

CD4+T细胞亚群的新认识及对炎症性肠病研究的指导

郑长青, 胡刚正

郑长青, 胡刚正, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110003
项目负责人: 郑长青, 110003, 辽宁省沈阳市三好街 36 号, 中国医科大学附属第二医院消化内科. zhengchangqing88@163.com
电话: 024-83956383 传真: 024-83956682
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-11-19

摘要

大量证据提示CD4+T淋巴细胞在炎症性肠病的发病中起重要作用. CD4+T淋巴细胞可根据表型, 细胞因子表达谱和功能等方面的差异分为多个亚群, 研究这些亚群的分类、极化(或分化)、功能特点及相互关系是认识T细胞致病机制的基础. 目前对Th1/Th2的极化过程已积累了丰富的认识. 近年来很多学者认为调节性T淋巴细胞是一个能产生明显免疫抑制作用的相对独立的T细胞亚群, 并提出致病性T细胞/调节性T细胞平衡是机体调节免疫反应的主要模式, 其紊乱可诱发免疫性疾病, 包括炎症性肠病. 本文就这些新认识作一综述并针对炎症性肠病的研究提出一些看法.

郑长青, 胡刚正. CD4+T细胞亚群的新认识及对炎症性肠病研究的指导. 世界华人消化杂志 2004;12(3):505-511
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/505.asp>

0 引言

CD4+T淋巴细胞可分为很多功能不同的亚群, 大量证据提示这些亚群的紊乱可能是炎症性肠病(IBD)的重要发病机制. 很早就根据细胞因子表达谱的不同将辅助性T细胞分为Th1细胞和Th2细胞, 并提出Th1/Th2平衡失调可能是IBD的发病机制之一. 近年来很多学者倾向于将抑制性T淋巴细胞重新命名为调节性T淋巴细胞(Tr细胞), 认为是一个在表型、细胞因子表达谱和功能上相对独立的T细胞亚群, 并提出致病性T细胞/调节性T细胞平衡是机体调节免疫反应的主要模式, 其紊乱可诱发免疫性疾病, 包括炎症性肠病. 因此, 关于CD4+T细胞各亚群的分类、极化机制、表型和功能特点及相互关系等研究一直很受关注. 此领域的新认识可能对炎症性肠病的研究提供重要的指导作用.

1 CD4+T细胞亚群

人体的T细胞来源于胸腺, 在外周经历活化、增生和分化后形成成熟的效应T细胞, 无论是初始T细胞还是成熟T细胞, 在表型和功能上均表现为高度异质性. 在胸腺中经过阳性选择后, T细胞可分为CD4+T细胞和CD8+T细胞, 这种膜表面标记与功能差异相关, 其分别介导与人类主要组织相容性抗原复合体II(MHC

II)和I(MHC I)分子的结合, 多数CD8+T细胞以直接细胞毒性作用为功能特点. 根据功能差异, 很早就从理论上将CD4+T细胞分为辅助性T细胞(Th细胞)和抑制性T细胞(Ts细胞). Th细胞主要表现为增强免疫应答, Ts细胞则相反. 1986年Mosmann et al^[1]首先根据分泌的细胞因子的不同将Th细胞分为Th1和Th2两大类, Th1细胞以表达IFN- γ 和IL-2为主, 不表达IL-4, Th2细胞以表达IL-4, IL-5, IL-10为主, 不表达IFN- γ . 此分类虽根据其细胞因子表达谱, 但能很好的代表其功能差异, 因为这种功能差异在很大程度上正是由其分泌的不同细胞因子所决定. Th1细胞促进B细胞分泌IgG2 α , Th2细胞促进B细胞分泌IgE, IgG1, Th1细胞的保护效应主要针对肿瘤和细胞内微生物, Th2细胞主要针对细胞外寄生虫. Th1细胞介导的病理过程和疾病主要有迟发型高敏反应(DTH), 类风湿性关节炎, I型糖尿病, Chron病, 甲状腺炎, 葡萄膜炎等, Th2细胞主要介导嗜酸性粒细胞相关细胞毒性作用, 过敏性疾病, 哮喘等^[2]. 在后来的研究中发现, IFN- γ 与IL-2, IL-4与IL-10的表达常不一致, 且其功能差别也大, 故最近已有权威文献^[3]用Th1细胞表达IFN- γ 和TNF- β , Th2细胞表达IL-4, IL-5, IL-9, IL-13来表述. 在实际研究中, 一般只以高表达IFN- γ 和IL-4分别代表Th1细胞和Th2细胞. Th0细胞曾被用来表示同时低表达IFN- γ 和IL-4的一类亚群, 一般被认为是初始T细胞向成熟Th1/Th2细胞分化的过渡细胞群. 在口服耐受的研究中发现一类高表达IL-10和TGF- β 的T细胞, 其能产生很强的抗原特异性免疫抑制和非特异性旁路抑制作用, 这种介导口服耐受的T细胞被称为Th3细胞^[4]. 其前体细胞及分化过程尚不清楚, 但既然其以抑制免疫反应为功能特点, 继续划入Th细胞行列就不太合适了. 尽管1970年代初在概念上已明确提出了Ts细胞^[5], 但由于这种抑制作用的细胞和分子机制并不清楚, 考虑到在很多情况下, 即使是Th1细胞, Th2细胞或细胞毒性T细胞(CTL), 在发挥免疫效应的同时也能对其他免疫细胞的活化、增生和表达效应因子产生抑制作用, 所以目前的教科书仍认为Ts细胞只是一个功能上的概念, 而不代表一个较独立的细胞群体^[6]. 近年的研究进展已对这一观点提出了挑战, 越来越多的学者认为机体内存在以抑制免疫反应为主要功能特点的独立CD4+T细胞亚群已不容置疑, 并倾向于用Tr细胞来统一表示此类细胞^[7-10].

2 调节性T细胞

T细胞的克隆剔除和无能化(Anergy)被公认为机体耐受自身及外来抗原的主要机制,但自反应T细胞及外来抗原和其抗原特异性T细胞在机体内的同时存在却未表现出明显的自身免疫病或高敏反应提示机体内存在一种主动免疫抑制的耐受机制^[11-14].近年研究证明Tr细胞是介导这种主动免疫耐受的主要细胞.机体内存在以抑制免疫反应为主要功能特点的T细胞亚群的最有力证据来自动物试验.将某些致病性抗原或半抗原以适当剂量灌服小鼠并未观察到病理反应,从其脾脏或外周血中分离的T细胞转输到同基因小鼠体内不但不引起不良反应,而且能产生强力的抑制相应抗原所诱发的病理反应,此类T细胞被称为Th3细胞,体外培养中能高表达IL-10和TGF- β 而或不低表达IFN- γ ,IL-4,并能抑制Th1/Th2细胞的活化增生^[4,15-16].人类或小鼠的CD4+T细胞,在加IL-10的体外培养环境下反复刺激能诱导出一类高分泌IL-10和TGF- β 的T细胞亚群,被称为Tr1细胞,其能抑制其他T细胞的增生,动物体内试验中能抑制结肠炎的发展^[17-18].生长期胸腺切除小鼠(d3Tx)能自发多器官的自身免疫性炎症反应,如:胃炎,卵巢炎,睾丸炎,甲状腺炎等,将裸鼠转输被除去CD4+CD25+T细胞的正常鼠CD4+T细胞也产生类似的自身免疫病,这些炎症能被转输正常小鼠的CD4+CD25+T细胞所抑制^[11,19-20].重度联合免疫缺陷鼠(SCID)转输正常鼠CD45RB^{high}CD4+T细胞亚群能诱发结肠炎,而转输CD45RB^{low}CD4+T细胞亚群能阻止这种结肠炎的发生^[21].这些符合Tr细胞功能特点的T细胞亚群的前体细胞和分化过程是否在本质上一致尚不清楚.Th3细胞和Tr1细胞较为相似,均可看作外来抗原特异性Tr细胞,CD4+CD25+T细胞并无明显的外来抗原特异性,因为来自无菌环境饲养下的正常鼠的CD4+CD25+T细胞也能产生同样的体内免疫抑制作用,故被称为自发性Tr细胞,但有研究显示他们之间有明显的联系^[22].在人体或小鼠,CD4+CD25+T细胞约占外周血CD4+T细胞的5-10%,而相似比例的胸腺CD4+CD8-T细胞表达CD25并能产生如外周血CD4+CD25+T细胞同样的免疫抑制作用^[23-27].值得注意的是成人外周血CD4+CD25+T细胞的CD25表达水平有明显差别,高表达的只占很小部分^[28].有研究认为CD25的表达发生在CD4+CD8+双阳T细胞向CD4+CD8-T细胞转化阶段^[24-25].此类细胞在IL-2,CD28或B7基因剔除小鼠外周血中没有或很少说明其在CD4+CD25+T细胞分化或增生中起重要作用^[24,29].转录因子Foxp3特异的表达于自发性Tr细胞,其基因缺陷与自身免疫性疾病相关,通过反转录病毒转染Foxp3基因能促使初始T细胞向Tr细胞分化,因此其被看作参与Tr细胞分化的重要分子^[30].很多研究发现Tr细胞能高表达IL-10和TGF- β ,用相应抗体中和此细胞因子则其体内免疫抑制作用降低说明Tr细胞的功能可以通过这些抑制性细胞因子来实现^[31-32],也有研究提示直

接细胞接触是介导Tr细胞调节功能的重要途径^[23,33].CTLA-4可能在CD4+CD25+T细胞的分化或免疫抑制作用中发挥一定作用,其主要表达在CD4+CD25+T细胞表面,抗CTLA-4抗体能使CD4+CD25+T细胞的体内免疫抑制作用减弱^[29,34-35].肿瘤坏死因子受体超家族成员GITR(TNFRSF18)主要表达于CD4+CD25+T细胞,给与GITR特异性抗体或除去GITR高表达T细胞能诱导正常小鼠发生器官特异性自身免疫病,提示其在介导Tr细胞的免疫抑制作用中扮演重要角色^[36].

3 CD4+T细胞极化

T细胞极化(Polarization)指生理或病理状态下,各种初始CD4+T细胞在某种抗原刺激和一定的抗原提呈环境下,被克隆剔除、无能化或克隆扩增并向表型和功能不同的各类细胞亚群转变的过程.研究这一过程的分子机制是认识T细胞亚群稳态或失调并用以防病治病的基础.目前只有Th1/Th2的极化过程被研究的较清楚.

一般认为人体T细胞来源于胸腺,在胸腺内经过选择后分化为初始T细胞,然后到达次级淋巴组织的T细胞富集区,在抗原刺激下活化、克隆扩增并分化为各种功能成熟的T细胞亚群.普通抗原有效活化T细胞一般至少需要两种信号途径.一种为MHC-抗原/TCR-CD3途径,另一种被称为协同刺激途径(共刺激途径),包括B-7/CD28,B-7/CTLA-4,CD40/CD40L,ICAM/LFA-1,CD58/LFA-2等.要阐述T亚群的极化机制,首先需回答其极化结果主要由不同初始T细胞的内在的分化方向的选择性所决定还是由相似的无分化选择性的初始T细胞在不同的抗原提呈环境中分化而来,前者称为选择学说,后者称为分化学说^[37-38].这两种学说均是针对Th1/Th2极化而提出的,由于在初始T细胞上找不到代表分化选择性的标志和分化学说得到越来越多的证据的支持,选择学说已不受关注.分化学说的直接证据为体外培养中,加不同的细胞因子能控制T细胞的分化方向^[2,39].此观点已广泛接受,根据此学说,T细胞的极化由抗原提呈环境所决定,一般认为环境中的大分子物质作用于细胞首先必须通过其膜表面的受体,所以我们首先要考虑的就是哪些膜表面受体介导了T细胞的极化,依据抗原提呈理论,MHC/TCR,共激分子及其受体,细胞因子和黏附分子及其受体等最可能参与T细胞的极化.

抗原-MHC/TCR-CD3途径:初始T细胞的活化一般需要抗原的刺激,体内试验中观察到抗原至少可以通过其种类、接触途径、剂量和持续时间来影响T细胞的极化.很多抗原和半抗原小剂量口服可诱导以分泌IL-10和TGF- β 为主的特异性Tr细胞,大剂量口服能促使抗原特异性T细胞克隆剔除或无能化,而经皮肤、静脉或灌肠等途径可诱导Th1或Th2型细胞免疫^[4].抗原的种类能决定极化,如:自身抗原趋向诱导T细胞向克隆剔除、无能化或Tr极化,三硝基苯磺酸(TNBS),

髓磷脂碱性蛋白(MBP)等倾向诱导 Th1 型反应, 恶唑酮, 多数寄生虫表面抗原等倾向诱导 Th2 型反应, 其反应类型和强度与抗原接触的次數(持续时间)有关^[40-43]. 这些现象的细胞和分子机制尚不清楚. 一般认为 T 细胞的 TCR 重组后, 不同克隆的 T 细胞 TCR 结构不同, 这种差别使其对各种抗原的亲合性不同, 那么不同抗原所诱发的 T 细胞极化方向是否主要由 TCR/CD3 的结构和抗原特异性差异所决定呢? 尽管一般认为 TCR 的特异性及与自身 MHC 分子复合物的结合力高低在胸腺内 T 细胞的阴性/阳性选择中起重要作用, 但在生理状态下外周淋巴细胞 TCR 的抗原特异性与极化的关系尚没有明确证据的支持, 不过病理情况下 TCR α/β 链的异常足以诱发 T 细胞介导的自身免疫性疾病^[44-45]. 在用体外培养方法分析 T 细胞的极化状态和极化条件时, 经常用抗 CD3 和抗 CD28 抗体刺激 T 细胞活化增生, 似乎认为所用的不同抗 CD3 和抗 CD28 抗体及各种抗原通过 TCR/CD3 途径的作用是完全一致的, 只起激发作用, 并不决定其极化方向. 可能是因为认识到 TCR 与 CD3 以非共价键结合成复合体, TCR 与 MHC 分子复合物结合后向胞内转导第一信号均由 CD3 通过其胞内的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)来完成.

协同信号分子途径: T 细胞膜表面的共激分子受体与抗原呈递细胞(APC)及其他细胞表达的天然配体结合所介导的第二信号途径在 T 细胞的活化和极化中可能是很重要的. T 细胞膜表面的 CD28 和 CTLA-4 在结构上有很大的同源性, 均能结合 B7-1 和 B7-2. CTLA-4 的结合能力更强, 与 CD28 相反, 某些情况下其与 B7 结合能抑制 T 细胞的活化^[46]. CD28 与 B7-2 结合倾向于促进 Th2 极化^[47-48]. 因此, T 细胞表面 CD28/CTLA-4 的表达和密度比例及不同的共激分子环境在其极化中可能发挥一定的作用. 其他的 LFA-1/ICAM, LFA-2/LFA-3, CD40L/CD40, FasL/Fas, 有丝分裂原受体/有丝分裂原等信号途径在 T 细胞的极化中作用尚不肯定.

细胞因子受体/细胞因子途径: T 细胞极化, 尤其是 Th1/Th2 极化中研究最多、最明确的是细胞因子的作用. IL-12, IFN- γ 能促进 T 细胞向 Th1 极化而抑制向 Th2 极化. IL-4 能促进 Th2 极化而抑制 Th1 极化. IL-10, TGF- β 能抑制 Th1/Th2 极化, 而促进 Tr 极化. IL-18, IL-13 可能倾向于分别促进 Th1 和 Th2 极化. 细胞因子的这些作用是被充分证实的, 体外培养的 T 细胞活化过程中加入不同的细胞因子或抗细胞因子抗体能很好的控制其极化方向, 人体或动物体内给予某些细胞因子或细胞因子抗体能明显影响极化结果, 针对细胞因子或其受体的转基因或基因剔除动物模型也观察到相似的结果^[49-51].

胞内信号途径-转录因子: TCR/CD3 和 CD28 途径的信号转导是通过一序列的蛋白酪氨酸激酶(PTK), 磷脂酶, 丝裂原激活的蛋白激酶(MAP 激酶)等级联放大, 最后活化一些相应的转录因子. 转录因子在 Th1/Th2 极化

中的作用被研究的较多. STAT1, STAT3, STAT4, STAT6, c-maf, NFAT, NIP45, fos/Jun, NF- κ B, T-bet, GATA-3 等在某些条件下均可参与 T 细胞的活化, 但目前明确的决定 Th1 极化的转录因子主要有 STAT1, STAT4, T-bet, 决定 Th2 极化的有 c-maf, GATA-3 和 STAT6^[39, 52-61]. IL-12 诱导的 Th1 极化需要 STAT4 的活化^[52]. T-bet 是 2000 年才确定的 Th1 极化的重要转录因子, 其在 Th1 表达而在 Th2 不表达, T-bet 基因缺陷小鼠 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 表达下调^[53-55]. GATA-3 选择性表达在 Th2 而不在 Th1 细胞, 能促进 IL-4, IL-5, IL-13 的表达, 在 Th2 极化中起关键作用, STAT6 可能位于 GATA-3 的上游, 在 IL-4 诱导下活化, 其能促进 GATA-3 活化和表达^[60-61].

Grogan et al^[39]在体外培养条件下用加不同细胞因子或抗体(IL-4, IFN- γ , IL-12 和相应抗体)的方法来研究 Th1/Th2 极化过程, 发现初始 T 细胞在活化的早期可同时低表达 IL-4 和 IFN- γ , 并且不依赖 STAT4, T-bet, GATA-3 和 STAT6, 持续的极化条件刺激下, 活化的 T 细胞开始增生分化为高分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞或高分泌 IL-4 的 Th2 细胞, 同时转录因子 T-bet 或 GATA-3 活化和高表达. 已极化的 Th1 或 Th2 细胞在 3-4 次分裂之前表现出明显的可塑性, 即在相反的极化条件下持续培养可使 T 细胞的极化倒转, 但在多次分裂后则难以使其极化倒转. 因此认为 T 细胞的完全极化需要经过活化(Activation)、定向(Commitment)、基因沉默(Silencing)和后遗传稳定(Epigenetic stabilization)等阶段.

APC^[62-65]: 如果认为机体内细胞因子, 共激分子等环境因素在 T 细胞的极化中起关键性作用, 那么这些环境因素始初又有哪些细胞决定呢? 根据抗原提呈理论, 首先考虑到的应该是抗原提呈细胞. 专职性 APC 包括树突状细胞(DC)和巨噬细胞, 在膜相关的免疫反应中, DC 发挥主要抗原提呈作用, 因此各种表型不同的 DC 是否控制着这些环境因素并决定 T 细胞的极化呢? 近年研究提示可能存在这种调节机制. 在小鼠的次级淋巴器官中至少有三类主要的 DC 亚群: CD8 α ⁺ 淋巴样 DC (CD8 α ⁺ lymphoid DC), CD8 α ⁻ 髓样 DC (CD8 α ⁻ myeloid DC), 郎格罕氏细胞源 DC (LC-derived DC). CD8 α ⁺ 淋巴样 DC 主要位于淋巴器官的 T 细胞区和胸腺的皮质区, 高表达 IL-12 和 IFN- γ . CD8 α ⁻ 髓样 DC 主要位于脾的边缘区, 抗原活化后进入 T 细胞区, 还位于派尔集合淋巴结(Peyer's patches)的上皮下区, 不表达 IL-12 或 IFN- γ . 郎格罕氏细胞源 DC 位于淋巴结的 T 细胞区, 高表达 IL-12. 通过体外抗原刺激活化不同 DC 亚群后将其转入同基因鼠体内的方法证实 CD8 α ⁺ 淋巴样 DC 亚群倾向于诱导 Th1 型细胞免疫, 而 CD8 α ⁻ 髓样 DC 亚群诱导 Th2 型反应. 在人类, 目前比较清楚的有三个亚群: 类浆细胞样 DC (plasmacytoid DC), 髓样 DC (myeloid DC, interstitial DC), 郎格罕氏细胞源 DC. 类浆细胞样 DC 主要表型为 CD11c-CD11b-IL3R+CD1a⁻, 位

于淋巴器官的T细胞区, 体外试验中高表达 $\text{INF-}\alpha$, 不表达 IL-10 和 IL-12, 对 CD4+T 细胞的激发作用较弱. 髓样 DC 主要表型为 CD11c+CD11b+IL3R-CD1a-, 位于淋巴样器官的T细胞区和组织间质, 高表达 IL-10 和 IL-12, 不表达 $\text{INF-}\alpha$, 对 CD4+T 细胞的激发作用较强. 郎格罕氏细胞源 DC 表型为 CD11c+CD11b+IL3R-CD1a+, 位于淋巴结的T细胞区和上皮, 高表达 IL-12, 不表达 IL-10 和 $\text{INF-}\alpha$, 对 CD4+T 细胞的激发作用较强. 在体外培养中, 单核细胞起源的 CD11c+ 髓样 DC 促进 Th1 型反应, 而 CD11- 类浆细胞样 DC 诱导 Th2 型反应, 其极化程度与 DC 的成熟状态和 DC/T 细胞比例有关. DC 诱导 Th1 型细胞免疫是通过其分泌 IL-12 和 $\text{IFN-}\gamma$ 来介导的, 诱导 Th2 型反应的机制尚不清楚, 可能并不是通过分泌 IL-4 介导. G-CSF 注入人体能明显升高外周血中 CD11c- 类浆细胞样 DC 前体细胞的数量, 此类 DC 能诱导 T 细胞分泌较高的 IL-10 而发挥免疫抑制作用^[66-67]. 在外周耐受诱导过程中, DC 可能在一定程度上控制了 Tr/Th 极化方向. Akbari et al^[68] 发现小鼠鼻内给予卵清蛋白(OVA)能诱导抗原特异性 CD4+T 细胞的低反应, 并从肺输出淋巴结中分离纯化出一种 B7-1^{hi}B7-2^{hi}CD40+MHC II CD8- 表型的 DC, 其能高分泌 IL-10, 体外培养中能诱导出高表达 IL-10 的 Tr1 类似细胞, 将其转输给同基因小鼠能明显的诱导抗原特异性免疫耐受.

4 调节性T细胞/致病性T细胞平衡

CD4+T细胞调控机体免疫反应的模式尚未阐明. 有两个基本点是肯定的, 一方面T细胞要避免对自身组织造成自主性病理损伤, 另一方面又要保持对外来微生物或抗原的有效对抗或适应(耐受). 这就要求机体的免疫功能状态处于一定水平和免疫细胞有特异性识别能力. T 细胞的特异性识别机制主要是靠其在胸腺发育中的阳性/阴性选择来实现. 已知正常机体内存在自反应 T 细胞, APC 呈递的自身肽/MHC 分子(self-peptide-self-MHC molecules)对初始 T 细胞及记忆性 T 细胞外周数量的维持发挥重要作用, 说明正常人外周 T 细胞经常通过 TCR 认识自身成分, 但很少引起自身免疫病^[11-13, 69-71]. 某些外周 T 细胞克隆在识别自身或外来抗原上可能并不存在绝对的特异性^[72]. 机体经常从不同途径接触外来抗原, 但对不同抗原表现出不同的应答, 对同一抗原在多次接触中机体的特异性免疫既可以越来越强, 也可以越来越弱(耐受), 以适应机体的不同需要. 比如多数病毒的感染或疫苗的多次接种使机体的特异性免疫增强, 而多数来自食物和肠道微生物的抗原在反复的消化道接触中却能使机体对其特异性免疫越来越弱(免疫耐受). 这些现象只靠已知的特异性识别机制(阳性/阴性选择)和整体的免疫状态高低是难以解释的. 根据近年来对调节性 T 细胞认识的深入, 此处认为 Tr 细胞/致病性 T 细胞(Tp 细胞)平衡是机体调节免疫反应的重要机制

之一. Tp 细胞包括 Th1/Th2 细胞及活化的细胞毒性 T 细胞(CTL)等. 作者将 Tr/Tp 平衡设想为自身抗原特异性 Tr 细胞(Trs 细胞)/自身抗原特异性 Tp 细胞(Tps 细胞)平衡和外来抗原特异性 Tr 细胞(Tre 细胞)/外来抗原特异性 Tp 细胞(Tpe 细胞)平衡两种模式, 这两类平衡相互影响, 共同调节机体的免疫反应. 正常情况下, T 细胞接受小量的 APC 提呈的自身抗原肽并倾向于向 Trs 细胞分化, Trs 细胞在 Tr/Tp 平衡中占优势而避免造成自身组织的病理性损伤, 某些情况下 Tps 细胞长期占优势而引起自身免疫病^[7]. 当机体初次接触某种外来抗原时, 初始 T 细胞接受提呈抗原后优势分化方向既可以倾向 Tre 细胞也可以倾向 Tpe 细胞, 或平衡极化. Tre 细胞占优势有利于 Trs 细胞分化, 此时引起的免疫反应较轻, 持续时间较短, 反复同样的刺激后 Tre 细胞占绝对优势并对此抗原产生免疫耐受. Tpe 细胞占优势则引起较强的免疫反应, 同时清除外来抗原的能力增强, 随着抗原的清除, APC 提呈自身抗原肽暂时性增加使 Trs 细胞大量分化以控制自身免疫损伤, 并使 Tpe 细胞下降到特异性记忆 T 细胞的基准水平, 如果 Trs 细胞不能足够产生则 Tpe 细胞持续维持在高水平以至再接触极微量的抗原也能诱发明显而持久的免疫损伤, 在另一种特殊情况下, 一度的 Tpe 细胞优势使 Tps 细胞分化大量激活或/和 Trs 细胞分化抑制, Trs/Tps 平衡中 Tps 细胞长期占支配地位, 引起某些需要外来抗原激发的自身免疫病.

5 炎症性肠病与 CD4+T 细胞

炎症性肠病包括 Crohn 病和溃疡性结肠炎, 其病因尚不清楚, 可能主要由遗传易感体质决定, 一般认为免疫调节紊乱是关键发病机制, 肠道菌群是这种免疫损伤过程的重要激发因素^[73]. 已知 CD4+T 细胞在免疫反应中起重要调节作用; 炎症性肠病病变局部总有 CD4+T 细胞的浸润并表现出异常的功能状态^[74-75]; Th1/Th2 型细胞免疫在外来抗原诱发的临床表现类似于炎症性肠病的动物模型及 SAMP1/Yit 鼠自发的与 Crohn 病表现相似的回肠炎中扮演重要角色^[40, 42, 76]; IL-10, IL-2, TCR α/β 基因缺陷鼠, 重度联合免疫缺陷鼠(SCID)转输正常鼠 CD4+CD45RB^{hi}T 细胞亚群均能自发慢性肠道炎症说明 T 细胞的功能缺陷足以诱发并维持炎症性肠病^[21, 45, 77-78]. 因此有理由认为 CD4+T 细胞的免疫调节功能紊乱是炎症性肠病发病的重要机制之一, 但介导这种病理损伤的免疫反应是如何被激发及机体为何不能通过正常的调节机制自主而有效的控制这种免疫反应目前还很不清楚. 现根据上述 CD4+T 细胞亚群的新观点谈一谈炎症性肠病的发病机制及治疗策略.

致病性 T 细胞: 炎症性肠病病变局部总存在异常表现的 CD4+T 细胞, 这些 T 细胞中的绝大部分很可能起促进炎症反应作用, 因此可将这部分看作致病性 T 细胞. 研究这些 Tp 细胞的表型特点, 细胞因子表达谱, 致病及其极化的病理生理机制并以阻断此过程来治疗此

病的思路是很自然的. 很多证据提示Th1细胞为Crohn病的主要Tp细胞, 溃疡性结肠炎的主要Tp细胞尚不很肯定, 典型的Th2细胞可能只起有限作用. IL-12和IL-18是Th1极化中重要的细胞因子, IL-4, IL-13促进Th2极化, IFN- γ 和IL-4, IL-5分别是介导Th1和Th2细胞免疫效应的关键分子, 因此分别用相应抗体中和其功能或基因控制手段阻断其表达可望成为Crohn病和溃疡性结肠炎的治疗方法^[3, 79]. 共激分子/共激分子受体在T细胞的活化中起重要作用, 其在炎症性肠病变局部表达异常, 故研究其表达异常的机制及如何控制这一信号途径来治疗炎症性肠病很有必要^[80-84]. 转录因子STAT4, T-bet和GATA-3, STAT6分别在Th1和Th2极化中起关键作用, 这些转录因子及其他参与T细胞活化的NF- κ B, STAT1, STAT3, c-maf, NFAT等均可能成为治疗靶点^[3, 85].

Th1/Th2平衡: 体内体外试验均证实Th1细胞与Th2细胞能相互拮抗, Th1细胞通过分泌IFN- γ 抑制Th2极化, Th2细胞也能通过分泌IL-4限制Th1型反应. 利用这种Th1/Th2相互拮抗的平衡机制, 是否可以用促进Th1/Th2一方极化以控制另一方过度极化的方法来治疗疾病呢? 动物试验中已观察到明显效果, 但能否用于治疗炎症性肠病尚需研究^[2, 86-87].

Tr/Tp平衡: Tr/Tp平衡失调可能是许多免疫性疾病的共同发病机制. 如果认为来自肠道菌群的抗原激发并维持了炎症性肠病的免疫反应且CD4⁺T细胞在这种炎症过程中起重要作用, 那么用Tr/Tp平衡失调来解释为什么此免疫反应会长期持续而不能形成免疫耐受似乎比较合理^[88-89]. 机体从肠道会经常接触多种外来抗原, 在正常情况下通过抗原特异性初始T细胞的克隆剔除或Tr细胞的有效极化产生抗原特异性免疫耐受, 以防止再次接触同种抗原引起过强的免疫反应而造成机体的损伤^[90]. 由于某些原因, 炎症性肠病患者既不能将抗原特异性T细胞剔除又不能产生足够的Tr细胞来限制Tp细胞, 使机体再接触很微量的特异抗原也能触发较强持续时间较长的免疫反应. 根据Tr/Tp平衡理论, 用促进抗原特异性或非特异性Tr极化以诱导免疫耐受来治疗自身免疫病或高敏反应可能更科学. 直接阻断Tp(如Th1/Th2)极化过程或效应分子可能降低机体的整体免疫能力, 不利于清除入侵的病原微生物及突变的自身细胞, 通过Th1/Th2平衡机制来治疗疾病可能需要很大剂量的细胞因子, 而大剂量细胞因子本身可能有不良反应. 利用Tr/Tp平衡来控制免疫性疾病符合机体本身的调节机制, Tr/Tp平衡为一动态过程, 促进外抗原特异性Tr极化能有效预防高敏反应, 却不影响整体的免疫防御能力(如口服耐受), 促进自身抗原特异性Tr极化能治疗自身免疫病, 而且不影响对致病微生物的免疫能力, 但由于目前对Tr细胞的认识不足, 还难以有效促进特异性Tr极化. 非特异性Tr细胞能通过旁观效应抑制免疫反应, 因此用Tr/Tp平衡机制来防治疾病

并非一定要针对抗原特异性Tr极化. 在动物试验中, 诱导抗原特异性口服耐受及局部或全身应用IL-10已显示出一定的防治效果, 但临床试验中单独应用IL-10似乎并不理想, 如何高效利用抗炎细胞因子和非特异性Tr极化来治疗炎症性肠病有待进一步研究^[91-96].

炎症性肠病在我国的发病率呈上升趋势, 但因病因不明还难以找到真正特异而有效的治疗方法^[97]. 在IBD与T淋巴细胞的关系上, 对Th1/Th2细胞研究较多, Th1/Th2平衡观念被广泛接受. 尽管近年来Tr细胞的作用在免疫学领域越来越受重视并被积极研究^[10], 但由于直到2001年才首次报道人体胸腺和外周血中的CD25⁺CD4⁺T细胞在表型、所占比例、体外增生特点、细胞因子表达谱, 尤其是体外培养中抑制CD25⁺CD4⁺T细胞增生和细胞因子表达等方面与鼠类的相应细胞十分相似^[23, 98], 所以到目前为止尚没有有关Tr细胞(CD25⁺CD4⁺T细胞)在IBD患者体内功能状态的研究资料. 作者认为根据已知的有关Tr细胞的认识及Tr/Tp平衡理论来研究IBD的发病机制很有必要, 当前的研究至少应回答: IBD患者外周血及病变局部CD25⁺CD4⁺T细胞与正常人相比是否存在数量和表型的差异; CD25⁺CD4⁺及CD25⁺CD4⁺T细胞对自身肽或肠道菌群抗原刺激的增生反应及细胞因子表达谱在患者与正常人间有无差别; 参与Tr极化和Tr细胞免疫调节效应的物质(Foxp3, B7-2/CTLA-4, ICOS/ICOSL, GITR, TGF- β 、IL-10、IL-2及其受体等)是否存在结构或功能缺陷; APC及Th1/Th2细胞对Tr细胞抑制作用的敏感性是否下降. 相信随着对这些问题的回答, CD4⁺T细胞在IBD发病中的作用机制会更加明确, 治疗更加有的放矢.

6 参考文献

- 1 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357
- 2 Rocken M, Racke M, Shevach EM. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today* 1996;17:225-231
- 3 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8:567-573
- 4 Garcia G, Weiner HL. Manipulation of Th responses by oral tolerance. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;238:123-145
- 5 Gershon RK. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975;26:170-185
- 6 吴厚生, 秦慧莲. 特异免疫应答细胞: T淋巴细胞与特异性细胞免疫. 陈慰峰. 医学免疫学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 89-97
- 7 Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-822
- 8 Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2001;13:644-649
- 9 Annacker O, Pimenta-Araujo R, Buren-Defranoux O, Bandeira A. On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001;182:5-17
- 10 Francois BJ. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2003;3:189-198
- 11 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164

- 12 Hemmer B, Vergelli M, Pinilla C, Houghten R, Martin R. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today* 1998;19:163-168
- 13 Hausmann S, Wucherpfennig KW. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Curr Opin Immunol* 1997;9:831-838
- 14 Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400
- 15 Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:207-214
- 16 Marth T, Ring S, Schulte D, Klensch N, Strober W, Kelsall BL, Stallmach A, Zeitz M. Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR-transgenic mice. *Eur J Immunol* 2000;30:3478-3486
- 17 Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:263-276
- 18 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742
- 19 Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:423-449
- 20 Sakaguchi S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* 2000;12:684-690
- 21 Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993;5:1461-1471
- 22 Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001;167:4245-4253
- 23 Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+) CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001;31:1247-1254
- 24 Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 1998;10:371-378
- 25 Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317-5326
- 26 Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+) cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001;193:1295-1302
- 27 Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001;98:2736-2744
- 28 Wing K, Ekmarm A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002;106:190-199
- 29 Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-440
- 30 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061
- 31 Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-822
- 32 Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:111-119
- 33 Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255-260
- 34 Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-310
- 35 Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302
- 36 Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-142
- 37 Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;172:921-929
- 38 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173
- 39 Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001;14:205-215
- 40 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-1290
- 41 Racke MK, Bonomo A, Scott DE, Cannella B, Levine A, Raine CS, Shevach EM, Rocken M. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med* 1994;180:1961-1966
- 42 Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-1939
- 43 Kjaer TM, Frokiaer H. Induction of oral tolerance with microdoses of ovomucoid depends on the length of the feeding period. *Scand J Immunol* 2002;55:359-365
- 44 Kumar V, Sercarz E. An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes. *Immunol Rev* 2001;182:113-121
- 45 Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:274-282
- 46 Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-126
- 47 De Becker G, Moulin V, Tieleman F, De Mattia F, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1998;28:3161-3171
- 48 Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995;2:523-532
- 49 Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000;14:1693-1711
- 50 Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263-266
- 51 Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999;17:255-281
- 52 Szabo SJ, Jacobson NG, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 1995;2:665-675
- 53 Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-669
- 54 Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002;295:338-342
- 55 Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mudter J, Galle PR, Bhan A, Autschbach F, Sullivan BM, Szabo SJ, Glimcher LH, Blumberg RS. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002;195:1129-1143
- 56 Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J* 1999;18:420-432
- 57 Kurata H, Lee HJ, O'Garra A, Arai N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 1999;11:677-688

- 58 Rengarajan J, Tang B, Glimcher LH. NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsive-ness of naive T(H) cells. *Nat Immunol* 2002;3:48-54
- 59 Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 1996;85:973-983
- 60 Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-596
- 61 Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000;12:27-37
- 62 Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 2001;22:41-47
- 63 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 64 Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-923
- 65 Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000;1:199-205
- 66 Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000;165:566-572
- 67 Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000;95:2484-2490
- 68 Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001;2:725-731
- 69 Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:547-556
- 70 Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4 (+)CD25(+) regulatory T cells. *J Immunol* 2002;168:1644-1648
- 71 Yan J, Mamula MJ. Autoreactive T cells revealed in the normal repertoire: escape from negative selection and peripheral tolerance. *J Immunol* 2002;168:3188-3194
- 72 Leng Q, Bentwich Z. Beyond self and nonself: fuzzy recognition of the immune system. *Scand J Immunol* 2002;56:224-232
- 73 Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003;9:1646-1656
- 74 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-1270
- 75 Mariani P, Bachetoni A, D'Alessandro M, Lomanto D, Mazzocchi P, Speranza V. Effector Th-1 cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:2029-2035
- 76 Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Kozaiwa K, Cominelli F. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest* 2001;107:695-702
- 77 Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ, Rennick DM. T helper cell 1-type CD4⁺ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:241-251
- 78 Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Terhorst C. Evidence that CD4⁺, but not CD8⁺ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol* 1995;25:2618-2625
- 79 Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-389
- 80 Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol* 1999;163:4049-4057
- 81 Rogler G, Hausmann M, Spottl T, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Scholmerich J, Gross V. T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1105-1111
- 82 Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MadCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1999;45:856-863
- 83 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, Overbergh L, Mathieu C, Heremans H, de Boer M, Boon L, D'Haens G, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4⁺ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions. *J Immunol* 2000;164:6005-6014
- 84 Stuber E, Buschenfeld A, Luttges J, Von Freier A, Arendt T, Folsch UR. The expression of OX40 in immunologically mediated diseases of the gastrointestinal tract (celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis). *Eur J Clin Invest* 2000;30:594-599
- 85 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996;2:998-1004
- 86 Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun* 2002;70:5931-5937
- 87 Hogaboam CM, Vallance BA, Kumar A, Addison CL, Graham FL, Gauldie J, Collins SM. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997;100:2766-2776
- 88 Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001;182:190-200
- 89 Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* 1999;20:442-445
- 90 Strobel S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation. *Proc Nutr Soc* 2001;60:437-442
- 91 Guarner F, Casellas F, Borruel N, Antolin M, Videla S, Vilaseca J, Malagelada JR. Role of microecology in chronic inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(Suppl 4):S34-38
- 92 Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Brennan FM, Hodgson HJ. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis. *Gut* 2003;52:363-369
- 93 Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26:934-938
- 94 Gotsman I, Shlomai A, Alper R, Rabbani E, Engelhardt D, Ilan Y. Amelioration of immune-mediated experimental colitis: tolerance induction in the presence of preexisting immunity and surrogate antigen bystander effect. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:926-932
- 95 Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJ, Schreiber S, Gregor M, Ludwiczek O, Rutgeerts P, Gasche C, Koningsberger JC, Abreu L, Kuhn I, Cohard M, LeBeaut A, Grint P, Weiss G. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002;50:191-195
- 96 Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:1434-1444
- 97 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 98 Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001;31:1122-1131

胃黏膜异型增生组织中微卫星不稳定性的检测及其意义的探讨

刘平, 张小勇, 邵耘, 赵志泉

刘平, 张小勇, 邵耘, 赵志泉 南京医科大学第一附属医院消化科
江苏省南京市 210029

刘平, 男, 1955-10-28 生, 江苏省如皋市人, 汉族. 1982 年南京医科大学学士, 1985 年南京医科大学硕士, 副教授、主任医师. 主要从事消化系统恶性肿瘤防治的临床研究.

江苏省科委社会发展基金资助项目, No. BS98028

项目负责人: 刘平, 210029, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第一附属医院消化科. liupinga@yahoo.com

电话: 025-3718836-6415 传真: 025-372440

收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-10-01

Microsatellite instability in dysplasia mucosa and gastric cancer

Ping Liu, Xiao-Yong Zhang, Yun Shao, Zhi-Quan Zhao

Ping Liu, Xiao-Yong Zhang, Yun Shao, Zhi-Quan Zhao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Science and Technology Committee Foundation of Jiangsu Province, No. BS98028

Correspondence to: Dr. Ping Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. liupinga@yahoo.com

Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-10-01

Abstract

AIM: Gastric mucosa dysplasia has been regarded as a precancerous lesion of the stomach. Abnormal gene alterations in the mucosa dysplasia of the stomach, which may lead to cell transformation, are probably of great importance in the development of gastric cancer (GC). Microsatellite instability (MSI) is a good marker of genome instability. Investigation of MSI in the cancer and precancerous lesion of the stomach will help us to search into the carcinogenesis of stomach and the potential role of MSI in the development of gastric cancer.

METHODS: Silver staining single strand conformation polymorphis-polymerease chain reaction (PCR-SSCP) was used to screen MSI markers at 5 loci in formalin-fixed, paraffin-embeded tissues of GC ($n=30$), dysplasia ($n=30$) and corresponding normal gastric tissues.

RESULTS: The abnormal shifting of the single-strand DNA was identified in 7 (23.3%) out of GC, in 9 (30%) out of dysplasia samples respectively. Three (10%) tumors and two (6.7%) dysplasia displayed a high-level of MSI (two or more loci altered). Low-level MSI (one loci altered) was detected in 13.3% of the tumors and in 23.3% dysplasia samples. GC with MSI was associated with distal location of the tumors ($P=0.044$). No association was detected between MSI and the grade of dysplasia.

CONCLUSION: The accumulation of MSI in the dysplasia

of gastric mucosa may be an early molecular event in the development of gastric cancer. It contributes probably to the multistep gastric carcinogenesis.

Liu P, Zhang XY, Shao Y, Zhao ZQ. Microsatellite instability in dysplasia mucosa and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3): 512-515

摘要

目的: 胃黏膜异型增生是胃癌的癌前病变, 胃癌的发生可能是胃黏膜异型增生过程中的一系列基因变异累积引起胃黏膜细胞发生恶性转化所致. 微卫星不稳定性(MSI)是DNA基因组不稳定的重要标志, 研究胃癌和癌前病变组织MSI的存在情况, 有助于从基因组不稳定的角度探讨胃癌可能的发生机制以及MSI在胃癌发生过程中的可能作用.

方法: 胃癌 30 例、异型增生组织 30 例分别提取病变组织及相应正常组织的 DNA, 应用银染 PCR-SSCP 技术检测 5 个微卫星位点不稳定性存在状况.

结果: 胃癌组织 MSI 的发生率 23.3%, 胃窦癌 MSI 的发生率显著高于贲门癌(10% vs 3.3%, $P=0.044$). 胃黏膜异型增生组织的 MSI 发生率 30%, MSI 与异型增生的程度无明显关系.

结论: MSI 是胃癌多步骤发生过程中的早期分子事件, 对胃癌的发生和发展可能具有重要作用.

刘平, 张小勇, 邵耘, 赵志泉. 胃黏膜异型增生组织中微卫星不稳定性的检测及其意义的探讨. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):512-515

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/512.asp>

0 引言

胃癌的发生发展是一个多因素参与, 多基因变异累积, 逐渐演变的多阶段过程^[1-16], 胃黏膜异型增生被认为是胃癌的癌前病变, 与胃癌的发生关系密切^[17-23]. 微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)在多种肿瘤组织中均可检测到, 以胃癌发生率较高, 对于慢性胃炎基础上异型增生黏膜 MSI 的情况, 国内外报道均很少. 我们采用 PCR-SSCP 技术, 检测胃黏膜异型增生和胃癌两种组织中 MSI 的发生情况和特点, 探讨了 MSI 在胃癌发生发展中的可能作用.

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2001-01/2001-10 因胃癌行手术切除者 30 例, 均无胃癌家族史. 胃黏膜异形增生 30 例来自我院内镜室胃镜活检标本. 胃癌按 1987 年全国肿瘤会议 PTNM 分期标准分期, 异型增生按 WHO 标准分轻、中、重度. 挑选分别包括病变及正常组织标本的蜡块, 连续以 5 μ m 厚度切片, 用于 DNA 提取. 所有标本的病变均经病理医师确认. PCR 引物、脱氧核苷酸(dNTPs)购自上海生工公司; Taq 酶购自大连宝生物公司.

1.2 方法 石蜡切片经二甲苯脱蜡; 无水乙醇洗脱后烘干. 加入 TE(Tris-EDTA, pH=8.0) 95 μ L 及蛋白酶 K(终浓度 500 mg/L) 5 μ L, 37 $^{\circ}$ C 过夜, 离心后 97 $^{\circ}$ C 7 min 灭活蛋白酶 K, 取上清 -20 $^{\circ}$ C 贮存. 引物序列参照相关文献的报道选用(Cancer Res 1997;57:4749 & 1998;58:5248, 表 1). PCR 反应总体积 25 μ L, 含 50-200 ng DNA. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55-58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min. 取 PCR 产物 12 μ L 加变性缓冲液(980 mL/L 去离子甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.1 g/L 溴酚蓝, 0.1 g/L 二甲苯青)12 μ L, 97 $^{\circ}$ C 变性 7 min, 迅速置于乙醇碎冰中, 双链对照标本用 PCR 产物 6 μ L 加上样缓冲液(2.5 g/L 溴酚蓝、400 g/L 蔗糖)2 μ L. 采用 70 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶(19:1)电泳, 1 \times TBE 缓冲液, 室温下 180V 恒压电泳 3 h, 银染制成干胶. MSI 判断标准: 肿瘤组织与正常组织相比, 出现异常条带或条带迁移. 阳性标本重复 1 次试验以确认无误.

统计学处理 各组之间年龄的比较采用单因素方差分析及 t 检验; 各组 MSI 发生率的比较采用 Fisher 精密检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性.

表 1 引物序列

微卫星位点	引物序列	扩增片段大小
BAT-25	5' -TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'	-90 bp
	5' -TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	
BAT-26	5' -TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'	80-100 bp
	5' -AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'	
D5S346	5' -ACTCACTCTAGTGATAAATCG-3'	96-122 bp
	5' -AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'	
D17S250	5' -GGAAGAATCAAATAGACAA-3'	-150 bp
	5' -GCTGGCCATATATATTTAAACC-3'	
D2S123	5' -AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3'	197-227 bp
	5' -GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'	

2 结果

在 30 例胃癌中有 7 例表现 1 个或 1 个以上位点的不稳定性(图 1), MSI 发生率为 23.3%, 其中 3 例表现 2 个位点(大于或等于 30-40% 位点数)的不稳定性, 记作 MSI-H; 4 例仅在一个位点表现不稳定性, 记作 MSI-L; 其余 23 例为 MSS.

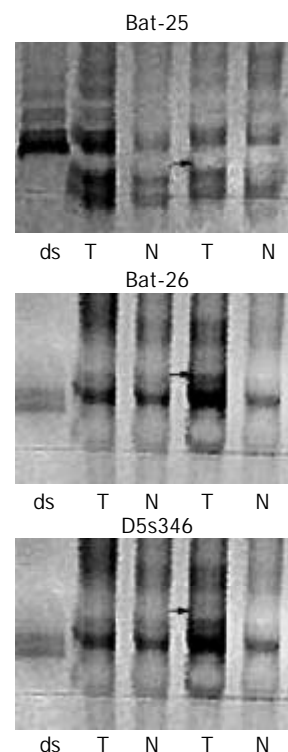


图 1 胃癌组织 MSI 检出情况. Ds: 双链 DNA; T: 胃癌组织; N: 正常组织; T 与 N 相比, 多出一异常条带, 表明 MSI 的存在(箭头所指处).

2.1 MSI 与临床病理的关系 MSI 胃癌与 MSS 胃癌在性别、年龄、细胞分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期方面无统计学差异, 但胃窦癌较贲门癌更易表现 MSI ($P = 0.044$, 表 2).

表 2 胃癌组织 MSI 与临床病理的关系

特点	MSS ($n = 23$)	MSI-L ($n = 4$)	MSI-H ($n = 3$)
平均年龄(mean \pm SD)	57 \pm 11	58 \pm 5	69 \pm 5
男:女	17:6	4:0	2:1
高中分化	5	1	2
低分化	18	3	1
贲门	12	1	0
胃体	9	2	1
胃窦 ^a	2	1	2
淋巴结	- 10	2	3
	+ 13	2	0
TNM 分期	I, II 期 11	2	2
	III, IV 期 12	2	1

^a $P < 0.05$ (Fisher 精密检验), vs 贲门癌.

2.2 异型增生组织 MSI 在 30 例慢性胃炎伴异型增生患者中 9 例存在 MSI(图 2), 阳性率为 30%, 其中 7 例为 MSI-L, 2 例为 MSI-H. 中度以上异型增生组织中 MSI 阳性率 33.3%(6/18), 高于轻度异型增生的 25%(3/12), 但二者之间的差异无统计学意义. MSI 与 MSS 的异型增生在性别、年龄方面亦无显著性差异.

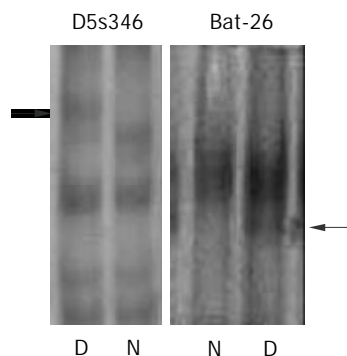


图2 异型增生组织的 MSI 及检出情况.D: 异型增生组织; N: 正常组织; D 与 N 相比, 条带迁移率明显改变或出现一异常条带, 表明 MSI 的存在(箭头所指处).

3 讨论

微卫星(microsatellite, MS)序列的多态性由等位基因间重复单位数目变化所引起. MSI 是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变, 表现为病变组织与其相应的正常组织相比, DNA 结构性等位基因的大小发生改变. 其发生原因可能与DNA错配修复基因的缺陷有关. 在人类散发性肿瘤中, 胃癌 MSI 的发生率最高, 通常报道在 13-44%, 个别达到 76.7%^[24-25]. 由于不同研究所选择的 MS 位点种类及数量不同, 所报道结果的可比性不强. 随着检测位点数量的增加, MSI 阳性的机会也就增加. 我们选用1997年美国癌症研究院推荐的用于胃癌 MSI 检测的 5 个位点, 即 2 个单核苷酸, 3 个二核苷酸重复序列, 胃癌 MSI 的发生率为 23.3%. Leung et al^[24] 用以上 5 个位点加 BAT-40, D13S170, TP53 等 3 个位点分析 30 例胃癌组织的 MSI, 阳性率达 76.7%. 胃癌 MSI 阳性率的高低不一可能与所选位点的种类和数目、样本数量、MSI 阳性的判断标准、遗传背景以及地理区域等不同有关.

MSI 胃癌与临床病理的关系目前尚未明确, 一些研究资料显示^[26-30], MSI-H 与 MSI-L 和 MSS 胃癌相比具有不同的临床病理特征, MSI-H 胃癌一般多发生在胃窦部, 少有淋巴结转移, 恶性程度较低, 预后较好. 本组结果表明, MSI 与性别、年龄、肿瘤浸润深度、细胞分化程度、淋巴结转移、Lauren 分型以及预后无明显相关. 由于本组资料病例数较少, 所得到的结果尚需更多样本的研究加以证实. 胃黏膜异型增生被认为是胃癌的癌前病变. 部分胃癌的发生可能是胃黏膜异型增生过程中一系列基因变异的累积所致. 因此, 研究胃癌和癌前病变组织 MSI 的存在情况, 可以从基因组不稳定的角度探讨胃癌可能的发生机制. 本组异型增生组织中 MSI 发生率为 30%, 且与异型增生的程度无关, 这与 Lee et al^[31] 报道的结果相似. 本研究结果显示, MSI 在胃癌和癌前病变组织中均有相当比例的存在, 提示在癌前病变阶段已出现基因的不稳定现象, 这是胃癌发生前的分子异常事件, 可能会成为胃癌多步骤发生过程中的起点. Kashiwagi et al^[32] 对 6 例 MSI 的高分化型癌或胃腺瘤标

本作回顾性研究, 取其 1-7 a 前的标本, 结果发现该 6 例标本在慢性胃炎阶段就已经表现为 MSI, 提示 MSI 的出现在胃癌发生过程中发挥了重要作用, 是胃癌发生因素中的重要环节, 胃黏膜组织 MSI 的分析可能将有助于胃癌发生危险性的预测.

4 参考文献

- 1 房殿春. 基因不稳在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2003; 11:1-5
- 2 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):111-115
- 3 Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002;17:323-329
- 4 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 5 Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21 (WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94: 2107-2112
- 6 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 7 Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
- 8 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 9 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:59159-59155
- 10 Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and c-myc protein in gastric carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:258-261
- 11 Wang GT. Progress in studies of mechanism of gastric pre-cancerous lesions, carcinogenesis and their reversion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1-4
- 12 Du JJ, Dou KF, Cao YX, Wang ZH, Wang WZ, Gao ZQ. CALL, a down-regulated gene in gastric cancer: a functional study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:525-529
- 13 Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition, early and advanced stages of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- 14 Wang DX, Fang DC, Liu WW. Study on alteration of multiple genes in intestinal metaplasia, atypical hyperplasia and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:855-859
- 15 Wang B, Shi LC, Zhang WB, Xiao CM, Wu JF, Dong YM. Expression and significance of P16 gene in gastric cancer and its precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:39-42
- 16 Li YL, He XM, Zheng HC, Wu DY, Yang XF, Xin Y, Fu BY. Expression of PTEN encoding product in malignant lesions of gastric mucosa and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1294-1296
- 17 Pan CJ, Liu KY. Proliferation/apoptosis and expression of P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:526-530
- 18 Hao DM, Sun XJ, Zheng ZH, He G, Ma MC, Xu HM, Wang MX, Sun KL. Screening and expression of associated genes in gastric dysplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:6-9

- 19 Chen SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- 20 Lu SY, Pan XZ, Peng XW, Shi ZL, Lin L, Chen MH. Effect of *Hp* infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:386-388
- 21 Wang DX, Fang DC, Li W, Du QX, Liu WW. A study on relationship between infection of *Hp* and inactivation of antioncogenes in cancer and pre-cancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:984-987
- 22 Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000;88:2520-2528
- 23 Wu YQ, Wang MW, Wu BY, You WD, Zhu QF. Expression of apoptosis-associated proteins and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in precancerous lesions of stomach. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1219-1222
- 24 Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156:537-543
- 25 Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 2001;20:329-335
- 26 Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, Sheu JC, Lin JT. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:403-411
- 27 Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;95:350-353
- 28 Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, Chen JY. A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:92-101
- 29 Ogata S, Tamura G, Endoh Y, Sakata K, Ohmura K, Motoyama T. Microsatellite alterations and target gene mutations in the early stages of multiple gastric cancer. *J Pathol* 2001;194:334-340
- 30 Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab Invest* 2001;81:593-598
- 31 Lee JH, Abraham SC, Kim HS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:611-618
- 32 Kashiwagi K, Watanabe M, Ezaki T, Kanai T, Ishii H, Mukai M, Hibi T. Clinical usefulness of microsatellite instability for the prediction of gastric adenoma or adenocarcinoma in patients with chronic gastritis. *Br J Cancer* 2000;82:1814-1818

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编委会组成

《World Journal of Gastroenterology, WJG》编辑委员会由来自 53 个国家的 179 位消化病学专家组成, 具有广泛的代表性, 特别是聘请了一批工作在临床和科研一线, 具有良好科学记录的中青年专家为评委. 分别来自以下国家: ALBANIA(1), ALGERIA(1), ARGENTINA(2), AUSTRIA(1), BELARUS(1), BELGIUM(1), BRAZIL(1), CANADA(1), CHINA(38), COSTA RICA(1), DENMARK(1), EGYPT(1), FINLAND(1), GERMANY(7), GREECE(1), HUNGARY(2), ICELAND(1), INDIA(2), IRAN(1), IRELAND(1), ISRAEL(1), ITALY(2), JAPAN(3), KENYA(1), LATVIA(1), LITHUANIA(1), MACEDONIA(1), MALAYSIA(2), MONACO(1), NEW ZEALAND(1), PHILIPPINES(1), POLAND(2), ROMANIA(1), RUSSIA(3), SINGAPORE(1), SLOVENIA(3), SOUTH AFRICA(1), SOUTH KOREA(2), SPAIN(1), SRI LANKA(1), SWEDEN(2), SWITZERLAND(2), THAILAND(1), THE NETHERLANDS(1), TURKEY(1), UNITED KINGDOM(7), UNITED STATES(55), YUGOSLAVIA(1). WJG 编委的任务是针对论文的科学性、创新性和先进性及可读性进行评价和修改, 并针对我国现阶段科学研究整体水平和科研人员英文报告撰写能力的实际情况对稿件提出具体的建设性意见; 对投送 WJG 稿件的题名、摘要、引言、材料和方法、结果和讨论等进行综合评价, 根据是否能较好地反映我国或国际消化病学临床和基础的先进水平决定所投论文是否被接受. 目前, 投送 WJG 稿件的质量差别较大, 有些论文的科学性、可读性方面的问题较多. 为此, WJG 制定了稿件评审要点, 对控制 WJG 的学术质量起到了核心作用.

胃癌 Fhit 蛋白表达缺失的临床病理意义

赵 坡, 刘 武, 吕亚莉

赵坡, 刘武, 吕亚莉, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
赵坡, 男, 1957-06-24 生, 四川省成都市人, 汉族. 1984 年第三军医大学学士, 1990 年第三军医大学硕士, 1993 年华西医科大学博士, 1995 年军事医学科学院博士后, 1997 年英国帝国癌症研究基金会 St Mark's 研究所研究员, 1998 年英国 Aberdeen 大学生物医学系研究员. 现任教授、主任医师, 主要从事肿瘤的病理诊断和研究, 发表论文 60 篇.

项目负责人: 赵坡, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院病理科. zhaopo@plagh.com.cn

电话: 010-66937954 传真: 010-68181689

收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

Loss of fragile histidine triad protein expression and its clinicopathological significance in gastric cancer

Po Zhao, Wu Liu, Ya-Li Lu

Po Zhao, Wu Liu, Yali Lu, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Po Zhao, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. zhaopo@plagh.com.cn

Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To investigate the expression of fragile histidine triad protein, Fhit and the possible relationship between its expression and clinicopathological indices in gastric carcinoma.

METHODS: Fhit protein expression was detected in 76 cases of gastric carcinoma, 58 dysplasia and 10 normal mucosae by immunohistochemical method to analyse its relationship to histological grade, clinical stage, metastatic status and prognosis.

RESULTS: The loss of Fhit protein expression was detected in 48/76 (63.2%) cases of cancer tissue, 36/58 (62.1%) cases of adjacent dysplastic tissue and 0/10 cases of normal gastric mucosa. There was a significant difference in the expression of Fhit protein between cancer or adjacent dysplastic tissue and normal gastric mucosa ($P = 0.000$). It was also showed that loss of Fhit protein expression was found first in 35.7% (10/28) of grade I-II, and in 79.2% (38/48) of grade III ($P = 0.000$); second in 43.8% (14/32) of stage I-II, whereas in 77.3% (34/44) of stage III-IV ($P = 0.004$); and last in 36.4% (8/22) of tumors without metastasis but in 74.1% (40/54) of those with metastasis ($P = 0.003$). The significant difference in the loss of expression of Fhit was found between cancers on different histological grade, clinical stage and metastatic status, respectively. Follow-up data showed that there was a significant difference in median survival time between carcinomas with loss of Fhit (33 months) and those without (71 months) (Log rank = 20.78; $P = 0.000$).

CONCLUSION: Fhit protein is an important tumor suppressor protein. Loss of Fhit protein expression may be associated

with carcinogenesis, invasion, metastasis and prognosis in the gastric carcinoma.

Zhao P, Liu W, Lu YL. Loss of fragile histidine triad protein expression and its clinicopathological significance in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):516-519

摘要

目的: 探讨 76 例胃癌 Fhit 蛋白表达与临床病理的关系.

方法: 采用免疫组化方法, 检测 76 例胃癌、58 例紧邻癌旁的异常增生和 10 例正常胃黏膜的 Fhit 表达并分析其与组织学分级、临床分期以及预后的关系.

结果: 癌组织 Fhit 表达缺失为 48/76 例(63.2%), 紧邻癌旁的异常增生黏膜缺失为 36/58 例(62.1%), 而正常胃黏膜为 0/10, 相差有非常显著性($P = 0.000$) Fhit 蛋白缺失癌在癌组织学分级中的分布为 I - II 级癌 35.7% (10/28), III 级癌 79.2% (38/48), 相差有非常显著性($P = 0.000$). Fhit 蛋白缺失癌在临床分期中的分布为 I ~ II 期癌为 43.8% (14/32), III - IV 期癌 77.3% (34/44), 相差有非常显著性($P = 0.004$). Fhit 蛋白缺失癌在转移状况组的分布为转移癌 74.1% (40/54), 未转移癌为 36.4% (8/22), 相差有非常显著性($P = 0.003$). 随访资料显示 Fhit 蛋白缺失癌的中位生存时间为 33 mo, 而 Fhit 蛋白表达癌者为 71 mo, 相差有非常显著性(Log rank=20.78; $P = 0.000$).

结论: Fhit 蛋白为一种重要的抑癌蛋白, 其表达缺失状况可能与胃癌的发生、侵犯、转移以及患者的预后相关.

赵坡, 刘武, 吕亚莉. 胃癌 Fhit 蛋白表达缺失的临床病理意义. 世界华人消化杂志 2004;12(3):516-519

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/516.asp>

0 引言

脆性三联组氨酸基因(fragile histidine triad, FHIT)是最近继 p53、p16 基因之后在国外成功分离并定位于染色体 3p14.2^[1-2]的重要抑癌基因. FHIT 基因不仅横跨家族性肾细胞癌的易位断点 t (3:8)(p14.2;q24), 同时也见于大多数人类的共同脆性位点 FRA3B. FHIT 基因结构及表达的异常见于多种常见类型的癌组织^[3-32], 胃癌中 FHIT 基因或表达的异常国外已有少量研究^[13-14, 25, 30]. 胃癌为我国常见肿瘤, 其基因研究也不少^[33-52], 但目前尚罕见中国胃癌中 FHIT 基因蛋白(Fhit)原位表达的研究, 亦未见有随访资料的分析报道. 我们报告 76 例胃

癌 Fhit 表达状况及其与临床病理指标的可能关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 1996-2000 年存档并有随访资料的胃癌手术标本 76 例, 组织学 I 级 22 例, II 级 6 例, III 级 48 例; 临床 I 期 20 例, II 期 12 例, III 期 38 例, IV 期 6 例; 手术时已出现淋巴结转移 54 例, 无淋巴结转移 22 例。紧邻癌旁的异常增生黏膜 58 例作为自身对照, 正常胃黏膜 10 例为正常对照。

1.2 方法 切片脱蜡至水, 在 30 ml/L 过氧化氢 - 甲醇中浸泡 10 min 灭活内源性过氧化氢酶, 采用枸橼酸 - 微波 - SP 法在 10 mmol/L 枸橼酸(pH 6.0)中煮沸 5 min, 保温 10 min, 100 ml/L 羊血清封闭。兔抗人 FHIT (Zymed, 购自北京中山公司)抗体稀释度为 1:200, 4℃过夜; 免疫组化染色均按 SP 药盒(Zymed)说明书进行。参考文献[11, 22, 24]方法观察 Fhit 蛋白的分布、阳性强度和阳性率。先按染色强度打分: 0 分为无色, 1 分为浅黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色; 再按阳性细胞所占百分比打分: 0 分为阳性细胞小于 5%, 1 分为大于 5-25%, 2 分为大于 25-50%, 3 分为大于 50-75%, 4 分为大于 75%, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积 9-12 分为强阳性(++), 5-8 分为弱阳性(+), 0-4 分为阴性(-)来确定 Fhit 蛋白表达状况。

统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件, 以 Fisher's 确切概率法(双侧)检验判断 Fhit 表达与各病理指标的相互关系; 以 Kaplan-Meier 法 Log rank 检验作单因素生存分析, $P < 0.05$ 为相差有显著性意义。

2 结果

2.1 胃癌组织 Fhit 表达 Fhit 蛋白主要表达于癌旁正常或紧邻癌旁的异常增生黏膜和癌组织上皮细胞的胞质以及一些间质细胞如淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞的胞核及胞质(图 1A)。Fhit 蛋白表达缺失的分布为癌组织 48/76 例(63.2%, 图 1B), 癌旁黏膜 36/58 例(62.1%), 正常胃黏膜 0/10。癌组织或癌旁异常增生与正常胃黏膜比较, 相差有非常显著性($P = 0.000$)。癌组织与癌旁异常增生比较, 相差无显著性($P = 1.000$)。

2.2 Fhit 蛋白表达与癌生物学行为的关系 本组 76 例胃癌标本中, Fhit 缺失癌在癌组织学分级中的分布为 I - II 级癌 35.7% (10/28), III 级癌 79.2% (38/48), 组间比较, 相差有非常显著性($P = 0.000$)。Fhit 缺失癌在临床分期中的分布为 I - II 期癌 43.8% (14/32), III - IV 期癌 77.3% (34/44), 组间比较, 相差有非常显著性($P = 0.004$)。Fhit 缺失癌在转移癌中的分布为 74.1% (40/54), 在未转移癌中的分布为 36.4% (8/22), 组间比较, 相差有非常显著性($P = 0.003$)。本组随访资料(图 2)显示 Fhit 缺失癌的中位生存时间(Median survival)为 33 mo, 而 Fhit 表达癌者则为 71 mo, 二者比较相差非常显著(Log rank=20.78; $P = 0.000$)。

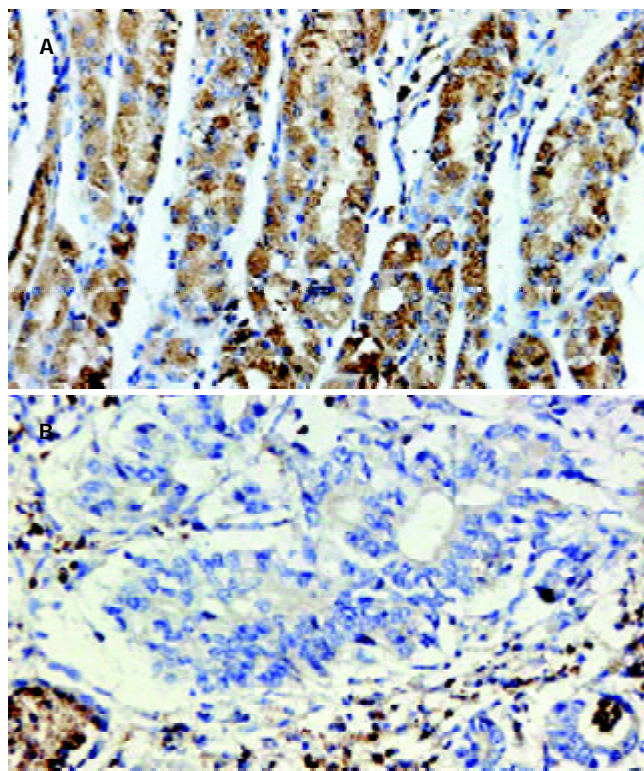


图 1 胃癌 Fhit 蛋白表达结果(SP × 200)。A: 胃正常黏膜组织的腺上皮细胞阳性; B: 胃癌细胞阴性。

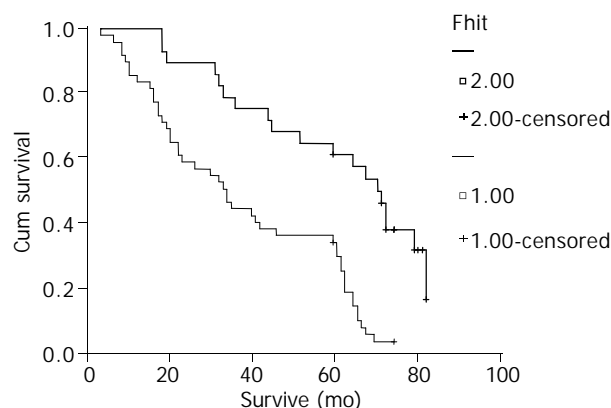


图 2 Fhit 蛋白表达状况的生存曲线。

3 讨论

在正常情况下, Fhit 存在于大多数正常组织中。国外发现多种肿瘤组织中 Fhit 表达存在频繁地降低或丢失, 并发现与 FHIT 基因转录及缺失有关, 故提示 FHIT 基因为多种肿瘤的候选抑制基因^[1-2]。Fhit 蛋白抑制肿瘤的机制可能与以下方面有关: (1)具有 Ap3A 水解酶的作用。Ap3A 为 ATP 类似物, 能以底物方式提供磷酸基团从而提高蛋白激酶的活性。因此 Fhit 表达下降时 Ap3A 水平升高可增强生长信号传导途径, 阻断抑制途径或凋亡通道导致肿瘤的发生和发展; (2) mRNA 脱帽功能。Fhit 蛋白具有去除 mRNA 帽类似物的作用, 影响重要基因 mRNA 的翻译; (3) Fhit - Ap3A 底物复合物作用。Fhit 蛋白还可与其底物 Ap3A 结合通过 Fhit - 底物复合物产生抑癌作用, 其抑癌作用可能比其水解酶作用更重要。国外^[13-14, 25, 30]发现 Fhit 蛋白表达降低或丢失在胃癌发生和

演化中具有重要作用. 本研究与国外作者的结果比较, 胃癌组织 Fhit 蛋白表达缺失率为 63.2% (48/76), 证实了国外(62.9%)的发现. 本组结果中紧邻癌旁的异常增生黏膜 Fhit 蛋白表达缺失率为 62.1%, 提示 Fhit 蛋白表达缺失与胃黏膜上皮细胞的癌变有关; 本结果中 Fhit 蛋白缺失癌在各临床分期组中的分布有非常显著性差异 ($P=0.004$) 并多见于伴有转移的胃癌 ($P=0.003$); 随访资料中 Fhit 蛋白缺失癌的中位生存时间明显低于 Fhit 蛋白表达癌 (Log rank=20.78; $P=0.000$), 提示 Fhit 蛋白表达减少与癌组织侵袭、转移以及预后相关, 亦与国外的结果一致^[13-14, 25, 30]. 本结果提示 Fhit 蛋白为一种与胃癌发生和侵犯转移相关的重要抑癌蛋白. Fhit 蛋白用免疫组化方法易于检测, 可能成为一种新的分子指标监测临床患者预后.

