13 Sanyal AJ, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Stravitz RT, mLLS AS. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2064-2071
- 14 Sanyal AJ. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C--risk factors and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 48-51
- 15 Liu CJ, Jeng YM, Chen PJ, Lai MY, Yang HC, Huang WL, Kao JH, Chen DS. Influence of metabolic syndrome, viral genotype and antiviral therapy on superimposed fatty liver disease in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2005; 10: 405-415
- 16 Smith AD. The liver in metabolic syndrome. *J R Soc Med* 2005; 98: 336
- 17 Yoon EJ, Hu KQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int J Med Sci* 2006; 3: 53-56
- 18 钟彦伟, 成军, 陈新华. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒NS5A抗原模拟表位. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 133-136
- 19 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV核心蛋白结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 86-88
- 20 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1022-1026
- 21 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒脂肪变的临床与病理学特点. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1009-1013
- 22 Patton HM, Patel K, Behling C, Bylund D, Blatt LM, Vallee M, Heaton S, Conrad A, Pockros PJ, McHutchison JG. The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*

■同行评价

在我国,慢性乙、丙型肝炎的发病率,对人民健康和国民经济的影响具大,相关的研究意义深远,丙型肝炎合并代谢综合征方面的临床及机制研究刚刚起步,更具研究前景。这些研究不仅对于相关疾病的预防、诊断、治疗和相关影响及联系等方面有着指导意义,也为我国相关的研究弥补一定的空白。

- 2004; 40: 484-490
- 23 Hezode C, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES, Dhumeaux D, Pawlotsky JM. Different mechanisms of steatosis in hepatitis C virus genotypes 1 and 3 infections. *J Viral Hepat* 2004; 11: 455-458
- 24 Lonardo A, Adinolfi LE, Loria P, Carulli N, Ruggero G, Day CP. Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extra-hepatic disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 586-597
- 25 Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38: 1008-1017
- 26 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379
- 27 Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35: 367-372
- 28 Scheen AJ, Luyckx FH. Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance: interface between gastroenterologists and endocrinologists. *Acta Clin Belg* 2003; 58: 81-91
- 29 Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA* 2003; 289: 3000-3004
- 30 Mattar SG, Velcu LM, Rabinovitz M, Demetris AJ, Krasinskas AM, Barinas-Mitchell E, Eid GM, Ramanathan R, Taylor DS, Schauer PR. Surgically-induced weight loss significantly improves non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Ann Surg* 2005; 242: 610-7; discussion 618-620
- 31 Arao M, Murase K, Kusakabe A, Yoshioka K, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Tagaya T, Yamanouchi K, Ichimiya H, Sameshima Y, Kakumu S. Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2003; 38: 355-360
- 32 Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-1119
- 33 Hickman IJ, Clouston AD, Macdonald GA, Purdie DM, Prins JB, Ash S, Jonsson JR, Powell EE. Effect of weight reduction on liver histology and biochemistry in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2002; 51: 89-94
- 34 Schettler V, Monazahian M, Wieland E, Ramadori G, Grunewald RW, Thomssen R, Muller GA. Reduction of hepatitis C virus load by H.E.L.P.-LDL apheresis. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 154-155

电编 李琪 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 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2007-05月上旬在山东省济南市召开第七次全国消化系疾病学术会议。现将会议的征文内容及有关事项通知如下。

1 征文内容

消化系统疾病的流行病学、基础及临床(包括内镜诊断和治疗)研究。因会议论文交流将按下列组别进行分会场交流, 故务必请在下列8个组别中选择1个您认为适合的交流组别, 并在论文摘要的右下角上标明。(1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性疾病; (7)胃肠激素; (8)其他。

2 征文要求

请提供800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者的姓名、单位和邮政编码。并提供电脑打印稿(附软盘), 经所在的单位审查盖章后寄至中华医学会学术会务部刘亚君收(北京东四西大街42号 邮编 100710), 信封上请注明会议名称。请最好同时通过本次会议专用网站(网址: www.assimilation2007.com)邮寄电子文稿和报名。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理。截稿日期: 2007年2月28日(以当地邮戳为准)

蓝氏贾第鞭毛虫感染的免疫学诊断方法

卫茹, 田喜凤, 阎静波, 杨志宏

卫茹, 田喜凤, 杨志宏, 华北煤炭医学院生物科学系病原生物学学科 河北省唐山市 063000
阎静波, 华北煤炭医学院基础系病理学学科 河北省唐山市 063000
国家自然科学基金资助课题, No. 30670224
通讯作者: 田喜凤, 063000, 河北省唐山市, 华北煤炭医学院生物科学系病原生物学学科, jean1957@sina.com
电话: 0315-3726332
收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-09-28

Immunological diagnosis of *Giardia lamblia* infection

Ru Wei, Xi-Feng Tian, Jing-Bo Yan, Zhi-Hong Yang

Ru Wei, Xi-Feng Tian, Zhi-Hong Yang, Division of Pathogenic Biology, Department of Biological Science, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Jing-Bo Yan, Division of Pathology, Department of Basic Medicine, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30670224
Correspondence to: Xi-Feng Tian, Division of Pathogenic Biology, Department of Biological Science, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China. jean1957@sina.com
Received: 2006-09-08 Accepted: 2006-09-28

Abstract

Giardia lamblia infection causes diarrhea in human beings and other mammals, and it is attracting more and more attention in recent years. In this article, we reviewed immunological methods for the diagnosis of *Giardia lamblia* infection, compared the advantages and disadvantages of several diagnostic approaches, and briefly introduced some commercial kits, which would bring lots of conveniences to clinical diagnosis, therapy, and prognosis of Giardiasis.

Key Words: Immunological diagnosis; *Giardia lamblia*; Infection

Wei R, Tian XF, Yan JB, Yang ZH. Immunological diagnosis of *Giardia lamblia* infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(36):3487-3492

摘要

蓝氏贾第鞭毛虫感染可引起人及其他哺乳动

物腹泻。近年来, 贾第虫病的严重性和危害性日益受到重视。本文对蓝氏贾第鞭毛虫感染的免疫学诊断方法研究进行了综述, 比较了各种方法的优缺点, 简要介绍了一些商品化试剂盒的使用情况。贾第虫病免疫学诊断方法的应用, 对贾第虫病的临床诊断、治疗、预后将带来极大的方便。

关键词: 蓝氏贾第鞭毛虫; 免疫学诊断; 感染

卫茹, 田喜凤, 阎静波, 杨志宏. 蓝氏贾第鞭毛虫感染的免疫学诊断方法. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3487-3492
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3487.asp>

0 引言

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*), 简称贾第虫, 是一种引起人及其他哺乳动物腹泻的机会性致病寄生虫。无论在工业发达国家或发展中国家均有本虫的广泛流行^[1]。在美国将贾第虫称为“头号肠道寄生虫”, 该国的一项调查估计每年有 2.8×10^6 人感染蓝氏贾第鞭毛虫^[2]。在意大利研究表明感染蓝氏贾第鞭毛虫可加重肠易激综合征^[3]。法国则发现肠源性脂肪代谢障碍的发病与其有关^[4]。在发展中国家, 感染人数估计为2.5亿^[5]。本虫在我国的流行也相当广泛, 感染率各地区不等, 约在1%-10%左右^[6]。其滋养体引起的贾第虫病已被列为全世界危害人类健康的十种主要寄生虫病之一^[7]。最新研究证明, 蓝氏贾第鞭毛虫合并HIV/AIDS的感染, 及其在同性恋者中流行的报道不断增多^[8]。本病除地方性流行、暴发外, 在旅游者中感染也甚常见, 故有“旅游者腹泻(traveller's diarrhea)”之称^[9]。因此, 贾第虫病的严重性和危害性日益受到重视。本文就近年来贾第虫病的免疫学诊断方法的研究综述如下。

1 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)

1.1 检测抗原 ELISA是免疫学试验中应用最普遍、适用范围最广的一种免疫酶标记检测技术^[10-11]。检测贾第虫抗原的敏感性为100%、特

■背景资料

蓝氏贾第鞭毛虫寄生于人和哺乳动物的小肠, 引起以腹泻为主要症状的贾第虫病(giardiasis), 贾第虫病呈世界性分布, 是最常见的胃肠道寄生虫。贾第虫病的诊断主要是通过粪便检查, 免疫学诊断方法为贾第虫病的流行病学调查、疗效考核、感染源的筛查提供了捷径。

■ 研发前沿

贾第虫病的诊断主要是通过粪便检查,但费时费力,而且对操作人员的技术水平要求较高,故免疫学诊断方法对于贾第虫病的易感人群,尤其是免疫力低下的患者(如儿童、老人、AIDS等)的诊断、治疗、预后及随访有很大帮助,目前国外已研发出许多商品化的试剂盒更方便、快速。

异性为91.67%(Ali *et al*, 2003)^[12]. 该检测法与患者粪便中包裹的计数、粪便的性状(血便、黏液便、脂肪泻)及年龄无显著的相关性,却与恶心、腹胀、腹痛、腹泻、食欲减退、体重减轻、乏力(除外呕吐及便秘)等消化道症状呈正相关,贾第虫包裹在稀质粪便中计数较高^[13-14].

Nakaya *et al*^[15]用哥伦比亚贾第虫病患者粪便中的包裹(包裹经蔗糖梯度离心法提纯)和感染贾第虫的长爪沙鼠体内的滋养体,接种家兔以获得不同阶段的抗贾第虫IgG抗体(经正辛酸和硫酸铵沉淀法纯化)用于检测患者粪便中的抗原. 该法捕获贾第虫抗原最适多克隆抗体浓度为40克/毫升,最适的稀释倍比浓度为1:100,消光值(OD)为0.24^[16-17]. 对196份患者粪便样本的寄生虫学检验,69份粪便样本中查到了贾第虫包裹,56份粪便样本中未见贾第虫包裹,71份粪便样本中可见其他寄生虫,其敏感性为100%(95% CI: 93.4-100%);特异性为95% (95% CI: 88.6-97.6%);阳性预测(价)值为91% (95% CI: 81.4-95.9%);阴性预测(价)值为100% (95% CI: 96.1-100%)^[15]. 故认为ELISA法可提高诊断贾第虫的阳性率,并且可用于贾第虫治疗后的随访^[18-20].

1.1.1 斑点-ELISA (DOT ELISA) 以硝酸纤维素(NC)多孔薄膜作为固相载体,预先将贾第虫抗体点涂于NC膜上,以吸附粪便样本中的抗原,阳性反应在NC膜上呈现有色斑点,阴性对照为无色. Rashid *et al*用DOT-ELISA法检测200名1-13岁的埃及患儿(主要是腹痛、腹泻、食欲减退、体重减轻和维生素缺乏等相关症状),其阳性率为24.5%、敏感性为100%、特异性为93.8%^[21]. 该法操作简单、反应快速、肉眼判断结果、直观且可保留结果以利复查,适于现场调查.

1.1.2 双抗体夹心法-ELISA (double antibody sandwich ELISA) 应用色谱仪纯化抗溶组织阿米巴、贾第虫、隐孢子虫的抗血清,检测埃及90名患者粪便样本中相应的抗原. 40名年龄相近的对照组中,20名是其他寄生虫的感染者(阳性对照组),另20名为无肠道寄生虫感染者(阴性对照组). 该法检测溶组织阿米巴和贾第虫感染的阳性率为100%,隐孢子虫感染的阳性率为96.6%,检测溶组织阿米巴、贾第虫、隐孢子虫粪抗原的假阳性例数分别为5(87.5%)、3(92.5%)、2(95%)^[22]. 粪抗原的平均值水平随感染的症状加重而增加,而与年龄无明显相关性^[23].

1.1.3 抗原捕获法-ELISA (antigen-capture ELISA) 贾第虫的病原学诊断是在显微镜下查

到贾第虫的包裹或滋养体,此法费时费力,而且对操作人员的技术要求也较高,容易漏检^[24]. Jelinek *et al*^[25]分别用显微镜(铁苏木素染色和SAF浮聚法)和ELISA试剂盒检测795名德国慕尼黑患者的粪便样本,以便了解海外旅游者中贾第虫病的患病率,其中74位患者确诊为贾第虫感染. ELISA试剂盒(95.5%)较显微镜检查(81.8%)更具敏感性,其特异性为99.7%. 因此,抗原捕获法-ELISA试剂盒对于贾第虫感染的一次粪便样本的阳性诊断率较高,而在一次粪便显微镜检查结果阴性时并不能排除贾第虫感染的可能性,故增加粪便显微镜检查的次数(至少3次)方可提高阳性诊断率^[26]. 但是,由于ELISA试剂盒不能检测出潜在病原体,因此他并不能取代寄生虫显微镜检法.

1.2 检测抗体

1.2.1 IgG 检测血清中的特异性IgG抗体可作为辅助诊断方法^[27]. 用ELISA法和间接免疫荧光抗体法检测巴西日托中心147名0-6岁年龄组的儿童的滤纸血样和每名儿童的三份粪便样本(每份粪便样本独立包装,并经自然沉淀法和硫酸锌漂浮法处理),其中,93名儿童的粪便样本查到贾第虫包裹. ELISA法在100(68%)份血清样本中测得抗贾第虫IgG抗体(其中粪检阳性病例为67,粪检阴性病例为33),间接免疫荧光抗体法在93(63.3%)份血清样本中测得抗贾第虫IgG抗体(其中粪检阳性病例为76,粪检阴性病例为17). ELISA法和间接荧光抗体法检测贾第虫抗体的敏感性分别为72%和82%,而间接荧光抗体法的特异性(70%)强于ELISA法(39%). 对于三份粪检贾第虫包裹均阴性的儿童,ELISA法有一定的假阳性率^[28]. 在贾第虫病的流行区内,对于那些无临床表现的大部分患者,间接荧光抗体法的检出率较ELISA法高,与显微镜检结果相符,与十二指肠引流液检查的符合率可达100%,此法一般只适用于个例的诊断,不能替代病原检查;而ELISA法一般只作为临床辅助诊断,更适宜于流行病学调查^[29].

1.2.2 IgA 应用ELISA法检测患者唾液内特异性抗贾第虫IgA抗体也可作为一种诊断贾第虫感染的筛选方法^[30-32]. 对36名以腹泻为主要症状的埃及患者粪便样本同时进行直接涂片检查和十二指肠引流液检查,其中94.4%粪检贾第虫阳性患者的唾液内可测得特异性的抗贾第虫IgA抗体,33.3%粪检贾第虫阴性患者的唾液内可测得特异性的抗贾第虫IgA抗体. 十二指肠引流液检查为

阴性患者的唾液内均未测得特异性的抗贾第虫IgA抗体^[33]. 对于有长期(>1 mo)持续症状的患者, ELISA法检测特异性的抗贾第虫IgA抗体适用于贾第虫病的普查^[34-35].

2 免疫荧光抗体测定法 (IFA)

2.1 直接荧光抗体测定法(DFA) 为了确定贾第虫病的发病率和临床特点, Morimoto *et al*^[36]用直接涂片显微镜法、直接荧光抗体测定法和Kohn's一步染色法检测了Kochi医学院附属医院1790名患者的粪便, 17(0.95%)名患者的粪便中测得贾第虫包囊. 这些患者多为中老年群体(41-79岁), 并且大多数(除外2例)无海外旅游史. 因此, 寄生虫感染的诊断更多依靠实验室粪便的检查, 以排除可引起感染的寄生虫包囊携带者^[37-39].

直接荧光抗体测定法对保存在5℃的冷藏室中的14份粪便样本, 保存在零下20℃的冰箱中9份粪便样本, 保存在常温3.9%甲醛溶液(formalin-saline solution)中28份粪便样本中的贾第虫包囊均可测得. 而直接涂片法检测到在冰箱中保存的粪便样本中的贾第虫包囊的阳性率为56%, 检测到冰冻粪便样本中的贾第虫包囊的阳性率为93%, 检测保存超过24 mo粪便样本中的贾第虫包囊为阴性^[40]. 直接荧光抗体测定法检测长期保存的粪便样本中的贾第虫包囊是一种有效的方法^[41-43].

2.2 免疫磁性分离法-间接荧光抗体测定法(IMS-IFA) 近年来出现了一些新的检查方法, Souza *et al*首次报道了IMS-IFA检测人体粪便中贾第虫包囊, FAUST *et al*和Lutz寄生虫学检验技术的检测结果作为对照^[44]. 粪便样本固定在醋酸钠醋酸甲醛(formalin-sodium acetate-acetic acid, SAF)溶液中, 室温20℃保存不超过4 mo. 对127份粪便样本检测结果为, IMS-IFA检测贾第虫包囊的阳性检出率为27.5%, FAUST和Lutz寄生虫学检验技术检测贾第虫包囊的阳性检出率为15.7%. IMS-IFA较FAUST和Lutz寄生虫学检验技术检测粪便中贾第虫包囊具有更高灵敏度. IMS-IFA可同时检测多份粪便样本, 缩短样本保存的时间, 并可增加贾第虫包囊的回收率^[45].

3 酶免疫测定法(EIA)

EIA试剂盒可用于检测粪便样本中贾第虫和溶组织内阿米巴原虫^[46-47]. Schunk *et al*^[48]从德国慕尼黑大学附属医院门诊患者收集了276份粪

便样本, 以显微镜检查的结果作为参考标准时, EIA试剂盒检测贾第虫的敏感性为100%、特异性为99.6%, 检测溶组织内阿米巴原虫的敏感性为81.8%、特异性为99.2%. 两种检查方法与其他肠道内寄生原虫无交叉反应^[48-49]. 由于其他潜在病原体的存在, 所以该法并不可以取代显微镜检法, 但EIA试剂盒可能会成为一种非常有效且有价值的诊断辅助方法^[50-52].

实际上, 对于无症状的贾第虫感染者和个别有阳性体征贾第虫感染的患者EIA试剂盒的敏感性差别不大(77/83%). 无论对于有贾第虫感染阳性体征的患者(83/75%), 无症状地感染贾第虫的患者(77/61%), 还是对总体(80/67%)来说, 使用EIA试剂盒检测单份粪便样本的敏感性均较高^[53]. 为了使贾第虫感染诊断的敏感性大于90%, 常规寄生虫学检查和EIA试剂盒并用是必要的^[54-56].

4 试剂盒

目前已有不少检测蓝氏贾第虫的诊断试剂盒供市售. 由于在蓝氏贾第虫感染流行的地区, 常伴有诸如溶组织内阿米巴、隐孢子虫等肠道原虫的感染, 因而研究者和生产厂商常将诊断试剂盒设计成可同时诊断多种肠道原虫感染.

4.1 贾第虫/隐孢子虫快速检测试剂盒(Color PAC) 全称Color PAC复合快速固相定性免疫层析实验(Color PAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay), 为美国Becton Dickinson公司产品, 可同时检测蓝氏贾第虫和隐孢子虫的感染, 完成整个实验约需10 min. 检测蓝氏贾第虫的敏感性和特异性均为100%, 检测隐孢子虫的敏感性和特异性分别为97.6%和100%^[57]. Color PAC快速检测试剂盒虽然不能替代常规粪便中虫卵和寄生虫的检查, 但在蓝氏贾第虫和隐孢子虫感染的确诊中是非常有用的.

4.2 贾第虫/隐孢子虫微量检测试剂盒(ProSpecT) ProSpecT Giardia/Cryptosporidium Microplate Assay系美国Alexon公司生产, 可同时检测蓝氏贾第虫和隐孢子虫, 检测蓝氏贾第虫的敏感性和特异性分别为94%和100%, 检测隐孢子虫的敏感性和特异性分别为97%和100%^[58-61]. 当被检测的粪便样本中有血时, ProSpecT试剂盒有一定的假阳性率^[62-63].

4.3 Color PAC与ProSpecT比较 应用Color PAC试剂盒检测241份粪便样本, 贾第虫感染阳性

■应用要点

本文对每一种免疫学诊断方法进行细致的评价, 以便对不同的发病群体、不同的卫生环境使用比较灵敏的检查方法.

者53例, 隐孢子虫感染阳性者90例. ProSpecT试剂盒检测56例贾第虫感染阳性者, 93例隐孢子虫感染阳性者. 两种试剂盒检测贾第虫感染阳性符合率为98.7%, 隐孢子虫感染阳性符合率为98.1%^[64-65]. 在使用中Color PAC试剂盒较ProSpecT试剂盒更简便、快速, 但价格较高^[66-67].

4.4 寄生虫酶免疫测定筛选膜(Triage) 全称为Triage寄生虫膜上酶免疫(triage parasite panel enzyme immunoassay), 是一种新的定性酶免疫测定方法, 由美国BIOSITE Diagnostics公司生产. 原理为用已知的抗体捕获特定抗原并固定在膜上, 完成每人份粪便样本的检测约需15 min^[68]. 值得注意的是Triage试剂盒所需的粪样必须是新鲜粪便及其立即冻存者, 否则影响结果的判读. 检测444份粪便样本, 贾第虫感染阳性170例, 敏感性和特异性分别为95.9%和97.4%, 阴性预测值(NPV)为97.4%; 溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴感染阳性99例, 敏感性和特异性分别为96.0%和99.1%, 阴性预测值(NPV)为98.8%; 微小隐孢子虫感染阳性60例, 敏感性和特异性分别为98.3%和99.7%, 阴性预测值(NPV)为99.7%^[69]. 在粪样中同时检测贾第虫、溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴、微小隐孢子虫感染时, Triage试剂盒是一种简便、可供选择的方法^[68].

4.5 贾第虫/隐孢子虫免疫快速检测卡(ImmunoCard STAT) ImmunoCard STAT Cryptosporidium/Giardia rapid assay实质上是使用快速固相定性免疫层析法同时检测蓝氏贾第虫和隐孢子虫, 产于美国Meridian Bioscience的一种试剂盒, 要求在12 min内完成对未经浓缩固定在甲醛溶液中每份粪便样本的检测. 检测170份已知贾第虫阳性标本结果为159份, 敏感性和特异性分别为93.5%和100%, 阳性预测值(PPV)为100%, 阴性预测值(NPV)为95.5%, 感染数量较少(免疫荧光测定法仅见10-100个包裹)的7份粪便样本和3份仅有滋养体的粪便样本呈假阴性, 但1份呈假阴性的粪便样本却含有大量包裹. 感染数量较少的粪便样本呈现假阴性说明该试剂盒的敏感性受到一定的限制, 却无法解释含有大量包裹的呈假阴性粪便样本反复检测仍呈假阴性的结果, 该作者认为这份粪便样本在固定前经过了不适的处理或使用了不适的固定液^[70].

总之, 贾第虫病的首选诊断方法仍是粪便涂片检查. ELISA法适于贾第虫病的血清流行病学调查、疗效考核及防治结果的检测. DFA可以检

测到在不同环境保存且已发生形状改变的粪便样本中的贾第虫包裹. IFA操作简便, 可用于特异性抗原的检查与定位. 试剂盒可同时检测贾第虫等其他肠道原虫的感染, 也可对水源及其他污染源进行筛查. 贾第虫病的免疫学诊断方法较多, 而且其敏感性和特异性均较高, 对贾第虫病的临床诊断、治疗、预后带来了极大的方便.

5 参考文献

- 1 田喜凤, 卢思奇. 蓝氏贾第鞭毛虫细胞骨架的研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1434-1436
- 2 Ali SA, Hill DR. Giardia intestinalis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 453-460
- 3 Nakaya Y, Shiota S, Sakamoto K, Iwase A, Aoki S, Matsuoka R, Tei Y, Okada Y, Miyake Y. Double infection with Giardia lamblia and Salmonella paratyphi A associated with acute renal failure. *Intern Med* 1998; 37: 489-492
- 4 Fenollar F, Lepidi H, Gerolami R, Drancourt M, Raoult D. Whipple disease associated with giardiasis. *J Infect Dis* 2003; 188: 828-834
- 5 Tian XF, Lu SQ, Liu YM, Wang FY, Huang S. Effect of dihydroartemisinin on ultrastructure of Giardia lamblia in vitro. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2005; 23: 292-295
- 6 田喜凤, 卢思奇, 尚红伟, 王凤云. 双氢青蒿素对体外蓝氏贾第鞭毛虫滋养体细胞骨架的损伤作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1977-1981
- 7 Sandhu H, Mahajan RC, Ganguly NK. Flowcytometric assessment of the effect of drugs on Giardia lamblia trophozoites in vitro. *Mol Cell Biochem* 2004; 265: 151-160
- 8 Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of Giardia lamblia. *Int J Parasitol* 2003; 33: 3-28
- 9 李雍龙. 人体寄生虫学. 第六版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 53
- 10 Goncalves ML, Araujo A, Duarte R, da Silva JP, Reinhard K, Bouchet F, Ferreira LF. Detection of Giardia duodenalis antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 640-643
- 11 Aldeen WE, Carroll K, Robison A, Morrison M, Hale D. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Giardia lamblia in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1338-1340
- 12 Handoussa AE, Helmy MM, Hussein EM, El-Nimr HI. Degree of symptoms versus copro-antigen levels in Giardia lamblia infection. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 69-81
- 13 Guerreiro NM, Herrera PM, de Escalona L, de Kolster CE, de Yanes VG, de Febres O, Naveda O, de Naveda M. Giardia lamblia: comparison of two diagnostic methods and evaluation of response to treatment with metronidazole. *GEN* 1991; 45: 105-110
- 14 Sanad MM, Darwish RA, Nasr ME, el-Gammal NE, Emara MW. Giardia lamblia and chronic gastritis. *J Egypt Soc Parasitol* 1996; 26: 481-495
- 15 Duque-Beltran S, Nicholls-Orejuela RS, Arevalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James MA. Detection of Giardia duodenalis antigen

- in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 1165-1168
- 16 Itoh N, Muraoka N, Saeki H, Aoki M, Itagaki T. Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 717-718
 - 17 Decock C, Cadiergues MC, Larcher M, Vermot S, Franc M. Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs. *Parasite* 2003; 10: 69-72
 - 18 Andersson M, Ronnmark J, Arestrom I, Nygren PA, Ahlborg N. Inclusion of a non-immunoglobulin binding protein in two-site ELISA for quantification of human serum proteins without interference by heterophilic serum antibodies. *J Immunol Methods* 2003; 283: 225-234
 - 19 Soliman MM, Taghi-Kilani R, Abou-Shady AF, El-Mageid SA, Handousa AA, Hegazi MM, Belosevic M. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 232-239
 - 20 Bisoffi Z, di Tommaso M, Ricciardi ML, Majori S, Campello C. Evaluation of a commercially available ELISA for detection of *Giardia lamblia* antigen in faeces: preliminary results in unconventional samples. *Eur J Epidemiol* 1995; 11: 703-705
 - 21 Rashid SM, Nagaty IM, Maboud AI, Fouad MA, Shebl A. Comparative study on ELISA, IFA and direct methods in diagnosis of giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 2002; 32: 381-9, 1 p following 389
 - 22 Hassan MM, Afify H, Abdel-Ghaffar M, Dyab AK, Hassounah O, el-Badrawy el-SM, Salaeh A, Gabe O, Dawood MM. Detection of *E. histolytica*, *G. lamblia* and *Cryptosporidium* copro-antigens in stool samples. *J Egypt Soc Parasitol* 2002; 32: 191-200
 - 23 Torres D, Fernandez M, Brito T, Finlay C. Solid-phase immunoenzyme assay for detecting *Giardia lamblia* antigens. *Rev Cubana Med Trop* 1997; 49: 52-58
 - 24 Lascrain-Ledesma R, Mora-Jaen ME, Acosta-Altamirano G, Santos-Preciado JL. The prevalence of antibodies against *Giardia lamblia* in umbilical cord serum and in maternal peripheral blood. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993; 50: 27-31
 - 25 Jelinek T, Peyerl G, Loscher T, Nothdurft HD. Giardiasis in travellers: evaluation of an antigen-capture ELISA for the detection of *Giardia lamblia*-antigen in stool. *Z Gastroenterol* 1996; 34: 237-240
 - 26 Addiss DG, Mathews HM, Stewart JM, Wahlquist SP, Williams RM, Finton RJ, Spencer HC, Juranek DD. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1137-1142
 - 27 Velazquez C, Beltran M, Ontiveros N, Rascon L, Figueroa DC, Granados AJ, Hernandez-Martinez J, Hernandez J, Astiazaran-Garcia H. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol* 2005; 27: 351-356
 - 28 Guimaraes S, Sogayar MI. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev Saude Publica* 2002; 36: 63-68
 - 29 Hernandez JF, Duque S, Arevalo A, Guerrero R, Nicholls RS. Identification of antigens of Colombian *Giardia duodenalis* isolates recognized by total IgG and subclasses. *Biomedica* 2003; 23: 263-273
 - 30 Rodriguez OL, Hagel I, Gonzalez Y, Roque ME, Vasquez N, Lopez E, Di Prisco MC. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *J Trop Pediatr* 2004; 50: 68-72
 - 31 Tellez A, Palm D, Weiland M, Aleman J, Winiecka-Krusnell J, Linder E, Svard S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. *Parasite Immunol* 2005; 27: 163-169
 - 32 Granot E, Spira DT, Fraser D, Deckelbaum RJ. Immunologic response to infection with *Giardia lamblia* in children: effect of different clinical settings. *J Trop Pediatr* 1998; 44: 241-246
 - 33 Shatla HM, el-Hodhod MT, Mohsen DM, Salah el-Din MY. Potential diagnosis of *Giardia lamblia* infection through specific antibody detection in saliva. *J Egypt Soc Parasitol* 2004; 34: 621-630
 - 34 Stager S, Muller N. *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect Immun* 1997; 65: 3944-3946
 - 35 Yanke SJ, Ceri H, McAllister TA, Morck DW, Olson ME. Serum immune response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs. *Vet Parasitol* 1998; 75: 9-19
 - 36 Morimoto N, Komatsu C, Kataoka H, Ogura K, Sugiura T. Incidence and clinical features of *Giardia lamblia*. *Rinsho Byori* 2003; 51: 633-636
 - 37 Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1942-1943
 - 38 Aziz H, Beck CE, Lux MF, Hudson MJ. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. *Clin Lab Sci* 2001; 14: 150-154
 - 39 Karanis P, Opiela K, Al-Arousi M, Seitz HM. A comparison of phase contrast microscopy and an immunofluorescence test for the detection of *Giardia* spp. in faecal specimens from cattle and wild rodents. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 250-251
 - 40 Morimoto N, Komatsu C, Nishida M, Sugiura T. Detection of *Giardia lamblia* cysts in non-fixed long-term stored human feces by direct immunofluorescence assay. *Jpn J Infect Dis* 2001; 54: 72-74
 - 41 Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS, Mattia AR. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1632-1634
 - 42 El-Shewy KA, El-Hamshary EM. Immunofluorescent detection of both *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* using anti-*Cryptosporidium* oocyst antibodies. *J Egypt Soc Parasitol* 1999; 29: 777-786
 - 43 Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 623-626
 - 44 Souza DS, Barreiros JT, Papp KM, Steindel M, Simoes CM, Barardi CR. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and

- of Lutz for the diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human feces. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45: 339-342
- 45 Hsu BM, Huang C, Lai YC, Tai HS, Chung YC. Evaluation of immunomagnetic separation method for detection of *Giardia* for different reaction times and reaction volumes. *Parasitol Res* 2001; 87: 472-474
- 46 Mank TG, Zaat JO, Deelder AM, van Eijk JT, Polderman AM. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 615-619
- 47 Dedkova LM, Volkov GN, Serova OA, Belanov EF, Bormotov NI, Krotova VA, Ofitserov VI. The detection of antibodies to the trophozoite antigens of *Lambliia* by an immunoenzyme method. *Med Parazitol (Mosk)* 1999; : 46-48
- 48 Schunk M, Jelinek T, Wetzel K, Nothdurft HD. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 389-391
- 49 Merzlova NB, Romanenko NA, Baburina LV, Fukalova VN. Prevalence and diagnosis of lamblasis in Perm region. *Med Parazitol (Mosk)* 2004; : 24-27
- 50 Kucheria TV, Polushkina MG, Anishchenko NV, Gorban' LJa, Avdiukhina TI. Outbreak of giardiasis at a preschool children establishment in the town of Perm'. *Med Parazitol (Mosk)* 2002; : 51-53
- 51 Srijan A, Wongstitwilairoong B, Pitarangsi C, Serichantalergs O, Fukuda CD, Bodhidatta L, Mason CJ. Re-evaluation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp from stool specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36 Suppl 4: 26-29
- 52 Weitzel T, Dittrich S, Mohl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 656-659
- 53 Pillai DR, Kain KC. Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica*-E. dispar and *Giardia lamblia* coproantigen. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3017-3019
- 54 Dedkova LM, Volkov GN, Serova OA, Belanov EF, Bormotov NI, Krotova VA, Ofitserov VI. The detection of antibodies to the trophozoite antigens of *Lambliia* by an immunoenzyme method. *Med Parazitol (Mosk)* 1999: 46-48
- 55 Martin AM, Rodriguez J, Canut A, Dovigo CA. Evaluation of an immunoenzyme technique for the detection in feces of the *Giardia intestinalis* antigen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 39-42
- 56 Hanson KL, Cartwright CP. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 474-477
- 57 Garcia LS, Shimizu RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1267-1268
- 58 Boone JH, Wilkins TD, Nash TE, Brandon JE, Macias EA, Jerris RC, Lysterly DM. TechLab and alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 611-614
- 59 Rocha MO, Mello RT, Guimaraes TM, Toledo Vd, Moreira Md, Costa CA. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay, in belo horizonte, brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999; 41: 151-154
- 60 Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA, Calhoun LB, Yan SS. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2781-2783
- 61 Kolakowska R, Trippner M, Wasilewska E, Kreczko S. Detection of the parasite *Giardia intestinalis* during feces examination with immunoenzymatic and microscopic methods. *Pol Tyg Lek* 1996; 51: 210-211
- 62 Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1526-1529
- 63 Lindo JF, Levy VA, Baum MK, Palmer CJ. Epidemiology of giardiasis and cryptosporidiosis in Jamaica. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 717-721
- 64 Bitkowska E, Walochowa M, Dzbenski TH. Detection of *Giardia* antigens in feces by immunoenzymatic method; advantages and disadvantages of commercially available diagnostic kits. *Med Dosw Mikrobiol* 1995; 47: 95-99
- 65 Maraha B, Buiting AG. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 485-487
- 66 Katanik MT, Schneider SK, Rosenblatt JE, Hall GS, Procop GW. Evaluation of ColorPAC *Giardia*/*Cryptosporidium* rapid assay and ProSpecT *Giardia*/*Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4523-4525
- 67 Oster N, Gehrig-Feistel H, Jung H, Kammer J, McLean JE, Lanzer M. Evaluation of the immunochromatographic CORIS *Giardia*-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 112-115
- 68 Sharp SE, Suarez CA, Duran Y, Poppiti RJ. Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 332-334
- 69 Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3337-3340
- 70 Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, Carroll M, Chan F. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 209-212

电编 李琪 编辑 王晓瑜

细胞间隙连接通讯及其通路蛋白与大肠癌发生关系的研究进展

吕丽艳, 关景明, 米丽娜

吕丽艳, 关景明, 米丽娜, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
通讯作者: 吕丽艳, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科. lvliyan_126@126.com
收稿日期: 2006-10-08 接受日期: 2006-10-16

Research progress on the roles of gap junctional intercellular communication and connexin in the carcinogenesis of colorectal cancer

Li-Yan Lv, Jing-Ming Guan, Li-Na Mi

Li-Yan Lv, Jing-Ming Guan, Li-Na Mi, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Li-Yan Lv, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. lvliyan_126@126.com

Received: 2006-10-08 Accepted: 2006-10-16

Abstract

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is a widespread signal transduction pathway in multicellular organisms. It participates the transportation of ion and other micromolecular signal transduction transmitter. The role of GJIC is to adjust the process of cell growth, cell multiplication and differentiation, and any change in GJIC will obviously affect the tumorigenesis. The carcinoma of large intestine is one of the most common cancers in human beings. Recent investigation indicated that the carcinogenesis of large intestine is the consequence of multiple genes, procedures and stages, including oncogene activation, anti-oncogene deactivation, lost control of DNA transcription and DNA injuries, etc. The final appearance of cell transformation, caused by any reason, is the lost control of cell cycle as well as the limitless proliferation of cells. In this article, we reviewed the recent research progress on the roles of GJIC and connexin in the carcinogenesis of large intestine.

Key Words: Connexin; Gap junction intercellular communication; Carcinoma of large intestine

Lv LY, Guan JM, Mi LN. Research progress on the roles of gap junctional intercellular communication and connexin in the carcinogenesis of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3493-3499

摘要

细胞间隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是多细胞生物体内普遍存在的一种通讯方式, 他参与离子和其他小分子信号物质的转运. GJIC对细胞的生长、增殖和分化起重要的调控作用, 他的改变与肿瘤的发生密切相关. 大肠癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 目前研究表明, 大肠癌的发生是一个多步骤、多基因、多阶段的过程, 包括癌基因激活、抑癌基因失活、DNA转录表达失控、DNA损伤等. 不论何种原因的细胞转化, 其最终表现为细胞周期失控、细胞无限增殖. 本文就GJIC及其通路蛋白、细胞因子与大肠癌的发生的研究进展作一综述.

关键词: 连接蛋白; 细胞间隙连接通讯; 大肠癌

吕丽艳, 关景明, 米丽娜. 细胞间隙连接通讯及其通路蛋白与大肠癌发生关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3493-3499

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3493.asp>

0 引言

细胞通讯是指一个细胞的信息通过化学递质或电信号传递给另一个靶细胞, 使其产生相应的效应. 在生物体内, 大多数的细胞与其他细胞间有两种不同的通讯方式, 一种是生长因子或激素介导的通讯, 他不需要直接的细胞接触; 另一种是细胞接触介导的通讯. 在后一种通讯方式中, 细胞间隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是目前已知的相邻细胞间直接交流胞质的唯一膜通道结构, 被认为在肿瘤的发生、发展和组织自身稳定的

■背景资料

间隙连接(GJ)是一类形成于相邻细胞间的连接复合体, 由聚集的通道形成并直接联系毗连细胞的内部结构. 以连接子为结构单位, 其蛋白成分称为连接蛋白, 在细胞间信息调控信号传导方面起重要作用, 构成细胞间通讯功能. 不同的连接蛋白由位于不同染色体上的连接蛋白基因编码, 连接蛋白基因的异常可导致间隙连接功能的异常, 从而引起细胞间失去接触抑制进行扩增, 基因损伤的恶性表型得以表达, 形成癌细胞.

■研究前沿

现在国内外在该领域研究的热点主要是细胞连接通讯及其通路蛋白在恶性肿瘤发生、发展中的作用。

维持中具有重要作用^[1-2]。本文通过对GJIC的生物学特性、GJIC及其通路蛋白与大肠癌发生关系的回顾,旨在探讨细胞间隙连接通讯及其通路蛋白在肿瘤发生中的重要作用,并加强对大肠癌发生的认识。

1 细胞间隙连接通讯及其通路蛋白

1.1 间隙连接的定义及功能 细胞间隙连接是相邻细胞之间形成的一种能够开放和关闭的亲水性膜通道结构^[3],由跨膜的细胞间隙连接蛋白(connexin, Cx)构成^[4]。通道的直径约为1.5-2.0 nm,只能透过相对分子质量<1000的分子和离子,如Ca²⁺、cAMP、三磷酸肌醇、葡萄糖、维生素及其他参与生长调节的物质可以通过间隙连接为相邻细胞所共有。而蛋白质、RNA、多糖和脂质复合物等大分子物质则不能透过间隙连接通道^[5-6]。不同组织、细胞之间通过间隙连接,进行信息沟通,平均代谢产物,使各种信息有效的达到相应的细胞,保持细胞群体对生长刺激和调节反应的同步性,使细胞的增值、分化按正常的程序进行。目前,已知的间隙连接的生理功能包括:(1)信号的传递功能;(2)构成存在于平滑肌、心肌、神经末梢的电紧张突触;(3)缓冲毒性化学物质的毒害作用;(4)通过周围细胞滋养受损细胞;(5)参与局部的代谢功能;(6)参与胚胎发育、细胞的分化和生长控制;(7)参与细胞的黏附和运动^[7]。

1.2 连接蛋白基因及其产物的结构和功能 间隙连接由细胞膜上的连接子结构单位组成,其蛋白成分称为连接蛋白,是由许多同源性基因编码的多基因家族,不同的连接蛋白由位于不同染色体上的Cx基因编码^[8-9]。目前认为,Cx基因具有抑癌基因的特点。已发现的Cx有约近20种之多,cDNA克隆序列分析发现他们具有高度同源性。Cx基因均具有2个外显子:第1个外显子较短,只有几十到一百多个碱基对(bp),第2个外显子包含一个完整的编码区。内含子较长且长度不一。在其反义起始密码子上游16-33 bp处有一个剪切受体位点^[10]。cDNA推导出的氨基酸序列分析表明,Cx含有4个疏水性的跨膜区,在细胞膜上形成双跨膜的分子链,其氨基端与羧基端在细胞质面^[11]。连接蛋白的同源性主要在细胞外两个结构域,跨膜部分的结构域同源性较低,细胞质内结构域的同源性最低。连接蛋白成员之间细胞外结构域的高度保守性可能允许各成员之间相互作用,如一个细胞膜上的Cx32能够与另一细胞膜

上的Cx43相连接形成细胞间的通道^[12];细胞质面结构域的差异可能与连接蛋白成员的组织特异性和交叉性、各种细胞内通道开关的调节及电导通讯的差异有关。不同的连接基因编码的连接蛋白在信息通讯中显示出不同的选择性及方向性,这种差异导致了间隙连接通讯独特的功能。

1.3 间隙连接的影响因素 影响或调控连接蛋白(Cx)的因素可直接或间接影响到间隙连接通讯的功能,其主要因素有:(1)Cx磷酸化影响Cx构象和通道的开关,当Cx磷酸化时通道关闭,去磷酸化时通道打开^[13-14]。Cx磷酸化异常可干扰正常的间隙连接通讯功能,导致生长控制异常;(2)某些癌基因编码的蛋白激酶如V-fps, C-src, V-Src, C-erbB2等能通过Cx磷酸化调节间隙连接通讯^[15-16];(3)细胞质中Cx蛋白池为调节细胞膜上的Cx数量所必需,细胞可通过这种Cx蛋白迁入到质膜上或通过靶质膜上Cx蛋白胞饮入胞质中的方法来增加或减少膜上Cx蛋白的数量;(4)化学药物对连接蛋白的影响,如抑制肿瘤药物三磷酸腺苷等可增强间隙连接通讯,促癌剂如林丹等则能抑制间隙连接通讯;(5)Cx的快速构象变化是调节Cx功能的重要方式,影响通道快速关闭和开启的因素有蛋白激酶、细胞内pH值迅速变化、糖皮质激素、钙和钙调蛋白、cAMP、LDL和细胞内外电压梯度等。如细胞外钙离子浓度升高是促进连接形成,细胞内钙离子浓度升高时通道关闭,提高cAMP、LDL浓度能够促进连接蛋白形成细胞间隙连接^[17-18];(6)细胞间隙连接形成依赖于细胞间质的酸化;(7)细胞表面的黏附分子与Cx作用为间隙连接形成提供了稳定的结构^[19];(8)电压梯度可以协调Cx成员间的相互作用。

1.4 GJIC及其通路蛋白在肿瘤中的表达调控 肿瘤是一种增殖失控和分化紊乱的疾病,肿瘤发生过程中的任何一个步骤受到阻断都有可能抑制肿瘤的发展。已有的研究发现,肿瘤细胞和转化细胞普遍存在间隙连接通讯的缺陷^[20-21],主要表现在肿瘤细胞间的同型GJIC减少,肿瘤细胞与周围正常细胞间的异型GJIC选择性丧失,从而使肿瘤细胞脱离机体的调控,导致肿瘤细胞无限增殖。细胞间隙连接通讯的恢复与肿瘤的生长控制和转化表型的抑制相关^[22-23]。

目前,有多种理论来阐述肿瘤的发生和发展,而GJIC概念都可用来解释他们的假说,如:干细胞假说^[24]认为未分化完全的细胞都有可能

癌性转化. 正常情况下, 干细胞的分化潜能被周围已分化细胞抑制, 而这种抑制必须通过细胞间隙连接通讯才能实现, 只有在分化细胞出现凋亡、衰老和损伤时, 干细胞才会分裂, 并保持着细胞增减的动态平衡^[25-27]. 当细胞间缺少分化产物时, 则细胞间隙连接不健全, 完全失去对邻近干细胞的分裂抑制作用, 使干细胞的分裂成了一种自主行为, 失去接触抑制, 这时癌细胞便有机会和干细胞结合在一起, 一方面使干细胞自主分裂, 另一方面引导分裂后的细胞以自己为模板进行分化, 并最终形成癌瘤. 而致癌多阶段模型则认为致癌作用分3个主要阶段: (1)引发阶段; (2)促癌变阶段; (3)进展阶段. 在引发阶段, 自发的或致癌因子诱导正常细胞成为起始细胞. 此阶段细胞间仍存在正常的GJIC; 而促癌阶段癌起始细胞与周围正常细胞的GJIC受到抑制, 细胞失去接触抑制进行扩增, 基因损伤的恶性表型得以表达, 形成癌细胞^[28]; 进展阶段在致癌剂和促癌剂反复刺激下, 癌细胞不断增殖, 形成临床肿瘤. 这两个模型显示GJIC受抑是进入促癌阶段的重要机制. 连接蛋白基因在各种组织中的表达既有交叉性, 又有组织特异性. 如Cx32和Cx26基因在肝、肾、肠、肺、脾等组织中有表达, 但在心肌和成年人骨骼肌中不表达; 而Cx43基因则在心肌、平滑肌、子宫肌、卵巢颗粒细胞、星形细胞、成纤维细胞和晶状体等组织中有表达^[8,29]. 此外, 一些连接蛋白基因在正常组织中不表达, 却在肿瘤组织中表达. 如Cx43基因在正常肝细胞中不表达(仅在肝脏内皮细胞和胆管表皮细胞中表达), 却在肝细胞癌中表达; Cx26在正常皮肤中不表达, 却在皮肤基底细胞癌中表达^[30]. 大量研究资料表明, Cx基因在多种肿瘤细胞表达下降或消失. Cx也明显降低或消失, 继而GJIC能力下降或消失, 由此导致细胞恶变肿瘤形成^[31]. 随着对Cx基因研究的深入, 研究者发现在一部分良性肿瘤和恶性肿瘤及转化细胞株中存在连接蛋白基因的稳定表达^[32]. 如Cx37和Cx43在鼻咽癌和慢性鼻咽炎组织中的稳定表达, 而且两者的表达无量的差异. 这又提示连接蛋白基因表达降低并不是每种细胞转化及肿瘤形成所必须.

大量研究资料表明, 用Cx基因转染肿瘤细胞, 使其重建细胞间隙连接, 恢复GJIC可以延缓肿瘤细胞生长, 为肿瘤治疗研究提供了理论基础和新的思路^[33]. 在Warn-Cramer *et al*^[34]的实验中, Martyn将CxcDNA转染至小鼠永生化细胞

后, 并为建立功能性细胞间隙连接通讯, 但仍然抑制细胞增殖. Lee *et al*^[35]的研究显示, 采用Cx基因转染GJIC功能正常的细胞, 细胞通讯功能未见增强, 但同样抑制了细胞的生长. 这些研究表明转染Cx基因后的抑癌作用除建立功能性的GJIC外, 尚存在其他机制. Bradshaw于1993年用Cx43基因转染神经胶质瘤C6细胞后, 发现转染的C6细胞IGFBP-4(有抑制细胞生长作用)的表达较转染前明显增高, 而IGFBP-3(有促进细胞生长作用)转染前呈高表达, 转染后为无表达, 这表明肿瘤抑制除细胞间隙连接通讯外, 细胞内也存在抑制机制^[36]. 转染Cx基因抑制肿瘤细胞生长的机制总结为: (1)细胞间隙连接通讯的恢复; (2)转染Cx基因后诱导或抑制了某些与细胞生长、分化和增值有关基因的转录; (3)Cx可能与某些蛋白质存在交互作用, 这种交互作用参与细胞生长、分化或增值的调控过程, 或干预与细胞生长和增值有关的信号转导过程, 此时Cx通常被定位在细胞核或细胞质内. 应该强调的是, 转染了基因后的肿瘤细胞其生长和增值被抑制, 仅是指延缓了肿瘤细胞的生长、分化和增值, 并非完全逆转了其恶性表型^[37-38].

2 大肠癌发病相关因素及发病机制

大肠癌包括结肠癌和直肠癌, 是人类常见的恶性肿瘤之一. 近年来, 世界上多数国家大肠癌发病率呈上升趋势, 且发病年龄提前. 癌肿的发生涉及多因素, 结直肠癌的发生也不例外, 各种因素综合作用使癌基因和抑癌基因复合突变, 是大肠癌发生的分子生物学基础. 其发病的相关因素如下:

2.1 遗传因素 大肠癌约80%是散发的, 20%为遗传性的, 其中包括遗传性非息肉病性大肠癌家系(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)、家族性腺瘤性息肉病家系(familia adenomatous polyposis, FAP)和家族性大肠癌系(familia colorectal cancer, FCC)^[39]. FAP通常指大肠腺瘤数超过100个以上者, 一般在100-1000个之间. 约占遗传性结直肠癌的5%, 其发病率为1/8000-29 000, 多数在青少年时期出现息肉, 30岁左右开始出现症状, 45岁之前发生癌变. FAP可伴有颅骨和长骨骨瘤、视网膜色素沉着、软组织肿瘤、腹壁硬纤维瘤、胃十二指肠和甲状腺肿瘤等^[40]. FAP是一种常染色体显性遗传病, 位于5q²¹的APC基因种系突变是其发生的分子遗传学基础. 一般FAP患者的息肉数可达成百

■相关报道

目前有关细胞间隙连接蛋白与大肠癌发生关系的报道相对较少, 且主要集中在Cx43和Cx32的表达缺失与大肠癌发生的研究中.

■创新盘点

目前国内外关于细胞间隙连接通讯(GJIC)及其通路蛋白主要集中在其与神经胶质瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鼻咽癌及肝癌的发生、分化、增殖等方面的报道。但在大肠癌方面的报道甚少,并且研究内容与大肠腺瘤癌变的关系未涉猎。本文通过对GJIC及其通路蛋白生物学特性和大肠癌发病相关因素及发病机制的描述,探讨GJIC及其通路蛋白与大肠癌尤其是大肠腺瘤癌变发生的关系,为今后研究大肠癌的发生提供新的思路。

上千,且息肉大小不一、形态各异,多发生在结肠和直肠,其癌变率极高,有人认为其癌变率为100%。绝大多数患者在45岁以前死于息肉癌变。HNPCC 1895年被Warthin's发现,又称Lynch综合征,是一种外显率为70-80%的常染色体显性遗传病^[41],占有所有大肠癌的2%-7%^[42]。其突变基因有4种错配修复基因(MMR): hMSH2, hMLH1, hPMS1和hPMS2^[43]。临床上HNPCC患者发病年龄较早,原发癌常见,肿瘤发生的部位以右半结肠为主且可同时或异时发生多个结直肠肿瘤^[44]。FCC在大肠癌患者中,有10%-15%有家族性,但不符合FAP或HNPCC的标准,统称为FCC。近期发现FCC的发生与APC中11307K基因突变有关。

2.2 良性疾病恶变 (1)腺瘤: 结直肠腺瘤也可称为上皮内瘤变,具有组织结构和细胞学上的异型性,即没有组织结构和细胞学上的异型性是不能诊断为腺瘤的。结直肠腺瘤在组织学上可分为管状腺瘤(管状结构大于80%)、绒毛状腺瘤(绒毛状结构大于80%)、管状绒毛状腺瘤(管状和绒毛状结构均小于80%)和锯齿状腺瘤^[45]。1974年Morson^[46]提出大肠腺瘤癌变的序贯学说,认为绝大多数结直肠癌起源于腺瘤,因此将腺瘤看作看作是癌前病变。结直肠癌的发生大致是经过正常肠上皮→腺瘤→腺瘤伴异型增生→腺瘤癌变→腺癌的演变过程。一般而言,腺瘤的发病年龄早于结直肠癌约5-10 a或更长的时间,大肠癌的形成具有较为明确的阶段性。组织病理学研究提示约有0.2%-8.3%结直肠腺瘤病灶内有癌变,相反在14%-23%结直肠癌的浸润病灶连接残留的腺瘤组织。在切除标本或内镜检查可见约30%病例同时存在腺瘤和癌肿^[47]。杂和性缺失的分子致癌途径是APC基因突变导致小腺瘤形成^[48],多发生在脾曲远端的左半结肠。小腺瘤到明显腺瘤的过程激活了k-ras基因,继之基因调控发生障碍,使抑癌基因失去活性,在多基因转化过程中DCC基因丢失,最后在染色体17P的P53基因缺失或突变,癌基因活性增强,从而产生了癌的前期变化。总之,在腺瘤癌变过程中,APC基因→k-ras基因→DCC基因→p53基因分阶段参与了整个癌变过程^[49-51]。腺瘤癌变是指在同一肿瘤内存在着浸润性结直肠癌和腺瘤,或先前存在的腺瘤转变为浸润性结直肠癌。腺瘤癌变可以为早期癌变,即浸润性结直肠癌仅局限于黏膜下层,也可以为中晚期结直肠癌^[52]。结直肠腺瘤的癌变率受多种因素的影响:腺瘤大小:腺瘤的大小和恶变率呈正相

关。<1 cm癌变率为1%, 1-2 cm为5%-10%, >2 cm为20%,有报道高达30%^[53]。腺瘤随体积增大恶变率增高已被多数学者认可,但仍不应放松对小腺瘤恶变的警惕性;组织学类型:管状腺瘤癌变率为4.8%,管状绒毛状腺瘤为2.5%,绒毛状腺瘤为40.7%^[54],有报道绒毛状腺瘤癌变率高达56.76%^[53];异型增生的程度:异型增生是指上皮细胞增殖和分化偏离了正常规律,出现异型细胞。轻度异型增生的腺瘤恶变率为7.8%,中度异型增生为18%,重度异型增生为45.5%^[55];腺瘤的蒂:腺瘤有蒂癌变率低,广基的癌变率可达75%;数目和年龄,腺瘤数越多癌变率就越高,年龄越大癌变率越高;腺瘤的部位及表面形状等。(2)炎症性肠病:炎症性肠病主要指溃疡性结肠炎和克罗恩病,溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因不明的直肠和结肠炎症性疾病。据有关资料报道,UC患者部分细胞代谢异常和癌前改变的发生有一定的关系,认为比较密切的有杯状细胞黏液的改变,细胞内DNA、RNA代谢的异常等。UC相关性结直肠癌与散发性结直肠癌的发病机制是不同的,目前多数学者认同正常表皮→过渡增生→轻度异型增生→中度异型增生→UC相关性结直肠癌的发展过程,其中p53, k-ras, 18q, TGF- β , APC等参与了整个过程。UC患者发生大肠癌的机会比正常人高5-10倍,其相关因素主要有以下几个方面:(1)病程:UC病程愈长,大肠癌的发生率越高;(2)年龄:UC的发病年龄越小,最终发生癌变的可能性就愈高;(3)病变范围:目前大多数专家多一致认为:UC累及大肠病变范围越大,癌变率越高;(4)临床分型:慢性持续型的癌变率高于其他3型;(5)息肉:UC易伴有假性息肉,癌变率会增高;(6)与组织学的关系:有专家提出UC的黏膜异型增生是结肠癌标志,有资料表明,高度异型增生的癌变率高于低度异型增生。UC相关性结直肠癌多属于低分化腺癌或黏液形成癌。

克罗恩病(Crohn's disease)患者发生癌的危险性较一般人群高440倍,而且发生癌的年龄比一般人群早10 a。大多数学者认为,从炎症到癌症平均为15-20 a,病程长,病变广泛的CD发生癌变的倾向与UC相似,两者分别是普通人群的19倍和18倍^[56]。但CD患者癌变确切的危险性尚不清楚。(3)饮食、环境和其他因素:大多数学者认为,大肠癌发病率的升高与人们生活水平的提高、饮食条件的改善有关。高脂饮食,特别是含有饱和脂肪酸的饮食、常食用腌鱼、腌肉及油

炸食品、长期摄入啤酒和酒精^[57-58]、膳食中缺少富含纤维素与钙、膳食纤维、维生素及微量元素Se, Zn, Fe等物质, 与大肠癌的发病密切相关。另外, 缺乏体育锻炼^[59], 社会心理因素作用如长期精神压抑、不适应环境、不能自我调节的不良情绪、焦虑和应激反应强也是大肠癌发病的危险因素。

3 细胞调控、细胞因子与大肠癌的发生

恶性肿瘤的发生与发展的过程是细胞过度增殖和细胞凋亡受抑制的过程。大肠癌的发生也不例外, 正常肠黏膜上皮细胞存在程序性死亡, 即细胞凋亡, 籍以清除衰老的细胞, 维持黏膜细胞生理平衡。当各种因素引起肠黏膜上皮细胞过渡累积时, 就有可能引起大肠癌的发生。因此, 细胞凋亡的异常和细胞的过度增殖导致增殖/凋亡比值加大是大肠癌发生的重要因素之一。大量的研究报道显示, 在大肠癌中, PCNA、Ki-67及细胞周期蛋白等反映细胞群体增殖活性的可靠指标的表达呈明显的增高趋势^[60-61], 而与大肠癌细胞凋亡调控的主要相关基因bcl-2, p53, c-myc及其蛋白在大肠癌的表达明显下降^[62-63]。细胞调控与肿瘤发生、发展的关系是肿瘤研究的一个热点, 其与大肠癌的发生、发展、转移及愈后的关系目前尚未完全明确, 有待于继续深入研究。

4 GJIC及其通路蛋白与大肠癌

GJIC是细胞间的一种重要连接方式, 在细胞分化、生长控制及维持体内自然环境平衡等方面起重要作用^[64-65]。近几年来, 国内外对GJIC与癌变的关系进行了大量的研究, 发现Cx基因的表达对绝大多数肿瘤细胞的生长起负调控作用, 故有学者认为Cx基因是非突变型抑癌基因^[66-67]。许多研究表明, Cx43表达减少或缺失以及定为异常与多种肿瘤细胞如乳腺癌、肝癌、宫颈癌、卵巢癌等的发生、发展及转移密切相关。

目前, 有关Cx蛋白与大肠癌关系的研究报道资料相对较少。黄梅芳 *et al*^[68]对大肠癌及相应正常组织内的连接蛋白基因在mRNA水平进行了系统的表达研究, 发现大肠正常组织细胞中有Cx32, Cx37, Cx43 mRNA的高表达, 大肠癌细胞中有Cx43基因的微弱表达。而Cx37和Cx46在大肠癌细胞株中却有一定水平的表达, 说明大肠癌组织GJIC缺陷。Cx32是正常大肠上皮细胞间隙连接通道的主要成分, 他的表达缺失是

致大肠癌细胞间隙连接通讯障碍的主要原因。Cx32和Cx43在正常肠黏膜上皮细胞中高水平表达, 在癌旁细胞中表达水平下降, Cx32在癌细胞及癌细胞株均不表达; Cx43在癌细胞中有低水平表达, 在癌细胞株中无表达。这提示大肠癌的发生可能与Cx32和Cx43的表达缺失有关。人大肠癌细胞株表达Cx37和Cx46, 这提示体内、外细胞生存环境差异亦可能影响Cx基因的表达水平。有报道, Cx43基因在某些组织细胞中检测到其5-UTR上游, 距转录起始点近端有AP-1位点及变异的TATA盒、激素应答元件, 这些均与其转录活性有关^[69]。有人比较了小鼠、大鼠、小牛及人的Cx43-UTR, 均有很高的同源性, 含4个AUUUA重复序列。可能与Cx43 mRNA的稳定性有关。在黄梅芳 *et al*的实验中, TPA处理大肠癌细胞株后, 在Cx43mRNA表达增强的同时, 却使其本身的Cx46表达明显减弱, 说明Cx46和Cx43基因结构的差异性。因此推测, Cx46在大肠癌细胞中的表达可能是恶性肿瘤细胞中同族不同种类基因表达的变异^[70]。Cx43与Cx46均属于Cx家族的a-亚类, 这种结构同源性有可能使Cx43变异为Cx46。TPA对Cx46基因表型的抑制, 说明了这种变异的可逆性, 为阐明大肠癌变机制提供了新的思路。

总之, GJIC与癌变的关系已被广泛证实, 但对GJIC系统及其通路蛋白的研究主要集中在胃癌、肝癌、子宫癌及乳腺癌等肿瘤的研究, 而在大肠癌及癌前病变的研究则很少。GJIC在大肠癌变过程中具体的作用机制还需要深入了解, 若能摸清各种连接蛋白在肿瘤组织中表达的规律, 就有可能为大肠癌的早期诊断提供新的指标, 为有效控制大肠癌生长的基因疗法提供新的手段。

5 参考文献

- 1 Mesnil M. Gap junctions and cancer: implications and perspectives. *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 197-206
- 2 Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. The role of intercellular communication via "gap junctions" in disease. *Ned Tijdschr Geneesk* 2003; 147: 2463-2466
- 3 Holder JW, Elmore E, Barrett JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3475-3485
- 4 Simon AM. Gap junctions: more roles and new structural data. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 169-170
- 5 袁慧, 浦跃朴. 细胞间隙连接通讯与癌变关系的研究进展. *中国预防医学杂志*, 2004; 5: 67-68
- 6 Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2045-2058
- 7 邱元正. 连接蛋白基因与肿瘤研究进展. *国外医学: 耳*