4 参考文献

- Huebner K, Croce CM. Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br J Cancer* 2003;88:1501-1506
- Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, Huebner K, Croce CM. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:748-754
- Ginestier C, Bardou VJ, Popovici C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Geneix J, Adelaide J, Chaffanet M, Hassoun J, Viens P, Jacquemier J, Birnbaum D. Loss of FHIT protein expression is a marker of adverse evolution in good prognosis localized breast cancer. *Int J Cancer* 2003;107:854-862
- Koda M, Yashima K, Kawaguchi K, Andachi H, Hosoda A, Shiota G, Ito H, Murawaki Y. Expression of Fhit, Mlh1, and P53 protein in human gallbladder carcinoma. *Cancer Lett* 2003;199:131-138
- Yura Y, Mandai M, Konishi I, Hamid AA, Tsuruta Y, Kusakari T, Fujii S. Loss of Fhit protein expression in high-grade and advanced stage endometrial carcinomas. *Anticancer Res* 2003;23:2837-2843
- Huang LW, Chao SL, Chen TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol* 2003;90:331-337
- Gopalakrishnan VK, Banerjee AG, Vishwanatha JK. Effect of FHIT gene replacement on growth, cell cycle and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreatol* 2003;3:293-302
- Koch E, Fiedler W, Tannapfel A, Ballhausen WG. Alteration of the fragile histidine triad gene in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:907-913
- Chang YL, Wu CT, Shih JY, Lee YC. Roles of Fhit and p53 in Taiwanese surgically treated non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 2003;89:320-326
- Machida S, Ohwada M, Saga Y, Suzuki M. Abnormal fragile histidine triad expression in advanced cervical cancer and evaluation of its utility as a prognostic factor. *Oncology* 2003;65:89-93
- Zhao P, Song X, Nin YY, Lu YL, Li XH. Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1216-1219
- Takizawa S, Nakagawa S, Nakagawa K, Yasugi T, Fujii T, Kugu K, Yano T, Yoshikawa H, Taketani Y. Abnormal Fhit expression is an independent poor prognostic factor for cervical cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1213-1216
- Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol* 2003;200:39-46
- Rocco A, Schandl L, Chen J, Wang H, Tulassay Z, McNamara D, Malfertheiner P, Ebert MP. Loss of FHIT protein expression correlates with disease progression and poor differentiation in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:84-88
- Baykal C, Ayhan A, Al A, Yuce K, Ayhan A. No relationship is indicated between FHIT expression and clinicopathologic prognostic parameters in early stage cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:192-196
- Sevignani C, Calin GA, Cesari R, Sarti M, Ishii H, Yendamuri S, Vecchione A, Trapasso F, Croce CM. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63:1183-1187
- Noguchi T, Takeno S, Kimura Y, Uchida Y, Daa T, Yokoyama S, Gabbert HE, Mueller W. FHIT expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11:441-447
- Fouts RL, Sandusky GE, Zhang S, Eckert GJ, Koch MO, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L. Down-regulation of fragile histidine triad expression in prostate carcinoma. *Cancer* 2003;97:1447-1452
- Sukosd F, Kuroda N, Beothe T, Kaur AP, Kovacs G. Deletion of chromosome 3p14. 2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:455-457
- Petursdottir TE, Hafsteinsdottir SH, Jonasson JG, Moller PH, Thorsteinsdottir U, Huiping C, Egilsson V, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at the FHIT gene in different solid human tumours and its association with survival in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2002;22:3205-3212
- Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, Suzuki I, Ito M, Wennerberg J. Low expression of fragile histidine triad gene correlates with high proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39:56-63
- Zhao P, Li XY, Chen LZ. Loss of fragile histidine triad expression and metastasis in breast cancer. *Ai Zheng* 2002;21:668-670
- Pekarsky Y, Palamarchuk A, Huebner K, Croce CM. FHIT as tumor suppressor: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancer Biol Ther* 2002;1:232-236
- Zhao P, Lu Y, Hu Y, Zhong M, Li Z, Li X. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinoma. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2002;31:124-127
- Chang YT, Wu MS, Chang CJ, Huang PH, Hsu SM, Lin JT. Preferential loss of Fhit expression in signet-ring cell and Krukenberg subtypes of gastric cancer. *Lab Invest* 2002;82:1201-1218
- Petursdottir TE, Hafsteinsdottir SH, Jonasson JG, Moller PH, Thorsteinsdottir U, Huiping C, Egilsson V, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at the FHIT gene in different solid human tumours and its association with survival in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2002;22:3205-3212
- Mady HH, Melhem MF. FHIT protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:351-358
- Pavelic K, Krizanac S, Cacev T, Hadzija MP, Radosevic S, Crnic I, Levanat S, Kapitanovic S. Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis-clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol Med* 2001;7:442-453
- Mori M, Mimori K, Masuda T, Yoshinaga K, Yamashita K, Matsuyama A, Inoue H. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHIT locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7379-7382
- Caselli M, Marchisio M, Gaudio M, Saragoni L, Lanza G, Alvisi V, Bertagnolo V, Concu M, Capitani S, Caramelli E. Fhit protein expression in human gastric cancer and related precancerous lesions. *Oncol Rep* 2001;8:1233-1237
- Kitamura A, Yashima K, Okamoto E, Andachi H, Hosoda A, Kishimoto Y, Shiota G, Ito H, Kaibara N, Kawasaki H. Reduced Fhit expression occurs in the early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis. *Oncology* 2001;61:205-211

- 32 Deng YF, Tian F, Lu YD, Chen ZC, Xie DH, Yang XM, Shao XY. Mutation and abnormal expression of the fragile histidine triad gene in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2001; 111:1589-1592
- 33 金顺花, 朴熙绪, 金海峰, 朴凤顺, 许强. P27kipl、CyclinE 和 CyclinA 在胃癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003;11: 1804-1806
- 34 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪. MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1800-1801
- 35 李宏武, 单吉贤. HGF/SF、c-met 基因信号异常与胃肠道恶性肿瘤. 世界华人消化杂志 2003;11:1749-1751
- 36 张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武军, 梁永信. 胃癌组织 CD44v9 和 MMP-2 基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:1531-1534
- 37 徐采朴, 周永宁, 陈渝. alpha-连接素表达与胃癌生物学行为的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:1275-1278
- 38 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东瑛, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉. 胃黏膜癌变过程中 PTEN 基因编码产物的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1294-1296
- 39 李俊美, 罗和生, 姚宏昌. 雌激素诱导基因 PS2/TFF1 在胃癌及癌前病变中的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:1302-1305
- 40 张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆. GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联. 世界华人消化杂志 2003;11:1306-1309
- 41 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌. 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系. 世界华人消化杂志 2003; 11:1310-1313
- 42 叶梅, 刘君炎, 邓长生. 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联. 世界华人消化杂志 2003;11:1314-1317
- 43 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚. 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和 PCNA 的表达意义. 世界华人消化杂志 2003; 11:1219-1222
- 44 朱亚青, 尹浩然, 朱正纲, 刘炳亚, 张奕, 陈雪华, 于颖彦, 林言箴. 胃癌 SMAD4/DPC4 杂合性丢失的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11:522-525
- 45 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 46 褚传莲, 李延青, 张燕, 李文婕, 赵宪邨. 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:481-482
- 47 任群, 王振宁, 罗阳, 敖杨, 鲁冲, 姜莉, 徐惠绵, 张学. 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究. 世界华人消化杂志 2003;11:310-313
- 48 房殿春. 基因不稳在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2003; 11:1-5
- 49 郝冬梅, 孙秀菊, 郑志红, 贺光, 马鸣超, 徐惠绵, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:6-9
- 50 孙秀菊, 孙开来, 付浩, 王舒宝, 陈峻青. 胃癌细胞 nm23H1 基因表达与体内外侵袭力的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:10-13
- 51 尹芳, 时永全, 陈彩平, 乔泰东, 陈宝军, 苗继延, 樊代明. 胃癌耐药相关抗体 MGr1 筛选文库获得的基因 MGr1-Ag1 在胃癌组织中表达的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:18-21
- 52 周永宁, 徐采朴, 房殿春. CpG 岛甲基化与胃肠道肿瘤. 世界华人消化杂志 2003;11:65-71

World Journal of Gastroenterology 2005 年将改为周刊

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊. WJG 创刊于 1995 年, 原名《China National Journal of New Gastroenterology》, 1998 年更名为 WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版. WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 月刊, 大 16 开, 256 页, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从 2005 年开始, WJG 将由半月刊改为周刊, 大 16 开, 160 页, 每月 7、14、21、28 日出版.

酒石酸锑钾诱导人胃癌细胞凋亡

郭光云, 徐少勇, 邓长生

郭光云, 徐少勇, 鄱阳医学院附属人民医院消化内科 湖北省十堰市 442000
邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
郭光云, 女, 1971-08-16 生, 湖北省十堰市人, 汉族, 武汉大学在读硕士。
湖北省教育厅资助项目, No. 2000A43003
项目负责人: 徐少勇, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属人民医院消化内科。 xushaoyong195571@sina.com.cn
电话: 0719-8652119-6208
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-06

Potassium antimonyl tartrate induces apoptosis in human gastric carcinoma cells

Guang-Yun Guo, Shao-Yong Xu, Chang-Sheng Deng

Guang-Yun Guo, Shao-Yong Xu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China
Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Supported by the Education Department Foundation of Hubei Province, No. 2000A43003
Correspondence to: Shao-Yong Xu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China. xushaoyong195571@sina.com.cn
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-06

Abstract

AIM: Potassium antimonyl tartrate (PAT), an antiparasitic agent has recently been shown to induce apoptosis of leukaemia cells. Its effects on human gastric cancer SGC-7901 cells and possible mechanism were investigated in this study.

METHODS: The growth inhibition of cells induced by various concentrations of PAT in different time course was analyzed by using MTT assay. The nuclei were stained by Hoechst 33 258 and the morphologic changes were observed by fluorescence microscope. TUNEL staining, double-staining, and flow cytometry were used to detect apoptosis of cells.

RESULTS: SGC-7901 cells' growth inhibitory rates by PAT were significantly different in dose- and time-dependent manners (analysis of variance, $P < 0.01$). Chromatin condensation and nuclear fragmentation were seen under fluorescence microscope in the cells treated with Hoechst 33 258, and apoptotic cells were also detected by flow cytometry and TUNEL staining method.

CONCLUSION: PAT can induce the apoptosis of SGC-7901 cells, and PAT may be a promising apoptosis-inducer in gastric cancer therapy.

Guo GY, Xu SY, Deng CS. Potassium antimonyl tartrate induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):520-522

摘要

目的: 用于治疗寄生虫病的酒石酸锑钾能抑制白血病细胞及淋巴瘤细胞生长, 并诱导其凋亡. 本文探讨其对胃癌 SGC-7901 细胞株的作用及可能的机制.

方法: 采用 MTT 法检测不同浓度酒石酸锑钾对胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用; 经 Hoechst 33 258 染色后用荧光显微镜观察细胞核的形态变化; DNA 末端原位标记染色法、双染法(annexin-V/PI)和流式细胞术检测细胞凋亡.

结果: 酒石酸锑钾能明显抑制胃癌细胞生长, 抑制作用呈时间和剂量依赖性(方差分析, $P < 0.01$); Hoechst 33 258 染色后荧光显微镜观察细胞核固缩, 呈致密的强荧光; DNA 末端原位标记染色法、流式细胞仪检测均检测到凋亡细胞. 结论: 酒石酸锑钾能诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡. 有望作为一种新的凋亡诱导剂用于胃癌的治疗.

郭光云, 徐少勇, 邓长生. 酒石酸锑钾诱导人胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12(3):520-522

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/520.asp>

0 引言

胃癌是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤之一^[1-10]. 近年来随着诊断技术的进步, 使得早期胃癌的治疗取得了满意的疗效^[11-12], 可是对中晚期胃癌, 化疗的效果仍较差. 因此, 寻找新的方法治疗胃癌, 延长患者的生存期, 具有重要临床意义^[13-15]. 研究表明三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病疗效显著, 并能诱导多种实体瘤细胞凋亡^[16], 但因具有致癌性及其他副作用而使临床使用受限^[17]. 新近的研究表明, 酒石酸锑钾曾用于治疗寄生虫感染, 能显著抑制白血病细胞、恶性 B 淋巴细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 而副作用比三氧化二砷小^[18-19]. 酒石酸锑钾对胃癌细胞的作用尚未见报道, 现探讨如下.

1 材料和方法

1.1 材料 酒石酸锑钾(potassium antimonyl tartrate)购自 Sigma-Adrich 公司; Hoechst 33 258 购自 Sigma 公司; 四甲基偶氮唑盐[3-(4, 5-dimethylthiazo-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT]购自北京华美公司; RPMI 1640 培养基、小牛血清购自 Gibco 公司; SGC-7901 胃癌细胞株购自中科院上海细胞生物所; Annexin-V/PI 试剂盒购自 Bender Medsystems 公司. TUNEL 试剂盒购自武汉博士德公司. Olympus BX51 荧光显微镜 Σ 960

酶标仪 Coulter Epics XL 流式细胞仪等。

1.2 方法 细胞培养用 RPMI 1640 培养液(含 100 mL/L 小牛血清、100 KU/L 青霉素、100 KU/L 链霉素), 在 37℃, 50 mL/L 的 CO₂ 孵箱中常规培养。取对数生长期的 SGC-7901 胃癌细胞用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 调整细胞密度为 3×10^7 /L, 接种于 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 200 μ L, 细胞培养 24 h 贴壁后, 加入酒石酸锑钾。设立阴性对照组和实验组, 酒石酸锑钾浓度为(5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 40 μ mol/L)每组均设立 4 个复孔。培养 24 h, 48 h, 72 h 每孔加入 MTT (5 g/L, PBS 配制) 20 μ L 再培养 4 h, 吸弃上清, 加入 DMSO 200 μ L, 震荡 10 min。于酶标仪 490 nm 处测量吸光度 A 值。实验重复 3 次, 取其均值。计算细胞增生的抑制率。细胞生长抑制率=(1- 实验组 A 值)/对照组 A 值 \times 100%。

1.2.1 细胞核的变化 取指数生长期的细胞, 以 1×10^8 /L 的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 细胞贴壁后加入 5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L 酒石酸锑钾及不加药物的阴性对照, 24 h 后吸尽培养液, 加入固定液(甲醇 V: 冰醋酸 V = 3 : 1) 0.5 mL, 固定 10 min, 去固定液, 用 PBS 洗两遍。加入 Hoechst 33 258 (5 mg/L) 染色液 0.5 mL, 染色 5 min。紫外光激发, 荧光显微镜观察并照相。

1.2.2 细胞凋亡的检测 取指数生长期的细胞, 以 1×10^8 /L 的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后加入 5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L 酒石酸锑钾及不加药物的阴性对照。收集药物作用 24 h 后的细胞, 按照试剂盒说明书操作, 用 Annexin-V 和 PI 染色, 流式细胞仪检测。另培养 24 h 后, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 按照试剂盒说明书操作。高倍光镜下记数 1 000 个细胞, 计算凋亡指数 (apoptosis index, AI)= 凋亡细胞数 / 总细胞数 \times 100%。

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件处理系统, 细胞生长抑制率用 F 检验, 细胞凋亡率用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 细胞增生抑制率 酒石酸锑钾能有效抑制体外培养的 SGC-7901 细胞生长, 其抑制率随时间延长和浓度升高而升高(^bP < 0.01 F = 276.81 表 1), 呈时间效应和剂量效应关系。

表 1 酒石酸锑钾对 SGC-7901 细胞的生长抑制率(mean \pm SD, %)

PAT(μ mol/L)	t/ h		
	24	48	72
5	8.5 \pm 4.4	12.2 \pm 3.3	19.5 \pm 5.2
10	14.2 \pm 5.0	33.4 \pm 4.3	38.4 \pm 5.4
20	25.7 \pm 3.8	47.2 \pm 5.1	54.1 \pm 7.5
40	27.7 \pm 4.0	59.7 \pm 5.5	66.6 \pm 6.0

^bP < 0.01, F = 276.81.

2.2 细胞核形态特征 酒石酸锑钾作用 24 h 行 Hoechst

33 258 染色后, 在荧光显微镜下观察, SGC-7901 细胞核明显变小, 并可见致密强荧光(图 1)。而对照组细胞所发荧光较弱, 较均匀。

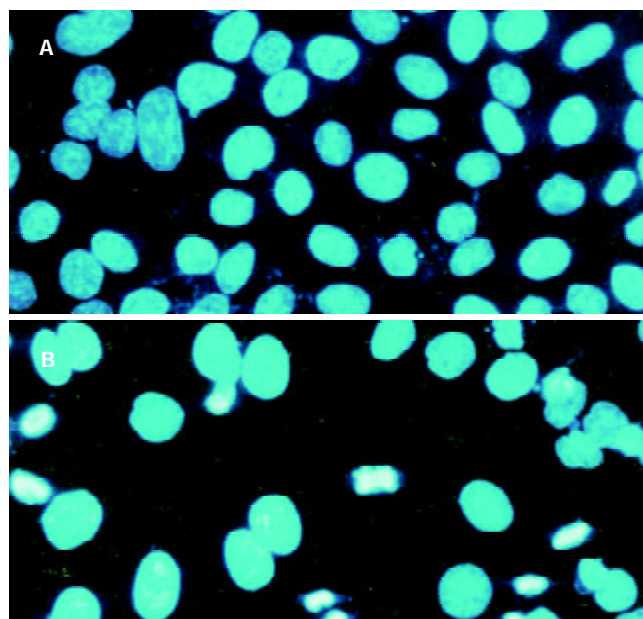


图 1 作用 24 h SGC-7901 细胞核形态 \times 400。A: 对照组; B: 酒石酸锑钾。

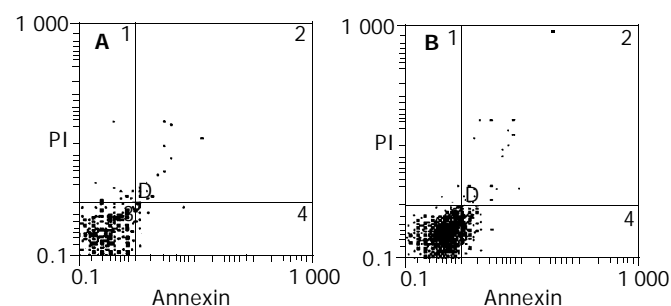


图 2 Annexin V - FITC 和 PI 双染检测 SGC-7901 细胞早期凋亡。A: 对照组; B: 酒石酸锑钾。

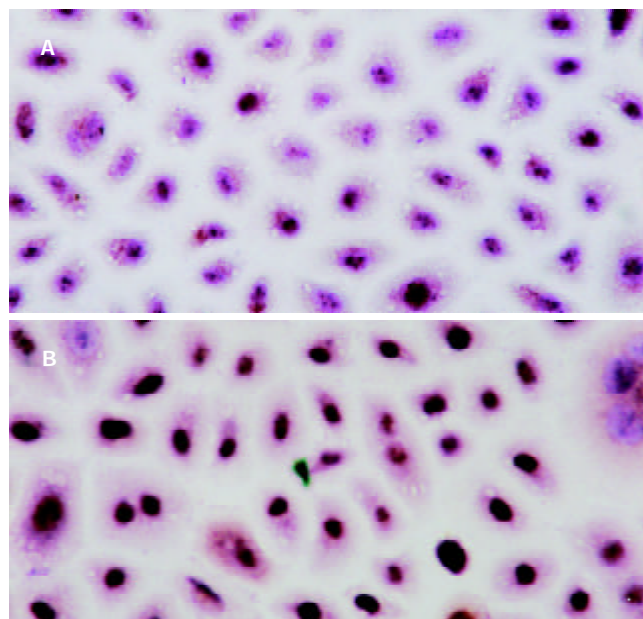


图 3 SGC-7901 细胞凋亡 TUNEL \times 400。A: 对照组; B: 20 μ mol/L 酒石酸锑钾。

2.3 细胞凋亡检测结果 酒石酸锑钾作用于 SGC7901 细胞, 用 Annexin V 和 PI 染色流式细胞仪检测双参数图上可见对照组细胞主要分布于第三象限(Annexin V - PI-), 酒石酸锑钾处理后细胞分布发生明显改变, 第四象限细胞(Annexin V + PI-)增加, 代表早期凋亡细胞, 第二象限细胞(Annexin V + PI+)分布也增加, 代表坏死细胞(图 2)。酒石酸锑钾处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 早期细胞的凋亡率 3.4%, 8.2% 和 12.9%, 呈一定的剂量效应关系。TUNEL 检查细胞核中有棕红色颗粒为阳性细胞(图 3)。细胞的凋亡指数为 7.5%, 16.7%, 38.1%, 阴性对照组为 4.6%, ($P < 0.01$, $\chi^2 = 47.454$)。可见在一定时间内, 随着作用浓度增大, 凋亡细胞的百分率也随着增加。

3 讨论

凋亡异常在肿瘤发生发展中具有重要作用, 逃避凋亡机制的调控在肿瘤细胞对常规化疗药物耐药中起关键作用。随着凋亡研究的深入, 人们致力于开发新的药物以选择性诱导肿瘤细胞凋亡^[20]。酒石酸锑钾能抑制急性早幼粒细胞白血病细胞 NB4 和 NB4R4 生长, 通过降解 PML/PML-RAR α 混合蛋白, 而诱导 NB4 和 NB4R4 凋亡。其微摩尔浓度可诱导 NB4, NB4R4 细胞凋亡, 机体能很好耐受而无明显毒副作用, 锑剂与 RA 之间无交叉耐药, 副作用比三氧化二砷小。Lecureur et al^[18] 研究表明, 酒石酸锑钾能诱导其他白血病细胞(K562, HL60, U937 和 KGLa)凋亡。他可能作用于谷胱甘肽过氧化物酶或巯基, 导致氧化应激, 线粒体跨膜电位下降, 触发细胞凋亡的级联反应; 因诱导的凋亡不能被广谱 caspase 酶的抑制剂所阻滞, 推测凋亡过程可能不需 caspase 酶的激活, 但凋亡诱导因子是否参与凋亡过程尚需研究。Lecureur et al^[19] 研究亦发现酒石酸锑钾能抑制多种淋巴细胞株的生长, 包括来源于急性淋巴细胞白血病的 Jurkat, Molt-4, Nalm-6 细胞和来源于淋巴瘤 Dudi, Raji, Recl 细胞。并能诱导 Dudi, Jurkat 细胞凋亡。凋亡依赖于 caspase 酶的活性, 并与线粒体跨膜电位下降和细胞内活性氧类物质增多有关。酒石酸锑钾能显著抑制恶性淋巴细胞生长, 而对正常的淋巴细胞无影响。提示酒石酸锑钾诱导凋亡对正常组织的影响小, 使其在治疗血液系统恶性肿瘤中具有一定的应用前景^[18-19]。

我们发现微摩尔浓度酒石酸锑钾能明显抑制体外培养的胃癌 SGC-7901 细胞的生长, 且其抑制细胞增生在一定范围内, 随酒石酸锑钾的浓度而增加, 作用时间延长, 细胞增生抑制率相应增加, 具有时效及量效关系。通过荧光显微镜观察到酒石酸锑钾作用后, 细胞的染色质浓缩、边聚, 等凋亡的形态改变; 用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的连接素(Annexin V - FITC)和 PI 双染法检测细胞凋亡, 因 Annexin V 能与暴露在凋亡早期细胞膜外表面的磷脂酰丝氨酸特异性结合与其连接的 FITC 发出绿色荧光, 而此时细胞维持膜的完整性, 变性染色质着色的荧光染

料 PI 不能进入细胞; 凋亡晚期及继发性坏死细胞膜失去完整性, 故 FITC 和 PI 双染; 坏死、机械性损伤的细胞只能 PI 与结合。故通过双染可区分早期的凋亡细胞与凋亡晚期坏死、继发性坏死细胞。酒石酸锑钾作用后 SGC-7901 细胞呈典型的凋亡细胞分布图。TUNEL 法亦检测到凋亡细胞。TUNEL 法和 Annexin V /PI 法检测细胞凋亡率有一差别, TUNEL 法检测凋亡率稍高, 可能因为 TUNEL 无法区分死亡细胞与凋亡细胞, 少数坏死细胞也呈阳性染色有关^[3]。

4 参考文献

- Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙. 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制. *世界华人消化杂志* 2003;11:1535-1539
- 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪. MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1800-1801
- 任群, 王振宁, 罗阳, 敖杨, 鲁冲, 姜莉, 徐惠绵, 张学. 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:310-313
- 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:526-530
- Qiu GB, Gong LG, Hao DM, Zhen ZH, Sun KL. Expression of MTLN gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2160-2163
- Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1409-1414
- 张晓兵, 刘泽军. 胃癌 DNA 甲基化谱研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:1454-1457
- Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- Zheng HC, Sun JM, Wei ZL, Yang XF, Zhang YC, Xin Y. Expression of Fas ligand and caspase-3 contributes to formation of immune escape in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1415-1420
- Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:35-39
- Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1930-1934
- 刘文超, 穆怀兴, 任军, 张学庸, 潘伯荣. 防御素对胃癌细胞系体外的杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:622-626
- Li JY, Wang XZ, Chen FL, Yu JP, Luo HS. Nimesulide inhibits proliferation via induction of apoptosis and cell cycle arrest in human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:915-920
- Wang ZY. Arsenic compounds as anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48(Suppl 1):S72-76
- Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J* 2003;79:391-396
- Lecureur V, Lagadic-Gossman D, Fardel O. Potassium antimonyl tartrate induces reactive oxygen species-related apoptosis in human myeloid leukemic HL60 cells. *Int J Oncol* 2002;20:1071-1076
- Lecureur V, Le Thiec A, Le Meur A, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Fardel O. Potassium antimonyl tartrate induces caspase- and reactive oxygen species-dependent apoptosis in lymphoid tumoral cells. *Br J Haematol* 2002;119:608-615
- Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2003;2:573-580

塞来西布体外对人类肝胃癌细胞生长的抑制作用

樊菁, 窦科峰, 李开宗

樊菁, 窦科峰, 李开宗, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科, 陕西省西安市 710032
樊菁, 男, 1978-05-23 生, 青海省西宁市人, 汉族, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科硕士生
项目负责人: 樊菁, 710032, 陕西省西安市长乐西路 127 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. fanjing@fmmu.edu.cn
电话: 029-83375260 传真: 029-83375255
收稿日期: 2004-01-02 接受日期: 2004-01-12

Inhibitory effects of celecoxib on proliferation of human liver and gastric carcinoma cells *in vitro*

Jing Fan, Ke-Feng Dou, Kai-Zong Li

Jing Fan, Ke-Feng Dou, Kai-Zong Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Jing Fan, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 127 Changle West Road, Xi'an 710032, China. fanjing@fmmu.edu.cn
Received: 2004-01-02 Accepted: 2004-01-12

Abstract

AIM: To study the inhibitory effects of celecoxib on proliferation of human hepatoma SMMC-7721 cells and gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro*.

METHODS: The two carcinoma cells were cultured with celecoxib at various concentrations (0, 20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{mol/L}$). Growth suppression was detected with MTT colorimetric assay, cell apoptotic alterations were evaluated by transmission electron microscopy (TEM), and quantity of Cox-2 was evaluated by cytochemical staining.

RESULTS: The inhibition of proliferation on two carcinoma cells was observed by MTT (49.1% and 42.9% by 320 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib). The inhibitory effect was dose-dependent. Apoptotic cells were observed under transmission electron microscope. The different quantities of Cox-2 protein in cells were observed by cytochemical staining.

CONCLUSION: Celecoxib inhibits proliferation, induces apoptosis of human two carcinoma cells *in vitro*, and the effects have close relation to the quantities of Cox-2 protein in cells.

Fan J, Dou KF, Li KZ. Inhibitory effects of celecoxib on proliferation of human liver and gastric carcinoma cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):523-526

摘要

目的: 研究塞来西布在体外对人类肝癌7721细胞以及胃癌7901细胞的生长抑制作用。

方法: 两种肿瘤细胞用含不同浓度(0, 20, 40, 80, 160 和 320 $\mu\text{mol/L}$)的塞来西布的培养液培养. 应用MTT测定法来测定生长抑制率, 电镜技术来观察细胞凋亡情况, 免疫组化技术来检测细胞内Cox-2蛋白含量。

结果: 塞来西布对两种肿瘤细胞均具有生长抑制作用(塞来西布 320 $\mu\text{mol/L}$ 时两种肿瘤细胞抑制率分别为 49.1% 和 42.9%), 并呈量-效关系. 电镜下可观察到凋亡细胞. 免疫组化发现细胞内环氧化酶的含量在处理前后有明显变化。

结论: 在体外, 塞来西布抑制人类肝癌及胃癌细胞生长, 诱导他们产生凋亡, 并且该作用与细胞内环氧化酶含量有密切关系。

樊菁, 窦科峰, 李开宗. 塞来西布体外对人类肝胃癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(3):523-526

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/523.asp>

0 引言

早在 1870 年代, 阿斯匹林以及其衍生物就被用于解热、镇痛以及抗血栓的治疗^[1]. 他们被称作非甾体类抗炎药(NSAID), 其主要的的作用在于抑制了环氧化酶(cyclooxygenase)的活性, 减少了前列腺素的合成, 从而降低了炎症反应. 最近, 通过流行病学、基础实验和临床研究发现, 长期服用 NSAID 可以降低食管癌、胃癌、结肠癌及直肠癌等肿瘤的发病率. 其中, 针对环氧化酶两种亚型之一的环氧化酶-2 (Cox-2)的特异性抑制剂塞来西布(celecoxib)具有明显的抑制多种肿瘤细胞如前列腺癌^[2]、脑瘤^[3]等的生长, 并有促进肿瘤细胞凋亡的作用. 因此, 我们选择人类肝癌细胞(SMMC-7721)和胃癌细胞(SGC-7901)来观察塞来西布对他们的生长抑制及促凋亡作用, 为塞来西布抗肿瘤机制的进一步研究和肿瘤的化学治疗或是化学辅助治疗的临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Celecoxib 购自 Cearal 公司, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 胰酶购自华美生物公司. MTT 购自 Gibco 公司. Cox-2 免疫组化试剂盒购自博士德生物公司. 小牛血清、RPMI1640 和 DMSO 购自鼎国公司. 肝癌细胞(SMMC-7721)由本实验室提供, 细胞置于含 50 mL/L CO_2 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养, 以含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 作为其培养基, 10^4 /L 细胞接种 100 mL 培养瓶进行培养, 3 d 传代。

1.2 方法 将对数生长期的 SMMC-7721 及 SGC-7901 细胞计数后, 调整细胞密度为 $1 \times 10^4/L$, 接种到 96 孔培养板, 每孔 200 μL , 每组 8 孔, 细胞贴壁后每孔分别加入 20, 40, 80, 160 和 320 $\mu mol/L$ 不同浓度的塞莱西布继续培养 24 h, 以培养液为对照组. 分别加入新配置的 5 g/L MTT 60 μL , 37 $^{\circ}C$ 继续孵育 4h, 弃上清, 加入 DMSO 150 μL 以及甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.2) 20 μL , 振荡 10 min 后, 用酶标仪, 在 570 nm 波长测定吸光度, 记录数据. 肿瘤细胞的抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{阴性对照组 A 值}) \times 100\%$. 细胞培养同上, 对照组换正常培养液, 实验组换含 320 $\mu mol/L$ 的塞莱西布的培养液, 培养 24h 后, 消化后 D-Hanks 液洗涤离心 (1 000 r/min, 5min/ 次) 2 次后, 用 25 g/L 戊二醛 4 $^{\circ}C$

固定 30 min, 常规制作电镜标本, 双铅染色后, 置于 1200EX 型透射电镜观察摄片. 细胞以 $10^4/L$ 分别接种 4 个预置 4 块 1cm \times 1cm 盖玻片的 6 cm 培养皿, 37 $^{\circ}C$ 培养箱培养, 设立对照组和实验组, 对照组换正常培养液, 实验组换含 320 $\mu mol/L$ 的塞莱西布的培养液, 培养 24 h 后, 按试剂盒说明固定染色, 显微镜(Olympus)观察摄片.

统计学处理 对 MTT 测定所获得的数据进行 mean \pm SD 检验分析, $P < 0.05$ 被认为是具有显著差异.

2 结果

2.1 MTT 法检测 随着药物浓度的升高, 两种细胞的存活率呈明显下降, 存在量效关系(表 1).

表 1 塞莱西布对肿瘤细胞增生活性的影响(MTT 法 mean \pm SD)

塞莱西布($\mu mol/L$)	A 值		抑制率(%)		t	
	SGC-7901	SMMC-7721	SGC-7901	SMMC-7721	SGC-7901	SMMC-7721
0 (对照)	0.0743 \pm 0.0024	0.0653 \pm 0.0021				
20	0.0703 \pm 0.0012	0.0607 \pm 0.0006	5.4 \pm 1.2	7.7 \pm 0.7	6.000	13.999
40	0.0697 \pm 0.0012	0.0593 \pm 0.0021	6.3 \pm 1.2	9.2 \pm 2.4	7.000	4.992
80	0.0680 \pm 0.0020	0.0587 \pm 0.0015	8.5 \pm 1.8	10.2 \pm 1.7	5.485	7.559
160	0.0557 \pm 0.0042	0.0503 \pm 0.0015	25.0 \pm 4.0	23.0 \pm 1.7	7.766	17.008
320	0.0393 \pm 0.0050	0.0373 \pm 0.0012	47.1 \pm 4.8	42.9 \pm 1.4	12.044	41.999

$P < 0.05$.

2.2 凋亡细胞的超微结构 在电镜下可以看出, 两种实验组的细胞, 有典型的凋亡结构出现. 其特征是细胞皱缩, 微绒毛消失, 体积缩小, 且染色质浓缩, 形成沿核膜分布的不同形状和大小的块状结构(图 1).

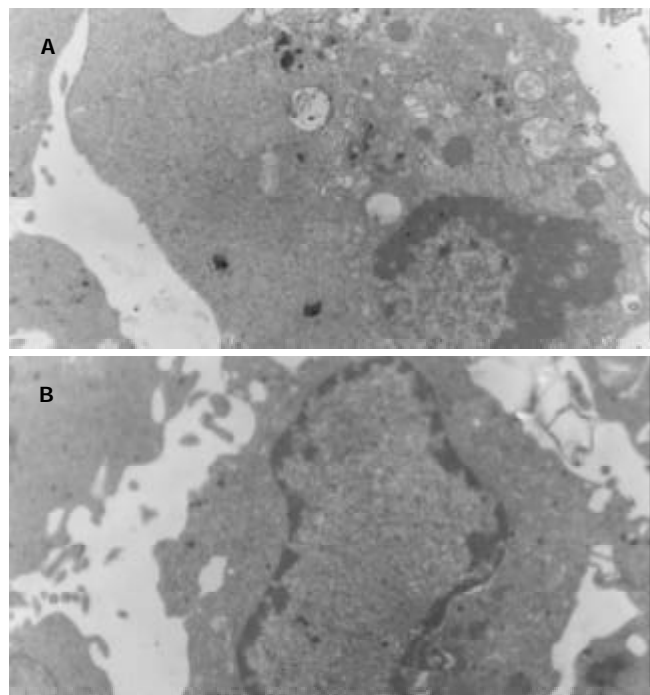


图 1 癌细胞凋亡的超微结构电镜 $\times 12\ 000$. A: 7901 细胞; B: 7721 细胞.

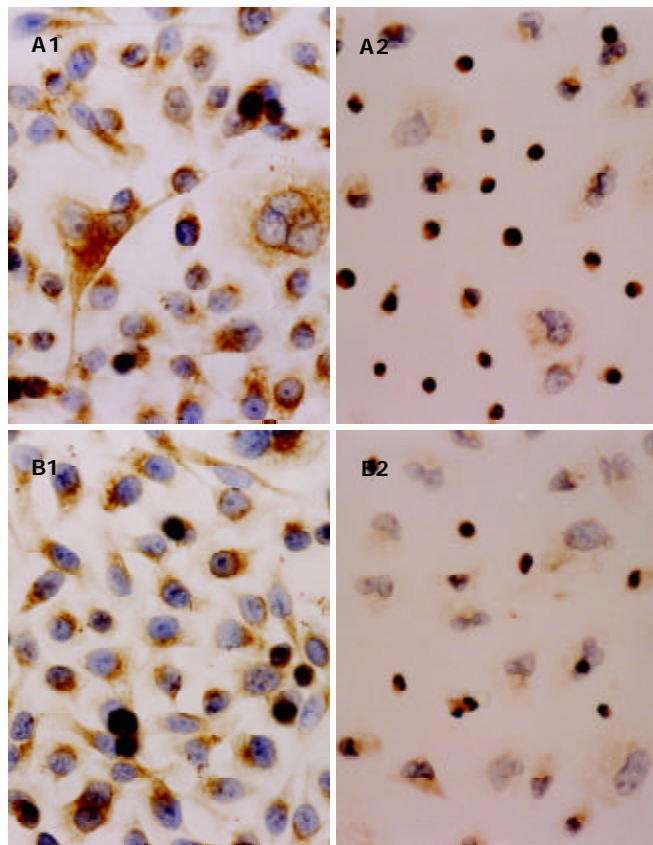


图 2 塞莱西布作用 24 h 的 COX-2 表达 SABC $\times 400$. A1: 7901 对照组; A2: 7901 实验组; B1: 7721 对照组; B2: 7721 实验组.

2.3 细胞化学染色观察 COX-2 阳性的细胞主要为细胞质和核膜着色, 呈棕黄色细颗粒状, 少部分细胞有细胞核和细胞质同时着色. 处理前的两种肿瘤细胞, COX-2 的表达水平较高, 而处理后, 可以发现, COX-2 表达水平明显下降, 并出现细胞形态的改变(图 2).

3 讨论

Kerr et al 学者最先提出了细胞凋亡这个概念. 随后的一系列研究显示肿瘤细胞的增生与其丧失凋亡能力有关^[4-17], 并且存在多种因素导致了肿瘤细胞凋亡能力的丧失^[18-23]. 因此, 探索能够诱导肿瘤细胞凋亡的新药就成为了众多学者努力的方向^[24-25]. 作为一种新近合成的抗风湿的非甾体类抗炎药, 塞莱西布最初的目的主要是抗炎镇痛治疗. 然而, 随着一些临床流行病学的调查的展开, 有学者发现, 患有家族性腺瘤息肉病的患者, 在持续 6 mo 服用一定剂量的塞莱西布后, 其息肉数量和大小都小于对照组患者^[26]. 流行病学研究的发现, 引起了科研人员的注意. 随后展开的一些实验中, 人们发现, 塞莱西布能够抑制部分肿瘤细胞的生长并且诱导他们的凋亡, 比如: 前列腺癌^[2]、脑癌^[3]等.

目前肿瘤仍是严重威胁人类生命的主要疾病之一, 其发病机制复杂, 影响因素多^[27-30]. 临床上, 许多患者在确诊时已丧失了手术机会, 而化疗和放疗的效果不佳、毒副作用较大. 因此, 寻找一种高效低毒的药物作为化疗治疗或是辅助治疗晚期肿瘤就是许多学者研究的方向. 本实验中, 我们通过 MTT 法, 发现塞莱西布具有明显的抑制两种肿瘤细胞生长的作用, 并且存在量-效关系. 通过电镜等, 我们又观察到塞莱西布对他们存在明显的促凋亡作用. 通过细胞化学染色, 我们发现, 塞莱西布对两种肿瘤细胞内的环氧化酶-2 (Cox-2) 具有明显的抑制作用, 此酶的含量可能与塞莱西布的作用密切相关.

目前, 塞莱西布抑制肿瘤细胞生长和促进其凋亡的作用机制还不是很清楚, 存在几种不同的观点. 有的观点认为, 环氧化酶-2 (Cox-2) 在肿瘤组织过表达所产生的前列腺素 E₂, 是大部分肿瘤细胞形成和存活的基础, 塞莱西布抑制了他的表达, 也同时抑制了前列腺素 E₂ 的合成, 因此抑制了肿瘤细胞的存活, 诱导了凋亡^[3]; 有的观点认为, 塞莱西布抑制了肿瘤细胞内内质网表面的 Ca²⁺ 依赖的 ATP 酶的功能, 导致了细胞内 Ca²⁺ 调控机制的紊乱, 从而促进了肿瘤细胞的凋亡^[31]; 还有观点认为, 塞莱西布通过抑制了蛋白激酶 C 依赖的激酶 1 (PKC1) 的磷酸化, 抑制了该激酶的功能, 也抑制了其下游分子蛋白激酶 B (PKB) 的功能, 从而导致了有功能的促凋亡分子 bad 在细胞内的表达量上升, 促进了细胞凋亡等^[32].

最近, 塞莱西布已经被美国食品和药品管理委员会(FDA)批准, 作为患家族性息肉病(FAP)的患者预防结肠癌的预防药物. 相信随着科研实验的进一步深入,

对环氧化酶-2 的特异性抑制剂塞莱西布抗肿瘤的作用机制的研究必将有所突破. 塞莱西布所具有的明显的抑制肿瘤细胞生长并且诱导其凋亡的特性, 相信将在多种晚期肿瘤的化疗治疗或辅助治疗中具有广阔的应用前景.

4 参考文献

- 1 Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003;110:255-258
- 2 Kirschenbaum A, Liu X, Yao S, Levine AC. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology* 2001;58(2 Suppl 1): 127-131
- 3 Patti R, Gumired K, Reddanna P, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD. Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib. *Cancer Lett* 2002;180:13-21
- 4 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 5 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 6 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
- 7 Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450
- 8 Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K. Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappaB inactivation. *Oncogene* 2003;22:1653-1662
- 9 Shen ZY, Shen J, Li QS, Chen CY, Chen JY, Yi Z. Morphological and functional changes of mitochondria in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenic trioxide. *World J Gastroenterol* 2002;8:31-35
- 10 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 11 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 12 Sun BH, Zhao XP, Wang BJ, Yang DL, Hao LJ. FADD and TRADD expression and apoptosis in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:223-227
- 13 Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- 14 Liu LX, Jiang HC, Piao DX. Radiofrequency ablation of liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:393-399
- 15 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 16 Yang JY, Luo HY, Lin QY, Liu ZM, Yan LN, Lin P, Zhang J, Lei S. Subcellular daunorubicin distribution and its relation to multidrug resistance phenotype in drug-resistant cell line SMMC-7721/R. *World J Gastroenterol* 2002;8:644-649
- 17 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- 18 Zheng JY, Li KZ, Wang WZ. Impact of the expression of p27KIP1 on apoptosis and progression of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:883-886
- 19 Hu PZ, Zhang CS, Ma FC, Wang SJ, Wang WL. Expressions of cyclin-dependent kinase inhibitor P21WAF1/CIP1 and PCNA

- in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:145-148
- 20 Guo XZ, Shao XD, Xu JH, Zhao JJ, Li HY, Wang D. The expression of bcl-xL mRNA in the tissues of hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:530-532
- 21 Liang Y, Lu B, Cui ZF, Li XD, Guo YJ, Lu YJ. The expression of Fas/FasL in hepatocellular carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1364-1368
- 22 Zhang CS, Wang WL, Peng WD, Hu PZ, Chai YB, Ma FC. Bcl-2 ribozyme's promotion of apoptosis of SMMC7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:417-419
- 23 Lu SY, Pan XZ, Peng XW, Shi ZL, Lin L, Chen MH. Effect of Hp infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:386-388
- 24 Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003;22:107-113
- 25 Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxyl camptothecin in gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- 26 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- 27 Zhou XD, Yu JP, Ran ZX, Luo HS, Yu BP. Expression of cFLIP and p53 mutation in adenocarcinoma of colon. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:536-539
- 28 Cui J, Yang DH, Qin HR. Mutation and clinical significance of c-fms oncogene in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:392-395
- 29 Yang YL, Dou KF, Li KZ. Correlation of UPAR and VEGF expression with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:381-383
- 30 Guo J, Shen ZX, Tan SY, Luo HS, Li HX, Feng ZQ, Yang J. Expression of MDM2, P53 and P14ARF in human colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:540-543
- 31 Johnson AJ, Hsu AL, Lin HP, Song X, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem J* 2002;366(Pt 3):831-837
- 32 Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, Ogier-Denis E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 2002;277:27613-27621

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的和与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

奥曲肽对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长和凋亡的影响

吕 宾, 徐 毅, 丁志山

吕宾, 徐毅, 丁志山, 浙江中医学院附属医院消化科 浙江省杭州市 310006
吕宾, 男, 1963-10 出生, 浙江省东阳市人, 汉族, 1984 年于温州医学院获学士学位, 1999 年于浙江大学医学院获硕士学位, 教授、主任医师, 主要从事消化病的临床和科研工作。

项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 浙江中医学院附属医院消化科. lubin8@hzcnc.com
电话: 0571-87068001

收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-12-08

Effect of octreotide on growth and apoptosis of human gastric cancer cell line SGC-7901

Bin Lu, Yi Xu, Zhi-Shan Ding

Bin Lu, Yi Xu, Zhi-Shan Ding, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine College, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Dr. Bin Lu, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine College, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China.
lubin8@hzcnc.com

Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To observe the effects of somatostatin analog (octreotide) on the growth and apoptosis of gastric cancer cell line.

METHODS: The proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901 was determined in octreotide groups and control group by MTT. The cell morphology was observed under HE staining and electron microscopy. The cell cycle and apoptosis ratio were measured using flow cytometry analysis.

RESULTS: The growth of gastric cancer cell line SGC-7901 was significantly inhibited by octreotide with 160-480 mg/L (vs controls, $P < 0.001$), and the maximal inhibitory rate was 25.4%. Morphological variations of apoptosis were observed at 48 hours treated with octreotide by HE staining and apoptosis body was observed under electron microscope. Apoptotic rate was $9.42 \pm 5.29\%$ ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Octreotide can suppress the growth of gastric cancer cell line SGC-7901 and induce apoptosis of the cells.

Lu B, Xu Y, Ding ZS. Effect of octreotide on growth and apoptosis of human gastric cancer cell line SGC-7901. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):527-529

摘要

目的: 研究生长抑素类似物奥曲肽对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长和凋亡的作用。

方法: 取人胃癌细胞株 SGC-7901, 体外培养后以处于对数生长的细胞制成单细胞悬液, 加入不同浓度的奥曲肽, 以 MTT 法进行细胞增生试验, 并以不含药物的培养液为阴性对照; 通过 HE 染色和电子显微镜观察细胞形态, 通过流式细胞仪测定 SGC-7901 细胞周期和凋亡率。

结果: 奥曲肽在一定浓度范围内 (160-480 mg/L) 对 SGC-7901 细胞的生长具有抑制作用 (与对照组比较, 均 $P < 0.001$), 并存在量效关系和饱和性, 最大抑制率为 25.4% (奥曲肽浓度 400 mg/L)。奥曲肽可诱导 SGC-7901 细胞凋亡, HE 染色见奥曲肽作用 48 h, 细胞开始出现凋亡的形态学改变, 72 h 凋亡细胞明显增多, 电镜下见有典型的凋亡小体出现。流式细胞仪分析可见 G1 峰前出现亚二倍体峰, 凋亡率为 $9.42 \pm 5.29\%$ ($P < 0.05$)。

结论: 奥曲肽在体外能抑制人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞的生长, 其作用与诱导肿瘤细胞凋亡有关。

吕宾, 徐毅, 丁志山. 奥曲肽对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):527-529

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/527.asp>

0 引言

生长抑素对机体几乎所有分泌功能起抑制作用^[1-4], 生长抑素类似物奥曲肽能抑制多种肿瘤的生长^[5-7], 胃癌细胞有生长抑素受体表达^[8], 因此在理论上生长抑素能通过受体对胃癌细胞发挥相应作用。为了探讨奥曲肽治疗胃癌的可能性, 我们通过体外实验研究奥曲肽对胃癌细胞生长和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC-7901 (中科院上海细胞所), 维护于含 100 ml/L 小牛血清和 3 g/L 谷氨酰胺的 PRMI 1640 培养液中, 另加青、链霉素各 100 ku/L, 置于 37 °C、50 ml/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。实验用药为生长抑素类似物 - 奥曲肽 (北京诺华制药公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞增生试验 MTT 法 取状态良好、处于对数生长期的 SGC-7901 细胞, 用 2.5 g/L trypsin+0.1 g/L EDTA 消化后制成 1×10^7 /L 的单细胞悬液, 以每孔 200 μ L 接种于 96 孔平底培养板中, 置于 37 °C、50 ml/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱中, 24 h 后加入不同浓度的奥曲肽 (浓度分别为 80, 160, 280, 400, 480 μ g/L, 由

无血清 PRMI1640 培养液将奥曲肽母液稀释而成). 50 ml/L 小牛血清, 以不含药物的培养液为阴性对照. 实验组及对照组均设 8 个复孔, 培养 48 h 后, 每孔加入新配制的 MTT 液(5 g/L)20 μ L, 置于孵育箱内 4 h 后, 吸去培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 用酶标仪于 492 nm 波长测吸光度 (A) 值, 细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 \times 100%.

1.2.2 HE 染色和电子显微镜观察 取状态良好的处于对数生长期的细胞, 2.5 g/L trypsin 消化后, 制成 1×10^8 /L 的单细胞悬液, 每瓶 3 mL 接种于含玻片的培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}$ C、50 ml/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱, 24 h 后加入奥曲肽, 分别于 48 h 和 72 h 后乙醇固定 5 min, 苏木精染液染色 1 min, 自来水冲洗, 晾干, 封片, 油镜下观察. 细胞培养 24 h 后加入奥曲肽, 72 h 后取 5×10^6 个细胞, PBS 洗涤细胞 2 遍, 30 ml/L 戊二醛固定 4 h, 10 g/L 锇酸固定 1 h, 梯度丙酮脱水, 树脂包埋, LKB-NOVa 热膨胀式超薄切片机, 厚度 500 nm, 醋酸铀、枸橼酸铅双染色法染色, JEM100CX- II 透射式电子显微镜下观察.

1.2.3 流式细胞仪测定 细胞培养 24 h 后加入奥曲肽, 48 h 后, 弃去培养液, 2.5 g/L trypsin+0.1 g/L EDTA 消化, 收集细胞, 制成单细胞悬液, PBS 洗 2 次(5 000 r/min) 调节细胞密度为 1×10^9 /L, 700 ml/L 冰乙醇固定 24 h 后取单细胞悬液 100 μ L 置试管中, 加 PI 溶液 50 μ L, 室温避光 30 min, 加 PBS 溶液 400 μ L, 上机行流式细胞仪测定 SGC-7901 细胞 DNA 含量, 并以流式细胞仪随机软件分析, 以加入二甲基亚砜的细胞组为阴性对照, 试验和对照组各设 4 个样本.

统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件包统计, 结果以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 t 检验进行统计学分析.

2 结果

奥曲肽对 SGC-7901 细胞的生长具有抑制作用, 其抑制率随着药物浓度的增高而增大, 最大抑制率可达 25% (表 1). 提示奥曲肽对胃癌 SGC-7901 细胞的体外抑制作用存在量效关系.

表 1 奥曲肽对胃癌细胞 SGC-7901 生长的抑制作用 (mean \pm SD, A, n=8)

奥曲肽浓度(μ g/L)	A 值	细胞存活率(%)
480	0.3 690 \pm 0.0 093 ^b	75.4
400	0.3 650 \pm 0.0 294 ^b	74.6
280	0.3 880 \pm 0.0 368 ^b	79.3
160	0.4 208 \pm 0.0 309 ^b	86.0
80	0.4 633 \pm 0.0 476	94.7
0 (对照组)	0.4 893 \pm 0.0 618	100.0

^bP < 0.001, vs 对照组.

奥曲肽作用后 48 h 细胞开始出现凋亡的形态学改

变, 72 h 凋亡细胞明显增多, 通过 HE 染色, 可看到较为典型的细胞凋亡形态学改变: 细胞核固缩, 染色质凝集, 呈新月形紧贴于核膜周边, 核破裂, 染色质片断化, 凋亡小体形成(图 1). 电镜下见凋亡细胞的核染色质浓聚成颗粒状或条索状, 聚集在核膜下, 内质网扩张, 出现空泡, 有典型的凋亡小体形成(图 2).

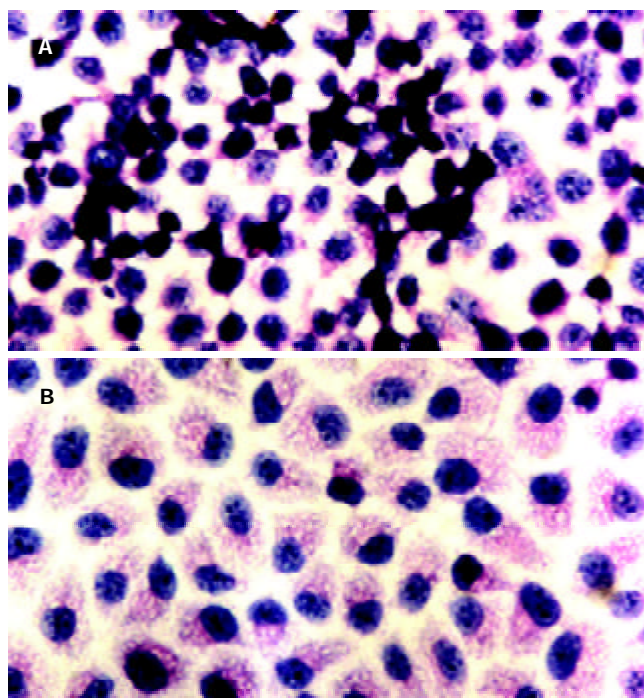


图 1 SGC-7901 细胞 HE 染色. A: 奥曲肽; B: 对照组.

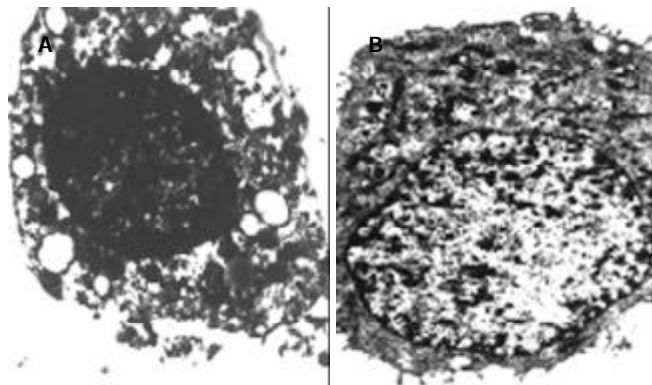


图 2 SGC-7901 细胞电子显微镜. A: 奥曲肽; B: 对照组.

流式细胞仪检测显示, 当奥曲肽浓度达到 160 μ g/L 时, DNA 直方图上可见 G1 峰前出现亚二倍体峰(凋亡峰), 浓度升至 280 和 480 μ g/L, 凋亡峰更为明显. 奥曲肽对细胞周期和凋亡均有影响(表 2).

表 2 奥曲肽对细胞周期和凋亡的影响(mean \pm SD, n=4)

组别	G0/G1	S	G2/M	凋亡率(%)
奥曲肽	62.4 \pm 6.8	34.3 \pm 3.0	3.3 \pm 4.6	9.4 \pm 5.3 ^a
对照组	57.7 \pm 4.1	34.5 \pm 2.4	6.0 \pm 2.2	0

^aP < 0.05, vs 对照组.

3 讨论

胃癌的生长受许多因素影响, 有研究显示, 五肽胃泌素能促进胃癌细胞株 HGC808、HGC823 的生长, 增加氨基己糖的含量, 而生长抑素则能抑制胃癌细胞的生长和分泌胃泌素、胰高糖素, 降低氨基己糖的含量^[9]. 我们的实验显示, 奥曲肽对胃癌细胞 SGC-7901 的体外生长具有抑制作用, 随剂量增大抑制作用增强, 最大抑制率达 25%. 建立裸鼠人胃癌原位移植瘤模型, 以奥曲肽皮下注射 8 wk, 发现抑瘤率达 62.3%, 凋亡指数为 $18.3 \pm 2.7\%$, 而且胃癌组织及胃癌细胞株均有生长抑素受体 SSTR-2、SSTR-3 基因的表达, 结果提示奥曲肽通过 SSTR-2 和 SSTR-3 介导有效地抑制胃癌生长^[10].

生长抑素可诱导乳腺癌细胞、大肠癌细胞、肝癌细胞凋亡. 在我们的实验中, 经 HE 染色和电子显微镜检查, 肿瘤细胞在生长抑素作用下, 48 h 开始出现凋亡的形态学改变, 72 h 凋亡细胞明显增多. HE 染色和电子显微镜均可看到较为典型的细胞凋亡形态学改变. 流式细胞仪检查在 DNA 直方图上 G1 峰前出现凋亡峰, 细胞周期分析表明, SGC-7901 细胞经生长抑素作用后, 细胞被阻滞于 G0/G1 期, S 期和 G2/M 期细胞明显减少, 细胞凋亡率为 $9.4 \pm 5.3\%$, 表明生长抑素可以通过诱导凋亡的途径抑制肿瘤细胞的生长. 有研究显示, 在高、中分化胃癌组织中生长抑素高表达, 凋亡指数高, 而在低分化腺癌和黏液腺癌中生长抑素呈低表达, 提示生长抑素具有抗增生促凋亡作用^[11].

生长抑素通过肿瘤表面的生长抑素受体直接抑制肿瘤增生. 生长抑素受体有 1-5 型, 在不同的肿瘤细胞中表达不同, 在胃癌表面有生长抑素受体的表达. 伴有腹腔淋巴结转移的胃癌, 其癌组织生长抑素 II 型受体基因表达低下, 提示生长抑素在胃癌的发生发展过程中起一定的作用, 而 II 型生长抑素受体表达减少可能与胃癌的转移有关^[12]. 通过免疫组化研究胃癌组织中生长

抑素和表皮生长因子的表达, 并对预后进行随访, 发现生长抑素阳性胃癌其表皮生长因子受体的表达明显减少, 而生长抑素阴性表达的表皮生长因子阳性胃癌预后差, 提示生长抑素可能通过干扰生长因子的合成而抑制胃癌生长^[13]. 总之, 生长抑素抑制肿瘤细胞生长的机制尚不明确, 可能的机制有诱导肿瘤细胞凋亡和内分泌途径等一系列机制抑制肿瘤生长.

4 参考文献

- 1 黄象谦. 生长抑素 - 可能是人体内影响最广泛的一个胃肠激素. 华人消化杂志 1998;6:93-96
- 2 Li YY. Mechanisms for regulation of gastrin and somatostatin release from isolated rat stomach during gastric distention. *World J Gastroenterol* 2003;9:129-133
- 3 Yao YL, Xu B, Zhang WD, Song YG. Gastrin, somatostatin, and experimental disturbance of the gastrointestinal tract in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:399-402
- 4 Zhang ZF, Wang ZL, Lu GQ. Peripheral mechanism of inhibitory effect of centrally administrated histamine on gastric acid secretion. *World J Gastroenterol* 1998;4:222-224
- 5 de Herder WW, Lamberts SW. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr Opin Oncol* 2002;14:53-57
- 6 Froidevaux S, Eberle AN. Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy. *Biopolymers* 2002;66:161-183
- 7 Wang CH, Tang CW, Liu CL, Tang LP. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1904-1908
- 8 王消冰, 王绪, 张南征. 生长抑素与胃癌. 世界华人消化杂志 2001;9:1185-1189
- 9 刘小菁, 张正, 杨丽, 强鸥. 胃泌素、生长抑素对人胃癌细胞生长的调节作用. 华西医科大学学报 1998;29:292-294
- 10 王春晖, 唐承薇, 汤丽平. 奥曲肽抑制胃癌生长的实验研究. 胃肠病学 2002;7:158-162
- 11 林静, 王超, 景燕, 庞有成, 杨红, 乔进朋, 陈勃, 姚希贤. 胃癌组织中内分泌细胞的表达及与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1054-1055
- 12 王承党, 陈玉丽, 吴婷, 刘豫瑞. 胃癌组织中生长抑素 II 型受体基因低表达与淋巴结转移. 世界华人消化杂志 1999;7:864-866
- 13 王鲁平, 虞积耀, 邓永江, 田玉旺, 吴霞, 刘光, 丁华野. 胃癌组织中生长抑素与表皮生长因子受体表达的相关性及意义. 华人消化杂志 1998;6:606-609

TGIF反义寡核苷酸对胃癌细胞增生和凋亡的影响

胡忠良, 文继舫, 柳洋, 王宽松, 郑晖, 傅春燕

胡忠良, 文继舫, 柳洋, 王宽松, 郑晖, 傅春燕, 中南大学基础医学院病理学教研室 湖南省长沙市 410078
胡忠良, 男, 1973-02-05 生, 湖南省衡山县人, 汉族. 1997 年湖南医科大学学士, 中南大学基础医学院病理学教研室在职博士生, 主要从事胃肠肿瘤研究. 项目负责人: 文继舫, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 88 号, 中南大学基础医学院病理学教研室. jifangwen@hotmail.com
电话: 0731-2650400 传真: 0731-2650400
收稿日期: 2003-07-15 接受日期: 2003-08-28

Effects of TGIF antisense oligonucleotide on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells

Zhong-Liang Hu, Ji-Fang Wen, Yang Liu, Kuan-Song Wang, Hui Zhen, Chun-Yan Fu

Zhong-Liang Hu, Ji-Fang Wen, Yang Liu, Kuan-Song Wang, Hui Zhen, Chun-Yan Fu, Department of Pathology, Basic Medical Institute, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Correspondence to: Ji-Fang Wen, Department of Pathology, Basic Medical Institute, Central South University, 88 Xiangya Road, Changsha 410078, Hunan Province, China. jifangwen@hotmail.com
Received: 2003-07-15 Accepted: 2003-08-28

Abstract

AIM: TGIF (TG interacting factor) can inhibit both TGF- β and retinoid signaling pathways, moreover, the activation of MAPK pathway can lengthen its half life. However, its role in carcinogenesis is still unclear. Thus we attempt to investigate the effect of TGIF antisense oligodeoxynucleotide (ASDON) on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells.

METHODS: After gastric carcinoma cells, SGC-7901, were transfected with TGIF ASDON, we analyzed the transfect efficiency by RT-PCR, its proliferation by MTT method, cell cycle and apoptosis rate via flow cytometer.

RESULTS: After transfection with TGIF ASDON, the proliferation of SGC-7901 cells was partially inhibited, and its inhibitory rate was increased to 20.4% at 72h, whereas it had no effect on cell cycle and apoptosis of SGC-7901 cells. Followed by the treatment of TGF- β 1, the growth rate of cells transfected with TGIF ASDON was distinctly reduced by 30%, and the content of G1 phase cells increased more obviously compared with the cells transfected with mutated oligonucleotides or untransfected cells.

CONCLUSION: TGIF can resist the negative regulation of TGF- β 1 over proliferation and cell cycle. Most of tumor cells and interstitial cells can secrete TGF- β 1, and tumor cells may resist the TGF- β 1 mediated growth inhibition via TGIF, leading to the progression and even metastasis of tumor.

Hu ZL, Wen JF, Liu Y, Wang KS, Zhen H, Fu CY. Effects of TGIF antisense oligonucleotide on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):530-532

摘要

目的: TGIF (TG interacting factor) 是 TGF- β 和视黄醛信号传导通路的抑制分子, 且 MAPK 通路的活化能延长其半衰期, 但他在肿瘤发生中的作用尚不清楚, 本研究旨在探讨 TGIF 反义寡核苷酸对胃癌细胞增生和凋亡的影响。

方法: 将 TGIF 反义寡核苷酸瞬时转染胃癌细胞株 SGC-7901, RT-PCR 检测转染效率, MTT 法检测胃癌细胞的增生速度, 流式细胞术分析转染细胞的细胞周期和凋亡率的变化。

结果: SGC-7901 细胞转染 TGIF 反义寡核苷酸后, 细胞增生受到部分抑制, 72h 后, 他的抑制率达 20.4%, 但细胞的凋亡和细胞周期分布无明显改变. TGF- β 1 处理后, 与突变寡核苷酸转染组细胞和未转染组细胞相比, TGIF 反义寡核苷酸转染的 SGC-7901 细胞的增生受到明显抑制 (30%), G1 期细胞含量增加更明显。

结论: TGIF 能抑制 TGF- β 1 对细胞生长和细胞周期的负调控作用, 多数肿瘤细胞和间质细胞能分泌 TGF- β 1, 这些肿瘤细胞有可能利用 TGIF 甚至少量 TGIF, 抑制 TGF- β 对自身的生长抑制作用, 从而促进肿瘤的发生、发展与转移。

胡忠良, 文继舫, 柳洋, 王宽松, 郑晖, 傅春燕. TGIF 反义寡核苷酸对胃癌细胞增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):530-532
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/530.asp>

0 引言

胃癌是一种严重威胁我国人民生命健康的常见肿瘤, 但其确切的发病机制尚不清楚^[1-8]. 目前国内外的研究均表明, 多数肿瘤丧失了 TGF- β 介导的生长抑制作用, 胃癌也不例外^[9]. TGIF (TG-interacting factor, TGIF) 能抑制 TGF- β 信号通路^[10-13]. MAPK 通路对 TGIF 的磷酸化使 TGIF 的半衰期延长, TGIF 蛋白浓度升高^[14]; 且 c-Jun 能增强 TGIF 与 smad2 的结合^[15]. TGIF 功能的增强可能抑制 TGF- β 对细胞的负性调节作用. 为探讨 TGIF 在肿瘤发生中的作用, 我们利用 TGIF 反义寡核苷酸转染胃癌细胞 SGC-7901, 观察他对该细胞增生和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞系 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞库, TGF- β 1 购自 Sigma 公司, TGIF 反义寡核苷酸和突变寡核苷酸参照文献 (Wotton D, et al, *Cell* 1999; 97:29-39) 由上海生物工程技术有限公司合成, 各

碱基均用硫代磷酸化法修饰. 脂质体 Lipofectin, Trizol 和 RPMI 1640 购自 Invitrogen 公司. 超级小牛血清购自杭州四季青公司, RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, TGIF 和 β -actin 扩增引物(表 1)由软件 Primer Premier 5.0 设计, 由上海生物工程技术服务有限公司合成.

1.2 方法 将细胞接种于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在含 50 mL/L CO_2 空气的饱和湿度培养箱 37℃ 连续培养. 实验用细胞均处于对数生长期. TGIF 反义寡核苷酸转染前 1 d, 接种 SGC-7901 细胞至 96 孔板中(3×10^3 个/孔)或 50 mL 培养瓶中(5×10^5 个/瓶)贴壁培养 18 h, 无血清培养基洗涤细胞 2 次, 转染按 lipofectin 说明书进行, 最终每孔或每瓶分别转染 0.5 或 5 μg 寡核苷酸, 实验共分 3 组, 即 TGIF 反义寡核苷酸转染组、突变寡核苷酸转染组和未转染组. 转染 6 h 后, 弃转染液. 无血清培养基洗涤细胞 2 次, 各组细胞换用正常培养液或含 TGF- β 1 (10 $\mu\text{g/L}$)的培养液继续培养. 按 Trizol 说明书提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的提取质量, 核酸分析仪测定 RNA 含量, 2 μg 总 RNA 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链. 再取 cDNA 2 μL 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 亚沸水 35.5 μL , 10 \times buffer 5 μL , MgCl_2 4 μL (25 mmol/L), dNTP 1 μL (200 $\mu\text{mol/L}$), 引物各 1 μL (0.1 $\mu\text{mol/L}$), Taq 酶 0.5 μL (2 Mu/L), 混匀后加入 50 μL 矿物油, 点离心. 95℃ 变性 10 min, 扩增 35 个循环(97℃ 50 s, 62℃ 90 s, 72℃ 90 s), 第 5 循环结束后, 加 β -actin 引物(0.1 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 继续扩增, 最后延伸 10 min. MTT 法检测细胞的增生速度换用正常培养液或含 TGF- β 1 (10 $\mu\text{g/L}$)的培养液培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 加 5 g/L 的 MTT 20 μL 于各组中(4 孔/组), 继续培养 4 h 后弃板中的培养液, 各孔加 DMSO 150 μL , 轻轻振动后用酶标仪(波长 490 nm)测定各孔的 A 值. 流式细胞术分析细胞周期和凋亡. 在换用正常培养液或含 TGF- β 1 (10 $\mu\text{g/L}$)的培养液培养 48 h 后, 0.2 g/L EDTA 和 2.5 g/L 胰酶消化并收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 750 mL/L 乙醇 4℃ 固定, 流式细胞仪测定各组细胞的 DNA 含量, Cell Quest 软件分析细胞群体的周期分布和凋亡.

2 结果

2.1 TGIF 反义寡核苷酸转染对 TGIF 表达的影响 经 RT-PCR 分析发现 SGC-7901 细胞转染 TGIF 反义寡核苷酸后, TGIF mRNA 表达明显减少(图 1), TGIF 反义寡核苷酸能抑制 TGIF 的表达.

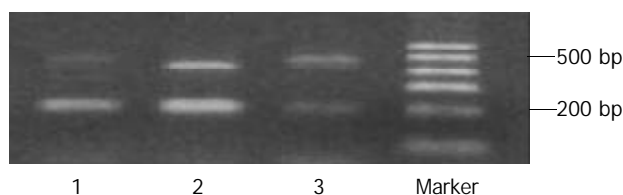


图 1 TGIF 反义寡核苷酸转染 SGC-7901 细胞 24 h 后 RT-PCR 分析. 1: TGIF 反义寡核苷酸; 2: 突变寡核苷酸; 3: 阴性对照; 前带 β -actin, 204 bp; 后带 TGIF, 420 bp.

表 1 TGIF 和 β -actin 的扩增引物序列

引物	序列	长度(bp)
TGIF	上游 5' -GAGAAGGAGAAGGGGCAACCTA-3'	420
	下游 5' -TGGCAGATCACTGATGGACG-3'	
β -actin	上游 5' -CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'	204
	下游 5' -GGAGCAATGATCTTGATCTT-3'	

2.2 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞生长的影响

TGIF 反义寡核苷酸转染细胞后, SGC-7901 细胞 24 和 48 h 的生长速度出现一定程度的抑制, 72 h 后, TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的生长抑制率达 20.4% (较未转染细胞)(图 2). TGF- β 1 处理后, 各组细胞生长速度均明显减慢(图 3), 且 TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的生长速度较突变组和未转染组明显减慢, 72 h 后, TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的生长抑制率达 30% (较未转染细胞).

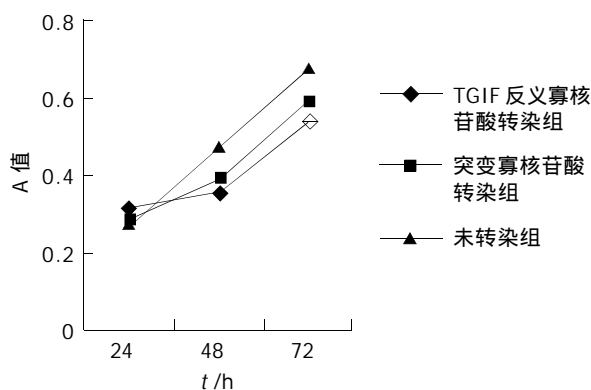


图 2 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞生长的影响.

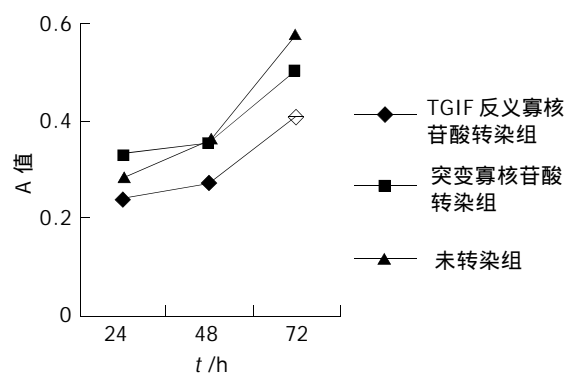


图 3 TGF- β 1 处理后, TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞生长的影响.

2.3 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞周期的影响

TGIF 反义寡核苷酸转染后, 流式细胞术分析 3 组细胞的细胞周期分布未见明显差别(表 2); TGF- β 1 处理后, TGIF 反义寡核苷酸转染组的 G1 期细胞含量由 49% 增加到 58%, 较未转染组和突变寡核苷酸转染组的 G1 期细胞含量增加更明显.

2.4 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

TGIF 反义寡核苷酸转染组与突变寡核苷酸转染组和未转染组 3 组间细胞凋亡率未见明显差别; TGF- β 1 处理

后, 各组细胞的凋亡率无明显差别.

表2 TGIF 反义寡核苷酸对细胞周期的影响

	反义TGIF转染组		突变寡核苷酸转染组		未转染组	
	TGF- β 1(+)	TGF- β 1(-)	TGF- β 1(+)	TGF- β 1(-)	TGF- β 1(+)	TGF- β 1(-)
G1	0.58	0.49	0.53	0.47	0.56	0.49
G2	0.08	0.11	0.9	0.14	0.08	0.13
S	0.34	0.40	0.38	0.39	0.36	0.39

3 讨论

众所周知, TGF- β 是一类能抑制上皮细胞生长的细胞因子, 肿瘤细胞常常逃逸 TGF- β 介导的生长抑制作用. TGIF 是 TGF- β 和视黄醛^[16]信号传导通路的抑制分子, Nakakuki et al^[17]发现在食管癌细胞系中有 TGIF 基因的扩增, Luo et al^[18]发现在卵巢癌患者的血清中存在针对 TGIF 的抗体. 他在肿瘤中的作用引起了我们的极大兴趣. 我们推测 TGIF 反义寡核苷酸可能通过拮抗 TGIF 对 TGF- β 和视黄醛信号传导通路的抑制作用, 从而部分逆转胃癌细胞的生物学行为. 但 TGIF 反义寡核苷酸转染 SGC-7901 细胞后, 他的生长速度无明显减慢, 细胞周期分布也无明显改变, 这可能是由于 SGC-7901 细胞在缺乏外源性 TGF- β 1 时, TGF- β 信号通路处于未激活状态所致. 他同时提示我们反义 TGIF 可能不能逆转胃癌细胞的恶性生长特点.

TGF- β 1 作用后, TGIF 反义寡核苷酸组细胞较突变组和未转染组细胞的生长速度明显减慢, 流式细胞术分析也表明 TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的 G1 期细胞含量较突变寡核苷酸组和未转染组明显增多. Lo et al^[14]的研究报道与我们的结果一致, 他利用碘化脱氧尿嘧啶吸收试验, 发现稳定转染 TGIF 基因的 HaCaT 细胞能拮抗 TGF- β 介导的生长抑制作用.

乔文 et al^[19]发现 TGF- β 1 能明显诱导 SGC-7901 细胞的凋亡, 但我们多次流式细胞分析均表明 TGF- β 1 不能明显诱导 SGC-7901 细胞的凋亡. TGIF 反义寡核苷酸转染后, 胃癌细胞的凋亡没有明显改变; TGF- β 1 作用后, 他的凋亡率也无明显改变. 这很可能是由于 SGC-7901 细胞本身对 TGF- β 1 介导的细胞凋亡不敏感, 导致 TGIF 反义寡核苷酸不能通过拮抗 TGIF 而增强 TGF- β 对该细胞的凋亡诱导作用. TGIF 是否能抑制 TGF- β 诱导的细胞凋亡作用有待进一步的研究.

因此, 我们在胃癌细胞 SGC-7901 中证明 TGIF 不能抑制他的增生和诱导他的凋亡, 但能抑制 TGF- β 对该细胞生长和细胞周期的负调控作用, 最近, Chen et al^[20]发现 TGF- β 能诱导 TGIF mRNA 表达上调. 有趣的是: 多数肿瘤细胞和间质细胞能分泌 TGF- β , 这些肿瘤细胞有可能利用 TGIF 甚至少量 TGIF, 抑制 TGF- β 对自身的

生长抑制作用, 从而促进肿瘤的发生与发展, 甚至导致肿瘤的转移.

4 参考文献

- 于君, 沈祖尧. 幽门螺杆菌感染所致胃黏膜分子生物学行为改变在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:499-502
- 房殿春. 基因不稳定性在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1-5
- 孙喜文, 申宝忠, 石美森, 戴旭东. CD44v6 基因表达与胃癌危险因素的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1129-1132
- Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:899-904
- 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
- Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG, Zhang YC, Xin Y. Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003;9:1662-1666
- 万顺梅, 孙少华, 邓明德, 葛勤利, 杨玉捷. 胃癌组织中转化生长因子和血小板源生长因子表达的意义. 世界华人消化杂志 2002;10:36-39
- Wieser R. The transforming growth factor-beta signaling pathway in tumorigenesis. *Curr Opin Oncol* 2001;13:70-77
- Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999;97:29-39
- Melhuish TA, Wotton D. The interaction of the carboxyl terminus-binding protein with the Smad corepressor TGIF is disrupted by a holoprosencephaly mutation in TGIF. *J Biol Chem* 2000;275:39762-39766
- Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, Massague J. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 2001;12:457-463
- Wotton D, Lo RS, Swaby LA, Massague J. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 1999;274:37105-37110
- Lo RS, Wotton D, Massague J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20:128-136
- Pessah M, Prunier C, Marais J, Ferrand N, Mazars A, Lallemand F, Gauthier JM, Atfi A. c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6198-6203
- Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 1995;270:31178-31188
- Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2002;23:19-24
- Luo LY, Herrera I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer* 2002;87:339-343
- 乔文, 胡家露. 转化生长因子 β 对胰腺癌细胞凋亡诱导的研究. 解放军医学杂志 1997;22:338-340
- Chen F, Ogawa K, Nagarajan RP, Zhang M, Kuang C, Chen Y. Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. *Biochem J* 2003;371(Pt 2):257-263

中药复方胃康宁对人胃癌细胞VEGF及其受体表达的作用

闵存云, 李庆明, 吴伟康

闵存云, 李庆明, 吴伟康, 中山大学中西医结合研究所 广东省广州市 510120
闵存云, 男, 1970-05-09 生, 云南省陆良县人, 汉族. 中山大学博士生, 主要从事消化系统疾病的临床及实验研究.

项目负责人: 闵存云, 510120, 广东省广州市沿江西路 107 号, 中山大学中西医结合研究所. drmincunyun888@yahoo.com.cn

电话: 020-81332037 传真: 020-81332853

收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

Effect of Chinese medicine Weikangning on expression of VEGF and its receptors Flt and KDR in gastric carcinoma cells

Cun-Yun Min, Qing-Ming Li, Wei-Kang Wu

Cun-Yun Min, Qing-Ming Li, Wei-Kang Wu, The Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Correspondence to: Cun-Yun Min, The Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-Sen University, 107 Yianjiang Xilu, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. drmincunyun888@yahoo.com.cn

Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

Abstract

AIM: To study effect of traditional Chinese medicine Weikangning (WKN) on the expression of VEGF and its receptors Flt and KDR in gastric carcinoma cells.

METHODS: We used different dosage of WKN on rats to prepare serum containing WKN. The gastric carcinoma cells were cultured in the RPMI1640 media with serum containing WKN for 48 hours. The expression of VEGF, Flt-1 and KDR was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry in gastric cancer cell lines respectively.

RESULTS: All gastric cancer cell lines analyzed expressed VEGF Flt-1 and KDR. But the expression of fVEGF (186.82 ± 0.22 , 195.35 ± 0.45 , 172.62 ± 0.52), Flt-1 (198.44 ± 0.44 , 188.66 ± 0.46 , 197.01 ± 0.91) in cells cultured in serum containing WKN decreased in a dose-dependent manner as compared with control (VEGF 162.78 ± 0.58 , Flt: 172.65 ± 0.65) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: VEGF and its receptors KDR and Flt-1 are expressed widely in gastric carcinoma cells and WKN can inhibit their expression.

Min CY, Li QM, Wu WK. Effect of Chinese medicine Weikangning on expression of VEGF and its receptors Flt and KDR in gastric carcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):533-536

摘要

目的: 研究胃癌细胞血管内皮生长因子(VEGF)及其受体 Flt、KDR 的表达与中药胃康宁的调控作用.

方法: 以不同剂量的中药复方胃康宁制剂给SD大鼠灌胃制备含药血清, 然后以含药血清培养胃癌细胞, 共同培养两代后, 分别用免疫组化法和RT-PCR检测不同剂量组胃癌细胞中 VEGF 及其受体 Flt、KDR 的表达情况.

结果: 与对照组(VEGF 162.78 ± 0.58 , Flt: 172.65 ± 0.65)相比, VEGF及其受体Flt在用药组胃癌细胞中的表达减弱, 染色变浅(VEGF: 186.82 ± 0.22 , 195.35 ± 0.45 , 172.62 ± 0.52 , Flt: 198.44 ± 0.44 , 188.66 ± 0.46 , 197.01 ± 0.91 , $P < 0.05$), 并且与用药剂量有一定的关系; VEGF mRNA及其受体 Flt mRNA、KDR mRNA在用药组胃癌细胞中的表达也受到抑制.

结论: 中药胃康宁对胃癌细胞血管内皮生长因子及其受体 Flt、KDR 的表达有抑制作用.

闵存云, 李庆明, 吴伟康. 中药复方胃康宁对人胃癌细胞 VEGF 及其受体表达的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(3):533-536

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/533.asp>

0 引言

恶性肿瘤生长的基础是肿瘤组织内血管的再生^[1-5], 肿瘤细胞分泌的生长因子可调节肿瘤组织内血管的再生^[6-9]. 此外, 肿瘤细胞分泌的生长因子对肿瘤细胞本身的生长也存在一定的作用. 在这些生长因子之中, 血管内皮生长因子(VEGF)的作用最引人注目^[10]. 我们通过观察 VEGF 及其受体 Flt, KDR 在胃癌细胞中的表达与中药胃康宁的调控作用, 探讨中医中药对胃癌的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol、PCR 试剂盒均为 GIBCO 公司产品. VEGF 及其受体 Flt 的抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色液由博士德公司提供. MGC-803 胃癌细胞株和 Wistar δ 大鼠, 清洁级, 由中山大学实验动物中心提供. 中药胃康宁由党参、半枝莲、五灵脂等组成. 用各种药物的颗粒剂(由江苏省江阴制药厂提供), 分别制成 1 kg 生药/L 及 2 kg 生药/L 浓度, 加防腐剂苯甲酸(1 g/L)、4℃冷藏保存, 供大鼠灌胃、制备含药血清之用. 胃康宁含药血清制备: Wistar δ 大鼠, 清洁级, 质量 120-150 g, 共 120 只, 随机分为 4 组. 低剂量组按生药 5 g/kg, 中剂量组按 10 g/kg, 高剂量组按 20 g/kg 灌胃, 对照组给予相同体积的生理盐水, 1 次/d, 连灌 1 wk. 末次灌药后 1 h 在无菌条件下自腹主动脉采血, 1 700 r/min 离心

制备含药血清: 将所采各组动物血清分别混合, -70°C 冷藏备用, 临用前需 56°C 灭活 30 min.

1.2 方法 复苏 MGC-803 胃癌细胞株, 体外传代培养, 待培养瓶底铺满胃癌细胞后, 弃去培养液, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化胃癌细胞, 用新鲜含 100 ml/L 小牛血清 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{L}$. 设空白对照组、正常大鼠血清对照组、胃康宁含药血清高、中、低剂量实验组共 5 组. 共同培养两代后进行检测. 将胃癌细胞按 $1 \times 10^5/\text{L}$ 的密度均匀接种于培养瓶中, 共同培养两代后, 用免疫组化法检测 VEGF 及其受体 Flt, 采用 SABC 试剂盒, 按说明书进行操作. 结果采用德国 KONTRON IBAS2.0 全自动图像处理系统进行定量分析. 胃癌细胞内总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍 - 酚一步法, 采用 GIBCO 公司的 TRIzol, 按说明书进行操作. 提取后的 RNA 于 -70°C 冰箱保存备用. 参照人 VEGF, KDR, FLT-1 mRNA 的序列设计引物, 上海博亚生物技术公司合成, 引物序列: VEGF 正向引物为 $5' \text{ TTGCTGCTC TACCTCCAC3'}$, 反向引物为 $5' \text{ AATGCTTTCTCCGCTC TG3'}$, FLT-1 正向引物为 $5' \text{ CAA GTG GCC AGA GGC ATG GAG TT 3'}$, 反向引物为 $5' \text{ GAT GTA GTC TTT ACC ATC CTG TTG3'}$, KDR 正向引物为 $5' \text{ GAG GGC CTC TCA TGG TGA TTG T3'}$, 反向引物为 $5' \text{ TGC CAG CAG TCC AGC ATG GTC TG3'}$, β -actin 正向引物为 $5' \text{ CTAYYGGCAACGAGCGGTTC3'}$, 反向引物为 $5' \text{ CTTAGGAGTGGGGTGGCTT3'}$, VEGF 的反应条件为: 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环, 72°C 延伸 7 min; Flt, KDR 的反应条件为: 95°C 2 min, 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环, 72°C 延伸 7 min. PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后拍照, 并用全自动图像处理系统分别测量电泳条带的面积 (AREA)、平均吸光度 (OPTDM) 及二者的乘积 (OPTDI) 进行定量分析. 试验中分别设立空白对照和各样本的 β -actin 对照.

统计学处理 检测结果用 SPSS 软件进行统计学分析.

2 结果

2.1 VEGF 及其受体 Flt 的表达 所有胃癌细胞中均可见 VEGF 和 Flt 表达, 但与对照组相比, 用药组胃癌细胞中 VEGF 和 Flt 的表达减弱, 并且与用药剂量相关 (表 1, 图 1).

表 1 胃癌细胞 VEGF 及其受体 Flt 表达的灰度值 (mean \pm SD)

分组	VEGF	Flt
高剂量组	186.82 \pm 0.22 ^b	198.44 \pm 0.44 ^b
中剂量组	195.35 \pm 0.45 ^b	188.66 \pm 0.46 ^b
低剂量组	172.62 \pm 0.52 ^b	197.01 \pm 0.91 ^b
血清组	165.11 \pm 0.65	177.68 \pm 0.48
对照组	162.78 \pm 0.58	172.65 \pm 0.65

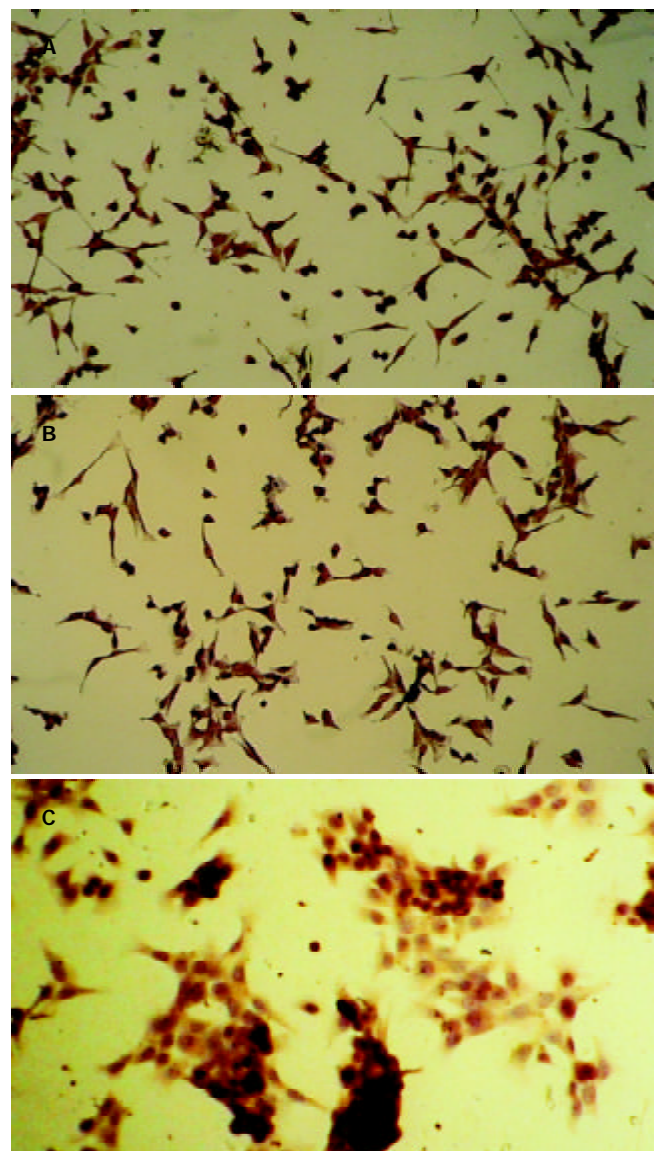
^bP < 0.01 vs 对照组.

2.2 胃康宁对 VEGF, Flt, KDR mRNA 表达的影响 所有胃癌细胞中均可见 VEGF、Flt 和 KDR mRNA 表达, 但与对照组相比, 用药组胃癌细胞中 VEGF, Flt 和 KDR mRNA 的表达相对减弱, 并且与用药剂量有一定的关系 (表 2, 图 2).

表 2 胃康宁对 VEGF 及其受体 KDR、Flt mRNA 表达的影响

指标		对照组	血清组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
VEGF	AREA	297	261	192 ^{bd}	134 ^{bd}	120 ^d
	OPTDM	0.17	0.152	0.14 ^{bd}	0.107 ^{bd}	0.072 ^d
	OPTDI	50.8	39.555	25.9 ^{bd}	14.4 ^{bd}	8.6 ^d
Flt	AREA	306	271	247 ^{bd}	197 ^{bd}	111 ^d
	OPTDM	0.41 ^c	0.368	0.34 ^{bd}	0.275 ^{bd}	0.061 ^d
	OPTDI	124.5	99.6	84.0 ^{bd}	54.3 ^{bd}	6.8 ^d
KDR	AREA	408	272	239 ^{bd}	178 ^{bd}	79 ^d
	OPTDM	0.282	0.237	0.162 ^{bd}	0.15 ^{bdd}	0.112 ^d
	OPTDI	115.2	35.8	44.2 ^{bd}	19.9 ^{bd}	18.8 ^d

^dP < 0.01 vs 对照组; ^bP < 0.01 vs 高剂量组.



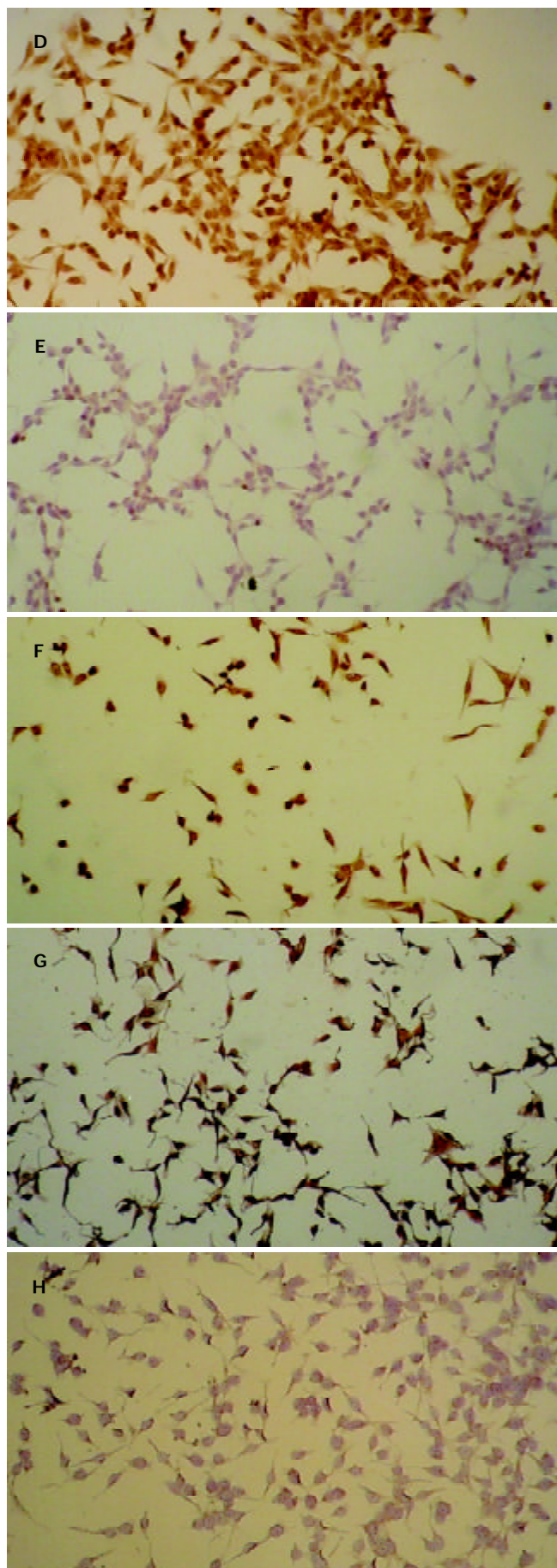


图1 各组免疫组化图. A: VEGF 高剂量组(10×40); B: VEGF 中剂量组(10×40); C: VEGF 低剂量组(10×40); D: Flt 高剂量组(10×40); E: Flt 中剂量组(10×40); F: Flt 低剂量组(10×40); G: VEGF 正常对照组(10×40); H: Flt 正常对照组(10×40).

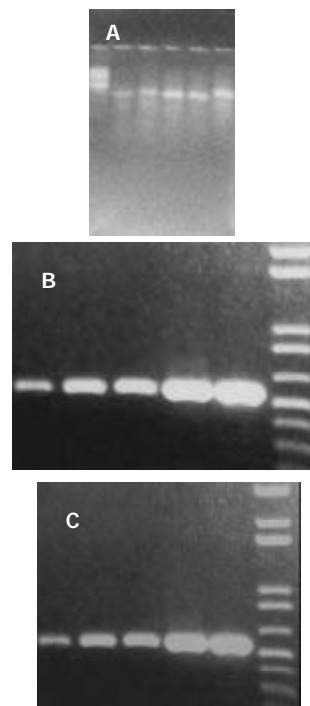


图2 各组电泳图. A: VEGF 图中自左至右分别为: Marker, 高剂量组, 中剂量组, 低剂量组, 血清对照组, 正常对照组; Bnt 图中自左至右分别为: 高剂量组, 中剂量组, 低剂量组, 血清对照组, 正常对照组, Marker.

3 讨论

血管内皮生长因子(VEGF)是肿瘤细胞系中的一种新型生长因子,他特异性地作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞增生.对原位肿瘤的形成和生长以及转移瘤的形成中起着十分重要的作用^[1-4]. VEGF 在胃癌细胞中广泛表达^[10-13], VEGF 促进血管的形成是胃癌发生浸润、转移的机制之一^[14-16], VEGF-C 和 VEGF-D 的表达更是胃癌细胞淋巴结转移的重要标志^[17-19]. VEGF的水平不仅与胃癌的预后有关,更与治疗效果密切相关^[20-22].近年的一些研究显示, VEGF 还具有旁分泌作用^[23]. 抗 VEGF mAb 能抑制肿瘤的生长和转移,反义 VEGF mRNA 通过和 VEGF mRNA 核苷酸碱基互补结合,抑制 VEGF 的翻译过程,并促进 VEGF mRNA 的降解从而可以抑制 VEGF 的表达与分泌^[24]. VEGF 受体 Flt-1 结合小肽能与入脐静脉内皮细胞、肿瘤细胞结合,抑制新生血管的形成,促进肿瘤组织坏死及显著抑制肿瘤生长^[25].

近年对中医中药的研究表明,健脾益气类中药及复方既可提高胃癌患者的免疫功能、改善其生存质量,又可增强抗肿瘤药物的疗效,降低其毒副作用^[26]. 而健脾益气,活血化瘀的中药复方则具有诱导和促进肠化细胞、异型增生细胞分化成熟,抑制和纠正细胞的异常增生及保护胃黏膜作用^[27]. 崔儒涛^[28]用具有健脾,活血,解毒作用的乐胃煎治疗以 MNNG 诱导的大鼠胃癌模型则发现,该方可抑制 Bcl-2 基因表达,而促进 Fas 基因表达,使胃黏膜细胞发生正常凋亡,逆转或阻止胃癌发生. 紫杉醇在诱导胃癌细胞凋亡的同时可使端粒酶的活性下降,而且呈时间依赖性和剂量依赖性^[29]. 姜黄素诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡的作用也呈现出时间

依赖性和剂量依赖性^[30]。人参挥发油可抑制体外培养的SGC-823胃癌细胞糖代谢和能量代谢,进而抑制核酸代谢抑制胃癌的生长^[31]。目前在研究的药物还有大蒜油^[32],甘草提取物、虫草、黄今提取物、海浮石中的硅酸盐、水蛭、丹参、没食子丙酸、砒霜等^[33-34]。我们先前的实验结果表明,中药胃康宁示仅可抑制胃癌的生长,还能抑制胃癌组织中P53, VEGF等的表达^[35-36]。本实验的结果表明,体外培养的各用药组胃癌细胞VEGF及其受体KDR、Flt免疫组化检测图像的灰度值均增加,与对照组比较差异具有显著性($P < 0.01$),而各用药组VEGF及其受体KDR、Flt mRNA的表达则减弱($P < 0.01$),说明胃康宁对VEGF及其受体KDR、Flt基因的表达具有明显的抑制作用,并存在一定的量效关系。同时也说明了中药对胃癌的治疗作用是多靶点、多层次的,既作用于相关的基因,又作用于相应的蛋白和受体。

4 参考文献

- Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Baba H, Sugimachi K. Tumor growth patterns and biological characteristics of early gastric carcinoma. *Oncology* 2001;61:102-112
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003;22:773-778
- Keyes KA, Mann L, Cox K, Treadway P, Iversen P, Chen YF, Teicher BA. Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex Multiplex technology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:321-327
- Duff SE, Li C, Jeziorska M, Kumar S, Saunders MP, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer* 2003;89:426-430
- Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001;61:2145-2153
- Ikeguchi M, Cai J, Fukuda K, Oka S, Katano K, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Correlation between spontaneous apoptosis and the expression of angiogenic factors in advanced gastric adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:257-263
- Huang SP, Wu MS, Wang HP, Yang CS, Kuo ML, Lin JT. Correlation between serum levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1165-1169
- Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ, Zhang YQ, Huang QS, Ma WY, Chai YB, Jin M. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:500-505
- Tao HQ, Lin YZ, Wang RN. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4:10-13
- Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:596-601
- Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- Fabbri C, Jaboli MF, Giovanelli S, Azzaroli F, Pezzoli A, Accogli E, Liva S, Nigro G, Miracolo A, Festi D, Colecchia A, Montagnani M, Roda E, Mazzella G. Gastric autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before, during and after interferon-alpha therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9:1487-1490
- Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002;38:1413-1419
- Takahashi A, Kono K, Itakura J, Amemiya H, Feng Tang R, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology* 2002;62:121-127
- Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:21-27
- Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci* 2003;94:43-49
- Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- Kimura H, Konishi K, Nukui T, Kaji M, Maeda K, Yabushita K, Tsuji M, Miwa A. Prognostic significance of expression of thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;76:31-36
- Li HH, Wang XC, Lu JR, He KJ, Yang Z. Effects of short-term treatment of somatostatin on angiogenesis of gastric carcinoma. *Ai Zheng* 2003;22:990-993
- Basaki Y, Chikahisa L, Aoyagi K, Miyadera K, Yonekura K, Hashimoto A, Okabe S, Wierzba K, Yamada Y. Gamma-Hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2001;4:163-173
- Keyes KA, Mann L, Cox K, Treadway P, Iversen P, Chen YF, Teicher BA. Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex Multiplex technology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:321-327
- Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:505-512
- Broggini M, Marchini SV, Galliera E, Borsotti P, Tarabozetti G, Erba E, Sironi M, Jimeno J, Faircloth GT, Giavazzi R, D'Incalci M. Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. *Leukemia* 2003;17:52-59
- Penault-Llorca F, Etessami A, Bourhis J. Principal therapeutic uses of monoclonal antibodies in oncology. *Cancer Radiother* 2002;6(Suppl 1):24s-28s
- 赵群, 李勇, 王力利. 参芪扶正注射液对胃癌患者手术及化疗时免疫功能的影响. *中国中西医结合杂志* 2001;21:424-426
- 单兆伟, 陆为民. 胃舒胶囊治疗萎缩性胃炎癌前病变气虚血瘀证临床与实验研究. *中医杂志* 2001;42:539-542
- 崔儒涛, 程勇. 乐胃煎对大鼠胃黏膜上皮异型增生细胞凋亡及调控基因的影响. *中西医结合脾胃杂志* 2000;8:67-69
- 朱菊人, 刘吉勇, 许洪伟. 紫杉醇诱导胃癌细胞凋亡及对端粒酶活性调节的关系. *临床消化病杂志* 2001;13:243-245
- 叶红军, 吴运, 房家智. 刺五加皂甙对胃癌细胞膜电位和亚细胞结构的影响. *中华消化杂志* 2002;22:48-49
- 赵军宁, 王晓东, 彭晓华. 姜黄素诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡. *中药药理与临床* 2000;16:12-13
- 王懋霞, 李凤文, 李晓光. 人参挥发油对体外培养 SGC-823 胃癌细胞化学成分的影响. *中国中药杂志* 1992;17:110-112
- 李晓光, 谢锦玉, 李文梅. 大蒜油诱导人胃癌细胞分化和凋亡的机制研究. *中华肿瘤杂志* 1998;20:325
- 马靖, 彭文烈, 梁东. 甘草提取物诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡的初步研究. *中国中西医结合杂志* 2000;20:928
- 李庆明, 余谦, 曾敬, 吴伟康. 胃康宁对大鼠胃癌 VEGF 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:359-360
- 李庆明, 余谦, 闵存云. P53 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:997-1000

长春新碱诱导人胃癌耐药细胞表达 P - 糖蛋白由核因子 - κ B 活化调控

王 维, 罗和生

王维, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
王维, 女, 1976-02-14 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 武汉大学人民医院消化内科博士生.
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. luotang@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041911-2134
收稿日期: 2003-09-18 接受日期: 2003-10-27

Involvement of NF-kappa B activation in P-glycoprotein expression in vincristine-resistant human gastric cancer cells

Wei Wang, He-Sheng Luo

Wei Wang, He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luotang@public.wh.hb.cn
Received: 2003-09-18 Accepted: 2003-10-27

Abstract

AIM: To investigate the effect of vincristine on activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and expression of p-glycoprotein (P-gp) in vincristine-resistant human gastric cancer SGC7901 cells (SGC7901/VCR) and the parent sensitive clone (SGC7901).

METHODS: NF- κ B-DNA binding activity was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Levels of inhibitory κ B (I κ B- α) and P-gp were measured by cellular-ELISA. And immunocytochemistry was used to detect the translocation of P65.

RESULTS: IN comparison with the parent SGC7901 cells, the basal and vincristine-induced NF- κ B-DNA binding activity at various concentrations were all higher in the SGC7901/VCR cells. Concurrent with the NF- κ B activation, vincristine-induced I κ B- α degradation and P-gp upregulation were also found to be highly enhanced in the SGC7901/VCR cells than that in the sensitive SGC7901 cells. In the SGC7901/VCR cells, the activation of NF- κ B induced by vincristine showed a positive relation with the level of P-gp expression ($r=0.977$, $P<0.01$). And nuclear translocation of P65 occurred concomitantly with NF- κ B activation. Furthermore, the inhibition of NF- κ B by MG-132, a proteasome inhibitor, could reduce NF- κ B activation, I κ B- α degradation and P-gp upregulation.

CONCLUSION: The enhancement of NF- κ B activation correlates with vincristine resistance and NF- κ B may play an important role in the regulation of the P-gp expression.

Wang W, Luo HS. Involvement of NF-kappa B activation in P-glycoprotein expression in vincristine-resistant human gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):537-541

摘要

目的: 研究核因子 - κ B (NF- κ B) 在胃癌长春新碱耐药细胞中的活化情况, 及其对细胞膜 P - 糖蛋白 (P-gp) 表达的调控作用。

方法: 以胃癌细胞 SGC7901 及其长春新碱 (VCR) 耐药株 SGC7901/VCR 为研究对象. 采用凝胶电泳迁移率分析检测 NF- κ B DNA 结合活性, 细胞 - ELISA 法检测细胞内 I κ B- α 蛋白和细胞膜 P - 糖蛋白 (P-gp) 的表达, 免疫细胞化学法观测细胞内 P65 核转位。

结果: SGC7901/VCR 耐药细胞中 NF- κ B 的基础活性比敏感细胞高 1.4 倍. 不同浓度 VCR (5, 10, 20, 50 μ g/L) 均可引起耐药细胞 NF- κ B DNA 结合活性增强、I κ B- α 蛋白表达下降和 P-gp 表达增强, 而亲本敏感细胞产生的上述效应均不及耐药细胞明显; SGC7901/VCR 耐药细胞中, NF- κ B 活性与 P-gp 的表达呈正相关 ($r=0.977$, $P<0.01$), 且 NF- κ B 活化的同时伴有 P65 核转位. NF- κ B 抑制剂 MG-132 可抑制 VCR 诱导的 NF- κ B 活化及 I κ B- α 降解, 同时还能抑制 P-gp 高表达。

结论: 胃癌长春新碱耐药细胞中 NF- κ B 活性增强, 可能参与调控 VCR 诱导的细胞膜 P-gp 高表达。

王维, 罗和生. 长春新碱诱导人胃癌耐药细胞表达 P - 糖蛋白由核因子 - κ B 活化调控. 世界华人消化杂志 2004;12(3):537-541
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/537.asp>

0 引言

肿瘤细胞耐药的形成与细胞膜 P - 糖蛋白 (P-gp) 过度表达、DNA 修复系统异常、凋亡信息抑制等有关. 核因子 - κ B (NF- κ B) 成员可调控免疫和炎症基因的表达, 在机体防御中发挥重要作用^[1-3], 而且, 在多种肿瘤中有 NF- κ B 组成性活化^[4-7], 他还参与细胞增生、凋亡、恶性转化和血管形成^[8-11]. NF- κ B 信号转导途径在保护细胞免受抗癌药物诱导的凋亡中发挥关键作用^[12]. 另外, 人 *mdr1* 基因 (编码 P-gp) 上存在 NF- κ B 结合位点^[13], 提示 NF- κ B 还可通过调节 P-gp 的表达参与形成耐药. 目前 NF- κ B 和耐药相关性的研究多集中于淋巴

造血组织肿瘤,而实体瘤,特别是胃癌耐药与 NF- κ B 关系的研究极少。我们通过研究长春新碱(vincristine, VCR)对人胃癌细胞 SGC7901 及相应多药耐药细胞 (SGC7901/VCR)NF- κ B DNA 结合活性的影响和P-gp上调的核转录机制,探讨 NF- κ B 在胃癌耐药形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC7901 购自中国科学院上海细胞生物研究所,相应多药耐药细胞株 SGC7901/VCR由第四军医大学全军消化病研究所惠赠。VCR购自上海华联制药有限公司;MG-132购自 Alexis 公司;二甲基亚砜(DMSO)和多聚甲醛(PFA)购自 Sigma 公司;Gel Shift Assay System 试剂盒、NF- κ B 双链寡核苷酸探针和G-25层析柱购自 Promega 公司; [γ - 32 P]ATP(111PBq/mol)购自北京亚辉生物医学工程公司;小鼠抗人 NF- κ Bp65 单抗和兔 κ B- α 多抗购自 Santa Cruz 公司;小鼠抗人 P-gp 单抗购自 NeoMarkers 公司,HRP 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗购自 Vector 公司;SP 染色试剂盒购自北京中山技术有限公司。

1.2 方法 两种细胞常规培养于含 100 ml/L 新生牛血清的 RPMI1640 培养液中,其中耐药细胞培养液中加入 VCR 0.7 mg/L 以维持耐药表型,并在无药条件下培养 7 d 后进行各项检测。细胞接种培养 36-40 h 后加药, VCR 组以不同浓度 VCR(5, 10, 20, 50 μ g/L)作用细胞 6 h;抑制剂组以 MG-132 (2.5 μ mol/L, 溶于 DMSO)预处理细胞 30 min,再加 10 μ g/L VCR 共同作用 6 h;同时设立不加药物的空白对照组和 DMSO 溶剂组。凝胶电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)。收集 5×10^6 细胞,参照文献[Nucleic Acids Res 1989; 17: 6419]的方法,用碱性低渗裂解液 A 和 B 分别裂解细胞膜和核,低温高速离心(14 000 g),含核蛋白的上清保存于 -80 $^{\circ}$ C,由紫外分光光度计定其浓度;EMSA 检测 NF- κ B 的 DNA 结合活性参照试剂盒内说明书进行。用 [γ - 32 P]ATP 以 T₄ 寡核苷酸激酶法对 NF- κ B 探针末端标记。未标记探针经 G-25 层析柱离心除去。蛋白-DNA 结合反应体系含有 8 μ g 核蛋白, $5 \times$ 凝胶结合缓冲液和无核酶水,总体积 9 μ L,室温下孵育 10 min 后加入标记探针 1 μ L,继续孵育 20 min。反应产物经 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 1 h, -70 $^{\circ}$ C 曝光 24 h,常规方法显影。显影带通过激光扫描仪(Typhoon9200 型,瑞典安玛西亚公司)扫描成像后用 Imagequant 软件分析各带的相对放射性强度;凝胶迁移率特异性竞争抑制实验,EMSA 中设两组竞争性对照,分别为特异性和非特异性竞争抑制实验,前者在反应体系之中加入 100 倍未标记的特异性 NF- κ B 探针,后者加入 100 倍未标记的非特异性 AP-2 探针,室温孵育 10 min 后加入标记探针,以后步骤同 2;超迁移分析(super shift assay)的结合反应体系中加入 NF- κ Bp65 单抗 0.8 μ g,室温孵育 30 min 后加入标记探针,以后步骤同 2。细胞酶联免疫黏附法(Cellular-ELISA)测定 κ B- α 蛋白和 P-糖蛋白:接种细

胞于 96 孔培养板,实验组和对照组条件同 EMSA,每个时相点设 3 个复孔,按 Parnas et al (Brain Res Protoc 1998;2: 333)的方法测定。简言之,细胞经 40 g/L PFA 固定后,封闭液(含 50 ml/L 山羊血清和 10 ml/L 牛血清白蛋白)孵育 30 min,依次加入一抗(37 $^{\circ}$ C 作用 2 h)、酶标二抗(37 $^{\circ}$ C 作用 1 h)、底物(四甲基联苯胺 +H₂O₂, 室温暗处作用 1 h),2 mol/L 硫酸中止反应,490 nm 处测吸光度 A 值。实验结束后在倒置显微镜下计数各孔细胞数,以校正 A 值。免疫细胞化学检测 NF- κ B P65 核转位:细胞接种于无菌盖玻片,干预结束后 40 g/L PFA 固定 3 min,冷 PBS 漂洗两次,染色步骤参照 SP 试剂盒说明书,其中 P65 单抗稀释度为 1:50,4 $^{\circ}$ C 过夜,最后 DAB 显色,苏木素复染。染成棕黄色为阳性,观察阳性着色部位。

统计学处理 由 SPSS 统计软件处理,用均数 \pm 标准差表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 NF- κ B DNA 结合活性和表达 VCR 处理前,SGC7901 和 SGC7901/VCR 均存在一定 NF- κ B 基础活性,且耐药细胞比敏感细胞高 1.4 倍;以 5, 10, 20, 50 μ g/L VCR 作用两种细胞各 6 h,均可引起 NF- κ B 的 DNA 结合活性增强,且在一定范围内呈剂量依赖性。与敏感细胞未加药组相比,VCR 诱导敏感细胞 κ B 活性上升 0.7-3.8 倍,而耐药细胞上升 2.1-5.4 倍,且相同浓度 VCR 作用下,耐药细胞 κ B 的活化程度均较敏感细胞高。耐药细胞在 20 μ g/L VCR 时 κ B 活性最强,敏感细胞的 κ B 活性在 50 μ g/L 时才达到高峰。竞争性抑制实验中,100 倍未标记的 NF- κ B 探针能抑制滞后带的产生,而无关探针 AP-2 对滞后带无明显影响,证实 EMSA 检测的特异性。超迁移试验中,加入 0.8 μ g 抗 P65 单抗后,电泳滞后带变淡且更为滞后,证实转位入核的 NF- κ B 至少含有 P65 亚单位(图 1)。不同浓度 VCR 作用 6 h 时,两种细胞的 κ B- α 蛋白表达基本呈浓度依赖性递减,且敏感细胞中的表达程度较耐药细胞高(图 2),其中 0, 5, 10, 20 μ g/L VCR 作用下两种细胞 κ B- α 蛋白的表达差异有统计学意义(P < 0.05)。

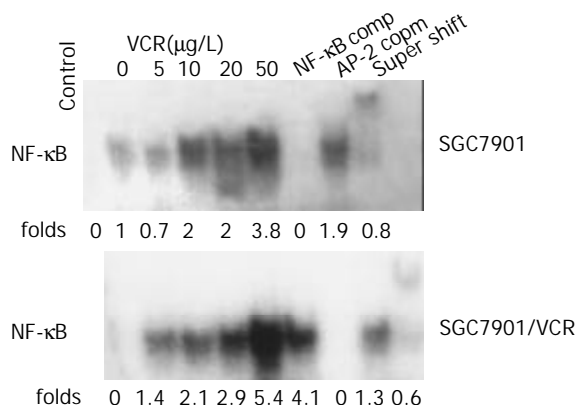


图 1 VCR 对 SGC7901 和 SGC7901/VCR 细胞 NF- κ B DNA 结合活性的影响。Control: 未加核蛋白的阴性对照; NF- κ B comp: 加入 100 倍未标记 NF- κ B 探针; AP-2 comp: 加入 100 倍未标记 AP-2 探针; Super shift: 加入 0.8 μ g P65 单抗; 敏感细胞未加药组设为 1。

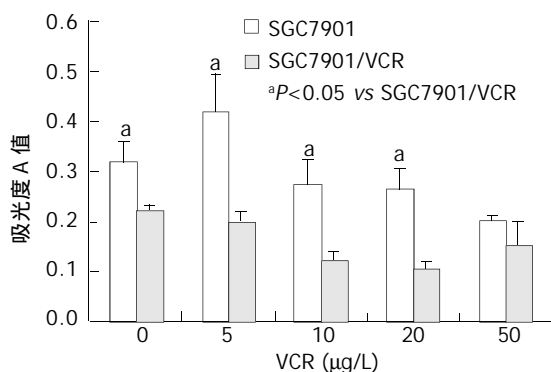


图2 VCR作用6 h对SGC7901和SGC7901/VCR细胞P-gp表达的影响。

2.2 P-糖蛋白(P-gp)的表达 无VCR刺激时, SGC7901和SGC7901/VCR细胞均存在一定程度的P-gp基础表达, 且耐药细胞比敏感细胞高1.41倍; 不同浓度VCR作用24 h时, 耐药细胞P-gp表达水平均较亲本敏感细胞高, 其中0, 10, 20, 50 μg/L时两种细胞P-gp的表达差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。

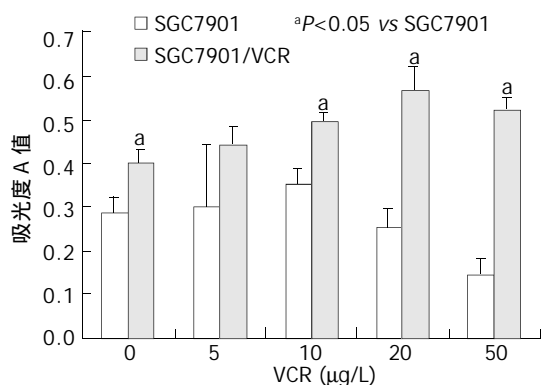


图3 VCR作用24 h对P-gp表达的影响。

2.3 NF- κ B活性与P-gp表达的联系 不同浓度VCR作用6 h时, SGC7901/VCR耐药细胞中NF- κ B活性与P-gp的表达呈正相关($r = 0.977$, $P < 0.01$), 20 μg/L VCR时, 二者的表达均达峰值(图4)。

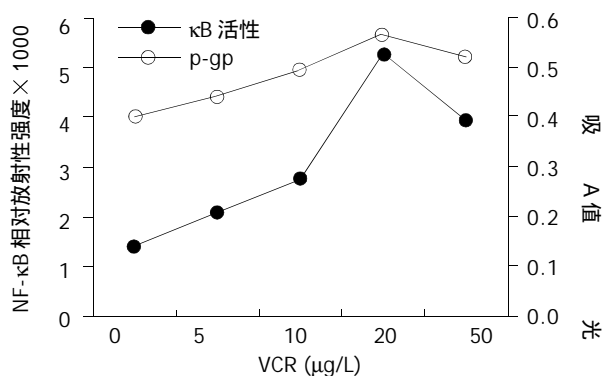


图4 SGC7901/VCR耐药细胞中NF- κ B活性与P-gp表达间的相关性。

2.4 VCR诱导耐药细胞P65由胞质向胞核转位 无VCR刺激时, SGC7901/VCR细胞内P65集中于胞质, 细胞核未见着色(图5A); 10 μg/L VCR作用6 h时, 细胞核着色明显(图5B). 说明VCR刺激后可引起耐药细胞内P65由胞质向胞核转位。

刺激时, SGC7901/VCR细胞内P65集中于胞质, 细胞核未见着色(图5A); 10 μg/L VCR作用6 h时, 细胞核着色明显(图5B). 说明VCR刺激后可引起耐药细胞内P65由胞质向胞核转位。

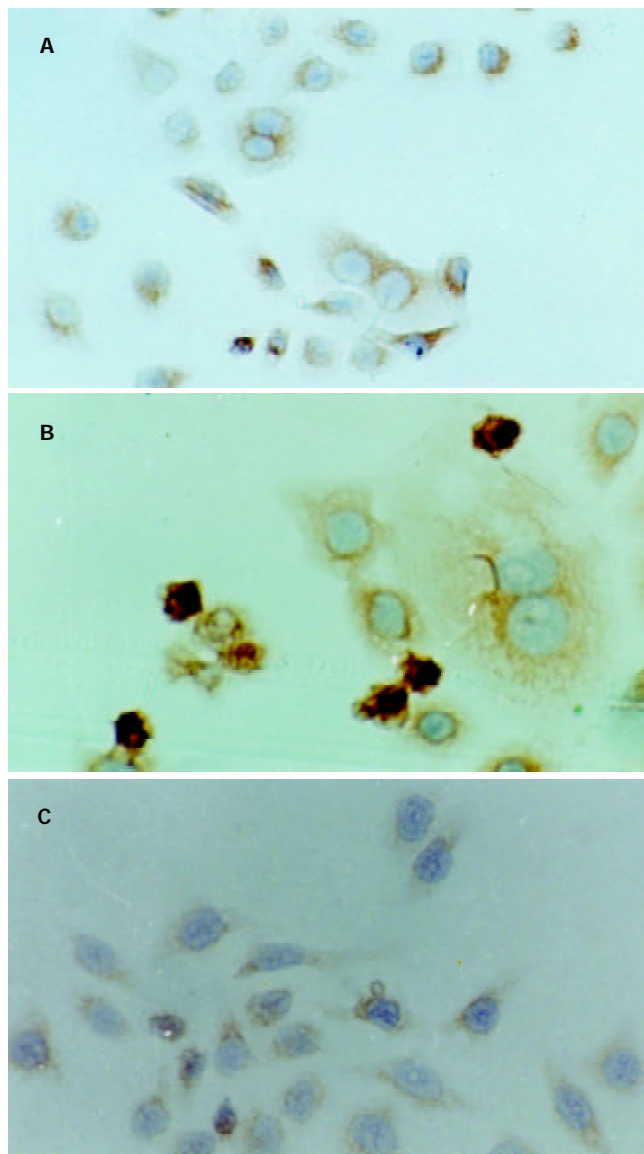


图5 MG-132抑制SGC7901/VCR细胞NF- κ B P65核转位作用SP×200. A: 无VCR刺激时仅胞质中P65阳性表达; B: VCR10 μm/L作用6 h时细胞核着色明显; C: MG-132预作用30min, 再与10 μm/L VCR作用6 h, 胞质中可见P65弱表达, 胞核未见着色。

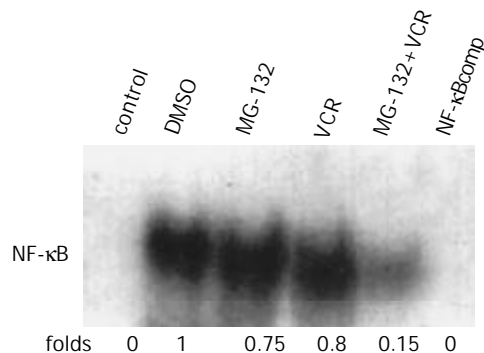


图6 MG-132抑制SGC7901/VCR耐药细胞NF- κ B DNA的结合活性。

2.5 MG-132对VCR作用的影响 NF- κ B抑制剂MG-132 (2.5 μ mol/L)预作用30 min能明显抑制10 μ g/L VCR诱导的NF- κ B活性增强,而溶剂DMSO和MG-132单独使用时,均不能抑制 κ B活化(图6). MG-132对于VCR引起的耐药细胞I κ B- α 低表达(作用6 h)和P-gp高表达(作用24 h)也有明显抑制作用(表1). MG-132还可抑制VCR引起的耐药细胞P65核转位(图5C).

表1 MG-132对SGC7901/VCR耐药细胞I κ B- α 和P-gp表达的影响 ($n=3$, mean \pm SD)

分组	I κ B- α (A值)	P-gp(A值)
对照	0.221 \pm 0.012	0.403 \pm 0.028
VCR (10 μ g/L)	0.122 \pm 0.018 ^a	0.496 \pm 0.018 ^a
MG-132 (2.5 μ mol/L)	0.210 \pm 0.090	0.413 \pm 0.042
MG-132+VCR	0.450 \pm 0.066 ^a	0.221 \pm 0.019 ^a

^aP < 0.05 vs 对照组.

3 讨论

NF- κ B (通常指p50/P65异源二聚体)是一种重要的核转录调节因子. 静息状态时, 他与细胞内抑制物I κ B结合, 以非活性形式存在于胞质中. 多种因素刺激下, I κ B磷酸化、泛素化并在胞质中降解, 然后NF- κ B转位入核, 与靶基因调控区结合, 调节靶基因的合成^[14-15]. NF- κ B具有广泛的调节作用, 参与炎症反应、免疫反应、细胞分化和凋亡^[1], 最近有研究认为NF- κ B还参与调控肿瘤细胞对抗癌治疗的敏感性^[12]. Manna et al^[16]发现表达NF- κ B的细胞系HuT-78对TNF, 紫杉醇和okadaic acid耐药, 而不表达NF- κ B的Jurket细胞对上述药物均敏感. 这可能与NF- κ B在转录水平上调抗凋亡基因的表达(如Bcl-2, IEX-1等)有关^[17-19]. Arlt et al^[20]进一步发现胰腺癌敏感细胞中NF- κ B活性很低, 而耐药细胞中活性明显增高, 且使用NF- κ B拮抗剂可显著提高耐药细胞对鬼臼乙叉甙和阿霉素的敏感性. 本实验以胃癌细胞SGC7901及其长春新碱耐药株为研究对象, 发现VCR可诱导两种细胞NF- κ B DNA结合活性增强, 但与亲本敏感细胞相比, 耐药细胞的NF- κ B基础活性更高, 且不同浓度VCR作用时, 耐药细胞的 κ B活化程度均较敏感细胞高. 这些差异与NF- κ B主要表现为抗凋亡、维持细胞存活的作用一致, 提示两种细胞NF- κ B对VCR刺激的反应不同可能参与胃癌耐药.

目前还不清楚VCR最初是通过什么靶点和/或产生何种损伤来激活NF- κ B. 有报道微管解聚类药物可活化NF- κ B^[21-22], Rosettc et al^[21]还发现微管稳定类药物能抑制这种活化, 故认为细胞骨架的不稳定是NF- κ B活化信号之一. 但随后有研究发现紫杉醇(稳定细胞内微管解聚)^[23-24]、VCR和长春花碱(使细胞内微管解聚)^[23], 均可某些肿瘤细胞的NF- κ B活化. 我们还发现VCR诱导NF- κ B活化的同时伴有I κ B- α 蛋白降解和P65核转

位, 且NF- κ B抑制剂MG-132可明显抑制VCR引起的耐药细胞I κ B- α 蛋白低表达、P65核转位和 κ B活化, 进一步证实SGC7901/VCR耐药细胞中存在NF- κ B信号通路.

除凋亡信息受抑, 肿瘤细胞获得耐药还与细胞膜上P-gp过度表达有关, 该蛋白由耐药基因Mdr1编码, 具有结合药物和ATP的位点, 可将化疗药从细胞内泵出细胞外, 是多种耐药细胞产生耐药性的重要机制, 而且拮抗P-gp的功能可在一定程度上逆转耐药^[25-26]. 本实验中也发现, SGC7901/VCR耐药细胞的P-gp的基础表达及VCR诱导后的表达均较亲本敏感细胞高, 可能是细胞对VCR耐药的重要原因. 有研究显示P-gp的表达可能受NF- κ B调控^[27-28], Deng et al^[29]进一步发现在大鼠肝癌细胞系中2-乙酰氨基苄诱导mdr1b基因过表达由NF- κ B介导, 且Mdr1b基因5'端-167至-158区域为NF- κ B结合位点, Bentires-Alj et al^[13]也发现人Mdr1基因的第二个启动子上存在NF- κ B结合位点, 提示NF- κ B可转录激活Mdr1, 使细胞膜表面P-gp表达增高. Um et al^[30]的实验证实, P-gp高表达的耐药细胞中NF- κ B DNA结合活性和P65的表达均高于敏感亲本细胞, 提出NF- κ B活化可能是P-gp高表达细胞耐药的重要机制; 本实验也观测到耐药细胞NF- κ B活性与P-gp表达的变化呈正相关, 且MG-132在抑制NF- κ B活化的同时也抑制P-gp表达, 提示NF- κ B途径参与调节VCR诱导的P-gp表达.

致谢: 樊代明教授惠赠SGC7901/VCR耐药细胞株, 张翼教授、包鹏辉硕士在实验技术上大力支持.

4 参考文献

- Liou HC. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. *J Biochem Mol Biol* 2002;35:537-546
- Jia CK, Zheng SS, Li QY, Zhang AB. Immunotolerance of liver allotransplantation induced by intrathymic inoculation of donor soluble liver specific antigen. *World J Gastroenterol* 2003; 9:759-764
- Gong JP, Liu CA, Wu CX, Li SW, Shi YJ, Li XH. Nuclear factor κ B activity in patients with acute severe cholangitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:346-349
- Zhu JW, Yu BM, Ji YB, Zheng MH, Li DH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by hydrogen peroxide in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:153-157
- Chen CD, Sawyers CL. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* 2002;22:2862-2870
- Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM 3rd, Mackay S. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001; 130:363-369
- Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- Orlowski RZ, Baldwin AS Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002;8:385-389
- Lin A, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003;13:107-114
- Kim DW, Sovak MA, Zanieski G, Nonet G, Romieu-Mourez R, Lau AW, Hafer LJ, Yaswen P, Stampfer M, Rogers AE, Russo J,

- Sonenshein GE. Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis* 2000;21:871-879
- 11 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
 - 12 Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M55-62
 - 13 Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 2003;22:90-97
 - 14 Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C451-462
 - 15 Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1509-1520
 - 16 Manna SK, Aggarwal BB. Lipopolysaccharide inhibits TNF-induced apoptosis: role of nuclear factor-kappaB activation and reactive oxygen intermediates. *J Immunol* 1999;162:1510-1518
 - 17 Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001;107:241-246
 - 18 Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:135-142
 - 19 Schoemaker MH, Ros JE, Homan M, Trautwein C, Liston P, Poelstra K, van Goor H, Jansen PL, Moshage H. Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB-regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis. *J Hepatol* 2002;36:742-750
 - 20 Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Folsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE, Schafer H. Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 2001;20:859-868
 - 21 Rosette C, Karin M. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B. *J Cell Biol* 1995;128:1111-1119
 - 22 Mistry P, Deacon K, Mistry S, Blank J, Patel R. NF-kappa B promotes survival during mitotic cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2003 [Epub ahead of print]
 - 23 Das KC, White CW. Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997;272:14914-14920
 - 24 Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W. Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:4426-4432
 - 25 Wang H, Chen XP, Qiu FZ. Overcoming multi-drug resistance by anti-MDR1 ribozyme. *World J Gastroenterol* 2003;9:1444-1449
 - 26 Yin F, Shi YQ, Zhao WP, Xiao B, Miao JY, Fan DM. Suppression of P-gp induced multiple drug resistance in a drug resistant gastric cancer cell line by overexpression of Fas. *World J Gastroenterol* 2000;6:664-670
 - 27 Ros JE, Schuetz JD, Geuken M, Streetz K, Moshage H, Kuipers F, Manns MP, Jansen PL, Trautwein C, Muller M. Induction of Mdr1b expression by tumor necrosis factor-alpha in rat liver cells is independent of p53 but requires NF-kappaB signaling. *Hepatology* 2001;33:1425-1431
 - 28 Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser IA. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium-and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:1887-1896
 - 29 Deng L, Lin-Lee YC, Claret FX, Kuo MT. 2-acetylaminofluorene up-regulates rat mdr1b expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2001;276:413-420
 - 30 Um JH, Kang CD, Lee BG, Kim DW, Chung BS, Kim SH. Increased and correlated nuclear factor-kappa B and Ku autoantigen activities are associated with development of multidrug resistance. *Oncogene* 2001;20:6048-6056

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文，如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究作为主的综述性论文，将优先发表，使WJG成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。

丝裂霉素联合舒林酸对胃癌SGC7901细胞诱导凋亡的研究

颜永乐, 马 力

颜永乐, 马力, 兰州医学院附属二院消化内科 甘肃省兰州市 730030
颜永乐, 男, 1970-03-31 生, 甘肃省天水市人, 汉族. 1993 年兰州医学院本科毕业, 主治医师, 硕士研究生. 研究方向: 胃肠道肿瘤.
项目负责人: 马力, 730030, 甘肃省兰州市, 兰州医学院附属二院消化内科.
ylxie007@163.com
电话: 0931-8943130 传真: 0938-2610328
收稿日期: 2003-10-24 接受日期: 2003-12-08

Apoptosis induced by mitomycin with sulindac on human gastric cancer cell SGC7901

Yong-Le Xie, Li Ma

Yong-Le Xie, Li Ma, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Correspondence to: Li Ma, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. ylxie007@163.com
Received: 2003-10-24 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of mitomycin (MMC) with sulindac on the cell viability, apoptotic induction and expression of apoptosis-related gene *Bcl-2* and cyclooxygenase-2 (COX-2) in gastric adenocarcinoma cell SGC7901.