■应用要点

本文通过对GJIC及其通路蛋白、细胞因子与大肠癌发生关系研究进展的系统回顾, 使读者能够更加深刻的认识到GJIC及其通路蛋白在大肠癌发生中的重要作用, 并对未来的实验探索有一定的指导作用。

■名词解释

间隙连接:是相邻细胞之间形成的一种能够开放和关闭的亲水性膜通道结构,跨膜的细胞间隙连接蛋白(connexin, Cx)构成。通道的直径约为1.5-2.0 nm,只能透过相对分子质量<1000 Da的分子和离子。不同组织、细胞之间通过间隙连接,进行信息沟通,平均代谢产物,使各种信息有效的达到相应的细胞,保持细胞群体对生长刺激和调节反应的同步性,使细胞的增值、分化按正常的程序进行。

- 8 Haeffliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J Biol Chem* 1992; 267: 2057-2064
- 9 Houghton FD, Barr KJ, Walter G, Gabriel HD, Grummer R, Traub O, Leese HJ, Winterhager E, Kidder GM. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. *Biol Reprod* 2002; 66: 1403-1412
- 10 Bai S, Spray DC, Burk RD. Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1216: 197-204
- 11 Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 1-7
- 12 吴瑾, 王翠华, 周红凤, 刘丹, 王雯, 张波, 隋广杰. 间隙连接蛋白32, 43的表达对胃癌侵袭转移潜能的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 557-562
- 13 Nielsen M, Ruch RJ, Vang O. Resveratrol reverses tumor-promoter-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 804-809
- 14 DeoCampo ND, Wilson MR, Trosko JE. Cooperation of bcl-2 and myc in the neoplastic transformation of normal rat liver epithelial cells is related to the down-regulation of gap junction-mediated intercellular communication. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1501-1506
- 15 Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M, Hori M. c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 1780-1788
- 16 Cottrell GT, Lin R, Warn-Cramer BJ, Lau AF, Burt JM. Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C511-C520
- 17 Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 17): 3037-3049
- 18 Cruciani V, Mikalsen SO. Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol Cell* 2002; 94: 433-443
- 19 Yano T, Yamasaki H. Regulation of cellular invasion and matrix metalloproteinase activity in HepG2 cell by connexin 26 transfection. *Mol Carcinog* 2001; 31: 101-109
- 20 孙华, 刘耕陶. 细胞间隙连接通讯与肿瘤. *中国药理学通报* 2004; 20: 1205-1208
- 21 Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 125-145
- 22 Naus CC, Zhu D, Todd SD, Kidder GM. Characteristics of C6 glioma cells overexpressing a gap junction protein. *Cell Mol Neurobiol* 1992; 12: 163-175
- 23 Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR. Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 1991; 124: 207-225
- 24 Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 43-48
- 25 宋今丹. 医学细胞生物学. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 74-77
- 26 Trosko JE. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S326-S331
- 27 Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. The role of human adult stem cells and cell-cell communication in cancer chemoprevention and chemotherapy strategies. *Mutat Res* 2005; 591: 187-197
- 28 Yamasaki H, Omori Y, Zaidan-Dagli ML, Mironov N, Mesnil M, Krutovskikh V. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 1999; 23: 273-279
- 29 范松青, 周鸣, 向秋, 王洁如, 熊伟, 王蓉, 魏启幼, 周金平, 李桂源. 细胞间隙连接蛋白在多种类型癌组织中的原位表达研究癌症 2003; 22: 686-690
- 30 张晓峰, 李百祥. 细胞间隙连接通讯与肿瘤关系的研究进展. *卫生毒理学杂志* 2002; 16: 185-187
- 31 张永兴, 王恩华. 细胞连接蛋白及其基因与肿瘤关系研究进展. *国外医学·肿瘤学分册* 2004; 31: 733-735
- 32 Jinn Y, Ichioka M, Marumo F. Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer. *Cancer Lett* 1998; 127: 161-169
- 33 Mesnil M. Connexins and cancer. *Biol Cell* 2002; 94: 493-500
- 34 Warn-Cramer BJ, Lin R, Martyn K, Guyette CV, Lau AF. Maintaining connexin43 gap junctional communication in v-Src cells does not alter growth properties associated with the transformed phenotype. *Cell Commun Adhes* 2003; 10: 299-303
- 35 Lee HJ, Lee IK, Seul KH, Rhee SK. Growth inhibition by connexin26 expression in cultured rodent tumor cells. *Mol Cells* 2002; 14: 136-142
- 36 Naus CC. Gap junctions and tumour progression. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 136-141
- 37 Schwarz M, Wanke I, Wulbrand U, Moennikes O, Buchmann A. Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicol Pathol* 2003; 31: 99-102
- 38 Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006; 394: 527-543
- 39 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 534-536
- 40 张延龄. 结直肠癌的发病机制. *国外医学: 外科学分册*, 2003, 30: 96-98
- 41 Cunningham C, Dunlop MG. Molecular genetic basis of colorectal cancer susceptibility. *Br J Surg* 1996; 83: 321-329
- 42 Muller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002; 20: 102-109
- 43 Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740
- 44 王达, 薛英威, 周宪军, 乔凤, 张妍, 李辉, 赵亚双. 遗传性非息肉病性大肠癌13家系分析. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 180-183
- 45 郑杰. 结直肠息肉和结直肠癌. *中华病理学杂志*, 2005, 34: 4-5
- 46 Morson B. President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* 1974; 67: 451-457
- 47 Arenas RB, Fichera A, Mhoon D, Michelassi F. Incidence and therapeutic implications of synchronous

- colonic pathology in colorectal adenocarcinoma. *Surgery* 1997; 122: 706-9; discussion 709-710
- 48 Dimitriadis A, Vincan E, Mohammed IM, Roczo N, Phillips WA, Baidur-Hudson S. Expression of Wnt genes in human colon cancers. *Cancer Lett* 2001; 166: 185-191
- 49 Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1982-1987
- 50 Golijow C, Guerci A, Mouron S, Abba M, Dulout FN, Ottino A, Pianzola H. Activation of K-ras and c-erbB-2 protooncogenes in human colonic adenocarcinomas. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2001; 31: 71-76
- 51 张艳虹, 高玉彤, 来茂德. 散发性结直肠癌中p53蛋白表达与微卫星不稳定性关系. *实用肿瘤杂志* 2000; 15: 87-90
- 52 Li FE, Ye HJ, Li J, Wang JP, Liu YG, Yu GY, Yin WH. Clinical, enteroscopic, and pathological characteristics of 796 cases of colorectal polyps. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 30: 463-466
- 53 欧希龙, 刘顺英, 许曼华. 大肠息肉的异型增生及恶变. *南京铁道医学院学报* 2001; 20: 47-49
- 54 Kapsoritakis AN, Potamianos SP, Koukourakis MI, Tzardi M, Mouzas IA, Roussomoustakaki M, Alexandrakis G, Kouroumalis EA. Diminutive polyps of large bowel should be an early target for endoscopic treatment. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 137-140
- 55 郭志义, 李平, 胡纲, 何祥飞, 张旭. 大肠腺瘤恶变的相关因素探讨. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 279-281
- 56 Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH, Stern J, Lucas M, Autschbach F, Herfarth C, Heuschen G. Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001; 120: 841-847
- 57 Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Ballard L, Edwards S, Schaffer D, Potter J, Leppert M, Samowitz WS. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1831-1836
- 58 Slattery ML. Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2000; 11: 142-146
- 59 Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 216-227
- 60 Sheikh RA, Min BH, Yasmeen S, Teplitz R, Tesluk H, Ruebner BH, Tobi M, Hatfield J, Fligel S, Lawson MJ. Correlation of Ki-67, p53, and Adnab-9 immunohistochemical staining and ploidy with clinical and histopathologic features of severely dysplastic colorectal adenomas. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 223-229
- 61 Kanczuga-Koda L. Gap junctions and their role in physiology and pathology of the digestive tract. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2004; 58: 158-165
- 62 Saleh HA, Jackson H, Banerjee M. Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 oncoproteins: correlation with Ki67 proliferation index and prognostic histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8: 175-182
- 63 孙保存, 赵秀兰, 王展宏, 刘易欣, 王欣, 古强. 大肠上皮恶性转化不同阶段中Fas, p53表达及其与凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2070-2073
- 64 Ruch RJ. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24: 216-231
- 65 Yamasaki H, Mesnil M, Omori Y, Mironov N, Krutovskikh V. Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res* 1995; 333: 181-188
- 66 Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C R Acad Sci III* 1999; 322: 151-159
- 67 Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O. Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer* 1992; 51: 522-529
- 68 黄梅芳, 邓长生, 朱尤庆, 张春香, 黄星. Cx基因组在大肠癌中的表达及突变. *武汉大学学报(医学版)* 2002; 23: 120-122
- 69 Geimonen E, Jiang W, Ali M, Fishman GI, Garfield RE, Andersen J. Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* 1996; 271: 23667-74
- 70 Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 43-48

■同行评价

本文阐述的内容对了解细胞间隙连接通讯及其通路蛋白与大肠癌发生关系有一定的理论价值, 为进一步的理论研究提供了新的思路。

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 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.

人肝癌裸鼠移植模型的研究进展

叶 翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华

■背景资料

为了研究人类肝癌发生、发展以及抗癌药物的作用和机制, 需要建立肝癌动物模型, 1966年Flanagan发现细胞免疫功能缺陷的裸小鼠, 从而大大降低了人癌裸鼠移植的免疫排斥反应, 使人癌裸鼠移植成为可能, 人肝癌裸鼠移植模型已成为迄今人体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 因此成为肝癌实验研究理想的动物模型。

叶翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 张淑玲, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科. yp_breezy@yahoo.com.cn
电话: 027-85726360
收稿日期: 2006-06-14 接受日期: 2006-08-10

Research progress of human hepatocellular carcinoma models in nude mice

Pian Ye, Shu-Ling Zhang, Sheng-Hua Jie, Ji-Hua Dong

Pian Ye, Shu-Ling Zhang, Sheng-Hua Jie, Ji-Hua Dong, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Shu-Ling Zhang, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yp_breezy@yahoo.com.cn
Received: 2006-06-14 Accepted: 2006-08-10

Abstract

Animal models, which can factually simulate the natural growth, invasion, and metastasis *in vivo*, are needed in basic and clinical research on liver cancer. At present, nude mice with transplanted human hepatocellular carcinoma are the best models of human liver cancer *in vitro*, and it takes less time to establish the model, with a higher success rate. Mouse model of human hepatocellular carcinoma can be obtained by subcutaneous transplantation, *in situ* transplantation, and intraperitoneal transplantation. Metastasis model was also one of them. The following aspects, including the characteristics of human hepatocellular carcinoma cells or surgical specimens, transplanted location, numbers of the transplanted cells, strains and week age of nude mice, and growing environment, etc, are the influential factors for the establishment of this model.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Nude mouse; Transplantation; Animal Model

Ye P, Zhang SL, Jie SH, Dong JH. Research progress of human hepatocellular carcinoma models in nude mice.

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(36):3500-3503

摘要

肝癌的基础与临床研究迫切需要能真正模拟肝癌在人体内自然生长、侵袭及转移全部过程的动物模型。目前, 人肝癌裸鼠移植模型是体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 并且造模时间短, 成功率高, 按移植部位可以分为皮下移植、原位移植、腹腔移植以及转移模型。影响裸鼠移植模型建立的因素主要有人肝癌细胞或外科标本的特性、移植部位及移植癌细胞数量、裸鼠的品系和周龄以及生长环境和其他因素的影响。

关键词: 肝癌; 裸鼠; 移植; 模型

叶翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华. 人肝癌裸鼠移植模型研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3500-3503
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3500.asp>

0 引言

研究人类肝癌需要建立肝癌动物模型, 目前, 人肝癌裸鼠移植模型是体外最接近人类肝癌的整体实验模型, 因此成为肝癌实验研究理想的动物模型。裸小鼠是1966年由Flanagan发现的一种无毛小鼠, 1969年Rygaard^[1]和Pocvlsen通过实验证实裸鼠由于先天性胸腺发育不良, 致T细胞生成障碍, 细胞免疫功能缺陷, 从而在理论上保证了人癌裸鼠移植的可能性。1976年, 日本Shimosato *et al*^[2]首先报道了包括肝癌在内的一系列裸鼠人癌模型的建立, 近30 a来, 国内外学者建立的人肝癌裸鼠模型从最初的皮下移植模型发展到腹腔移植模型、原位移植模型, 近几年又创造了人肝癌裸鼠转移模型。

1 几种常见的人肝癌裸鼠移植模型

1.1 皮下移植模型

1.1.1 肝癌外科标本移植 早期的移植瘤材料来源是人肝癌外科标本^[3-4], 一般取新鲜切除标本的肿瘤边缘癌细胞生长较快的部分, 去除纤

维组织和坏死组织后, 将癌组织剪成直径为1-2 mm的小块, 取2-3块在离体40 min内尽快用套管针接种于裸鼠皮下, 移植时严格按无菌操作, 外科标本移植成功率较低, 只有11%左右. 但移植后的人肝癌仍保持原先的形态和功能, 且较过去人肝癌的实验研究只能借助于动物自发、诱发以及同种移植性肝癌或人肝癌细胞系已经开辟了新的前景.

1.1.2 肝癌细胞株移植 后来发展为将已建立的人肝癌细胞株以包含 10^6 - 10^7 个处于对数生长期的瘤细胞的0.1-0.2 mL细胞悬液接种于裸鼠皮下^[5], 其成功率要高于外科标本. 目前, 大多数肝癌移植基本上都采用皮下接种^[6-7], 以躯干近头侧的成功率高, 其中又以腋下为最, 并且腋下皮肤松弛使瘤体长的较大, 宿主寿命也相对延长^[8]. 另外将肝癌细胞株种植在裸鼠背侧部皮下操作和观察都比较方便, 研究者们也较常采用^[9]. 1 wk左右皮下瘤可以触及(直径为2-3 mm), 10 d左右可以成瘤(直径为5 mm). 皮下移植成功率为70%-100%. 皮下移植瘤操作简便, 易于观察且成功率高, 因此常用作抗肝癌药物的研究和原位移植前的瘤源准备.

1.2 原位移植模型 相对于皮下移植模型来说, 人肝癌裸鼠原位移植模型可较好保持人肝癌的生物学特性. 移植方法同皮下移植模型, 移植部位一般在肝左叶, 刺破肝包膜后植入1-2块瘤组织^[10-11], 也可以将浓缩的瘤细胞株注入肝实质内^[12], 最后全层关腹. 2 wk末可用B超观察到种植瘤, 原位移植成功率较高, 可达100%. 但涉及到裸鼠的麻醉, 开关腹等手术操作, 故实施起来较皮下移植复杂许多. 虽然如此, 原位移植模型仍然很受研究者的欢迎, 因为肝癌最具特征性的生物学行为, 如腹腔浸润转移、腹水等表现仅仅见于原位移植瘤模型.

1.3 腹腔移植模型 腹腔移植瘤位置较深, 不利于观察和测量, 但是操作较简单, 且可出现一定比例的浸润、转移和腹水, 方法是将建立的裸鼠人肝癌组织模型剪成的小块或者人肝癌细胞株以0.3 mL注入裸鼠右下腹腔内^[13-14]. 裸鼠前侧腹壁比背侧更有利于人类移植瘤的生长. 腹腔移植模型可以局部侵袭到肌肉组织、肠、胰、肾和睾丸等, 发生肝内转移或者转移到肺及远处器官, 腹腔移植成功率也较高, 可达100%.

1.4 皮下-原位移植模型 也称为间接原位移植模型, 首先制作好皮下移植模型, 待移植瘤稳定传代后, 再植入同种裸小鼠肝内^[14]. 待肿瘤长到

1 cm³时, 切取供瘤鼠皮下肿块剪成1-2 mm³的肿瘤微块后, 再按照原位组织块移植法将肿瘤块植入到肝包膜下. 间接肝原位移植瘤模型能稳定传代, 移植瘤存活率达100%, 明显高于直接肝原位移植瘤模型, 此模型容易发生局部或远处转移, 甚至发生腹水和黄疸, 局部侵袭率接近100%, 自发转移率>50%.

1.5 皮下-肾包膜下移植模型 同皮下-原位移植模型, 首先也是制作好皮下移植模型, 只是将肿瘤块植入到裸鼠两侧肾包膜下^[15]. 肾包膜下是缺乏免疫监视的部位, 同时由于血供丰富, 为瘤细胞的存活和生长提供了充足的血液供应, 有利于移植瘤的转移, 其接种的成功率也高于皮下.

1.6 转移模型 肝癌术后复发转移是进一步延长肝癌患者生存的障碍, 而要研究肝癌转移复发的机制及其干预, 以利于提出有效的防治对策, 必需要有裸鼠人肝癌转移模型.

1.6.1 皮下-转移模型 用本身就具有自发转移潜能的肝癌细胞系如MHCC97-H, 经过体内筛选得到独特的拥有多发转移特性的细胞系HCCLM3接种于裸鼠皮下^[16]. 接种35 d后, 受种裸鼠100%发生明显的肺部转移.

1.6.2 原位-转移模型 采用组织学完整的人肝癌标本或者具有自发转移潜能的肝癌细胞系^[11,17], 以裸鼠肝被膜下植入的方法, 将肝癌组织或肝癌细胞系直接移植于裸鼠肝脏内, 观察移植瘤的生长情况, 筛选出1株人肝癌高转移瘤株. 接种后, 当裸鼠处于濒死状态时, 处死裸鼠, 系统解剖, 取转移灶植入新裸鼠皮下扩增, 被扩增的转移瘤重新移植到裸鼠肝被膜下, 鼠间连续原位传代, 非传代裸鼠长期观察肿瘤的转移^[14,18-19]. 由此获得的肝癌转移瘤株通过原位传代维持, 将瘤株在裸鼠体内进行纯化筛选后得到的瘤株再次植入裸鼠肝内, 便可建立高转移人肝癌裸鼠模型. 此种模型成功率也较高, 移植成功率和转移率均可达100%.

2 裸鼠成瘤的关键因素

经过国内外学者们多年来的实验摸索, 虽然人肝癌裸鼠移植模型已经比较成熟, 但仍会有移植成功率不高、潜伏期长以及难以连续传代等情况出现. 影响移植成功的因素主要有: 人肝癌细胞本身的特性、移植部位和数量、裸鼠的品系和大小以及环境因素的影响.

2.1 肝癌细胞或外科标本的特性 培养传代的细胞制成悬液后较分散, 容易被裸鼠机体免疫清

■研究前沿

肝癌的基础与临床研究都迫切需要能真正模拟肝癌在人体内自然生长、侵袭及转移全部过程的动物模型. 而人肝癌完整组织块裸鼠原位移植模型因保留了人肝癌的组织结构特征及具备侵袭转移潜能而成为目前最接近人体内肝癌生物学演化和特性的建模方法, 成为近年来肝癌建模的热点. 严格把握好影响模型成功的几种关键因素, 使模型的移植成功率接近100%是建模的重点. 然而裸鼠由于缺乏T细胞免疫功能而难以进行与免疫有关的抗转移研究.

■应用要点

本文总结各种肝癌裸鼠移植模型建立的方法要点、成功率、用途和意义,对于基础和临床动物实验研究具有指导意义。

除,因此较原发肝癌组织难以形成移植瘤。人肝癌外科标本恶性程度与移植成功率大致呈正相关,一般分化程度低、复发性肿瘤以及转移瘤的移植成功率高,具高侵袭和转移潜能的癌细胞更易移植成功。

2.2 移植部位及移植癌细胞数量 移植部位通常选用皮下、腹腔内、原位移植。皮下接种部位多在背部靠近头部皮下,也可采用腋下,由于血管丰富且皮下游离空间大,既易使肿瘤成活又能使肿瘤长大也不影响裸鼠本身的活动,也有报道接种在背部靠近左或右后肢皮下,便于操作且更易于观察。细胞系接种时的细胞数量对成瘤率很重要,一般需要 10^6 数量级以上的细胞才能成瘤,常用的方法是每一接种部位种植含 1×10^6 - 1×10^7 的瘤细胞悬液0.1-0.2 mL。由于移植的细胞经过酶处理后可导致细胞结构被破坏,进一步引起肿瘤生物学行为的改变,影响瘤细胞的移植生长和转移,且细胞悬液本身就已失去了肿瘤的组织结构特点,因此皮下移植的肝癌不易发生转移,故目前研究肝癌转移特性时倾向于进行新鲜组织块原位移植法。

2.3 裸鼠的品系和周龄 裸鼠虽无胸腺、缺乏T细胞免疫,但体内尚存在NK细胞、巨噬细胞及抗原提呈细胞,故仍具一定的免疫功能,不同品系的裸鼠免疫力有差异,因此肝癌移植成功率也会有所不同,因此人肝癌裸鼠移植时要严格使用同一品系的裸鼠。目前国内外研究者们最常用的是BALB/c-nu/nu裸鼠。近年来也有报道用严重联合免疫缺陷(SCID)鼠(T、B细胞联合免疫缺陷)来代替裸鼠进行人肝癌移植实验^[20-21]。由于SCID鼠几乎完全丧失T和B淋巴细胞免疫功能,也就几乎不具备任何排斥反应,因此肿瘤成活率与生长率更高,但是他们也更易发生感染,死亡率较高,故采用不多。另外,裸鼠的周龄也是影响移植成功的重要因素之一,新生鼠免疫功能尚未完全建立,故肿瘤生长更容易且更迅速,随着裸小鼠周龄的增长或环境因素等(如感染)的影响,裸小鼠体内的正常T细胞可能会增加,免疫力增强从而易于发生排斥反应,故通常选用4-6周龄的裸鼠作为移植模型。裸鼠的性别对肝癌移植模型的建立影响不大。

2.4 生长环境及其他因素的影响 裸鼠是胸腺发育不良而致T细胞免疫缺陷的动物,因而非常易受致病菌感染,如饲养于普通环境,容易受到细菌或病毒感染,受抗原刺激后裸鼠体内的NK细胞、巨噬细胞及抗原提呈细胞等可被大量启动

且数量和活性升高,产生主动免疫力和排斥移植瘤的反应,从而易导致人肝癌移植失败。因此裸鼠宜饲养于无特定病原体(SPF级)的环境中,严格掌握温度和湿度。饥饿、声音、光线等刺激也会影响裸鼠的生长而最终破坏动物模型的建立。另外,当对裸鼠辅以X线照射或免疫抑制剂处理时,可增加移植成功率。

总之,肝癌的基础与临床研究都迫切希望能真正模拟肝癌在人体内自然生长、侵袭及转移全部过程的动物模型。裸鼠由于免疫缺陷使人肝癌组织或细胞移植成为可能,是目前人体外最接近人类肝癌的整体实验模型,而人肝癌完整组织块裸鼠原位移植模型因保留了人肝癌的组织结构特征及具备侵袭转移潜能而成为目前最接近人体内肝癌生物学演化和特性的建模方法,且其造模时间短,成功率高,因此是研究人肝癌生长、侵袭及转移较为理想的模型,如果能严格把握好影响模型成功的几种关键因素,该模型的移植成功率可接近100%。然而裸鼠由于缺乏T细胞免疫功能而难以进行与免疫有关的抗转移研究。

3 参考文献

- 1 Rygaard J. Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77: 761-762
- 2 Shimamoto Y, Kameya T, Nagai K, Hirohashi S, Koide T, Hayashi H, Nomura T. Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1976; 56: 1251-1260
- 3 汤钊猷, 马曾辰, 薛琼, 林芷英, 应越英, 徐元鼎, 孙聆善, 袁新华. 裸鼠人体肝癌移植模型的研究(I): 模型的建立及其血清学与形态学特征. *上海第一医学院学报* 1982; 9: 21-25
- 4 Ma ZC. Transplantation model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. II. Establishment of the LTNM2 human liver cancer model in nude mice and observation on the growth of the transplanted tumor. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1985; 7: 405-407
- 5 Ma H, Liu Y, Liu S, Xu R, Zheng D. Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice. *Hepatology* 2005; 42: 1355-1363
- 6 Zhao J, Zhang X, Shi M, Xu H, Jin J, Ni H, Yang S, Dai J, Wu M, Guo Y. TIP30 inhibits growth of HCC cell lines and inhibits HCC xenografts in mice in combination with 5-FU. *Hepatology* 2006; 44: 205-215
- 7 Li Y, Tang ZY, Tian B, Ye SL, Qin LX, Xue Q, Sun RX. Serum CYFRA 21-1 level reflects hepatocellular carcinoma metastasis: study in nude mice model and clinical patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 515-520
- 8 Sun F, Tang Z, Liu K. Growth pattern and metastatic behaviour of orthotopically metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude

- mice. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1995; 75: 673-675, 710
- 9 Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, Rocken C, Malfertheiner P, Farrell GC. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2006; 43: 134-143
- 10 Gao YS, Chen XP, Li KY, Wu ZD. Nude mice model of human hepatocellular carcinoma via orthotopic implantation of histologically intact tissue. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3107-3111
- 11 Guan M, Rodriguez-Madoz JR, Alzuguren P, Gomar C, Kramer MG, Kochanek S, Prieto J, Smerdou C, Qian C. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res* 2006; 66: 1620-1629
- 12 Ogawa K, Nakanishi H, Takeshita F, Futakuchi M, Asamoto M, Imaida K, Tatematsu M, Shirai T. Establishment of rat hepatocellular carcinoma cell lines with differing metastatic potential in nude mice. *Int J Cancer* 2001; 91: 797-802
- 13 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 630-636
- 14 Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye SL, Liu YK, Tang ZY. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive *in vivo* selection and studies on metastatic characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 460-468
- 15 Gu Y, Zhu CF, Iwamoto H, Chen JS. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6512-6517
- 16 Yang J, Qin LX, Li Y, Ye SL, Liu YK, Gao DM, Chen J, Tang ZY. Molecular cytogenetic characteristics of the human hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 with high metastatic potential: comparative genomic hybridization and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 158: 180-183
- 17 Ip YC, Cheung ST, Leung KL, Fan ST. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6269-6276
- 18 Li Y, Tang Y, Ye L, Liu B, Liu K, Chen J, Xue Q. Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through *in vivo* selection and screening for metastasis-related genes through cDNA microarray. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 43-51
- 19 Li Y, Tang Z, Ye S, Liu Y, Chen J, Xue Q, Huang X, Chen J, Bao W, Yang J, Gao D. Establishment of human hepatocellular carcinoma cell line with spontaneous pulmonary metastasis through *in vivo* selection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 601-605
- 20 Su ZJ, Chen HB, Zhang JK, Xu L. Effects of dendritic cells from cord blood CD34+ cells on human hepatocarcinoma cell line BEL-7402 *in vitro* and in SCID mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2502-2507
- 21 Elinav E, Abd-Elnabi A, Pappo O, Bernstein I, Klein A, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice via leptin, is associated with inhibition of tumor cell growth and natural killer cell activation. *J Hepatol* 2006; 44: 529-536

■同行评价

1995年《中华医学杂志》、1998年《中华外科杂志》、2004年《第四军医大学学报》等都有人肝癌裸鼠移植模型的单一方法学研究报告,但综述不多,本文的刊出对于临床实验有一定的指导意义。

电编 张敏 编辑 张焕兰

氨呼气试验用于幽门螺杆菌感染诊断的可行性

马永健, 刘国卿, 张厚德, 方晴波, 赵海歌

■背景资料

^{13}C , ^{14}C -尿素呼气试验已成为 *H. pylori* 诊断的“金标准”。然而, ^{13}C -UBT 试剂和测量仪器昂贵, 难于普遍开展; ^{14}C 属放射性核素, 用于儿童、孕妇和哺乳期妇女的 *H. pylori* 感染检测则受到顾虑。如果可以通过测量尿素分解产生的另一种产物 NH_3 来诊断 *H. pylori* 感染, 则可用普通非同位素标记尿素代替 ^{13}C , ^{14}C -尿素进行呼气试验, 则既可保持呼气试验无创伤的优点, 又可克服 ^{13}C 或 ^{14}C -尿素呼气试验昂贵或有辐射的缺点, 因此引起人们的关注。

马永健, 刘国卿, 赵海歌, 深圳大学核技术应用联合研究所 广东省深圳市 518060

张厚德, 深圳市第六人民医院消化内科 广东省深圳市 518060

方晴波, 深圳大学理学院应用化学系 广东省深圳市 518060

深圳市2004年科技计划项目资助, No. 200441

通讯作者: 马永健, 518060, 广东省深圳市, 深圳大学核技术应用联合研究所. mayj2345@sina.com

电话: 0755-26536218

收稿日期: 2006-10-08 接受日期: 2006-10-14

Feasibility of ammonia breath test in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection

Yong-Jian Ma, Guo-Qing Liu, Hou-De Zhang, Qing-Bo Fang, Hai-Ge Zhao

Yong-Jian Ma, Guo-Qing Liu, Hai-Ge Zhao, Joint Institute of Applied Nuclear Technology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

Hou-De Zhang, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

Qing-Bo Fang, Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

Supported by the Science and Technology Research Projects of Shenzhen City, No. 200441

Correspondence to: Yong-Jian Ma, Joint Institute of Applied Nuclear Technology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China. mayj2345@sina.com

Received: 2006-10-08 Accepted: 2006-10-14

Abstract

AIM: To investigate the feasibility of ammonia breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.

METHODS: Grounded on the indophenol blue photometric method, the way of breath ammonia sampling, and endpoint judgement for breath ammonia sampling were systematically studied. Directed by optimistic method, the levels of breath ammonia were measured before and after ingestion of 300 mg unlabeled urea in 39 volunteer patients. *H. pylori* infection was determined by ^{14}C urea breath test, and the changes of breath ammonia level before and after ingestion of urea were analyzed.

RESULTS: The breath ammonia levels were

found to increase after ingestion of urea. Although the ammonia changing rate (ACR) of *H. pylori*-positive subjects were not always higher than those of *H. pylori*-negative ones, the mean value of ACR was notably higher than that of *H. pylori*-negative ones. When 90% was selected as the cut-off ACR, the sensitivity, specificity, and accuracy of this test was 79%, 68% and 71.8% (28/39), respectively. The relatively low accuracy might mainly result from the fluctuation of breathe ammonia during sampling.

CONCLUSION: Ammonia breath test is greatly valuable in the diagnosis of *H. pylori* infection, but the method of breath ammonia sampling and the optimal cut-off ACR value may need further studying.