METHODS: Human gastric cancer SGC7901 cells were divided into three groups, sulindac, MMC and sulindac with MMC. After treatment with drugs, cell viability was examined by MTT assay. Flow cytometry was used for the cell cycle distribution and apoptotic rates. The morphology of the cells was observed under light microscope and interactive laser cytometer. The expression of COX-2, *Bcl-2* was determined by the immunocytochemical method.

RESULTS: After exposure for 12 h to three kinds of drugs, gastric cancer cells SGC7901 presented some morphologic features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation, DNA fragmentation, formation of apoptotic bodies. The effects of growth inhibition were more obvious in cotreatment group with MMC and sulindac than MMC group. The apoptotic rates in cotreated cells and MMC-treated cells at 24 h after treatment were 12.0% and 7.2%, respectively. After exposure for 24 h to MMC, upregulation of COX-2 and *Bcl-2* protein expression was noted, meanwhile, in cotreatment group, the levels of COX-2 were downregulated but the expression of *Bcl-2* gene was not changed significantly.

CONCLUSION: MMC-induced apoptosis is reduced by upregulating the expression of COX-2 and *Bcl-2* genes. MMC combined with sulindac can suppress growth of gastric cancer cells through induction of apoptosis which may be mediated by downregulation of apoptosis-related *Bcl-2* gene and COX-2 gene.

Xie YL, Ma L. Apoptosis induced by mitomycin with sulindac on human gastric cancer cell SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):542-545

摘要

目的: 研究丝裂霉素与舒林酸合用对人胃腺癌SGC7901细胞的生长抑制、诱导凋亡及凋亡相关基因*bcl-2*和COX-2基因表达的影响。

方法: SGC7901 胃癌细胞被分为三个实验组, 舒林酸组、丝裂霉素组和舒林酸与丝裂霉素联合组.应用光镜、激光共焦显微镜、MTT法、流式细胞仪和免疫组化技术研究三组药物作用后, 胃癌细胞的形态学变化、生长抑制、诱导凋亡和对凋亡相关基因*Bcl-2*和COX-2表达的影响。

结果: 药物作用于细胞后, 可看到较为典型的细胞凋亡形态学变化: 细胞核固缩, 染色质凝集, 核碎裂, 染色质片段化, 凋亡小体形成等. 药物干预 24 h, 联合组和 MMC 组对胃癌 SGC7901 细胞诱导的凋亡率分别为 12.0% 和 7.20%。对细胞的增生抑制以联合组最强, MMC 次之, 舒林酸最弱. 经 MMC 作用 24 h 后, COX-2 和 *Bcl-2* 蛋白表达增强, 而联合组出现 COX-2 蛋白表达减弱, *Bcl-2* 蛋白亦未出现明显升高。

结论: 人胃癌 SGC7901 细胞体外实验中, MMC 联合舒林酸使用, 可使增生抑制加强. MMC 可能由于上调 COX-2、*Bcl-2* 蛋白, 减弱了自身对 SGC7901 胃癌细胞的诱导凋亡, MMC 联合舒林酸可抑制 COX-2、*Bcl-2* 表达, 从而提高 MMC 的抗癌效果。

颜永乐, 马力. 丝裂霉素联合舒林酸对胃癌 SGC7901 细胞诱导凋亡的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(3):542-545

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/542.asp>

0 引言

COX-2 基因表达的蛋白被认为是一种原癌蛋白(proto-oncogenic protein)^[1], 在很多肿瘤组织中表达上调, 与肿瘤的发生与发展关系密切^[2-12]. 非甾体类消炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID), 如阿司匹林、吲哚美辛、和舒林酸(sulindac)等, 这类药物可通过抑制环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 而起到抗肿瘤增生和诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[13-22]. NSAID 中的选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布(celecoxib)已被美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准用于家族性腺瘤样息肉的防治^[23]. 近年,

NSAIDs抗胃癌细胞增生也屡见报道. 本实验旨在观察舒林酸和丝裂霉素(mitomycin, MMC)联合使用对体外培养胃癌 SGC7901 细胞增生的影响, 并通过检测 COX-2 和 Bcl-2 用药前后的变化, 探讨两种药物的合用是否可增强抗癌作用及可能的机制. 为临床治疗提供理论与实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC7901 (中分化腺癌)购自中科院上海细胞生物研究所; RPMI1640培养基, 胰蛋白酶(Gibco 公司); 四氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶、舒林酸(sulindac)购自美国Sigma公司; 丝裂霉素(MMC)为日本协和株式会社产品; 山羊抗人 COX-2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), Bcl-2 单抗及 SP 试剂盒为福建迈新生物技术公司产品; 恒温 CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司), 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂), 激光共聚焦显微镜(德国 Leica SP2 型), 流式细胞仪(EPICSXL 型, 美国 Coulter 公司), 图像分析系统(四川联合大学).

1.2 方法 将舒林酸和 MMC 以单药和两药联合的形式分为: 舒林酸组、MMC 组和联合组. 实验时将溶解于培养液中的药物(舒林酸以 DMSO 预溶)加入培养细胞的新鲜培养液中, 使药物浓度达到: 舒林酸组, 含 1 mmol/L (其中 DMSO 浓度不超过 5 g/L); MMC 组, 含 1×10^{-3} g/L; 联合组, 含 1 mmol/L 的舒林酸和 1×10^{-3} g/L 的 MMC. 胃癌 SGC7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素及 1×10^{-3} g/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中, 置于 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱内培养. 细胞为上皮样贴壁生长, 取对数生长期细胞用于实验. 将 SGC7901 细胞按每孔 7×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 24 h 后换液, 加入药物, 每组设 6 个复孔, 并设含相同浓度 DMSO 的空白对照, 继续培养 12 h, 24 h, 48 h, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL; 作用 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加 DMSO 溶液 150 μL, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在 570 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值, 整个实验重复 3 次以上. 以时间为横轴, 吸光度(mean±SD)为纵轴绘制生长曲线.

1.2.1 形态学观察 加入药物后, 在倒置显微镜下观察细胞变化形态; 分别于 12 h, 24 h, 48 h 取出处理后的单层附壁细胞爬片, 常规 HE 染色后观察; 将药物处理后的细胞制成细胞悬液, 取一滴细胞悬液与 5 μL 吡啶橙溶液混匀点滴于清洁玻片上, 10 min 后, 盖玻片封片. 激光共聚焦显微镜下观察、摄片.

1.2.2 流式细胞仪测定 收集药物处理后的胃癌细胞, PBS 洗涤后, 用 4℃乙醇固定 12 h 以上, 离心除去乙醇, 加入 10 g/L RNA 酶溶液 200 μL, 37℃水浴 15 min, 加入碘化丙啶, 上流式细胞仪检测凋亡百分率和各细胞周期所占百分比.

1.2.3 COX-2, Bcl-2 蛋白检测 细胞接种于盖玻片上, 分别处理, 作用 24 h 后取出玻片, PBS 洗后, 950 mL/L

乙醇固定 30 min, 采用常规 SP 法, 细胞爬片依次用 5 mL/L H₂O₂ 甲醇 30 min, 羊血清室温封闭 10 min, 滴加一抗后, 置 4℃冰箱过夜, 再滴加生物素化二抗 37℃孵育 12 min, 滴加链亲和素-过氧化酶溶液 37℃15 min, DAB 显色、脱水、透明、封片. 实验中设置阳性对照, 阴性对照(以 PBS 代替一抗).

统计学处理 应用 SPSS 8.0 统计分析软件进行 t 检验和方差检验.

2 结果

2.1 SGC7901 细胞生长和凋亡 联合用药对细胞增生抑制强于丝裂霉素, 而舒林酸作用最弱(图 1). 未用药的 SGC7901 细胞生长良好, 表现为梭形或多角形, 并可融合形成集落. 加药后, 出现伪足回缩, 细胞变圆、变小、部分细胞脱落漂浮于培养液中. 通过 HE 染色, 可看到较为典型的细胞凋亡形态学变化: 细胞体积缩小, 核固缩深染, 部分裂解形成凋亡小体. 活细胞对荧光染料有拒染性, 故染色较浅, 激光共聚焦显微镜下观察, 可见正常细胞核形态饱满, 表现为弥散均匀的黄绿色荧光, 凋亡细胞则出现细胞核体积缩小, 荧光染色增强, 染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光以及细胞膜出泡、凋亡小体形成. 上述表现以联合药物组最明显, 且凋亡细胞数量随着药物作用时间的延长而增加(图 2).

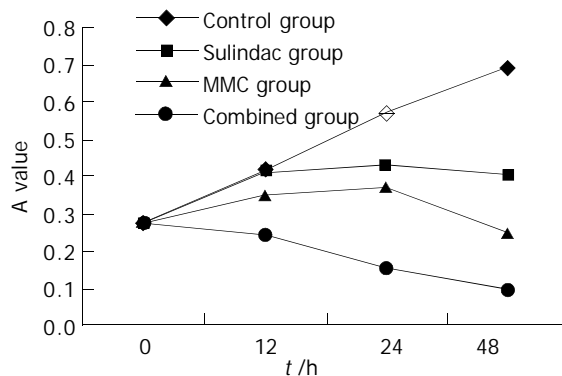


图 1 药物对 SGC7901 细胞生长抑制作用.

表 1 药物对 SGC7901 细胞凋亡及细胞周期的影响(% , mean±SD)

Group	Apoptosis	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	0.43 ± 0.38	47.43 ± 2.81	45.50 ± 1.25	7.06 ± 4.06
Sulindac	3.80 ± 0.53 ^a	49.67 ± 3.29	44.70 ± 5.82	4.97 ± 6.52
MMC	7.20 ± 1.31 ^a	56.67 ± 3.92 ^a	40.40 ± 11.53	6.60 ± 2.99
Combined	11.97 ± 2.59 ^b	68.40 ± 5.53 ^b	29.23 ± 5.87	2.37 ± 0.45

^aP < 0.05, vs Control; ^bP < 0.01, vs MMC.

2.2 细胞周期的分布 药物作用 24 h 后, 流式细胞仪检测凋亡率和细胞周期分布, 可见细胞凋亡率明显增加, 且联合组细胞凋亡率明显高于丝裂霉素及其他组(P < 0.01); 对细胞周期分布的影响, 即使 G₀/G₁ 期细胞比例增高,

使S期细胞比例降低(表1)。

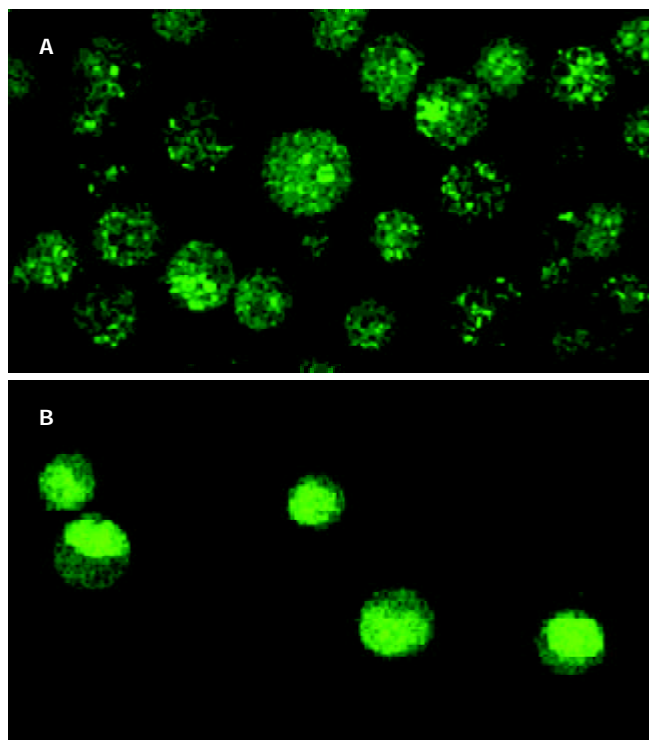


图2 SGC7901细胞经吡啶橙染色 $\times 400$ 。A: 未经药物处理, 细胞核形态饱满, 呈均匀的黄绿色荧光; B: 药物作用后 SGC7901, 细胞核固缩, 荧光染色增强, 染色质呈致密浓染的块状。

2.3 COX-2, Bcl-2 蛋白的表达 对照组 COX-2, Bcl-2 蛋白均呈阳性表达。COX-2 蛋白表达物质呈棕黄色颗粒状, 主要弥散分布于整个胞质或沿核膜周边呈线状分布, 强阳性时可反应于胞核; Bcl-2 蛋白主要定位于胞膜、胞核及核膜。采用图像分析系统检测免疫组化染色后细胞平均灰度值, 用此间接反映 COX-2 和 Bcl-2 蛋白表达量。舒林酸干预 24 h 后, COX-2、Bcl-2 表达减弱, 而 MMC 则使两种蛋白表达增强, 合用后, COX-2 表达减弱, Bcl-2 与对照组比较无变化, 但较 MMC 组表达减弱(表 2)。

表2 药物干预 24 h 对 SGC7901 细胞 COX-2 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 (mean \pm SD, $n = 3$, A)

Group	COX-2	Bcl-2
Control	0.4 980 \pm 0.0 330	0.3 652 \pm 0.057
Sulindac	0.3 967 \pm 0.0 306 ^a	0.2 617 \pm 0.0 333 ^b
MMC	0.5 633 \pm 0.0 208	0.4 500 \pm 0.0 436 ^b
Combined	0.4 000 \pm 0.0 265 ^{ac}	0.3 660 \pm 0.0 397 ^c

^aP < 0.01, ^bP < 0.05, vs control; ^cP < 0.05, vs MMC.

3 讨论

化疗耐药是肿瘤治疗中的难题, 研究耐药机制和寻求克服途径成为当今肿瘤治疗的重点^[24-26]。肿瘤细胞对化疗药物的耐药缘于多种机制, Bcl-2 基因的异常表达可

能与之有关^[27]。研究通过抑制 Bcl-2 的表达以增强化疗药物的敏感性, 如利用反义寡核苷酸封闭细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达, 可使细胞对顺铂、5-氟尿嘧啶的敏感性增强^[28]。COX-2 在许多肿瘤细胞中高表达, 如胃癌 SGC7901 细胞^[29]。有证据表明 COX-2 基因表达增强导致 Bcl-2 蛋白表达增加并引起细胞凋亡抑制^[30], COX-2 是 Bcl-2 的上游调节者, 通过作用于 Bcl-2 家族而影响肿瘤细胞凋亡的发生发展^[31]。最近研究者发现舒林酸在体外对人胃腺癌细胞株 MKN45 和 MKN28 有良好的增生抑制作用, 并能诱导 2 株细胞发生凋亡, 舒林酸诱导胃癌细胞凋亡与其抑制 COX-2 继而抑制 Bcl-2 蛋白有关^[13]。我们用 MTT 法证实 MMC 与舒林酸合用对 SGC7901 细胞的增生抑制强于 MMC 或舒林酸的单独干预; 流式细胞仪检测显示合用组较单药组更高的凋亡率; 药物干预 24 h, MMC 使 COX-2, Bcl-2 蛋白表达增多, 而合用后, COX-2, Bcl-2 蛋白均较 MMC 组减少。提示 MMC 可能通过增加 COX-2, Bcl-2 的表达减弱了自身对胃癌细胞的凋亡诱导效应, 舒林酸抑制 COX-2 蛋白, 下调 Bcl-2 的表达, 从而增强了 MMC 的诱导凋亡。国外学者报道^[32], MMC 作用于 MKN74 胃癌细胞后 COX-2, Bcl-2 上调, 而 MMC 与 COX-2 选择剂 NS-398 共同处理胃癌细胞后, 两种蛋白表达降低, 细胞凋亡有显著提高。本实验中虽然未见到合用后 Bcl-2 较空白组减弱, 但较 MMC 作用后表达亦明显降低, 同时也可看到舒林酸对 COX-2 和 Bcl-2 蛋白的表达抑制作用。

细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。许多人体基因如 Bcl-2, P53, C-myc 及相关基因 Bcl-2, bax, bad 等参与凋亡的调控, 其中 Bcl-2 基因尤为重要, 他被看作是细胞凋亡调控的最后共同通路之一^[33]。Bcl-2 能抑制许多抗肿瘤药物的诱导细胞凋亡作用, 降低其细胞毒性^[34]。应用药物如 COX-2 抑制剂或反义基因治疗^[2, 35]与传统化疗药物协调使用, 可提高化疗效果, 减少药物剂量和药物副作用。本实验观察到的结果提示舒林酸可能通过调节凋亡抑制基因 Bcl-2, 从而使 MMC 产生化疗增效, 但 COX-2 与凋亡相关基因 bax, Bcl-2 之间的信号传递过程仍未完全清楚, 而且 NSAID 抗肿瘤作用机制中除了 COX-2 途径外, 还有 COX-2 非依赖途径^[36-39], 包括对细胞周期的影响, 影响 NF- κ B 的活性和 P53 的表达, RAS 信号传递途径的调节等。因此, NSAIDs 抗胃癌机制中 COX-2 依赖和非依赖性途径可能均有参与, 但确切的作用机制及何种途径为主目前仍未明了。我们的研究提示舒林酸和 MMC 在体外对胃癌 SGC7901 细胞的增生有一定的协同作用, 但在不同的细胞株及临床应用的有效性, 尚难确定, 须进行更为广泛、深入的研究。

4 参考文献

- Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguella M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific

- cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001;61:1733-1740
- 2 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 3 Davies G, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol* 2002;13:669-678
- 4 Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E (2) receptor EP (2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002;62:506-511
- 5 Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 2001;91:737-743
- 6 Weddle DL, Tithoff P, Williams M, Schuller HM. Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas. *Carcinogenesis* 2001;22:473-479
- 7 Ristimäki A, Nieminen O, Saukkonen K, Hotakainen K, Nordling S, Haglund C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 2001;158:849-853
- 8 Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:429-434
- 9 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001;76:26-30
- 10 Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001;91:333-338
- 11 Fantappiè O, Masini E, Sardi I, Raimondi L, Bani D, Solazzo M, Vannacci A, Mazzanti R. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* 2002;35:843-852
- 12 Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002;62:1567-1572
- 13 Sun B, Wu YL, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhang YP, Zhong J. Effects of Sulindac on growth inhibition and apoptosis induction in human gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:997-1002
- 14 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716
- 15 Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-4577
- 16 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 17 Lynch PM. COX-2 inhibition in clinical cancer prevention. *Oncology* 2001;15(3 Suppl 5):21-26
- 18 Li JY, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Huang JA. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the proliferation and cyclooxygenase activity of gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:262-265
- 19 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-1112
- 20 Mann M, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, DuBois RN. Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology* 2001;120:1713-1719
- 21 Wight NJ, Gottesdiener K, Garlick NM, Atherton CT, Novak S, Gertz BJ, Calder NA, Cote J, Wong P, Dallob A, Hawkey CJ. Rofecoxib, a COX-2 inhibitor, does not inhibit human gastric mucosal prostaglandin production. *Gastroenterology* 2001;120:867-873
- 22 Zhang Z, DuBois RN. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology* 2000;118:1012-1017
- 23 赵丽琴. Celecoxib 用于治疗息肉在美国批准上市. 国外医学药学分册 2000;27:319-320
- 24 姚学清, 林锋. 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1433-1435
- 25 Wang SD, Zhang ZS, Zhang XQ, Zhou DY. The function of CPP32 in apoptosis of multidrug-resistance gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1152-1156
- 26 马强, 张振书, 王群英. 大肠癌多药耐药性的逆转. 世界华人消化杂志 2001;9:822-825
- 27 Reed JC. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy. *J Nat Can Inst* 1997;89:988-990
- 28 王佐佑, 肖冰, 时永金, 赵燕秋, 樊代明. 转染 Bcl-2 反义核酸对胃癌细胞药物敏感性的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:796-797
- 29 Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- 30 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cells* 1995;83:493-501
- 31 Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998;58:4245-4249
- 32 Hsueh CT, Chiu CF, Kelsen DP, Schwartz GK. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances mitomycin-C-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;45:389-396
- 33 Chen CJ, Sun YX, Zhou HG, Pan BR, Zheng SG, Hong XZ, Liu JH, Feng WY. Bcl-2 and p53 expressions in colorectal adenoma and carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:683-685
- 34 Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-157
- 35 Wu GS, Wu XY, Zou SQ, Qiu FZ. Effects of cyclooxygenase-2 antisense vector on proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:733-736
- 36 Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Hinoda Y, Imai K. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancers with microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999;84:400-403
- 37 Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 1999;274:27307-27314
- 38 Gilhooly EM, Rose DP. The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 1999;15:267-270
- 39 Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, Katada J, Yamashina S, Katori M. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol* 2000;130:641-649

胃癌组织 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 表达与胃癌预后的关系

段伦喜, 钟德午, 胡辅珍, 赵 华, 杨竹林, 易文君, 舒国顺, 华颂文

段伦喜, 钟德午, 胡辅珍, 赵华, 杨竹林, 易文君, 舒国顺, 华颂文, 中南大学湘雅二医院普外科 湖南省长沙市 410011

段伦喜, 男, 1970-10-19 生, 湖南常德人, 汉族. 1994 年湖南医科大学本科毕业, 2000 年中南大学湘雅医学院硕士毕业, 中南大学湘雅二医院普外科主治医师.

项目负责人: 段伦喜, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院普外科. dlx19701019a@163.com

电话: 0731-5524222-2260

收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

Relationship between expression of VEGF, Flt1, bFGF and P⁵³ and outcome in patients with gastric carcinoma

Lun-Xi Duan, De-Wu Zhong, Fu-Zhen Hu, Hua Zhao, Zhu-Lin Yang, Wen-Jun Yi, Guo-Shun Shu, Shong-Wen Hua

Lun-Xi Duan, De-Wu Zhong, Fu-Zhen Hu, Hua Zhao, Zhu-Lin Yang, Wen-Jun Yi, Guo-Shun Shu, Shong-Wen Hua, Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Lun-Xi Duan, Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. dlx19701019a@163.com

Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the expression of VEGF, Flt1, bFGF and P⁵³, the clinicopathological characteristics and outcome in patients with gastric carcinoma.

METHODS: The relationship between VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ expression and clinicopathological characteristics and outcome in the patient was assessed by streptavidin-biotin method of immunohistochemistry with polyclonal antibodies against VEGF, Flt1, bFGF, and P⁵³ protein. The survival curves were formulated using Kaplan-Meier method and analyzed by the log-rank test, and the influence of each variable on survival was assessed by the cox's proportional hazard model.

RESULTS: VEGF expression was closely correlated with serosal invasion (Se, Se₁ invasion vs P_m, SS and M, SM invasion, $P < 0.01$). Expression of P⁵³ was obviously higher in the patients with lymph node metastasis than those without (lymph node metastasis vs non-lymph node metastasis, $P < 0.05$). There was a positive correlation between VEGF and Flt1 expression (VEGF expression in Flt1 positive group vs Flt1 negative group, $P < 0.01$). The factors that affected the prognosis in patients with gastric carcinoma were PTNM stage, VEGF expression, serosal invasion, and surgical curability. Flt1, bFGF, and P⁵³ expression had no influence on the prognosis of patients with gastric carcinoma ($P > 0.05$).

CONCLUSION: P53 expression has significant relationship with lymph node metastasis in gastric carcinoma. VEGF expression is correlated with serosal invasion and the prognosis and may be a good prognostic indicator in gastric carcinoma.

Duan LX, Zhong DW, Hu FZ, Zhao H, Yang ZL, Yi WJ, Shu GS, Hua SW. Relationship between expression of VEGF, Flt1, bFGF and P⁵³ and outcome in patients with gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):546-549

摘要

目的: 探讨胃癌中 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 的表达及意义.

方法: 应用 SABC 免疫组化法, 研究 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 在胃癌中表达及与胃癌生长转移、临床病理特征、预后的关系.

结果: 胃癌 VEGF 表达与肿瘤浸润深度有关(浆膜、浆膜外 vs 肌层和黏膜层, $P < 0.01$). P⁵³ 表达与淋巴结转移相关(P⁵³ 阳性淋巴结转移组 vs P⁵³ 阴性淋巴结无转移组, $P < 0.05$). VEGF 与 Flt1 表达呈正相关(VEGF 表达在 Flt1 阳性组 vs 在 Flt1 阴性组, $P < 0.01$); 影响胃癌预后的因素有临床病理分期、VEGF 表达、肿瘤浸润深度、手术方式. Kaplan-Meier 研究显示 VEGF 表达与胃癌生存预后相关($P < 0.05$). Flt1, bFGF, P⁵³ 表达与生存预后无关($P > 0.05$).

结论: P⁵³ 表达与淋巴结转移相关. VEGF 表达与肿瘤浸润深度和胃癌生存预后相关, VEGF 表达可作为预测胃癌预后一项很好的指标.

段伦喜, 钟德午, 胡辅珍, 赵华, 杨竹林, 易文君, 舒国顺, 华颂文. 胃癌组织 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 表达与胃癌预后的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):546-549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/546.asp>

0 引言

胃癌是最常见癌肿之一^[1-6], 探讨胃癌生物学行为及预后相关因素有重要意义^[7-10]. 实体肿瘤的生长与转移依赖于血管生成^[11]. 肿瘤的血管生成依赖于多种相关因子的诱导和调节^[12], 在众多与其有关的因子中, VEGF (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是迄今鉴定出来的最重要的血管生成因子. 我们探讨胃癌中 VEGF 及其受体 Flt1 和 P⁵³, bFGF 的表达与预后的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 1994-01/1996-10 本院普外科收治胃癌 52 例. 年龄 28-73, (平均 51); 男 34 例, 女 18 例; 临床病理分期 (按 IJCC1988 年标准) I 级 14 例, II 级 9 例, III 级 15 例, IV 级 14 例; 根治性手术 39 例, 姑息性手术 13 例. 所有病例术前未作放疗和化疗, 术后均接受随访, 大于 5 a 者 40 例. 5 a 内死亡 25 例, 其中根治手术 13 例, 姑息手术 12 例; 生存 15 例, 均为根治手术. 羊抗人 FGF-21(147)-G(IgG)(1:200), P⁵³(FL-393)-G(IgG)(1:200), 兔抗人 VEGF(147)(IgG)(1:200), Flt1(C-17)(IgG)(1:200) 多克隆抗体, SABC 试剂盒均购于武汉博士德公司.

1.2 方法 采用 SABC 法, 以已知阳性大肠癌切片作为阳性对照, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照. 染色步骤: 切片脱蜡, 30 ml/L H₂O₂ 甲醇液封闭内源性过氧化酶, 消化液消化, 滴加一抗、二抗和 SABC 试剂, AEC 显色, 苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明、中性树脂封固. 显微镜下双盲法阅片, 在细胞核或细胞质内、细胞膜被染成红色者为阳性细胞. (1) VEGF, P⁵³ 蛋白: 阳性癌细胞大于或等于 10% 为阳性, 无阳性细胞或阳性癌细胞小于 10% 为阴性^[13-14]; (2) Flt1 蛋白: 肿瘤血管内皮细胞阳性染色判为阳性, 肿瘤血管内皮细胞阴性染色判为阴性; (3) bFGF: 以胞质胞膜被染成红色者为阳性细胞, 采用图像分析系统(HPIAS-1000P)对染色强度进行定量, 按强度不同分为 0 到 +++, 以 0 代表未见染色, +++ 代表最强染色.

统计学处理 由 Spss10.0 统计软件完成, 率的比较采用 χ^2 检验, Kaplan-Meier 法作生存率曲线, Logrank 法作时序检验, 各指标对生存率的影响采用 Cox 模型多因素分析, 检验水准 $P=0.05$.

2 结果

2.1 胃癌中 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 的表达 VEGF 表现为细胞膜或胞质阳性(图 1), 阳性表达率为 53.8% (28/52). Flt1 表现为胞质阳性, 以肿瘤血管内皮细胞阳性表达为主(图 2), 阳性表达率为 51.9% (27/52). bFGF 表现为胞质胞膜阳性, 少数肿瘤细胞核阳性(图 3), 阳性表达率 71.2% (37/52). P⁵³ 主要为胞核阳性(图 4), 阳性表达率 34.6% (18/52).

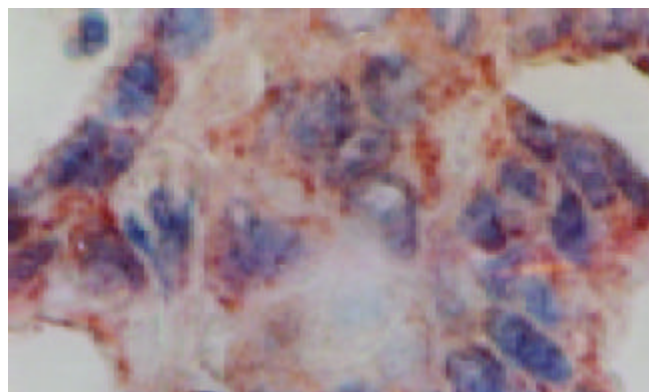


图 1 胃癌细胞 VEGF 胞质胞膜阳性 SABC×400.

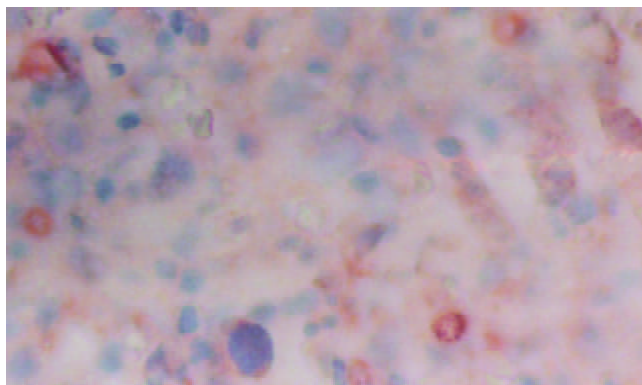


图 2 肿瘤血管内皮细胞 Flt1 阳性 SABC×400.

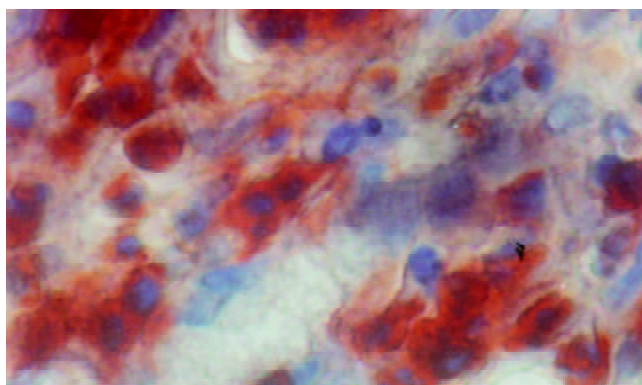


图 3 胃癌细胞 bFGF 胞质胞膜阳性 SABC×400.

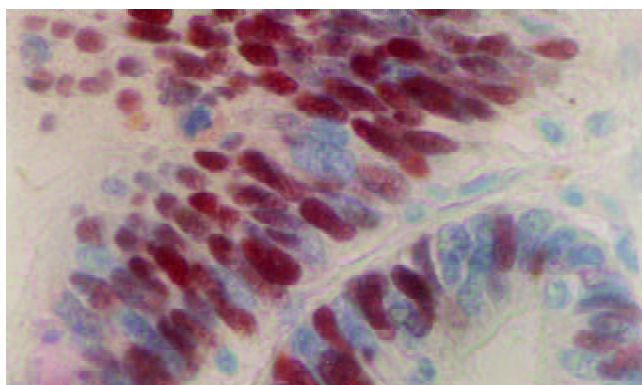


图 4 胃癌细胞 P⁵³ 胞核阳性 SABC×400.

2.2 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 表达与临床病理 VEGF 表达与肿瘤浸润深度有关($P<0.01$). P⁵³ 表达与淋巴结转移有关($P<0.05$). Flt1, bFGF 表达与临床病理分期、组织学类型、浸润深度、淋巴转移、远处转移之间均无关($P>0.05$), 见表 1.

2.3 胃癌中 VEGF, Flt1, bFGF, P⁵³ 表达间的关系 Flt1 阳性组 VEGF 阳性率为 74.1%, Flt1 阴性组 VEGF 阳性率为 32.0%, 二者有显著性差异($P<0.05$), 表明 VEGF 与 Flt1 呈正相关. 其他各因子之间无相关性. 将 52 例生存时间和各因素定量化数据输入计算机得到 COX 回归方程为: $h_j(t) = h_0(t) \exp(0.7221 \text{ 临床病理分期} + 1.471 \text{ 浸润深度} + 1.2605 \text{ VEGF 表达} - 1.2770 \text{ 手术方式})$. 说明对胃癌预后有影响的因素只有临床病理分期、肿瘤浸润深度、VEGF 表达、手术方式四因素, 其余各因素对生存预后

无影响.而从优势比看,影响程度的大小依次为:浸润深度、手术方式、VEGF表达、临床病理分期.

2.4 Kaplan-Meier生存分析 将VEGF表达分为阳性组和阴性组,制出Kaplan-Meier生命曲线(图5),以logrank检验法检验,其 $P=0.0030$ 表明两组生存率有显著性差异.同样对Flt1, bFGF, P^{53} 制出生命曲线图并作logrank检验, $P>0.05$,表明以Flt1, bFGF, P^{53} 蛋白表达分组,两组生存率无显著性差异.

表1 VEGF、Flt1、bFGF、 P^{53} 表达与临床病理因素之间的关系

因素	n	VEGF		Flt1		bFGF		P^{53}	
		-	+	-	+	-	+	-	+
组织类型	I	5	2	3	2	3	2	3	3
	II	14	7	7	7	5	9	7	7
	III	29	15	14	15	7	22	23	6 ^a
	IV	4	0	4	2	1	3	1	3
浸润深度 M, SM		7	6	1	5	2	3	4	1
	Pm, SS	8	6	2	5	3	0	8	1
	Se, Sei	37	12	25 ^b	15	22	12	25	17
淋巴转移	-	19	12	7	12	7	5	14	3
	+	33	12	21	13	20	10	23	16 ^a
远处转移	-	41	21	20	21	20	11	30	14
	+	11	3	8	4	7	4	7	5
PTNM分期	I	14	9	5	9	5	4	10	2
	II	9	4	5	4	5	2	7	5
	III	15	6	9	6	9	3	12	6
	IV	14	5	9	6	8	6	8	6

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

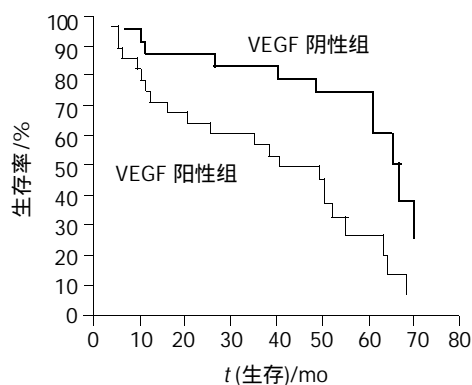


图5 胃癌 VEGF Kaplan-Meier 生命曲线.

3 讨论

肿瘤生长赖于血管生成,作为重要的血管生成因子,VEGF与胃癌的发生发展转移复发有关^[14-17]. VEGF和胃癌血管生成淋巴结转移以及胃癌发展密切相关,结合微血管计数可以预测胃癌的分期和转移^[15]; VEGF血清含量增高,预示胃癌的转移和预后不良^[16]. 本研究显示VEGF表达与胃癌浸润深度有关,与其他临床病理因素无关.同时我们采用Kaplan-Meier法分别对VEGF,

Flt1, P^{53} 阳性表达组和阴性表达组病例生存率作了生存曲线图对比,发现VEGF与胃癌生存率和预后相关,而Flt1, P^{53} 与胃癌生存率和预后无关. K-M法生存分析只是一种单因素分析方法,不能去除各因子间的混杂影响.我们又应用Cox多因素模型对临床病理分期(PTNM分期)、细胞学分级、浸润深度、淋巴转移、远处转移、手术方式、VEGF、Flt1、 P^{53} 表达进行了多因素回归分析,最后被引入Cox回归方程的只有:手术方式、临床病理分期、VEGF表达和浸润深度四个因素,表明VEGF可判断胃癌预后,而Flt1、 P^{53} 与胃癌预后无明显关系.

VEGF通过与受体Flt1和KDR的接合而刺激肿瘤血管内皮细胞的生长,在肿瘤的血管生成中起到非常重要的作用. 李江 et al^[18]研究指出肝细胞肝癌中血管形成主要是由VEGF/Flt1系统介导的,血管形成丰富的区域,细胞凋亡的敏感性和发生率降低;胃癌细胞增值和血管内皮细胞增值相互影响且机制复杂,VEGF受体在其中起到重要的作用^[19-20]. 显性阴性的KDR突变体引起的肿瘤血管生成的抑制不可被Flt1恢复,说明Flt1不介导有丝分裂作用,可能介导VEGF引起的非有丝分裂反应.本研究Flt1阳性组与Flt1阴性组VEGF阳性率有显著性差异,Flt1表达随VEGF表达上调而上调,表明VEGF与Flt1表达有相关性,同时Flt1不但在血管内皮细胞表达,同时在少数肿瘤细胞上亦表达,表明VEGF除了旁分泌机制作用血管内皮细胞外,也存在自泌机制.

bFGF促进细胞黏膜组织修复^[21], bFGF可能为血管内皮细胞有丝分裂原并参与肿瘤血管生成^[22]. bFGF表达与肿瘤细胞分化、淋巴转移、临床病理分期、血管计数、pCNA指数、DNA倍体含量相关^[22-23]. 本组病例bFGF表达与临床病理各因素、胃癌生存率及预后无关.表明bFGF在有些类型肿瘤中有促血管生成作用,而在有些类型肿瘤如胃癌中无直接促血管生成作用. 陶厚权 et al^[24]研究指出Rg3能有效抑制人胃癌血管生成,其机制可能与减少VEGF和bFGF表达有关.因此, bFGF在胃癌肿瘤血管生成中的作用,有待我们进一步研究.

P^{53} 基因是一种抑癌基因,突变型 P^{53} 可导致细胞癌变,已经证实 P^{53} 蛋白表达与多种恶性肿瘤的发生发展浸润转移预后有关^[25-27]. 胃幽门螺杆菌感染可诱导 P^{53} 基因突变^[28-29], P^{53} 过度表达又可导致肿瘤血管生成增加^[17],后者可能与通过上调VEGF蛋白表达有关^[30]. 本组病例提示突变型 P^{53} 表达与VEGF, Flt1, bFGF蛋白表达无关,我们认为 P^{53} 突变能否使VEGF表达上调值得进一步探讨研究. 本组病例显示突变型 P^{53} 表达与淋巴结转移有关,提示检测突变型 P^{53} 表达对预测胃癌淋巴结转移可能有一定价值.

4 参考文献

- 1 Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J*

- Gastroenterol* 2003;9:1930-1934
- 2 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
- 3 Zhao XH, Gu SZ, Liu SX, Pan BR. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:665-669
- 4 Chen H, Wang LD, Guo M, Gao SG, Guo HQ, Fan ZM, Li JL. Alterations of p53 and PCNA in cancer and adjacent tissues from concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China. *World J Gastroenterol* 2003;9:16-21
- 5 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤经纬. 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访. *世界华人消化杂志* 2003;11:1279-1281
- 6 沈波, 朱金水. 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1425-1428
- 7 Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1409-1414
- 8 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 9 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- 10 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:35-39
- 11 张国锋, 王元和, 王强. 消化道肿瘤的抗血管生成治疗. *世界华人消化杂志* 2001;9:1180-1184
- 12 吴静, 樊代明. 肿瘤血管生成与肿瘤血管抑制治疗. *世界华人消化杂志* 2001;9:316-321
- 13 张林, 付红梅, 金树珍, 黄润, 周成刚. P⁵³ 过度表达及细胞外基质与胃癌分化、浸润和转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:992-996
- 14 Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of P⁵³, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002;2:1471-2407
- 15 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 16 毛振彪, 肖明兵, 黄介飞, 倪海兵, 倪润洲, 魏群, 张弘. 血管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
- 17 Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y, Sugimachi K. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000;128:408-416
- 18 李江, 王文亮, 刘斌. 人类肝细胞肝癌的细胞凋亡和癌组织内血管形成的调控. *华人消化杂志* 1998;6:1057-1060
- 19 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 20 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:596-601
- 21 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, Jiang LX, Sun XQ, Sheng ZY. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol* 2000;6:353-355
- 22 Yamaguchi K, Ura H, Yasoshima T, Shishido T, Denno R, Hirata K. Liver metastatic model for human gastric cancer established by orthotopic tumor cell implantation. *World J Surg* 2001;25:131-137
- 23 徐卫明, 朱贤立. 碱性成纤维细胞生长因子在幕上星形细胞瘤中的表达及其意义. *癌症* 2000;19:61-65
- 24 陶厚权, 邹寿椿. Rg3 抑制人胃癌血管生成的临床研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1218-1219
- 25 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. The function of apoptosis and protein expression of bcl-2, P53 and *C-myc* in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):27
- 26 Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:216-223
- 27 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p⁵³ and *c-myc* genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:822-826
- 28 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lu XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 29 Teh M, Tan KB, Seet BL, Yeoh KG. Study of P⁵³ immunostaining in the gastric epithelium of CagA-positive and CagA-negative *Helicobacter pylori* gastritis. *Cancer* 2002;95:499-505
- 30 Saito H, Tujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Neoangiogenesis and relationship to nuclear p⁵³ accumulation and vascular endothelial growth factor expression in advanced gastric carcinoma. *Oncology* 1999;57:164-172

肝硬化和肝癌肝组织 Survivin 基因表达与增生的关系

贾克东, 石淑仙, 阮幼冰

贾克东, 江西省人民医院消化内科 江西省南昌市 330006
石淑仙, 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北省武汉市 430030
阮幼冰, 华中科技大学同济医学院超微病理室 湖北省武汉市 430030
贾克东, 男, 1963-08-18 生, 山东省昌乐县人, 汉族, 1986 年青岛医学院本科毕业, 1993 年山东省医学科学院硕士研究生毕业, 2003 年华中科技大学同济医学院博士研究生毕业, 副主任医师, 发表论文 28 篇, 主要从事肝脏及消化疾病的临床医疗及研究工作。
国家自然科学基金资助项目, No. 30070847
项目负责人: 阮幼冰, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院超微病理室. ruanyb@public.wh.hb.cn
电话: 0791-6895621
收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-10-22

Relationship between expression of survivin gene and proliferation of hepatocytes in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma

Ke-Dong Jia, Shu-Xian Shi, You-Bing Ruan

Ke-Dong Jia, Department of Gastroenterology, The People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Shu-Xian Shi, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
You-Bing Ruan, Department of Ultrastructural Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30070847
Correspondence to: Dr. You-Bing Ruan, Department of Ultrastructural Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.
ruanyb@public.wh.hb.cn
Received: 2003-09-15 Accepted: 2003-10-22

Abstract

AIM: To evaluate the usefulness of detection of cell proliferation and survivin gene in choosing liver cirrhosis patients with extremely dangerous for HCC development.

METHODS: Total RNA was extracted from fresh specimens of HCC and liver cirrhosis. Survivin mRNA amplification was performed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Immunostaining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was employed to assess liver cell proliferative activity in formalin-fixed, paraffin-embedded liver specimens. PCNA immunostaining in liver cells of HCC and cirrhosis fresh and archive specimens was performed with monoclonal antibodies directed against CD10. Five liver specimens removed from patients with hemangioma were taken as normal controls. The PCNA labeling index was determined by positive cells in each microscopic field (200 \times) obtained from mean value of positive cells in ten different fields.

RESULTS: RT-PCR was performed in 17 HCC and 21 liver cirrhosis specimens, 11 HCC specimens showed 344 bps

molecular survivin DNA band in 1% agarose electrophoresis, but none of liver cirrhosis specimens showed positive band. The survivin positive rate in HCC specimens was 64.7% (11/17). The median PCNA labeling index of 11 survivin positive HCC specimens was 6.8 (from 0.5 to 40), which was significantly higher than that of 6 survivin negative HCC specimens (2.15), while that of 21 LC and 5 normal liver specimens were 2.47 and 1.56 respectively. By using a cutoff of PCNA labeling index (3.12) obtained by two times of the index value in normal liver specimens, six specimens of 30 liver cirrhosis patients with mean PCNA labeling index 5.05 ± 2.61 were considered high proliferative activity.

CONCLUSION: Expression of survivin is detected in HCC tissues but not in liver cirrhosis tissues, indicating that the gene expression may occur at the late phase of HCC transformation. The PCNA detection can be a good mean in screening the high-risk people with elevated possibility of HCC development among liver cirrhosis patients.

Jia KD, Shi SX, Ruan YB. Relationship between expression of survivin gene and proliferation of hepatocytes in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):550-554

摘要

目的: 了解 Survivin 基因表达与肝硬化细胞增生活性的关系, 探讨测定 Survivin 基因和增生细胞核抗原(PCNA)在肝硬化患者中发现肝癌高危人群的意义。

方法: 以 RNA 提取试剂获得新鲜肝癌及肝硬化组织 RNA, 应用 RT-PCR 法测定 Survivin 基因 mRNA; 应用抗-PCNA 单克隆抗体, 以 SP 免疫组织化学方法测定肝硬化和肝癌组织中的 PCNA。

结果: 测定 21 例肝硬化组织, Survivin 表达全部阴性, 17 例肝癌组织, Survivin 基因阳性 11 例, 阳性率为 64.7%。11 例 Survivin 阳性肝癌组织 PCNA 阳性计数平均值为 6.8 (0.5-40), 显著高于 6 例 Survivin 阴性肝癌组织 2.15 (0.5-3.0)。而 21 例肝硬化组织和 5 例正常肝组织对照 PCNA 计分分别为 2.47 和 1.56。以 5 例正常肝组织 PCNA 阳性细胞计数的 2 倍 (3.12) 作为细胞高增生活性标准, 测定 30 例肝硬化组织, 有 6 例处于高增生状态, 其平均 PCNA 计数为 5.05 ± 2.61 , 细胞增生活性介于其余肝硬化组织和肝癌组织之间。

结论: Survivin 基因仅在肝癌组织表达, 其表达具有高度肿瘤选择性。肝癌细胞增生活性较肝硬化明显升高, 其升高程度与 Survivin 基因的表达有关, 增生活性越高该基因的表达阳性率越高。PCNA 可以很方便的用于肝硬化组织细胞

增生活性的评价,在确定肝硬化人群肝癌发生高危患者方面 PCNA 的测定优于 Survivin 基因的测定。

贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 肝硬化和肝癌肝组织 Survivin 基因表达与增生的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(3):550-554

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/550.asp>

0 引言

肝癌(HCC)是肝硬化(LC)自然病程的一部分, 大约每年平均有 3-10% 的 LC 患者转化为 HCC, HCC 中大约有 80% 的合并有 LC 的存在, 因此 LC 患者是 HCC 发生的高危人群^[1-5]. 在 LC 人群中确定危险因子, 以便进一步发现高危患者, 进行严密的随访, 可及时发现早期 HCC^[6-11]. Survivin 基因是一种凋亡抑制基因, 研究发现该基因在癌组织中表达增强^[12-16]. 应用 RT-PCR 技术和免疫组织化学技术对 HCC 和 LC 组织中 Survivin 基因和增生细胞核抗原(PCNA)进行了测定, 以了解 Survivin 基因在 LC 组织中表达的情况, 以及该基因与 LC 组织细胞增生的关系, 进一步探讨该基因和 PCNA 在 LC 患者中发现 HCC 高危人群及 HCC 早期诊断的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-03/2002-04 期间因肝炎后 LC 手术新鲜肝脏组织 21 例, 男 17 例, 女 4 例, 33-62(平均年龄为 36), 有消化道出血病史 16 例, 有脾功能亢进 6 例, 肝功能 Child-Pugh A 级 7 例, B 级 12 例, C 级 2 例. 新鲜 HCC 患者组织标本 21 例, 男 16 例, 女 5 例, 29-63 (平均年龄 45), 肿瘤直径大于 10 cm 5 例, 多发 6 例. 正常肝组织 5 例来自肝血管瘤手术切除患者. 标本迅速置于 1 g/L DEPC 处理的 0.01 mol/L PBS 配制的 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 2-4 h, 然后一部分常规进行石蜡包埋、切片; 一部分置于 -70 °C 冰箱中保存供提取 RNA 用. 病理室保存标本: HCC 及 LC 组标本各 30 例均取自同济医院 1998/2000 年存档的石蜡块标本. 所有组织切片均经常规 HE 染色, 镜下对原始诊断进行复核. 对 LC 患者肝组织肝纤维化程度进行评分, 评分标准除窦周间隙纤维化未计入外, 其余基本参照 Chevallier SSS 评分法(Hepatology 1994;20:349-355)进行. 对 HCC 患者肝组织根据细胞分化程度参照 Edmondson 分级法(肝病的现代诊断与治疗. 北京: 中国医学科技出版社, 2001: 581-582)分为 4 级. 全部评价过程均由一位资深病理专业教授协助完成。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 应用 RNA 提取试剂(Omega 公司), 取新鲜肝组织 50-100 mg 提取总 RNA, 方法按说明书进行. 提取 RNA 置 -70 °C 储存备用. 引物设计 自 GenBank 中共获得 7 个 Survivin cDNA 序列, 其中 5 个为 429 个碱基组成, 选择同源性最大序列如下: a tgggtgcccc gacgttgccc cctgctgccc agcccttct caaggaccac cgcattctca cattcaagaa ctggcccttc ttgagggct ggcctgcac cccggagcgg

atggccgagg ctggcttcat ccactgcccc actgagaacg agccagactt ggcccagtgt ttcttctgct tcaaggagct ggaaggctgg gagccagatg acgaccccat agaggaacat aaaaagcatt cgtccggttg cgctttcctt tctgtcaaga agcagtttga agaattaacc cttggtgaat ttttgaaact ggacagagaa agagccaaga acaaaattgc aaaggaaacc aacaataaga agaagaatt tgaggaaact gcgagaaaag tgcgcccgtgc catcgagcag ctggctgcca tggattga. 应用计算机辅助软件根据上述序列, 设计引物如下: 上游引物 5' -CCA CCG CAT CTC TAC ATT C-3' 97-115base); 下游引物 5' -CTT TCT CCG CAG TTT CCT C-3' 422-440 base). 引物总长度为 19 bp, 拟扩增 DNA 片段长度为 344 bp. Survivin cDNA 的合成反应总体积为 20 μL, 其中模板 RNA 3 μL(约 1-3 μg), 下游引物 1 μL (50 pmol), RNA 酶抑制剂 0.5 μL, dNTP 1.25 μL, M-MLV 逆转录酶 1 μL (3 334 nkat), H₂O 13.25 μL, 42 °C 反应 60 min, 然后 99 °C 5 min. Survivin DNA PCR 扩增反应总体积为 50 μL, 包括 cDNA 模板 10 μL, PCR buffer 5 μL, 上游引物 1 μL (50 pmol), 去离子水 33 μL, 95 °C 10 min, 然后加入 Tag 酶 1 μL (33 nkat), 石蜡油覆盖, 反应条件为 94 °C 2 min, 94 °C, 30 s 变性, 55 °C 30 s 退火, 72 °C 60 s 延伸, 共循环 30 次, 最后一次 72 °C 延伸 5 min.

1.2.2 PCNA 免疫组织化学 鼠抗 PCNA 单克隆抗体 PC10 (MBI 产品, MAB-0145), 购自福州迈新生物技术开发公司. 免疫组织化学应用北京中山生物技术公司生产的 SP 染色试剂盒, 方法参照说明书进行, 简述如下: 组织切片依次经常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇水合, PBS 冲洗后置 3 mL/L H₂O₂ 中, 室温下 30 min, 以封闭内源性过氧化酶, 滴加正常血清封闭液, 15 min, 甩干后滴加抗 PCNA 单克隆抗体, 37 °C 孵育 2 h, PBS 冲洗, 5 min 3 次, 然后依次按说明书加入生物素化二抗工作液、辣根酶标记链霉卵白素工作液, 最后 DAB 显色. 显微镜下观察每份组织片 PCNA 染色情况, 每份标本在高倍视野(200 ×)下分别观察 10 个视野, 计数每个视野的阳性细胞总数, 最后取平均值作为每份标本的 PCNA 染色计分。

2 结果

2.1 肝组织 Survivin 表达 21 例 HCC 组织, 有 11 例成功扩增出分子量为 344 bp 的 Survivin 特异性条带. 进一步应用 HE 染色对扩增阴性的 10 例 HCC 组织进行检查, 发现其中 3 例光镜下未见到癌组织, 1 例仅见到坏死组织, 因此考虑此 4 例组织取材不准, 其余 17 例 HCC 组织, Survivin 阳性率为 64.7%(11/17). 10 例 LC 组织 RT-PCR 无 1 例扩增出阳性条带(图 1).

2.2 肝组织细胞增生活性 LC 组织与 HCC 组织 PCNA 阳性染色全部位于细胞核, 阳性细胞核着色呈棕黄色, 其中前者 PCNA 阳性细胞以簇状分布为主, 少数散在分布于再生结节的周围, 而后者 PCNA 阳性细胞多数在癌组织内呈弥漫性均匀分布, 且癌结节周围的边缘

性聚集现象表现明显(图2-4). 比较30例LC组织及30例HCC组织的PCNA测定结果, HCC组织肝细胞的增殖活性明显高于LC组织, 其PCNA阳性计分分别为 10.1 ± 12.3 和 2.4 ± 2.1 , 二者比较统计学显示有显著性差异($P=0.003$). 5例正常肝组织PCNA阳性细胞计数分别为0.5, 1.2, 2.3, 2.0, 1.8, 平均值为1.56, 以平均值的2倍作为肝组织高增生状态的标准, 30例LC组织中有6例存在高增生状态, 其PCNA阳性细胞计数分别为3.7, 4.1, 10.1, 3.5, 3.3, 5.6, 平均值为 5.0 ± 2.6 , 其增殖活性介于LC低增生组和HCC组之间($P<0.05$). 24例低增生LC患者肝组织PCNA阳性细胞计数与正常肝组织比较无明显差异($P>0.05$). 同时将19例LC组织进行纤维化程度SSS评分, 与PCNA测定结果进行配对比较, 相关性分析显示二者无明显相关性, 相关系数 $r=0.337$, $P=0.159$, 证明LC组织肝细胞的增生与肝脏纤维化程度无关.

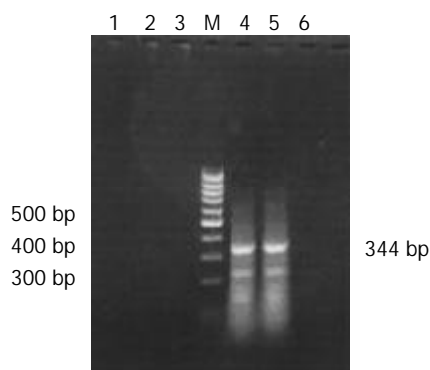


图1 肝组织 Survivin RT-PCR 结果. 1, 6: 正常肝组织; 2, 3: 肝硬化组织; 4, 5: 肝癌组织; M: DNA 标准分子.

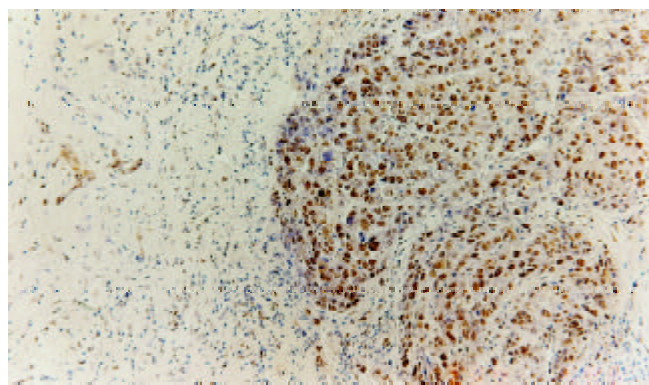


图2 肝癌组织 PCNA 免疫组化染色(高度增生) $\times 100$.

2.3 增殖活性与细胞分化程度的关系 HCC 组织按细胞分化程度分为 I - IV 级, HCC 各级 PCNA 计分分别为 3.7, 9.74, 14.36, 15.7, 进行 Spearman 等级相关分析, 相关系数 $r=0.74$, $P<0.001$. 提示肝癌细胞的增殖活性与恶性程度成正相关.

2.4 增殖活性与 HCC 组织 Survivin 基因表达的关系 11 例 Survivin 阳性的 HCC 组织 PCNA 阳性计数为 6.8 (0.5-40), 6 例 Survivin 阴性 HCC 组织 PCNA 阳性计数为 2.1 (0.5-3.0), 二者相比有显著性差异($P<0.05$), 证明肝癌组

织 Survivin 基因的表达与细胞增生活性升高有关.

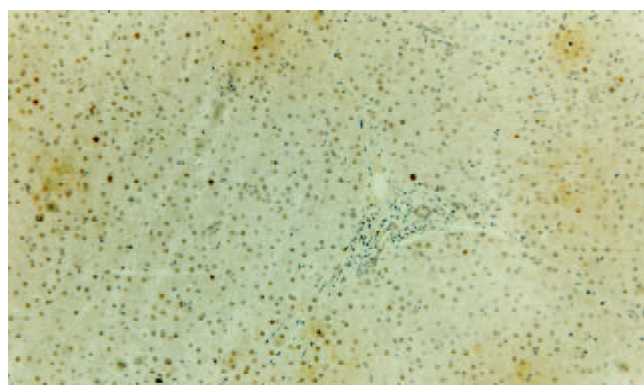


图3 肝硬化组织 PCNA 免疫组化染色(低度增生) $\times 100$.

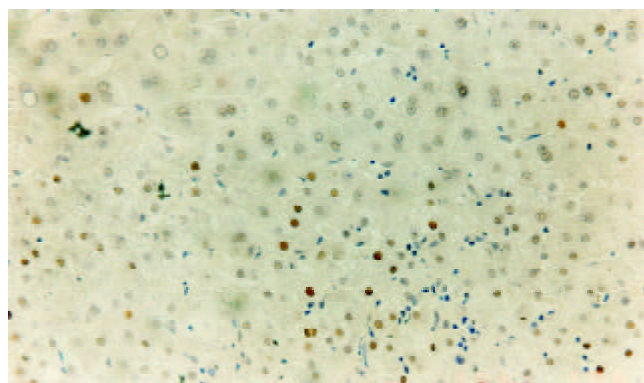


图4 肝硬化组织 PCNA 免疫组化染色(中度增生) $\times 200$.

3 讨论

研究发现肝癌形成过程中, 肝细胞增生活性的升高和凋亡水平的下降共同发挥了重要的作用^[17-18], 但是与细胞凋亡变化相比细胞增生活性的升高是主要的^[19-20]. 已经证实 LC 组织本身存在 O_6 - 甲基鸟嘌呤修复酶的缺陷, 基础研究显示 O_6 - 甲基鸟嘌呤如果不能及时修复容易造成基因突变, 进而引起癌基因的活化和抑癌基因的失活, 最终导致 HCC 的发生, LC 患者修复酶的缺陷使 O_6 - 甲基鸟嘌呤持续存在, 加上肝细胞增生活性的增强, 构成了 LC 组织 HCC 发生的分子生物学基础(J Hepatobiliary Pancreat Surg 1998;5:355-366).

临床资料证实 LC 患者肝细胞增生活性的升高是 HCC 发生的最重要危险因子, Donato et al^[21] 以 PCNA 作为细胞增生指标对 208 例肝硬化患者的肝脏组织标本的细胞增生情况进行了分析, 然后进行了为期 88 ± 42 mo 的前瞻性研究, 发生肝癌的 50 例患者和 158 例未发生肝癌的患者 PCNA 指数分别为 $3.6 \pm 2.4\%$ 和 $1.6 \pm 1.5\%$. 以研究起始 PCNA 指数 2% 为标准, 将患者分为高风险组和低风险组, 结果 80 例 PCNA 大于 2% 的高风险组患者, HCC 年发生率为 5.2%, 而 PCNA 小于 2% 的低风险组患者发生率仅为 1.1%. Sangiovannio et al^[22] 以流式细胞仪测定研究起始肝硬化组织标本细胞处于增生周期 S 期的比值, 随访 97 例肝硬化患者, 平均随访

时间为 53 mo, 结果共发生 HCC 12 例, 12 例肝癌患者为 $2.5 \pm 1.6\%$, 显著高于未发生肝癌的肝硬化患者 ($0.9 \pm 0.6\%$), 以 S 期细胞大于或等于 1.8% 将患者分为细胞高增生组和低增生组, 高增生组 HCC 发生率为 60%, 而低增生组为 4%, 进一步证明肝硬化患者细胞增生活性升高是肝癌发生的危险因素。

我们应用针对 PCNA 的 PC10 单克隆抗体的免疫组织化学技术, 通过对 30 例 LC 和 30 例 HCC 组织的研究, 结果显示 HCC 组织肝细胞增生活性明显高于 LC 组织, 其 PCNA 计数分别为 10.08 和 2.38, 显示了肝细胞增生在 HCC 进展中的作用。在 LC 组织中有 20%(6 例)患者 PCNA 计数超过正常肝组织的 2 倍, 其增生活性虽低于 HCC 组织, 但与其他 LC 组织及正常肝组织相比均显著升高, 提示存在 HCC 发生的高度危险性, 应进行严密的临床随访, 以及早发现 HCC 的发生。我们发现肝细胞的 PCNA 阳性细胞指数与肝组织纤维化程度的 SSS 评分无明显相关性, 相关系数 $r = 0.337$, $P > 0.05$, 证明 LC 组织肝细胞的增生活性与肝脏纤维化程度无关, 同时间接证明了 LC 患者 HCC 发生的直接原因是其他原因诱发的肝细胞高增生活性, 而不是肝纤维化本身。Survivin 基因是近年来研究的一个重要凋亡抑制基因, 与其他凋亡抑制基因不同, 其表达具有很强的组织特异性, 在胚胎性组织及包括胃癌^[23]、乳腺癌^[24]、结直肠癌^[25]、胰腺癌^[26]等大多数的肿瘤组织中表达, 但在正常发育成熟的组织不表达。除了抗凋亡的功能外, 最近研究显示。

Survivin 基因的表达与 HCC 患者细胞增生活性的增强有关, 通过对细胞增生凋亡平衡的破坏, 在肝癌发生过程中发挥重要的作用^[27-28]。Ito et al^[29]应用免疫组织化学测定 20 例 HCC 组织, 结果显示 Survivin 蛋白阳性 14 例, 而在相应的周围慢性肝炎和 LC 组织中均未发现该蛋白的表达。陈涛 et al^[28]应用上述同样方法测定 48 例 HCC, 结果 Survivin 蛋白表达阳性率为 64.6%, 且表达阳性率与 HCC 恶性程度、细胞增生凋亡比成正相关。我们测定 17 例 HCC 组织, Survivin 基因表达阳性 11 例, 阳性表达率为 64.7%(11/17), 11 例 Survivin 阳性 HCC 组织平均 PCNA 计数为 9.68 ± 11.64 , 显著高于 6 例 Survivin 阴性 HCC 组织 (3.27 ± 1.73), 与上述研究结果相一致, 进一步证明该基因的表达同时伴有肝细胞增生活性的升高。Survivin 基因的表达是一个渐进过程, 在由癌前细胞向癌细胞转化过程中, 其表达水平逐渐升高, 组织学正常的组织, Survivin 阳性提示正常细胞已经发生了向癌细胞的转变, 因而认为该基因的测定可以用于肿瘤的早期诊断^[30]。然而, Ikeguchi et al^[27]曾经对 61 例 HCC 结节周围组织进行了测定, 结果 Survivin 基因表达全部阴性, 由此认为该基因的表达仅发生于 LC 组织中已经转化的癌细胞, 我们所观察的结果与上述结果一致, 21 例 LC 组织 Survivin 基因表达全部阴性, 分析可能与本研究中的 LC 组织全部未出现癌性转变有关。

根据上述结果我们认为 Survivin 基因表达的测定可以用于 HCC 的早期诊断, 但无法区分处于 HCC 发生高危阶段的 LC 患者。

肝细胞的增生与 Survivin 基因的表达不仅与 HCC 的发生有关, 而且也与 HCC 的预后和复发有关^[21, 31]。我们测定 17 例 HCC 组织, 其中 11 例 Survivin 阳性 HCC 组织 PCNA 阳性计数显著高于 6 例阴性组织 ($P < 0.05$), 而且 HCC 细胞 PCNA 阳性计数与 HCC 分化程度呈正相关, 分化越差, PCNA 计数越高, 充分说明二者在 HCC 预后方面具有较高的一致性。鉴于 Survivin 基因的表达发生在 HCC 阶段, 推测处于 HCC 发生高危阶段的 LC 患者可能仅仅表现为细胞增生活性的增加, 而并未出现基因型的癌性改变, 故针对 Survivin 基因的测定不适合在 LC 患者中对 HCC 发生高危人群的筛选, 加之该方法步骤复杂, 技术要求和对组织的要求均较高, 因此我们认为该方法很难适用于临床应用。而 PCNA 免疫组织化学技术可以有效测定 LC 患者肝细胞增生活性, 及时发现 HCC 高危人群, 配合影像学及血清学检查, 实现 HCC 的早期诊断。

4 参考文献

- 1 Wu GC, Zhou WP, Zhao YR, Guo SH, Wang ZY, Zou SB, Zhang QH, Ren H, Huang AL, Zhang DF. The natural history of chronic hepatitis B: a retrospective study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:566-570
- 2 Kim YS, Um SH, Ryu HS, Lee JB, Lee JW, Park DK, Kim YS, Jin YT, Chun HJ, Lee HS, Lee SW, Choi JH, Kim CD, Hyun JH. The prognosis of liver cirrhosis in recent years in Korea. *J Korean Med Sci* 2003;18:833-841
- 3 Miyazawa K, Moriyama M, Mikuni M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Yamagami H, Kaneko M, Shioda A, Tanaka N, Arakawa Y. Analysis of background factors and evaluation of a population at high risk of hepatocellular carcinoma. *Intervirolgy* 2003;46:150-156
- 4 Findor J, He XS, Sord J, Terg R, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev* 2002;1:220-225
- 5 Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, Piscaglia F, Gramantieri L, Zanetti M, Sherman M. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 2001;48:251-259
- 6 McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, Dunaway E, Williams J. Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16-year population-based study. *Hepatology* 2000;32:842-846
- 7 Yuen MF, Cheng CC, Laufer JJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330-335
- 8 Trevisani F, De NS, Rapaccini G, Farinati F, Benvegno K, Zoli M, Grazi GL, Del PP, Di N, Bernardi M. Italian liver cancer group. Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects on cancer stage and patient survival (Italian experience). *Am J Gastroenterol* 2002;97:734-744
- 9 Henrion J, Libon E, De Maeght S, Deltenre P, Schapira M, Ghilain JM, Maisin JM, Heller FR. Screening for hepatocarcinoma in a cohort with cirrhosis mainly of alcoholic origin. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:534-539

- 10 Chen TH, Chen CJ, Yen MF, Lu SN, Sun CA, Huang GT, Yang PM, Lee HS, Duffy SW. Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high risk group in Taiwan. *Int J Cancer* 2002;98:257-261
- 11 Goodman M, Ueyama N, Naider F. Conformational studies of alanine oligopeptides by nuclear magnetic resonance. *Biopolymers* 1975;14:901-914
- 12 Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, Shroyer KR. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001;32:119-125
- 13 Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001;8:305-310
- 14 O' Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13103-13107
- 15 Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:635-640
- 16 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001;108:981-990
- 17 Park YN, Chae KJ, Kim YB, Park C, Theise N. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis. *Cancer* 2001;92:2733-2738
- 18 Chen GG, Lai PB, Chak EC, Xu H, Lee KM, Lau WY. Immunohistochemical analysis of pro-apoptotic Bid level in chronic hepatitis, hepatocellular carcinoma and liver metastases. *Cancer Lett* 2001;172:75-82
- 19 Pizem J, Marolt VF, Luzar B, Cor A. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non-neoplastic liver tissue. *Pflugers Arch* 2001;442:R174-176
- 20 Paiva C, Oshima CT, Lanzoni VP, Forones NM. Apoptosis, PCNA and p53 in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1058-1061
- 21 Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, Ronchi G, Lampertico P, Morabito A, Balestrieri MR, Colombo M. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology* 2001;34:523-528
- 22 Sangiovanni A, Colombo E, Radaelli F, Bortoli A, Bovo G, Casiraghi MA, Ceriani R, Roffi L, Redaelli A, Rossini A, Spinzi G, Minoli G. Hepatocyte proliferation and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1575-1580
- 23 Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer* 2002;86:737-743
- 24 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134
- 25 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000;46:645-650
- 26 Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001;92:271-278
- 27 Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3131-3136
- 28 陈涛, 贾玉容, 田伏洲, 蔡忠红, 李广阔. 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:411-414
- 29 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-1085
- 30 Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032
- 31 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-1945

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《World Journal of Gastroenterology, WJG》主要开设以下栏目. (1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文. (2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文. (3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果. (4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文. (5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果. (6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案.

AgNORs 计数 DNA 含量及 PCNA 与肝硬化增生结节和肝癌的关系

牛兆山, 张昭成

牛兆山, 张昭成, 青岛大学医学院病理学教研室 山东省青岛市 266021
牛兆山, 男, 1964-03-25 生, 山东省青岛市人, 汉族. 1986 年滨州医学院毕业, 讲师, 主要从事肝细胞癌的病理研究.
山东省教育委员会科研基金资助课题, No. J94K26
项目负责人: 张昭成, 266021, 山东省青岛市登州路 38 号, 青岛大学医学院病理学教研室.
电话: 0532-3812410
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-16

Correlation of AgNORs, DNA contents and PCNA expression with liver cirrhosis, hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma

Zhao-Shan Niu, Zhao-Cheng Zhang

Zhao-Shan Niu, Zhao-Cheng Zhang, Department of Pathology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Supported by the Scientific Research Fundation of Shandong Provincial Education Committee, No. J94K26
Correspondence to: Zhao-Cheng Zhang, Department of Pathology, Qingdao University Medical College, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. nzsmxh@public.qd.sd.cn
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To study the relationship between liver cirrhosis (LC), liver hyperplastic nodules (LHN) and hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Silver colloid, image analysis and immunohistochemical technique were used to examine AgNORs counts, DNA contents and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in LC, LHN and HCC.

RESULTS: In LHN, the AgNORs counts, DNA contents and the expression of PCNA were significantly higher than those in the normal liver and LC ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, respectively); the AgNORs counts approached those in HCC grade I ($P > 0.05$), and the DNA contents approached those in HCC ($P > 0.05$). There was no significant difference of AgNORs counts, DNA contents and the expression of PCNA between LC and the normal liver tissues.

CONCLUSION: LHN and LC are two different cell population with various characteristics; LHN is actively proliferative lesions and should be considered as a preneoplastic lesion of HCC, while LC represents mature liver cells and does not contribute directly to the hepatocarcinogenesis.

Niu ZS, Zhang ZC. Correlation of AgNORs, DNA contents and PCNA expression with liver cirrhosis, hyperplastic nodules and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):555-558

摘要

目的: 探讨肝硬化(LC)、增生结节与肝细胞癌(HCC)之间的关系.

方法: 分别应用银染色技术、图像分析及免疫组织化学技术检测 LC、增生结节及 HCC 中 AgNORs 计数、DNA 含量及增生细胞核抗原(PCNA)的表达.

结果: 增生结节中, 其 AgNORs 计数、DNA 含量及 PCNA 的表达均与正常肝组织和 LC 组织有明显差异(P 分别 < 0.01 , 0.05 , 0.05); 其中 AgNORs 计数与 I 级 HCC 相近($P > 0.05$), DNA 含量与 HCC 相近($P > 0.05$). LC 组织和正常肝组织间的 AgNORs 计数、DNA 含量及 PCNA 的表达差异均无显著性(P 均 > 0.05).

结论: 增生结节与 LC 是两种不同性质的细胞群体, 前者属于活跃增生性病变, 是 HCC 的癌前期病变, 后者仍为成熟的细胞, 与 HCC 的发生没有直接关系.

牛兆山, 张昭成. AgNORs 计数 DNA 含量及 PCNA 与肝硬化增生结节和肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):555-558
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/555.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1-12]. 近年来其发病率及死亡率有明显的上升趋势, 因此研究 HCC 的发病机制对于此病的预防和治疗具有十分重要的意义. 许多研究表明, 细胞恶变最突出的特征是失去生长抑制而异常增生, 因此正确估计肿瘤组织细胞增生活性, 对研究肿瘤的生物行为具有重要意义. 我们检测能够用来评估细胞增生活性的参数 AgNORs 计数、DNA 含量及 PCNA 的表达, 旨在探讨 LC、增生结节和 HCC 之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 我院普外科 1986/1991 年手术切除或活检的 HCC 标本 100 例. 男 76 例, 女 24 例, 平均年龄 50.4 岁. 术前均没有接受化放疗. 组织经酒精固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚连续切片. 我们分别随机选取 48 例标本检测 AgNORs 计数和 DNA 含量, 70 例标本检测 PCNA 表达. 同时进行这三项指标检测的有 18 例(因病例较少, 本文未做三者的相关性分析). 在 48 例 HCC 标本中, 根据

细胞分化程度分为 I, II, III 级, 分别为 8, 30 和 10 例, 48 例标本均有癌旁组织, 其中 18 例伴有增生结节, 16 例伴有 LC, 13 例伴有正常肝组织. 在 70 例 HCC 标本中, 53 例伴有癌旁组织, 其中 32 例伴有增生结节, 31 例伴有 LC, 12 例伴有正常肝组织, 23 例同时伴有增生结节和 LC.

1.2 方法 AgNORs 染色采用 Ploto 改良法, 每张切片随机计数 100-150 个细胞核内 AgNORs 数(双核及多核细胞分别计数每个核内 AgNORs 数), 再换算成每个核内 AgNORs 平均数. 在显微镜下用测微仪测量 AgNORs 的最大直径. 采用 Feulgen 方法测 DNA, 用德国 Opton 公司 Vidas 型全自动图像分析仪测定 DNA 含量, 以积分吸光度值(OD)表示细胞核 DNA 的相对含量. 每张切片随机测 100 个以上细胞核, 同时测同一张切片 100 个以上淋巴细胞, 取其平均 OD 值作为正常二倍体对照. 按下列公式计算每例 DNA 倍体值: 每例 DNA 倍体值 = (每例平均 OD 值 / 淋巴细胞平均 OD 值) \times 2. PCNA 染色采用免疫组织化学 SP 法, PCNA(PC10)及 SP 试剂盒均为美国 Dako 公司产品, 以已知阳性切片作为阳性对照, PBS 代替 I 抗作阴性对照; PCNA 阳性分级按下述标准记录: 每例切片连续观察 10 个高倍视野, 每个视野计 100 个细胞中阳性细胞数, 取其平均值, 阳性细胞数 0-25% 为 I 级; 26-50% 为 II 级; 51-75% 为 III 级; 76-100% 为 IV 级.

统计学处理 应用 t 检验和 χ^2 检验.

2 结果

2.1 AgNORs 计数 AgNORs 主要呈两种形态, 一种呈团块状较大颗粒, 由许多小颗粒聚集而成, 相当于核仁本身(即主核仁)中的 AgNORs(此种大团块计为一个颗粒), 另一种为散在于细胞核内较小的银染颗粒. 正常肝细胞大多含 1 个 AgNORs, 少数 2-3 个, 平均 1.54 ± 0.66 , 颗粒大小较一致, 直径大于 $2 \mu\text{m}$ 的 AgNORs 每 100 个核中平均为 4 个. LC 组织大多数细胞形态正常, AgNORs 计数于正常肝细胞相近, 多数细胞含有 1 个 AgNORs, 少数 2-3 个, 个别 3-4 个, 平均 1.75 ± 0.78 . 大多数 AgNORs 在 $1-2 \mu\text{m}$, 直径大于 $2 \mu\text{m}$ 的每 100 个核中平均 19 个. HE 切片中可见直径大于 $2 \mu\text{m}$ AgNORs 的细胞多数是散在的, 体积大, 胞质丰富呈嗜酸性的毛玻璃样肝细胞. 嗜酸性细胞增生结节由胞质丰富、嗜酸性的毛玻璃样肝细胞组成. 此种细胞核大, 核仁较正常肝细胞明显增大、增多. AgNORs 计数在 1-5 之间, 平均 2.45 ± 1.11 , 大小变化较大, 直径大于 $2 \mu\text{m}$ 的 AgNORs 显著增多, 每 100 个核中平均 43 个. HCC 组织 AgNORs 数为 1-11 个之间, 平均 4.36 ± 1.63 (其中 I 级 HCC 平均 2.73 ± 1.31 , II 级 4.43 ± 1.72 , III 级 5.48 ± 2.70). 直径 $0.5-6 \mu\text{m}$, 颗粒较多的相对较小, 颗粒较少的相对较大, 每 100 个核中直径大于 $2 \mu\text{m}$ 的 AgNORs 数平均为 44 个.

LC 组织中 AgNORs 计数与正常肝组织相比无统计

学差异($t=0.77$, $P>0.05$), 与 I 级 HCC 相比有明显差异($t=2.31$, $P<0.05$); 嗜酸性细胞增生结节 AgNORs 计数显著高于正常肝组织和 LC 组织($t=2.89$, 2.51 , $P<0.01$, $P<0.05$), 而与 I 级 HCC 相近($t=0.38$, $P>0.05$). 100 个核中直径大于 $2 \mu\text{m}$ 的 AgNORs 平均数中, LC 显著高于正常肝组织($\chi^2=9.63$, $P<0.01$); 嗜酸性细胞增生结节及 HCC 显著高于 LC ($\chi^2=13.46$, 14.48 , P 均 <0.01), 而前二者间无差异($\chi^2=0.02$, $P>0.05$, 见表 1).

表 1 HCC 组织中 AgNORs 计数及大小与 DNA 倍体数

组织分类	n	AgNORs 计数		DNA 含量 (mean \pm SD)
		(mean \pm SD)	直径 $>2 \mu\text{m}/100$	
正常	13	1.54 ± 0.66	4	4.85 ± 0.59
LC	16	1.75 ± 0.78	19	5.37 ± 0.84
增生结节	18	2.45 ± 1.11	43	7.81 ± 2.92
HCC	48	4.36 ± 1.63	44	7.18 ± 3.40
I 级	8	2.73 ± 1.31		5.49 ± 1.11
II 级	30	4.43 ± 1.72^a		7.94 ± 4.23
III 级	10	5.48 ± 2.70		7.04 ± 2.34

^a $P<0.05$, ^a $t=2.59$, $P<0.05$, vs I 级.

2.2 DNA 含量测定 正常肝细胞、LC、增生结节、HCC 组织 DNA 含量均为多倍体. 正常肝组织 DNA 倍体数为 3.0-6.34, 平均 4.85 ± 0.59 . LC 组织中为 5.04-6.72, 平均 5.37 ± 0.84 . 增生结节为 4.12-14.22, 平均 7.81 ± 2.92 . HCC 组织为 3.38-17.6. 平均 7.18 ± 3.40 . 其中 LC 组织 DNA 含量与正常肝组织间无差异($t=1.88$, $P>0.05$); 增生结节与 HCC DNA 含量均显著高于 LC 组织($t=3.22$, 2.09 , P 分别 <0.01 和 0.05), 前二者间 DNA 含量相近($t=0.69$, $P>0.05$, 见表 1).

2.3 PCNA 检测 PCNA 阳性显色呈棕色颗粒状, 均定位于细胞核内. HCC 细胞 PCNA 多数呈阳性表达(图 1), 但数量和分布具有异质性; LC 组织中只有少量 PCNA 阳性细胞, 呈单个散在分布; 增生结节 PCNA 阳性细胞所占比例介于 HCC 与 LC 组织之间, 其中 1 例增生结节 PCNA 呈强阳性表达(图 2). 经统计学处理, PCNA 阳性细胞分级 HCC 大于增生结节大于 LC 和正常肝组织($\chi^2=6.69$, 8.45 , P 均 <0.05); 而 PCNA 阳性分级在 LC 及正常肝组织间差异无显著意义($\chi^2=0.002$, $P>0.05$, 见表 2).

表 2 PCNA 在 HCC 组织的表达结果

组织分类	n	PCNA 分级			
		I	II	III	IV
正常	12	10	2	0	0
LC	31	26	5	0	0
增生结节	32	18 ^a	11 ^a	2 ^a	1 ^a
HCC	70	32 ^c	15 ^a	16 ^c	7 ^c

^a $P<0.05$, ^c $\chi^2=6.69$, vs 增生结节; ^a $P<0.05$, ^a $\chi^2=8.45$, vs LC 和正常.

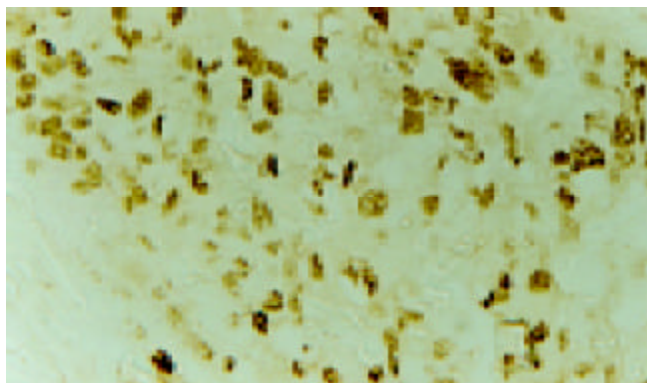


图1 PCNA 在 HCC 中的阳性表达. SP×200.

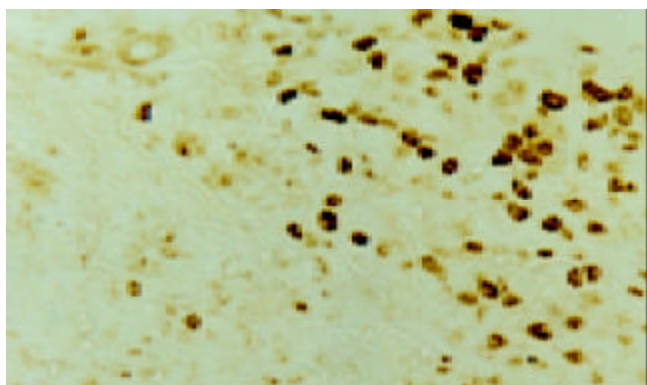


图2 PCNA 在增生结节中的阳性表达. SP×200.

3 讨论

AgNORs与细胞增生和恶性转化密切相关^[13-15]. DNA是细胞增生分化的物质基础, DNA含量能反映肿瘤细胞的增生活性, 并可区分瘤性病变与非瘤性病变^[16-18]. PCNA表达及合成与细胞增生周期有关, G₁期PCNA逐渐增多, S期达到高峰, 故PCNA已被广泛应用于肿瘤研究中^[12]. 本结果表明, LC结节与增生结节在AgNORs计数、形态大小、DNA含量、PCNA表达以及与HCC关系等方面有许多不同之处. LC结节中大多数肝细胞形态正常, 其AgNORs计数、大小、DNA含量及PCNA表达与正常肝细胞相似($P > 0.05$), 而与I级HCC有明显的差异($P < 0.05$). 增生结节AgNORs计数、每100个核中直径大于2 μm的AgNORs数、DNA含量及PCNA增生指数明显多于LC结节($P < 0.05$); 且增生结节AgNORs计数与I级HCC相近($P > 0.05$), DNA含量与HCC相近($P > 0.05$). 表明增生结节中细胞大多处于细胞周期的S期(DNA合成期), 分裂、代谢旺盛; 而LC结节中的细胞大多处于静止状态, 是一种高度成熟的细胞. 提示增生结节与LC结节为明显不同的两种病变.

AgNORs颗粒的大小与细胞的增生状态有一定关系. 有研究表明^[19], 直径大于2 μm、粗大、不规则的AgNORs(核仁型)的增多具有重要意义, 表明细胞处于增生状态; 而圆形较规则直径为1-2 μm的AgNORs表明细胞处于静止状态. 本结果显示, LC结节、增生结节、HCC组织中直径大于2 μm的AgNOR颗粒明显多于正常肝组

织, 增生结节及HCC组织又明显多于LC ($P < 0.05$), 而前二者间无差异($P > 0.05$). 提示LC组织散在的毛玻璃样肝细胞、增生结节及HCC组织均为活跃增生细胞. HE切片显示, LC组织中AgNORs颗粒大于2 μm的细胞, 绝大多数为散在的嗜酸性毛玻璃样肝细胞, 这种散在的肝细胞是与正常肝组织性质完全不同的新的细胞群体, 其可以在无LC的组织中出现, 故与LC没有直接关系, 从而表明LC组织中AgNORs计数、大小及DNA含量高于正常肝组织, 与嗜酸性细胞有直接关系. LC结节(或没有LC)散在嗜酸性毛玻璃样肝细胞, 不论在细胞形态、还是AgNORs计数及DNA含量等具有与嗜酸性细胞增生结节细胞相同的特点, 提示其为嗜酸性细胞增生结节的来源细胞, 可进一步发展为嗜酸性细胞增生结节.

多年来, 人们普遍认为LC与HCC关系密切, 并认为LC与HCC的发生有关. 较多的研究认为, 肝腺瘤样增生为HCC的癌前期病变^[20-24]. 但近年来, 有的研究对此提出异议, 我们以前的研究表明, 增生结节为肝癌的癌前期病变, 而LC与HCC发生的关系并不明显^[25]. 在欧、美国家, 酒精是引起LC的主要原因, 但HCC的发病率却较低; 四氯化碳可以引起LC, 但不能引起HCC. 我们认为我国HCC伴有LC的比例明显高于欧、美国家的原因是与HBV感染有关, LC与HCC是伴随关系. 本研究中, 从LC、增生结节到I级, II级, III级HCC, 细胞形态从正常逐渐出现异常, 异型性逐渐增大, AgNORs计数、DNA含量逐渐增多, 表明AgNORs计数、DNA含量与肝细胞分化程度有一定关系, 而分化差的病变其肝细胞的PCNA增生指数显著增高^[26-28]. 许多研究都表明, 具有高度细胞增生活性的病变可被视为HCC的癌前期病变^[20, 29-32]. 我们的研究结果显示, 癌旁的增生结节具有比LC结节更高的增生活性, 与HCC相近, 从而提示: LC组织增生能力有限, 而增生结节处于活跃增生状态和低分化状态, 具有恶性转化的高度危险性; 持续增生的增生结节至少有一部分已发生恶性转化, 具有与HCC相同或相似的某些生物学行为, 是HCC的癌前期病变; 细胞增生活性的增高, 在HCC的发生和维持方面可能发挥重要作用.

4 参考文献

- Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- Ho MK, Lee JM, Chan CK, Ng IO. Allelic alterations in nontumorous liver tissues and corresponding hepatocellular carcinoma from Chinese patients. *Hum Pathol* 2003;34:699-705
- Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- Fan ZR, Yang DH, Cui J, Qin HR, Huang CC. Expression of

- insulin like growth factor II and its receptor in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2001;7:285-288
- 6 Wang Q, Lin ZY, Feng XL. Alterations in metastatic properties of hepatocellular carcinoma cell following H-ras oncogene transfection. *World J Gastroenterol* 2001;7:335-339
- 7 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 8 Cao XY, Liu J, Lian ZR, Clayton M, Hu JL, Zhu MH, Fan DM, Feitelson M. Differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma induced by woodchuck hepatitis B virus in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:575-578
- 9 Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002;13:1929-1939
- 10 Zeng WJ, Liu GY, Xu J, Zhou XD, Zhang YE, Zhang N. Pathological characteristics, PCNA labeling index and DNA index in prognostic evaluation of patients with moderately differentiated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1040-1044
- 11 Huang JZ, Xia SS, Ye QF, Jiang HY, Chen ZH. Effects of p16 gene on biological behaviours in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:84-88
- 12 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
- 13 Derenzini M, Trete D. Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNOR). *Pathologica* 2001;93:99-105
- 14 Pich A, Margaria E, Chiusa L. Significance of the AgNOR in tumor pathology. *Pathologica* 2002;94:2-9
- 15 Chen M, Lee JC, Lo S, Shen J. Argyrophilic nuclear organizer regions in nasopharyngeal carcinoma and paraneoplastic epithelia. *Head Neck* 2003;25:395-399
- 16 Zuo LF, Lin PZ, Qi FY, Guo JW, Liu JH. Flow cytometric analysis of DNA, telomerase content and multi-gene expression in esophageal epithelial dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2409-2412
- 17 Konarska L, Skierski J, Ellert A, Steinbrich J, Wozniak A, Kalczak M. Comparative studies of nuclear DNA content in benign and malignant thyroid lesions. *Acta Biochim Pol* 2001;48:783-7793
- 18 Li LX, Crotty KA, Scolyer RA, Thompson JF, Kril JJ, Palmer AA, McCarthy SW. Use of multiple cytometric markers improves discrimination between benign and malignant melanocytic lesions: a study of DNA microdensitometry, Karyometry, Argyrophilic staining of nucleolar organizer regions and MIBL-Ki67 immunoreactivity. *Melanoma Res* 2003;13:581-586
- 19 Chen M, Lee JC, Wu X, Lo S. Morphometric analysis of AgNORs in nonkeratinizing carcinoma and adjacent normal epithelia in the nasopharynx. *Anal Quant Cytol Histol* 2002;24:173-177
- 20 Park YN, Chae KJ, Kim YB, Park C, Theise N. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis. *Cancer* 2001;92:2733-2738
- 21 Ishikawa M, Yogita S, Miyake H, Fukuda Y, Harada M, Wada D, Tashiro S. Differential diagnosis of small hepatocellular carcinoma and borderline lesions and therapeutic strategy. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1591-1596
- 22 Miskad UA, Yano Y, Nakaji M, Kishi S, Itoh H, Kim SR, Ku Y, Kuroda Y, Hayashi Y. Histological study of PIVKA-II expression in hepatocellular carcinoma and adenomatous hyperplasia. *Pathol Int* 2001;51:916-922
- 23 Nita ME, Alves VA, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Mello ES, Gama-Rodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:39-48
- 24 Ishikawa M, Sasaki K, Chikaishi H, Miyauchi T, Fukuda Y, Miyake H, Yogita S, Tashiro S. A case of adenomatous hyperplasia in the liver with chronic hepatitis C that transformed into hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2002;24:316
- 25 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p53 and C-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:822-826
- 26 Pizem J, Marolt VF, Luzar B, Cor A. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non-neoplastic liver tissue. *Pflugers Arch* 2001;442(6 Suppl 1): R174-176
- 27 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 28 Nakano A, Watanabe N, Nishizaki Y, Takashimizu S, Matsuzaki S. Immunohistochemical studies on the expression of P-glycoprotein and p53 in relation to histological differentiation and cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003;25:158-165
- 29 Chen M, Lee JC, Wu X, Lo S. Morphometric analysis of AgNORs in nonkeratinizing carcinoma and adjacent normal epithelia in the nasopharynx. *Anal Quant Cytol Histol* 2002;24:173-177
- 30 Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2003;31:126-133
- 31 Kwon Y, Lee SK, Kim JS, Ro JY, Yu E. Synchronous hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma arising in two different dysplastic nodules. *Mod Pathol* 2002;15:1096-1101
- 32 Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2003;31:126-133

World Journal of Gastroenterology 出版周期

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将从2004年起由月刊改为半月刊,以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期,力争论文的投稿时滞控制在1-4个月内出版,并进入Science Citation Index-Expanded及Index Medicus/MEDLINE等国际著名检索系统,以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位。例如,2003年第10期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用PMOD和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术:76例”,是一篇具有国际领先水平的论文,该文从收稿至出版仅用45天。

鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响

马 力, 张月宁

马力, 张月宁, 兰州医学院第二附属医院消化内科 甘肃省兰州市 730030
马力, 男, 1944-09-15 生, 甘肃省临潭县人, 汉族. 1967 年兰州医学院本科毕业, 1982 年第二军医大学硕士毕业, 教授, 硕士生导师. 主要从事消化系统疾病、消化内镜的临床与实验研究.
电话: 0931-8942371
项目负责人: 马力, 730030, 甘肃省兰州市, 兰州医学院第二附属医院消化内科.
电话: 0931-8942371
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-10-18

Effects of seminal oil emulsion of *Brucea javanica* on apoptosis and apoptosis-related genes in human hepatocellular carcinoma cells

Li Ma, Yue-Ning Zhang

Li Ma, Yue-Ning Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Correspondence to: Dr. Li Ma, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-10-18

Abstract

AIM: To explore the anti-tumor mechanism of seminal oil emulsion of *Brucea javanica* by studying in vitro its effects on apoptosis, cell cycle and expression of apoptosis-related genes p53 and Bcl-2 in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: Anti-proliferation effect was measured by MTT assay. The morphology of cells was observed under transmission electron microscope. Agarose gel electrophoresis was used to analyze DNA character and the flow cytometry to detect apoptotic rate and cell cycle distribution. The levels of p53 and Bcl-2 protein were examined by immunocytochemical staining.

RESULTS: The proliferation of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 could be remarkably inhibited by seminal oil emulsion of *Brucea javanica* in a time- and concentration-dependent manner. Morphological and biochemical changes characteristic of apoptosis were observed through electron microscope and agarose gel electrophoresis. After 12, 24, 48 h incubation with 0.10 g/L emulsion of seminal oil of *Brucea javanica*, the flow cytometry showed typical subdiploid peaks and the cell cycle was arrested at G0/G1 phase ($P < 0.05$). The expression of p53 and Bcl-2 was down-regulated after exposure to the drug, with a positive correlation between them ($r = 0.966$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Seminal oil emulsion of *Brucea javanica* can significantly inhibit the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 in vitro through inducing apoptosis and arresting cell cycle at G0/G1 phase, and its

underlying mechanism is related to the down-regulating mutant type p53 as well as Bcl-2, with p53 pathway playing a leading role.

Ma L, Zhang YN. Effects of seminal oil emulsion of *Brucea javanica* on apoptosis and apoptosis-related genes in human hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):559-562

摘要

目的: 研究鸦胆子油乳体外诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的作用及对细胞周期和凋亡相关基因 p53 和 Bcl-2 表达的影响, 探讨其抗肿瘤机制。

方法: MTT 法检测鸦胆子油乳不同浓度和作用时间对肝癌细胞的抑制增生作用; 透射电镜观察细胞形态学改变; 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 特征; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期分布; 免疫细胞化学染色检测 p53 和 Bcl-2 的表达。

结果: 鸦胆子油乳对人肝癌细胞 SMMC-7721 具有显著的抑制增生作用, 且有时间和浓度依赖性。透射电镜和凝胶电泳可观察到凋亡特征性的形态学和生化特征改变。0.10 g/L 鸦胆子油乳作用 12, 24, 48 h 后, 流式细胞仪分析可见典型的亚二倍体峰, 细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。p53 和 Bcl-2 在经鸦胆子油乳作用后表达水平均下降, 二者呈正相关 ($r = 0.966$, $P < 0.05$), p53 下降更为明显。

结论: 鸦胆子油乳体外对肝癌细胞 SMMC-7721 有显著的抑制增生作用, 能诱导凋亡、阻滞细胞周期于 G0/G1 期, 抑制 p53 和 Bcl-2 的表达是其重要机制, 其中 p53 途径起主导作用。

马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):559-562

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/559.asp>

0 引言

诱导肿瘤细胞凋亡是许多化疗药物(也包括一些中药)发挥抗肿瘤作用的主要机制之一^[1-4]。肿瘤细胞凋亡与化疗敏感性有关, 凋亡调控机制障碍对刺激不敏感是肿瘤耐药的重要原因^[5-8]。诱导肿瘤细胞凋亡及寻找有效的凋亡诱导药物仍是目前肿瘤治疗研究的热点之一^[9-13]。细胞凋亡是诱导基因、抑制基因和双向控制基因相互作用的结果, p53 和 Bcl-2 在其中发挥着重要作用^[14-16]。一旦发生凋亡相关基因的突变或缺失, 就会导致细胞凋

亡失控,引起疾病的发生^[17]. 鸦胆子系苦木科鸦胆子属植物 *Brucea javanica* (L.) Merr 的成熟果实,其醇提取物对多种瘤株有抑制作用^[18-19]. 鸦胆子油具有抗癌及抗动脉栓塞的双重作用,因此被用于介入治疗^[20]. 我们研究了鸦胆子油乳体外对人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制生长和诱导凋亡的作用,及对 p53, Bcl-2 表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 SMMC-7721 由兰州大学生物学院提供; 100 g/L 鸦胆子油乳由浙江三九邦而康药业有限公司提供; RPMI1640: Gibco 公司; 小牛血清: 杭州四季青生物工程材料研究所; MTT, SDS, 细胞凋亡电泳检测试剂盒: Sigma 公司; 鼠抗人 p53、鼠抗人 Bcl-2、免疫细胞化学 SP 药盒、DAB 显液: Biotech 公司. 细胞在含 100 ml/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中于 37 °C, 50 ml/L CO₂、饱和湿度的孵箱中培养. 鸦胆子油乳用培养液稀释成工作浓度.

1.2 方法 鸦胆子油乳对 SMMC-7721 细胞的毒性作用采用 MTT 比色法. 取对数生长期的细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板中培养, 24 h 后弃培养液. 实验组加入鸦胆子油乳, 据预实验结果设立 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 g/L 组; 对照组仅加入等量培养液; 调零组为等量培养液, 不含细胞及药物. 每组设 4 个复孔. 分别培养 8, 20, 44, 68 h 后弃培养液, 每孔加入 MTT (1 g/L) 50 μ L, 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 100 g/L SDS 100 μ L, 37 °C 孵育 30 min, 酶标仪 (EXL800 型, 威士达公司) 测定各孔于 570 nm 波长处的吸光度 A (OD) 值. 用以下公式计算抑制率 (IR) = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$. 将对照组及 0.10 g/L 鸦胆子油乳作用 12, 24, 48 h 的细胞消化, 制成单细胞悬液 (各样本细胞数大于 10^9 /L). 离心, PBS 洗 2 次, 4 °C 预冷 700 ml/L 乙醇固定 12 h 后, 用流式细胞仪 (Epic SXL 型: Coulter 公司) 检测凋亡百分率及各细胞周期所占百分比. 收集对照组及 0.05, 0.10, 0.50 g/L 鸦胆子油乳作用 48 h 的细胞 (每个样本约 2×10^6 个细胞), 按试剂盒要求提取 DNA, 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 紫外灯下观察, 照相. 胰酶消化对照组及 0.10 g/L 鸦胆子油乳作用 48 h 的细胞制成细胞悬液, 离心弃上清, 25 g/L 戊二醛固定, 制备超薄切片, 双铅染色, 电镜 (日本 JEM100CX 型) 下观察并照相. 收集对照组及 0.10 g/L 鸦胆子油乳作用 12, 24, 48 h 的细胞, 制成细胞悬液, 均匀涂于防脱片, 40 g/L 多聚甲醛固定, 采用 SP 染色法, DAB 显色 (操作步骤按说明书). 一抗和二抗工作浓度均为 1:200. 阴性对照取 PBS 代替一抗; 阳性对照为已知 p53, Bcl-2 阳性的乳腺癌组织切片. 图像分析系统 (THW-5002 型: 四川联合大学) 下测定 p53, Bcl-2 阳性细胞数, 测量窗面积为 100 μ m², 放大 40 倍.

统计学处理 实验数据均由 3 次以上独立的实验得出, 结果用 mean \pm SD 表示. 应用 SPSS 10.0 软件进行单

因素方差分析和直线相关分析.

2 结果

2.1 鸦胆子油乳的毒性作用 MTT 检测结果显示鸦胆子油乳处理肝癌细胞后, 其生长增生被抑制, 实验组与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$). 随着药物浓度提高和作用时间延长, 抑制率亦相应增大 (图 1). 经鸦胆子油乳作用后, 流式图上 G1 期前出现典型的亚二倍体峰, 48 h 达 $(25.7 \pm 3.8\%)$, 显著高于对照组 ($P < 0.01$). G0/G1 期细胞比率上升, S 期和 G2/M 期细胞比率下降, 表明细胞周期被阻滞于 G0/G1 期 (表 1). 0.05 和 0.10 g/L 浓度组作用 48 h 后电泳均出现凋亡特征性的梯状带, 0.10 g/L 浓度组较明显. 0.50 g/L 浓度组条带模糊, 无梯状带出现 (图 2). 透射电镜下观察, 正常细胞的胞膜完整, 细胞核和细胞器亚微结构清晰. 0.10 g/L 鸦胆子油乳作用 48 h 后, 同一电镜切片中可观察到细胞凋亡不同时期典型的形态学改变, 表现为胞质浓缩、空泡形成; 核固缩, 染色质向核膜聚集, 呈块状或新月形小体; 胞膜出泡和凋亡小体形成, 但细胞器保持相对完整 (图 3).

2.2 p53 和 Bcl-2 的表达 阳性细胞染成棕黄色或棕褐色, p53 免疫反应定位于胞核, Bcl-2 免疫反应定位于胞膜、胞质及核膜 (图 4). 对照组 p53 和 Bcl-2 均呈高表达, 经 0.10 g/L 鸦胆子油乳作用后表达水平下降, p53 较 Bcl-2 显著, 二者呈正相关 ($r = 0.966$, $P < 0.05$), 这种作用有时间依赖性 (表 2).

表 1 鸦胆子 0.10 g/L 油乳对 SMMC-7721 细胞周期和细胞凋亡的影响 (mean \pm SD, %)

组别	分期	12 h	24 h	48 h
对照组	G0/G1	58.9 \pm 6.9	52.8 \pm 2.3	57.2 \pm 11.6
	G2/M	7.6 \pm 6.7	11.9 \pm 1.4	13.9 \pm 4.7
	S	33.5 \pm 4.2	35.3 \pm 2.1	28.9 \pm 12.8
实验组	亚二倍体峰	0.7 \pm 0.2	1.9 \pm 0.6	4.6 \pm 1.0
	G0/G	60.9 \pm 7.1	59.5 \pm 8.4 ^a	71.2 \pm 3.5 ^b
	G2/M	11.2 \pm 2.3	15.8 \pm 5.2	9.3 \pm 5.2
	S	27.9 \pm 4.5	24.7 \pm 7.1	19.5 \pm 2.7
	亚二倍体峰	6.5 \pm 1.9 ^b	16.3 \pm 4.4 ^b	25.7 \pm 3.8 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 对照组.

表 2 鸦胆子 0.10 g/L 油乳对 SMMC-7721 细胞 p53, Bcl-2 蛋白表达的影响 (mean \pm SD, %)

t/h	P53	Bcl-2
0	48.9 \pm 12.6	55.9 \pm 9.9
12	43.8 \pm 8.5	50.1 \pm 13.7
24	33.2 \pm 9.3 ^a	46.2 \pm 9.9
48	28.8 \pm 6.5 ^b	39.3 \pm 8.2 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 0 h 组.

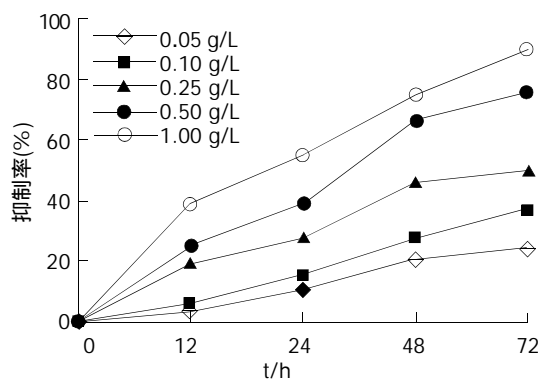


图1 鸦胆子油乳对 SMMC-7721 细胞的抑制作用.

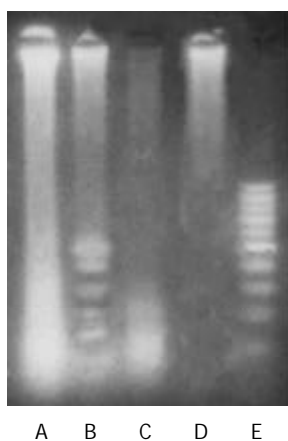


图2 琼脂糖凝胶电泳. A: Marker; B:对照组 C: 0.05; D: 0.10; E: 0.50 g/L 鸦胆子油乳组.

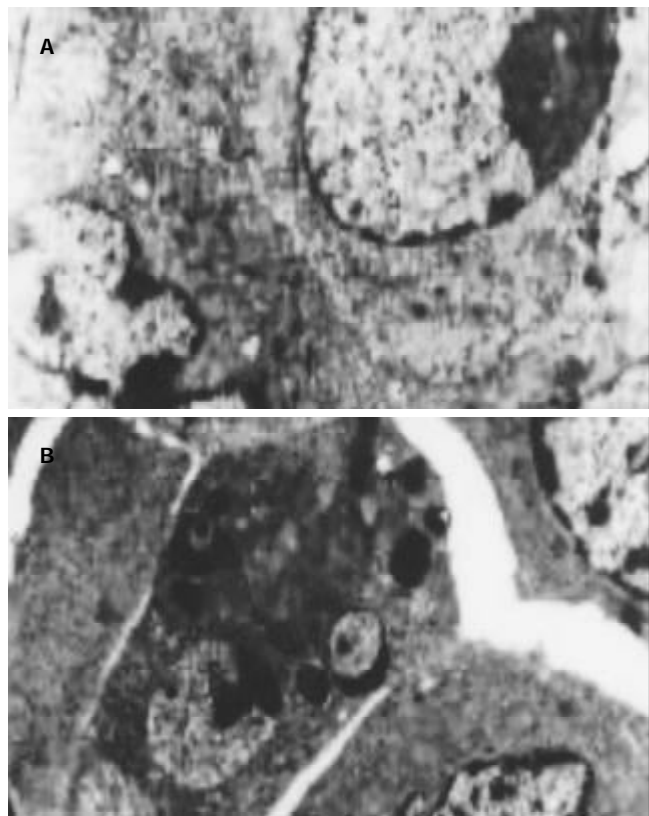


图3 鸦胆子 0.10 g/L 油乳对 SMMC-7721 细胞形态学的影响(透射电镜 $\times 6000$).

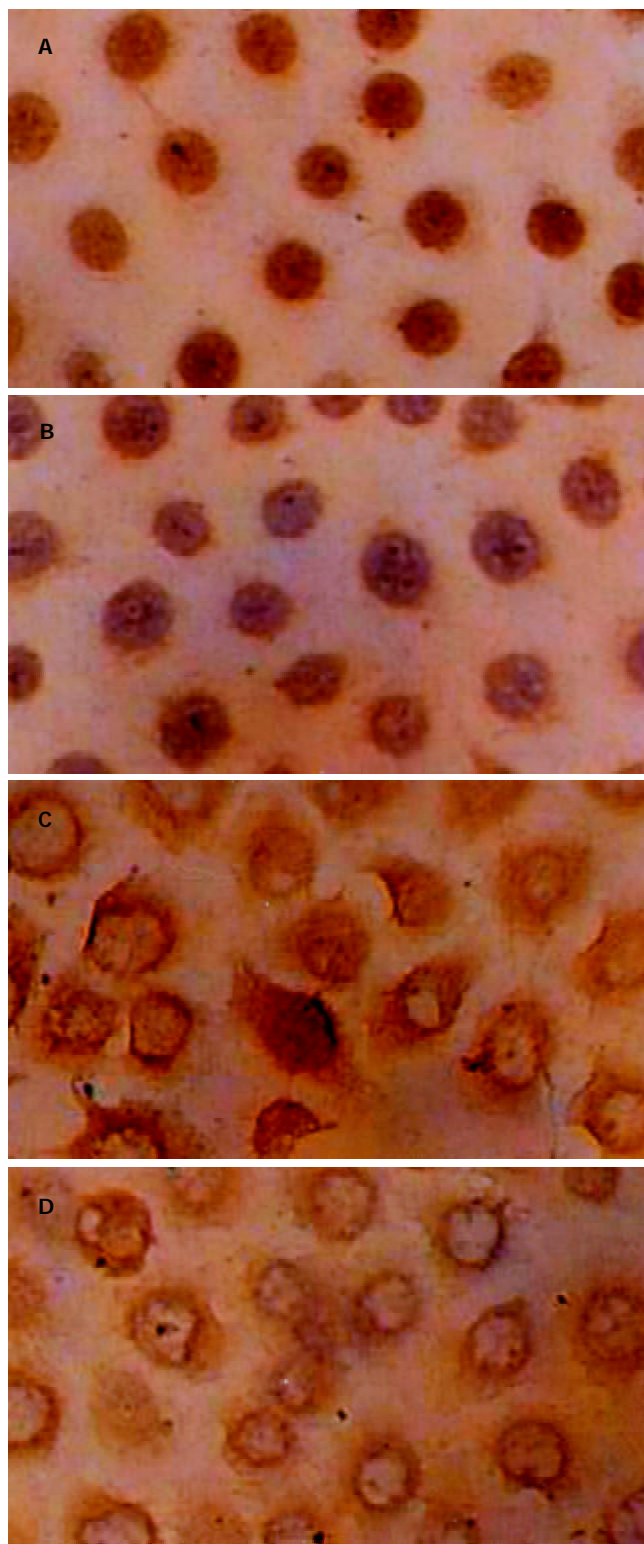


图4 鸦胆子 0.10 g/L 油乳对 SMMC-7721 细胞 p53, Bcl-2 蛋白表达的影响(SP 法 $\times 400$). A: p53 对照组; B: p53 实验组; C: Bcl-2 对照组; D: Bcl-2 实验组.

3 讨论

本实验结果表明, 鸦胆子油乳可以诱导肝癌细胞凋亡. 电泳图显示 0.05, 0.10 g/L 浓度组出现细胞凋亡特征性的梯状带, 后者较明显, 而 0.25 g/L 浓度组无梯状带出现. 表明鸦胆子油乳在低浓度时以诱导细胞凋亡为主, 高浓度时可能以引起细胞坏死为主, 因此其诱导凋亡作用与浓度有关. 0.10 g/L 鸦胆子油乳处理肝癌细胞 12 h 后

在流式图上即出现典型的亚二倍体峰,且随时间延长而增高,表明鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡也呈时间依赖性。因此,从诱导凋亡角度看,应选择合适的药物浓度和作用时间,这样既能清除肿瘤细胞,又能避免正常细胞因药物剂量过大和作用时间过长而受到损害。通过测定细胞凋亡,既能根据肿瘤细胞对药物的反应性优选敏感药物,又可通过观察细胞凋亡率的变化确定合适的药物浓度^[7,21]。

作为细胞周期重要的负性调控因子, p53 在维持基因组稳定性、调控细胞凋亡和细胞周期中起重要作用^[14-15, 22-23]。野生型 p53 的蛋白产物能阻滞 DNA 受损的细胞于 G1 期,抑制 DNA 合成,诱导 DNA 修复,修复不成功则诱导其凋亡^[24]。突变型 p53 失去这种监控作用,可导致细胞增生失控发生肿瘤^[25]。野生型 p53 蛋白半衰期短,含量很低,而突变型 p53 蛋白稳定性增加,因此常规免疫化学检测的 p53 蛋白被认为是突变型 p53 基因的产物。Bcl-2 能抑制细胞凋亡,延长细胞存活^[26-27]。其过表达可导致细胞对多种促凋亡因素耐受,而表达下调可诱导细胞凋亡^[28]。本文结果显示,鸦胆子油乳作用后,肝癌细胞 p53 和 Bcl-2 表达水平均下降, p53 较显著,细胞凋亡增加,细胞周期被阻滞于 G0/G1 期,表明抑制突变型 p53 和 Bcl-2 的表达,甚至诱导部分突变型 p53 恢复成野生型 p53,是其调控细胞凋亡和细胞周期的重要机制,其中 p53 起了主导作用。由于 p53 和 Bcl-2 的下降呈正相关,而 Bcl-2 的表达受 p53 调控,故推测 p53 参与了鸦胆子油乳对 Bcl-2 表达的下调作用。

从鸦胆子中可以分离出一系列苦木内酯成分,其抗癌活性主要与其所含的不饱和脂肪酸,特别是油酸、亚油酸有关。鸦胆子抗肿瘤的机制包括不饱和脂肪酸抑制癌细胞 DNA 合成,破坏肿瘤生物膜结构,增强机体细胞免疫能力,增强自然杀伤细胞对肿瘤细胞的敏感性,通过激活凝血系统形成血栓起栓塞作用,鸦胆子油乳可促进骨髓干细胞形成,与放疗和/或化疗联合应用有一定的防止白细胞和血小板降低的作用^[20]。俞丽芬 et al^[29] 研究表明鸦胆子油乳对人胃腺癌耐药细胞的耐药性有逆转作用。本实验明确了鸦胆子油乳对肝癌细胞有明显的抑制生长作用,诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期于 G0/G1 期是其抗肿瘤的重要机制; p53 和 Bcl-2 表达水平的调节在不同程度上参与了这一过程。本研究为临床应用鸦胆子油乳治疗肝癌提供了有力的实验证据和理论依据,同时也为进一步研究、开发我国特有的鸦胆子类药物开创了广阔前景。

4 参考文献

- 1 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎. 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2003;11:908-911
- 2 Kleibl Z, Raisova M, Novotny J, Pohlreich P, Matous B. Apoptosis and its importance in the development and therapy

- of tumors. *Sb Lek* 2002;103:1-13
- 3 杨建青, 杨连粤, 祝和成. 丝裂霉素诱导人肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2001;9:268-272
- 4 王树滨, 杨纯正. 肿瘤化疗药物诱导细胞凋亡的研究进展. 癌症 2000;19:1173-1176
- 5 Yang HH, Ma MH, Vescio RA, Berenson JR. Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis. *J Clin Oncol* 2003;21:4239-4247
- 6 Elliott MJ, Farmer MR, Atienza C Jr, Seilwell A, Dong YB, Yang HL, Wong SL, McMasters KM. E2F-1 gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells. *Tumour Biol* 2002;23:76-86
- 7 Makin G, Dive C. Modulating sensitivity to drug-induced apoptosis: the future for chemotherapy? *Breast Cancer Res* 2001;3:150-153
- 8 Luk'ianova NI, Kulik GI, Chehun VF. Role of the p53 and Bcl-2 genes in apoptosis and drug resistance of tumors. *Vopr Onkol* 2000;46:121-128
- 9 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- 10 Thorburn A, Thorburn J, Frankel AE. Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis* 2004;9:19-25
- 11 刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强. GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1357-1361
- 12 李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平. TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1369-1371
- 13 苏颖, 陈增, 林可婧, 邹长梭, 林华妹. 三氧化二砷抑制肝癌细胞端粒酶表达及诱导细胞凋亡作用. 世界华人消化杂志 2003;11:264-267
- 14 Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003;22:9030-9040
- 15 Zhu Z, Zhu MH. Research advances on p53 gene network. *Ai Zheng* 2003;22:547-551
- 16 Fu YF, Fan TJ. Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002;34:389-394
- 17 Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;156:409-417
- 18 Luyengi L, Suh N, Fong HH, Pezzuto JM, Kinghorn AD. A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry* 1996;43:409-412
- 19 Xuan YB, Yasuda S, Shimada K, Nagai S, Ishihama H. Growth inhibition of the emulsion from *Brucea javanica* to cultured human carcinoma cells. *Gan To Kagaku Ryoho* 1994;21:2421-2425
- 20 俞进友, 朱良志, 夏曙祥. 浅谈鸦胆子在原发性肝癌介入治疗中的作用. 中国肿瘤临床与康复 1995;2:49-50
- 21 王和, 楼江燕, 刘珊玲, 彭芝兰. 细胞凋亡检测用于卵巢癌实体瘤体外化疗药物敏感试验. 实用癌症杂志 2000;15:267-269
- 22 张艳, 何凤田. P53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1593-1596
- 23 Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:60-66
- 24 Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001;29(Pt 6):684-688
- 25 Cappello F, Bellafiore M, Palma A, Bucchieri F. Defective apoptosis and tumorigenesis: role of p53 mutation and Fas/FasL system dysregulation. *Eur J Histochem* 2002;46:199-208
- 26 Humlova Z. Protooncogene Bcl-2 in process of apoptosis. *Sb Lek* 2002;103:419-425
- 27 Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. The Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* 2001;19:57-74
- 28 Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;12:193-213
- 29 俞丽芬, 吴云林, 章永平. 鸦胆子油乳剂对人胃腺癌长春新碱耐药细胞株 MKN28/VCR 的逆转作用. 世界华人消化杂志 2001;9:376-378

通 告

郜永顺同志:

您好!

您发表于《世界华人消化杂志》的论著[郜永顺, 等. 裸鼠肝内种植人肝癌组织的肿瘤特征. 世界华人消化杂志, 2004, 12(3): 563-566], 应作者要求, 并经《世界华人消化杂志》编辑部讨论, 同意作者撤稿。

此致

敬礼!



乳果糖溶液在改善肝癌患者动脉栓塞治疗后腹部和肝性脑病症状中的作用

卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 贺祥

卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 中国人民解放军第一军医大学南方医院介入治疗科 广东省广州市 510515
贺祥, 河南大学淮河医院放射科 河南省开封市 475000
卢伟, 男, 1967-02-02 生, 江西省波阳县人, 汉族。2002 年第一军医大学博士毕业, 主治医师, 讲师, 主要从事肿瘤和血管的介入诊疗研究。
广东省科技攻关课题, No. 2KB0461S
项目负责人: 李彦豪, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学附属南方医院介入治疗科。liyanhao@fimmu.com
电话: 020-61642084 传真: 020-61642082
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

Effect of lactulose on alleviating abdominal symptoms and encephalopathy after transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma

Wei Lu, Yan-Hao Li, Xiao-Feng He, Yong Chen, Xiang He

Wei Lu, Yan-Hao Li, Xiao-Feng He, Yong Chen, Department of Interventional Radiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University of PLA, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Xiang He, Department of Radiology, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China
Supported by Science and Technique Program of Guangdong Province, No. 2KB0461S
Correspondence to: Dr. Yan-Hao Li, Department of Interventional Radiology, Nanfang hospital, First Military Medical University of PLA, Guangzhou 510515, China. liyanhao@fimmu.com
Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of lactulose on alleviating abdominal symptoms and encephalopathy after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: One hundred patients with HCC who were treated with TACE were divided into two groups. Patients in group A received oral lactulose (15-30 ml, 3 times/d) after TACE. No lactulose was prescribed in group B. The times of bowel movement per day, the degree of abdominal distension and vomiting in the two groups were compared. The changes of liver and renal function were evaluated with total bilirubin levels (TBIL), albumin (ALB), alanine aminotransferase (ALT) and blood urea nitrogen (BUN) before and after TACE. The prevalence of encephalopathy and blood ammonia levels in the two groups was also compared.

RESULTS: The mean times of bowel movement per day in the two groups were 1.86 ± 0.83 and 0.48 ± 0.41 , respectively, with a statistical difference ($U = 309.00$, $P < 0.0001$). The degree of abdominal distension and vomiting was minimal in group A than that in group B ($\chi^2 = 7.860$, $P = 0.02$). Although there was no significantly difference in serum TBIL, ALB, ALT, and BUN between the two groups, the blood ammonia levels in group A were significantly lower than

that in group B ($t = 3.091$, $P = 0.003$). The prevalence of encephalopathy in group B was higher than that in group A ($\chi^2 = 6.947$, $P = 0.038$).

CONCLUSION: Oral lactulose exerts prokinetic effect on gastrointestinal tract. It can relieve the symptoms of abdominal distension and vomiting after TACE and help prevent the happening of encephalopathy.

Lu W, Li YH, He XF, Chen Y, He X. Effect of lactulose on alleviating abdominal symptoms and encephalopathy after transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):567-569

摘要

目的: 探讨TACE后使用乳果糖溶液在改善患者腹部症状以及肝性脑病的作用。

方法: 100例原发性肝癌患者随机分组行经导管肝动脉化疗栓塞术, A组($n=50$)术后给予杜秘克乳果糖溶液15-30 mL, 3次/d, B组($n=50$)不服用乳果糖。治疗后分别观察患者每日大便次数、腹胀、呕吐情况、TACE前后肝肾功能(包括TBIL, ALT, ALB, BUN)和血氨的变化情况以及两组出现肝性脑病的情况。

结果: A、B两组平均大便次数分别为 1.86 ± 0.83 次/d 和 0.48 ± 0.41 次/d, 差异有显著性意义($U = 309.00$, $P < 0.0001$)。腹胀和呕吐方面, A组显著好于B组($\chi^2 = 7.860$, $P = 0.02$)。虽然两组治疗前后TBIL, ALT, ALB, BUN均没有显著差异(t 均 < 1.660 , $P > 0.05$), 但是A组血氨显著低于B组($t = 3.091$, $P = 0.003$)。B组肝性脑病发生率显著高于A组($\chi^2 = 6.947$, $P = 0.038$)。

结论: 肝癌TACE术后服用乳果糖可以促进肠道功能, 改善腹胀和呕吐情况。同时可以预防肝性脑病的发生。

卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 贺祥。乳果糖溶液在改善肝癌患者动脉栓塞治疗后腹部和肝性脑病症状中的作用。世界华人消化杂志 2004;12(3):567-569
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/567.asp>

0 引言

经导管肝动脉栓塞化疗术(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)是不适于手术治疗肝细胞癌患者的首选方法^[1-3]。但是多数患者术后出现腹胀、食欲不振、便秘等症状^[4-8]。这些症状不但可以加重栓塞后综合征, 而且可以加重肝细胞的损伤、诱发肝昏迷的

可能,因此术后改善肠道蠕动功能、保持肠道通畅不但有利于减轻患者的症状、改善患者的食欲,还可以改善肝细胞营养、促进肝功能的恢复.笔者探讨TACE后使用乳果糖溶液在改善患者腹部症状以及肝性脑病的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 原发性肝癌患者100例,男90例,女10例,平均年龄50(30-73)岁.均符合1999年在成都第四届全国肝癌会议通过的HCC诊断标准^[9].其中病理学证实者5例,其余均经临床、影像学检查(B超、CT或/和MRI、肝动脉造影)以及实验室检查确诊.随机分两组,每组50例,两组患者术前一般资料的比较详见表1,两组患者一般资料没有显著差异.

表1 两组患者首次TACE治疗前一般资料的比较

项目	A组(n=50)	B组(n=50)
性别(男/女)	46/4	45/5
年龄(岁)	54.5 ± 9.4	53.6 ± 10.6
肿瘤大小(cm)	8.59 ± 2.22	8.42 ± 2.76
门脉癌栓(无/有)	41/9	40/10
腹水(无/有)	33/17	30/20
Child-Pugh分级(例)		
(A/B/C)	44/5/1	42/7/1
谷丙转氨酶(U/L)	46 ± 28	55 ± 31
总胆红素(μmol/L)	16.89 ± 7.38	14.78 ± 6.83
白蛋白(g/L)	34.95 ± 4.82	35.52 ± 3.87

1.2 方法 所有患者均行超选择性肝动脉TACE治疗,即将导管尽量超选择到肿瘤的供血动脉内注入碘油-化疗药物乳化剂,并用明胶海绵颗粒和聚乙烯醇颗粒行供血动脉栓塞.术后均常规给予对症、护肝、支持治疗.A组(n=50)给予杜秘克乳果糖溶液(苏威制药厂提供)15-30 mL,3次/d.B组(n=50)为不服用任何导泻药物的空白对照组.TACE后1-7 d记录患者症状如每天排便次数、腹胀、呕吐情况,同时比较术前和术后5 d肝肾功能(包括TBIL,ALT,ALB,BUN)和血氨的变化情况.比较两组TACE前和后患者术后出现肝性脑病情况.采用如下标准评价腹胀和呕吐程度:1级:没有明显腹胀和呕吐,可以正常进食;2级:轻度腹胀,不伴或伴有轻度呕吐现象,进食减少;3级:中-重度腹胀,伴有明显地呕吐,不能进食.肝性脑病程度分级按如下标准:(1)无任何肝性脑病症状和体征;(2)亚临床型肝性脑病:表现为注意力下降,认知力(心算能力)下降,睡眠周期改变(日夜倒错);(3)临床型肝性脑病:主要指肝昏迷前驱期和昏迷前期的症状,包括,淡漠少言,嗜睡,言语不清,行为异常等.少数可以出现定向力障碍,扑翼样震颤,脑电图异常,昏睡和昏迷等.

2 结果

A组平均每天大便为1-4(1.9 ± 0.8次),B组平均每日大便0-2(0.5 ± 0.4).两组比较秩和检验 $U=309.00$, $P<0.001$.两组腹胀和呕吐情况比较采用 $R \times C$ 卡方检验, $\chi^2=7.860$, $P=0.02$,两组差异有显著性意义(表2).两组TACE后TBIL和ALT均明显升高(t分别为3.497和3.307, P 均 <0.001),ALB和BUN则变化不明显(t值分别为1.342和1.680, $P>0.05$),两组之间比较,各项指标TACE前、后均没有显著差异(t均 <1.660 , P 均 >0.05 ,表3).A、B两组TACE前基础血氨水平没有显著差异(t=0.180, $P=0.857$),TACE前、后比较均有显著差异(t分别为3.837和6.000, P 均 <0.000),TACE后两组间比较有显著差异(t=3.091, $P=0.003$,表4).两组患者肝性脑病发生差异有显著性意义($\chi^2=6.947$, $P=0.038$,表5).两组中仅B组1例出现浅昏迷状态,其余临床期肝性脑病均表现前驱期和昏迷前期的症状.

表2 两组腹胀和呕吐情况比较

组别	腹胀、呕吐程度分级			合计
	1级	2级	3级	
A	25	20	5	50
B	12	27	11	50

χ^2 检验, $\chi^2=7.860$, $P=0.02$.

表3 两组患者TACE前后TBIL、ALT、ALB、BUN比较

分组	<i>n</i>		TBIL(mmol/L)	ALB(g/L)	ALT(nKa+/L)	BUN(mmol/L)
A 组	50	前	20.6 ± 8.4	34 ± 1	0.79 ± 0.32	4.9 ± 1.8
		后	37.3 ± 12.1 ^b	33 ± 2	1.64 ± 0.60 ^b	4.5 ± 2.2
B 组	50	前	21.8 ± 10.6	33 ± 2	0.66 ± 0.26	4.0 ± 1.7
		后	35.8 ± 15.8 ^b	32 ± 3	1.31 ± 0.43 ^b	4.2 ± 1.6

^b $P<0.01$,vs前.

表4 两组口服乳果糖治疗前后血氨的变化情况

组别	血氨(μmol/L)			
	治疗前	治疗后	t	P
A组	73.7 ± 13.4	68.9 ± 10.0	3.837	0.000
B组	74.1 ± 12.9	63.0 ± 9.2	6.000	0.000
t	0.180	3.091		
P	0.857	0.003		

表5 两组患者TACE肝性脑病的发生情况

组别	肝性脑病			合计
	无	亚临床型肝性脑病	临床型肝性脑病	
A	42	7	1	50
B	34	10	6	50

χ^2 检验, $\chi^2=6.947$, $P=0.038$.

3 讨论

肝癌TACE后常出现便秘和腹胀. 主要原因有: (1)肝癌患者常伴有肝硬化、门脉高压, 胃肠道淤血, 加上患者发热使胃肠道淤血加重. (2)患者TACE后一般需卧床休息, 使肠蠕动减慢; (3)恶心、呕吐使患者进食减少, 造成便秘、腹胀、胃肠胀气等症状. 乳果糖在小肠内不被吸收和分解而完整到达大肠, 在那里被分解为短链脂肪酸(主要为乳酸、乙酸、丙酸), 从而降低了肠道pH值, 促进肠道的蠕动. 其次, 短链脂肪酸使肠道内渗透压升高, 从而明显减少结肠对水分的吸收, 使大便体积增大, 迅速排空. 此外, 乳果糖尚有调节肠道菌群的功能, 有资料显示乳果糖可以作为肠道有益菌-双歧杆菌的营养, 使其数量增长3个数量级(从 10^9 - 10^{12}), 导致肠内容物增加. 本研究表明, 乳果糖组和安慰剂组比较, 前者患者每日大便次数显著多于后者, 在腹胀和呕吐的程度方面, 前者亦显著好于后者. 说明乳果糖有利于改善肝癌患者TACE后的便秘、腹胀和呕吐症状. 乳果糖组85%的患者取得了较好的效果, 每日大便在2-3次. 50例患者除1例患者出现轻度腹绞痛和腹泻水样便外, 没有患者出现严重副反应.

已知TACE后肝功能均可出现不同程度的肝功能损伤, 多数肝功能损伤是一过性的, 肝功能各生化指标往往在术后3-4 wk内恢复到术前水平. TACE后口服乳果糖是否有利于肝功能的恢复, 尚没有文献报道. 本研究两组TACE术前、后TBIL, ALT, ALB, BUN均没有显著的差异, 因此我们认为肝功能指标的改善不大可能是乳果糖的作用, 而更应该归功于足够的营养、卧床休息或限制活动、护肝和支持治疗等.

肝性脑病是一种肝癌TACE后的常见并发症. 是潜在的可逆的中枢神经系统的功能紊乱. 假设的致病机制包括肠道内的神经毒素(氨等)作用、由芳香氨基酸合成的假神经递质以及在脑中的 γ -氨基丁酸神经递质(GABA)/内源性苯二氮卓类药物增加等有关, 其中氨与肝性脑病的关系最为密切, 有直接的因果关系^[10]. 目前已有较多文献^[10-12]报道乳果糖对临床型肝性脑病的有效, 而对亚临床型肝性脑病治疗和预防作用报道不多. 亚临床型肝性脑病也称轻微肝性脑病, 由于一般没有可觉察的临床症状, 无意识障碍, 有良好的运动能力, 有时仅表现注意力下降、睡眠周期改变(日夜倒错)、日常生活方式改变(疲劳), 只有通过心理和智力测验才能发现异常^[11-12]. 聂玉强 et al^[13]研究显示: 亚临床肝性脑病在肝硬化患者中的发生率占57.1%, 如不进行有效治疗, 部分患者将发展成为临床型肝性脑病, 他们采用乳果糖治疗能

够降低患者血氨水平, 提高智力测验结果, 同时可以防止体感诱发电位的恶化, 最终降低临床型肝性脑病的发生率. 本研究表明, 肝癌TACE后采用乳果糖治疗可以明显减少亚临床和临床型肝性脑病的发生. 其原因为: 口服乳果糖可以减少细菌的产氨, 减少肠道对氨的吸收, 所以降低血氨, 减轻了神经症状. 汪佩文 et al^[14]的研究发现对亚临床肝性脑病患者采用乳果糖治疗后, 患者血氨明显下降, 数字连线试验成绩明显提高. 其他研究^[15]显示乳果糖加双歧杆菌口服液治疗可以降低亚临床肝性脑病患者的血氨水平, 可以降低临床肝性脑病的死亡率. 因此笔者建议: 肝癌TACE后可常规应用乳果糖治疗, 以改善便秘、腹胀等症状, 同时预防出现亚临床或临床型肝性脑病.