Key Words: Ammonia Breath Test; *Helicobacter pylori*; Ammonia changing rate

Ma YJ, Liu GQ, Zhang HD, Fang QB, Zhao HG. Feasibility of ammonia breath test in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3504-3508

摘要

目的: 探讨氨呼气试验对诊断胃幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 感染的可行性及其应用价值。

方法: 以靛酚蓝比色测氨法为基础, 对呼气氨采集方法以及采气终点判断方法等进行了系统研究。在优化的方案下, 选取39例患者进行服用尿素(300 mg/次)前后的呼气氨检测, 并以 ^{14}C -尿素呼气试验 (^{14}C -UBT) 结果作为 *H. pylori* 感染与否的标准, 考察 *H. pylori* 感染患者服用尿素前后呼气氨变化率之间的关系。

结果: 受检者服用尿素后呼气氨浓度较本底值有升高趋势, 虽然 *H. pylori* 阳性患者的呼气氨变化率并不一定高于 *H. pylori* 阴性患者, 但 *H. pylori* 阳性患者的呼气氨变化率的平均值显著高于 *H. pylori* 阴性患者的呼气氨变化率平均值。若以90%的呼气氨变化率作为 *H. pylori* 感染的判断值, 其诊断的敏感度为79%, 特异度为68%, 准确度为71.8%(28/39), 低准确度可能

主要由呼气氨样本采集过程难控制造成。

结论: 非标记尿素氨呼气试验对于 *H pylori* 的临床诊断具有潜在应用前景, 但呼气氨采集方法的优化设计以及 *H pylori* 临床诊断中呼气氨变化率的最佳判断值方面仍有待于进一步的研究工作。

关键词: 氨呼气试验; 幽门螺杆菌; 呼气氨变化率

马永健, 刘国卿, 张厚德, 方晴波, 赵海歌. 氨呼气试验用于幽门螺杆菌感染诊断的可行性. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3504-3508
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3504.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是一种革兰氏阴性菌, 最早由澳大利亚学者Marshall和Warren发现. 已有研究提示, *H pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌等上消化道疾病关系密切^[1-2], 医学上常采用血清检查、胃镜活检尿素酶分析和C-尿素呼气试验3种方法进行诊断检测^[3-4]. 血清和胃镜分析属侵入性检测方法, 对患者带来一定的伤害且存在准确性较低的缺点, 呼气试验因为具有无创伤、无痛苦和无交叉感染以及高度的准确性的优点而受到患者和临床医生的普遍欢迎. 当前, ¹³C, ¹⁴C-尿素呼气试验(urea breath test, UBT)已成为 *H pylori* 诊断的“金标准”. 美中不足的是, ¹³C-UBT试剂和测量仪器昂贵, 难于普遍开展; ¹⁴C属放射性核素, 用于儿童、孕妇和哺乳期妇女的 *H pylori* 感染检测受到顾虑, 虽然其产生的微量放射性剂量不会对受试者造成不良影响^[5].

尿素呼气试验的原理基于 *H pylori* 具有丰富的尿素酶, 该酶可分解标记尿素产生¹³CO₂/¹⁴CO₂和NH₃, 通过测¹³CO₂/¹⁴CO₂而达到对 *H pylori* 的诊断. 该酶分解标记尿素产生的另一半产物NH₃, 由于测量不便, 一直未引起人们的重视. 随着测量技术的进步, 以测NH₃为手段的非标记尿素呼气试验用于 *H pylori* 的诊断得到了关注. Kearney *et al*^[6]的研究发现, *H pylori* 阳性患者在服用非标记尿素后, 呼气氨的变化率远高于 *H pylori* 阴性患者. Dunn *et al*^[7]的研究表明, 通过服用碱性试剂改变胃液pH值的方法, *H pylori* 阳性患者的呼气氨含量可提升至2-3倍, 提示氨呼气试验可有效应用于胃内 *H pylori* 的诊断检测. 此外, Narasimhan *et al*^[8]还将呼气氨检测应用于示踪肾脏患者的血液透析过程, 发现呼气氨含量变

化与血氨以及肌氨酸酐的含量变化有很好的相关性. 由于呼气氨的含量低(100-2000 ppb), 精确可靠的呼气氨测定方法及其仪器研制仍是研究者探索的主要目标. 当前, 氨呼气试验在诊断 *H pylori* 感染及其在临床上的应用仍处于摸索阶段. 本研究目的在于探讨尿素氨呼气试验用于判断 *H pylori* 感染诊断的可行性. 以靛酚蓝比色测氨法为基础, 对呼气氨的采集方法以及采集终点的判定方法进行了优化设计. 同时, 对39例消化内科患者进行了服用非标记尿素呼气试验, 以¹⁴C-UBT作为 *H pylori* 感染诊断的“金标准”, 探讨了呼气氨含量变化与 *H pylori* 感染与否的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 浓硫酸、氢氧化钠、水杨酸、柠檬酸钠、亚硝基铁氰化钠、次氯酸钠、氯化铵均为广州化学试剂厂产品; ¹⁴C尿素胶囊为深圳市中核海得威生物科技有限公司产品(剂量: 2.775 × 10⁴ Bq/粒); 紫外分光光度计为上海光学仪器厂产品; 气体采样器(自制), 抽气泵、大型气泡吸收管(深圳化试科技有限公司提供).

1.2 方法

1.2.1 靛酚蓝比色法测定氨 靛酚蓝比色测氨法基于以下原理: 空气氨吸收在稀硫酸中, 在亚硝基铁氰化钠及次氯酸钠存在下, 与水杨酸生成蓝绿色的靛酚蓝染料, 根据着色深浅, 用分光光度计比色定量. 本实验呼气氨的测定主要参照GB/T18204.25《公共场所空气中氨检验方法》^[9], 于7支10 mL具塞比色管分别加入含0.00, 0.50, 1.00, 3.00, 5.00, 7.00, 10.00 μg的氨标准工作液(1.00 mg/L)和稀硫酸吸收液(0.005 mol/L), 在各管中依次加入0.50 mL水杨酸溶液(50 g/L, 室温下稳定1 mo), 0.10 mL亚硝基铁氰化钾溶液(10 g/L, 冰箱贮存稳定1 mo)和0.10 mL次氯酸钠溶液(0.05 mol/L, 冰箱贮存稳定2 mo), 混匀, 室温下放置1 h. 用1 cm比色皿, 于波长697.5 nm处, 以水做参比, 测定各管溶液的光密度. 以氨含量(μg)坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准工作曲线.

1.2.2 氨呼气试验 本试验对两种呼气氨采集方法(直接吹气法和抽气泵采集法)进行了比较. 如表1所示, 抽气泵采集法较直接吹气法具有更好的平行性, 其变异系数范围分别为10.8%-47.2%和0.7%-13.4%. 所有氨呼气试验均采用抽气泵收集呼气氨. 当人处于非自然呼吸状态时, 呼气样品中可能携带有空气, 而不全是由肺部呼出

■ 研发前沿

目前, 氨呼气试验研究工作主要在方法研究(尿素剂量、促进氨气排出和采集呼气氨的技巧等)和适用于临床使用的微量氨气测量技术研究两个方面.

■创新盘点

本文将已成为国家标准的空气中的微量氨气的测定方法,通过改进气体采集技术用于呼气氨采集和测定,以探讨氨呼气试验用于诊断 *H pylori* 感染的可行性。

表 1 抽气和吹气法采样平行性比较

采集方法	受检者编号	吸光度1	吸光度2	吸光度3	平均值	变异系数(%)
吹气法(3000 mL)	1	0.388	0.455	0.373	0.405	10.8
	2	0.191	0.268	0.381	0.280	34.1
	3	0.350	0.701	—	0.526	47.2
	4	0.340	0.569	—	0.455	35.6
抽气法(3000 mL)	5	0.152	0.116	0.134	0.134	13.4
	6	0.272	0.289	0.330	0.297	10
	7	0.068	0.055	0.063	0.062	10.6
	8	0.095	0.087	0.089	0.090	4.6

表 2 CO₂归一化法和固定体积法平行性的比较

终点判定法	受检者编号	吸光度1	吸光度2	吸光度3	平均值	变异系数(%)
CO ₂ 归一法	1	0.106	0.096	0.152	0.118	25.3
	2	0.177	0.234	0.423	0.278	46.3
固定体积法(3000 mL)	3	0.340	0.250	0.300	0.297	15.2
	4	0.460	0.423	0.441	0.441	4.2

来的气体。CO₂归一化似可有效的纠正这一偏差,利用海胺高效吸收CO₂的特点,当加入酚酞指示剂的吸收液由红色消退后,即可停止抽气。然而,通过比较CO₂归一化法以及固定采集3000 mL呼气这两种方法(表2),CO₂归一化虽然有固有的优势,但固定体积采样具有更好的测试平行性,故而试验后期统一采集3000 mL样品用于呼气氨测试(至于为什么CO₂归一化反而使平行性变差,可能是海胺吸收液放出的氨气也部分被大型气泡吸收管内的氨吸收液吸收的缘故,需要进一步实验确认原因)。用上述确定的采样和采样量终点判断方法进行氨呼气试验。受检者清晨空腹,用1个内装10 mL稀硫酸吸收液的大型气泡吸收管,首先通空气2 min,在自然呼吸下,通过一改进的抽气泵以0.5 L/min的流量对受试者采集呼气样本3000 mL,此呼气样本用于测定人体呼气氨本底值。受试者服用非标记尿素胶囊2粒(深圳大学核技术应用联合研究所制备,单位剂量:150 mg/粒),分别于15、25和35 min,同上述步骤采集呼气样本3000 mL。取样结束后将呼气样品溶液转入比色管中进行比色测定,用已知标准曲线进行呼气氨的定量分析。试验结果取3次分析的平均值。

1.2.3 ¹⁴C尿素呼气试验 (¹⁴C-UBT)受检者清晨空腹,通过防倒流输液管向装有CO₂吸收指示剂的液闪瓶中吹气,直至瓶中液体由紫红色褪为红色为止(约1-3 min),这一瓶作为测试本底瓶。受

试者服用¹⁴C-尿素胶囊1粒(深圳市中核海得威生物科技有限公司提供,单位剂量:2.775×10⁴ Bq/粒),静坐20 min后,再次同上法,收集呼气作为检测样品瓶。呼气收集结束后,向瓶内加入闪烁液4.5 mL(含7 g/L PPO, 0.5 g/L POPOP的二甲苯液),加盖旋紧,摇匀后待测定。待测液的¹⁴C放射性活性通过TriCarb-22200CA型液闪仪(美国PACKARD公司)测定完成。样品测试2 min,得出cpm数,经淬灭校正后得dpm数,样品瓶与本底瓶的dpm之差再除以2,则得每例受检者的dpm/mmol CO₂值,以dpm/mmol CO₂值≥100判定为 *H pylori* 阳性^[10]。

2 结果

受检者服用尿素后呼气氨浓度较本底值有升高趋势,虽然 *H pylori* 阳性患者的呼气氨变化率并不一定高于 *H pylori* 阴性患者,但 *H pylori* 阳性患者的呼气氨变化率的平均值显著高于 *H pylori* 阴性患者的呼气氨变化率平均值。若以90%的呼气氨变化率作为 *H pylori* 感染的判断值,其诊断的敏感度为79%,特异度为68%,准确度为71.8% (28/39),低准确度可能主要由呼气氨样本采集过程难控制造成(图1,表1-2)。

3 讨论

3.1 服用尿素后呼气氨的含量变化 基于尿素酶分解尿素产氨的反应, *H pylori* 阳性患者在服用

尿素胶囊后其呼气氨含量会显著增高. 正常人服用尿素后主要通过肾脏随尿直接排除, 部分尿素被肠道细菌分解产生氨气, 氨气进入血液循环后经肺排出. 因此 *H pylori* 阴性患者在服用尿素胶囊后其呼气氨也会有相应的增高. 图1为 *H pylori* 阳性患者服用非标记尿素后呼气氨吸光度随时间的变化, 由图可见, 呼气氨的含量在患者服用尿素胶囊后呈上升趋势. 在 ^{14}C -UBT 试验中, 呼气 $^{14}\text{CO}_2$ 的含量在15 min后达到峰值^[10]. 本研究临床试验选择患者在服用尿素15、25和35 min后分别采集呼气氨样品(3000 mL), 并取3次的平均值作为服用尿素后呼气氨含量(用以计算呼气氨变化率).

3.2 呼气氨变化率与临床 *H pylori* 感染诊断 根据患者在服用非标记尿素后呼气氨增幅上的差异对于判别胃肠 *H pylori* 感染具有潜在的应用前景^[6-7]. 本试验对39例消化内科门诊检查患者进行了服用非标记尿素的氨呼气试验, 患者年龄介于17-64岁之间(平均34岁), 其中男性患者22名, 女性患者17名. ^{14}C 尿素呼气试验的结果显示, 受检者当中 *H pylori* 阳性、阴性患者分别为14和25例. 研究发现, 患者服用尿素后呼气氨浓度较本底值有升高趋势, 其呼气氨变化率介于33%-900%之间, 虽然 *H pylori* 阳性患者的呼气氨变化率并不一定高于 *H pylori* 阴性患者, 但 *H pylori* 阳性患者的呼气氨变化率的平均值(232.2%)显著高于 *H pylori* 阴性患者的呼气氨变化率平均值(89.8%), 提示氨呼气试验对于判定患者有无 *H pylori* 感染是可行的. 若以90%的呼气氨变化率作为 *H pylori* 感染的判断值, 其诊断的敏感度为79%, 特异度为68%, 准确度为71.8% (28/39).

显然, 71.8%的准确度难以满足临床诊断的要求. 在对同一患者(*H pylori* 阳性)的氨呼气试验过程中发现, 患者在不同时间段的呼气氨变化率波动较大. 在呼气采集过程中, 受试者呼吸的频度、深度等均会发生变化, 故不同次采集同样体积的呼气中所含的氨气量就会有较大的波动. 推测, 呼气氨诊断试验中的低准确度可能主要是由呼气氨样本采集过程难控制造成的. 为此, 对呼气氨采集方法的进一步优化是下一步工作的重点内容. 如采用无氨的 CO_2 吸收剂来改进 CO_2 归一化法, 或者采用在线即时测量仪器等, 均有可能消除每个受检者呼吸不一致性造成的对结果平行性的影响. 另外, 虽然 Dunn *et al*^[7] 的研究表明, 通过服用碱性试剂改变胃液pH值的

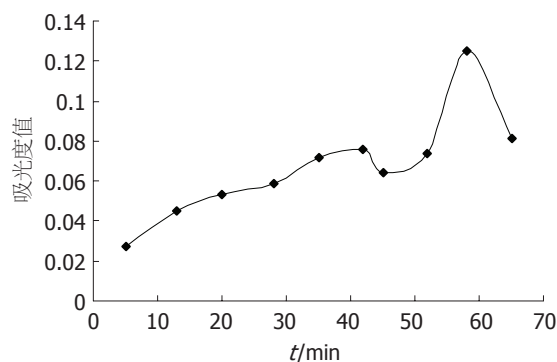


图1 *H pylori* 阳性患者服用非标记尿素后呼气氨吸光度随时间的变化.

■应用要点

氨呼气试验如经改进可用于胃内 *H pylori* 感染诊断, 则既可保持 ^{13}C , ^{14}C -尿素呼气试验无创伤的优点, 又可克服他们或昂贵或有辐射的缺点, 具有临床应用前景.

方法, *H pylori* 阳性患者的呼气氨含量可提升至2-3倍, 但我们在上述39例之外另做过20例碱化胃液试验, 未发现碱化可提高呼气氨变化率, 原因有可能还是被呼气采集不可控造成的波动掩盖, 或者碱化确实不影响肺部而来的氨气(不是从食道逸出的).

3.3 影响人体呼气氨的因素 呼气氨主要系指从肺部而来的氨气, 包括气道生成氨和由血弥散入肺泡的氨. 通常来说, 体内氨主要来源于以下3个途径: (1)氨基酸的代谢分解(内源性氨); (2)肠道吸收氨(外源性氨); (3)肾脏产氨. 在正常生理情况下, 体内的来源与去路保持动态平衡, 氨在肝中通过鸟氨酸循环合成尿素并通过肾脏随尿排出, 这是体内氨的主要消除途径, 少部分氨以铵盐形式由尿排出.

呼气氨主要受制于消化道产氨和胃肠道产氨的影响, 此外, 空气氨污染本底对呼气氨有一定的贡献; 口咽部细菌的代谢产氨作用也不可忽略. 由于氨气可以自由透过细胞膜而 NH_4^+ 不能, 碱性环境(体液)往往可增加氨气从肠道的吸收并减少 NH_4^+ 从肾脏排泄, 导致血氨升高. 胃肠道每天产氨约4 g, 是血氨的主要来源. 当肝功能严重损伤时, 尿素合成发生障碍, 可导致血氨浓度升高, 进而影响呼气氨的含量.

非标记尿素氨呼气试验对于 *H pylori* 感染的临床诊断具有潜在的应用前景. 通过39例消化内科患者的临床试验发现, 患者服用尿素后呼气氨浓度较本底值有升高趋势, 虽然 *H pylori* 阳性患者的呼气氨变化率并不一定高于 *H pylori* 阴性患者, 但 *H pylori* 阳性患者的呼气氨变化率的平均值显著高于 *H pylori* 阴性患者的呼气氨变化率平均值, 提示氨呼气试验对于判定患者有无 *H pylori* 感染是可行的. 若以90%的呼气氨变化率作为 *H pylori* 感染的判断值, 其诊断的

■名词解释

氨呼气试验: 通过测定呼气中的氨气含量来诊断疾病的一种无创伤诊断技术, 目前氨呼气试验尚处于探讨研究过程中。

敏感度为79%, 特异度为68%, 准确度为71.8% (28/39)。低准确度可能主要由呼气氨样本采集过程难控制造成, 如何改进呼气氨采集方法以及确定*H. pylori*临床诊断中呼气氨变化率的最佳判断值仍有待于进一步的研究工作。

4 参考文献

- 1 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000; 8: 206-207
- 2 林辉, 任建林. 幽门螺杆菌与胃黏膜保护研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2586-2590
- 3 孙涛, 叶剑雄, 马桂香, 崔立红, 刘超群, 浦江, 付山峰, 江骥. ¹³C-尿素呼气试验诊断胃幽门螺杆菌感染. 世界华人消化杂志 2000; 8: 270
- 4 Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 489-496

- 5 马永健, 张培信. 碳[¹⁴C]尿素呼气试验的辐射剂量估算与风险评价. 深圳大学学报理工版 2004; 21: 39-42
- 6 Kearney DJ, Hubbard T, Putnam D. Breath ammonia measurement in *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2523-2530
- 7 Dunn C.D.R, Black M, Cowell D.C, Penault C, Ratcliffe N.M, Spence R, Teare C. Ammonia vapour in the mouth as a diagnostic marker for *Helicobacter pylori* infection: preliminary 'proof of principle' pharmacological investigations. *Br J Biomed Sci* 2001; 58: 66-75
- 8 Narasimhan LR, Goodman W, Patel CK. Correlation of breath ammonia with blood urea nitrogen and creatinine during hemodialysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4617-4621
- 9 公共场所空气中氨检验方法. 国家标准GB/T18204.25-2000
- 10 马永健, 张厚德, 陈观榕, 叶平. 在诊断HP的¹⁴C-UBT中¹⁴C-尿素的最低有效活度的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 1997; 6: 157-159

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 ●

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办, 现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗: 新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性; (2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果; (3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理; (4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理; (5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值; (6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力。

2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并请在信封上注明“会议征文”。截稿日期: 2007-01-31。正式代表发论文证书并授一级继续教育学分。来稿请寄:《中华肝胆外科杂志》编辑部。

3 联系方式

地址: 北京市复兴路28号; 邮编: 100853; 电话: 010-66936223; 电传: 010-68177009; E-mail: zhgdwkzz@vip.163.com; 详情请登陆网站: www.zhgdwkzz.net.

噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白

陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖

陈京龙, 魏红山, 张黎颖, 北京地坛医院 北京市 100011
刘霞, 山东大学2004级硕士研究生 山东省济南市 250013
通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市东城区安定门外大街地坛公园13号, 北京地坛医院病毒研究室. ddriver@163.com
电话: 010-64211031-2358
收稿日期: 2006-08-27 接受日期: 2006-09-25

Screening of serum protein of cryptogenic hepatitis binding protein by phage display system

Jing-Long Chen, Hong-Shan Wei, Xia Liu, Li-Ying Zhang

Jing-Long Chen, Hong-Shan Wei, Li-Ying Zhang, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Xia Liu, Postgraduate in Medical College of Shandong University, Jinan 250013, Shandong Province, China
Correspondence to: Hong-Shan Wei, Department of Virology, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Andingmenwai Street, East District, Beijing 100011, China. ddriver@163.com
Received: 2006-08-27 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To investigate the pathogenesis of cryptogenic hepatitis (CH) by screening its binding protein of serum protein.

METHODS: Using serum protein of cryptogenic hepatitis as the selective molecule, T7 select phage from human liver cDNA library was bio-panned and the positive clones were selected 5 times. After polymerase chain reaction of bacteriophage plaque, the DNA fragments of the screened clones were sequenced, and the amino acid sequence of target protein was compared with protein sequence database from BLAST in GenBank.

RESULTS: After bioamplification for 5 times, 24 positive clones were obtained from 60 clones screened randomly. The sequence of the positive clones were researched for homology, and Homo sapiens hepatitis V virus NS5A trans-regulated protein 13 was ascertained as the serum protein of CH-binding protein, which was located at liver.

CONCLUSION: Serum CH protein is interacted with Homo sapiens hepatitis V virus NS5A trans-regulated protein 13 in liver, which plays an important role in the pathogenesis and treatment of CH.

Key Words: Cryptogenic hepatitis; Binding protein; Serum protein; Hepatitis C virus; Phage display system

Chen JL, Wei HS, Liu X, Zhang LY. Screening of serum protein of cryptogenic hepatitis binding protein by phage display system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3509-3512

摘要

目的: 通过筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白, 为隐源性肝炎的发病机制研究探索新途径。

方法: 应用噬菌体表面展示技术, 将隐源性肝炎患者血清作为固相筛选蛋白, 用噬菌体正常人肝细胞T7 cDNA文库进行5轮生物筛选, 经噬斑PCR, 对筛选克隆进行DNA序列分析, 将推断的氨基酸序列在蛋白质库中进行搜索, 自GenBank中获得结合蛋白的cDNA和基因组的全长序列, 然后再探讨该蛋白在隐源性肝炎发病机制中的作用。

结果: 噬菌体经过5轮生物富集后, 从随机筛选的60个克隆中得到24个阳性克隆, 经序列测定后进行同源搜索, 初步确定人类HCV NS5A转化调节蛋白13(NS5ATP13)为人体肝脏中固有的与隐源性肝炎血清蛋白结合的蛋白。

结论: 应用T7 cDNA噬菌体表面展示技术, 我们发现隐源性肝炎血清蛋白与人类肝细胞HCV NS5A转化调节蛋白13相互作用, 在隐源性肝炎发生及抗病毒治疗有重要意义。

关键词: 隐源性肝炎; 血清蛋白; 结合蛋白; 丙型肝炎病毒; 噬菌体表面展示技术

陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖. 噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白. *世界华人消化杂志* 2006;14(36):3509-3512
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3509.asp>

■背景资料

隐源性肝炎是肝炎病毒学指标阴性并排除常见肝病的一类肝损害, 之前有学者提出新型病毒感染、自身免疫性肝炎等病因学说, 至今仍无法判断感染或非感染因素在其肝损害发病过程中作用。由于隐源性肝炎发病率较高, 且病因尚不明确, 目前隐源性肝炎的病原学研究成为该方面研究热点, 开展对隐源性肝炎发病机制的研究对隐源性肝炎的临床有很好的指导意义。

■创新盘点

本研究应用的T7 cDNA噬菌体展示文库是目前先进的结合蛋白高通量筛选方法,避免了一些体内环境的干扰,在体外真实而单一的模拟出肝细胞编码蛋白的情况,经与固相靶蛋白(隐源性肝炎血清蛋白)结合,筛选出其结合蛋白,为下一步机制研究提供新思路。

0 引言

隐源性肝炎(cryptogenic hepatitis)又称特发性肝炎(idiopathic hepatitis)、未分类肝炎(unclassified hepatitis),临床上专指不能用感染(常见为病毒感染)、脂肪代谢、药物以及肝脏肿瘤、淤血等常见肝病病因解释的一类肝损害。之前有学者曾提出新型病毒感染、自身免疫性肝炎等病因学假说,至今仍无法判断感染或非感染因素在其肝损害发病过程中作用。有研究指出,病毒等病原体基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间相互作用,可能是病原体致病的重要分子机制^[1]。因此,本研究拟采用隐源性肝炎患者血清蛋白为固相靶分子,用噬菌体表面展示的人肝细胞cDNA文库来筛选特异的血清蛋白结合蛋白,以探讨隐源性肝炎发病的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料 T7 select人类肝脏cDNA噬菌体展示文库购自Novagen公司,应用菌株为BLT5615。PCR相关试剂、异丙基2β2D硫代半乳糖苷(IPTG)购自华美生物公司。胰蛋白胨和酵母提取物为Oxoid公司产品。其他试剂均为国产分析纯。所用10例隐源性肝炎血清标本选自北京地坛医院2005-03/2006-03住院患者。每例样本均为HBV、HCV病毒标志物检测阴性,血清免疫指标检测阴性,且无长期大量饮酒史的肝炎患者。对照组20例为健康查体者。

1.2 方法

1.2.1 T7 select人类肝脏cDNA噬菌体文库生物筛选扩增 T7 select人肝脏cDNA噬菌体展示文库用于筛选。取混合后的肝炎血清80 μL,加入320 μL包被液震荡混匀,包被于24孔板,4℃ 48 h后,1×TBST(含1 mL/L体积Tween-20)洗涤5遍,加入T7 select人肝脏cDNA噬菌体展示文库,4℃过夜;洗涤后,加入T7洗脱缓冲液洗脱;将噬菌体洗脱液10 μL加入BLT5615菌中扩增,收获细菌裂解液作为扩增噬菌体文库以用于下一步筛选,再取混合后的正常血清80 μL,加入320 μL包被液震荡混匀,包被于24孔板4℃ 48 h后,1×TBST洗涤5遍,加入前一步细菌裂解液用于筛选。上述两步生物筛选为1轮。重复上述生物筛选步骤,共筛选5轮。

1.2.2 噬斑PCR扩增 5轮筛选后的噬菌体洗脱液加入BLT5615扩增,选择适当滴度铺于LB平板,挑取单个噬斑置于100 mmol/L IPTG诱导后的BLT5615,37℃裂解细菌,最后以此裂解液作为

表 1 噬菌体生物富集结果

筛选轮数	投入量 (pfu/L)	产出量 (pfu/L)	产出率(%)
1	1×10^{12}	3×10^{13}	30.00
2	3×10^{13}	4×10^{13}	1.30
3	4×10^{13}	5×10^{12}	0.13
4	5×10^{12}	4×10^{12}	0.80
5	4×10^{12}	3×10^{12}	0.75

产出率 = 洗脱的噬菌体数量/投入的噬菌体数量。

PCR模板扩增插入的外源性cDNA片段。T7重组噬菌体中插入片断引物: sense: 5'-TTATCGGATA ACCCTTTATA-3', antisense: 5'-CCCTCAAGACC CGTTTAGAG-3'。由上海生物工程公司合成。PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s; 50℃退火50 s; 72℃延伸1 min; 共35个循环; 之后72℃总延长10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR扩增结果。

1.2.3 测序及同源性分析 PCR产物经琼脂糖电泳筛选合适的条带,送生物公司进行DNA序列测定(北京英俊生物公司)。根据测序结果判断其开放性读码框架(ORF),将获得的推断的核苷酸序列在美国国立卫生院GenBank数据库BLASTn进行同源性序列比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>),最终判定相关蛋白的性质、基因组序列及该基因在染色体中的定位等。

2 结果

2.1 T7 select肝细胞cDNA文库的筛选 以隐源性肝炎患者血清蛋白作为固相支持分子,对人类正常肝细胞cDNA文库进行5轮“包被-结合-洗脱-扩增”筛选。固相平板洗脱下的噬菌体数量呈现明显增加趋势,均可达到 10^9 数量级以上。噬菌体的投入及产出情况见表1。

2.2 测序结果的初步分析 经过60个噬斑PCR筛选序列测定,获得7个测序结果,将推断的核苷酸序列经GenBank数据库BLAST软件分析得到3个克隆编码18-1基因结构与人类HCV NS5A转化调节蛋白13基因区高度同源(同源性为100%)。经对比研究,我们确定人类HCV NS5A转化调节蛋白13为人体肝脏所固有的,与隐源性肝炎血清蛋白相结合的候选蛋白。该蛋白包含700个氨基酸,其基因位于10号染色体长臂24.32区(10q24.32),cDNA全长2103 bp。

3 讨论

隐源性肝炎是一类甲、乙、丙、丁、戊5型肝炎病毒学指标阴性的(急或慢性)肝炎,总发患者

数约有9万人, 占肝炎总数的11.5%。隐源性肝炎的病原学指标一直未能明确, 因此, 国内外学者以病因学为其命名-“不明原因肝炎”^[2-4]。根据2000年召开的第十次全国病毒性肝炎和肝病会议对隐源性肝炎的定义, 本实验选取肝炎病毒学指标阴性的患者血清, 同时排除常见的肝病病因: 自身免疫性肝炎(自身抗体阴性)、脂肪性肝病(酒精性、糖尿病)、药物性肝病、先天性肝病等。应用T7 select肝细胞噬菌体文库能将正常肝细胞的蛋白表达于其表面的特性与亲和选择相结合的技术^[5-6], 研究隐源性肝炎血清蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用, 继而探明其发病机制。经5轮生物筛选富集, 发现人类HCV NS5A 转化调节蛋白13(NS5A_{TP13})可能为人体肝脏中固有的与隐源性肝炎血清蛋白结合的候选蛋白。HCV NS5A基因(位于6258-7601 bp之间)编码的58 kDa的NS5A蛋白属丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白, 在HCV RNA病毒的复制过程中起关键作用^[7]。HCV NS5A本身作为转录反式激活因子, 能够激活转录因子STAT3, NF- κ B, 在细胞的炎症反应、肿瘤发生及转移过程中均起重要作用^[8-9]。本实验通过对病毒学指标阴性的肝炎患者血清进行T7 select肝细胞噬菌体cDNA文库筛选发现HCV NS5A基因的转化调节蛋白13上调, 认为可能是间接通过HCV调节基因-NS5A调节肝细胞转录、信号转导以及HCV病毒复制等途径导致肝损伤^[10-13]。洪源 *et al*^[14]通过基因表达谱芯片技术对HCV NS5A基因反式调节基因的研究也证实上调的基因中包括细胞生长、炎症发生、肿瘤发生的相关调节基因。研究表明, 在NS5A上还存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 能够与肝细胞中干扰素(IFN)刺激蛋白-双链RNA依赖的激酶(PKR)相互作用, 通过抑制PKR的功能, 下调IFN引起的抗病毒反应, 这也从理论上证实临床上隐源性肝炎容易对IFN无应答的原因^[15-16]。对于血清学检测中HCV病毒学阴性者, 我们仍不能完全排除丙型肝炎。针对本实验筛选的3个阳性克隆均为NS5A转化调节蛋白13, 而临床检测中病毒标志物阴性, 我们考虑丙型肝炎可能性大: 丙型肝炎抗体的阳性率尚受机体免疫功能状态影响, 少数患者抗体滴度比较低, 影响检测结果, 对丙型肝炎病毒抗体阴性、有输血史和反复ALT异常的患者应当采用丙型肝炎病毒结构和非结构蛋白做免疫印迹, 提高检出率, 该检测为目前丙型肝炎病毒抗体的最敏感的方法之一^[3]。

本研究发现, 隐源性肝炎患者血清蛋白与人类肝细胞HCV NS5A转化调节蛋白13相互作用, 对隐源性肝炎肝细胞损伤发生机制的研究, 以及指导临床干扰素抗病毒治疗都有重要的意义。

4 参考文献

- 1 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003; 124: 327-334
- 2 Quiros-Roldan E, Torti C, Carosi G. The novel non-A, non-E hepatitis viruses and their pathogenic effect. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 552-554
- 3 缪晓辉. 隐源性肝炎诊治方面的若干问题. *肝脏* 2001; 6: 74-78
- 4 Menon KV, Zein NN. What do we need to know about non-A-to-E viral hepatitis? *Curr Gastroenterol Rep* 2000; 2: 33-39
- 5 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前S1蛋白结合蛋白筛选. *世界华人消化杂志* 2002; 27: 321-322
- 6 钟彦伟, 成军, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白抗原模拟表位. *世界华人消化杂志* 2003; 28: 34-36
- 7 Amemiya F, Maekawa S, Enomoto N. Interferon resistance and ISDR (interferon sensitivity determining region). *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1249-1253
- 8 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9599-9604
- 9 Waris G, Tardif KD, Siddiqui A. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1425-1430
- 10 Nunez O, Fernandez-Martinez A, Majano PL, Apolinario A, Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Lopez-Cabrera M, Bosca L, Clemente G, Garcia-Monzon C, Martin-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 2004; 53: 1665-1672
- 11 Choi SH, Hwang SB. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem* 2006; 281: 7468-7478
- 12 Girard S, Vossman E, Misek DE, Podevin P, Hanash S, Brechot C, Beretta L. Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 2004; 40: 708-718
- 13 Nunez O, Fernandez-Martinez A, Majano PL, Apolinario A, Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Lopez-Cabrera M, Bosca L, Clemente G, Garcia-Monzon C, Martin-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins.