4 参考文献

- 1 Qian J, Feng GS, Vogl T. Combined interventional therapies of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1885-1891
- 2 Lin SC, Shih SC, Kao CR, Chou SY. Transcatheter arterial embolization treatment in patients with hepatocellular carcinoma and risk of pulmonary metastasis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1208-1211
- 3 Ji W, Li JS, Li LT, Liu WH, Ma KS, Wang XT, He ZP, Dong JH. Role of preoperative selective portal vein embolization in two-step curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1702-1706
- 4 Guo WJ, Yu EX, Liu LM, Li J, Chen Z, Lin JH, Meng ZQ, Feng Y. Comparison between chemoembolization combined with radiotherapy and chemoembolization alone for large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1697-1701
- 5 Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Lu LX, Zhang WZ, Yuan YF, Guo YP, Lin XJ, Li GH. High-dose iodized oil transcatheter arterial chemoembolization for patients with large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:74-78
- 6 Fan J, Ten GJ, He SC, Guo JH, Yang DP, Wang GY. Arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:33-37
- 7 王红梅, 廖国清, 李虎城, 戴海峰, 解国清, 邹建军, 许红兵. 肝动脉灌注化疗栓塞治疗中晚期肝癌32例. *世界华人消化杂志* 1999;7:684
- 8 卢云, 石景森. 肝动脉化疗栓塞术后死亡病例31例. *世界华人消化杂志* 1998;6:6
- 9 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准. *中华肝脏病学杂志* 2000;8:135
- 10 刑全台, 刘连水. 乳果糖对亚临床肝性脑病的作用研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:108-109
- 11 李瑜元, 聂玉强, 沙卫红, 平丽, 杨富英, 余庆珠, 吴惠生. 亚临床肝性脑病的发病率调查. *中华内科杂志* 2000;39:625
- 12 相云龙, 王素珍. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病. *中国新药与临床杂志* 2000;19:523-524
- 13 聂玉强, 曾峥, 李瑜元, 沙卫红, 平丽, 戴寿军. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的临床研究. *中华内科杂志* 2003;42:261-262
- 14 汪佩文, 姜海琼, 王兴鹏. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的疗效观察. *胃肠病学杂志* 2003;8:118-124
- 15 苏同宝, 刘朝阳, 魏素云, 于培龙. 双歧杆菌口服液加乳果糖口服液保留灌肠治疗肝性脑病31例分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2001;10:138

直肠癌细胞系膜内淋巴结转移的解剖病理学研究

郑阳春, 周总光, 郑雪莲, 李立, 雷文章, 王天才, 邓伊伶, 陈代云, 刘卫平

郑阳春, 周总光, 郑雪莲, 李立, 雷文章, 王天才, 四川大学华西医院消化外科 四川省成都市 610041
邓伊伶, 陈代云, 刘卫平, 四川大学华西医院病理科 四川省成都市 610041
郑阳春, 男, 1975-08-09 生, 浙江省江山市人, 汉族, 博士生. 主要从事结肠癌微转移方面的研究.
国家自然科学基金资助课题, No. 39925032
项目负责人: 周总光, 610041, 四川省成都市国学巷 37 号, 四川大学华西医院消化外科. zhou767@21cn.com
电话: 028-85422484 传真: 028-85422484
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-11-19

Anatomic pathology of tumor cell spread through lymph nodes in the mesorectum of rectal cancer

Yang-Chun Zheng, Zong-Guang Zhou, Xue-Lian Zheng, Li Li, Wen-Zhang Lei, Tian-Cai Wang, Yi-Ling Deng, Dai-Yun Chen, Wei-Ping Liu

Yang-Chun Zheng, Zong-Guang Zhou, Xue-Lian Zheng, Li Li, Wen-Zhang Lei, Tian-Cai Wang, Department of Digestive Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Yi-Ling Deng, Dai-Yun Chen, Wei-Ping Liu, Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39925032
Correspondence to: Dr. Zong-Guang Zhou, Department of Digestive Surgery, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guo Xue Xiang, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhou767@21cn.com
Received: 2003-10-10 Accepted: 2003-11-19

Abstract

AIM: To investigate the size, distribution, and pattern of metastases and micrometastases of lymph nodes (LNs) within the mesorectum of rectal cancer.

METHODS: All rectal cancer specimens obtained by total mesorectal excision were treated with lymph node revealing solution to retrieve all LNs, which were detected with a combination use of haematoxylin and eosin staining and immunohistochemical (IHC) staining with an antibody against cytokeratin 20.

RESULTS: A total of 548 LNs in 31 specimens were harvested, with 17.7 nodes per case. 153 nodes (27.9%) in 27 patients (87.1%) were found positive by routine pathological examination and IHC staining. Of all the nodes retrieved, nodes <0.5 cm numbered 366 (66.8%) with 91 ones (59.5%) positive. Among the 27 metastasized cases, there were 15 cases whose tumors were located in the back wall of the rectum, in which 78 nodes were detected positive with 75 nodes along the superior rectal artery. In the other 12 cases with tumors positioned in the lateral wall, 75 nodes were diagnosed positive, with 37 nodes, 8 nodes around the branch of superior rectal artery and middle rectal artery on tumor side, and 9 nodes, 0 nodes

on the opposite side, respectively.

CONCLUSION: The majority of tumor positive LNs in the mesorectum are <0.5 cm in diameter. LNs within the mesorectum are distributed mainly along major supplying vessels with around the superior rectal artery most. The pattern of lymphatic spread of rectal cancer has close relationships with tumor location in the rectal wall. Tumors in the posterior wall may spread in both sides of the mesorectum simultaneously, while tumors localized in one lateral wall tend to metastasize preferably to LNs in the mesorectum of tumor side.

Zheng YC, Zhou ZG, Zheng XL, Li L, Lei WZ, Wang TC, Deng YL, Chen DY, Liu WP. Anatomic pathology of tumor cell spread through lymph nodes in the mesorectum of rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):570-573

摘要

目的: 研究直肠癌系膜淋巴结(LN)大小、分布、转移及微转移规律.

方法: 对全直肠系膜切除的直肠癌标本用LN显示液处理, 切取的LN以常规病理结合免疫组化染色检测.

结果: 本组 31 例 548 枚 LN, 27 例(87.1%)153 枚(27.9%) LN 发现转移. 其中, 直径小于 0.5 cm LN 366 枚(66.8%), 转移 91 枚(59.5%). 转移病例中, 后壁直肠癌 15 例, 78 枚 LN 转移, 75 枚沿直肠上动脉分布. 侧壁直肠癌 12 例, 75 枚 LN 转移, 同侧直肠上动脉分支、直肠中动脉旁转移 37 和 8 枚, 对侧分别为 9 和 0 枚.

结论: 直肠癌大部分转移 LN 直径小于 0.5 cm, 主要分布于直肠上动脉旁. LN 转移与肿瘤方位有关, 后壁癌可同时沿肿瘤两侧系膜扩散, 侧壁癌以同侧 LN 受累为主.

郑阳春, 周总光, 郑雪莲, 李立, 雷文章, 王天才, 邓伊伶, 陈代云, 刘卫平. 直肠癌细胞系膜内淋巴结转移的解剖病理学研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12(3):570-573

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/570.asp>

0 引言

直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率逐年上升^[1-5]. 手术切除是目前直肠癌治疗的主要手段^[6-8], 然而约 30% 的患者在根治术后 5 a 内出现复发^[9-11]. 肿瘤细胞在区域淋巴结中的转移、微转移被认为是导致直肠癌术后复发、转移的重要原因^[12-16]. 全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)以低局部复发率, 高 5 a 生存率的优势, 正逐步成为中、低位直肠癌手术

治疗的新标准^[17-18]。然而迄今, 有关直肠癌系膜淋巴结分布的报道较少, 直肠癌系膜淋巴结的转移规律尚有争议, 直肠癌系膜淋巴结的微转移规律有待阐明^[19-20]。我们研究直肠癌系膜内淋巴结的数目、大小、分布及转移、微转移情况, 探讨直肠癌系膜淋巴结的转移、微转移规律, 为直肠癌术式的合理选择提供客观依据。

1 材料和方法

1.1 材料 前瞻性随机收集2001-10/2002-10我院行TME治疗的直肠癌标本31例, 所有患者术前均未接受放疗或化疗, 并经纤维结肠镜及病理活检证实为直肠腺癌。男18例, 女13例, 年龄32-74(中位55)岁。以腹膜反折为界, 高位直肠癌7例, 低位直肠癌24例。高分化腺癌3例, 中分化腺癌20例, 低分化腺癌8例。

1.2 方法 根据Koren et al (Dis Colon Rectum 1997;40:407-410)介绍的淋巴结显示技术, 手术标本经中性甲醛固定24 h后, 于淋巴结显示液(lymph node revealing solution, LNRS)中浸泡6 h, 流水彻底冲洗后, 淋巴结呈现为白垩色的结节。从直肠上动脉根部沿其走行进行解剖, 直至其末级分支。系膜内的其他组织以2-3 mm间隔连续剪切、清除脂肪组织, 检取淋巴结, 测量大小并记录解剖学位置。切取的淋巴结按分布分别石蜡包埋, 每个蜡块按20-40 μm 间隔连续切片, 切片厚度4 μm 。然后从不同代表平面的10张切片中选取2张进行HE染色。HE阴性的淋巴结另抽取3张切片, 1张再行HE染色, 另2张行细胞角蛋白20(cytokeratin 20, CK20)免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色, 检测肿瘤微转移。免疫组化检测采用LsAB法。CK20 mAb购自美国NeoMarkers公司, 二抗及染色试剂盒购自美国Zymed公司。组织切片染色前置60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱过夜, 烘干的切片依次经二甲苯、梯度酒精脱蜡至水, 3 mL/L H_2O_2 溶液浸泡20 min以灭活内源性过氧化物酶, 然后切片置入枸橼酸修复液中高压锅煮沸3 min充分暴露抗原。正常山羊血清室温下封闭10 min后, 滴加1:50稀释的鼠抗人CK20 mAb, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。滴加生物素化羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应45 min, 再滴加SP复合物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。随后DAB显色5-8 min, 再经苏木素复染、脱水、透明、封片。每次染色均以PBS代替一抗作阴性对照, 直肠癌组织作为阳性对照, 细胞质呈橙黄色视为阳性。

统计学处理 采用SPSS 10.0软件, 均数的比较采用t检验, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 淋巴结转移的检出 本组31例直肠癌标本, 共检获淋巴结548枚, 平均每例17.7(3-34)枚。HE染色22例114枚淋巴结有肿瘤转移, 淋巴结转移率80.1%, 转移度20.8%。经IHC检测, 发现18例39枚淋巴结存在肿瘤微

转移, 淋巴结微转移率58.1%, 微转移度7.1%, 其中HE阴性的9例166枚淋巴结中有5例(55.6%)10枚(6.0%)淋巴结存在肿瘤微转移。镜下观察, 直肠癌细胞CK20的阳性表达定位于胞质, 微转移灶表现为单个散在、或2-3个及数个聚集成簇的癌细胞团。所有微转移细胞呈恶性肿瘤细胞表现, 核大、核小体清晰(图1)。

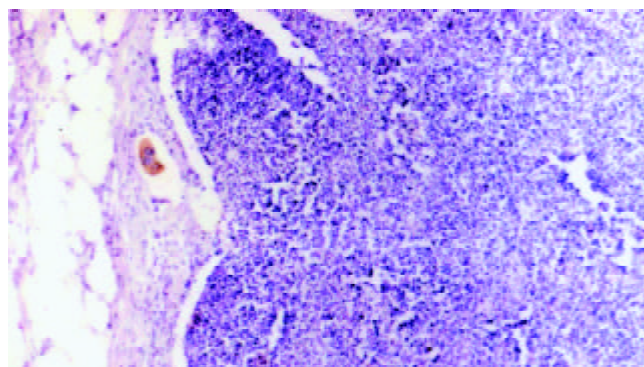


图1 直肠癌系膜淋巴结内簇状癌细胞转移 IHC $\times 100$ 。

2.2 淋巴结大小与转移 本组31例548枚淋巴结, 平均直径0.41(0.07-1.10 cm), 转移淋巴结共153枚, 平均直径0.49(0.15-1.10 cm)。其中HE阳性淋巴结114枚, 平均直径0.52(0.15-1.10 cm), IHC阳性淋巴结39枚, 平均直径0.39(0.15-0.8 cm), 二者比较差异有显著性($t = 4.152$, $P < 0.01$)。直径小于或等于0.2 cm淋巴结92枚(16.8%), 转移7枚, 占转移淋巴结总数的4.6%, 直径大于或等于0.5 cm淋巴结182枚(33.2%), 转移62枚(40.5%), 直径0.2-0.5 cm淋巴结274枚(50.0%), 转移84枚(54.9%)(表1)。

表1 直肠癌系膜淋巴结大小与肿瘤转移情况

LN 直径(cm)	LN 总数	HE 阳性	IHC 阳性	转移总数	转移度(%)
≤ 0.2	92	4	3	7	7.6 ^a
0.2-0.5	274	56	28	84	30.7 ^b
≥ 0.5	182	54	8	62	34.1 ^c
合计	548	114	39	153	27.9

^a $P < 0.01$, vs 0.2-0.5; ^b $P > 0.05$, vs ≥ 0.5 ; ^c $P < 0.01$, vs ≤ 0.2 。

2.3 淋巴结的分布与转移 本组27例转移标本, 共切取淋巴结499枚。以腹膜反折为界, 高位直肠癌5例, 切取淋巴结81枚, 分布于肿瘤旁2枚(2.5%), 转移0枚; 直肠上动脉旁79枚(97.5%), HE阳性18枚, IHC阳性4枚。低位直肠癌22例, 检获淋巴结418枚, 分布于肿瘤旁52枚(12.4%), HE阳性7枚, IHC阳性6枚, 直肠上动脉旁333枚(79.7%), HE阳性87枚, IHC阳性23枚, 直肠中动脉旁33枚(7.9%), HE阳性2枚, IHC阳性6枚; 以肿瘤在肠壁的位置划分, 后壁直肠癌15例, 侧壁直肠癌12例(表2)。

表2 直肠癌系膜淋巴结分布与肿瘤转移情况

LN系膜分布	侧壁直肠癌(12例)				后壁直肠癌(15例)			
	LN总数	HE阳性	IHC阳性	转移度(%)	LN总数	HE阳性	IHC阳性	转移度(%)
肿瘤旁	36	5	5	27.8	18	2	1	16.7
直肠中动脉旁								
同侧 [*]	20	2	6	40.0 ^a	0	0	0	0
对侧 [#]	12	0	0	0	0	0	0	0
直肠上动脉分支旁								
同侧 [*]	86	27	10	43.0 ^b	108	21	9	27.8 ^c
对侧 [#]	56	7	2	16.1	79	23	2	31.7
直肠上动脉主干旁	26	10	1	42.3	57	17	3	35.1
合计	236	51	24	31.8	263	63	15	29.7

^{*} 在后壁直肠癌指左侧系膜血管; [#] 在后壁直肠癌指右侧系膜血管。 ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP > 0.05, vs 对侧[#]。

3 讨论

直肠癌术后肿瘤复发、转移一直是直肠癌外科治疗中倍受关注的问题。近20 a的临床实践证明, TME可以根除传统手术中直肠系膜切除不全, 系膜内残留癌灶的隐患, 有效降低直肠癌术后局部复发率和提高5 a生存率, 是治疗中、低位直肠癌的理想术式^[6-8, 21-22]。直肠系膜是指盆筋膜脏层所包裹的直肠周围脂肪、血管和淋巴组织, 系膜内的淋巴结是直肠癌扩散、转移最先受累的组织。Canessa et al^[19]对20例尸检标本的解剖显示, 直肠系膜淋巴结每例平均8.4枚, 71.4%位于腹膜反折上方。Topor et al^[20]对7例尸检标本施行全直肠系膜切除及盆腔淋巴结清扫, 切取的标本用LNRS进行处理, 结果盆腔淋巴结每例平均24.9枚, 包括直肠系膜淋巴结每例平均13.6枚, 54%的淋巴结位于直肠后方。本组资料中, 直肠癌系膜淋巴结每例平均17.7枚, 直肠上动脉主干及其分支旁、肿瘤旁、直肠中动脉旁淋巴结分布各占16.8%, 65.5%, 11.7%与6.0%。最小检出淋巴结直径0.07 cm, 66.8%的淋巴结直径小于0.5 cm, 16.8%淋巴结直径小于或等于0.2 cm, 59.5%转移淋巴结直径小于0.5 cm。这些小淋巴结尤其是直径小于或等于0.2 cm者极易在术中活检、术后的病理取材中被遗漏, 致使淋巴结检测不全, 影响病情判断^[13, 23-24]。有些外科医生倾向于术中凭手扪判断淋巴结有无转移, 或以有无探及肿大的淋巴结来决定是否行淋巴结清扫。本研究表明, 肿大的淋巴结并不一定是肿瘤转移, 而术中未探及肿大的淋巴结, 也不意味着系膜淋巴结就没有转移, 即使常规病理检查阴性的淋巴结中仍有9.0%存在肿瘤微转移。

本组资料显示, 直肠的淋巴引流与系膜血管相伴行。直肠癌系膜淋巴结大部分沿直肠上动脉左、右侧分支(65.5%)及直肠上动脉主干(16.8%)排列, 肿瘤旁(11.7%)及直肠中动脉旁(6.0%)分布较少。高位直肠癌淋巴转移以上行方向为主, 即自肠管肿瘤旁淋巴结开始, 沿着直肠上动脉分支向其主干方向转移, 累及肠系膜下淋巴结群,

最后到肠系膜根部淋巴结。低位直肠癌除可发生上行转移外, 还可向侧方、下方转移。侧方淋巴结转移主要是沿肛提肌转移至直肠中动脉旁、或穿过肛提肌注入闭孔淋巴结, 再注入髂内、髂总淋巴结。文献报道低位直肠癌淋巴结侧方转移率10-25%^[6, 12, 25], 本组为19.4%, 均发生于肿瘤距齿状线5 cm以内的患者。直肠癌淋巴结的下行转移极少见, 一般认为是正常的上行通道被肿瘤阻断后, 淋巴逆行引流所致。本组未见下行转移病例。本组资料还表明, 直肠癌淋巴结转移方向不仅与肿瘤在直肠所处的节段有关, 还与肿瘤在肠壁所处的方位密切相关。结果显示, 后壁直肠癌主要是沿直肠上血管向肠系膜根部淋巴结转移, 肿瘤在直肠上动脉左、右两侧分支旁的淋巴结转移频率没有差异(P > 0.05)。侧壁直肠癌可以同时发生上方与侧方淋巴结转移, 但是均以肿瘤同侧淋巴结受累为主。本组侧壁直肠癌12例, 发生同侧直肠上动脉分支旁淋巴结转移9例, 对侧5例, 淋巴结转移度分别为43.0%与16.1%, 二者比较有显著性差异(P < 0.01), 而且存在对侧直肠上动脉分支旁淋巴结转移的病例都有同侧直肠上动脉分支旁淋巴结受累。发生同侧直肠中动脉旁淋巴结转移6例, 对侧0例, 淋巴结转移度分别为40.6%与0(P < 0.05), 其中4例仅为直肠中动脉旁淋巴结微转移。

淋巴结转移是影响直肠癌预后最主要的因素之一, 因此手术彻底清除受累淋巴结显得尤为重要。直肠癌TME手术要求在直视下沿盆筋膜脏、壁层之间的无血管间隙进行锐性解剖, 完整的切除直肠系膜及其内的脂肪、血管和淋巴组织^[17, 26-27]。为了根除肿瘤复发的隐患, 有学者主张对低位直肠癌, 尤其是低位进展期直肠癌施行包括髂总、髂内、髂外、闭孔、直肠中动脉根部淋巴结在内的扩大的盆腔淋巴结清扫^[6, 28]。另有学者则指出, 侧方淋巴结清扫并不能提高根治术后5 a生存率, 反而增加了手术并发症, 尤其是患者的泌尿功能及性功能严重受损, 极大地降低了术后生活质量^[29-30]。

根据本组资料发现, 不仅不同肠管节段的直肠癌

淋巴流向不同, 不同肠壁方位的直肠癌淋巴结转移规律也存在很大的差异。由于进展期低位直肠癌(距齿状线小于 5 cm)存在一定数量的侧方淋巴结转移, 对这些患者如果不进行侧方淋巴结清扫, 残留的病变将成为术后局部复发的重要原因, 影响长期生存率; 而直肠癌不同的手术方式和淋巴结清扫范围又直接影响患者术后的生存率与生活质量, 因此我们认为, 直肠癌术式的选择应该个体化: (1)对于后壁直肠癌, 可按照 TME 的原则, 完整切除肿瘤及包裹其周围的直肠系膜; 若术前已有证据显示肿瘤发生侧方淋巴结转移, 则同时行双侧侧方淋巴结清扫, 手术操作时仔细耐心, 注意保护盆腔自主神经, 防止术后泌尿功能及性功能障碍的发生。(2)对于侧壁直肠癌, 若肿瘤局限于一侧肠壁未超过中线、且系膜未发生淋巴结转移, 可行选择性单侧全直肠系膜切除(selective unilateral total mesorectal excision, SULTME), 手术完整切除肿瘤侧直肠系膜, 而在切除对侧直肠系膜时, 靠近直肠系膜侧断离侧韧带, 尽量多保留部分直肠侧韧带组织, 以确保盆腔自主神经丛不受损伤; 若肿瘤已发生侧方淋巴结转移, 但转移仅限于肿瘤侧直肠中动脉旁而对侧尚未受累时, 尤其是对于部分肿瘤分化程度高、仅查及肿瘤侧直肠中动脉旁淋巴结微转移者, 可在 TME 的基础上视情况仅行单侧侧方淋巴结清扫, 以保留至少一侧盆腔神经免受损伤, 利于术后排便、排尿及性功能的恢复, 提高生活质量。若肿瘤已发生双侧侧方淋巴结转移, 或肿瘤已超越中线累及对侧肠壁者, 手术原则同后壁直肠癌。(3)对于直肠前壁肿瘤, 手术切除遵循 TME 原则, 重点强调完整切除直肠前方的 Denonvillier's 筋膜。

4 参考文献

- Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- Zheng S, Liu XY, Ding KF, Wang LB, Qiu PL, Ding XF, Shen YZ, Shen GF, Sun QR, Li WD, Dong Q, Zhang SZ. Reduction of the incidence and mortality of rectal cancer by polypectomy: a prospective cohort study in Haining County. *World J Gastroenterol* 2002;8:488-492
- Zhou ZG, Wang Z, Yu YY, Shu Y, Cheng Z, Li L, Lei WZ, Wang TC. Laparoscopic total mesorectal excision of low rectal cancer with preservation of anal sphincter: A report of 82 cases. *World J Gastroenterol* 2003;9:1477-1481
- 谢正勇, 卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. *世界华人消化杂志* 2003;11:1050-1053
- 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:1760-1763
- Dong XS, Xu HT, Yu ZW, Liu M, Cu BB, Zhao P, Wang XS. Effect of extended radical resection for rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:970-973
- Hu JK, Zhou ZG, Chen ZX, Wang LL, Yu YY, Liu J, Zhang B, Li L, Shu Y, Chen JP. Comparative evaluation of immune response after laparoscopic and open total mesorectal excisions with anal sphincter preservation in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2690-2694
- Makin GB, Breen DJ, Monson JR. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:612-621
- Sun XN, Yang QC, Hu JB. Pre-operative radiochemotherapy of locally advanced rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:717-720
- Demols A, Van Laethem JL. Adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:420-426
- Frizelle FA, Emanuel JC, Keating JP, Dobbs BR. A multicentre retrospective audit of outcome of patients undergoing curative resection for rectal cancer. *N Z Med J* 2002;115:284-286
- Shimoyama M, Yamazaki T, Suda T, Hatakeyama K. Prognostic significance of lateral lymph node micrometastases in lower rectal cancer: an immunohistochemical study with CAM5.2. *Dis Colon Rectum* 2003;46:333-339
- Andreola S, Leo E, Belli F, Gallino G, Sirizzotti G, Sampietro G. Adenocarcinoma of the lower third of the rectum: metastases in lymph nodes smaller than 5 mm and occult micrometastases; preliminary results on early tumor recurrence. *Ann Surg Oncol* 2001;8:413-417
- Chen K, Cai J, Liu XY, Ma XY, Yao KY, Zheng S. Nested case-control study on the risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:99-103
- Yuan HY, Li Y, Yang GL, Bei DJ, Wang K. Study on the causes of local recurrence of rectal cancer after curative resection: analysis of 213 cases. *World J Gastroenterol* 1998;4:527-529
- 卿三华, 蒋会勇, 齐德林, 周正端, 黄祥成, 张福明, 盛权根. 影响大肠癌淋巴结转移的因素间相关性探讨. *世界华人消化杂志* 2000;8:654-657
- Vironen JH, Halme L, Sainio P, Kyllonen LE, Scheinin T, Husa AI, Kellokumpu IH. New approaches in the management of rectal carcinoma result in reduced local recurrence rate and improved survival. *Eur J Surg* 2002;168:158-164
- Bulow S, Christensen IJ, Harling H, Kronborg O, Fenger C, Nielsen HJ. Recurrence and survival after mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 2003;90:974-980
- Canessa CE, Badia F, Fierro S, Fiore V, Hayek G. Anatomic study of the lymph nodes of the mesorectum. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1333-1336
- Topor B, Acland R, Kolodko V, Galandiuk S. Mesorectal lymph nodes: their location and distribution within the mesorectum. *Dis Colon Rectum* 2003;46:779-785
- Wibe A, Moller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig JN, Heald RJ, Langmark F, Myrvold HE, Soreide O. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer-implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum* 2002;45:857-866
- Ridgway PF, Darzi AW. The role of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Cancer Control* 2003;10:205-211
- Cserni G. The influence of nodal size on the staging of colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 2002;55:386-390
- Nagtegaal ID, van Krieken JH. The role of pathologists in the quality control of diagnosis and treatment of rectal cancer-an overview. *Eur J Cancer* 2002;38:964-972
- Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Hase K. Prognostic determinants of patients with lateral nodal involvement by rectal cancer. *Ann Surg* 2001;234:190-197
- Wibe A, Eriksen MT, Syse A, Myrvold HE, Soreide O. Total mesorectal excision for rectal cancer-what can be achieved by a national audit? *Colorectal Dis* 2003;5:471-477
- Kneist W, Heintz A, Junginger T. Intraoperative identification and neurophysiologic parameters to verify pelvic autonomic nerve function during total mesorectal excision for rectal cancer. *J Am Coll Surg* 2004;198:59-66
- Fujita S, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Lateral pelvic lymph node dissection for advanced lower rectal cancer. *Br J Surg* 2003;90:1580-1585
- Watanabe T, Tsurita G, Muto T, Sawada T, Sunouchi K, Higuchi Y, Komuro Y, Kanazawa T, Iijima T, Miyaki M, Nagawa H. Extended lymphadenectomy and preoperative radiotherapy for lower rectal cancers. *Surgery* 2002;132:27-33
- Fazio S, Ciferri E, Giacchino P, Municino O, Rovida S, Bondanza GS, Gazzaniga GM. Anterior resection in rectal cancer: the role of lymphadenectomy. Comparison of 2 surgical experiences. *Chir Ital* 2002;54:649-657

抑瘤基因 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生长的影响

王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 张晓梅, 彭 聪, 黄 河, 刘 芬, 李晓玲, 李桂源

王晓艳, 沈守荣, 刘芬, 中南大学湘雅三院消化内科 湖南省长沙市 410013
刘华英, 彭聪, 黄河, 李晓玲, 李桂源, 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所
湖南省长沙市 410078
张晓梅, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410078
王晓艳, 女, 1970-04-01 生, 河南省郑州市人, 汉族. 1993 年获山西医科大学学士学位, 2003 年获中南大学湘雅医学院博士学位, 主治医师. 主要从事
消化道肿瘤发病机制研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30370801
湖南省自然科学基金资助项目, No. 01JJY2102 和 03JJY2004
项目负责人: 沈守荣, 410013, 湖南省长沙市桐梓坡路, 中南大学湘雅三院
消化内科. ligy@xymu.net.
电话: 0731-8618450
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-22

Effects of tumor suppressor gene NGX6 on growth of human colon cancer cell line HT-29

Xiao-Yan Wang, Shou-Rong Shen, Hua-Ying Liu, Xiao-Mei Zhang,
Cong Peng, He Huang, Fen Liu, Xiao-Ling Li, Gui-Yuan Li

Xiao-Yan Wang, Shou-Rong Shen, Fen Liu, Department of
Gastroenterology, Third Xiangya Hospital, Central South University,
Changsha 410013, Hunan Province, China
Hua-Ying Liu, Cong Peng, He Huang, Xiao-Ling Li, Gui-Yuan Li, Institute
of Cancer Research, Xiangya School of Medicine, Central South
University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Xiao-Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.
30370801, the Natural Science Foundation of Hunan, No.01JJY2102
and No. 03JJY2004
Correspondence to: Dr. Shou-Rong Shen, Department of Gastroenterology,
Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan
Province, China. ligy@xymu.net
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-10-22

Abstract

AIM: NGX6 is a novel tumor suppressor gene candidate, and the expression of NGX6 decreased in colon cancer specimen, which suggested that the down-regulation of NGX6 was closely related to tumorigenesis of colon cancer. This study was designed to explore effects of NGX6 on the cytobiological characteristics of human colon cancer cell line HT-29 and to elucidate the role of NGX6 in the colon cancer.

METHODS: The mammal expression vector of pcDNA3.1 (+)/NGX6 was transfected into human colon cancer cell line HT-29 cells by liposome. The integration of the exogenous vector DNA and the expression of NGX6 were detected by dot blot and RT-PCR. Finally, the cytobiological characteristics of positive clone were analyzed by growth curves of cells, MTT, soft agar assay, FCM and xenograft.

RESULTS: pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 cells grew slower than pcDNA3.1 (+)/HT-29 and HT-29 cells ($P < 0.05$), and the PDT of pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 cell was 34.5 hours, which was significantly longer than that of pcDNA3.1 (+)/

HT-29 cells (27.1 h) and HT-29 cells (23.0 h). FCM data showed that the overexpression of NGX6 blocked the progression of G1 \rightarrow S phase in cell cycle, and it also presented decreased clonogenicity in soft agar assay and tumor formation in nude mice.

CONCLUSION: The re-expression of NGX6 can reverse the malignant phenotype of human colon cancer cell line HT-29. Therefore, NGX6 gene may be a good candidate of tumor suppressor gene associated with colon cancer.

Wang XY, Shen SR, Liu HY, Zhang XM, Peng C, Huang H, Liu F, Li XL, Li GY. Effects of tumor suppressor gene NGX6 on growth of human colon cancer cell line HT-29. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):574-579

摘要

目的: NGX6 是新克隆的候选抑瘤基因, 其在结肠癌组织中表达明显下调, 提示 NGX6 的差异表达与结肠癌发生有关. 本文通过研究 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生物学特性的影响以明确 NGX6 在结肠癌发生发展中的作用.

方法: 脂质体介导 pcDNA3.1 (+)/NGX6 重组体转染低表达 NGX6 的人结肠癌细胞 HT-29, Dot blot 及 RT-PCR 方法检测外源性 NGX6 基因的表达, 借助生长曲线、MTT、软琼脂集落形成、流式细胞仪、裸鼠成瘤实验对 NGX6 转染前后人结肠癌细胞 HT-29 的生物学行为进行检测.

结果: pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 组细胞生长速度比 pcDNA3.1 (+)/HT-29 和 HT-29 组明显减慢 ($P < 0.05$), 其倍增时间为 34.5 h 比 pcDNA3.1 (+)/HT-29 (27.1 h) 和 HT-29 (23.0 h) 延长; pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 组软琼脂集落形成率较对照组明显下降 ($P < 0.05$); 流式细胞仪检测 NGX6 高表达能延缓 HT-29 细胞周期由 G0/G1 期 \rightarrow S 期的进程; 裸鼠成瘤实验表明 pcDNA3.1 (+)/NGX6/HT-29 组成瘤受抑.

结论: NGX6 的重表达可逆转人结肠癌细胞 HT-29 的恶性表型; NGX6 是极具前途的结肠癌相关抑瘤基因候选者.

王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 张晓梅, 彭聪, 黄河, 刘芬, 李晓玲, 李桂源. 抑瘤基因 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生长的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):574-579

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/574.asp>

0 引言

结肠癌是最常见的人类恶性肿瘤之一^[1-10], 在北美和欧洲结肠癌是癌相关性死亡的主要原因^[11]; 在我国其发病率正以每年 2.4% 的速度增长. 研究表明结肠癌中存在

EGF/EGFR 高表达, 其与结肠癌的恶性转化、增生、浸润及不良预后有密切关系^[12-16], 抗 EGF/EGFR 治疗可逆转结肠癌的恶性表型^[17]. 生物信息学预测 NGX6 蛋白具有 EGF-like 结构域, 其可明显地抑制鼻咽癌细胞的增生, 提示 NGX6 可能具有负性调控 EGFR 的作用^[18-20]. 文献报道 NGX6 基因低表达与结肠癌的发生、转移密切相关. 上述研究结果提示 NGX6 在结肠癌中可能通过影响 EGFR 的活性及表达而抑制结肠癌的发生和增生^[21]. 为进一步明确 NGX6 在结肠癌中的作用, 我们建立了稳定表达 NGX6 的人结肠癌细胞 HT-29, 通过生长曲线、MTT、软琼脂集落形成、裸鼠成瘤实验, 分析 NGX6 基因对人结肠癌细胞 HT-29 生物学行为的影响, 以阐明其在结肠癌发生、发展、分化中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 低分化人结肠癌细胞 HT-29, 用含 120 ml/L 胎牛血清的 DMEM, 50 ml/L 的 CO₂, 37 °C 条件下培养; pcDNA3.1(+)/NGX6 重组体为哺乳动物高效表达载体 (由湘雅医学院肿瘤研究所李江博士惠赠); Balb/c 裸鼠, ♂, 4 周龄, 购于中国科学院上海药物研究所动物中心, 在湘雅医学院动物学部无菌饲养; 随机引物标记试剂盒、反转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、Taq 酶、限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 均购自美国 Promega 公司; 脂质体、TrizolTM 试剂、蛋白酶 K 和 RNA 酶为美国 GIBCOL 公司产品; DNA 抽提纯化试剂盒 (小量质粒快速抽提纯化试剂盒、大量质粒快速抽提纯化试剂盒、小量胶回收试剂盒) 购自上海舜华生物工程有限公司; 同位素 α -³²P-dCTP 购自北京福瑞公司; 胎牛血清, DMEM 培养基购自华美生物工程公司; 三对引物由上海博亚生物技术有限公司合成: GAPDH 的两条引物为: L: 5' - CCACCCAGAAGACTGTGGAT-3'; R: 5' - TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3' 其扩增目的片段为 402 bp; NGX6: L: 5' - GTGCGTGTGGAAACATCATC-3'; R: 5' - TTTGGAACAGGTCACTGCTG-3', 其扩增目的片段为 520 bp; pCDNA3.1(+): L: 5' - TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT-3'; R: 5' - TCATTTGAAACCCAGAGTC-3', 扩增片段为 498 bp.

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取步骤 按小量质粒快速抽提纯化试剂盒操作程序提取. 培养细胞基因组 DNA 抽提用刮棒将细胞收集入 1 mL 的 PBS 中, 按照《分子克隆实验指南》步骤操作. 培养细胞总 RNA 的提取按 TrizolTM 试剂盒 (GIBCOL 公司) 操作程序提取. 差异 RT-PCR: 先用 DNase-I 消化 RNA 中痕量的 DNA. 按反转录试剂盒操作程序作反转录反应, 反应体积 20 μ L, 模板 RNA 4 μ g, 反应结束后, 95 °C, 10 min 终止反转录反应. PCR 反应体系 50 μ L 中含 KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 200 mmol/L, Tris HCl 10 mmol/L, pH 8.0, 上下游引物 0.1 mmol/L, 模板 cDNA 5 M I, TaqDNA 聚合酶 3U, 石蜡油覆盖. 为客观地反映 mRNA 表达的相

对水平, 在 NGX6 及内对照 GAPDH 达到 PCR 平台期前结束 PCR. 采用下列参数进行差异 PCR: 94 °C, 50 s; 55-58 °C, 50 s; 72 °C, 50 s; 取 PCR 产物 5 μ L, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下照相. RT-PCR 产物琼脂糖电泳照片和 Dot blotX 光片结果用 TIPAS98 图像分析仪进行灰度扫描, 测定产物条带面积的积分光密度 A 值 (IA). NGX6 的相对量 (IA 比值) = NGX6 的 IA / 内对照 GAPDH 的 IA.

1.2.2 质粒 DNA 的转染 在 6 孔板中, 每孔接种 1×10^5 个 HT-29 细胞于完全培养基中, 细胞生长至 40-60% 融合期. 取重组体 DNA 4 μ g 及脂质体 10 μ L 转染细胞, 24 h 后更换完全培养基继续培养. 48h 后, 用选择性培养基 (G418 浓度: 1-3 d 为 250 mg/L, 以后为 550 mg/L) 筛选抗性克隆, 18 d 后挑单个克隆扩大培养, 建成稳定传代的转染细胞系.

1.2.3 DNA 探针的制备 以 NGX6 cDNA 为模板, PCR 扩增 NGX6 的产物, PCR 纯化试剂盒回收 PCR 产物, 以 α -³²P-dCTP 为标记物, 采用随机引物标记试剂盒分别标记 NGX6 及 GAPDH 基因的探针, 标记 DNA 量为 50-100 ng, 探针的比放射活性大于 1×10^8 cpm/g. Sephadex G-50 柱纯化探针. 探针杂交: 将 total RNA 10 μ g 通过多孔过滤加样器加样于尼龙膜上, 凉干尼龙膜, 1.5 J/cm² 紫外线将 RNA 与尼龙膜交联, 真空凝胶干燥仪上 80 °C 干烤 2 h. 同一张膜先后与 NGX6 探针和 GAPDH 探针杂交, -70 °C 放射自显影 3 d; 取 X 光片显影, 定影.

1.2.4 细胞生长 将 pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29, pcDNA 3.1(+)/HT-29 和 HT-29 三组细胞各取 1×10^4 个接种于 24 孔板内, 每隔 24 h 消化 3 孔细胞计数, 每孔计数 3 遍, 取均值. 共记数 8 d, 以细胞数为纵坐标, 时间为横坐标绘出生长曲线. 数据分别采用 t 检验和配伍组多样本间均数比较处理, 并计算生长期细胞的倍增时间. 四唑盐 (MTT) 比色法: 按《细胞培养》步骤操作, 酶联免疫检测仪上测定各孔 490 nm 波长处的吸光度 A 值, 数据经统计学软件 SPSS 11.0 处理. 软琼脂集落形成: 配制 5 g/L 的底层琼脂, 凝固后将含单细胞的 3.3 g/L 顶层琼脂培养液接种于底层琼脂上, 每种细胞接种 5 皿, 接种密度为 2.0×10^4 细胞 / 平皿. 在含 50 mL/L CO₂ 的 37 °C 生化培养箱中培养 15 d, 计算平均集落形成率, 数据经统计学软件 SPSS 11.0 处理. 克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 $\times 100\%$. 流式细胞术: 取生长状态良好、融合至 70-80% 的 HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29 三组细胞 PBS 洗涤, 700 mL/L 乙醇固定, 调节细胞浓度至 1×10^6 /L, 加入 PI 染液, 流式细胞仪分析细胞群体在细胞周期各个时相的分布比例及细胞凋亡的百分率. 裸鼠成瘤: 以 3×10^7 个细胞 / 只裸鼠的浓度, 将 HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6 /HT-29 三组细胞接种于 4 周龄裸鼠的前肢腋下, 每组 3 只, 每隔 3 d 测量裸鼠移植瘤体

积的大小. 30 d后处死裸鼠, 测量移植瘤体积及重量, 并用甲醛固定石蜡包埋制成病理切片做 HE 染色.

2 结果

2.1 双酶切鉴定 NGX6/pcDNA3.1(+)重组体 EcoR I 和 Xho I 双酶酶切 5 组转化细菌 JM109 的重组体, 均切出 5.4 Kb 的 pcDNA3.1(+)载体的及 2.1 Kb 的 NGX6 片段 (图 1), 表明重组体均含 NGX6 阅读框架的全长.

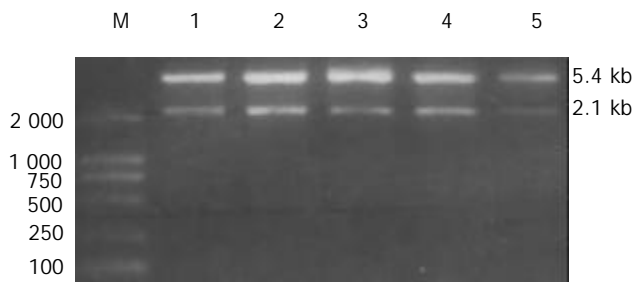


图1 重组体质粒双酶切鉴定结果. M: DL2000Marker; 1-5 为载体重组体酶切后产物均为阳性克隆.

2.2 NGX6 基因重组体的脂质体转染和克隆筛选 分别挑选 11 个转染 pcDNA3.1(+)/NGX6 及 4 个转染 pcDNA3.1(+) 的抗性克隆扩大培养, RT-PCR 和 Dot blot 鉴定克隆的阳性率, 11 个 pcDNA3.1(+)/NGX6 克隆中 2 个克隆(+2、+10 号)灰度扫描 IA 值与空白组的 IA 值之比大于 1.5 (图 2); 4 个转染 pcDNA3.1(+) 的抗性克隆中 -4 和 -6 号质粒的表达量高 (图 3). 点杂交鉴定结果与 RT-PCR 结果一致 (图 4). 以下实验分别选 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组的 +10 号克隆为阳性组、pcDNA3.1(+)/HT-29 的 -6 号克隆和 HT-29 组为阴性对照组.

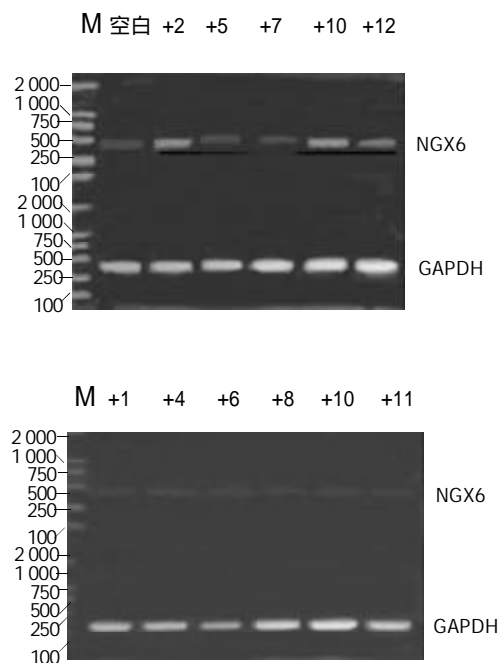


图2 pcDNA3.1(+)/NGX6 转染 HT-29 细胞抗性克隆的 RT-PCR 鉴定结果. M: DL 2 000 marker;空白为未转染的 HT-29 克隆; +2~+12 为转染 pcDNA3.1(+)/NGX6 重组体的克隆, 其中 +2, +10 为阳性克隆.

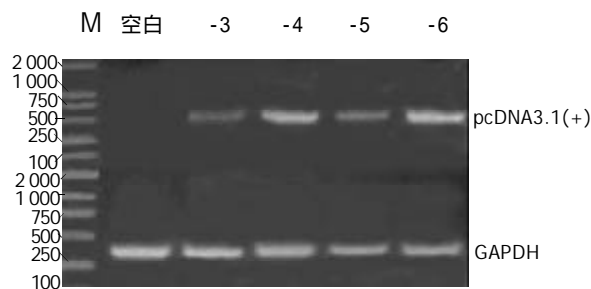


图3 pcDNA3.1(+)转染 HT-29 细胞抗性克隆的 RT-PCR 鉴定结果. M: DL 2000 marker; 空白: 为未转染 HT-29 组; -3~-6 为 pcDNA3.1(+) 转染组均阳性; -4, -6 克隆 pcDNA3.1(+) 表达量高.

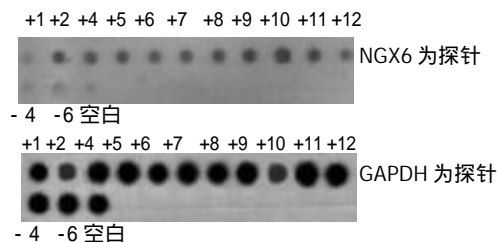


图4 pcDNA3.1(+)/NGX6 和 pcDNA3.1(+)转染的 HT-29 抗性克隆分别以 NGX6, GAPDH 为探针的点杂交鉴定结果.

2.3 NGX6 对 HT-29 细胞生物学性状的影响 绘制 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 三组细胞的生长曲线 (图 5), 结果表明 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组细胞的生长速度比 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组明显降低, t 检验和方差分析 ($P < 0.05$). 根据公式 $T_D = t \times \log 2 / (\log NT - \log N_0)$ 得出 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组的倍增时间分别为 34.5 h、27.1 h 和 23.0 h (图 6). 酶联免疫检测仪测定 96 孔板中 3 组细胞分别在 490 nm 波长处的吸光度, 结果表明 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组的吸光值明显较 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组高, HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组吸光度 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 分别为 0.67 ± 0.07 , 0.64 ± 0.05 , 0.50 ± 0.04 , 统计学分析 (t 检验和方差分析) ($P < 0.05$), 表明 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组细胞生长速度较另外两组明显减慢. pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组的平均集落形成率分别为 4.11%、10.54% 和 9.69%, 阳性组克隆形成率明显降低 ($P < 0.05$) (图 7), 且 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组集落生长速度较 pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组慢, 集落体积小, 克隆存活时间缩短. 上述结果表明在体外 NGX6 基因能抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增生. 流式细胞仪检测结果显示 3 组细胞凋亡率无明显差别; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 组 G1/G0 期细胞分布的百分比分别为 61.8%、38.1% 和 40.85%, 3 组细胞 S 期的百分比分别为 13.0%、23.0% 和 23.8%, 表明 NGX6 转染后能延缓 HT-29 细胞周期由 G1 \rightarrow S 期的进程. 将 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29, pcDNA3.1(+)/HT-29 和 HT-29 三组细胞分别注射 3 组裸鼠, 每组 3 只, 每只裸鼠接种 3×10^7 个肿瘤细胞, 4-5 d 可见到皮下

包块, HT-29 和 pcDNA3.1(+)/HT-29 组肿块生长速度较快, 且于 15 d 时肿块坏死脱落; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组的肿块生长较慢, 瘤体从 24 d 开始坏死(图 8). 3 组移植瘤石蜡切片 HE 染色显示均为低分化腺癌, 无组间差别. pcDNA3.1(+)/HT-29 组移植瘤 HE 染色发现肿瘤包膜断裂, 瘤体内有血管瘤栓形成, 而 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组血管壁结构完整, 未见瘤细胞浸润(图9).

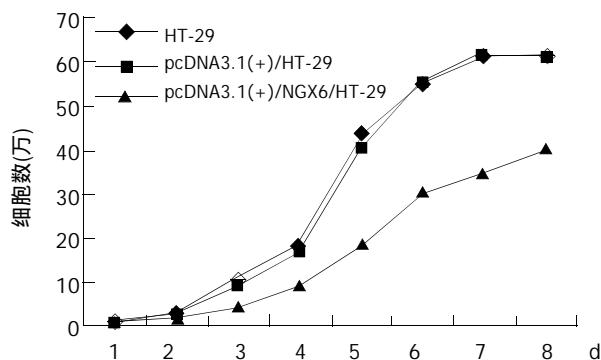


图 5 NGX6 基因转染前后的 HT-29 细胞生长曲线.

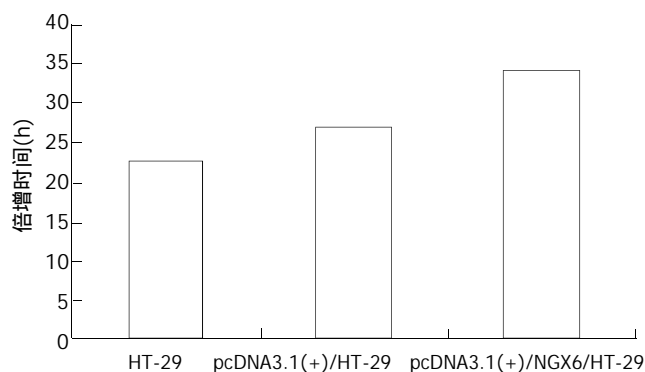


图 6 NGX6 转染对结肠癌细胞 HT-29 倍增时间的影响.

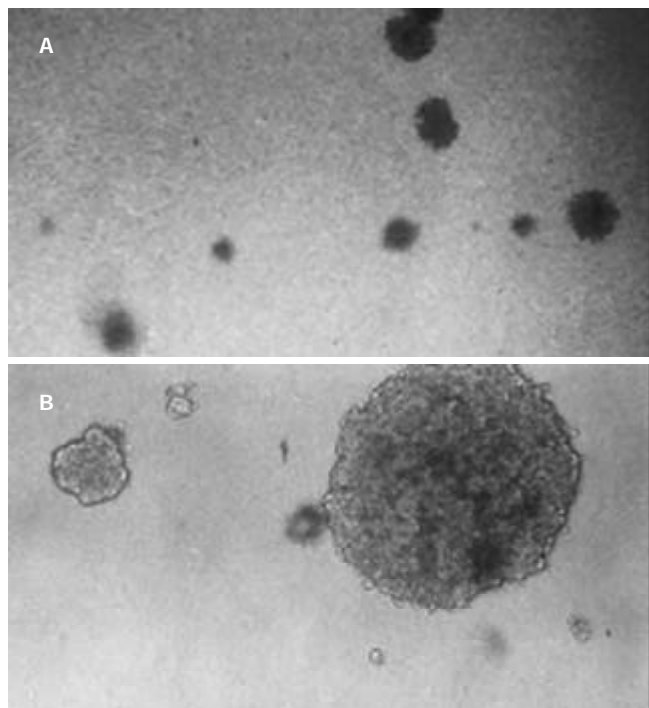


图 7 NGX6 转染前后 HT-29 细胞的软琼脂集落形成. A: HT-29 组($\times 100$); B: HT-29 组($\times 400$); C: pcDNA3.1(+)组($\times 100$); D: pcDNA3.1(+)组($\times 400$); E: pcDNA3.1(+)/NGX6 组($\times 100$); F: pcDNA3.1(+)/NGX6 组($\times 400$); G: HT-29 和 pcDNA3.1(+)/HT-29 组克隆数多, 体积大; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 组克隆数明显减少, 体积小.

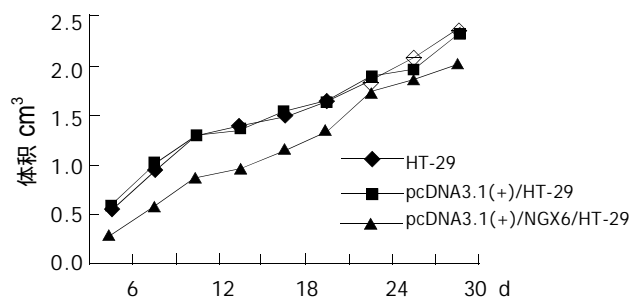


图 8 NGX6 转染前后裸鼠移植瘤体积变化.

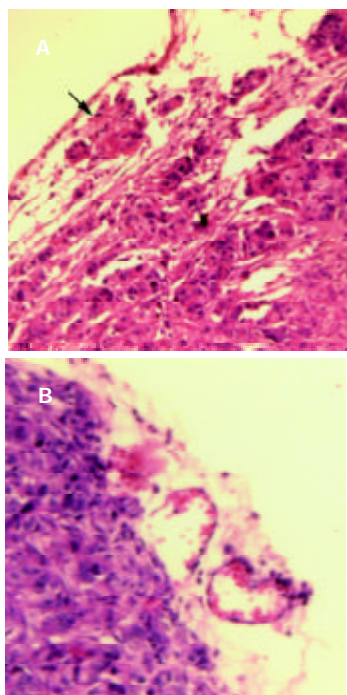


图9 pcDNA3.1(+)/HT-29和pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组移植瘤HE ($\times 200$); A pcDNA3.1(+)/HT-29组移植瘤可见瘤体包膜断裂、不完整, 箭头所示处血管瘤栓形成; B pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组移植瘤内血管壁完整, 未见瘤细胞侵犯。

3 讨论

结肠癌的发生涉及到瘤基因的激活和抑瘤基因的失活^[22-23]. Vogelstein实验室建立了经典的“APC \rightarrow K-ras \rightarrow DCC \rightarrow p53 \rightarrow nm23”的结肠癌发病机制模式^[24], 但结肠癌的发生存在多样性^[25]. NGX6基因(AF188239)是新克隆的候选抑瘤基因, 生物信息学预测NGX6位于染色体的9p11.1-12区域, cDNA全长2.1 Kb, 基因编码338个氨基酸, 具有两个跨膜结构, 一个EGF-like domain, 多个N-糖基化位点和多个酪氨酸磷酸激酶位点^[26]. EGFR与结肠癌的恶性转化、增生、浸润及不良预后有密切关系^[27-31]. 最近Williams在结肠癌中克隆了2个具有EGF-like domain的新基因, 其明显地能抑制结肠癌的增生^[32]. 上述研究提示NGX6是否通过影响结肠癌中EGFR的活性发挥抑瘤作用? 已有研究表明NGX6表达变化与结肠癌的发生、转移呈负相关^[33]. 为进一步明确NGX6对结肠癌增生的影响, 将NGX6基因通过脂质体介导转染入NGX6低表达的人结肠癌细胞系HT-29, 建立NGX6稳定表达的人结肠癌细胞系, 探讨NGX6在结肠癌发生、发展中的作用. 结果显示pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组结肠癌细胞较pcDNA3.1(+)/HT-29和HT-29组细胞生长缓慢, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞的倍增时间(34.5 h)比pcDNA3.1(+)/HT-29和HT-29组倍增时间(27.1 h和23.0 h)延长; 软琼脂集落形成实验发现pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组克隆形成率较对照组降低, 克隆体积减小, 克隆存活时间缩短, 强烈表明NGX6重表达可明显地抑制人结肠癌细胞HT-29的克隆形成力. 裸鼠成瘤实验显示pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组的移植瘤体积

有所缩小, 但统计学无明显差别, 可能与每只裸鼠接种瘤细胞数量较多、实验动物较少或与肿瘤在裸鼠体内生长环境复杂, 尚受到其他生长因子刺激有关. 移植瘤病理切片HE染色示3组均为低分化腺癌, 无组间差异. 值得关注的是, pcDNA3.1(+)/HT-29组的病理切片中发现有血管瘤栓形成, 瘤体包膜断裂; pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组无此现象. 已有研究表明NGX6在有转移的结肠癌组织中较无转移的结肠癌组织中表达明显下调, 上述结果提示NGX6可能具有抑制结肠癌转移的作用.

肿瘤是一种细胞周期性疾病^[34]. 细胞周期能否启动进入细胞增生, 其主要在于能否通过G1/S检测点, 细胞一旦通过该检测点, 即使在缺乏生长因子刺激条件下, 细胞也能在cyclins和CDK的驱动下完成该细胞周期^[35], 所以G1/S检测点在肿瘤增生中发挥着关键的作用^[36-39]. 为明确NGX6对结肠癌细胞周期的影响, 采用流式细胞仪检测NGX6转染前后人结肠癌细胞HT-29在细胞周期中的分布, 发现pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞在G0/G1期的细胞数明显增加, S期减少. NGX6转染后G0/G1期与S期细胞数的比值为转染前比值的2.24倍, 形成G0/G1期阻滞, 表明NGX6明显延缓人结肠癌细胞HT-29细胞周期由G1 \rightarrow S期的进程, 纠正细胞的失控性增长, 逆转人结肠癌细胞的恶性表型. 综上所述, 新候选抑瘤基因NGX6可抑制人结肠癌细胞系HT-29增生. NGX6符合抑瘤基因的基本条件: (1)基因在相应的正常组织中表达; (2)在肿瘤组织中有该基因功能失活或结构改变或表达缺陷; (3)将基因野生型导入基因异常的肿瘤细胞内, 可全部或部分改变其恶性表型. 因此NGX6为新的结肠癌相关抑瘤基因. 同时研究还发现NGX6可能具有结肠癌转移抑制作用, 正在进行进一步的研究以明确NGX6在结肠癌转移中的作用.

4 参考文献

- 1 Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2642-2649
- 2 Ji CY, Smith DR, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:216-223
- 3 谢正勇, 卿三华. 国人青年结肠癌解剖部位分布及临床病理特点. *世界华人消化杂志* 2003;11:1050-1053
- 4 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1976-1980
- 5 Yan W, Wang WL, Zhu F, Chen SQ, Li QL, Wang L. Isolation of a novel member of small G protein superfamily and its expression in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1719-1724
- 6 Cai KL, Wang GB, Xiong LJ. Effects of carbon dioxide and nitrogen on adhesive growth and expression of E-cadherin and VEGF of human colon cancer cell CCL-228. *World J Gastroenterol* 2003;9:1594-1597
- 7 Zhu JW, Yu BM, Ji YB, Zheng MH, Li DH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by hydrogen peroxide in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:153-157
- 8 袁耀宗, 王琴, 徐家裕, 周文达, 俞莺莺, 罗伟. 抗结肠直肠癌单克隆抗体测定胃、肠癌患者血清中癌相关抗原. *新消化病学* 1995;3:3-4

- 9 唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇. DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:1645-1646
- 10 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青. 胃泌素拮抗剂增加 C D 自杀基因对结肠癌细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1385-1388
- 11 Clarke LE, Leitzel K, Smith J, Ali SM, Lipton A. Epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood of patients with pancreatic, lung, and colon carcinomas detected by RT-PCR. *Int J Oncol* 2003;22:425-430
- 12 王青, 吴金生, 高德明, 赖大年, 马庆久. EGF 受体和转化生长因子 α -mRNA 在人大肠癌组织的表达意义. 世界华人消化杂志 1999;7:590-592
- 13 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 人结肠癌中 EGFR、EGF 及 TGF- α 的基因表达. 中国医学科学院学报 1994;16:259
- 14 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 表皮生长因子受体单克隆抗体抗人结肠癌 LST174 的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:841
- 15 Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer* 2003;97:960-968
- 16 Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American joint committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331-1346
- 17 Gainet M, Guardiola E, Dufresne A, Pivot X. Epidermal growth factor receptors (EGFR): a new target for anticancer therapy. *Cancer Radiother* 2003;7:195-199
- 18 Xiong W, Zeng ZY, Li XL. Single-nucleotide polymorphisms in NGX6 gene and their correlation with nasopharyngeal carcinoma. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002;34:512-515
- 19 李江, 谭琛, 向秋. 用双向电泳和质谱技术检测 NGX6 转染后人鼻咽癌细胞表达差异的蛋白质. 生物化学与生物物理进展 2001;28:573-578
- 20 李小玲, 李江, 黄宇琛. 人鼻咽癌相关基因 NGX6 在大肠杆菌中的诱导表达及纯化. 生命科学研究 2003;7:151-155
- 21 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 王洁如, 李江. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因 NGX6 的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:873-876
- 22 许昌泰, 闫小君. p53 抗癌基因和消化系统肿瘤. 世界华人消化杂志 1999;7:77-79
- 23 Watanabe N. Oncogene and tumor suppressor gene. *Rinsho Byori* 2002;123(Suppl):131-136
- 24 Zajac V, Tomka M, Ilencikova D, Majek P, Stevurkova V, Kirchhoff T. A double germline mutations in the APC and p53 genes. *Neoplasma* 2000;47:335-341
- 25 Vecsey-Semjen B, Becker KF, Sinski A, Blennow E, Vietor I, Zatloukal K, Beug H, Wagner E, Huber LA. Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene* 2002;21:4646-4662
- 26 谢奕, 宾亮华, 阳剑波. 一个在鼻咽癌中表达下调的新基因 NAG-7 的克隆及其特征分析. 中华医学杂志 2001;114:530-534
- 27 Takahashi Y, Ellis LM, Wilson MR, Bucana CD, Kitadai Y, Fidler IJ. Progressive upregulation of metastasis-related genes in human colon cancer cells implanted into the cecum of nude mice. *Oncol Res* 1996;8:163-169
- 28 Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:3-9
- 29 Radinsky R, Risin, Fan, Dong, Bielenberg, Bucana, Fidler. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995;1:19-31
- 30 De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, Peeters PM, Slooff MJ, De Vries EG. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 1998;28:971-979
- 31 Parker C, Roseman BJ, Bucana CD, Tsan R, Radinsky R. Preferential activation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma liver metastases in nude mice. *J Histochem Cytochem* 1998;46:595-602
- 32 Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999;59:4083-4089
- 33 Zhang XM, Wang XY, Sheng SR, Wang JR, Li J. Expression of tumor related genes NGX6, NAG 7 BRD7 in gastric cancer and colonorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1729-1733
- 34 金顺钱, 詹启敏. 肿瘤分子生物学是基础医学研究的前沿. 世界华人消化杂志 2002;10:678-680
- 35 曾益新. 肿瘤学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999:108-109
- 36 Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS* 2003;111:252-265
- 37 Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002;1:103-110
- 38 Michalides RJ, van de Brekel M, Balm F. Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck* 2002;24:694-704
- 39 Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-231

DPC₄基因转染对结肠癌血管生成的影响

罗庚求, 李景和, 陈永平, 文继舫, 肖德胜, 胡忠良, 杨晓静, 郑 晖

罗庚求, 李景和, 陈永平, 文继舫, 肖德胜, 胡忠良, 杨晓静, 郑晖, 中南大学基础医学院病理学系 湖南省长沙市 410078
罗庚求, 男, 1972-11-07 生, 湖南省邵东县人, 汉族. 1998 年湖南医科大学学士, 2003 年中南大学湘雅医学院硕士, 助教. 主要从事消化道肿瘤研究. 湖南省科委基金资助项目, No.1013-19
项目负责人: 李景和, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 88 号, 中南大学湘雅基础医学院病理系. ggluo@sina.com
电话: 0731-2650408
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-09-25

Effect of transfected DPC₄ gene on angiogenesis of colon carcinoma

Geng-Qiu Luo, Jing-He Li, Yong-Ping Chen, Ji-Fang Wen, De-Sheng Xiao, Zhong-Liang Hu, Yiao-Jing Yang, Hui Zheng

Geng-Qiu Luo, Jing-He Li, Yong-Ping Chen, Ji-Fang Wen, De-Sheng Xiao, Zhong-Liang Hu, Yiao-Jing Yang, Hui Zheng, Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of Hunan Province, No.1013-19
Correspondence to: Jing-He Li, Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China. ggluo@sina.com
Received: 2003-08-23 Accepted: 2003-09-25

Abstract

AIM: To study the mechanism of transfected DPC₄ gene on angiogenesis.

METHODS: SW620 cells were transfected with PcDNA3.1-DPC₄ plasmid by using lipofectamine transfecting technique. Expression of Smad4 in DPC₄⁺-SW620 cells was observed by Western blot. The expression of VEGF protein in the cell supernatant was detected by ELISA, and VEGF mRNA by RT-PCR. The model of nude mice inoculated with DPC₄⁺-SW620 cells was established by injecting into flank subcutaneously. The expression of VEGF protein and the microvessel density of tumor tissue in nude mice were detected by immunohistochemical staining (SP method).

RESULTS: DPC₄⁺-SW620 cells expressing Smad4 were harvested; Smad4 protein showed stronger expression in SW620 cells transfected with PcDNA-DPC₄ plasmid than that in not-transfected SW620 cells and SW620 cells transfected with blank plasmid, and the positive signal was localized in cytoplasm and nucleus, mainly in cytoplasm; There were lower expression of VEGF protein and mRNA in DPC₄⁺-SW620 cells than that in SW620 cells and PcDNA-SW620 cells ($P < 0.05$); The model of nude mice inoculated with colon carcinoma cells was established successfully. The tumors of nude mice inoculated with DPC₄⁺-SW620 cells grew more slowly than that inoculated with SW620 cells and PcDNA-SW620 cells. The volume and mass of tumors in nude mice inoculated with DPC₄⁺-SW620 cells were smaller and lighter than those with SW620 cells and PcDNA-SW620 cells ($P < 0.05$). The

expression of VEGF and the microvessel density in DPC₄⁺-SW620 cells were lower than those in SW620 cells and PcDNA-SW620 cells ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The DPC₄ gene can suppress the growth of the tumors in nude mice inoculated with DPC₄⁺-SW620 cells; The inhibitory effect of DPC₄ on colon carcinoma may be partly mediated by suppressing angiogenesis of tumor.

Luo GQ, Li JH, Chen YP, Wen JF, Xiao DS, Hu ZL, Yang YJ, Zheng H. Effect of transfected DPC₄ gene on angiogenesis of colon carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):580-584

摘要

目的: 研究DPC₄基因转染对结肠癌血管生成的影响.

方法: 利用脂质体介导转染技术建立表达 Smad4 蛋白的 DPC₄⁺-SW620(PcDNA-DPC₄ 转染的 SW620 细胞)细胞模型; Western blot 检测细胞中 Smad4 的表达; 利用 ELISA 法检测细胞上清中 VEGF 蛋白的表达; 利用 RT-PCR 检测细胞内 VEGF mRNA 的表达; 利用皮下注射法建立裸鼠结肠癌移植瘤模型; 利用免疫组织化学 S-P 法检测裸鼠肿瘤组织中 VEGF 的表达及微血管密度.

结果: 建立了表达 Smad4 蛋白的 DPC₄⁺-SW620 细胞系; DPC₄⁺-SW620 细胞, 其 Smad4 蛋白表达于细胞质及细胞核, 以胞质为主; DPC₄⁺-SW620 细胞其 Smad4 蛋白表达水平明显高于 SW620 细胞及 PcDNA-SW620 细胞(PcDNA3.1 转染的 SW620 细胞); DPC₄⁺-SW620 细胞其 VEGF 蛋白、VEGF mRNA 水平明显低于 SW620 细胞及 PcDNA-SW620 细胞($P < 0.05$); 成功地建立了裸鼠结肠癌移植瘤模型; DPC₄⁺-SW620 组裸鼠肿瘤生长速度慢于 SW620 细胞组及 PcDNA-SW620 细胞组($P < 0.05$); DPC₄⁺-SW620 组裸鼠肿瘤重量低于 SW620 细胞组及 PcDNA-SW620 细胞组($P < 0.05$); DPC₄⁺-SW620 组裸鼠肿瘤组织 VEGF 蛋白、肿瘤组织微血管密度均低于 SW620 细胞组及 PcDNA-SW620 细胞组($P < 0.05$).

结论: DPC₄能够抑制裸鼠结肠癌移植瘤的生长.

罗庚求, 李景和, 陈永平, 文继舫, 肖德胜, 胡忠良, 杨晓静, 郑晖. DPC₄ 基因转染对结肠癌血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):580-584
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/580.asp>

0 引言

转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超

家族是由许多具有生物学特性的信号分子所组成的大家族^[1-5]. DPC₄基因表达产物 Smad4 是 TGF- β 信号转导通路中关键的核内转录因子. DPC₄是候选的肿瘤抑制基因^[6], 其缺失或突变失活与恶性肿瘤细胞丧失对 TGF- β 的反应性而逃避 TGF- β 的生长抑制作用密切相关, DPC₄的缺失或突变与结肠癌的恶性演进, 如远处转移有关^[7-9]. 我们通过 DPC₄基因转染高转移性的结肠癌细胞株 SW620, 获得表达 Smad4 蛋白的细胞系及通过动物实验建立了人结肠癌裸鼠移植瘤模型, 观察 DPC₄对 VEGF 的表达及微血管密度的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 SW620 细胞株由中南大学湘雅医学院细胞培养中心提供; Balb/c 裸鼠由北京中科院动物研究所提供; 空白质粒 PcDNA3.1 由 Joan Massague 惠赠, 阳性质粒 PcDNA3.1-DPC₄ 由本室肖德胜构建; 限制性内切酶 Hind III, BamH I, RPMI 1640, neomycine (G418), VEGF 和 GAPDH PCR 引物均由上海生工提供; 脂质体(lipofectamine), Trizol 购自 Invitrogen 公司; 鼠抗人 Smad4 Ab-1 购自 Neomarkers 公司; VEGF Ab-1, CD34 Ab-1, SP 试剂盒购自北京中山公司; MMV reverse transcription kit, PCR 试剂购自 Promega 公司; Qiagen plasmid mini kit 由 Qiagen 公司提供; VEGF ELISA kit 购自 Gibco 公司.

1.2 方法 取含 PcDNA3.1, PcDNA3.1-DPC₄ 质粒的细菌接种至含 LB 选择性培养基的培养皿, 用无菌牙签挑取菌落至培养液中小量培养, 碱裂解法小量制备质粒, 用 Hind III, BamH I 酶切鉴定, PcDNA3.1 及 PcDNA3.1-DPC₄ 经酶切电泳后分别出现 5.4、5.4 和 1.7 kb 的条带. 再用菌液大量培养, 并用质粒纯化试剂盒提取纯化质粒. 取高转移性结肠癌细胞株 SW620 培养, 用 lipofectamine reagent 将质粒 PcDNA3.1 与 PcDNA3.1-DPC₄ 分别转染 SW620 细胞, 转染细胞经 G418 0.5 g/L 浓度筛选 3 d, 以后换 0.25 g/L 维持筛选至长出细胞克隆, 挑取克隆扩增培养达 1×10^6 以上, 用细胞裂解液提取细胞总蛋白质, 用微量 BCA 法测定蛋白质浓度, 以 80×10^{-6} g 相同的总蛋白量加样进行 Western blot 分析以检测各组细胞 Smad₄ 蛋白的表达水平.

1.2.1 上清液 VEGF 水平检测 分别取未转染 SW620 细胞组, 空白质粒 PcDNA3.1 转染细胞组, 阳性质粒 PcDNA3.1-DPC₄ 转染细胞组, 用 D-Hanks 液洗涤, 2.5 g/L 胰酶消化, 计数板计数, 用 100 mL/L 小牛血清重悬成 4×10^8 /L, 各取 200 μ L 加入到 96 孔板, 每组设 3 个平行孔, 于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱培养 36 h, 各取 100 μ L 上清液按照 VEGF ELISA 试剂盒说明检测其蛋白分泌水平, 最后用酶标仪测 A₄₉₀ 值.

1.2.2 细胞内 VEGF 基因的表达 消化培养瓶中细胞, 用 100 mL/L 小牛血清重悬按细胞浓度为 1×10^8 /L, 接种至 6 孔板(每孔 1 mL), 置 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养至 80% 融合. 将 6 孔板内上清液去除, 用 PBS

洗 3 遍, 滤纸控干, 加 Trizol 试剂 1 mL, 提取总 RNA, 用核酸分析仪检测 RNA 浓度及纯度, 波长 A260/A280 比值 1.7-2.0, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见 3 条 RNA 带, 提示无 RNA 污染及降解. 取 2 μ g 总 RNA 进行逆转录合成 cDNA, 按逆转录试剂盒 A3 500 操作说明操作, 样品于 -20 $^{\circ}$ C 保存. 取 cDNA 进行 PCR 扩增, VEGF 及其内参照 GAPDH 引物序列为 VEGF 正义 5' GGG CAG AAT CAT CAC GAA 3', 反义 5' AAA TGC TTT CTC CGC TCT 3', 片段长度 359 bp; GAPDH 正义 5' CCACCCATG GCAAATTCCATGGCA 3', 反义 5' TCTAGACGGCA GGT CAGGTCCACC 3', 片段长度 598 bp. PCR 反应条件为预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物鉴定, 用 DOC 1 000 图像仪扫描, mRNA 相对含量用 PCR 产物 VEGF 灰度值与 GAPDH 灰度值的比值表示.

1.2.3 裸鼠成瘤 裸鼠于无特殊病原体条件(SPF)下饲养. 取雌性、4-5 周龄、体质量 14-18 g 的 Balb/c 裸鼠 12 只, 随机分成 3 组, 每组 4 只; 将转染 DPC₄ 基因、空白载体 PcDNA 及未转染 0.5×10^{10} /L 的 SW620 细胞 0.2 mL 注射接种于裸鼠腋下. 观察裸鼠成瘤的时间、成瘤率; 待腋下成瘤后每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤最大径(1)和最小径(t), 用公式 $V = \frac{1}{6} \pi \times t^2 \times l$ 计算肿瘤体积, 绘制生长曲线; 30 d 后处死, 拍照并分离肿瘤组织, 称重; 解剖裸鼠, 取肝脏、肺脏、脑、肾脏、胃肠组织及肿瘤组织, 肉眼观察及连续切片显微镜下观察肿瘤及转移情况. 瘤组织石蜡切片, 恒温干燥箱 56 $^{\circ}$ C 1 h, 二甲苯脱腊并梯度乙醇水化至水; 30 mL/L H₂O₂ 阻断 30 min, PBS 洗, 微波修复 5 min \times 2, 血清封闭 1h; 滴加鼠抗人 VEGF Ab-1(1:50), 37 $^{\circ}$ C 30 min, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加羊抗鼠 IgG, 湿盒内 37 $^{\circ}$ C 30 min, 滴加 streptavidin peroxidase 湿盒内 37 $^{\circ}$ C 30 min; DAB 显色. 对照: 用 PBS 缓冲液代替 VEGF Ab-1 做阴性对照, 用对 VEGF 高表达的乳腺癌组织为阳性对照. 另取肿瘤与正常组织交界处的肿瘤组织制片, 用 CD₃₄ 标记血管内皮细胞, 其一抗工作浓度为 1:25. 对照: 用 PBS 缓冲液代替 VEGF Ab-1 做阴性对照, 用对 CD34 高表达的肾癌组织做阳性对照. VEGF 蛋白表达均以胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性, 在每张切片上随机选取 10 个视野, 根据细胞染色强度分为阴性: 细胞无着色(0 分), 弱阳性: 黄色(1 分), 中度阳性: 棕黄(2 分), 强阳性: 棕褐(3 分). 计数每一强度的视野数, 根据下列计算公式计算每张切片的平均染色强度, $IS (intensity\ score) = \frac{\sum \{ [0 \times F_0] + [1 \times F_1] + [2 \times F_2] + [3 \times F_3] \}}{F}$, $F = \% \times 10$ 视野. 计算肿瘤内着色的毛细血管和微小血管, 凡呈现棕色单个内皮细胞或内皮细胞群者均作为一个血管计, 但肌层较厚及管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管不计数(N Engl J Med 1991;

324:1-8). 计数方法, 每张染色切片首先在低倍镜 $\times 40$ 选择肿瘤组织内血管密度最高区, 然后在 $\times 400$ 倍视野下计数3个视野内的微血管数, 取其平均值。

统计学处理 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 多组间比较用方差分析(方差齐)或秩和检验(方差不齐), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

空白质粒 PcDNA3.1 和阳性质粒 PcDNA3.1-DPC_4 酶切电泳后分别出现 5.4 kb 的载体片段、5.4 kb 的载体片段和 1.7 kb 的 DPC_4 目的片段(图 1)。基因转染后阳性克隆的 Western blot 分析表明 SW620 组和空白质粒 PcDNA3.1 组 DPC_4 表达弱阳性, 而阳性质粒 PcDNA3.1-DPC_4 组 DPC_4 表达强阳性(图 2)。

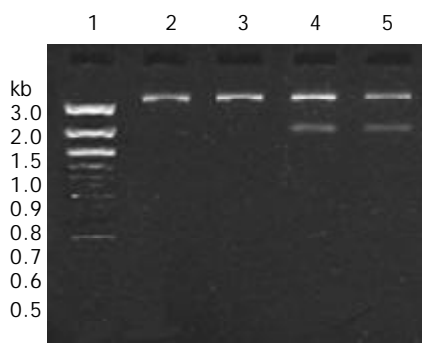


图 1 空白质粒 PcDNA3.1 和阳性质粒 PcDNA3.1-DPC_4 酶切电泳图。1: 为 marker; 2, 3: 空白质粒载体片段 5.4 kb; 4, 5 阳性质粒载体片段 5.4 kb 和 DPC_4 目的片段 1.7 kb。

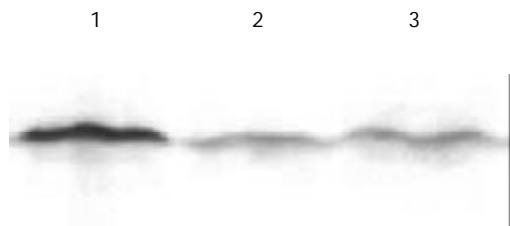


图 2 DPC_4 蛋白的 Western blot 分析。1: PcDNA-DPC_4 组; 2: PcDNA 组; 3: SW620 组。

2.1 SW620 细胞 VEGF 的蛋白水平 DPC_4 组较 SW620 组 VEGF 浓度明显降低, 差异有显著性(18.2 ± 0.5 vs $158.2 \pm 5.5 \text{ ng/L}$ $P < 0.05$)

2.2 转染后细胞内 VEGF mRNA 的表达 RT-PCR 重复 3 次, 经 VDS 图像分析系统进行灰度扫描, 经单向方差分析, DPC_4 组 SW620 组和空白质粒 PcDNA 组明显降低(图 3, $P < 0.05$)。

2.3 未转染组在接种后平均 6 d 出现明显的肿块, PcDNA3.1 空白载体转染组在接种后平均 7 d 出现明显的肿块, DPC_4 阳性质粒转染组在接种后出瘤时间明显延迟, 平均为 13 d。出瘤率均为 100%, 3 组无明显差异。未转染 SW620 组有一只裸鼠于 13 d 死亡, 经解剖发现

有灶性肺脓肿、灶性肝坏死, 可能是因为感染导致死亡。而 PcDNA3.1 空白载体转染组有一只裸鼠于 29 d 死亡, 考虑恶病质而死亡, 而 DPC_4 阳性质粒转染组无死亡。取肿瘤组织, 常规病理切片, 均为低分化腺癌, 无组间差异。取肝脏、肺脏、脑、肾脏、胃肠组织, 肉眼检查无明显转移灶, 经连续切片显微镜下观察均无肿瘤转移。待腋下成瘤后每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤最大径(1)和最小径(t), 绘制体积生长曲线(图 4)。用重复测量数据的方差分析, 转染 PcDNA3.1 空白载体组和未转染组肿瘤生长无明显差别, 而转染阳性质粒 DPC_4 组和其余两组肿瘤生长速度明显减慢, 差异有显著性($P < 0.001$)。裸鼠成瘤后 30 d 处死, 游离肿瘤并称质量。经单向方差分析, 转染阳性质粒 DPC_4 组(1.10 g)较转染空白质粒 PcDNA 组(3.48 g)和未转染组 SW620 (3.86 g)裸鼠肿瘤重量明显减轻($P < 0.05$), 而转染空白质粒 PcDNA 组和未转染组 SW620 无显著性差异($P > 0.05$)。

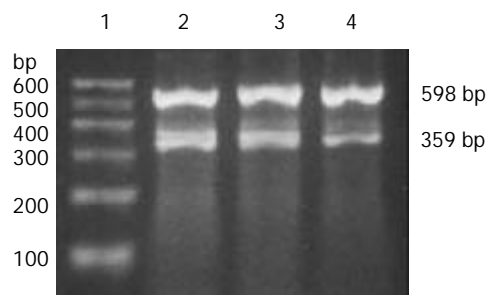


图 3 VEGF mRNA PCR 产物凝胶电泳图。1: Marker; 2: SW620 组; 3: PcDNA 组; 4: PcDNA-DPC_4 组。598 bp 为 GAPDH 片段、359 bp 为 VEGF 片段。

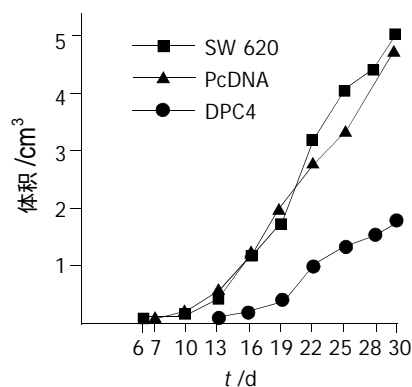


图 4 裸鼠成瘤结果。

2.4 肿瘤组织 VEGF 免疫组化结果经单向方差分析, DPC_4 组(1.20 ± 0.08)肿瘤组织内 VEGF 的表达较 SW620 组(2.30 ± 0.10)和 PcDNA 组(2.20 ± 0.10)明显降低($P < 0.05$), 而 SW620 组和 PcDNA 组无显著性差异。

2.5 肿瘤组织内微血管密度经单向方差分析, DPC_4 组肿瘤组织内微血管密度(MVD)较 SW620 组和 PcDNA 组明显降低(12.5 ± 2.8 vs 28.4 ± 2.3 , 27.1 ± 1.6 $P < 0.05$)。

而 SW620 组和 PcDNA 组无显著性差异(图 5).

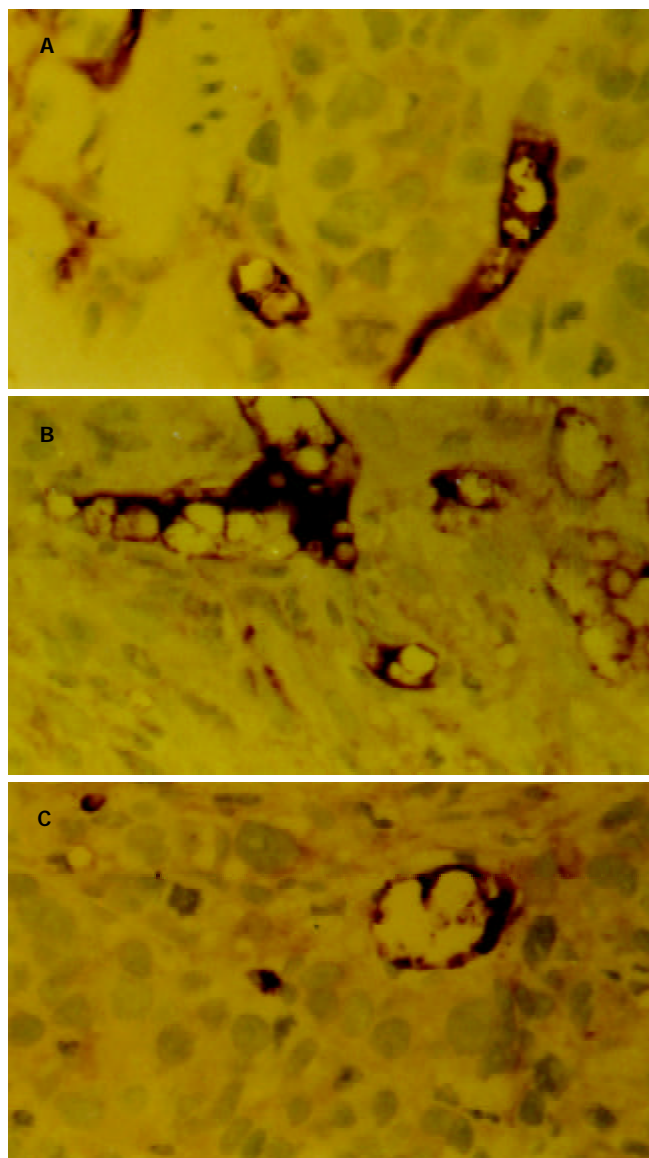


图 5 A: 未转染 SW620 组; B: 转染空白质粒 PcDNA 组; C: 转染阳性质粒 DPC₄ 组.

3 讨论

大肠癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一^[10-17], 其发病率有逐年上升的趋势^[18], 而对晚期大肠癌的治疗效果并不理想^[19-20], 分子生物学技术的突飞猛进、基因治疗的问世, 将为大肠癌的治疗开辟有效的途径. 应用抑癌基因治疗肿瘤是基因治疗研究的热点^[21]. 大肠癌的相关抑癌基因主要有 APC, DCC, p53 等. DPC₄ 是进展期结肠癌患者同时具有杂和性缺失和突变的基因^[22-24]. 我们通过质粒提取, 双酶切鉴定为理想的目的质粒, 转染高转移性结肠癌细胞株 SW620, 经 G418 筛选得到多个细胞克隆, 通过免疫细胞化学和 Western-blot 分析选取 Smad4 表达最强的克隆进行实验. 进一步将未转染 SW620 组、空白质粒 PcDNA-SW620 组、阳性质粒 DPC₄⁺-SW620 组细胞接种于 Balb/c 裸鼠, 成功地建立了结肠癌裸鼠移植瘤模型. 结果发现, SW620 组在接种后平

均 6 d 出现明显的肿块, PcDNA-SW620 组在接种后平均 7 d 出现明显的肿块, 而 DPC₄⁺-SW620 组在接种后平均 13 d 才出现明显的肿块, 成瘤时间明显延迟 ($P < 0.05$). 三组裸鼠的肿瘤体积随时间生长曲线表明 DPC₄⁺-SW620 组肿瘤生长速度较 SW620 组和 PcDNA-SW620 组明显减慢 ($P < 0.05$). 接种 30 d 后处死裸鼠分离肿块, 结果 DPC₄⁺-SW620 组肿瘤重量明显轻于其他两组 ($P < 0.05$). 以上结果表明, DPC₄ 能够抑制裸鼠结肠癌移植瘤的生长.

DPC₄ 能够对肿瘤的生长起抑制作用, 然而其确切的抑瘤作用机制尚处于探讨之中. TGF- β 对肿瘤的抑制作用可分为 Smad4 依赖型和 Smad4 非依赖型. TGF- β 多数是通过经典的 Smad4 依赖型通路发挥作用. Fink et al^[25] 发现 Smad4 单个等位基因缺失、另一等位基因突变的结肠癌细胞系 Vaco-235 亦同样表现为对 TGF- β 的生长抑制作用. DPC₄ 的可能下游目的基因包括 VEGF、血小板反应素-1 (TSP-1)、P21^{WAF1}、P15、内源性尿激酶型激活子 (uPA)、纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1)、二聚糖 (BGN)、死亡相关蛋白激酶 (DAP-kinase) 等^[26-30].

VEGF 是强有力的促血管生成因子, 在与血管内皮细胞增生相关的生理和病理过程中起重要作用, 特别是与实体瘤的关系密切. Im et al^[31] 用腺病毒介导转染反义 VEGF 能够抑制裸鼠乳腺癌的生长, 事实上 VEGF 启动子含有 Smad4 结合原件相关序列, 因而 DPC₄ 具备调节 VEGF 的理论基础. 从这一思路出发, 我们通过 DPC₄ 基因转染结肠癌细胞株 SW620, 建立表达 Smad4 蛋白的细胞系, 然后分未转染 SW620 组、空白质粒 PcDNA-SW620 组、阳性质粒 DPC₄⁺-SW620 组细胞进行实验, 用 ELISA 方法检测三组细胞上清液中 VEGF 蛋白、RT-PCR 方法检测三组细胞内 VEGF mRNA 的表达. 结果表明, DPC₄ 能够降低体外结肠癌细胞 VEGF 蛋白和 VEGF mRNA 的表达. 进一步通过建立的结肠癌裸鼠移植瘤模型, 用免疫组织化学检测肿瘤组织中 VEGF 蛋白的表达和微血管密度. 体内实验同样表明, DPC₄ 也能够降低 VEGF 的表达和微血管密度. 综合以上实验结果推测, DPC₄ 对裸鼠结肠癌移植瘤的抑制作用可能是通过抑制肿瘤的血管生成而实现的.

4 参考文献

- 1 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 2 Huang GC, Zhang JS, Zhang YE. Effects of retinoic acid on proliferation, phenotype and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in TGF-beta1-stimulated rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:819-823
- 3 Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- 4 Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of micro-satellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526

- 5 Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY. TGF beta1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol* 2002;8:496-498
- 6 Narai S, Watanabe M, Hasegawa H, Nishibori H, Endo T, Kubota T, Kitajima M. Significance of transforming growth factor beta1 as a new tumor marker for colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002;97:508-511
- 7 Yamaguchi A. Genetic changes in liver metastasis of colorectal cancer and their clinical application. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2001;102:370-375
- 8 Mikami T, Ookawa K, Shimoyama T, Fukuda S, Saito H, Munakata A. KAI1, CAR, and Smad4 expression in the progression of colorectal tumor. *J Gastroenterol* 2001;36:465-469
- 9 Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 2000;157:1105-1111
- 10 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001;7:722-725
- 11 Li XW, Ding YQ, Cai JJ, Yang SQ, An LB, Qiao DF. Studies on mechanism of Sialy Lewis-X antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:425-430
- 12 Wu BP, Xiao B, Wan TM, Zhang YL, Zhang ZS, Zhou DY, Lai ZS, Gao CF. Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:811-815
- 13 Deng YC, Zhen YS, Zheng S, Xue YC. Activity of boanmycin against colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:93-97
- 14 Peng ZH, Xing TH, Qiu GQ, Tang HM. Relationship between Fas/FasL expression and apoptosis of colon adenocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2001;7:88-92
- 15 Jia XD, Han C. Chemoprevention of tea on colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in Wistar rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:699-703
- 16 Xiao B, Jing B, Zhang YL, Zhou DY, Zhang WD. Tumor growth inhibition effect of hIL-6 on colon cancer cells transfected with the target gene by retroviral vector. *World J Gastroenterol* 2000;6:89-92
- 17 Xie B, He SW, Wang XD. Effect of gastrin on protein kinase C and its subtype in human colon cancer cell line SW480. *World J Gastroenterol* 2000;6:304-306
- 18 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 19 潘胜武, 孙安乐, 刘变英, 崔大祥, 闫小君, 栗彤, 雷宇锋, 王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1431-1432
- 20 李小安, 房殿春, 杨柳芹, 张汝刚, 司佩任. TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:298-301
- 21 刘占奎, 张超. TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1064-1067
- 22 Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:4115-4121
- 23 Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 2000;157:1105-1111
- 24 Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000;60:2002-2006
- 25 Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res* 2001;61:256-260
- 26 Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttes J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9624-9629
- 27 Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;31:47-59
- 28 Peng B, Fleming JB, Breslin T, Grau AM, Fojioka S, Abbruzzese JL, Evans DB, Ayers D, Wathen K, Wu T, Robertson KD, Chiao PJ. Suppression of tumorigenesis and induction of p15 (ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3628-3638
- 29 Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:36118-36128
- 30 Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 2002;4:51-58
- 31 Im SA, Kim JS, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Cho MS, Seong CM, Lee SN, Hong YK, Yung WK. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF. *Br J Cancer* 2001;84:1252-1257

大肠腺癌组织 leptin 受体的表达意义

吴 江, 邓长生, 陈立平

吴江, 邓长生, 陈立平, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
吴江, 男, 1978-05-07 生, 湖北武汉人, 2001 年武汉大学医学院本科毕业,
现为武汉大学中南医院消化内科研究生.
项目负责人: 吴江, 430071, 湖北省武汉市东湖路 169 号, 武汉大学中南医
院消化内科. no-river@163.net
电话: 027-87877459
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Expression and significance of leptin receptor in colorectal adenocarcinoma

Jiang Wu, Chang-Sheng Deng, Li-Ping Chen

Jiang Wu, Chang-Sheng Deng, Li-Ping Chen, Department of
Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan
430071, Hubei Province, China
Correspondence to: Jiang Wu, Department of Gastroenterology,
Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei
Province, China. no-river@163.net
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigation the expression of leptin receptor in colorectal cell lines and colorectal adenocarcinoma tissue, and the relationship between its expression, vascular proliferation and tumor cell proliferation.

METHODS: The expression of leptin receptor, CD34 and Ki67 proteins was detected by immunohistochemistry in HT29 and SW480 cells and colorectal adenocarcinoma tissues. Leptin receptor, the MVD and cell proliferation exponent were analyzed by image analysis software.

RESULTS: Leptin receptor was expressed in HT29 cells, SW480 cells and all colorectal adenocarcinoma tissue. The normal large intestine tissue also had leptin receptor, but the mean of their absorbance was lower than that of colorectal adenocarcinoma tissue (0.153 ± 0.011 vs 0.115 ± 0.071 , $P < 0.05$). The MVD and Ki67 exponent of colorectal adenocarcinoma tissue were both higher than those of normal controls (41.500 ± 10.700 vs 31.300 ± 11.100 , $P < 0.01$; 0.458 ± 0.108 vs 0.312 ± 0.097 , $P < 0.01$). There was a positive correlation between leptin receptor and Ki67 exponent ($r = 0.388$, $P < 0.05$). The MVD of colorectal adenocarcinoma tissue which leptin receptor expressed in blood vessel endothelial cells was higher than the negative ones (45.100 ± 10.000 vs 37.400 ± 10.200 , $P < 0.05$). The correlation could not be found between leptin receptor and clinical pathologic parameters of colorectal adenocarcinoma.

CONCLUSION: Leptin may have some roles to accelerate tumor cell proliferation and vascular proliferation in colorectal adenocarcinoma tissue after it binds leptin receptor.

Wu J, Deng CS, Chen LP. Expression and significance of leptin receptor in colorectal adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):585-589

摘要

目的: 研究 leptin 受体在人大肠癌细胞系及大肠腺癌组织中的表达, 探讨与肿瘤血管生成、细胞增生之间的关系.

方法: 免疫组织化学方法+图像分析检测 leptin 受体, CD34 及 Ki67 的表达, 并计算肿瘤微血管密度及细胞增生指数.

结果: leptin 受体在 SW480, HT29 细胞以及大肠癌组织均有表达, 大肠腺癌组织的平均染色吸光度比正常大肠组织高 (0.153 ± 0.011 vs 0.115 ± 0.071 , $P < 0.05$), 与 Ki67 指数呈正相关 ($r = 0.388$, $P < 0.05$); 血管内皮细胞表达 leptin 受体的大肠腺癌, 其 MVD 较高 (45.100 ± 10.000 vs 37.400 ± 10.200 , $P < 0.05$), 二者之间正相关 ($r = 0.569$, $P < 0.05$); 大肠腺癌 MVD、Ki67 指数比正常组织高 (41.500 ± 10.700 vs 31.300 ± 11.100 , $P < 0.01$; 0.458 ± 0.108 vs 0.312 ± 0.097 , $P < 0.01$); leptin 受体的表达与大肠腺癌临床病理参数之间未见相关.

结论: leptin 与大肠腺癌上的 leptin 受体结合后, 在促进肿瘤细胞增生及肿瘤组织的血管增生方面具有一定的作用.

吴江, 邓长生, 陈立平. 大肠腺癌组织 leptin 受体的表达意义. 世界华人消化杂志 2004;12(3):585-589

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/585.asp>

0 引言

肥胖基因(Ob 基因)的表达产物 leptin 蛋白(瘦素)具有抑制摄食、增加能量支出、调节代谢、激素分泌、生殖和免疫等多种功能. leptin 必须与不同靶器官上的 leptin 受体(leptin receptor, 也称 Ob-R)结合方能发挥其生物学功能. 我们用免疫组织化学方法检测 leptin 受体在大肠癌细胞系 SW480, HT29, 大肠腺癌组织及正常大肠组织中的表达, 并用抗 CD34 抗体标记肿瘤组织微血管密度(MVD), 用抗 Ki67 抗体标记增生期细胞, 检测肿瘤组织细胞增生指数, 探讨 leptin 受体表达与微血管密度、细胞增生指数的关系, 及其与大肠癌临床病理参数之间的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌细胞系 SW480, HT29 由武汉大学生命科学学院提供, 取细胞悬液均匀涂于多聚赖氨酸处理的载玻片上, 干燥后浸入冷丙酮中固定 5-10 min, 自然干燥, 放 -20 °C 冰箱保存备用. 2001/2002 武汉大

学中南医院手术切除大肠腺癌标本 30 例, 男 18 例, 女 12 例, 年龄 25-79 (平均 46.9 ± 18.7 岁), 正常大肠组织 20 例, 男 10 例, 女 10 例, 年龄 28-72 (平均 56.3 ± 12.8 岁), 为大肠手术切除之正常断端, 两组之间无关系。所有组织标本用 40 g/L 甲醛固定, 常规脱水, 透明, 浸蜡, 包埋, 制备 4 μ m 厚连续切片, 黏附于涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 60 $^{\circ}$ C 烤片备用。以上切片均经 HE 染色复查, 明确病理诊断。兔抗人 leptin receptor 多克隆抗体(浓缩液, 工作浓度为 1:50)购于武汉博士德生物工程有限公司; 鼠抗人 CD34mAb (工作液), 鼠抗人 Ki67mAb(工作液)和通用型 SP 免疫组化试剂盒, 均购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 leptin 受体, CD34 和 Ki67 蛋白质表达检测均采用免疫组化 SP 法。石蜡切片(4 μ m)常规脱蜡至水化; 浸泡于抗原修复液中, 放入 YWY781B 型微波炉, 一档加热 10 min; 取出自然冷却至室温后 PBS (0.01 mmol/L, pH7.4)洗涤; 加 30 mL/L H_2O_2 (试剂 A)阻断内源性过氧化物酶活性, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PBS 洗涤; 加封闭用正常羊血清(试剂 B)减少非特异性染色; 无须洗涤, 直接滴加相应的第一抗体, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 取出后 37 $^{\circ}$ C 再孵育 60 min, PBS 洗涤; 加生物素标记的二抗(试剂 C), 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PBS 洗涤; 加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(试剂 D), 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PBS 洗涤; 滴加新鲜配置的 DAB 显色 5-8 min, 自来水冲洗; 苏木精复染 5 min, 自来水冲洗; 浸入盐酸酒精分化 1 min, 自来水冲洗; 自然返蓝后, 脱水, 透明, 中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 阳性对照由试剂公司提供。SW480, HT29 细胞涂片 leptin 受体表达检测无须脱蜡和微波抗原修复过程, 其余步骤同上。用外接 Polaroid 数码相机的 Olympus 显微镜对玻片进行观察照相, 使用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文分析系统进行图像分析。

1.2.2 leptin 受体 先在低倍镜($\times 400$)下寻找肿瘤区域, 以细胞质出现棕黄色作为阳性细胞, 转高倍镜视野($\times 400$)摄像, 由图像分析软件检测该视野肿瘤细胞染色吸光度(A 值), 计算 5 个视野的平均吸光度作为最终表达结果。同时在肿瘤间质内寻找阳性染色的血管内皮细胞, 按有无血管染色分组。

1.2.3 肿瘤微血管密度 先在低倍镜($\times 40$)下扫视肿瘤区域, 选择其中高密度区, 转高倍镜($\times 200$)记数被抗 CD34 抗体染成棕色的血管数目, 结果以 5 个视野的均数表示。

1.2.4 肿瘤细胞增生指数 以细胞核出现棕黄色作为阳性细胞, 在高倍镜($\times 400$)下用图像分析软件检测 Ki67 细胞阳性率, 结果以 5 个视野的均数表示。

统计学处理 leptin 受体染色吸光度、微血管密度(MVD)、细胞增生指数均以 mean \pm SD 表示, 所得数据用 SPSS11.0 统计学软件进行 t 检验和方差分析, 用

Pearson 相关分析 leptin 受体和 MVD、细胞增生指数的关系。P < 0.05 有显著性差异。

2 结果

2.1 leptin 受体、MVD、Ki67 的表达 leptin 受体在 HT29 (图 1)、SW480(图 2)细胞及大肠腺癌组织细胞(图 3)中均可见着色(30/30, 100.0%), 弥漫性分布, 呈均一棕黄色定位于肿瘤细胞胞质中, 部分肿瘤组织间质血管内皮细胞(图 4)也有着色(16/30, 53.3%), 部分正常对照组织腺体细胞(图 5)也可见阳性表达(15/20, 75.0%)。30 例大肠腺癌组织中, leptin 受体染色吸光度 0.135-0.186, 平均 0.153 ± 0.011 。20 例正常组织 leptin 受体染色吸光度 0.000-0.185, 平均 0.115 ± 0.071 , 大肠腺癌组与正常组之间存在显著性差异($t = 2.366$, $P < 0.05$)。CD34 染色定位于血管内皮细胞膜上, 呈棕黄色, 在间质和癌巢都有分布, 微血管形态表现为管状、线状和点状。30 例大肠腺癌 MVD(图 6) 23.000-66.000, 平均 41.500 ± 10.700 , 20 例正常组织 MVD(图 7) 15.000-59.000, 平均 31.300 ± 11.100 , 两组之间有显著性差异($t = 3.255$, $P < 0.01$)。Ki67 染色定位于肿瘤细胞核, 呈棕色, 30 例大肠腺癌 Ki67 指数(图 8)0.291-0.650, 平均 0.458 ± 0.108 , 正常大肠黏膜基底层细胞也可见表达, 20 例正常组织 Ki67 指数(图 9) 0.074-0.427, 平均 0.312 ± 0.097 , 两组之间存在显著性差异($t = 4.997$, $P < 0.01$)。



图 1 HT29 细胞上 leptin 受体的表达($\times 400$)。

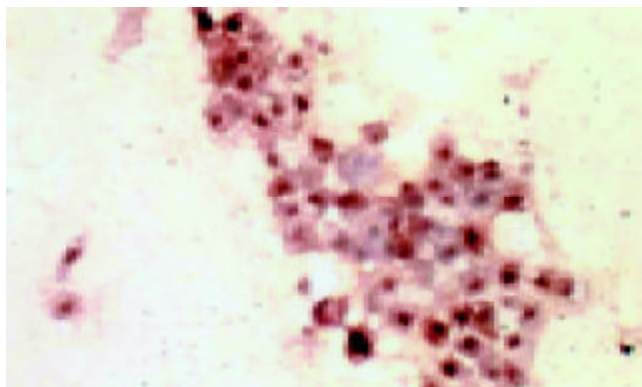
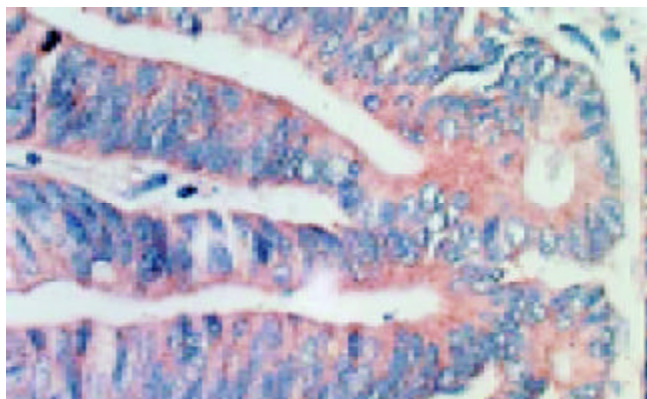
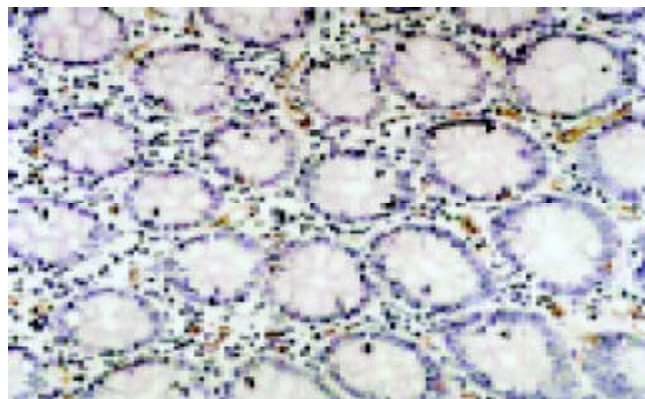
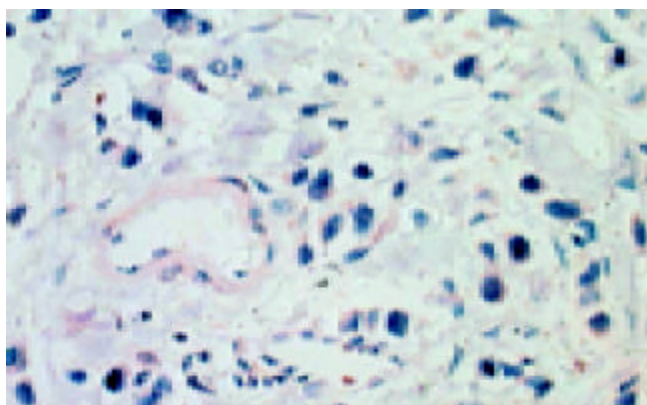
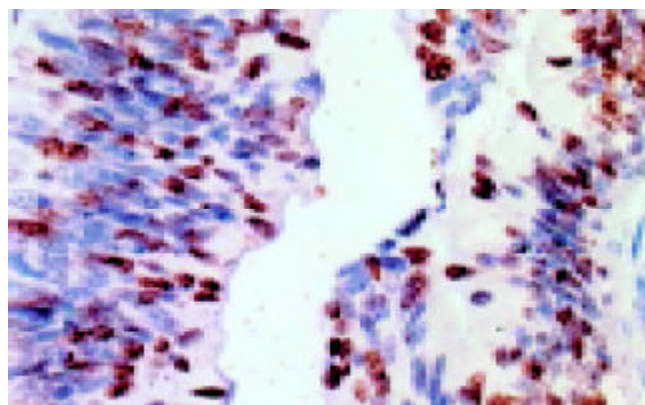
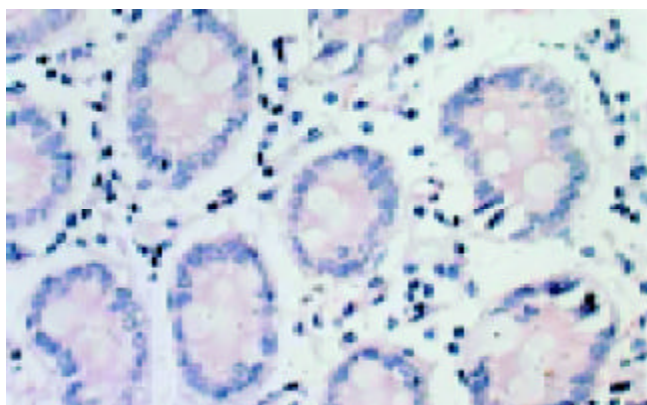
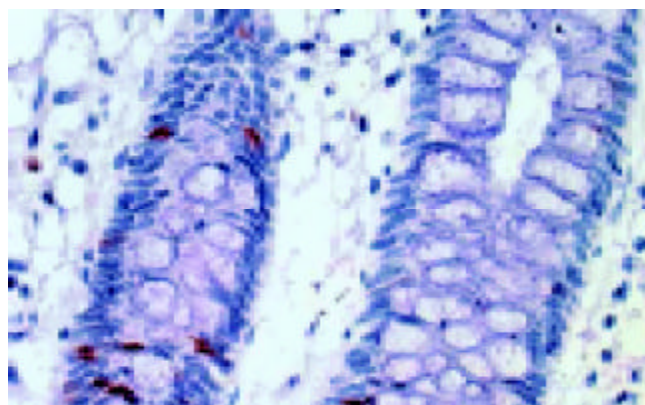
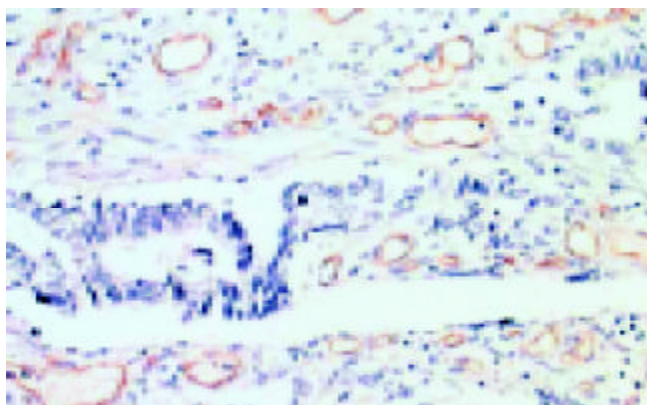


图 2 SW480 细胞上 leptin 受体的表达($\times 400$)。

图3 大肠腺癌组织细胞 leptin 受体的表达($\times 400$).图7 正常大肠组织 MVD($\times 200$).图4 大肠腺癌组织血管内皮细胞 leptin 受体的表达($\times 400$).图8 大肠腺癌 Ki67 的表达($\times 400$).图5 正常大肠组织 leptin 受体的表达($\times 400$).图9 正常大肠组织 Ki67 的表达($\times 400$).图6 大肠腺癌 MVD($\times 200$).

2.2 leptin 受体表达与 MVD、Ki67 指数的相关性 16 例大肠腺癌组织血管内皮细胞有 leptin 受体表达(16/30, 53.3%), 其 MVD 较之无表达的肿瘤组织高(45.100 ± 10.000 vs 37.400 ± 10.200 , $t=2.087$, $P<0.05$), 且其 leptin 受体吸光度与 MVD 之间正相关($r=0.569$, $P<0.05$); 30 例大肠腺癌组织 leptin 受体染色吸光度与 Ki67 指数呈正相关($r=0.388$, $P<0.05$), MVD 与 Ki67 指数之间也呈正相关($r=0.363$, $P<0.05$).

2.3 leptin 受体表达与大肠腺癌临床病理的关系 leptin 受体的表达在大肠腺癌组织高、中、低分化间无显著性差异($F=1.120$, $P>0.05$). Dukes' A, B, C 分期之间的 leptin 受体表达未见差异($F=0.343$, $P>0.05$), 无

淋巴结转移组(A+B期)与有淋巴结转移组(C期)间的 leptin 受体表达亦无差异($F=0.037$, $P>0.05$). 高分化大肠腺癌的 MVD 较中、低分化癌少($F=4.095$, $P<0.05$), 余未见差异(表 1).

表 1 leptin 受体表达、MVD、Ki67 指数与大肠腺癌临床病理参数的关系(mean±SD)

病理参数	n	leptin 受体染色吸光度	MVD	Ki67 指数
高分化	17	0.155 ± 0.012	37.500 ± 9.200 ^a	0.469 ± 0.116
中分化	8	0.152 ± 0.009	49.400 ± 11.600	0.414 ± 0.098
低分化	5	0.147 ± 0.006	42.200 ± 7.700	0.495 ± 0.088
Dukes' A 期	8	0.155 ± 0.008	45.900 ± 7.100	0.442 ± 0.123
Dukes' B 期	6	0.150 ± 0.009	41.300 ± 14.200	0.467 ± 0.100
Dukes' C 期	16	0.153 ± 0.013	39.300 ± 10.700	0.463 ± 0.109
淋巴结转移有	16	0.153 ± 0.013	39.300 ± 10.700	0.463 ± 0.109
淋巴结转移无	14	0.152 ± 0.009	43.900 ± 10.500	0.453 ± 0.110

^a $P<0.05$.

3 讨论

人类 Ob 基因位于 7 号染色体(7q31.3), leptin 是其编码产物, 由白色脂肪组织分泌入血. 人类 leptin 受体基因 (Ob-R 基因)位于 1 号染色体(1p31), leptin 受体属于 I 型细胞因子受体超家族, 是一种一次跨膜蛋白, 有 5 种亚型^[1]: Ob-Ra-e, Ob-Rb 的胞内结构域最长, 称为长亚型, 其余几种为短亚型. Ob-Ra 在短亚型中占绝大多数. 因此一般就以 Ob-Ra 作为短亚型. leptin 受体在体内分布于多种组织器官, 如中枢神经、心脏、胃、肝脏、胰脏、肾脏、前列腺、睾丸、卵巢、子宫、胎盘、皮肤和肌肉^[2-8]等. leptin 作为一种蛋白质激素, 具有促进多种细胞增生与分化的作用, 包括胎盘细胞、单核细胞、血管内皮细胞、自然杀伤细胞(NK)、骨及软骨细胞、胃黏膜细胞^[9-14]等. 肿瘤细胞具有无限增生性和去分化性, 而 leptin 促进细胞增生与分化的特性, 在肿瘤的发生发展过程中可能发挥一定的作用. 我们用免疫组织化学方法发现, 在大肠癌细胞系 SW480, HT29, 大肠腺癌组织细胞, 以及正常大肠组织的腺细胞中均有 leptin 受体表达. 30 例大肠腺癌 leptin 受体平均表达强度比 20 例正常组织高, 差异具有显著性. 这种体内和体外、正常和异常中的表达提示, leptin 受体的表达可能是大肠腺癌发生发展过程中的一个普遍性事件, 同时也说明大肠腺癌的发生发展与内分泌因素有一定的关系.

本实验显示, leptin 受体在部分大肠腺癌间质血管内皮细胞上表达. 血管内皮细胞上有 leptin 受体表达的肿瘤组织, 其 MVD 较之无表达的肿瘤组织高, 且 leptin 受体的表达与 MVD 正相关. 说明其在促进肿瘤组织血管生成方面可能有一定作用, 体外实验也证明, leptin 能促进血管内皮细胞的增生^[11]. 大肠腺癌组织中的 MVD 明显高于正常对照, 说明确实存在着血管生成的增加.

肿瘤组织的血管生成, 为肿瘤的生长提供氧、营养物质和远处转移通道, 是肿瘤恶性生物学行为不可缺少的一环.

我们发现, 大肠腺癌组织肿瘤细胞增生活跃, 明显强于正常组. 大肠腺癌细胞增生指数与 leptin 受体的表达存在正相关关系, 说明 leptin 与其受体结合后, 能够促进大肠腺癌细胞的增生, 该结论与 Hardwick et al^[15]的体外实验结果一致. 此外本实验还发现大肠腺癌 MVD 与 Ki67 指数间存在正相关性, 血液供应丰富的区域其肿瘤细胞增生也活跃, 反之增生活跃的肿瘤细胞也能产生某些促血管增生的物质, 二者相互作用形成恶性循环网络, 而 leptin 及其受体可能参与其中. 我们未发现 leptin 受体的表达与大肠腺癌分化程度、Dukes' 分期以及淋巴结转移等临床病理参数之间有相关性.

总之, 我们通过对大肠腺癌中 leptin 受体表达的研究, 将 leptin 这种内分泌激素与肿瘤联系起来, 初步探讨其在大肠腺癌发生发展过程中所发挥的作用以及可能的机制. 提示作为一个潜在的靶点, 在肿瘤的综合治疗方案中, leptin 及其受体也许能找到一席之地. 由于大肠癌在西方和我国皆常见^[16-28], 因而有良好的研究前景.

4 参考文献

- 1 Tena-Sempere M, Pinilla L, Zhang FP, Gonzalez LC, Huhtaniemi I, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E. Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *E Biol Reprod* 2001;64:634-643
- 2 Munzberg H, Huo L, Nillni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 2003;144:2121-2131
- 3 Challier J, Galtier M, Bintein T, Cortez A, Lepercq J, Hauguel-de Mouzon S. Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2003;24:92-99
- 4 Reimer MK, Ahren B. Altered beta-cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetes* 2002;51(Suppl 1):S138-143
- 5 Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod* 2002;66:1548-1554
- 6 Stallmeyer B, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J, Frank S. A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair. *J Invest Dermatol* 2001;117:98-105
- 7 Mix H, Widjaja A, Jandl O, Cornberg M, Kaul A, Goke M, Beil W, Kuske M, Brabant G, Manns MP, Wagner S. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut* 2000;47:481-486
- 8 El-Hefnawy T, Ioffe S, Dym M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology* 2000;141:2624-2630
- 9 Cauzac M, Czuba D, Girard J, Hauguel-de Mouzon S. Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation. *Placenta* 2003;24:378-384
- 10 Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 2001;212:83-91

- 11 Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 2001;33:95-102
- 12 Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:247-252
- 13 Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Broom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol* 2002;175:405-415
- 14 Schneider R, Bornstein SR, Chrousos GP, Boxberger S, Ehninger G, Breidert M. Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor. *Horm Metab Res* 2001;33:1-6
- 15 Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;121:79-90
- 16 Cui L, Jin HY, Cheng HY, Yan YD, Meng RG, Yu DH. Genetic detection of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:209-213
- 17 Xie LQ, Yu JP, Luo HS. Expression of estrogen receptor beta in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:214-217
- 18 Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ. Ethylene diamine tetraacetic acid-induced colonic crypt cell proliferation in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:218-222
- 19 Hu JK, Zhou ZG, Chen ZX, Wang LL, Yu YY, Liu J, Zhang B, Li L, Shu Y, Chen JP. Comparative evaluation of immune response after laparoscopic and open total mesorectal excisions with anal sphincter preservation in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2690-2694
- 20 Liu HX, Ding YQ, Li X, Yao KT. Investigation of Epstein-barr virus in Chinese colorectal tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2464-2468
- 21 Li W, Li CB. Lack of inhibitory effects of Lactic acid bacteria on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:2469-2473
- 22 Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2202-2206
- 23 Nan KJ, Qin HX, Yang G. Prognostic factors in 165 elderly colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:2207-2210
- 24 Li GQ, Li H, Zhang HF. Mad2 and p53 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:1972-1975
- 25 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1976-1980
- 26 Jiang YA, Luo HS, Zhang YY, Fan LF, Jiang CQ, Chen WJ. Telomerase activity and cell apoptosis in colon cancer cell by human telomerase reverse transcriptase gene antisense oligodeoxynucleotide. *World J Gastroenterol* 2003;9:1981-1984
- 27 Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1990-1994
- 28 Li XN, Ding YQ, Liu GB. Transcriptional gene expression profiles of HGF/SF-met signaling pathway in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1734-1738

World Journal of Gastroenterology 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于 2003-04-15 开通, 截止 2003-10-26 点击率已达 452392 人次. WJG 电子版由以下 7 个栏目组成. (1) 期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2) 出版: 出版, 版权, 征订. (3) 投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4) 新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子. (5) 投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计 28 项. (6) 电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG 电子期刊功能包括 HTM、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容的正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.

人CD81真核表达载体的构建及在COS-7细胞中的表达

刘秋平, 贾战生, 杜德伟, 李光玉, 潘 蕾, 魏 欣, 罗新栋, 王全楚

刘秋平, 贾战生, 杜德伟, 李光玉, 潘蕾, 魏欣, 罗新栋, 王全楚, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
刘秋平, 女, 1972-10-15 生, 陕西省岐山县人, 汉族, 1996 年西安医科大学学士, 第四军医大学唐都医院感染病诊疗中心硕士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎发病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30070687

项目负责人: 贾战生, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. jiazsh@fmmu.edu.cn
电话: 029-3377742 传真: 029-3537377

收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-10-22

Construction of human CD81 eukaryotic expression vector and expression of the gene segment in COS-7 cell line

Qiu-Ping Liu, Zhan-Sheng Jia, De-Wei Du, Guang-Yu Li, Lei Pan, Xing Wei, Xin-Dong Luo, Quan-Chu Wang

Qiu-Ping Liu, Zhan-Sheng Jia, De-Wei Du, Guang-Yu Li, Lei Pan, Xing Wei, Xin-Dong Luo, Quan-Chu Wang, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China. Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30070687
Correspondence to: Dr. Zhan-Sheng Jia, Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China.
jiazsh@fmmu.edu.cn

Received: 2003-09-15 Accepted: 2003-10-22

Abstract

AIM: To construct a human CD81 eukaryotic expression vector and to analyze the expression of CD81 in COS-7 cells.

METHODS: CD81 gene from the pMD18-T-CD81 vector with double-enzyme digestion was cloned into the pVAX1 eukaryotic expression vector, named pVAX1-CD81. The recombinant vector pVAX1-CD81 and pVAX1 as controls were transfected into COS-7 cells by lipofectamine, and the transient expression product on the transfected cells was analyzed with anti-CD81 monoclonal antibody by indirect immunofluorescence assay (IFA).

RESULTS: The identification of the eukaryotic expression vector pVAX1-CD81 by PCR and restriction enzyme analysis showed that CD81 gene was rightly inserted into the vector; and the product of the CD81 gene was successfully expressed on surface of COS-7 cells.

CONCLUSION: The eukaryotic expression vector with CD81 gene is constructed and efficiently expressed in COS-7 cells. The results indicate that the transfected CD81 cells will need to further studies on the roles of CD81 in the process of HCV infection and entrance to cells.

Liu QP, Jia ZS, Du DW, Li GY, Pan L, Wei X, Luo XD, Wang QC. Construction of human CD81 eukaryotic expression vector and expression of the gene segment in COS-7 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):590-593

摘要

目的: 构建含人CD81基因的真核表达载体, 探讨CD81在COS-7细胞的表达, 为研究丙型肝炎病毒(HCV)与CD81相互作用奠定基础。

方法: 从我们构建的含人CD81全编码基因载体pMD18-T-CD81, 应用双酶切回收基因片段, 定向克隆入真核表达载体pVAX1; 通过脂质体介导的基因转染技术将pVAX1-CD81和空载体转入COS-7细胞; 应用抗CD81单克隆抗体通过间接免疫荧光法检测COS-7细胞的表达产物。

结果: 重组的含CD81基因的真核表达载体pVAX1-CD81经酶切和PCR鉴定分析正确, 并证明在COS-7细胞表面有效地表达CD81蛋白。

结论: 成功构建含CD81全编码基因的真核表达载体pVAX1-CD81, 并在COS-7细胞表面有效表达CD81分子, 该转染细胞可作为研究CD81在HCV感染中的作用提供模型。

刘秋平, 贾战生, 杜德伟, 李光玉, 潘蕾, 魏欣, 罗新栋, 王全楚. 人CD81真核表达载体的构建及在COS-7细胞中的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):590-593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/590.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)为单股、正链、RNA包膜病毒, 其包膜糖蛋白与细胞表面受体或辅助分子相互作用, 介导病毒入胞是HCV感染致病的关键^[1-5]. 目前的研究表明, CD81作为HCV的候选受体之一可能在HCV感染靶细胞过程中发挥重要作用^[6-8]. CD81分子又称增生抗体靶抗原-1(TAPA-1), 属于四次跨膜超家族成员(TM4-SF), 是一种细胞膜表面黏附分子, 分布于多种细胞, 参与细胞的黏附、变形、活化、增生及信号转导等多种功能^[9-11]. 我们已成功从人Molt-4细胞克隆了CD81的全编码基因, 并经酶切鉴定和序列分析表明其核苷酸序列完全正确. 本研究通过构建人CD81基因真核表达载体, 转染COS-7细胞, 探讨CD81分子的表达, 为研究HCV与CD81的相互作用, 阐明HCV感染细胞的机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 pMD18-T-CD81载体由本室先前构建, 真核表达载体pVAX1由本室王福祥博士惠赠, 大肠杆菌

菌株 JM109 由本室保存. 绿猴 COS-7 细胞由第四军医大学免疫教研室刘雪松博士惠赠. DNA 抽提纯化试剂盒购自华舜生物工程有限公司, 限制性内切酶 BamH I, Xba I, T4 DNA 连接酶为 Takara 公司产品. Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 试剂公司, 细胞培养所用 RPMI 1640, DMEM(高糖型), 回收纯化试剂盒为 Gibco 公司产品. 鼠抗人的 CD81 mAb 为 Labvision 公司产品, FITC 标记的羊抗鼠的 IgG 购自华美公司.

1.2 方法 用 BamH I 和 Xba I 双酶切 pMD18-T-CD81, 回收大小约 729 bp 的 CD81 基因片段, 同时准备 pVAX1 载体, 确定二者的连接比例和条件, 应用 T4DNA 连接酶在 16 °C 条件下连接目的基因与载体, 转化大肠杆菌 JM109, 次日挑取卡那霉素抗性的阳性克隆, 扩增、提取质粒, 获得含 CD81 的真核表达质粒 pVAX1-CD81. 应用 BamH I 和 Xba I 双酶切重组的真核表达质粒 pVAX1-CD81. 应用先前研究设计合成的引物, 以 pVAX1-CD81 为模版, 进行 PCR 反应, 其反应体系为: pVAX1-CD81 2 µL, 上、下游引物各 1 µL, Taq DNA 聚合酶 0.5 µL, dNTPs 2 µL, MgCl₂ 1.5 µL, Buffer 2 µL, 去离子水 10 µL 至终体积 20 µL. 反应参数为: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环, 72 °C 再延伸 10 min. 对重组质粒双酶切产物、PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 取传代的绿猴 COS-7 细胞, 用含 100 ml/L 胎牛血清(含 1×10^3 U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素)的 DMEM 培养基 37 °C 50 ml/L CO₂ 培养, 细胞在转染前 24 h 传代, 待细胞汇合达 80% 时, 更换为无血清含 Lipofectamine 2000 包裹重组质粒 pVAX1-CD81 的 DMEM 培养液, 以空载体 pVAX1 为对照, 具体操作按说明书进行, 转染 6 h 后更换为含血清的 DMEM 继续培养. 应用转染 pVAX1-CD81 的 COS-7 细胞, 分别培养 24, 48, 72, 和 144 h, 制备细胞爬片, 冷丙酮固定, 吹干. 以鼠抗人的 CD81 mAb 为一抗, 进行间接免疫荧光染色, 荧光显微镜观察, 以空载体 pVAX1 作为阴性对照.

2 结果

2.1 真核表达载体 pVAX1-CD81 的鉴定 pMD18-T-CD81 载体为本室先前构建的原核载体, 为使 CD81 能在真核细胞表达, 我们重组了真核表达载体 pVAX1-CD81, 其两端分别有 BamH I 和 Xba I 酶切位点. 对 pVAX1-CD81 应用双酶鉴定, 切下一约 729 bp 的小片段和约 3 000 bp 的载体大片断, 与预期结果完全相符. 应用 PCR 扩增, 得到约 729 bp 的片段, 而对照组(空载体 pVAX1)用相同的引物, 未见条带出现(图 1). 结果表明 CD81 全序列基因成功插入真核表达载体.

2.2 pVAX1-CD81 在 COS-7 细胞中的表达 pVAX1 为一瞬时高效真核载体, 缺乏抗性筛选. 重组质粒 pVAX1-CD81 经脂质体介导转染 COS-7 细胞, 选取转染不同时间制备的细胞爬片, 进行间接免疫荧光检测. 结果表

明, 转染 pVAX1-CD81 后 48 和 72 h, COS-7 细胞表面有较强的绿色荧光, 而空载体 pVAX1 的细胞膜上未见荧光(图 2), 延长培养时间细胞膜荧光强度明显减弱. 结果说明, 我们成功地克隆人 CD81 全序列基因, 构建的真核表达载 pVAX1-CD81 可有效地在绿猴 COS-7 细胞表达人 CD81 分子, 该转染细胞可为进一步研究 HCV 与 CD81 的相互作用提供受体重建模型.

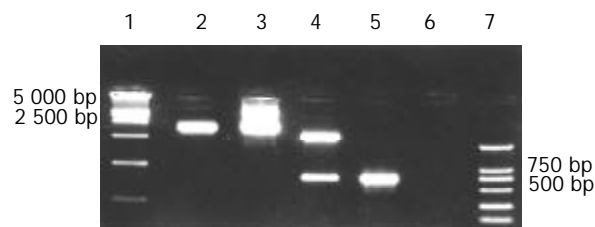


图1 重组质粒 pVAX1-CD81 的酶切及 PCR 鉴定. 1: Marker(DL 15 000); 2: pVAX1-CD81/BamH I; 3: pVAX1-CD81; 4: pVAX1-CD81/BamH I + Xba I; 5: pVAX1-CD81/PCR; 6: pVAX1/PCR; 7: Marker(DL 2 000).

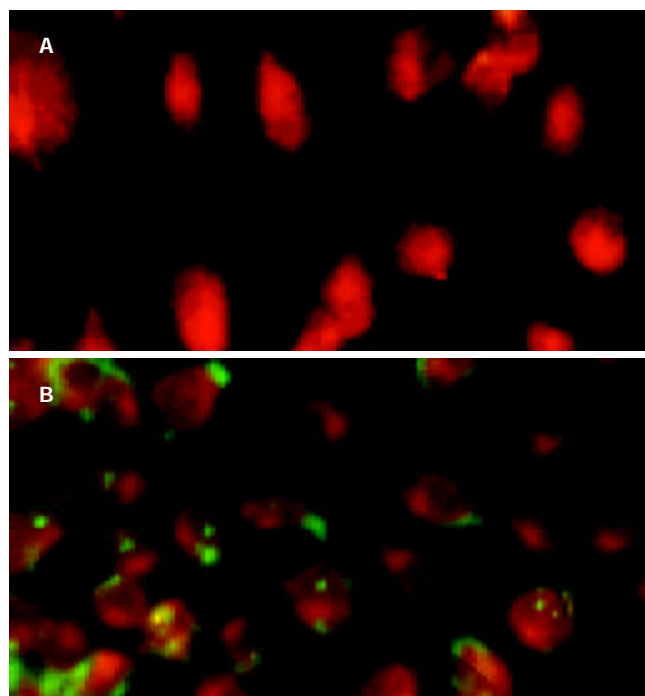


图2 pVAX1-CD81 转染 48 h 的 COS-7 细胞 IF $\times 200$. A: 转染 pVAX1; B: 转染 pVAX1-CD81.