■应用要点

本研究发现, 隐源性肝炎患者血清蛋白与人类肝细胞HCV NS5A转化调节蛋白13相互作用, 对隐源性肝炎肝细胞损伤发生机制的研究, 以及指导临床干扰素抗病毒治疗都有重要的意义。

■同行评价

该研究方法先进, 有创新性, 结果有重要的理论和实用价值.

- Gut* 2004; 53: 1665-1672
- 14 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 939-942
- 15 Kmiecik D, Kruszyna L, Migdalski P, Lacinski M, Juszczak J, Trzeciak WH. Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV-chronically infected patients and their effect on the result of treatment. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 92-99
- 16 Gervain J, Czibula A, Simon J, Kalmar T. Structural analysis of the PKR-binding region of HCV 1b samples from patients with chronic hepatitis C and the correlation with IFN-sensitivity. *Orv Hetil* 2003; 144: 1179-1184

电编 李琪 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 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10

PBC患者granulysin基因和蛋白的表达及临床意义

邓安梅, 钱玲, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前

邓安梅, 钱玲, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前, 第二军医大学附属长征医院实验诊断科、全军临床免疫中心 上海市 200003
上海市重点科研支撑项目, No. 051409012
上海市重点基础研究项目, No. 05JC14052
通讯作者: 仲人前, 200003, 上海市凤阳路415号, 第二军医大学附属长征医院实验诊断科. rqzhong@yahoo.com
电话: 021-63610109-73631 传真: 021-33110236
收稿日期: 2006-05-31 接受日期: 2006-08-10

Expression of granulysin in patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance

An-Mei Deng, Cheng Qian, Ding-Kang Yao, Yan Chen, Bo Chen, Ye Zhou, Ming-Li Gu, Chuan-Yong Wu, Ting-Wang Jiang, Ren-Qian Zhong

An-Mei Deng, Cheng Qian, Ding-Kang Yao, Yan Chen, Bo Chen, Ye Zhou, Ming-Li Gu, Chuan-Yong Wu, Ting-Wang Jiang, Ren-Qian Zhong, Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University; Clinical Immunology Center of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Supported by the Key Sustaining Scientific Research Program of Shanghai Municipality, No. 051409012, and the Key Basic Research Foundation of Shanghai Municipality, No. 05JC14052

Correspondence to: Ren-Qian Zhong, Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. rqzhong@yahoo.com
Received: 2006-05-31 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To explore the serum expression of granulysin mRNA and protein in patients with primary biliary cirrhosis (PBC).

METHODS: Patients with PBC ($n = 60$), hepatitis B related cirrhosis ($n = 60$), and healthy controls ($n = 100$) were included in this study. Based on TaqMan fluorescent probe technique, real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the expression of granulysin mRNA, using 18S rRNA as the internal control. The level of granulysin protein was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: The mean copy number of granulysin mRNA was significantly higher in PBC patients than that in healthy controls [$(2.7 \pm 2.5) \times 10^8$ vs $(3.0 \pm 1.9) \times 10^7$, $P < 0.01$] or patients with hepatitis B related cirrhosis [$(2.7 \pm 2.5) \times 10^8$ vs $(4.7 \pm 3.6) \times 10^5$, $P < 0.001$]. Meanwhile, the serum level of granulysin protein was also markedly higher in PBC patients than that in healthy controls (15.48 ± 3.24 $\mu\text{g/L}$ vs 4.76 ± 2.32 $\mu\text{g/L}$) or patients with hepatitis B related cirrhosis (15.48 ± 3.24 $\mu\text{g/L}$ vs 2.57 ± 1.84 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$).

sin mRNA was significantly higher in PBC patients than that in healthy controls [$(2.7 \pm 2.5) \times 10^8$ vs $(3.0 \pm 1.9) \times 10^7$, $P < 0.01$] or patients with hepatitis B related cirrhosis [$(2.7 \pm 2.5) \times 10^8$ vs $(4.7 \pm 3.6) \times 10^5$, $P < 0.001$]. Meanwhile, the serum level of granulysin protein was also markedly higher in PBC patients than that in healthy controls (15.48 ± 3.24 $\mu\text{g/L}$ vs 4.76 ± 2.32 $\mu\text{g/L}$) or patients with hepatitis B related cirrhosis (15.48 ± 3.24 $\mu\text{g/L}$ vs 2.57 ± 1.84 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Granulysin expression is associated with the occurrence and progression of PBC, which can help to make diagnosis for PBC.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Granulysin; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Deng AM, Qian C, Yao DK, Chen Y, Chen B, Zhou Y, Gu ML, Wu CY, Jiang TW, Zhong RQ. Expression of granulysin in patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3513-3516

摘要

目的: 探讨颗粒溶素(granulysin, GNLY)在原发性胆汁性肝硬化和患者(PBC)中的表达及其意义。

方法: 采用TaqMan探针技术, 以18S rRNA为内参照, 测定60例PBC患者外周血中GNLY mRNA的含量, 同时应用酶联免疫吸附法(ELISA), 检测PBC患者血清中GNLY蛋白的水平, 并以健康体检组($n = 100$)和乙型肝炎肝硬化组($n = 60$)为对照。

结果: PBC组GNLY mRNA的平均拷贝数显著高于健康对照组 $[(2.7 \pm 2.5) \times 10^8$ vs $(3.0 \pm 1.9) \times 10^7$, $P < 0.01$]和乙型肝炎后肝硬化组 $[(2.7 \pm 2.5) \times 10^8$ vs $(4.7 \pm 3.6) \times 10^5$, $P < 0.001$]。PBC患者血清中的GNLY蛋白表达显著高于健康对照组(15.48 ± 3.24 $\mu\text{g/L}$ vs 4.76 ± 2.32 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)和乙型肝炎后肝硬化组(15.48 ± 3.24 $\mu\text{g/L}$ vs 2.57 ± 1.84 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)。

结论: GNLY的表达与PBC的发生、发展存在

■背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种原因不明的自身免疫性肝病, 病理表现为非化脓性肝内胆管慢性炎症和汇管区淋巴细胞浸润, 典型的症状为黄疸、慢性瘙痒和皮肤黄色瘤。CD₈⁺T细胞介导的免疫反应参与PBC中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程。CTL介导的免疫反应参与PBC中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程。颗粒溶素(GNLY)是由激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)产生的一种阳离子蛋白质, 能够杀伤广谱的微生物。GNLY还能够激活单核细胞产生细胞因子, 对免疫细胞产生趋化作用。外周血GNLY水平可能作为体内细胞毒活性的标志之一。

■应用要点

本文研究结果提示,GNLY表达水平可能作为PBC病程监测及判断预后的指标,为临床治疗提供一定的依据.

一定的相关性,可用于PBC临床诊断.

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 颗粒溶素; 逆转录-聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定法

邓安梅, 钱静, 姚定康, 陈燕, 陈波, 周晔, 谷明莉, 吴传勇, 蒋廷旺, 仲人前. PBC患者granulysin的基因和蛋白的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3513-3516
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3513.asp>

0 引言

颗粒溶素(granulysin, GNLY)是由激活的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和自然杀伤细胞(natural killer, NK)产生的一种阳离子蛋白质,能够杀伤微生物和肿瘤细胞^[1]. GNLY同时还是一种化学诱导剂,能够激活单核细胞产生细胞因子或化学增殖素^[2]. CTL是特异性细胞免疫应答的主要效应细胞,在CTL中起主要作用的是CD₈⁺CTL. 原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种原因不明的自身免疫性肝病,病理表现为非化脓性肝内胆管慢性炎症和汇管区淋巴细胞浸润,典型的症状为黄疸、慢性瘙痒和皮肤黄色瘤. CD₈⁺T细胞介导的免疫反应参与PBC中胆管上皮细胞和肝细胞破坏的发病过程^[3]. 近几年,我国PBC的发病率逐年增加. 我们通过本实验室成功建立的GNLY FQ-PCR和ELISA方法检测外周血中GNLY基因mRNA和蛋白的表达,分别从转录和翻译水平探讨GNLY与PBC发生、发展的相关性,为辅助临床诊断提供一定的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 临床确诊的PBC患者60例均为长征医院住院患者,诊断符合美国肝病学会(AASLD)2000年推荐的PBC诊断标准^[4],男5例,女55例,男女比例为1:11,发病年龄45.6±10.2岁. 疾病对照组为确诊乙型肝炎肝硬化失代偿60例,男42例,女18例,年龄45.6±15.2岁. 正常对照组为健康体检者100例,年龄、性别与PBC相匹配. RNeasy Mini Kit(QIAGEN), TaqMan 2×PCR Master Mix, Taqman Reverse Transcription Regents(Applied Biosystem), 鼠抗人GNLY mAb(DH4α, 由斯坦福大学提供), 兔抗人GNLY多克隆抗体(本实验室保存), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG(Serotec公司), GeneAmp 7900 Sequence Detection Systems(美国PE Biosystems公司), 550型酶

联免疫检测仪(Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad公司). 依据GenBank人18S rRNA和GNLY的基因序列设计引物和探针用于荧光定量PCR检测. 内参18S rRNA上游引物: 5'ACATCCAAGGAAGGCAGCAG3'; 下游引物: 5'TTCGTCACCTACCTCCCCGG3'; 探针: FAM CGCGCAAATTACCCACTCCCGA TAMRA. GNLY上游引物: 5'ACTGAAGAAGATGGTGGATAAGCC3'; 下游引物: 5'GCCCTGGGTAACTCTAGACTGA3'; 探针: FAM CGGAACCTCCAGTCAGAAGACCAGA TAMRA.

1.2 方法

1.2.1 FQ-PCR测GNLY的表达 枸橼酸钠(1:9)抗凝血5 mL, 无菌分离外周血单个核细胞(PBMC). 按试剂盒说明提取细胞总RNA, 反转录按试剂说明书操作, 反转录条件为42℃ 45 min, 94℃ 3 min终止反应. 体系如下: RNA 2.85 μL, 10×Taqman RT Buffer 1.0 μL, 40 mmol/L Magnesium Chloride 2.2 μL, deoxyNTPS Mixture 2.0 μL, Random Hexamers 0.5 μL, RNAase Inhibitor 0.2 μL, MultiScribe Reverse 0.25 μL, 无RNA酶水1.0 μL, 共10 μL的反转录体系. 产物cDNA保存于-20℃备用. 扩增后, PCR产物纯化后与pMD18-T载体连接并鉴定, 转化感受态细胞DH5α, 经蓝白斑筛选, 对阳性克隆进行双酶切鉴定并测序, 得到重组质粒pMD18T-GNLY, pMD18T-18S rRNA. 将提取质粒测定A值, 按公式换算出拷贝数, 用TE缓冲液以1:10比例稀释成1×10³-1×10⁸拷贝. 标准品质粒模板分别进行荧光定量PCR扩增, 建立标准曲线. 扩增条件为50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min 40个循环, 最后由扩增仪计算出各样本基因的拷贝数.

1.2.2 ELISA检测血清中GNLY 将抗人GNLY mAb包被于96孔微孔板中4℃过夜, 加入含10 mL/L牛血清白蛋白(BSA)的10 mmol/L PBS(pH 7.4), 4℃过夜. 用含0.2 mL/L Tween20的PBS洗涤, 分别加入标准品、正常人和患者血清, 置37℃孵育1 h后洗涤, 再分别加入GNLY多克隆抗体和HRP标记的羊抗兔IgG, 置37℃恒温孵育1 h, DAB/H₂O₂显色20 min后加入H₂SO₄终止反应, 最后在酶标仪上450 nm处比色.

统计学处理 计量资料用mean±SD、变异系数(CV)来表示, 多组资料之间比较用方差分析, 两组之间比较采用t检验, P<0.05认为有统计学意义.

表 1 各实验组GNLY mRNA含量的定量检测结果(mean \pm SD, $n = 60$, 拷贝/ μ g RNA)

分组	表达量	均值
PBC	$5.35 \times 10^7 - 4.61 \times 10^9$	$(2.7 \pm 2.5) \times 10^{8b}$
乙型肝炎肝硬化	$6.74 \times 10^4 - 3.80 \times 10^6$	$(4.7 \pm 3.6) \times 10^{5d}$
正常对照	$9.28 \times 10^5 - 7.32 \times 10^7$	$(3.0 \pm 1.9) \times 10^7$

^b $P < 0.01$ vs 正常对照; ^d $P < 0.001$ vs 正常对照.

2 结果

2.1 绘制标准曲线和设定内参照 将各稀释度的阳性标准模板同时进行定量PCR检测, 产物进入指数增长期的起始点即阈循环(cycle threshold, CT)值作为检测的临界点. 在这一区间内CT值与起始模板量的对数呈反比关系. 横轴代表起始拷贝数的对数(log10), 纵轴代表对应的CT值, GNLY标准曲线相关系数达到0.996(图1). 以18S rRNA为内对照, 18S rRNA基因的CT值在14-18之间的认为是有效标本, 确保RNA反转录效率的一致性.

2.2 GNLY mRNA的表达 所有标本均重复检测2次取均值, 根据软件所得基因拷贝数和各样本RNA浓度, 将结果换算为拷贝数/ μ g RNA. 各组GNLY mRNA含量的定量检测结果如表1所示, PBC组GNLY mRNA的表达量显著高于正常对照组($P < 0.01$), 而乙型肝炎肝硬化组显著低于正常对照组($P < 0.001$).

2.3 ELISA检测血清中GNLY 所有标本和标准品均作2孔, 取2孔平均 A_{450} 为测定值. 60例正常健康人的血清GNLY平均浓度为 $4.76 \pm 2.32 \mu\text{g/L}$, 60例乙型肝炎肝硬化组患者血清中GNLY平均水平为 $2.57 \pm 1.84 \mu\text{g/L}$, 60例PBC患者的血清平均水平为 $15.48 \pm 3.24 \mu\text{g/L}$. PBC患者血清中GNLY的含量显著高于正常对照和乙型肝炎肝硬化组($P < 0.01$).

3 讨论

PBC是一种与自身免疫有关的慢性炎症性肝脏疾病, 主要特征为肝内中小胆管的非化脓性进行性炎症损伤. 90%以上的PBC患者血清中出现抗线粒体抗体(AMA)-M2亚型, 50%患者出现抗核抗体(ANA)^[4]. 有报道称, PBC患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例与肝功能损伤和血清抗AMA-M2抗体产生有密切关系^[5]. 本实验室先前的研究表明, 中国PBC患者与HLA-DRB1*0701基因相关, 与南美、北美、北欧、

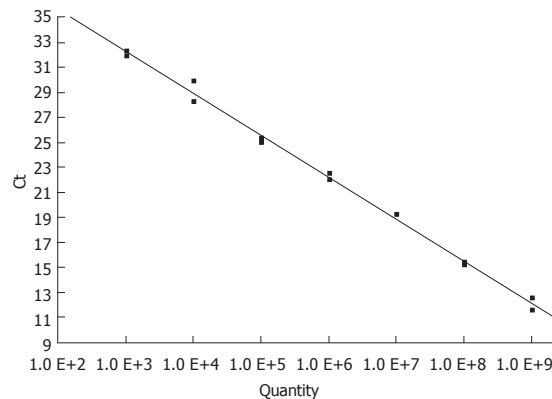


图 1 GNLY的标准曲线.

日本等其他国家PBC患者的易感基因明显不同, HLA-DR β 1第78位上的缬氨酸残基可能与PBC发病相关^[6]. PBC患者肝脏门管区有自身反应性CD8⁺T和CD4⁺T细胞的富集^[7], 说明PBC胆管损坏是由自身反应性CD8⁺T和CD4⁺T细胞介导的. 由CTL和NK分泌的GNLY属于II类抗微生物肽, 具有广谱抗菌作用. Takemoto *et al*^[8]报道GNLY在亚急性硬化全脑炎(SSPE)外周血中表达显著下降, 说明GNLY很可能涉及到SSPE的病理生理过程和发病机制. 国外有学者在麻风、移植排斥等疾病中发现GNLY表达增高^[9-10], 表明GNLY在宿主免疫防御中起重要作用, 然而在PBC中国内外未见相关报道.

本实验室通过自行建立的FQ-PCR^[11]和ELISA^[12]方法检测了PBC、乙型肝炎肝硬化患者和健康对照者PBMCs上GNLY mRNA及血清中GNLY的表达. FQ-PCR技术是通过PCR在指数扩增期荧光信号强弱不同来分析目的基因的表达, 实现了PCR从定性到定量的飞跃. FQ-PCR与传统的终点法PCR比较, 操作简便、特异性强、重复性好、定量准确. 结果表明, PBC组外周血GNLY mRNA和血清中GNLY表达与正常健康组及肝炎肝硬化组比较有显著性增高($P < 0.01$). 提示PBC疾病进展过程中CTL, NK细胞均被激活, 其中CTL的T细胞受体(TCR)免疫

■名词解释

FQ-PCR技术即荧光定量多聚酶反应, 是通过PCR在指数扩增期荧光信号强弱不同来分析目的基因的表达, 实现了PCR从定性到定量的飞跃. FQ-PCR与传统的终点法PCR比较, 操作简便、特异性强、重复性好、定量准确.

■同行评价

本研究表明,GNLY表达与PBC存在一定的关联性,有助于临床PBC的辅助诊断,方法可靠,具有一定的临床价值。

识别表达在胆管上皮细胞上的MHC-抗原肽复合物后,向靶细胞释放GNLY,高浓度的GNLY发挥细胞毒效应,致使胆管上皮细胞凋亡。离释放部位较远的GNLY浓度较低,诱导免疫细胞到达胆管上皮细胞损伤部位,引起免疫效应分子的释放且使效应分子有效地聚集到肝内胆管和汇管区,促成淋巴细胞浸润,造成中小胆管的进行性炎性损伤。

我们首次从转录和翻译水平证实了PBC患者GNLY基因和蛋白水平表达上调,提示GNLY及其介导的细胞免疫应答与PBC的发生、发展存在一定相关性,给临床辅助诊断提供一定依据。GNLY能否作为PBC早期诊断、病程监测及判断预后的指标,仍需要进一步研究探索。

4 参考文献

- 1 Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282: 121-125
- 2 Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005; 174: 5243-5248
- 3 Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2003; 362: 53-61
- 4 王雪松, 李永哲. 原发性胆汁性肝硬化自身抗体谱研

究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 245-249

- 5 李永哲, 胡朝军, 佟大伟, 张蜀澜, 刘定华. 原发性胆汁性肝硬化患者CD11c+和CD123+树突状细胞与肝功能损伤的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 341-345
- 6 刘海英, 邓安梅, 张建, 周晔, 姚定康, 沈芳, 屠小卿, 范列英, 仲人前. 原发性胆汁性肝硬化患者人类白细胞抗原等位基因多态性分析. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 410-413
- 7 Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, Coppel RL, Kaplan MM, Gershwin ME. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 2002; 109: 1231-1240
- 8 Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Hara T. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays. *J Neurovirol* 2005; 11: 299-305
- 9 Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant* 2005; 5: 1789-1792
- 10 Kotsch K, Mashregi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, Hoerstrup J, Pratschke J, Ding R, Suthanthiran M, Volk HD, Reinke P. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77: 1866-1875
- 11 钱琤, 邓安梅, 陈孙孝, 朱晔, 陈燕, 谷明莉, 王皓, 谭龙益, 孔宪涛, 仲人前. 建立人颗粒溶素基因表达含量荧光定量PCR检测方法的研究. 中华临床医学卫生杂志 2006; 4: 1-4
- 12 钱琤, 陈孙孝, 吴传勇, 蒋廷旺, 王燕, 周晔, 陈燕, 陈波, 邓安梅, 仲人前. 颗粒溶素酶联免疫吸附测定法的建立及临床初步应用. 中华检验医学杂志 2006; 29: 1018-1019

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 •

世界华人消化杂志的同行评议

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

胃癌组织中MK、VEGF表达的意义

赵治国, 史飞涛, 周明锴, 崔静, 付刚, 刘占举

赵治国, 史飞涛, 周明锴, 崔静, 刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
付刚, 焦作市第二人民医院病理科 河南省焦作市 454001
通讯作者: 赵治国, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科, zzghappy@eyou.com
电话: 0371-65261229
收稿日期: 2006-10-25 接受日期: 2006-11-10

Expression of midkine and vascular endothelial growth factor and their significances in gastric carcinoma

Zhi-Guo Zhao, Fei-Tao Shi, Ming-Kai Zhou, Jing Cui, Gang Fu, Zhan-Ju Liu

Zhi-Guo Zhao, Fei-Tao Shi, Ming-Kai Zhou, Jing Cui, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China
Gang Fu, Department of Pathology, the Second People's Hospital of Jiaozuo City, Jiaozuo 454001, He'nan Province, China

Correspondence to: Zhi-Guo Zhao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China. zzghappy@eyou.com
Received: 2006-10-25 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To investigate the expression vascular endothelial growth factor (VEGF) and midkine (MK) and their significances in gastric carcinoma.

METHODS: Immunohistochemistry was performed to detect the expression of MK, VEGF and CD34 in gastric carcinoma ($n = 64$) and adjacent normal tissues ($n = 20$).

RESULTS: The positive rates of MK and VEGF expression were significantly higher in gastric cancer tissues than those in the normal ones (76.6%, 79.7% vs 0, 15.0%, both $P < 0.01$). The expression of MK and VEGF had marked correlations with the invasion depth ($\chi^2 = 7.111$, $P = 0.008$; $\chi^2 = 7.590$, $P = 0.006$), lymph node metastasis ($\chi^2 = 4.814$, $P = 0.028$; $\chi^2 = 6.207$, $P = 0.013$), and clinical stages ($\chi^2 = 13.971$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 18.554$, $P = 0.000$). The value of MVD in patients

with positive MK expression was notably higher than that in ones with negative MK expression (31.745 ± 8.592 vs 24.680 ± 8.938 , $P < 0.01$), and there was a positive correlation between MK and VEGF expression ($\chi^2 = 4.447$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: MK and VEGF may play synergistic roles in the growth, invasion and metastasis of gastric carcinoma, and their co-expression may be a useful indicator for the prognosis of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Midkine; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Zhao ZG, Shi FT, Zhou MK, Cui J, Fu G, Liu ZJ. Expression of midkine and vascular endothelial growth factor and their significances in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3517-3520

摘要

目的: 研究中中期因子(midkine, MK)和血管内皮生长因子(VEGF)在胃癌组织中的表达情况, 并探讨其临床意义。

方法: 采用免疫组织化学方法检测64例胃癌组织、20例癌旁正常组织中MK、VEGF和CD34蛋白表达情况。

结果: 胃癌组织中MK、VEGF的阳性表达率分别为76.6%和79.7%, 显著高于癌旁正常组织(0, 15.0%)($P < 0.05$)。MK、VEGF的表达水平与胃癌的浸润深度($\chi^2 = 7.111$, $P = 0.008$; $\chi^2 = 7.590$, $P = 0.006$)、淋巴结转移($\chi^2 = 4.814$, $P = 0.028$; $\chi^2 = 6.207$, $P = 0.013$)、临床分期($\chi^2 = 13.971$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 18.554$, $P = 0.000$)。MK表达阳性的胃癌组织MVD显著高于MK表达阴性的胃癌组织(31.745 ± 8.592 vs 24.680 ± 8.938 , $P < 0.01$), 而且MK、VEGF表达在胃癌中也存在一定相关性($\chi^2 = 4.447$, $P < 0.05$)。

结论: MK、VEGF在胃癌的生长、侵袭与转移中起重要作用, 他们之间存在相互诱导或是协同效应, 其共同表达可作为判断胃癌预后的指标。

■背景资料

新生血管对胃癌生长转移起着至关重要的作用, 血管生成受多种因子调节。中期因子(midkine, MK)对肿瘤新生血管的形成具有调控作用, 在人类多种恶性肿瘤中高水平表达^[1-2]。血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子, 在肿瘤血管形成中起重要作用^[3]。二者都可以促进肿瘤血管形成。

■创新盘点

MK、VEGF二者与胃癌血管生长及胃癌生长及侵袭、转移的关系尚未见有文献报道。

关键词: 胃癌; 中期因子; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

赵治国, 史飞涛, 周明镨, 崔静, 付刚, 刘占举. 胃癌组织中MK、VEGF表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3517-3520

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3517.asp>

0 引言

中期因子(midkine, MK)对肿瘤新生血管的形成具有调控作用, 在人类多种恶性肿瘤中高水平表达^[1-2]. 血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子, 在肿瘤血管形成中起重要作用^[3]. 二者都可以促进肿瘤血管形成. 我们采用免疫组织化学技术对64例经手术治疗的胃癌患者组织标本进行MK、VEGF和MVD检测, 探讨MK、VEGF与胃癌血管生成的关系, 对两者的相关性进行分析, 从而为胃癌的临床治疗及判断预后提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集焦作市第二人民医院病理科2001-05/2005-05手术切除的胃癌组织标本64例. 其中男45例, 女19例, 年龄34-76(平均62.3)岁. 病理分期按照1997年国际抗癌联盟(UICC)分期标准. 所有病例术前均未进行化疗、放疗及其他抗癌治疗, 术后均经病理检查确诊. 另取20例癌旁距离肿瘤边缘不小于5 cm正常组织作为对照. 兔抗人MK多克隆抗体、免疫组化试剂盒及DAB显色剂购自武汉博士德公司, 鼠抗人VEGF和CD34 mAb购自美国Santa Cruz公司.

1.2 方法 组织经甲醛固定, 常规石蜡包埋, 做4 μ m厚连续切片, 免疫组化SABC法检测MK、VEGF和CD34的表达情况. MK抗体工作浓度为1:150, VEGF抗体和CD34抗体工作浓度为1:100. 具体实验程序严格按照试剂盒说明书进行. 用已知的阳性切片作为对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 结果的判定标准为: MK和VEGF以肿瘤细胞细胞膜和(或)细胞质内出现清晰的棕黄色颗粒为阳性, 结果以阳性细胞数所占百分比表示. 随机取10个高倍视野, 每个视野计数100个细胞. 肿瘤细胞中MK阳性细胞数<20%者为阴性(-), 20%-50%者为弱阳性(+), >50%者为强阳性(++). 微血管染色用鼠抗人CD34 mAb, CD34阳性为血管内皮细胞胞质着色, 采用Weidner微血管方法, 先在低倍镜($\times 40$)下观察每例切片中3个不重复血管密度最高区域, 然后在高倍镜下计数

每个区域MVD值, 求其平均值即作为该例组织的MVD值, 结果用mean \pm SD表示.

统计学处理 应用SPSS10.0统计分析软件包进行统计学处理, 计数资料采用 t 检验, 分类资料采用 χ^2 检验和单因素方差分析, MK和VEGF的相关性用spearman等级相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 MK和VEGF的表达及MVD的计数与分布 在20例正常胃黏膜组织中未见MK蛋白染色或仅见微弱染色, 表达率为0%, 在64例胃癌组织中, 49例MK蛋白染色为阳性, 表达率为76.6%, 二者相比, 差别有统计学意义($P < 0.01$); 而VEGF在正常胃黏膜组织和胃癌组织中分别有3例和51例阳性, 表达率分别为15.0%和79.7%. MK和VEGF阳性染色主要定位于胃癌细胞的胞质上, 细胞核无染色. 染色在癌组织内成弥漫性分布, 并存在明显的异质性, 在胃癌组织的边缘部位表达增强. 胃癌细胞外间质中还发现纤维组织着色、小血管内皮细胞及弹力膜层亦着色, 尤其是血管密集处明显增强. 本组胃癌组织的MVD均值为 30.089 ± 8.294 , 癌旁正常组织的MVD均值为 15.012 ± 7.134 , 两者差异有统计学意义($P < 0.01$). 阳性血管分布呈异质性, 主要分布于癌灶边缘.

2.2 MK和VEGF表达与胃癌各临床病理因素之间的关系 MK、VEGF在胃癌组织中的表达与患者年龄、性别、肿瘤直径大小及胃癌分化程度无关($P > 0.05$), 与胃癌组织的浸润深度、淋巴结转移及临床分期密切相关($P < 0.05$)(表1).

2.3 MK与胃癌组织MVD和VEGF之间的关系 MK表达阳性的胃癌组织MVD均值为(31.745 ± 8.592), MK表达阴性者MVD均值为(24.680 ± 8.938), 两者差别具有统计学意义($P < 0.01$). 在64例胃癌组织中MK和VEGF表达共同为阳性者37例, MK和VEGF表达共同为阴性者8例, MK表达阳性而VEGF表达阴性者12例, MK表达阴性而VEGF表达阳性者7例, 表达一致率为70.31%(45/64). Spearman等级相关分析表明二者之间表达存在显著相关性($\chi^2 = 4.447, P < 0.05$).

3 讨论

大量研究证明, 血管生成是肿瘤生长、侵袭、转移的基本要素, 新生血管的形成在肿瘤发生、发展的过程中起重要作用^[4]. VEGF是促进

表 1 MK和VEGF表达与胃癌各临床病理因素之间的关系

因素	<i>n</i>	MK阳性数(%)	χ^2	<i>P</i>	VEGF阳性数(%)	χ^2	<i>P</i>
年龄							
≤60岁	29	24 (82.8)	1.135	0.287	20 (69.0)	0.001	0.973
>60岁	35	25 (71.4)			24 (68.6)		
性别							
男	45	36 (80.8)	0.998	0.318	29 (64.4)	1.308	0.253
女	19	13 (68.4)			15 (78.9)		
直径							
≤5 cm	26	19 (73.1)	0.296	0.586	17 (65.4)	0.231	0.631
>5 cm	38	30 (78.9)			27 (71.1)		
分化程度							
高	16	11 (68.8)	0.885	0.643	9 (56.3)	3.180	0.204
中	26	20 (76.9)			21 (80.8)		
低	22	18 (81.8)			14 (63.6)		
浸润深度							
未达浆膜层	24	14 (58.3)	7.111	0.008	12 (50.0)	7.590	0.006
达到或超过浆膜层	40	35 (87.5)			33 (82.5)		
淋巴结转移							
无	27	17 (63.0)	4.814	0.028	14 (51.9)	6.207	0.013
有	37	32 (86.5)			30 (81.1)		
分期							
I a+ I b	9	3 (33.3)	13.971	0.001	2 (22.2)	18.554	0.000
II + III a	26	19 (73.1)			15 (57.5)		
III b+IV	29	27 (93.1)			27 (93.1)		

■应用要点

临床上联合检测MK, VEGF的表达, 其共同表达可能有助于判断胃癌的预后。

血管生成的重要因子, 是一种具有肝素结合活性的同源二聚体糖蛋白, 由多种细胞分泌, 他以旁分泌的方式, 通过酪氨酸激酶受体特异性地作用于内皮细胞, 对内皮细胞产生促分裂、增生和趋化作用, 并能增强血管通透性, 有利于血浆, 纤维蛋白外渗, 促进血管形成^[5]。

MK是近年来发现的一个新基因, 他与多向因子(pleiotrophin, PTN)一起组成一个新的肝素结合生长因子(HBGFs)家族。生理情况下MK基因的表达随个体的发育而变化, 在胚胎期高表达, 出生后逐渐降低, 在成年组织中, 除肾脏和小肠上皮外, 其他部位几乎不表达。近来研究证明, MK mRNA在多种癌组织中出现高频率, 高强度表达, 其可能与肿瘤的发生、生长及转移有关^[1,6-8]。MK高度表达于各种肿瘤细胞, 通过基因药物方法阻断MK的表达, 抑制其作用途径, 可以达到促进肿瘤细胞凋亡的目的^[9-10]。有研究表明, MK和VEGF与肿瘤的发生、发展具有一定的相关性。但是, 对于MK, VEGF在胃癌的血管形成, 侵袭和转移过程中所起的作用是否具有协同性, 尚未发现有研究。

我们的研究结果显示, MK的表达与患者年龄, 性别, 肿瘤大小, 胃癌分化程度无关, 与胃癌的浸润深度, 淋巴结转移, 临床分期及MVD密切相关。由此可见, MK在胃癌的发生和发展过程中起重要作用。Ikematsu *et al*^[11]发现, 在神经母

细胞瘤患者血清中可以检测到MK, 且随着肿瘤临床分期升高, 血清中的MK水平也随着升高, 这与我们的研究结果一致。VEGF也与胃癌的浸润深度, 淋巴结转移, 临床分期及MVD也存在相关性。目前, 大多数研究认为MVD值高是肿瘤预后不佳的指标。张宏图 *et al*^[12]研究也发现胃癌患者血清VEGF浓度高于健康对照, 与胃癌浸润深度, 淋巴结转移, 远处转移, 肿瘤分期密切相关。毛振彪 *et al*^[13]的研究也发现血清VEGF含量的增强, 预示胃癌的转移和预后不良。虽然MK参与肿瘤生长和转移的机制尚未十分清楚, 但是我们从研究中发现, MK蛋白阳性染色主要定位于胃癌细胞的胞质上, 细胞核无染色。染色在癌组织内成弥漫性分布, 并存在明显的异质性, 在胃癌组织的边缘部位表达增强。胃癌细胞外间质中还发现纤维组织着色、小血管内皮细胞及弹力膜层亦着色, 尤其是血管密集处明显增强。Mashour *et al*^[14]的实验结果也表明, MK在肿瘤血管细胞表达, 而在正常血管内皮细胞不表达。因此, 我们推测, MK可能通过刺激而内皮细胞增殖, 促进肿瘤血管的形成, 从而促进胃癌的发生、发展及转移。Ren *et al*^[15]的研究也发现, MK在食管鳞状细胞癌中过渡表达, 且在肿瘤血管形成和侵袭中起重要作用。

我们的研究结果还显示, MK和VEGF在胃癌组织中的表达有一定的相关性($P<0.05$), 在64

例胃癌组织中,有37例共同表达阳性,8例共同表达阴性,表达一致率为70.31%(45/64)。MK表达阳性率高的胃癌组织切片中,VEGF表达阳性率也增高,并且表达的部位基本一致,但是二者具有协同性的机制还需要进一步研究。MK、VEGF在胃癌的侵袭和转移中起重要作用,临床上联合检测MK、VEGF的表达,其共同表达可能有助于判断胃癌的预后。

4 参考文献

- Ikematsu S, Yano A, Aridome K, Kikuchi M, Kumai H, Nagano H, Okamoto K, Oda M, Sakuma S, Aikou T, Muramatsu H, Kadomatsu K, Muramatsu T. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83: 701-706
- Kato M, Shinozawa T, Kato S, Endo K, Terada T. Increased midkine expression in intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *Liver* 2000; 20: 216-221
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25
- Kuiper RA, Schellens JH, Blijham GH, Beijnen JH, Voest EE. Clinical research on antiangiogenic therapy. *Pharmacol Res* 1998; 37: 1-16
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611
- Ye C, Qi M, Fan QW, Ito K, Akiyama S, Kasai Y, Matsuyama M, Muramatsu T, Kadomatsu K. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 179-184
- 罗祥基,殷正丰,吴孟超.中期因子及其与肿瘤的关系. *临床与实验病理学杂志* 1999; 15: 441-442
- Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, Hiasa Y, Cho M, Uemura H, Hirao Y, Muramatsu T, Kadomatsu K. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* 1999; 57: 253-257
- Qi M, Ikematsu S, Ichihara-Tanaka K, Sakuma S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by Midkine. *J Biochem (Tokyo)* 2000; 127: 269-277
- Adachi Y, Matsubara S, Muramatsu T, Curiel DT, Reynolds PN. Midkine promoter-based adenoviral suicide gene therapy to midkine-positive pediatric tumor. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 588-592
- Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, Kadomatsu K. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer* 2003; 88: 1522-1526
- 张宏图,胡祥.血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 344-345
- 毛振彪,肖明兵,黄介飞,倪海兵,倪润洲,魏群,张弘.内皮生长因子在胃癌血清中的表达意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1220-1221
- Mashour GA, Ratner N, Khan GA, Wang HL, Martuza RL, Kurtz A. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene* 2001; 20: 97-105
- Ren YJ, Zhang QY. Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2006-2010

电编 李琪 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 •

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2006-12-28)

结肠癌中P15, P16与MMP-9的表达及相关性

张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉

张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000
通讯作者: 张占学, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科. zhangzx0268@eyou.com
电话: 0311-86377526
收稿日期: 2006-10-11 接受日期: 2006-10-27

Expression of P15, P16 and matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer

Zhan-Xue Zhang, Wei-Qing Song, Qing-Hui Yan, Bao-Jun Zhou, Jian-Hui Cai

Zhan-Xue Zhang, Wei-Qing Song, Qing-Hui Yan, Bao-Jun Zhou, Jian-Hui Cai, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Correspondence to: Zhan-Xue Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhangzx0268@eyou.com
Received: 2006-10-11 Accepted: 2006-10-27

Abstract

AIM: To investigate the expression of P15/P16 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as well as their relationships with the clinicopathological characteristics in colorectal cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of P15, P16 and MMP-9 in 50 specimens of colorectal cancer tissues, tissues 3 cm away from cancer, and normal tissues from resection margin.

RESULTS: The positive rates of P15 (84% vs 100%, $P < 0.05$), P16 (76% vs 100%, $P < 0.05$) and MMP-9 expression (82% vs 0, $P < 0.05$) were 84%, 76% and 82.00% in colorectal cancer tissues, 94%, 90% and 44% in the tissues 3 cm away from cancer, and 100%, 100% and 0, respectively, and there were significant differences among the three kinds of tissues ($P < 0.05$). The expression of P15/P16 and MMP-9 were markedly associated with the histological types, clinical stages and lymphatic metastases. Moreover, MMP-9 expression was negatively correlated with P15 and P16 expression ($r = -0.834$, P

< 0.05 ; $r = -0.752$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Down-regulation of P15/P16 expression and up-regulation of MMP-9 play important roles in the invasion and metastasis of colorectal cancer, which can help to make judgement for metastasis and prognosis.

Key Words: Colorectal cancer; P15; P16; Matrix metalloproteinase-9; Immunohistochemistry

Zhang ZX, Song WQ, Yan QH, Zhou BJ, Cai JH. Expression of P15, P16 and matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3521-3524

摘要

目的: 研究P15, P16和MMP-9在结肠癌及正常组织中的表达, 并探讨其与临床病理学特征的关系。

方法: 采用免疫组化法检测50例结肠癌组织、癌旁3cm组织及切缘正常组织中P15、P16和MMP-9表达的差异。

结果: 肿瘤、癌旁3cm与切缘正常组织中, P15的阳性表达率分别为84%、94%和100%, P16的阳性表达率分别为76%、90%和100%, MMP-9的阳性表达率分别为82%、44%和0, 均有显著性差异($P < 0.05$)。P15, P16和MMP-9的表达与结肠癌的分化程度、Dukes分期和淋巴结转移均有显著相关。结肠癌组织中MMP-9与P15、P16呈负相关性($r = -0.834$, $P < 0.05$; $r = -0.752$, $P < 0.05$)。

结论: P15, P16表达的下调和MMP-9表达上调将促进结肠癌浸润和转移, 二者在癌组织中表达的高低是结肠癌细胞重要的恶性生物学特征, 有助于对结肠癌转移及患者预后的判断。

关键词: 结肠癌; P15; P16; MMP-9; 免疫组化

张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉. 结肠癌中P15, P16与MMP-9的表达及相关性. *世界华人消化杂志* 2006;14(36):3521-3524
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3521.asp>

■背景资料

细胞增殖周期受细胞周期素依赖性激酶(CDKS)调节, 受其抑制因子(CDKIS)的作用而失活, P16, P15蛋白是CDKIS中的两种, P16, P15蛋白可特异地与CDK4/6或cyclinD1 CDK4/6复合物结合, 抑制Cdk4/6的活性, 抑制细胞由G1期进入S期。研究表明P16, P15高表达可能抑制肿瘤淋巴转移, 提示检测P16, P15对于肿瘤转移预测及预后评估具有一定帮助作用。基质金属蛋白酶MMP-9能降解基底膜和细胞外基质成分, 可促进癌细胞对周围组织的浸润和转移。

■创新盘点

国内外对P15、P16和MMP-9在结肠癌中的研究尚处于起步阶段,且缺乏判断结肠癌预后的简单有效的方法。本课题以结肠癌为研究对象,首次将两类与肿瘤转移密切相关的指标进行联合检测,进一步证实P15、P16和MMP-9与肿瘤临床病理及预后的关系以及两者之间的关系,为结肠癌的临床治疗及判断预后开辟了一条崭新的道路。

0 引言

P15和P16为抑癌基因,同属于周期依赖性激酶抑制因子(CDKI)基因家族,定位于人染色体9p21,编码的蛋白质能以相似的方式抑制cyclin-Cdk4/6复合物对PRb蛋白的磷酸化作用,进而阻止细胞周期通过G1/S检验点,在调节细胞增殖与凋亡、阻止有DNA损伤的细胞进行分裂增殖中具有关键的作用。MMP-9为基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)成员之一,能有效分解基底膜的主要成分IV型胶原蛋白,其过度表达与人类多种恶性肿瘤侵袭转移潜能及预后密切相关。在结肠癌中同时进行P15、P16和MMP-9与肿瘤侵袭、转移的研究报道少见,本研究目的就在于通过免疫组织化学方法,对P15、P16和MMP-9在结肠癌中表达进行研究,探讨其与结肠癌浸润转移的关系,为结肠癌的诊断和治疗及判断预后提供有参考价值的分子生物学指标。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院结肠癌标本50例,其中男28例,女22例。年龄36-87(平均59.29)岁。术前未接受任何抗肿瘤治疗。术后病理为:腺癌28例,黏液腺癌11例,低分化癌和未分化癌11例。Dukes分期:A-B期27例、C-D期23例。取材部位为肿瘤、癌旁3 cm、标本切缘。所有标本均为手术切除新鲜标本,取材后中性甲醛固定,石蜡包埋,厚4 μ m连续切片,行HE及免疫组织化学染色。

1.2 方法 采用SP法,P15、P16和MMP-9试剂均购自Stanta Cruz公司。结果判定:胞核或胞质出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。每张切片选择5个高倍视野,计数不少于500个细胞,取均数并评分:不着色为0分,着色淡为1分,着色深为2分;着色细胞占计数细胞百分率: $\leq 5\%$ 为0分,6%-25%为1分,26%-50%为2分, $\geq 51\%$ 为3分,染色程度与染色细胞百分率得分乘积为最后得分。0-1分为阴性病例,2分以上为阳性病例。

统计学处理 用SAS8.0软件进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 水平为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 P15、P16和MMP-9在结肠癌不同部位表达情况 在肿瘤组织、癌旁3 cm组织与切缘正常组织中,P15的阳性表达率分别为84.00%、94.00%和100.00%;P16的阳性表达率分别为76.00%、90.00%和100.00%,MMP-9的阳性表达率分别为82.00%、44.00%和0%,均有显著性差异($P < 0.05$)

(表1)。

2.2 P15、P16和MMP-9与结肠癌临床病理特征的关系 P15、P16和MMP-9的表达与结肠癌的分化程度、Dukes分期和淋巴结转移均有显著相关(表2)。

2.3 P15、P16与MMP-9表达的相关性 结肠癌组织中P15阳性42例,其中MMP-9阳性34例,8例P15阴性的病例中7例MMP-9阳性,呈负相关($r = -0.834, P < 0.05$);结肠癌组织中P16阳性38例,其中MMP-9阳性31例,12例P16阴性的病例中10例MMP-9阳性,呈负相关($r = -0.752, P < 0.05$)。

3 讨论

细胞增殖周期受细胞周期素依赖激酶(CDKS)调节。CKDS与细胞周期素结合被活化,促进细胞增殖。受到其抑制因子(CDKIS)的作用而失活。P16、P15蛋白则是CDKIS中的两种。在正常细胞中,细胞周期素D1与CDK4或CDK6结合成复合物,使CDK4/6活化,从而可使细胞内的另一种调节蛋白-视网膜母细胞瘤(RB)蛋白磷酸化,继而释放结合的转录因子(E2F),使细胞由G1期进入S期。如果CDKS得不到抑制,则导致细胞不断增殖。P16、P15蛋白则可特异的与CDK4/6或cyclinD1 CDK4/6复合物结合,抑制CDK4/6的活性,使RB蛋白不能磷酸化,无法与E2F解离,基因转录受到抑制,从而抑制细胞由G1期进入S期^[1]。

肿瘤发生、发展是多阶段、多基因的综合过程,涉及多种癌基因激活和抑癌基因的失活,估计需有4-5个基因的异常变化,而且癌变与突变次序有关,并需要一定次数的积累。P16是公认的多种肿瘤抑制基因蛋白,在许多肿瘤与细胞株中高频率纯合子缺失,这种缺失消除了附近的第二个基因,可能就是P15。研究发现,P15与P16基因及其产物在许多人类原发肿瘤和细胞株发生缺失,并导致肿瘤细胞无限制生长^[2-6];李庚 *et al*^[7]研究表明P16基因甲基化后失活在大肠癌的发生发展中起重要作用。P15和P16基因在抑癌基因家族中的重要地位几乎得到了一致的肯定。

国内外学者对不同肿瘤中P15、P16蛋白的表达进行检测,结果发现,不同的肿瘤组织中P15、P16基因的缺失率不尽相同,有关结肠癌的报道较少,国内张远 *et al*^[8]报道结肠癌P16蛋白的表达率为78.9%。略低于我们的研究结果,但都能说明结肠癌中也存在P15、P16基因的缺失,这可能是部分结肠癌发生的原因。肖鹏 *et al*^[9]发

表 1 P15, P16和MMP-9在结肠癌不同部位表达情况 ($n = 50$)

分组	P15			P16			MMP-9		
	阳性	%	P	阳性	%	P	阳性	%	P
结肠癌组织	42	84.00	<0.05	38	76.00	<0.05	41	82.00	<0.05
癌旁3 cm	47	94.00		45	90.00		22	44.00	
切缘组织	100	100.00		100	100.00		0	0.00	

表 2 P15, P16和MMP-9与结肠癌临床病理特征的关系

病理参数	n	P15			P16			MMP-9		
		阳性	%	P	阳性	%	P	阳性	%	P
分化程度										
高分化	28	26	92.86	<0.05	24	85.71	<0.05	20	71.43	<0.05
中低分化	22	16	72.73		14	63.64		21	95.45	
肿瘤大小										
<5cm	21	19	90.48	>0.05	17	80.95	>0.05	18	85.71	>0.05
>5cm	29	23	79.31		21	72.41		23	79.31	
浸润深度										
未浸透浆膜	24	21	87.50	>0.05	22	91.67	<0.05	18	75.00	>0.05
浸透浆膜	26	21	80.77		16	61.54		23	88.46	
Dukes分期										
A-B	27	26	96.30	<0.05	24	88.89	<0.05	21	91.30	<0.05
C-D	23	16	69.57		14	60.87		20	74.07	
淋巴结转移										
无	27	26	96.30	<0.05	24	88.89	<0.05	21	91.30	<0.05
有	23	16	69.57		14	60.87		20	74.07	

■名词解释

基质金属蛋白酶(MMPs): 是一组锌离子依赖的内分泌蛋白酶家族, 已经发现MMPs家族成员达20多种, 参与了许多生理及病理过程, 如炎症、组织纤维化和新生血管形成, 尤其是肿瘤的发生及转移均与MMPs的表达和活化有关。

现伴淋巴结转移的胃癌P15阳性率为13.8%, 无淋巴结转移的胃癌阳性率为52.9%, 无转移组原发性癌中P15表达水平显著高于有转移组. 我们在结肠癌及其转移淋巴结的研究中, 也发现恶性程度高、Dukes分期晚、伴淋巴结转移组P15、P16表达明显减低, 提示P15、P16基因的失活, 促进了肿瘤的转移.

P15与P16基因位置相邻, 均位于9p21, 二者基因编码核苷酸序列有93%相同, 其相应产物90%有同源性, 但二者生物学行为并不完全相同. P15可受生长转化因子 β (TGF- β)诱导使表达增多30倍, 而P16则不受TGF- β 所诱导, P16表达水平受Rb转录因子反馈调节, 而P15表达则不为Rb转录因子所调控. 有研究认为, 两者表达无明显相关性, 二者失活存在不同机制, 在肿瘤发生中作用不完全相同^[10], 另有学者认为两者具有协同性^[11]. 本研究结果显示, P15和P16在结肠癌中有相关性, 证明二者协同缺失更易导致细胞周期调控失调, 二者功能可能有互补作用. P15和P16低表达与结肠癌密切相关, 通过基因治疗方法增加P15和P16蛋白表达, 有助于缓解结肠癌的发展进程.

MMP-9是MMPs家族的重要成员, 由SoPata和Dancewicz于1974年从中性粒细胞提纯获得的

一种蛋白酶, 于1989年正式命名^[12], 其分子质量最大, 能够降解、破坏细胞外基质中最主要的组成成分IV、V型胶原和明胶^[13]. David *et al*^[14]采用免疫组化法研究发现, 与正常胃黏膜相比, 胃癌组织MMPs表达明显升高, MMPs与胃癌病期显著相关. Sier *et al*^[15]研究结果显示, 胃癌组织MMP-9表达显著高于邻近的正常胃黏膜, 其高表达胃癌患者生存期明显缩短. 近年来, 国内许多学者对MMP-9也有较深入的研究, 如彭利 *et al*^[16]认为, MMP-9与原发肝癌侵袭转移相关. 钱颀 *et al*^[17]认为MMP-9在胃癌的侵袭与转移中起重要作用.

本结果表明, 结肠癌标本切缘组织中MMP-9无表达, 而癌旁3 cm组织和癌组织的阳性表达率分别为44.00%和82.00%, 有显著性差异($P < 0.05$). 张明林 *et al*^[18]的研究中有类似发现. 这说明肿瘤细胞获得恶性表型的同时具备了降解基底膜和向周围组织浸润转移的能力, MMP-9可能参与了结肠癌的发生、发展过程. 观察切片发现MMP-9阳性的癌细胞呈灶状或片状分布, 且多位于癌边缘或管腔近旁, 提示, 具有转移潜能的癌细胞多位于肿瘤结节的表面或周边, 因而也符合肿瘤细胞向周边侵袭、脱落并向远处转移的假说. Dukes A-B期有淋巴结转

■同行评价

本文通过对50例结肠癌组织、癌旁3cm组织及切缘正常组织中P15、P16和MMP-9表达情况的研究,探讨了P15、P16和MMP-9与结肠癌临床病理特征的关系,结果表明三者与结肠癌的侵袭、转移密切相关,为临床上对结肠癌恶性程度及预后的判断提供了重要依据。

移组阳性率51.85%, C-D期无淋巴结转移组阳性率86.96%, 具有显著性差异($P<0.05$); 由于Dukes分期可以反映肿瘤浸润和转移的程度, 因此, MMP-9的表达与肿瘤组织的侵袭性呈正相关, 这也说明MMP-9在结肠癌的发展、浸润和转移过程中发挥了重要作用。国外学者在胃癌中有类似发现, 与国内张明林 *et al*^[18]的研究结果一致^[19-26]。

本研究还发现, P15、P16与MMP-9在结肠癌细胞的表达呈负相关, 即MMP-9阳性率越高, P15、P16阳性率越低, P15、P16阳性/MMP-9阴性组发生淋巴结转移和浆膜浸润的机会显著低于其他任何组, 从而可以推测P15、P16与MMP-9在结肠癌的发生、发展过程中存在相互关联、共同作用。所以联合检测P15、P16与MMP-9在判断肿瘤生物学行为及预后方面有更大意义。

4 参考文献

- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440
- Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene P16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology* 2000; 58: 126-136
- Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, Sun HL, Zhang YS. Relationship between inactivation of P16 gene and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 905-909
- Li FC, Li YH, Zhao X, Fu WN, Xu ZM, Li ZG, Sun KL. Association of homozygous deletion of P15 and P16 gene and amplification of EGFR gene in laryngeal squamous cell carcinoma. *Yi Chuan Xue Bao* 2004; 31: 109-113
- Qin Y, Liu JY, Li B, Sun ZL, Sun ZF. Association of low P16INK4a and P15INK4b mRNAs expression with their CpG islands methylation with human hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1276-1280
- 李庚, 千新来, 崔静, 王中群, 冶亚平, 杨晓煜, 李永真. DNA甲基化对大肠癌相关基因表达的调控意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1699-1703
- 张远, 王小强, 王金柱, 王旭升. 直肠癌P16蛋白表达的检测及其意义. *陕西肿瘤医学* 2001; 6: 105-107
- 肖鹏, 陈广斌, 白俊恒, 武步强. P16、P15基因在胃癌及转移淋巴结中的表达. *中国癌症杂志* 2002; 12: 293-300
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of P16 and P15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 6353-6358
- Zhou M, Gu L, Yeager AM, Findley HW. Incidence and clinical significance of CDKN2/MTS1/P16ink4A and MTS2/P15ink4B gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1997; 14: 141-150
- Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992; 1: 421-424
- Kumbla L, Bhadra S, Subbiah MT. Multifunctional role for fetuin (fetal protein) in lipid transport. *FASEB J* 1991; 5: 2971-2975
- David L, Nesland JM, Holm R, Sobrinho-Simoes M. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 1994; 73: 518-527
- Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, van Krieken JH, Lamers CB, Verspaget HW. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 413-417
- 彭利, 王顺祥, 何宏涛, 张凤瑞, 唐瑞峰. 基质金属蛋白酶9与原发性肝癌侵袭转移关系的初步研究. *实用癌症杂志* 2003; 8: 35-37
- 钱颀, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织Angiopoietin及MMP-9表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 299-302
- 张明林, 许建明, 梅俏, 鲍峻峻. MMP-2和MMP-9蛋白在结肠癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2494-2497
- Ikeda S, Kimura H, Shibata T. Correlation between expression of MMP-7 in gastric submucosal invasive carcinoma and lymph node micrometastasis. *Rinsho Byori* 2002; 50: 196-201
- Ajisaka H, Fushida S, Yonemura Y, Miwa K. Expression of insulin-like growth factor-2, c-MET, matrix metalloproteinase-7 and MUC-1 in primary lesions and lymph node metastatic lesions of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1788-1792
- Liu XP, Kawachi S, Oga A, Tsushimi K, Tsushimi M, Furuya T, Sasaki K. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 291-295
- Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa K, Chung YS. Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on a lymph node metastatic model of gastric cancer cells passaged by orthotopic implantation. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 213-218
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Kimura K, Sugiyama K, Momiyama N, Shimada H, Sasaki T. Inhibition of peritoneal dissemination in human gastric cancer by MMP-7-specific antisense oligonucleotide. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 205-212
- Park MJ, Kim MS, Park IC, Kang HS, Yoo H, Park SH, Rhee CH, Hong SI, Lee SH. PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. *Cancer Res* 2002; 62: 6318-6322

电编 李琪 编辑 王晓瑜

重组人粒细胞集落刺激因子联合温针灸治疗消化道肿瘤化疗后骨髓抑制的疗效

杨燕艳, 郑红薇, 孙大志

杨燕艳, 郑红薇, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院27楼护理单元 上海市 200003

孙大志, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003

通讯作者: 杨燕艳, 200003, 上海市凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院27楼护理单元.

yangyan-yan82@163.com

电话: 021-63610109-73827

收稿日期: 2006-04-15 接受日期: 2006-04-30

Therapeutic effect of myelosuppression with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor combined with warm-needle acupuncture on bone marrow inhibition following chemotherapy for gastrointestinal carcinoma

Yan-Yan Yang, Hong-Wei Zheng, Da-Zhi Sun

Yan-Yan Yang, Hong-Wei Zheng, Nursing Care Unit of the 27th Floor, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Da-Zhi Sun, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Yan-Yan Yang, Nursing Care Unit of 27th Floor, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. yangyan-yan82@163.com

Received: 2006-04-15 Accepted: 2006-04-30

Abstract

AIM: To observe the therapeutic effect of myelosuppression with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rhG-CSF) combined with warm-needle acupuncture after chemotherapy for gastrointestinal carcinoma.

METHODS: Patients with white cell count lower than $3.0 \times 10^9/L$ (examined twice) or neutrophilic leukocyte count lower than $2.5 \times 10^9/L$ (examined twice) were included in this study. The patients in single treatment group were treated by 150 μg rhG-CSF subcutaneously once a day for 3 days, while those in combined therapeutic

group were treated by chemotherapy as well as warm-needle acupuncture at the two Zusanli points simultaneously (once a day, one moxa once, until the 3rd day after chemotherapy).

RESULTS: In single-rhG-CSF group, 26 patients were treated 73 times in total, and complete remission was achieved 44 times, partial remission 29 times. The adverse effect appeared 12 times, and the rate was 16.44%. In combined therapeutic group, 28 patients were treated 68 times in total, and complete remission was achieved 57 times, partial remission 11 times. The adverse effect occurred 3 times, and the rate was 4.41%. There was significant difference between the two groups ($P < 0.01$).

CONCLUSION: rhG-CSF combined with warm-needle acupuncture has favorable efficacy in the treatment of bone marrow inhibition following chemotherapy for gastrointestinal carcinoma.

Key Words: Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor; Warm-needle acupuncture; Myelosuppression; Therapeutic efficacy

Yang YY, Zheng HW, Sun DZ. Therapeutic effect of myelosuppression with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor combined with warm-needle acupuncture on bone marrow inhibition following chemotherapy for gastrointestinal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3525-3528

摘要

目的: 观察重组人粒细胞集落刺激因子联合温针灸对消化道肿瘤化疗后骨髓抑制的疗效。

方法: 化疗结束后, 连续2次血常规检查示白细胞总数低于 $3.0 \times 10^9/L$ 或中性粒细胞低于 $2.5 \times 10^9/L$ 者作为使用该药对象。单纯治疗组, 采用惠尔血150 μg , sc 1次/d, 连用3 d。联合治疗组, 化疗期间即开始使用温针灸治疗, 取两侧足三里穴, 1次/d, 每次使用1个艾柱, 直至化疗后3 d。

■背景资料

化疗作为治疗消化道肿瘤的重要手段之一, 最常见的毒副作用之一是骨髓抑制, 特别是铂类药物的应用, 中西医结合在防治消化道肿瘤化疗产生骨髓抑制方面有着一定优势, 此项目为应用重组人粒细胞集落刺激因子联合温针灸治疗化疗后出现的骨髓抑制, 并在临床中收到较为满意疗效。

■研发前沿

化疗骨髓抑制的防治一直是肿瘤治疗的重点和热点, 重组人粒细胞集落刺激因子是治疗化疗骨髓抑制的研究热点, 但对重度骨髓抑制化疗方案的纠正, 如能得以其他方法与其达到协同效果且能减少副作用的发生则是目前亟待研究的问题。

■创新盘点

本文采用重组人粒细胞集落刺激因子联合温针灸治疗化疗后出现的骨髓抑制的治疗方法,此联合治疗方法不仅提高了疗效而且可以减少单纯应用重组人粒细胞集落刺激因子副作用的发生,同时阐述了治疗中的护理体会。

结果:单纯使用惠尔血治疗的26例共治疗73次中,治愈44次,好转29次;有12次发生不良反应,总的不良反应发生率为16.44%。联合温针灸治疗组28例共治疗68次,治愈57次,好转11次,发生不良反应3次,不良反应发生率为4.41%。经统计学分析,两者有显著性差异($P<0.01$)。

结论:惠尔血联合足三里温针灸治疗化疗致骨髓抑制白细胞减少有较好疗效,且对患者生存质量有显著提高。

关键词:重组人粒细胞集落刺激因子;温针灸;骨髓抑制;疗效

杨燕艳, 郑红薇, 孙大志. 重组人粒细胞集落刺激因子联合温针灸治疗消化道肿瘤化疗后骨髓抑制的疗效. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3525-3528

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3525.asp>

0 引言

世界卫生组织国际癌症研究中心(IARC/WHO)最新估计的数据——Globocan 2002, 2002年全球恶性肿瘤的发病死亡情况为(世界人口调整率): 男性发病率209.6/10万, 发病人数580万, 死亡率137.7/10万, 死亡人数380万; 女性的发病率161.5/10万, 发病人数506万, 死亡率92.2/10万, 死亡人数293万^[1]。目前, 化疗仍作为恶性肿瘤尤其是在对化疗较为敏感的消化道肿瘤治疗的重要手段之一^[2], 肿瘤化疗中最常见的毒副作用之一是骨髓抑制^[3], 特别是消化道肿瘤联合化疗方案中加用铂类药物^[4-7], 其中以白细胞、中性粒细胞减少最常见, 是影响化疗顺利进行的主要障碍之一, 为此有研究用胞苷脱氨酶基因对大剂量化疗保护作用等, 但尚处于实验研究阶段^[8], 有报道采用自体干细胞可以预防化疗时的骨髓抑制情况^[9], 重组人粒细胞集落刺激因子对肿瘤化疗引起的白细胞减少有良好的预防和治疗作用, 近几年来已成为恶性肿瘤化疗的重要辅助治疗手段^[10]。中西医结合在防治消化道肿瘤化疗产生骨髓抑制方面有着一定优势^[11], 我科应用重组人粒细胞集落刺激因子(惠尔血)联合温针灸治疗化疗后出现的白细胞减少或中性粒细胞减少141例, 临床疗效满意。

1 材料和方法

1.1 材料 住院经细胞学或病理学证实为恶性肿瘤患者。中位年龄47(20-70)岁, 全身状况(KPS)

评分50分以上, 不伴有严重的肝肾功能障碍, 其中胃癌90例次, 食管癌28例次, 结直肠癌23例, 共141例次, 其中性别、年龄及肿瘤分期两组间经统计学检验无显著性差异。入院后均劝说患者化疗后如出现骨髓抑制白细胞下降时, 采用惠尔血和温针灸联合治疗方案。患者拒绝温针灸者归入单纯采用惠尔血治疗组, 最后单纯惠尔血治疗组26例, 73例人次; 联合温针灸治疗者28例, 68例人次。

1.2 方法 化疗结束后, 连续两次血常规检查示白细胞总数低于 $3.0 \times 10^9/L$ 或中性粒细胞低于 $2.5 \times 10^9/L$ 者。采用惠尔血150 μg , sc 1次/d, 连用3 d, 第4天查白细胞总数大于 $4.0 \times 10^9/L$ 为治愈, 小于 $4.0 \times 10^9/L$ 而大于化疗结束时白细胞计数者为好转, 化疗期间每周检测外周血象1-2次。另灸法, 化疗期间即开始使用针灸治疗。取穴两侧足三里针灸, 针刺部位有酸或麻或胀感, 且提拉针柄时手下有沉重感, 1次/d, 每次使用1个艾柱, 直至化疗后第3天。化疗前及化疗中检测血象, 3 d 1次, 如产生严重骨髓抑制白细胞下降至或低于 $3.0 \times 10^9/L$ 或中性粒细胞低于 $2.5 \times 10^9/L$, 则停止化疗; 每次化疗结束后第1天查外周血象, 治疗3 d结束后第4天再次查外周血象, 治疗中观察与惠尔血及温针灸有关的不良反应。

统计学处理 采用SAS 6.02统计软件包, 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

治疗前全组病例白细胞最低值 $0.8 \times 10^9/L$, 范围 $0.8 \times 10^9/L$ - $2.4 \times 10^9/L$, 治疗后白细胞回升值范围 $3.4 \times 10^9/L$ - $4.4 \times 10^9/L$; 单纯使用惠尔血治疗的26例共治疗73次中, 治愈44次, 好转29次; 有12次发生不良反应, 总的不良反应发生率为16.44%, 其中出现低热5次, 出现四肢酸痛3次, 出现注射局部肿痛4次, 经对症处理, 能坚持完成治疗计划, 全组未见有皮疹等其他不良反应。联合温针灸治疗组28例共治疗68次, 治愈57次, 好转11次; 发生不良反应3次, 不良反应发生率为4.41%, 其中低热2次、出现肌肉酸痛1次。经统计学分析, 其中两者有效率有显著性差异($P<0.01$); 对患者卡氏评分(KPS)分析表明, 单纯惠尔血组对患者KPS提高3次、稳定45次、下降25次, 而惠尔血联合温针灸组对患者KPS提高20次、稳定43次、下降5次; 经统计学分析两组对患者KPS影响有显著性差异($P<0.01$)。

3 讨论

惠尔血是一种重组人粒细胞集落刺激因子, 能刺激骨髓造血干细胞, 促进其增殖、分化、成熟, 增加外周血中中性粒细胞数量, 增强生理功能, 从而提高机体抵抗力, 减少感染的发生率, 是一种具有强力升高白细胞作用的造血生长刺激因子, 对恶性肿瘤化疗所致的粒细胞减少症, 具有明显的预防和治疗作用^[12]. 可使患者较快渡过粒细胞减少期, 使感染持续时间明显缩短, 减少抗生素的用量, 并为下一步治疗计划的尽快实施, 争取了宝贵的时间. 足三里穴位是足阳明大肠经的常用穴位, 本穴有强壮提高机体免疫功能作用^[13-15], 且为保健要穴, 有研究表明, 艾灸可在一定程度上改善衰老机体的免疫衰退或紊乱情况. 增强免疫器官功能; 提高淋巴细胞转化率, 从多个途径增强或改善机体免疫功能^[16]. 并有研究表明, 针灸可通过修复化疗所致骨髓神经损伤, 而骨髓神经是造血微环境的重要组成部分, 具有一定调整造血的作用, 从而改善化疗骨髓抑制状态^[17]. 同时针灸对骨髓抑制的改善作用许多学者皆有报道^[18-19], 针灸抗化疗骨髓抑制, 提升白细胞的机制在于促进骨髓细胞向外周血中释放、延长白细胞寿命、通过提高血清集落刺激因子的活性, 促使造血干/祖细胞尽快增殖、减轻造血干/祖细胞受化疗药物的损伤; 实验有迹象表明针灸还可能作用于造血微环境^[20]. 温灸则具有调和气血温通经脉的作用, 实验表明温针灸有较强提高人体免疫力功能. 本研究表明, 惠尔血联合足三里温灸治疗化疗致骨髓抑制白细胞减少确有较好疗效, 与单纯惠尔血比较有显著性差异($P < 0.01$), 且对患者生存质量有显著提高, 仅在化疗结束后第4天联合治疗组KPS提高率为31.2%(20/64), 与单纯惠尔血治疗有显著性差异. 因此, 惠尔血联合温针灸在临床治疗中值得推广使用.

护理体会: 必须做好消毒工作, 其中包括针具消毒、腧穴部位的消毒和医者手指的消毒. 当腧穴消毒后, 切记接触污物, 以免重新污染关于医者手指的消毒, 在施术前, 医者应先用肥皂水将手洗刷干净, 待干后再用750 mL/L酒精棉球擦拭即可. 向患者及家属详细介绍该药的治疗目的、原理及成功病例, 以增加患者治疗的信心, 同时向患者及家属说明可能出现的轻微不良反应, 通过对症处理, 症状可改善. 保持治疗的最佳状态. 患者在过于饥饿、疲劳、精神过度紧张时, 不宜进行针刺. 对身体瘦弱, 气虚

血亏的患者, 进行针刺时手法不宜过强, 并应尽量选用卧位. 做好病房的消毒隔离, 采取保护性隔离, 住单间病房, 每日开窗通风30 min.

用药护理: 惠尔血用药时间以化疗24 h后开始使用为宜, 避免在化疗前后24 h内使用, 以免快速分裂的髓细胞对细胞毒剂潜在有敏感性. 接受该项治疗的患者均为白细胞或中性粒细胞减少者, 机体抵抗力低, 易受感染, 故护士为患者进行各项操作时, 应严格遵守无菌操作规程, 操作时动作轻柔, 穿刺准确无误, 防止反复穿刺造成皮下淤斑或水肿. 用药时避免与其他注射药液混用, 排空气时不浪费药液, 以确保进入患者体内药量的准确.

温针灸治疗中的护理: 在温针灸中主要问患者针感觉, 应在得气即足三里穴位处针下沉重感, 腧穴部位有酸、麻或胀感. 此时在针柄上加一艾柱, 点燃即可; 防止燃烧艾柱火星落下烧伤皮肤应在施针后在针体和穴位皮肤附近放一硬纸板相隔.

并发症的护理: 本组病例中出现的不良反应为发热、全身乏力、四肢酸痛、注射局部肿痛. 对于全身乏力、四肢酸痛的患者嘱其注意安全, 防止跌倒, 同时协助做好生活护理; 发热的患者嘱其卧床休息, 多饮水、促进体内毒素的排出, 控制体温应以物理降温为主, 经对症处理后体温均能降至正常; 而注射局部肿痛者则予以新鲜芦荟混合液(即新鲜芦荟汁5 mL加40%硫酸镁甘油5 mL、维生素B12 500)湿敷局部, 肿痛消失, 未影响治疗.

治疗后护理: 温针灸后穴位处出现微红灼热, 属正常现象, 无须处理, 如局部出现小水泡, 只要注意不擦破, 可任其自然吸收. 如水泡较大, 可用消毒毫针刺破水泡放出水液或用注射针抽出水液, 再涂以龙胆紫, 并以纱布包裹. 同时注意查血象, 观察白细胞、中性粒细胞回升情况.

4 参考文献

- 1 杨玲, 李连弟, 陈育德, Parkin D.M. 中国2000年及2005年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. 中国卫生统计 2005; 22: 218-221, 231
- 2 刘宝瑞, 李树业. 消化道肿瘤的标准化疗与新趋势. 陕西肿瘤医学 2001; 9: 148-149
- 3 Friberg LE, Henningsson A, Maas H, Nguyen L, Karlsson MO. Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4713-4721
- 4 王林, 李新平. 铂类药物的毒性作用与预防措施. 医药导报 2005; 24: 254-256
- 5 Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K, Boku N, Hyodo I, Saito H, Yamamichi N, Miyata Y, Ikeda N,

■名词解释

温针灸: 是针刺与艾灸结合应用的一种方法, 适用于既需要留针而又适宜用艾灸的病证. 操作方法是, 将针刺入腧穴得气后并予适当补泻手法而留针时, 将纯净细软的艾绒捏在针尾上, 或用艾条一段长约2 cm左右, 插在针柄上, 点燃施灸. 待艾绒或艾条烧完后除去灰烬, 将针取出.

■同行评价

本文具有较强的科学性, 治疗上具有较好的创新性, 治疗方法副作用小, 操作相对简单, 对目前消化道肿瘤因化疗所致骨髓抑制有较好的指导作用, 方法值得推广使用。文章思路清晰, 观点明确, 可读性较高。

- Yamamoto S, Fukuda H, Yoshida S. Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus uracil and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer: The Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205). *J Clin Oncol* 2003; 21: 54-59
- 6 Stathopoulos GP, Rigatos SK, Fountzilas G, Polyzos A, Stathopoulos JG. Paclitaxel and carboplatin in pretreated advanced gastric cancer: a phase II study. *Oncol Rep* 2002; 9: 89-92
- 7 Roth AD, Maibach R, Martinelli G, Fazio N, Aapro MS, Pagani O, Morant R, Borner MM, Herrmann R, Honegger H, Cavalli F, Alberto P, Castiglione M, Goldhirsch A. Docetaxel (Taxotere)-cisplatin (TC): an effective drug combination in gastric carcinoma. Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK), and the European Institute of Oncology (EIO). *Ann Oncol* 2000; 11: 301-306
- 8 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚. 胞苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1705-1708
- 9 朱金水, 朱励, 王龙, 庄奇新, 胡兵, 达伟, 陈维雄, 陈国强, 马积庆. 自体干细胞结合高剂量动脉化疗晚期胃癌作用研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1408-1411
- 10 Demirer T, Ayli M, Ozcan M, Gunel N, Haznedar R, Dagli M, Fen T, Genc Y, Dincer S, Arslan O, Gurman G, Demirer S, Ozet G, Uysal A, Konuk N, Ilhan O, Koc H, Akan H. Mobilization of peripheral blood stem cells with chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): a randomized evaluation of different doses of rhG-CSF. *Br J Haematol* 2002; 116: 468-474
- 11 张福武, 张翠英. 中西医结合治疗消化道肿瘤的临床应用. *华人消化杂志* 1998; 6: 506-507
- 12 Fornasiero A, Ghiotto C, Daniele O, Favaretto AG, D'Amanzo P, Ziade A. Neoadjuvant moderately high-dose chemotherapy with rh-G-CSF in locally advanced breast carcinoma. *Tumori* 2001; 87: 223-228
- 13 甘水咏, 樊云, 闻庆汉, 齐凤军, 田代志, 吴淼. 推拿足三里、肾俞穴对阳虚大鼠T淋巴细胞亚群 CD_4^+ / CD_8^+ 影响的实验研究. *湖北中医杂志* 2005; 27: 5-6
- 14 朱兆洪, 丁柱, 汤希孟, 丁克祥. 针刺“足三里”对脾虚小鼠脑组织中NO和NOS影响的实验研究. *中国针灸* 2000; 309-311
- 15 詹曦菁, 华晓宁. 针刺足三里穴对鼠红细胞免疫功能影响的实验研究. *武警医学* 2001; 12: 267-268
- 16 谢甦, 李丽红. 艾灸关元、足三里对衰老小鼠免疫功能影响的实验研究. *贵阳中医学院学报* 2003; 25: 44-46
- 17 赵喜新, 路玫, 王民集, 项晓人, 常明. 针灸对化疗所致小鼠骨髓神经损伤的修复作用. *河南中医学院学报* 2003; 18: 24-25
- 18 赵喜新, 王和平, 田开宇, 黄喜梅. 针灸对化疗小鼠骨髓粒系细胞动态变化的影响. *中国针灸* 2000; 172-174
- 19 赵小青, 郭晓原. 针灸治疗肿瘤化疗后所致骨髓抑制38例. *山东中医杂志* 2000; 20: 349-350
- 20 赵喜新, 黄喜梅, 王和平, 路玫, 田开宇. 针灸抗化疗骨髓抑制提升白细胞机制. *上海针灸杂志* 2003; 22: 29-33

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

●消息●

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、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。

白细胞介素-10基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关系

严艳, 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 刘芳, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉

严艳, 李卓, 李俊红, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 刘芳, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 首都医科大学附属北京佑安医院肝炎研究所 北京市 100069

李洪权, 刘英, 李辉, 中国协和医科大学流行病学教研室 北京市 100009

通讯作者: 李卓, 100069, 首都医科大学附属北京佑安医院肝炎研究所 lizhuo-youan@163.com

电话: 010-63292211-2362 传真: 010-63057109

收稿日期: 2006-10-25 接受日期: 2006-11-10

Genetic polymorphism of interleukin-10 in patients with hepatitis B infection

Yan Yan, Zhuo Li, Hong-Quan Li, Jun-Hong Li, Ying Liu, Chun-Yan Gou, Ji-Rong Gao, Jing Shan, Xin-Hui Guo, Fang Liu, Ji-Ming Yin, Dao-Jie Liu, Xian-Chun Xie, Hui Li

Yan Yan, Zhuo Li, Jun-Hong Li, Chun-Yan Gou, Ji-Rong Gao, Jing Shan, Xin-Hui Guo, Fang Liu, Ji-Ming Yin, Dao-Jie Liu, Xian-Chun Xie, Institute of Hepatitis, Beijing You'an Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China

Hong-Quan Li, Ying Liu, Hui Li, Department of Epidemiology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100009, China

Supported by the Momentous Science and Technology Project of Beijing Municipality, No. H020920020590

Correspondence to: Zhuo Li, Institute of Hepatitis, Beijing You'an Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China. lizhuo-youan@163.com

Received: 2006-10-25 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the polymorphism of interleukin-10 (IL-10) gene promoters and the clinical phenotypes of hepatitis B virus (HBV) infection in Chinese population.

METHODS: The genotypes of -819 locus in IL-10 promoter region were determined by polymerase chain reaction-sequence specific primer analysis (PCR-SSP), and those of -1082 and -592 loci in IL-10 promoter region were detected by polymerase chain restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) in patients with chronic hepatitis B (CHB, $n = 478$), self-limited HBV infection (SHI, $n = 267$) and chronic asymptomatic HBV carrier (AsC, $n = 223$).

RESULTS: The allele A and genotype AA frequencies of -1082 locus in IL-10 promoter region were significantly higher in CHB patients than those in SHI patients and AsC (A: $\chi^2 = 37.72$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 45.23$, $P = 0.000$; AA: $\chi^2 = 20.53$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 19.14$, $P = 0.000$). The allele T and genotype TT of -819 locus in IL-10 promoter region were also markedly higher in CHB patients than those in SHI patients and AsC (T: $\chi^2 = 10.5$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 17.38$, $P < 0.001$; TT: $\chi^2 = 8.76$, $P = 0.003$; $\chi^2 = 5.656$, $P = 0.017$). The polymorphism of -592 loci locus in IL-10 promoter region was not significantly different between the three groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The genetic polymorphism of interleukin-10 may be associated with the clinical phenotypes of HBV infection.

Key Words: Interleukin-10; Single nucleotide polymorphism; Hepatitis B virus

Yan Y, Li Z, Li HQ, Li JH, Liu Y, Gou CY, Gao JR, Shan J, Guo XH, Liu F, Yin JM, Liu DJ, Xie XC, Li H. Genetic polymorphism of interleukin-10 in patients with hepatitis B infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3529-3533

摘要

目的: 探讨中国人白细胞介素-10基因启动子单核苷酸多态性与乙型肝炎病毒感染之后临床发展之间的关系。

方法: 分别采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)和聚合酶链反应-序列特异性引物扩增法(PCR-SSP)检测478例慢性乙型肝炎患者, 223例乙肝病毒携带者及267例自限性感染者基因组DNA IL-10基因启动子区域3个多态位点-592、-819、-1082的基因多态性, 并进行相关性分析。

结果: IL-10-1082 A等位基因及AA基因型在慢性乙型肝炎患者组的频率明显高于自限性感染者组和乙肝病毒携带者组(A: $\chi^2 = 37.72$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 45.23$, $P = 0.000$; AA: $\chi^2 = 20.53$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 19.14$, $P = 0.000$)。IL-10-819 T等位基因及TT基因型在慢性乙型肝炎患者

■背景资料

近年来研究表明乙型肝炎的发生发展过程除了与病毒本身相关外, 更重要的是因宿主自身的免疫反应不同。细胞因子与机体免疫功能状态密切相关, 并在乙型肝炎发病机理中起着重要的作用。

■创新盘点

本研究发现IL-10-1082位点,慢性肝炎AA基因型明显高于自限性感染者和携带者,在其他一些研究中持有不同结论。

组的频率也高于自限性感染者组和乙肝病毒携带者组(T: $\chi^2 = 10.5, P < 0.001$; $\chi^2 = 17.38, P < 0.001$; TT: $\chi^2 = 8.76, P = 0.003$; $\chi^2 = 5.656, P = 0.017$)。IL-10-592 C/A等位基因频率和AA/CC/AC基因型在三组的分布没有统计学意义($P > 0.05$)。

结论: IL-10基因启动子多态性与乙肝病毒感染后临床发展过程可能相关。

关键词: 白细胞介素-10; 单核苷酸多态性; 乙型肝炎病毒

严艳, 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 刘芳, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉. 白细胞介素-10基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3529-3533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3529.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒(简称乙肝病毒)感染引起的一种传染病。我国是慢性乙型肝炎的高发区, 据统计, 在我国慢性乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带率为9.57%, 10%的成年人和大约60%-80%的儿童感染后会发展成为慢性乙型肝炎, 甚至是肝硬化和肝癌。其发展过程除了与病毒本身相关外, 更重要的是因宿主自身的免疫反应不同^[1]。细胞因子与机体免疫功能状态密切相关, 并在乙型肝炎发病机制中起着重要的作用^[2-4]。白细胞介素-10(IL-10)是一种抑制性细胞因子, 主要由Th2细胞产生, 抑制某些细胞因子(如TNF的合成及活性), 并且具有很强的抗炎作用, 可能是与细胞损伤和病毒感染慢性化有关的重要因素之一^[5-6]。已有文献报道, IL-10的分泌水平受遗传因素的影响^[7]。IL-10基因启动子区域主要有3个位点, 即-1082G/A, -819C/T, -592C/A^[8-9]。这3个位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与IL-10基因的转录活性及血清中IL-10的水平有关^[10-11]。因此我们对IL-10启动子区域3个位点基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关系进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-12/2004-03在北京佑安医院收集符合下述定义及标准的病例, 包括慢性乙型肝炎患者478例, 乙肝病毒携带者223例及自限性感染者267例的抗凝血标本, 其中男708例, 女260例, 年龄28-45岁, 3组之间性别、年龄具有可比性。本研究中慢性乙型肝炎患者和无症状慢性HBsAg

携带者的诊断定义, 依据2000年中华医学会感染病学分会, 肝病学会联合修订的病毒性肝炎防治方案的标准确定。入选标准和排除标准: (1)慢性乙型肝炎患者: HBsAg阳性; 抗-HBs阴性; 丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)等肝功能检测指标持续异常1 a以上; 或急性乙肝病程超过半年尚未痊愈的患者。(2)无症状慢性HBsAg携带者: HBsAg阳性, 无任何症状和阳性体征, 且各项肝功能指标正常, 并经1 a以上随访仍不处于患病状态。(3)HBV自限性感染者: 无急性或慢性乙型肝炎病史; 从未接种过乙型肝炎疫苗; 肝功能各项指标正常; 抗-HBs阳性或抗-HBs和抗-HBc阳性, HBsAg及HBcAg阴性。(4)不合并其他肝炎。(5)中国北方汉族。

1.2 方法 采集外周静脉血5 mL, 用EDTA抗凝管收取。加入红细胞裂解液离心弃上清, 重新悬浮白细胞, 再加入白细胞裂解液, 用常规酚-氯仿-异戊醇抽提法提取基因组DNA。分别采用聚合酶链反应-序列特异性引物扩增法(PCR-SSP)检测研究对象中IL-10基因启动区-819C/T位点的基因型; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)检测-1082G/A, -592C/A位点的基因型。PCR引物序列参照基因组数据库提供的序列和有关文献进行设计, 引物均由北京赛百盛公司合成, Taq酶和dNTP购自北京鼎国公司, *MnI* I, *Rsa* I 购自北京中银友谊公司, 使用美国MJ公司的2700-PCR扩增仪。-819C/T位点的PCR引物序列: 上游引物1: 5'-AACTGAGG CACAGAGATG-3', 上游引物2: 5'-AACTGAGG CACAGAGATA-3', 下游引物: 5'-AGCAACACT CCTCGCCGCAAC-3', 扩增片段长度是402 bp。扩增体系为30 μ L, 含1 U Taq酶、50 ng模板基因组DNA, 10 \times 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L引物, 0.08 mmol/L dNTP。反应参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。取PCR产物8 μ L用60g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。以上游引物1与下游引物扩增后在402 bp处出现电泳带为等位基因C纯合子(CC); 以上游引物2与下游引物扩增后在402 bp处出现电泳带为等位基因T纯合子(TT), 在两对引物扩增后402 bp处均出现电泳带则为杂合子(CT)。-1082G/A位点的PCR引物序列: 上游引物: 5'-TCTTACCTATCCCTACTTCC-3', 下游引物: 5'-CTCGCTGCAACCCAACTGGC-3', 扩增片段为139 bp。扩增体系同上, 反应参数: 退火温度61.8 $^{\circ}$ C, 其余同上。扩增后取PCR产物

表 1 IL-10-启动子区-1082等位基因与基因型频率比较 (n/%)

分组	n	基因型(%)			等位基因(%)	
		GG	AG	AA	G	A
慢肝	478	43 (9.00)	41 (8.60)	394 (82.40)	127 (13.30)	829 (86.70)
携带	223	44 (19.70)	31 (13.90)	148 (66.40)	119 (26.70)	327 (73.30)
自限	267	51 (19.10)	44 (16.50)	172 (64.40)	146 (27.30)	388 (72.70)

表 2 IL-10-启动子区-819等位基因与基因型频率比较 (%)

分组	n	基因型 (%)			等位基因 (%)	
		TT	TC	CC	T	C
慢肝	478	250 (52.30)	143 (29.92)	85 (17.78)	643 (67.26)	313 (32.74)
携带	223	101 (45.29)	68 (30.49)	54 (24.22)	270 (60.54)	176 (39.46)
自限	267	127 (47.57)	67 (25.09)	73 (27.34)	321 (60.11)	213 (39.89)

表 3 研究对象IL-10-启动子区-592等位基因与基因型频率比较 (%)

分组	n	基因型 (%)			等位基因 (%)	
		AA	AC	CC	A	C
慢肝	478	158 (33.05)	147 (30.75)	173 (36.20)	463 (48.43)	493 (51.57)
携带	223	90 (40.36)	58 (26.01)	75 (33.63)	238 (53.36)	208 (46.64)
自限	267	89 (33.33)	90 (33.71)	88 (32.96)	268 (50.19)	266 (49.81)

■应用要点

对HBV感染后临床转归与白介素-10的基因多态性的相关性进行研究,可以借此判断患者的预后,并为临床使用细胞因子进行治疗提供依据。

3 μL , 加入含有 *MnI* 3 U 的反应液 17 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 4 h, 将 G 等位基因切断, 产生 106 和 33 bp 两个片段。全部消化产物经 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。-592C/A 位点的 PCR 引物序列: 上游引物: 5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3', 下游引物: 5'-CTCGCTGCAACCCAAGTGGC-3', 扩增片段为 412 bp。扩增体系同上, 反应参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。扩增后取 PCR 产物 3 μL , 加入含有 *RsaI* 3 U 的反应液 17 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 4 h, 将 A 等位基因切段, 产生 176 和 236 bp 两个片段。全部消化产物经 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

统计学处理 IL-10 基因启动子区域-1082, -819, -592 等位基因频率及基因型频率分布情况的比较采用 χ^2 检验, 当 $P < 0.05$ 时有统计学意义, 统计学处理应用 SPSS11.0 完成。

2 结果

全部研究对象 IL-10 基因启动子基因型分布, 包括 478 例慢性乙型肝炎患者, 223 例慢性携带者和 267 例自限性感染者。采用 PCR-SSP 分析 IL-10 基因启动区-819C/T 位点的基因多态性; PCR-RFLP 分析-1082G/A 和-592C/A 位点的基因多态性。

2.1 IL-10 基因启动子区域的-1082G/A 等位基因及基因型频率比较 IL-10-1082A 在慢性乙型肝炎患者组的频率明显高于自限性 HBV 感染者

组和慢性 HBV 携带者组 ($\chi^2 = 37.72, P = 0.000$; $\chi^2 = 45.23, P = 0.000$); -1082AA 基因型在慢性乙型肝炎患者组的频率高于自限性 HBV 感染者 ($\chi^2 = 20.53, P = 0.000$), 高于慢性 HBV 携带者 ($\chi^2 = 19.14, P = 0.000$); -1082AA 基因型频率在慢性 HBV 携带者组与自限性 HBV 感染者组比较没有显著性差异 ($\chi^2 = 0.623, P = 0.723$); -1082AA/GG/GA 基因型在慢性 HBV 携带者组和自限性 HBV 感染者中比较没有显著性差异 ($\chi^2 = 0.111, P = 0.739$; $\chi^2 = 0.894, P = 0.344$; $\chi^2 = 0.623, P = 0.723$, 表 1)。

2.2 IL-10 基因启动子区域的-819 C/T 等位基因及基因型频率比较 IL-10-819T 等位基因频率在慢性乙型肝炎患者组高于自限性 HBV 感染者组和慢性 HBV 携带者组 ($\chi^2 = 10.5, P < 0.001$; $\chi^2 = 17.38, P < 0.001$)。IL-10-819 TT 基因型在慢性乙型肝炎患者与自限性 HBV 感染和 HBV 携带者组具有显著性差异 ($\chi^2 = 8.76, P = 0.003$; $\chi^2 = 5.656, P = 0.017$); 慢性乙型肝炎患者 CC, CT 基因型的频率与健康携带者和自限性 HBV 感染者比较也没有统计学意义 ($\chi^2 = 0.747, P = 0.387$; $\chi^2 = 0.194, P = 0.660$, 表 2)。

2.3 IL-10 基因启动子区-592C/A 等位基因及基因型频率比较 IL-10-592 A/C 等位基因频率在慢性乙型肝炎患者与自限性 HBV 感染者和慢性 HBV 携带者比较没有统计学意义 ($\chi^2 = 3.084, P > 0.05$;

■名词解释

限制性片段长度多态性(RFLP): 是发展最早的分子标记技术. RFLP技术的原理是检测DNA在限制性内切酶酶切后形成的特定DNA片段的大小. 因此凡是可以引起酶切位点变异的突变如点突变(新产生和去除酶切位点)和一段DNA的重新组织(如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化)等均可导致RFLP的产生.

$\chi^2 = 0.427, P = 0.1$). IL-10-592 CC, AA, CA基因型在慢性乙型肝炎患者与健康携带者和自限性HBV感染者中比较没有显著性差异($\chi^2 = 3.369, P = 0.071$; $\chi^2 = 0.196, P = 0.658$; $\chi^2 = 2.133, P = 0.144$; $\chi^2 = 0.335, P = 0.563$, 表3)

3 讨论

IL-10是一种由Th2细胞产生的免疫调节性细胞因子, IL-10与靶细胞膜上的IL-10受体结合后激活酪氨酸激酶, 从而发挥其生物学效应^[12]. IL-10具有多种抑制功能: (1)主要抑制Th1细胞的增殖和IL-2, TNF- α , TNF- γ 等细胞因子的合成及其活性, 从而抑制免疫应答. 其机制可能是IL-10下调了APC MHC II 抗原的表达, 从而降低了对TCR的刺激能力, 或改变了细胞内信号转导途径, 选择性抑制某些细胞因子mRNA转录; (2)IL-10在人的单核细胞表面抑制MHC II 类分子的表达, 降低单核细胞的抗原提呈能力; (3)IL-10阻断NK细胞刺激因子IL-12的诱导活性, 以抑制NK细胞产生TNF- γ ^[13-17]. 同时IL-10具有很强的抗炎作用. 内源性IL-10能减少肝细胞的炎性反应并限制其对肝脏的毒性作用. IL-10通过减少中性粒细胞的浸润, 活化, 减少中性粒细胞与肝窦内皮细胞的黏附, 降低局部炎症细胞因子的活性, 减轻肝脏的损害. 此外, IL-10还可以调节黏附因子的表达, 有研究表明, 细胞间黏附因子与白细胞功能相关性抗原-1的相互作用是肝细胞损伤的机制之一^[18-20].

IL-10在不同个体之间的分泌不同^[21-22], 其分泌在很大程度上与遗传因素相关. 人类IL-10基因位于第1号染色体, 他的基因启动子区具有高度多态性, 主要包括三个突变位点: -1082(G/A)、-819(C/T)、-592(C/A). 由于IL-10基因调控区启动子的多态性产生了不同的基因型, 从而影响了IL-10的转录, 即IL-10 mRNA生成, 进一步影响了血清中IL-10的水平. IL-10启动子的基因遗传性可能会调节抗体识别后免疫反应的方向和量的改变^[21,23-25]. 体外实验表明, 外周血单个核细胞经刀豆蛋白A刺激后, 带有GCC/GCC基因型者IL-10的产量最高, 带GCC/ACC, ACC/ATA基因型者其次, 而带有ATA/ATA, ACC/ACC 基因型者IL-10产量最低^[26].

Miyazoe *et al*^[27]研究正常人与慢性HBV感染者及慢性HBV携带者(asymptomatic carrier, AsC)与慢性进展性肝病患者之间IL-10基因启动子序列多态性, 结果显示: (1)正常人与慢性HBV感染之间IL-10基因启动子区等位基因分布并无

明显差异; (2)ATA/ATA基因型在AsC中的检测显著高于慢性进展性肝病; (3)GCC/GCC基因型在AsC中检出频率显著低于慢性进展性肝病. 提示, IL-10启动子区基因多态性与HBV感染导致慢性肝病的肝损害进展密切相关, IL-10高产量基因型(GCC/GCC基因型)者感染HBV后肝组织炎症坏死及肝纤维化程度较重, 而IL-10低产量基因型(ATA/ATA基因型)者感染HBV后肝组织炎症坏死及纤维化程度相对较轻, 似乎与IL-10具有抗炎症和抗纤维化作用相矛盾. 尽管IL-10具有抗炎症和抗纤维化作用, 但高水平的IL-10都可导致慢性HBV感染者体内病毒复制活跃, 从而诱发免疫反应, 导致肝组织炎症坏死. IL-10高产量基因型感染HBV后出现较重肝损害可能与此有关.

一些学者认为高水平IL-10会致使肝脏病变迁延不愈, 可能算是乙型肝炎慢性化的机制之一. 这与IL-10增加将限制IFN- γ 的合成, 削弱IFN- γ 杀灭HBV的作用和抑制宿主抗HBV细胞免疫活性, 导致HBV体内持续复制和表达抑制机体的抗病毒免疫, 导致HBV在体内持续存在有关^[28-30]. 但也有部分学者认为IL-10产量高的基因型(GCC/GCC基因型)与HBV感染的自发性清除有关^[27,31].

本研究中检测968例患者的IL-10基因启动子区域的3个位点, 即-1082G/A, -819C/T, -592C/A, 其中包括478例慢性乙型肝炎, 223例乙肝病毒携带者和267例自限性感染者. 结果显示, IL-10基因启动子-1082和-819位点的等位基因和基因型在3组中出现的频率具有统计学的差异. IL-10-1082 A等位基因在慢性乙型肝炎患者组的频率明显高于自限性感染者组和乙肝病毒携带者组; IL-10-1082基因型在3组之间的两两比较显示慢性乙型肝炎患者组的AA频率高于自限性感染者和乙肝病毒携带者. IL-10-819T等位基因在慢性乙型肝炎患者组的频率高于自限性感染者组和乙肝病毒携带者组. IL-10-819 TT基因型在慢性乙型肝炎患者与自限性感染者及乙肝病毒携带者的分布具有显著性差异, 慢性乙型肝炎患者的频率显著高于后两者. IL-10-592 A/C等位基因频率和AA/CC/AC基因型在慢性乙型肝炎患者与自限性感染者和乙肝病毒携带者的分布比较没有统计学意义.

慢性HBV感染是一个复杂的多种因素共同作用的过程, 病毒与宿主的相互作用非常关键. 我们探讨了IL-10基因启动子区多态性与HBV感染的关系发现, IL-10启动子区-1082G/A和

-819C/T等位基因和基因型, 在慢性乙型肝炎患者, 自限性感染者及慢性携带者中分布具有显著性差异, 提示IL-10启动子区基因多态性与乙肝病毒感染后临床发展过程可能相关, 可以成为病毒感染后临床发展的一个预测因素。

4 参考文献

- 1 施红, 王福生. 影响HBV感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. 世界华人消化杂志 2001; 9: 66-69
- 2 晏泽辉, 邓国宏, 王宇明. 乙型肝炎的宿主遗传易感性的研究进展及前景. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1002-1007
- 3 郑伟强, 张武英, 龙尧, 王胜春. 重型乙型肝炎患者血清白细胞介素-8和白细胞介素-10的检测及其临床意义. 中国现代医学杂志 2004; 14: 76-79
- 4 周越塑, 王福生, 刘明旭, 金磊, 洪卫国. 肿瘤坏死因子- α 基因启动子区点突变与乙型肝炎相关. 世界华人消化杂志 2005; 13: 207-210
- 5 Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-3451
- 6 曾俊涛, 刘正稳, 韩群英, 张妮. 白细胞介素-10启动子区基因多态性与慢性丙型肝炎的相关性. 西安交通大学学报 2005; 26: 37-39
- 7 毛小荣, 陈红. 白介素-10、肿瘤坏死因子- α 基因多态性与肝病. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 369-371
- 8 Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor- α gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002; 22: 404-412
- 9 Siekiera U, Jarosz-Chobot P, Janusz J, Koehler B. Polymorphism of TNF- α (308 A/G), IL-10 (1082 A/G, 819 C/T 592 A/C), IL-6 (174 G/C), and IFN- γ (874 A/T); genetically conditioned cytokine synthesis level in children with diabetes type 1. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2002; 8: 29-34
- 10 陈曲波, 范列英, 仲人前, 屠小卿, 袁媛, 朱烨, 叶伟民, 陆慧琦, 韩焕兴. 白细胞介素-10基因多态性与自身免疫性肝病相关性研究. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 356-359
- 11 曾俊涛, 刘正稳. IL-10在丙型肝炎中的作用. 国外医学·流行病学传染病学分册 2003; 30: 221-223
- 12 Gibbs VC, Pennica D. CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. *Gene* 1997; 186: 97-101
- 13 Im SH, Hueber A, Monticelli S, Kang KH, Rao A. Chromatin-level regulation of the IL10 gene in T cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 46818-46825
- 14 Ho AS, Moore KW. Interleukin-10 and its receptor. *Ther Immunol* 1994; 1: 173-185
- 15 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765
- 16 Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Larner AC, Finbloom DS. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 1999; 93: 1456-1463
- 17 Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118: 655-660
- 18 Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, Deviere J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997; 25: 1382-1389
- 19 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 20 Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999; 30: 526-530
- 21 任大宾, 孙仁宇. 白介素-10的抗炎功能及其分子机制. 国外医学呼吸系统分册 2005; 25: 175-178
- 22 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998; 28: 1597-1606
- 23 Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9465-9470
- 24 Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8
- 25 Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Paziienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. *Cytokine* 2004; 25: 103-109
- 26 张平安, 吴健民, 李艳. 几种细胞因子基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关系. 国际检验医学杂志 2006; 27: 173-175
- 27 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiji Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2086-2092
- 28 吴晓蔓, 郭海波. 慢性乙型肝炎患者血清IL-10与HBVDNA复制水平检测及临床意义. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 151-152
- 29 张萍, 颜学真, 吴文漪, 魏来, 冯霞. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞Th1、Th2型细胞标志物及其细胞因子的表达. 中华传染病杂志 2003; 21: 42-43
- 30 Bozkaya H, Bozdai M, Turkiilmaz R, Sarioglu M, Cetinkaya H, Cinar K, Kose K, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Circulating IL-2, IL-10 and TNF- α in chronic hepatitis B: their relations to HBeAg status and the activity of liver disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1675-1679
- 31 Thursz M. Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis. *Antiviral Res* 2001; 52: 113-116

■同行评价

本文实验设计合理, 对比恰当, 实验例数较多, 所得结果可靠, 文献引用较新, 讨论具体客观, 具有一定的临床参考价值。

自身免疫性肝炎临床、免疫学及病理学特征分析142例

李蕴铷, 魏来, 王文冰, 王培之, 张黎颖, 欧蔚妮, 谢雯, 成军

■背景资料

由于我国目前最多见的肝病为病毒性肝炎, 对自身免疫性肝炎容易误诊, 近年来随着对此病认识的逐渐加深和诊断技术的不断提高, 确诊的病例也在不断增加, 自身免疫性肝炎是一种原因未明的肝病, 无论在临床表现, 免疫学和病理学特征, 还是治疗的原则都与其他肝炎有着明显的不同, 掌握这些特点对自身免疫性肝炎诊治有十分重要的临床意义。

李蕴铷, 欧蔚妮, 谢雯, 北京地坛医院肝病二科 北京市 100011

王培之, 北京地坛医院病理科 北京市 100011

张黎颖, 成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

王文冰, 鞍山市传染病医院 辽宁省鞍山市 114000

魏来, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044

通讯作者: 李蕴铷, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院肝病二科. yunrul2002@yahoo.com.cn

电话: 010-64211031-2457

收稿日期: 2006-09-25 接受日期: 2006-10-13

Clinical, immunological and pathological characterization of autoimmune hepatitis: an analysis of 142 cases

Yun-Ru Li, Lai Wei, Wen-Bin Wang, Pei-Zhi Wang, Li-Ying Zhang, Wei-Ni Ou, Wen Xie, Jun Cheng

Yun-Ru Li, Wei-Ni Ou, Wen Xie, the Second Department of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Pei-Zhi Wang, Department of Pathology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Wen-Bin Wang, Anshan Infectious Disease Hospital, Anshan 114000, Liaoning Province, China

Lai Wei, Institute of Hepatology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China

Correspondence to: Yun-Ru Li, the Second Department of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, East District, Beijing 100011, China. yunrul2002@yahoo.com.cn

Received: 2006-09-25 Accepted: 2006-10-13

Abstract

AIM: To summarize the clinical, immunological and pathological features of autoimmune hepatitis (AIH).

METHODS: The data, including general information, clinical characteristics, and results of biochemical, immunological and pathological examinations, of 142 AIH patients were retrospectively analyzed.

RESULTS: Most of AIH patients were women, with a mean age of 52.57 ± 14.85 years old, and the ratio of male to female was 1 : 3.73. Of all the patients, 42.3% were presented with chronic hepatitis, 34.5% with acute hepatitis, 9.9% with

severe hepatitis and 13.4% with cirrhosis. The main clinical manifestations included fatigue (97.2%), inappetence (84.5%), jaundice (84.5%), fever (19%), nausea (14.1%), and abdominal swelling (12.7%). AIH patients complicated with primary biliary cirrhosis covered a percentage of 14.1%, and those complicated with other autoimmune diseases covered 17.6%. Biochemical examination showed elevated levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and total bilirubin. High level of γ -globulin and immunoglobulin G were tested in most patients. The percentages of patients with Type 1 AIH and Type 2 AIH were 92.2% and 6.3%, respectively, while there was only 1 case with Type 3 AIH. A total of 21 kinds of auto-antibodies were detected, including ANA (72.4%), SMA (19.7%), AMA (19%), anti-SSA (9.2%), etc. Hepatocyte denaturation, necrosis and plasmocyte infiltration were demonstrated in all of the 19 patients received liver biopsy, and fibrosis was found in 17 cases and bile duct injury in 1 case.

CONCLUSION: AIH occurred more frequently in females, and the onset and clinical features are not typical. Type 1 AIH is the most common one. There are many categories of antibodies in AIH, but the antibodies with higher specificity and sensibility should be further studied. Hepatocyte denaturation, necrosis, plasmocyte infiltration and fibrous proliferation are dominant histological features.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Immunology; Pathology; Clinical characteristic

Li YR, Wei L, Wang WB, Wang PZ, Zhang LY, Ou WN, Xie W, Cheng J. Clinical, immunological and pathological characterization of autoimmune hepatitis: an analysis of 142 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3534-3538

摘要

目的: 了解自身免疫性肝炎(AIH)患者的临床、免疫学和病理学特点。

方法: 回顾性分析142例AIH患者的一般资料、临床特点、生化检查、免疫学检查和自

身抗体的结果。

结果: 142例AIH患者男女比例1:3.73, 发病年龄为 52.57 ± 14.85 岁, 首次发病诊断分别为慢性肝炎(42.3%)、急性肝炎(34.5%)、重型肝炎(9.9%)和肝硬化(13.4%); 临床表现主要为乏力(97.2%)、纳差(84.5%)、黄疸(84.5%)、发热(19.0%)、恶心(14.1%)和腹胀(12.7%)等。生化检查显示, ALT、AST、TBIL水平升高。AIH亚型中I型多见(92.2%), II型少见(6.3%), III型罕见, 仅1例。AIH重叠原发性胆汁性肝硬化(PBC)占14.1%, 合并其他自身免疫性疾病占17.6%。免疫学检测显示, γ 球蛋白和IgG升高明显。自身抗体检测出不同类型21种, 以抗核抗体(82.4%), 抗平滑肌抗体(19.7%), 抗线粒体抗体(19%), 抗SSA抗体(9.2%)多见。肝活检19例, 均可见不同形式的肝细胞变性, 坏死和浆细胞浸润, 17例患者存在不同程度的纤维增生, 1例有胆管轻度破坏。

结论: AIH女性多见, 发病和临床表现无特异性, 生化检查以肝细胞损伤为主, I型AIH最多见, 检出自身抗体种类较多, 但特异性和敏感性较高的自身抗体尚待进一步研究。肝组织学改变主要为不同程度的肝细胞变性, 坏死, 浆细胞浸润和纤维增生。胆管破坏少见。

关键词: 自身免疫性肝炎; 免疫学; 病理学; 临床特征

李蕴钊, 魏来, 王文冰, 王培之, 张黎颖, 欧蔚妮, 谢雯, 成军. 自身免疫性肝炎临床、免疫学及病理学特征分析142例. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3534-3538

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3534.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是以肝脏炎症反应为主的自身免疫性肝病, 病因不明, 在美国约有100-200万AIH患者^[1], 我国尚缺乏确切的发病资料, 既往认为其为少见病, 近年来随着对此类疾病认识的加深和诊断技术的提高, 发现临床中并不少见, 我们对142例AIH患者的临床、免疫学和病理学特点进行分析。

1 材料和方法

1.1 材料 142例病例均为北京地坛医院2000-01/2005-08确诊为AIH的住院患者, 其中男30例, 女112例, 男女比例为1:3.73; 发病年龄为 52.57 ± 14.85 岁, 其中男 49.90 ± 16.96 岁, 女 53.29 ± 14.23 岁, 男女发病年龄差别无显著性($P>0.05$)。诊断符合1998年国际AIH小组修订的AIH描述性诊断和评

分诊断标准^[2]。糖皮质激素的应用方案和缓解的标准参照2002年美国肝病学会(AASLD)治疗指南^[3]。

1.2 方法

1.2.1 肝功能检查指标 肝功能检查指标主要包括: 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT), 采用日本日立7180自动生化分析仪检测。免疫球蛋白采用美国Beckman Coulter公司Array 360系统检测, 方法为免疫比浊法。

1.2.2 自身抗体的检测 抗核抗体(ANA), 抗平滑肌抗体(SMA), 抗肝肾微粒体抗体(抗LAK), 抗肝特异性胞质抗原型1抗体(抗LC1), 抗可溶性肝脏抗原抗体(抗SLA), 抗胃壁抗体(抗PCA), 抗核糖体抗体(抗RNP), 抗着丝点抗体(抗ACA), 抗肝细胞膜抗体(抗LMA), 抗肝细胞膜特异性脂蛋白抗体(抗LSP), 抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA), 抗SSA, 抗SSB, 抗Sm, 抗溶酶体抗体, 抗高尔基体抗体, 抗肌动蛋白抗体, 抗波形蛋白抗体, 抗Link18KD抗体等检测应用间接免疫荧光法和免疫印记法检测, 试剂盒购自德国欧蒙医学实验诊断公司。

1.2.3 肝组织活检 19例患者进行了肝组织活检, 蜡块包埋, 切成4 μ m厚度切片, 常规HE染色, 由两位有经验的病理医师阅读。

统计学处理 采用SPSS11.5进行统计学处理, 应用 t 检验。

2 结果

2.1 临床表现 首次发病诊断为慢性肝炎者为60例(42.3%); 急性肝炎者为49例(34.5%); 重型肝炎为14例(9.9%), 其中亚急性重型肝炎8例, 慢性重型肝炎6例; 肝硬化为19例(13.4%); 有50例(35.2%)患者存在不同时间的误诊, 平均误诊时间为 6.02 ± 7.24 a, 最长误诊时间为30 a。主要症状为乏力138例(97.2%), 纳差120例(84.5%), 腹胀18例(12.7%), 恶心20例(14.1%), 呕吐7例(4.9%), 腹泻和呕血黑便各2例(1.4%), 黄疸120例(84.5%), 皮肤瘙痒10例(7.0%), 肝区不适4例(2.8%), 发热27例(19.0%), 体温最高者达 39.5°C , 最低 37.7°C , 平均 $38.4 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$; 主要体征为面色灰暗23例(16.2%), 肝掌56例(39.4%), 蜘蛛痣17例(12.0%), 皮疹2例(1.4%), 肝大22例(15.5%), 脾大12例(8.5%), 腹水14例(9.9%), 双下肢浮肿3例(2.1%)。AIH重叠PBC患者20例(14.1%), 合并其他自身免疫性疾病25例(17.6%), 其中糖尿病8

■创新盘点

本文对142例自身免疫性肝炎患者的临床、免疫学和病理学特征进行了详细的描述, 并与国外的报道进行了比较, 强调AST的升高是AIH肝脏损伤的一个重要特点, 此外比较了我国甘草酸类药物与激素的近期疗效是文章另一个创新点。

■名词解释

治疗后缓解: 症状消失; 转氨酶降至正常上限的2倍以内; 胆红素和 γ -球蛋白降至正常; 肝组织恢复正常, 或门脉区炎症, 硬化程度减少到最轻或消失。

表 1 AIH患者肝功能指标实验室检查结果 (mean \pm SD, $n = 142$)

分组	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	TBil (μ mol/L)	DBil (μ mol/L)	ALP (nkat/L)	GGT (nkat/L)	AST/ALT
AIH组	6679.7 \pm 6535.6	6916.7 \pm 8765.1	156.9 \pm 157.5	89.33 \pm 91.54	3765.7 \pm 4797.6	3612.7 \pm 3811.1	1.8 \pm 3.2
正常值	0-683.1	0-683.1	0-20.5	0-8.6	700.1-2350.5	0-783.5	

表 2 AIH患者免疫学指标实验室检查结果 (mean \pm SD, $n = 111$)

分组	IgG (g/L)	IgM (g/L)	C3 (g/L)	C4 (g/L)	γ 球蛋白 (%)	CRP (g/L)	ESR (mm/h)
AIH组	21.1 \pm 9.4	2.2 \pm 1.7	0.97 \pm 0.4	0.3 \pm 0.4	25.9 \pm 8.4	8.9 \pm 13.8	37.8 \pm 31.4
正常值	6.9-16.2	0.6-2.6	0.9-2.1	0.2-0.5	12.1-22.5	< 10	0-15

例, 类风湿性关节炎4例, 神经性皮炎3例, 甲状腺机能亢进症、干燥综合征和银屑病各2例, 甲状腺机能减退症, 硬皮病, 白癜风和血小板减少性紫癜各1例。142例AIH患者肝功能各指标的实验室检查结果见表1。

2.2 免疫学指标 142例AIH中有111例具有完整的免疫学检查结果, 其中70%患者 γ 球蛋白大于正常值上限; IgM, C3, C4水平无明显升高; 69.6%患者IgG水平高于正常值上限; 56.7%患者ESR值高于正常值上限(表2)。

2.3 自身抗体检测 142例AIH患者中共检出各类自身抗体21种, 其中ANA阳性为117例(82.4%), SMA阳性者28例(19.7%), AMA阳性者27例(19.0%), 抗SSA阳性者13例(9.2%), 抗SSB阳性者2例, 抗LC1阳性者6例, 抗RNP阳性者5例, 抗Sm抗体阳性者4例, 抗PCA和抗LAK抗体阳性者各3例, 抗ACA、抗LMA抗体阳性者各2例, 抗LSP抗体阳性者、抗波形蛋白抗体、抗肌动蛋白抗体、抗SLA抗体、抗高尔基抗体、抗溶酶体抗体、抗双链DNA抗体、抗Link18KD抗体和ANCA阳性者各1例。根据自身抗体结果将AIH分为3个亚型: I型AIH患者131例(92.2%), II型AIH患者9例(6.3%), III型AIH患者1例。

2.4 肝脏病理学改变 19例患者均可见不同形式的肝细胞变性, 坏死和浆细胞浸润。变性主要为嗜酸样变性(10例)和气球样变性(5例), 水样和脂肪变性相对少见(各1例); 9例为点状坏死, 6例为碎屑样坏死, 4例桥接坏死, 2例小叶内融合坏死; 汇管区浆细胞浸润最为常见, 有部分患者存在窦周淋巴细胞的浸润; 17例患者在汇管区和窦周存在不同程度纤维组织增生, 2例存在纤维间隔, 1例存在小叶结节增生; 有1例考虑重叠PBC患者存在胆管破坏。

2.5 治疗和随访 79例AIH患者应用甘草酸类药

物治疗, 住院疗程 35.38 ± 16.57 d, 出院时78.9%获得缓解, 出院后继续口服同类药物; 21例AIH患者应用强的松治疗, 始量为40-60 mg/d, 以后逐渐减量, 住院疗程 38.21 ± 23.30 d, 出院时80.9%获得缓解, 出院后继续减量后予7.5-10 mg/d维持。出院时两组缓解率无显著性差异($P > 0.05$)。24例患者进行了平均 14 ± 5 mo的随访, 其中应用甘草酸类药物组13例, 有9例(69.2%)复发, 强的松组11例, 有3例(27.3%)复发。

3 讨论

AIH是最常见的一种自身免疫性肝病, 由于我国是以病毒性肝炎最为常见, AIH在我国既往未受重视, 临床中易导致误诊, 142例AIH患者有35.2%的患者存在不同时间的误诊, 最长有达30年之久。本资料结果显示, 男女比例为1:3.73, 发病年龄集中在50-60岁之间, 较欧美和印度报道的发病年龄偏大, 与日本报道相似^[4-5]。起病方式呈多样性, 其中以慢性肝炎表现起病者占近一半(42.3%), 急性肝炎方式起病者占1/3左右(34.5%), 这与国内外文献报道相似^[4,6]。值得注意的是, 首次发病呈现为重型肝炎(9.9%)和肝硬化(13.4%)者并不少见。临床表现中以乏力, 纳差和黄疸为最常见的3个症状, 恶心, 呕吐和腹泻等较重的消化道症状并不多见, 合并发热者占19.9%, 体温大多集中在38-39℃, 皮肤瘙痒多见于重叠PBC的患者, 单独AIH未发现皮肤瘙痒的表现, 肝大者并不多见(15.5%), 脾大、腹水和双下肢水肿及呕血、黑便者主要见于合并肝硬化者。肝功能检查中ALT和AST升高较明显, 令人感兴趣的是AST/ALT ≥ 1 的AIH患者达52%, 这与常见的病毒性肝炎有所不同。胆红素升高较常见(86.5%), 其中直接胆红素占总胆红素比例为54%, ALP和GGT的均有所升高, 但大多小于正常值上限的5倍以内, 以上提示AIH的肝损

伤以肝细胞的破坏为主, 胆管损伤较轻. 文献报道中约17%-48% AIH患者合并其他自身免疫性疾病, 常见的有甲状腺炎, 关节炎, 结肠炎, 干燥综合征等^[6-7], 本组资料显示AIH患者中17.6%存在其他类型自身免疫性疾病, 主要为糖尿病, 类风湿关节炎、甲亢、神经性皮炎、干燥综合征等. 虽然有认为AIH的发病可能与病毒感染有关, 特别是肝炎病毒, 如HAV, HCV等^[8-9], 有报道AIH患者注射甲肝、乙肝疫苗可诱发病情加重^[10], 但在本组病例中并不多见, 仅证实有2例分别感染了HBV和HEV. 免疫学检测结果显示, 大多数患者丙种球蛋白偏高, 主要以IgG升高为主, 是诊断AIH的重要参考指标, 如所在单位不能开展此项目检测, 蛋白电泳和血沉的检查亦有助于AIH的诊断. ANA和SMA阳性是诊断I型AIH最重要的参考指标^[7], 其阳性率最高, 共占92.2%, 和国内报道相似^[11], 此类抗体灵敏度较高, 但特异度不高, 单独的自身抗体不能诊断AIH, 需结合其他临床指标; II型AIH的特异性抗体为抗LAK1和抗LC抗体, 约占6.3%, 该亚型在欧洲国家相对常见, 且主要发生于儿童^[12]; 抗SLA/LP阳性是AIH特异性较高的一项指标, 目前被认为是III型AIH标志性抗体, 本组资料仅占1例, 其临床表现和实验室检查于I型AIH无区别, 对激素治疗反应较好^[13]. 值得注意的是, 除以上几种对诊断AIH有重要参考价值的自身抗体外, 尚检出其他自身抗体15种, 这些抗体的意义可能是AIH合并其他自身免疫性疾病的标志, 或者这些自身抗体中是否对诊断AIH更具有特异性, 尚需在临床和实验室方法等方面更深一步研究. 目前, 有关AIH病理学特征尚不够明确, 本组对19例AIH肝组织病理观察显示, 均肝组织病变均呈活动性肝炎改变. 可见肝小叶内点状坏死、碎屑样坏死、桥接坏死及小叶中央区融合性坏死. 汇管区小叶界面及小叶内坏死灶中淋巴细胞浸润严重, 在这些部位同时存在不同程度的纤维化. 肝组织淤胆不重, 胆管破坏不明显. AIH无特征性肝脏病理改变, 但由于肝脏病理学改变对AIH的描述性诊断或评分系统是必不可少的, 更主要的是有助于除外其他肝脏疾病, 因此肝组织活检对诊断AIH是十分必要的.

糖皮质激素虽已公认为治疗AIH的有效药物^[14-15], 但在临床应用中仍受到一定的限制: (1) AASLD推荐意见中仅对严重AIH建议应用免疫抑制剂治疗, 对于轻中度的AIH并未建议应用, 如何治疗尚无规范; (2) 我国AIH患者发病年

龄明显高于欧美, 平均年龄在50岁左右, 甚至有相当一部分患者年龄大于60岁, 且多为女性, 大多进入或即将进入绝经期, 很多患者同时患有高血压, 糖尿病, 骨质疏松等, 不能耐受长期应用激素治疗; (3) 我国病毒性肝炎, 特别是乙型肝炎发病率高, 有一部分AIH患者合并病毒性肝炎, 限制的激素的应用; 甘草酸类药物目前在临床上广泛用于治疗急慢性病毒性肝炎, 疗效确切, 不良反应轻, 其应用于治疗AIH报道不多, 我们应用中观察到短期疗效与强的松相似, 但随访中发现复发较强的松多见, 可惜随访例数较少, 应进一步扩大随访病例并延长随访时间.

4 参考文献

- 1 Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 223-243
- 2 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938
- 3 Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 36: 479-497
- 4 Choudhuri G, Somani SK, Baba CS, Alexander G. Autoimmune hepatitis in India: profile of an uncommon disease. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 27
- 5 Omagari K, Kinoshita H, Kato Y, Nakata K, Kanematsu T, Kusumoto Y, Mori I, Furukawa R, Tanioka H, Tajima H, Koga M, Yano M, Kohno S. Clinical features of 89 patients with autoimmune hepatitis in Nagasaki Prefecture, Japan. *J Gastroenterol* 1999; 34: 221-226
- 6 Nikias GA, Batts KP, Czaja AJ. The nature and prognostic implications of autoimmune hepatitis with an acute presentation. *J Hepatol* 1994; 21: 866-871
- 7 Matsumoto T, Morizane T, Aoki Y, Yamasaki S, Nakajima M, Enomoto N, Kobayashi S, Hashimoto H. Autoimmune hepatitis in primary Sjogren's syndrome: pathological study of the livers and labial salivary glands in 17 patients with primary Sjogren's syndrome. *Pathol Int* 2005; 55: 70-76
- 8 Tanaka H, Tujioka H, Ueda H, Hamagami H, Kida Y, Ichinose M. Autoimmune hepatitis triggered by acute hepatitis A. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6069-6071
- 9 Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuji T, Omata M. Present status of autoimmune hepatitis in Japan—correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26: 1207-1212
- 10 Csepregi A, Treiber G, Rocken C, Malfertheiner P. Acute exacerbation of autoimmune hepatitis

■同行评价

本文较详细分析了我国自身免疫性肝炎的临床、免疫学和病理学特点, 为更深刻理解自身免疫性肝炎的诊断标准提供了临床资料, 并为更进一步探讨自身免疫性肝炎患者的治疗方案做了启示性的工作.

- induced by Twinrix. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4114-4116
- 11 谭立明, 董叶, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 王园园. 自身免疫性肝炎患者自身抗体的测定及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2801-2805
- 12 Lankisch TO, Strassburg CP, Debray D, Manns MP, Jacquemin E. Detection of autoimmune regulator gene mutations in children with type 2 autoimmune hepatitis and extrahepatic immune-mediated diseases. *J Pediatr* 2005; 146: 839-842
- 13 Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, Wies I, Kanzler S, Cancado EL, Porta G, Nishioka M, Simon T, Daehnrich C, Schlumberger W, Galle PR, Lohse AW. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 2002; 51: 259-264
- 14 Czaja AJ, Menon KV, Carpenter HA. Sustained remission after corticosteroid therapy for type 1 autoimmune hepatitis: a retrospective analysis. *Hepatology* 2002; 35: 890-897
- 15 Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 2006; 43: S132-S144

电编 李琪 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 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐市召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编:210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.

联系电话:025-83472831, 86086091.

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

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字以内, 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。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

《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.

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 $T_{1/2}^1$, Vmax不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{\max} , C_{\max} , *Vd*, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 改为*M_r* 30 000或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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% 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 \pm 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 \leq 100,百分数到个位;101 \leq 分母 \leq 1 000,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

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 Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-

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。

Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的

研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上。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。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、补充或删除时, 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 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹志成 科学主任
伊利沙伯医院肿瘤研究科

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院普外科

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

党双锁 副教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院实验诊断科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

郝春秋 副教授
第四军医大学唐都医院全军感染病防治中心(传染科)

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

季国忠 主任医师
南京医科大学第二附属医院消化科

李晓宇 主任医师
北京航天中心医院消化内科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

李宗芳 教授
西安交通大学医学院第二附属医院干部病房普通外科

刘占举 教授
郑州大学第二附属医院消化科

吕宾 教授
浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈 教授
上海市长海医院病理科

彭吉润 主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

王效民 教授
厦门大学附属中山医院肝胆外科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

杨冬华 教授
广州市天河区暨南大学附属第一医院消化内科

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

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

张青云 教授
北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院检验科

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

郑民华 教授
上海瑞金医院普外科