3 讨论

HCV 是引起慢性肝脏疾病的主要原因之一^[12-17], HCV 感染后约 70% 转化为慢性^[18-22], 并与肝硬化、肝衰竭和肝癌的发生密切相关^[23-25]. 与大多数包膜病毒一样, HCV 可能通过其表面包膜糖蛋白与靶细胞表面受体分子结合, 并进入肝细胞是感染致病的关键^[1, 2, 5, 26]. 因此, 克隆 HCV 受体对于研究 HCV 包膜糖蛋白与受体分子的作用, 探讨 HCV 感染、发病机制和抗病毒治疗以及疫苗制备具有重要意义. 近年来, 国外学者在缺乏天然病毒颗粒的条件下, 应用真核细胞表达 HCV E 2 包膜糖蛋白、E1-E2 糖蛋白脂质体、类病毒颗粒等^[27-32], 在

体外模拟研究病毒与细胞的相互作用,相继发现细胞表面CD81、低密度脂蛋白受体(LDL-R)^[33-37]、B1型清道夫受体(SR-BI)^[38-39]、树突状细胞特异性细胞间黏附分子1的非整合素分子(DC-SIGN)和淋巴细胞特异性细胞间黏附分子1的非整合素分子(LC-SIGN)^[40-42]等参与了对HCV的结合和黏附,可作为HCV的候选受体。CD81是目前关于HCV感染入胞研究最多的候选受体。CD81在四次跨膜过程中形成两个胞外区EC1(extro-cellular domain 1)和EC2(extro-cellular domain 2)。近年来,许多学者应用重组的HCV E1和E2包膜蛋白在体外研究结果表明,在HCV结合过程中CD81的两个膜外区EC₂和EC₁各起不同作用,其中EC₂是HCV-E₂的识别结合部位,EC₁不参与HCV-E₂的结合。应用可溶性E2分子和抗CD81单克隆抗体可以阻断这种结合^[28-29]。然而,HCV-E2与CD81的结合能否导致HCV进入靶细胞,并在细胞内复制、致病还不清楚。由于缺乏HCV体外感染的传代细胞模型,限制了对HCV感染致病机制的研究。

应用受体重建方法作为确定病毒受体地位的重要方法之一,已在多种病毒受体研究中得到证明^[43-47]。通过基因转染方法改造非易感细胞,使其表达病毒受体,并获得易感性是受体重建的基本思路。我们先前的研究表明,成功地从富含人CD81的Molt-4细胞克隆了人CD81全序列基因,构建了载体pMD18-T-CD81,两端分别带有BamH I和Xba I酶切位点,并经测序分析其核苷酸与GeneBank公布的序列完全一致。为了进一步探讨CD81在HCV的感染中的作用,本研究应用基因重组方法成功构建了含人CD81全序列基因的真核表达载体pVAX1-CD81,并在绿猴肾COS-7细胞证明,转染的COS-7细胞在转染后48 h能够有效地表达人CD81分子。有研究表明,CD81分子具有种属特异性,不同种属CD81与HCV亲和力的大小不同,对HCV易感性的高低也不一致^[29]。COS-7细胞为非洲绿猴肾细胞的衍生细胞系,虽然猴的CD81和人的CD81高度相似,但二者的抗原性不同。本研究选择COS-7细胞为靶细胞有两方面考虑^[33]:其一,该细胞为异种细胞并不表达CD81,抗人CD81单抗与猴CD81无交叉反应;其二,体外应用HCV血清感染实验表明,COS-7细胞为非易感细胞,通过转染人CD81基因证明,pVAX1-CD81在COS-7细胞膜上可高效表达人CD81分子,如能介导HCV阳性血清感染细胞,可证实CD81的受体地位,可为进一步研究干扰阻断病毒与受体结合药物的研发及疫苗的制备提供感染细胞模型,为从分子水平阐明HCV的致病机制奠定基础。

4 参考文献

- Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 11):2589-2595
- Wang J, Xiang GJ, Liu BX. Effect of alpha 2b interferon on inducement of mIL-2R and treatment of HCV in PBMC from patients with chronic viral hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2003;9:751-754
- Castet V, Moradpour D. A model for the study of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2003;38:771-774
- Op De Beeck A, Dubuisson J. Another putative receptor for hepatitis C virus. *Hepatology* 2003;37:705-707
- Ahlquist P, Noueiry AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 2003;77:8181-8186
- Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E₂. *J Virol* 2000;74:3642-3649
- Hofmann WP, Sarrazin C, Kronenberger B, Schonberger B, Bruch K, Zeuzem S. Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003;187:982-987
- Tan YJ, Lim SP, Ng P, Goh PY, Lim SG, Tan YH, Hong W. CD81 engineered with endocytotic signals mediates HCV cell entry: implications for receptor usage by HCV in vivo. *Virology* 2003;308:250-269
- VanCompernelle SE, Levy S, Todd SC. Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell-B cell collaboration. *Eur J Immunol* 2001;31:823-831
- Soldaini E, Wack A, D' Oro U, Nuti S, Ulivieri C, Baldari CT, Abrignani S. T cell costimulation by the hepatitis C virus envelope protein E2 binding to CD81 is mediated by Lck. *Eur J Immunol* 2003;33:455-464
- Fritzscheing B, Schwer B, Kartenbeck J, Pedal A, Horejsi V, Ott M. Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J Immunol* 2002;169:5531-5537
- Zhang XX, Zhang SY, Liu J, Lu ZM, Wang Y. Expression of hepatitis C virus hypervariable region 1 and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:1003-1007
- 巨立中, 成军, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒复制模型系统. *世界华人消化杂志* 2003;11:1954-1956
- Du DW, Jia ZS, Li GY, Zhou YY. HBV DNA vaccine with adjuvant cytokines induced specific immune responses against HBV infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:108-111
- 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因TAHCCP2的克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:1893-1896
- 纪冬, 成军, 王建军. 丙型肝炎病毒复制子的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1014-1017
- Mao HX, Lan SY, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. Establishment of a cell-based assay system for hepatitis C virus serine protease and its primary applications. *World J Gastroenterol* 2003;9:2474-2479
- Zhou P, Cai Q, Chen YC, Zhang MS, Guan J, Li XJ. Hepatitis C virus RNA detection in serum and peripheral blood mononuclear cells of patients with hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:108-110
- Tang B, Zhuang L, You J, Zhang H, Zhang L. Seven-years follow-up on trial of Interferon alpha in patients with HCV RNA positive chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6 (Suppl 3):68
- Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, Hao LJ, Yang DL. Lethiferous effects of a recombinant vector carrying thymidine kinase suicide gene on 2.2.15 cells via a self-modulating mechanism. *World J Gastroenterol* 2003;9:2216-2220
- Zhao W, Liao GY, Jiang YJ, Jiang SD. No requirement of HCV 5' NCR for HCV-like particles assembly in insect cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:2226-2231
- Chen LK, Hwang SJ, Tsai ST, Luo JC, Lee SD, Chang FY. Glucose intolerance in Chinese patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2003;9:505-508
- Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S35-46

- 24 Abrizi F, Poordad FF, Martin P. Hepatitis C infection and the patient with end-stage renal disease. *Hepatology* 2002;36:3-10
- 25 Kenny-Walsh E. The natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:969-977
- 26 Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-49
- 27 Forns X, Allander T, Rohwer-Nutter P, Bukh J. Characterization of modified hepatitis C virus E2 proteins expressed on the cell surface. *Virology* 2000;274:75-85
- 28 Chan-Fook C, Jiang WR, Clarke BE, Zitzmann N, Maidens C, McKeating JA, Jones IM. Hepatitis C virus glycoprotein E2 binding to CD81: the role of E1E2 cleavage and protein glycosylation in bioactivity. *Virology* 2000;273:60-66
- 29 Drummer HE, Wilson KA, Pountourios P. Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol* 2002;76:11143-11147
- 30 Garcia JE, Puentes A, Suarez J, Lopez R, Vera R, Rodriguez LE, Ocampo M, Curtidor H, Guzman F, Urquiza M, Patarroyo ME. Hepatitis C virus (HCV) E1 and E2 protein regions that specifically bind to HepG2 cells. *J Hepatol* 2002;36:254-262
- 31 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642
- 32 Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7271-7276
- 33 Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12766-12771
- 34 Flint M, Quinn ER, Levy S. In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clin Liver Dis* 2001;5:873-893
- 35 Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 2000;74:10055-10062
- 36 Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 2002;68:206-215
- 37 Hennig BJ, Hellier S, Frodsham AJ, Zhang L, Klenerman P, Knapp S, Wright M, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002;3:359-367
- 38 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-5025
- 39 Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003;278:41624-41630
- 40 Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003;77:4070-4080
- 41 Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003;278:20358-20366
- 42 Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4498-44503
- 43 Wang X, Staudinger R. Interaction of soluble CD4 with the chemokine receptor CCR5. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:1066-1069
- 44 Zago A, Spear PG. Differences in the N termini of herpes simplex virus type 1 and 2 gDs that influence functional interactions with the human entry receptor Nectin-2 and an entry receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Virol* 2003;77:9695-9699
- 45 Shingai M, Ayata M, Ishida H, Matsunaga I, Katayama Y, Seya T, Tatsuo H, Yanagi Y, Ogura H. Receptor use by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 8):2133-2143
- 46 Neumann E, Moser R, Snyers L, Blaas D, Hewat EA. A cellular receptor of human rhinovirus type 2, the very-low-density lipoprotein receptor, binds to two neighboring proteins of the viral capsid. *J Virol* 2003;77:8504-8511
- 47 Inoue N, Winter J, Lal RB, Offermann MK, Koyano S. Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an Rta-dependent reporter cell line. *J Virol* 2003;77:8147-8152

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第二届全国普通外科主任论坛会议

首届全国普通外科主任论坛以其新颖的内容获得了巨大成功,受到与会者的高度评价。会议期间成立了全国普通外科主任联谊会,并决定 2004 年 12 月中旬在武汉召开第二届全国普通外科主任论坛。会议将由裘法祖院士任名誉主席,吴孟超,刘允怡,汤钊猷,黎介寿,黄志强和郑树森等 6 位院士以及黄洁夫副部长,陈汉教授任顾问。全国普通外科主任联谊会会长冷希圣教授任大会主席,常务副会长陈孝平教授任大会执行主席。

本次会议特邀国内外著名专家对普通外科领域的前沿问题,有争议的问题进行综述,评点,介绍普通外科疾病的新进展,新技术,同时仍将邀请专家介绍外科行政管理,学科建设,课题申报,论文(特别是英文)撰写及投稿技巧,医疗纠纷防范与处理的经验。

欢迎各位同道就上述领域撰稿。稿件要求寄全文及 500-800 字论文摘要,同时寄论文的软盘一份或发电子邮件,截稿日期 2004-08-30。

稿件请寄: 陈孝平所长或张志伟副所长收, 430030, 湖北省武汉市华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所。chenxp-53@163.com

联系电话: 027-83662599

(全国普通外科主任联谊会, 中华外科学会肝脏学组 2004-02-16)

鼠肝炎病毒3型N蛋白I区激活 mfgl2凝血酶原酶基因

宁 琴, 严伟明, 汪之沫, 习 东, 刘铭锋, Gary Levy, 罗小平

宁琴, 严伟明, 汪之沫, 习东, 罗小平, 华中科技大学同济医学院同济医院传染科 湖北省武汉市 430030
刘铭锋, Gary Levy, 多伦多大学医学院 加拿大 ON M5G 2C4
宁琴, 女, 1966-01-03 生, 江西省南城人, 汉族. 1985 年同济医科大学学士, 1993 年博士, 1994/2000 年多伦多大学博士后. 免疫学和传染病学教授、主任医师、博士生导师. 现任华中科技大学同济医学院附属同济医院传染病教研室副主任, 研究室主任. 主要从事肝病的基础和临床工作和 SARS 研究工作. 国家自然科学基金资助项目, No.NSFC30170846
杰出青年科学基金项目, No. NSFC30225040, NSFC30125019
首批教育部防治非典型科技攻关项目, No. [2003]64
973 计划 "SARS 防治基础研究", No.2003CB514100
项目负责人: 宁琴, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 同济医院感染科, 临床免疫研究室. qning@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662391 传真: 027-83662391
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

Domain I of nucleocapsid protein of murine hepatitis virus strain 3 upregulates transcription of mfgl2 prothrombinase/fibroleukin gene

Qin Ning, Wei-Ming Yan, Zhi-Mo Wang, Dong Xi, Ming-Feng Liu, Gary Levy, Xiao-Ping Luo

Qin Ning, Wei-Ming Yan, Zhi-Mo Wang, Dong Xi, Xiao-Ping Luo, Department of Infectious Disease, Tongji Hospital, Research Institute of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China
Ming-Feng Liu, Gary Levy, Toronto General Hospital, The University of Toronto, Toronto, ON M5G 2C4, Canada
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170846, the National Science Foundation of China for Distinguished Young Investigator, No.30225040 and No. 30125019; Fund from Ministry of Education for SARS Study, No. [2003] 64
Correspondence to: Dr. Qin Ning, Department of Infectious Disease, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefangdadao, Wuhan 430030, Hubei Province, China. qning@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To investigate the responsible domain(s) of N protein and the I gene within the N gene of MHV-3 or MHV-A59 in the activation of mfgl2.

METHODS: To investigate the responsible domain(s) of N protein of MHV-3 or MHV-A59 in the activation of fgl2 gene, four ways comparison of the N protein was carried out and the site directed mutated N gene expression constructs within domain I and domain III were cotransfected respectively with mfgl2 promoter/luciferase reporter gene in CHO cells. Macrophages from Balb/cJ mice were infected with I gene mutated MHV virus Alb110 and its isogenic Alb111 for 8-10 hours, procoagulant activity (PCA) were measured. MHV-A59 I gene expression construct was cotransfected with mfgl2 promoter-report gene in Chinese hamster ovary (CHO) cells, and luciferase activity was detected for the assessment of promoter function.

RESULTS: Mutations of residues Gly-12, Pro-38, Asn-40, Gln-41 and Asn42 within domain I of the N protein of MHV-A59 to their corresponding residues were found in MHV-2 abrogated mfgl2 transcription, whereas mutation of other N protein domain III did not affect mfgl2 gene transcription. Alb 110 and Alb 111 infected macrophages showed a remarkable increasing in PCA activity compared with no virus or MHV-2 or MHV-JHM infected macrophages. There was no significant difference in PCA activity between Alb 110, Alb 111 infected group and MHV-A59 group. Cotransfection I gene expression construct with a reporter construct containing mfgl2 promoter in CHO cells displayed no significant difference in luciferase activity compared with nontransfected CHO cells.

CONCLUSION: Domain I of nucleocapsid protein of murine hepatitis virus strain 3 upregulates the transcription of mfgl2 prothrombinase/fibroleukin gene. The MHV-A59 I gene is not essential for activation of mfgl2 gene. Our study may shed lights on the investigation of current worldwide-distributed disease, severe acute respiratory syndrome (SARS).

Ning Q, Yan WM, Wang ZM, Xi D, Liu MF, Levy G, Luo XP. Domain I of nucleocapsid protein of murine hepatitis virus strain 3 upregulates transcription of mfgl2 prothrombinase/fibroleukin gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):594-599

摘要

目的: 研究鉴定激活 mfgl2凝血酶原酶基因之冠状病毒3型或 A59 型鼠肝炎病毒 (MHV-3, MHV-A59) 核心(N)蛋白的功能区域.

方法: 应用定点突变技术、与 mfgl2 启动子共转染实验明确 mfgl2 凝血酶原酶基因之 MHV-3 或 MHV-A59 N 蛋白的功能区域. N 蛋白内含 I 基因突变病毒株 A1b 110 和其野生株 A1b 111 体外感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞、I 基因表达载体与 mfgl2 启动子共转染实验阐明 I 蛋白在 mfgl2 基因激活中的作用.

结果: N 蛋白包含由两个可变间隔区(A, B)隔开的三个结构区(I, II, III), MHV-A59 N 蛋白 I 区可增强 mfgl2 转录活性, 当其基因序列突变为非嗜肝性 MHV-JHM 或 MHV-2 I 区序列时, 则丧失激活 mfgl2 启动子转录活性的功能. I 基因突变病毒株 A1b 110 和其野生株 A1b 111 体外感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞后对 mfgl2 的激活无显著差异, 共转染实验阐明 I 蛋白并非 mfgl2 基因激活中的必备因素, 该组 mfgl2 启动子转录活性与对照组无显著差异, 而 N 蛋白可激活 mfgl2 启动子, 使其转录活性提高 62 倍.

结论: 鼠肝炎病毒N蛋白I区为激活 mfgl2凝血酶原酶基因的病毒蛋白功能区域.

宁琴, 严伟明, 汪之沫, 习东, 刘铭锋, Gary Levy, 罗小平. 鼠肝炎病毒3型N蛋白I区激活 mfgl2 凝血酶原酶基因. 世界华人消化杂志 2004;12(3):594-599
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/594.asp>

0 引言

肝脏枯否细胞和血窦内皮 mfgl2和hfgl2凝血酶原酶的高表达在冠状病毒-鼠肝炎病毒所诱导的小鼠暴发性病毒性肝炎和重症乙型肝炎的病情进展中起重要作用^[1-2]. 我们的前期研究显示并非所有鼠肝炎病毒株都可诱导 mfgl2 基因表达, 仅嗜肝性鼠肝炎病毒3型(MHV-3)和A59型鼠肝炎病毒(MHV-A59)感染可在体内外诱导 Balb/cJ 小鼠 mfgl2 基因高表达, 而非嗜肝性2型和JHM型鼠肝炎病毒(MHV-2和MHV-JHM)在体内外不能激活 mfgl2 基因^[3]. 已知 MHV-3 或 MHV-A59 核心(N)蛋白和宿主肝细胞核因子4(HNF4)为 mfgl2 基因激活的必要因素^[4]. N蛋白由3个保守结构区I、II和III组成, II区为与基因组RNA结合的部位, 而I区和III区的生物学功能尚未明了^[5-8]. 近来 Masters 研究组又在大多数 MHV N基因发现一内在开放阅读框架(internal ORF) I基因^[9]. 我们阐明激活 mfgl2凝血酶原酶基因的病毒蛋白功能区域.

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/cJ 小鼠6-8周龄购自 Jackson 实验室(Bar Harbor, ME), 在本院动物中心饲养. MHV-3, MHV-A59, MHV-JHM 和 MHV-2 购自美国典型生物保藏中心(ATCC). MHV-A59 I 基因突变病毒株 Alb 110 和其野生型 Alb 111, 特异性 I 蛋白 mAb 由美国纽约州立研究院 Paul Marsters 教授提供^[7]. Alb110 病毒株 I 基因读码框起始密码和终止密码均被突变, 此株病毒不产生 I 蛋白. 所有的病毒株均采用鼠 17CL1 细胞系进行扩增培养, 鼠 L2 细胞系蚀斑纯化和滴度测定. 小鼠原代巨噬细胞: 将 30 g/L 硫羟乙酸盐 1.5 mL 注射到 Balb/cJ 小鼠腹腔内, 4 d 后从该小鼠腹腔抽取巨噬细胞悬浮于 RPMI 1640 培养液中(含 2 mmol/L 谷氨酰胺和 20 mL/L 胎牛血清). 形态学和非特异酯酶染色检测巨噬细胞纯度超过 95%. 锥虫蓝排实验检测巨噬细胞存活率超过 95%. 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系来自 ATCC.

1.2 方法 N 基因、I 基因表达载体和 mfgl2 启动子虫荧光素酶(LUC)报告基因载体的构建^[4]: 通过 RT-PCR 对 MHV 全长 N 基因、I 基因编码区和 3 非编码(UTRS)序列进行扩增, 并将其亚克隆到表达载体 pCR 3.1. 所用引物序列为: N 基因上游引物 5' ACG ATG TCT TTT GTT CCT GGG 3', N 基因下游引物 5' TTT TTT TTT GTG ATT CTT CCA 3', I 基因上游引物 5' CGC GCT GGT AAT GGA AT 3', I 基因下游引物 5' CTT CGG CCA TAT CAG GTT 3'. 此载体含 CMV 启动子和小牛

生长激素 3' 端信号控制系统. 所克隆之 MHV-2 N 基因序列已提交至 NIH 基因文库(序列号 AF061853)^[3]. 从鼠基因组 P1 质粒的亚克隆 PM166 (pBluescript-m166)中酶解出 mfgl2 基因 5' 端 1.3 kb 的启动子 DNA 片段, 并将此 1.3 kb DNA 片段克隆至 pGL2 虫荧光素酶报告质粒(pGL2-basic, Promega)Sma I 和 Xho I 位点, 从而形成了 mfgl2 启动子/虫荧光素酶报告质粒 Pfgl2-LUC. 5' 端缺失 mfgl2 启动子/虫荧光素酶报告质粒的构建方法为以 PM166 为模板, 扩增 5' 端缺失 mfgl2 启动子 DNA 片段, 然后将其克隆到 pCR 2.1 载体, 再一次亚克隆到 pGL2 虫荧光素酶报告质粒 Xho I 和 HindIII 位点. 呼吸道合胞病毒(RSV) β -半乳糖苷酶(β -Gal)表达质粒购自 Promega 公司. 突变体: 使用 Dnasis 软件对嗜肝性 MHV (MHV-3, 序列号 M35254 和 MHV-A59) 和非嗜肝性 MHV (MHV-2 和 MHV-JHM, 序列号 M25875) N 蛋白氨基酸序列进行了比较(表1). 根据 QuikChangTM (stratagene) 定点诱变试剂盒操作指导设计上下游引物, 以 MHV-A59 N 基因表达载体为模板进行扩增制备相应 N 基因突变体, 其氨基酸突变位点和引物序列见表 2. 以上质粒均经测序鉴定无误. 分别将 N 蛋白 1 μ L 或 I 蛋白表达质粒或 N 蛋白突变体表达质粒 pGL2-basic 或 pfgl2-LUC DNA 野生型启动子虫荧光酶报告质粒 0.5 μ g 以及 β -gal 基因 DNA 0.25 μ g 溶于 OPTI-DMEM 培养液 100 μ L, 后与 OPTI-DMEM 培养液 100 μ L 混合(含 lipofectAMINETM 3.5 μ L), 将混合物置于室温中孵育 30 min. 向混合物中加入 OPTI-DMEM 培养液 1.8 mL 使总量达 2 mL. 将上述混合物按每孔 1 mL 的体积加入六孔平板上汇合率达 50%-80% 的 CHO 细胞内, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 条件培养 5 h, 换 20 g/L FBS DMEM 培养液, 44-48 h 后, 收集细胞并经液氮冻融 3 次, 取上清进行 β -gal 和 LUC 活性测定.

1.2.1 前凝血质活性 感染 MHV 及突变株的巨噬细胞(MOI=2.5)在含有 100 mL/L 胎牛血清和 200 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 中培养 8 h, 未感染的巨噬细胞和 MHV-3 感染的巨噬细胞分别作为阴性和阳性对照. 采用单相凝集试验(one-stage clotting assay)^[10], 测定 mfgl2 凝血酶原酶的功能(PCA).

1.2.2 Western-blot 鉴定 I 蛋白的表达 转染 24 h 后, 向培养孔内加 Triton 裂解液 [pH 7.8 100 mmol/L 磷酸钾, 2 mL/L Triton X-100, 1 mmol/L DTT(临用前新鲜加入)], 收集裂解液上清, 用邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)于 420 nm 处进行比色分析 β -gal 活性, 以判断转染效率. 收集另设平衡实验孔转染细胞, 凝胶加样缓冲液裂解后进行 SDS-PAGE (150 g/L 聚丙烯酰胺凝胶)电泳. 半干法将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 丽春红 S 染色确认蛋白质已转移到 NC 膜上, 蒸馏水漂洗脱色以备免疫分析. 将 NC 膜置于封闭液中于平缓摇动的摇床平台上室温温育 2 h. 弃去封闭液, 加入兔抗 MHV I 蛋白 mAb (1:200), 平缓摇动的摇床平台上室温温育 1 h. PBS 洗涤 10 min \times 5 次. 加入

辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1 : 1 500), 摇床平台上室温温育 1 h 观察结果.

统计学处理 采用 ANOVA 统计顾问软件(sigmastat advisory statistical software, jandel corporation) 对统计资料进行单向方差分析.

2 结果

2.1 mfgl2 基因的转录活性 我们比较了嗜肝性 MHV

(MHV-A59, MHV-3)与非嗜肝 MHV(MHV-2, MHV-JHM)的 N 蛋白氨基酸序列(表 1), 并对差异部分进行了系列定点突变. 瞬时转染试验显示, 嗜肝性 MHV N 蛋白 I 区有 4 个位点(Gly12, Pro38, Asn40, Gln41, Asn42)经突变后(表 2), 其激活 mfgl2 启动子的转录活性降为水平线(图 1), 而 N 蛋白 II 区突变体对 mfgl2 的转录活性没有明显下降, 表明嗜肝性 MHV N 蛋白 I 区为激活 mfgl2 凝血酶原酶基因的功能区域.

表 1 MHV-A59, MHV-3, MHV-2 和 MHV-JHM 的 N 蛋白氨基酸序列比较

		* P38 del						
		* G12S				P38L *	* NQN 40-42 del	
MHV-A59	1	MSFVPGQENA	GGRSSSVNRA	GNGILKKTWT	ADQTERGPNN		QNRGRRNQPK	50
MHV-3		G	G					
MHV-2		S	G			- - -	H	
MHV-JHM		S	G			L	K	
*E85Q								
MHV-A59	51	QTATTQPN SG	SVVPHYSWFS	GITQFQKGKE	FQFAEGQGV P		IANGIPASEQ	100
MHV-3					E			
MHV-2		A			Q		S	
MHV-JHM					Q		Q	
MHV-A59	101	KGYWYRHNR R	SFKTPDGQ QK	QLLPRWYFY Y	LGTGPHAGAS		<u>YGDSIEGVFW</u>	150
MHV-3					S			
MHV-2					E			
MHV-JHM			H		E			
MHV-A59	151	<u>VANSQADTNT</u>	<u>RS</u> DIVERDPS	SHEAIPTRFA	PGTVLPQGFY		VEGSGRSAPA	200
MHV-3		NS	S					
MHV-2		SQ	K TA V	K			K	
MHV-JHM		SQ	E R SA					
MHV-A59	201	SRSGRSQSR	GPNNRARSS S	NQRQPASTVK	PDMAEEIAAL		VLAKLGKDAG	250
MHV-3				A				
MHV-2								
MHV-JHM		P						
MHV-A59	251	QPKQVTKQSA	KEVRQKILNK	PRQKRTPNKQ	CPVQQCFGKR		GPNQNF GGSE	300
MHV-3								
MHV-2			T					
MHV-JHM							P	
*V321A								
MHV-A59	301	MLKLGTSDPQ	FPILAE LAPT	VGAFFFGSKL	ELVKKN SSGA		DEPTKDVYE	350
MHV-3								
MHV-2				PS				
MHV-JHM				A			G	
MHV-A59	351	QYSGAVRFDS	TLPGFETIMK	VLNENLNAYQ	<u>K-DGGADVVS</u>		<u>PKPQRKGRRQ</u>	400
MHV-3								
MHV-2		I		T	DQA SV L		P R	
MHV-JHM					NQ		RGTK	
MHV-A59	401	<u>AQEKKDEVDN</u>	VSVAKPKSSV	QRNVSRELTP	EDRSL LAQIL		DDGVVPDGL E	450
MHV-3								
MHV-2			L					
MHV-JHM		QKAQ						
MHV-A59	451	DDSNV *	500
500 MHV-3								
MHV-2								
MHV-JHM								

MHV-A59 N 蛋白完整氨基酸序列已列出, 其他三型 MHV 仅列出与 MHV-A59 不同的 N 蛋白氨基酸残基. 斜体和波浪纹、下划线部分表示可变间隔区 A 和 B 的序列. 破折号表示引入序列的空隙使比较的序列相应位置残基对齐. MHV-A59 N 蛋白中需要突变处理的氨基酸以黑体字和下划线表示. 星号后紧接着的部分表示突变.

表2 MHV-A59 N蛋白氨基酸突变位点和引物序列

Mutant Name	Mutation	Location of Mutation	Sense Primer (5' -3')/Antisense Primer (5' -3')
A59G12S	Gly12 to Ser12	Domain I	CCT GGG CAA GAA AAT GCC GGT AGC AGA AGC TCC TCT G/ C AGA GGA GCT TCT GCT ACC GGC ATT TTC TTG CCC AGG
A59P38L	Pro38 to Leu38	Domain I	GAC CAA ACC GAG CGT GGA CTA AAT AAT CAA AAT AGA GGC/ GCC TCT ATT TTG ATT ATT TAG TCC ACG CTC GGT TTG GTC
A59P38del	Pro38 deletion	Domain I	GCT GAC CAA CAA ACC GAG CGT GGA CCA AAT AAT CAA AAT AGA GGC AGA AGG/ CCT TCT GCC TCT ATT TTG ATT ATT TGG TCC ACG CTC GGT TTG TTG GTC AGC
A59NQN 40-42del	Asn40-Gln41- Asn42 deletion	Domain I	GG GCT GAC CAA ACC GAG CGT GGA CCA AAT (AAT CAA AAT) AGA GGC AGA AGG AAT CAG CCA AAG CAG ACT GC GC AGT CTG CTT TGG CTG ATT CCT TCT TCC TCT (ATT TTG ATT) ATT TGG TCC ACG CTC GGT TTG TTC AGC CC
A59E85Q	Glu85 to Gln85	Domain I	GGA AAG GAG TTT CAG TTT GCA CAG GGA CCA GGA GTG CCT ATT GCC GGC AAT AGG CAC TCC TGG TCC CTG AGC AAA CTG AAA CTC CTT TCC
A59V321A	Val321 to Ala321	Domain II	GCA GAG TTG GCT CCA ACA CCT GGT GCC GGT GCC TTC TTC GG CC GAA GAA GGC ACC GGC ACC AGG TGT TGG AGC CAA CTC TGC

黑体字母表示突变序列. 括号内黑体字母表示缺失序列. 所有突变的产物皆经测序核实方向和序列.

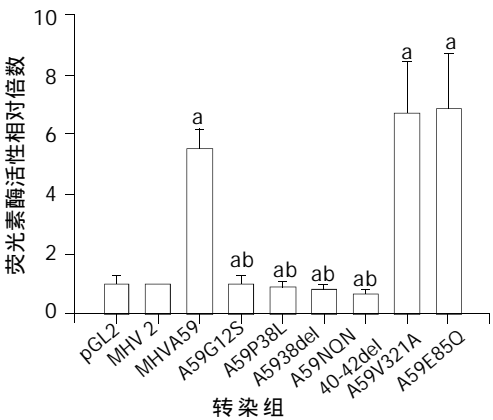


图1 mfgl2启动子与MHV-A59 N蛋白或其突变体N蛋白共转染后的转录活性检测. 共分9组, 每组设3个复管, 进行了相互独立而平衡的5次实验, 取mean±SD行统计学分析, 以pGL2组所显示的虫荧光酶活性为1, 其余各组虫荧光酶活性表示方法为与其与pGL2组的相对比率. ^aP <0.01 vs 转染MHV-2 N基因表达载体的细胞进行比较; ^{ab}P <0.01 vs 转染MHV-A59 N基因突变体表达载体的细胞进行比较.

2.2 巨噬细胞PCA的产生 我们将MHV-A59 I基因突变病毒株A1b110及其同基因型野生株A1B111感染Ba1b/cJ小鼠腹腔巨噬细胞并检测PCA活性. 结果显示, A1b 110与A1B 111对小鼠巨噬细胞PCA活性的诱导程度无显著差异, 与MHV-A59、MHV-3组亦无显著差异(图2)提示I基因可能对嗜肝性MHV N蛋白激活mfgl2启动子的作用无影响.

2.3 I基因的真核表达 我们克隆了MHV-A59 I基因并构建了其表达载体. 并在CHO细胞进行了I基因的真核表达. 采用特异性I蛋白单克隆抗体进行Western-blot显

示一特异性的23 KD蛋白条带, 见图3箭头处.

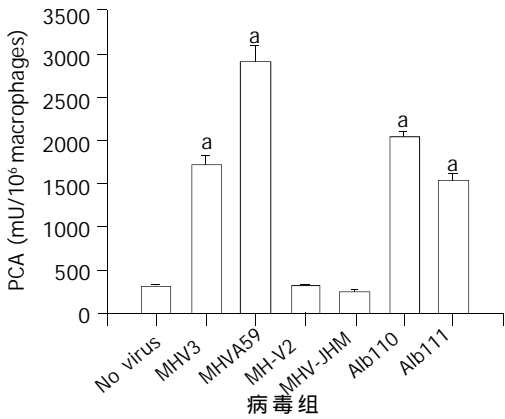


图2 基因突变病毒株和其野生株感染Balb/cJ小鼠巨噬细胞后PCA检测. I基因突变病毒株Alb110和他的同基因野生型Alb111感染Balb/cJ小鼠的巨噬细胞, 感染系数2.5, 8-10 h后收集巨噬细胞进行PCA测定. MHV-3、MHV-A59感染组设为阳性对照, MHV-2、MHV-JHM和无病毒感染组设为阴性对照. 进行了三次相互独立的实验, 每组设三管, 取mean±SD行统计分析. ^aP <0.01 vs 未受刺激的巨噬细胞进行比较.

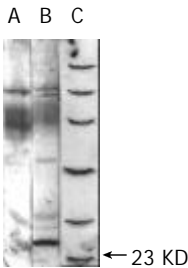


图3 I基因的真核表达. 泳道A: 未转染I-pCR3.1质粒DNA的CHO细胞; 泳道B: 转染I-pCR3.1质粒DNA的CHO细胞; 泳道C: 蛋白质标准分子量.

2.4 I 基因不诱导 mfgl2 基因的表达 应用 SPSS 统计学分析软件对 3 组相对荧光素酶活性倍数进行单因素方差分析, 结果 I 蛋白组与 pCR3.1 空质粒组比较 $P > 0.05$ (0.234), 与 N 蛋白组比较 $P < 0.05$ (0.038), N 蛋白组与 pCR3.1 空质粒组比较 $P < 0.01$ (0.005). 说明 I 蛋白对 mfgl2 基因转录活性无显著作用(图 4)

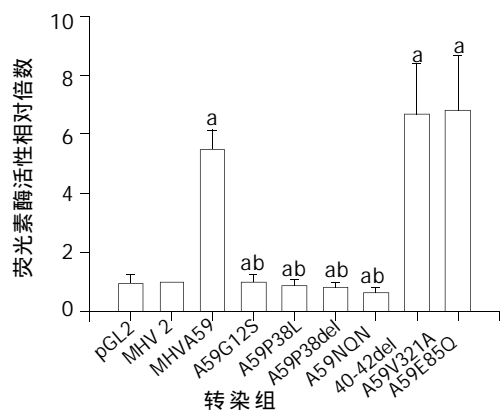


图4 mfgl2 启动子与 I 蛋白共转染后的转录活性检测. N 蛋白表达质粒和 pCR3.1 空质粒分别设为阳性和阴性对照. 每组设了 3 个复管, 进行了相互独立而平衡的 4 次实验, 取 mean±SD 进行统计分析. 以 pCR3.1 空质粒但所得虫荧光酶活性为 1, 其余各组虫荧光酶的活性表示方法为其与 pCR3.1 空质粒组的相对比率. * $P < 0.01$ vs pCR3. 空质粒组虫荧光酶活性比较差异有显著性.

3 讨论

我国重症乙型肝炎发病率高, 临床治疗手段有限, 其分子致病机制不甚明了^[11-12]. MHV-3 或 MHV-A59 感染引起的小鼠病毒性肝炎模型已被认为是研究人类重症肝炎发病机制的良好工具^[13-14]. mfgl2、hfgl2 凝血酶原酶的组织特异性表达已被证明在 MHV-3 引起的鼠暴发型肝功能衰竭和人类重症乙型肝炎的发病中起关键作用^[1-2, 15]. MHV-3 N 蛋白通过肝脏特异性转录因子肝核因子 4 (HNF4) 诱导 mfgl2/fibroleukin 基因的表达^[4, 16]. MHV-A59 N 蛋白与 MHV-3 N 蛋白仅有 1 个氨基酸的差异, 均可特异性地上调 mfgl2 基因表达^[2-3], 因此亦是进行嗜肝性 MHV 相关研究的代表病毒株. 嗜肝性和非嗜肝性 MHV N 蛋白均可进入被感染的细胞核内, 提示 MHV 介导的 mfgl2 转录激活与嗜肝性 MHV N 蛋白特异性性状有关^[17-19]. N 蛋白 I 区和 II 区富含几种碱性氨基酸残基: lys, arg 和 his. 对 MHV-A59, MHV-3, MHV-JHM 和 MHV-2 的 N 蛋白氨基酸序列分析初步显示这些碱性氨基酸残基可形成簇状结构(至少有两个簇), 由可变长度间隔区隔开, 单独或协同作用均有可能为核定位信号. 已知 MHV N 蛋白 II 区主要作用是与病毒基因组结合, 而 I 区和 III 区的功能尚不明^[20-21].

为确定嗜肝性 MHV N 蛋白对激活 mfgl2 表达发挥关键性作用之氨基酸功能域, 将 mfgl2 启动子/LUC 报告载体和 MHV-A59 N 基因野生型表达质粒或其氨基酸定点突变质粒共转染到 CHO 细胞, 结果显示位于 N 蛋白 I 区的氨基酸残基与 mfgl2 转录激活有关(图 1); 而 II 区

氨基酸残基突变则不影响. mfgl2 转录活性提示 N 蛋白 I 区的 Gly12, Pro38, Asn40, Gln41, Asn42 氨基酸残基很可能形成一个基元 (motif), 在 mfgl2 转录激活过程中发挥重要作用. 关于这些残基如何相互作用尚有待 MHV N 蛋白晶体结构的明确以深入研究.

I 蛋白是一个 23 ku 的疏水多肽, 由一个嵌入 MHV N 基因 5' 端的开放阅读框编码, 这个内在的基因被称为 I 基因, 其序列也已确证^[22-24]. 目前已经发现在 MHV 感染的细胞上均有 I 蛋白的表达, 实验表明 I 蛋白并非 MHV 在组织培养或天然宿主体内复制所必须的结构蛋白, 但 I 基因沉默病毒的噬斑直径要明显小于同基因的野生株病毒噬斑直径, 表明 I 基因的表达利于 MHV 病毒的生长^[9]. 为阐明 N 基因内含 I 基因是否参与调节 mfgl2 的作用, 我们将 I 基因突变病毒株 Alb110 及其野生株 Alb111 体外感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞, 检测其 PCA 活性, 将 I 基因表达载体与 mfgl2 荧光素酶报告质粒共转染以期明确 I 蛋白在 mfgl2 基因激活中的作用, 结果显示 I 蛋白非 mfgl2 基因激活的必备因素, 进一步论证了嗜肝性病毒株 MHV-3 和 MHV-A59 之 N 蛋白是促进前凝血酶活性提高、诱导 mfgl2 凝血酶原酶基因转录激活的病毒因素. 已知丙型肝炎核心蛋白对某些宿主基因的调节作用^[25-27], 我们的结果对人类乙型和丙型肝炎病毒核心蛋白调节宿主基因转录的研究具重要的指导意义.

目前累及全球 28 个国家和地区的 Urbani SARS 相关冠状病毒, 经测序核实其序列与 II 类冠状病毒其中包括 MHV 在基因序列同源性最大^[28-30], 目前尚未见到有关其发病机制、传播与防治动物模型的文献报道. 我们在 MHV-3 领域成功的科研经验对探讨 Urbani SARS 相关冠状病毒及其所致疾病的基础研究和防治有重要的借鉴意义.

致谢: 感谢胡锦涛女士协助本文文字和图表处理!

4 参考文献

- Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekia KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, Yeger H, Phillips MJ, Levy A. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997;71:9223-9230
- 陈悦, 宁琴, 王宝菊, 张东坤, 严福明, 孙奕, 习东, 严伟明, 郝连杰, Levy G, 罗小平. 重症乙型肝炎人纤维介素基因的表达及意义. *中华医学杂志* 2003;83:446-450
- Ning Q, Liu M, Kongkham P, Lai M, Marsden PA, Tseng J, Pereira B, Belyavskiy M, Leibowitz J, Phillips MJ, Levy G. The nucleocapsid protein of murine hepatitis virus type 3 induces transcription of the novel fgl2 prothrombinase gene. *Biol Chem* 1999;274:9930-9936
- 宁琴, 罗小平, 汪之沐, 韩梅芳, 严伟明, 刘铭锋, Levy G. Mfgl2 凝血酶原酶/fibroleukin 基因转录调控元件 HNF4 的研究. *中华医学杂志* 2003;83:678-683
- Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Advin Vir Res* 1997;48:1-100
- Cologna R, Spagnolo JF, Hogue BG. Identification of nucleocapsid binding sites within coronavirus-defective genomes. *Virology* 2000;277:235-249
- Narayanan K, Kim KH, Makino S. Characterization of N protein self-association in coronavirus ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 2003;98:131-140

- 8 Wu HY, Guy JS, Yoo D, Vlasak R, Urbach E, Brian DA. Common RNA replication signals exist among group 2 coronaviruses: evidence for in vivo recombination between animal and human coronavirus molecules. *Virology* 2003;315:174-83
- 9 Fischer F, Peng D, Hingley ST, Weiss SR, Masters PS. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J Virol* 1997;71:996-1003
- 10 Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattal M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998;160:3487-3493
- 11 冯志华, 聂青和, 白宪光, 白雪帆, 周永兴, 贾战生, 郝春秋. 膜式血浆置换治疗慢性重症肝炎肝功能衰竭疗效. 世界华人消化杂志 2002;10:638-641
- 12 李冠群, 李今怡, 霍宏慎, 王兆荃, 姜卫国. 斑块状肝细胞坏死在亚急性重症肝炎病理诊断中的意义. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):69
- 13 Jodie H, Stanley P. Mouse hepatitis virus. *Cur Opin Microbiol* 2001;4:462-466
- 14 Liu MF, Chan CWY, McGilvray ID, Ning Q, Levy GA. Fulminant viral hepatitis. Molecular and cellular basis, and clinical implications. *Exp Rev Mol Med* 2001;1:1-19
- 15 Marsden PA, Ning Q, Fung LS, Luo XP, Chen Y, Mendicino M, Ghanekar A, Scott GA, Miller T, Chan CWY, Chan MWC, He W, Gorczynski RM, Grant DR, Clark DA, Phillips MJ, Levy GA. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically-mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *J Clin Invest* 2003;112:58-66
- 16 Ning Q, Lakatoo S, Liu M, Yan W, Wang Z, Phillips MJ, Levy G. Induction of prothrombinase fgl2 by the nucleocapsid protein of virulent mouse hepatitis virus is dependent on host hepatic nuclear factor-4 a. *J Biol Chem* 2003;278:15541-15549
- 17 Wurm T, Chen H, Hodgson T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* 2001;75:9345-9356
- 18 Hiscox JA, Wurm T, Wilson P, Britton P, Cavanagh D, Brooks G. Coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J Virol* 2001;75:505-512
- 19 Brockway SM, Clay CT, Lu XT, Denison MR. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 2003;77:10515-10527
- 20 Masters PS, Parker MM, Ricard CS, Duchala C, Frana MF, Holmes KV, Sturman LS. Structure and function studies of the nucleocapsid protein of mouse hepatitis virus. In: Coronaviruses and their diseases. Cavanagh D, Brown T, eds. Plenum Press, New York 1990;239-246
- 21 Parker MM, Masters PS. Sequence comparison of the N genes of five strains of the coronavirus mouse hepatitis virus suggests a three-domain structure for the nucleocapsid protein. *Virology* 1990;179:463-468
- 22 Lapps W, Hogue BG, Brian DA. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* 1987;157:47-57
- 23 Homberger FR. Sequence analysis of the nucleoprotein genes of three enterotropic strains of murine coronavirus. *Arch Virol* 1995;140:571-579
- 24 Kunita S, Mori M, Terada E. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of rat coronavirus SDAV-681. *Virology* 1993;193:520-523
- 25 Lai M, Ware C. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:117-134
- 26 McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14
- 27 Webster G, Brown D, Dusheiko G. HCV genotypes-role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:229-240
- 28 Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, Chan AK, Skowronski DM, Salit I, Simor AE, Slutsky AS, Doyle PW, Krajden M, Petric M, Brunham RC, McGeer AJ. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003;348:1995-2005
- 29 Drosten C, Gunther S, Preiser W, Vander Werf S, Brodt HR, Becker S, Raberau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Clinat J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Mannguerre JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-1976
- 30 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarener J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel coronavirus associated with severe respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966

乙型肝炎病毒 P 基因 YMDD 变异的意义

王平忠, 张 岩, 白雪帆, 张 颖, 李谨革, 陈红梅, 王九平

王平忠, 张岩, 白雪帆, 张颖, 李谨革, 陈红梅, 王九平, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
王平忠, 男, 1963-03-01 生, 陕西省汉中市人, 汉族. 博士, 讲师. 主要从事病毒感染免疫及实验诊断研究.

项目负责人: 王平忠, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. wangpzj@hotmail.com
电话: 029-3377595

收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

Significance of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus

Ping-Zhong Wang, Yan Zhang, Xue-Fan Bai, Ying Zhang, Jin-Ge Li, Hong-Mei Chen, Jiu-Ping Wang

Ping-Zhong Wang, Yan Zhang, Xue-Fan Bai, Ying Zhang, Jin-Ge Li, Hong-Mei Chen, Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Ping-Zhong Wang, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. wangpzj@hotmail.com

Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

Abstract

AIM: To determine significance of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus during lamivudine therapy for chronic hepatitis B and to provide guideline for the clinical treatment.

METHODS: Dynamic change of HBV DNA quantitation was measured with fluorescence quantitative PCR during lamivudine treatment. 40 patients from chronic hepatitis B were treated with lamivudine for 48 weeks. In 17 patients HBV DNA remained to be positive, YMDD mutation were examined by GeneChip and Uniarray techniques.

RESULTS: In patients treated with lamivudine for 48 weeks, HBV DNA turned negative in 23 cases (57.5%). In 17 patients HBV DNA remained to be positive, there was HBV DNA rebound in 8 patients during lamivudine treatment. There were YMDD mutations in 7 cases (5 cases from patients of HBV DNA rebound). The rate of YMDD mutation was 17.5%(7/40).

CONCLUSION: During Lamivudine treatment, HBV YMDD in some patients can mutate. The HBV DNA rebound is associated with emergence of YMDD mutants. Detection of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus is important to clinical treatment for chronic hepatitis B.

Wang PZ, Zhang Y, Bai XF, Zhang Y, Li JG, Chen HM, Wang JP. Significance of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):600-603

摘要

目的: 了解拉米夫定治疗慢性乙型肝炎过程中HBV P基因

YMDD 变异的意义, 为临床治疗提供指导.

方法: 用定量PCR监测40例拉米夫定治疗期间的HBV DNA动态变化, 对治疗 48 wk 时 HBV DNA 仍为阳性的患者, 采用Uniarray技术和基因芯片检测YMDD突变.

结果: 拉米夫定治疗48 wk时, HBV DNA转阴者23例(57.5%). HBV DNA 仍为阳性者 17 例, 其中 8 例在治疗过程中出现 HBV DNA定量反跳. 用基因芯片法与Uniarray技术共检测出7例YMDD变异(5例出现于8例HBV DNA定量反跳者), 变异率为 17.5%(7/40).

结论: 拉米夫定治疗过程中, 可导致部分患者的HBV YMDD发生变异. 该变异使多数患者HBV DNA定量反跳. 检测HBV YMDD变异对慢性乙型肝炎的治疗具有重要的指导意义.

王平忠, 张岩, 白雪帆, 张颖, 李谨革, 陈红梅, 王九平. 乙型肝炎病毒 P 基因 YMDD 变异的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):600-603

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/600.asp>

0 引言

拉米夫定(lamivudine)是核苷类的抗乙型肝炎病毒(HBV)的新药, 是HBV复制强有力的抑制剂, 其作用靶为HBV DNA多聚酶, 通过抑制前基因组 RNA 逆转录为负链 DNA 及 DNA 链延伸过程中起到链终止作用来抑制 HBV 复制. 拉米夫定用于治疗慢性乙型肝炎已有较明确的疗效, 但由于其难以完全清除体内病毒, 尤其是对cccDNA无直接作用, 故需要长期用药以期耗竭cccDNA库来达到清除HBV的目的. 但长期用药可引起 HBV DNA 多聚酶活性区核苷酸序列的变异, 称为YMDD变异. 国内学者报道YMDD变异发生率第1a和第2a分别为14%和49%^[1], 变异后的HBV对拉米夫定的敏感性下降, 从而导致治疗失败^[2-4]. 因此, 检测YMDD基序变异对及时调整治疗方案、合理用药及提高疗效具有重要的指导意义^[5]. 为更好地监测慢性乙型肝炎患者应用拉米夫定治疗过程中耐药性的产生, 我们用定量PCR监测了40例拉米夫定治疗期间的HBV DNA动态变化, 对治疗48 wk时HBV DNA仍为阳性的患者, 用基因芯片和Uniarray技术检测YMDD突变.

1 材料和方法

1.1 材料 本院1999-12/2000-11住院和门诊患者血清标本40例, 男28例, 女12例. 年龄15-68(平均36.7岁). 临床诊断符合2000-09西安会议《病毒性肝炎防治方案》标准. 入选患者HBsAg, HBeAg阳性; 抗HIV,

抗-HDV, 抗-HCV 阴性(华美公司试剂). HBV DNA 斑点杂交阳性(上海医科大学预防医学研究所生产的试剂盒测定), 且HBV DNA 定量均大于 10^3 拷贝/L(荧光定量PCR法). 所有患者口服拉米夫定 100 mg/d, 疗程 48 wk. 于治疗前及治疗 24 wk、36 wk 和 48 wk 时采集外周血, 分离血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 统一检测. HBV DNA 定量试剂由中山大学达安基因诊断中心提供. Uniarray 技术检测试剂为上海基达基因技术有限公司生产的 UniArray™ HBV 拉米夫定耐药检测试剂盒. 所用仪器为 GeneAmp 5700 Sequence Detection System (applied biosystem 公司) 荧光 PCR 扩增仪. HBV YMDD 检测芯片由联合基因集团上海博华基因芯片技术有限公司制备. 图片扫描仪为 ScanArray 300 (美国).

1.2 方法 (1)HBV DNA 定量 采用荧光定量 PCR 法. 按说明书进行操作. (2)Uniarray 技术 主要步骤如下: 取待测血清、质控品 I(内参照阳性、YIDD 阳性、YVDD 阴性)和质控品 V(内参照阳性、YVDD 阳性、YIDD 阴性)各 50 μL , 分别加入 DNA 提取液 A 50 μL , 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清. 再加入 DNA 提取液 B 50 μL , 振荡混匀, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清 5 μL 进行 PCR 扩增. 扩增 PCR 反应体系为 50 μL , 包括 PCR 缓冲液 31 μL , MgCl_2 6 μL , Taq 酶 3 μL , 荧光探针 5 μL , 待检 DNA 样品 5 μL . 将各反应管按一定顺序放入 PE Gene Amp 5700 荧光 PCR 扩增仪上, 先 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min, 再 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, 40 个循环. 结果以 YIDD 或 YVDD 引物孔的 Ct 值与内参照引物孔的 Ct 值(基准值)之差 (ΔCt) 的大小作为突变是否发生的依据. 若 ΔCt 小于或等于 3, 则为 YMDD 变异; 若 ΔCt 大于 3, 则为 YMDD 野生型. (3)基因芯片测定方法 HBV YMDD (拉米夫定耐药基因) 检测芯片选定 HBV P 基因的保守区序列, 并设计了相关的引物, 扩增出包含有 YMDD 变异区的核苷酸片断, 针对 L528M, A548V, M552I 及 M552V 4 个位点设计探针, 将探针固定在经过特殊处理的玻片上, 并且与特定的 PCR 法标记扩增的片断杂交. 经过洗脱后, 在微排列扫描仪上扫描, 用专门的软件分析确定耐药的类型. 取待检测血清 10 μL , 采用常规酚、氯仿、异戊醇方法抽提 HBV DNA, 异丙醇沉淀; 取 5 μL 用于 PCR 扩增, 共 35 个循环; 再吸取 PCR 产物 2 μL , 加入 CY5 标记的 dUTP, 进行 PCR 标记, 共 35 个循环. 标记的产物沉淀后加入杂交试剂, 并与芯片分别于 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冷却后将杂交液 10 μL 滴于芯片的上样区, 封闭后在湿盒内 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 1.5 h, 然后用 $0.1\times\text{SSC}$ 洗涤 10 min, 双蒸水冲洗并避光晾干; 将杂交后的芯片插入 ScanArray 300 扫描仪(美国)中进行扫描, 扫描强度 55-60 %, 获得的图片用 GenArray-Check 软件分析各点的信号状况, 根据信号强度及比值作出判断结果(图 1, 表 1).

2 结果

2.1 HBV DNA 定量水平 治疗 48 wk 时, 17 例 HBV

DNA 仍为阳性, 对这 17 例患者治疗前及治疗 24 wk、36 wk 和 48 wk 的系列血清进行了 HBV DNA 定量检测. 结果发现, 8 例患者治疗过程中一度降低的 HBV DNA 水平又复升高(2 例于 36 wk 升高, 6 例于 48 wk 升高)(表 2). 2.2 Uniarray 技术检测结果 用 Uniarray 技术测定 40 例拉米夫定治疗 48 wk 时 HBV DNA 仍为阳性的 17 例血清, 3 例为 YVDD 变异, 4 例为 YIDD, 其余 10 例全部为野生株(表 3).

表 1 基因芯片扫描信号强度(1 例 YIDD 变异结果)

	平均值	比值	结果
YIDD 突变点	116.65	0.05	野生
单点差异对照	165.19		
单点差异对照	261.10		
YMDD 野生点	2 267.16		
A548V 突变点	186.37	0.02	野生
单点差异对照	320.44		
单点差异对照	804.78		
A548V 野生点	8 212.13		
L528M 突变点	4 271.79	0.34	野生
单点差异对照	8 890.03		
L528M 野生点	1 2670.01		
L528M 野生点	8 189.31		
YIDD 突变点	24 518.07	4.86	突变
单点差异对照	1 704.71		
单点差异对照	1 471.62		
YMDD 野生点	5 039.73		

表 2 治疗组 8 例 HBV DNA 反跳者定量检测结果

编号病例	t /wk			
	0	24	36	48
03	8.19×10^7	5.41×10^6	2.28×10^5	4.19×10^6
06	2.35×10^8	3.08×10^6	4.72×10^7	2.31×10^6
16	3.27×10^8	4.84×10^6	6.18×10^5	2.17×10^7
21	4.32×10^8	2.32×10^6	$<1.00\times 10^3$	7.18×10^6
23	6.18×10^7	1.28×10^6	4.42×10^5	2.21×10^6
25	7.84×10^7	1.35×10^5	4.05×10^6	8.12×10^6
28	4.67×10^6	3.22×10^5	5.09×10^4	6.16×10^5
30	5.56×10^8	4.32×10^6	3.92×10^4	1.92×10^6

表 3 YMDD 变异检测结果

病例编号	基因芯片	Uniarray 技术
03	YVDD+L528M	YVDD
16	YIDD	YIDD
18*	YIDD	YIDD
21	YVDD+ 野生株	YVDD
23	YIDD	YIDD
27*	YVDD+L528M	YVDD
30	YIDD	YIDD

*HBV DNA 未反跳, 但 48 wk 时仍为阳性.

2.3 基因芯片法检测结果 用基因芯片法测定治疗48 wk HBV DNA 仍为阳性的17例患者血清,发现YMDD变异7例,9例为野生株(无变异),1例为阴性.在7例YMDD变异中,YVDD变异3例,YIDD变异4例.3例YVDD中,2例合并528突变(核苷酸C⁶⁶⁹→A,使氨基酸由亮氨酸⁵²⁸→蛋氨酸),1例变异株和野生株同时存在(表3).

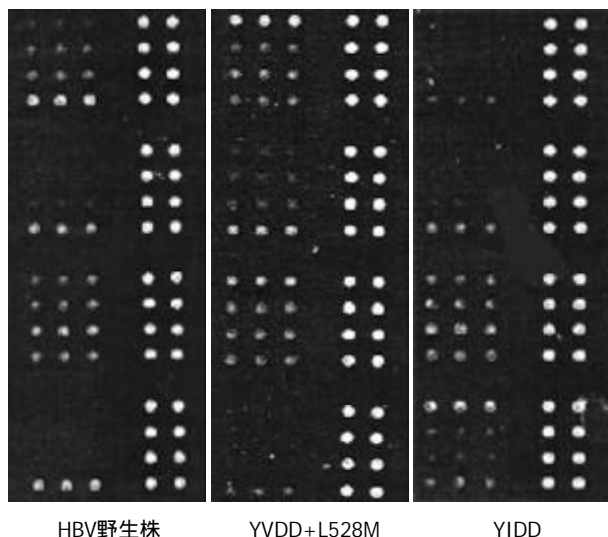


图1 YMDD变异的基因芯片扫描图.

3 讨论

拉米夫定是HBV复制强有力的抑制剂,能够与HBV DNA多聚酶YMDD(酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸)基序特异性结合,从而起到抑制病毒复制的作用.拉米夫定的临床试验结果表明,拉米夫定可明显抑制HBV的复制,进而达到控制炎症、稳定病情甚至阻止肝纤维化的进展.但对肝细胞内cccDNA无直接作用,而且他所抑制的HBV DNA多聚酶的活性在停药后又回复到原来的水平.因此其抑制病毒复制作用短暂,停药后易于复发,需要长期用药.但随着用药时间的延长,在药物和人体免疫选择压力下,可能产生耐药.体内外研究均已表明,拉米夫定耐药主要是由HBV P基因C区YMDD变异所引起.YMDD变异分为两种,一种是HBV P基因第550位氨基酸由蛋氨酸(methionine, M)突变为缬氨酸(valine, V),此乃YVDD变异,同时伴有528位的突变(核苷酸A⁶⁶⁹→C,使氨基酸由亮氨酸⁵²⁸→蛋氨酸);另一种是HBV P基因第550位氨基酸由M突变为异亮氨酸(isoleucine, I),此乃YIDD变异.这两种变异分别由HBV第739位碱基A→G和741位G→T突变所引起^[6-7].一旦出现YMDD变异株,对拉米夫定不再敏感.耐药可能会伴有HBV DNA定量反跳和肝功能变化,甚至导致病情恶化.de Man et al^[8]报道了1例肝移植术后HBV感染者,乙型肝炎免疫球蛋白治疗导致HBsAg逃避变异株,用泛昔洛韦治疗(500 mg 3次/d) 6 mo无效, P基因测序发现第513位氨基酸有异亮氨酸→亮氨酸的突

变,改用拉米夫定100 mg 1次/d, HBV DNA水平骤降,但拉米夫定治疗12 mo后HBV DNA复升,且发生重症肝炎,最后死亡.测序发现在YMDD区域附近有突变.因此在出现YMDD变异株后要密切监视患者病情变化,包括肝功能、HBV DNA定量等.如出现ALT明显升高,临床症状加重,则应停药.新出现的一些核苷类似药物如阿的福韦,对YMDD变异株仍然有效,将来上市后可以作为治疗这种变异株的有效药物^[9-10].

随着拉米夫定耐药株的出现,国内外研究者都在积极寻找检测他的有效方法.目前对变异株的检测与分析多采用RT-PCR产物测序法、错配PCR-RFLP及PCR-ELISA等^[11-13].这些方法存在着烦琐、费时、只能检测单个位点突变、不能提供全面的变异株情况等特点.基因芯片技术是近年来发展起来的高效分子诊断技术,已广泛应用于药物筛选,基因表达谱测定,多态性分析,新基因鉴定,测序,临床检测等领域的研究^[14-30].但该技术需专用仪器,不便推广使用.Uniarray技术是近年出现的又一检测YMDD变异的新技术,他是以UT-PCR(通用模板信号扩增技术)为基础的多基因/位点同时检测的阵列技术.UT-PCR是在Taqman荧光定量PCR基础上建立起来的新型PCR技术,主要是使用通用模板和通用荧光探针.通用引物由5'端的通用模板(UT)序列和3'的特异引物序列构成,通用模板序列不与任何天然核酸序列相匹配,只能与通用荧光探针匹配.通用荧光探针5'端标以荧光发射基团FAM标记,3'端以荧光淬灭基团TAMRA标记,由于距离相近,基团相互作用不产生荧光.该技术将各个被测基因位点的特异性UT引物置于标明的反应容器中,如微型试管中,利用UT-PCR的通用条件优势,在同一热循环中扩增和检测.他绕过了目前国际流行基因芯片技术需要大量的PCR预合成和核酸杂交等繁琐步骤,直接在阵列中进行成百上千个特异性的UT-PCR扩增检测反应,检测成本低,并且不需要特殊专用仪器.能够快速准确地检测出HBV耐药突变中临床最常见YMDD变异,并且能够与现在主流荧光实时PCR仪配合.因此UT-PCR和Uniarray的高灵敏、高特异、高精度度和高通量特点,在临床病原体检测、药效监测、突变分析以及相关科学研究领域中具有广阔的应用前景.

我们采用基因芯片法和Uniarray技术测定了40例拉米夫定治疗48 wk, HBV DNA仍为阳性的17例患者血清.共检出7例YMDD变异,其中5例为HBV DNA定量反跳者.提示YMDD变异与HBV DNA定量反跳密切相关,是HBV耐药的主要原因.对8例HBV DNA定量反跳者治疗前、治疗24、36、48 wk的系列血清进行了DNA定量检测,发现24 wk时DNA定量均下降,36 wk时有2例反跳,48 wk时有6例反跳,但仍低于治疗前基线水平,可能与变异病毒复制能力降低有关.基因芯片和Uniarray技术对YMDD变异检测结果基本相符.但

基因芯片能同时检测出多个点位的变异, 而且能检测出野生株和变异株共存, 即混合感染. 这种情况往往早于临床 HBV DNA 定量和肝功能的变化, 因此可以及早发现患者的病情变化. 同时, 如果检测结果由混合感染变为单一变异株或野生株, 也有利于指导临床是否再继续使用拉米夫定或停药改用其他药物. 随着拉米夫定的广泛和长期应用, 国内慢性乙肝患者中由此而引起 HBV YMDD 变异导致耐药、肝炎复发、以致发生病情恶化的问题会更引人关注. 因此, 临床上迫切需要一种简便、高效、成本较低的方法, 对应用拉米夫定治疗的患者进行动态监测, 以指导临床合理用药. Uniarray 检测技术的开发和应用, 期望能够解决这一问题.

4 参考文献

- 马红, 尤红, 尹珊珊, 贾继东, 王宝恩. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 2 年临床疗效. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;5:147-149
- Wakil SM, Kazim SN, Khan LA, Raisuddin S, Parvez MK, Guptan RC, Thakur V, Hasnain SE, Sarin SK. Prevalence and profile of mutations associated with lamivudine therapy in Indian patients with chronic hepatitis B in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2002;68:311-318
- Fischer KP, Gutfreund KS, Tyrrell DL. Lamivudine resistance in hepatitis B: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist Update* 2001;4:118-128
- Zoller B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in Hepatitis B virus subtypes adw. *Lancet* 2001;357:934-935
- Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- Niesters HG, Honkoop P, Haagsma EB, de Man RA, Schalm SW, Osterhaus AD. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis* 1998;177:1382-1385
- Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS. Mutation in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* 1998;28:1669-1673
- de Man RA, Bartholomeusz AI, Niesters HG, Zondervan PE, Locarnini SA. The sequential occurrence of viral mutations in a liver transplant recipient re-infected with hepatitis B: Hepatitis B immune globulin escape, famciclovir non-response, followed by lamivudine resistance resulting in graft loss. *J Hepatol* 1998;29:669-675
- 王小众, 陈运新, 马连生, 马景云, 潘伯荣. 中国慢性乙型肝炎抗病毒治疗的现状. 世界华人消化杂志 2002;10:745-748
- 侯金林, 孙剑. 乙型肝炎病毒核苷类似物耐药性监测和预防及其处理. 中华医学杂志 1999;79:806-807
- 孙剑, 侯金林, 王战会, 章廉, 骆抗先. 拉米夫定治疗中国乙型肝炎患者中发现 YMDD 耐药变异株. 解放军医学杂志 2000;25:11-13
- Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and take-over of YMDD motif mutant Hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and Re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-1716
- 郭宴海, 赵锦荣, 崔大祥, 阎小君. PCR-ELISA 检测血清 HBV 聚合酶 YMDD 基因变异. 第四军医大学学报 2002;23:347-350
- 杨守平, 胡德昌, 郑可飞, 孙小兵, 陶维玉, 马宁. 基因芯片检测拉米夫定治疗慢性乙型肝炎中 HBV YMDD 变异 25 例. 世界华人消化杂志 2002;10:1067-1068
- 李刚, 舒欣, 马会慧, 陈伟, 陈文思, 陈青, 江元森, 姚集鲁. 基因芯片技术检测 HBV HCV 及 HBV YMDD 变异株. 世界华人消化杂志 2003;11:178-181
- Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3022-3028
- Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shiota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001;120:955-966
- Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001;61:2129-2137
- Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J, Liu F, Huang QH, Cheng ZH, Li NG, Du JJ, Hu W, Shen KT, Lu G, Fu G, Zhong M, Xu SH, Gu WY, Huang W, Zhao XT, Hu GX, Gu JR, Chen Z, Han ZG. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15089-15094
- Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 2002;21:4855-4862
- Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40:2398-2407
- Bustin SA, Dorudi S. The value of microarray techniques for quantitative gene profiling in molecular diagnostics. *Trends Mol Med* 2002;8:269-272
- Shoemaker DD, Linsley PS. Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:334-337
- Wu CG, Salvay DM, Forgues M, Valerie G, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with Hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001;20:3674-3682
- Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- Wen WH, Bernstein L, Lescallett J, Beazer-Barclay Y, Sullivan-Halley J, White M, Press MF. Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res* 2000;60:2716-2722
- Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7382-7387
- Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T, Olesen SH, Andersen LD, Cordon-Cardo C, Orntoft TF. Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples. *Clin Chem* 2000;46:1555-1561
- Ishii M, Hashimoto S, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T, Aburatani H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. *Genomics* 2000;68:136-143
- 张建中, 黄英武, 刘冬梅, 杨利桃, 韩瑞刚, 王晋芬, 岳茂兴. 组织芯片技术的建立及其在大肠癌的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:157-160

SEN病毒核酸异质性及准种现象的观察

唐 蔚, 彭晓谋, 杨山麦, 王召钦, 王 辉, 蒋晓玲, 周伯平

唐蔚, 杨山麦, 王召钦, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平, 深圳市肝病研究所, 深圳市东湖医院 广东省深圳市 518020
彭晓谋, 中山大学附属第三医院传染病科 广东省广州市 510630
唐蔚, 女, 1970-01-25 生, 上海市人, 汉族. 1993 年复旦大学医学院(原上海医科大学)本科毕业, 2003-06 中山大学广州北校区硕士研究生毕业, 主治医师. 主要从事传染病的临床和科研工作. 发表论文 7 篇.
项目负责人: 唐蔚, 518020, 广东省深圳市布心路 2019 号, 深圳市肝病研究所, 深圳市东湖医院. viviantwei@hotmail.com
电话: 0755-25509800-3301 传真: 0755-25604034
收稿日期: 2003-06-10 接受日期: 2003-11-13

Demonstration of gene heterogeneity and quasispecies of SEN virus

Wei Tang, Xiao-Mou Peng, Shan-Mai Yang, Zhao-Qin Wang, Hui Wang, Xiao-Ling Jiang, Bo-Ping Zhou

Wei Tang, Shan-Mai Yang, Zhao-Qin Wang, Hui Wang, Xiao-Ling Jiang, Bo-Ping Zhou, Shenzhen Research Institute of Hepatology, Shenzhen East Lake Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China
Xiao-Mou Peng, Department of Infectious Disease, The Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dr. Wei Tang, Shenzhen Research Institute of Hepatology, Shenzhen East Lake Hospital, 2019 Buxin Rd, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. viviantwei@hotmail.com
Received: 2003-06-10 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To describe the gene heterogeneity and quasispecies of SEN virus.

METHODS: Three SEN virus subtype D or H positive sera from a SEN virus prevalence investigation in Shenzhen District were randomly selected and a nested-PCR were performed. 3 positive PCR products of each subtype were ligated into pMD18 T-vectors. 1-11 clones from every PCR product were randomly selected to be sequenced and aligned with SENV sequences retrieved from GeneBank representing strains from 4 different countries and district. Homology of nucleotide sequences were analysed and a phylogenetic tree was conducted.

RESULTS: 13 clones of SENV D and 3 of SENV H were sequenced and demonstrated to belong to SENV. 81.8% (9/11) clones from a single host SZ-54 were quasispecies. The nucleotide sequence homology of 15 SENV D clones (11 of Shenzhen and 4 retrieved from GeneBank representing 4 other countries and district) were 77.7-99.5%. The amount of mutated bases between each two of 9 clones from same host were 8.5 ± 5.2 , which was significantly different from that between each two of 11 clones from 3 hosts within Shenzhen district (28.9 ± 3.2) and that between each two of 15 clones from different hosts and districts (29.6 ± 7.8) ($P < 0.001$). The nucleotide sequence homology of 7 SENV H clones (3 of Shenzhen and 4 retrieved from GeneBank as described above) were 74.6-95.0%.

The phylogenetic tree shows that clones from same patient are more related to each other than from other patients and much closer than strains representing other countries and district.

CONCLUSION: There exist SENV quasispecies in SENV carriers. The heterogeneity of nucleic acid of SENV might be influenced by differences between hosts and regions. This unique characteristic should be taken in consideration when we detecting the virus, determining sequence mutation and even discussing its clinical implication.

Tang W, Peng XM, Yang SM, Wang ZQ, Wang H, Jiang XL, Zhou BP. Demonstration of gene heterogeneity and quasispecies of SEN virus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):604-606

摘要

目的: 报告SEN病毒核苷酸的异质性和准种特点.

方法: 取深圳地区SEN病毒流行病学调查得到的SENV D型或H型阳性血清各3份进行巢式PCR扩增, 阳性PCR产物克隆至T载体, 每份随机挑选1-11份阳性克隆进行分别测序, 并与GeneBank上的北京株、美国株、意大利株和日本株进行比较分析.

结果: 挑选的16株克隆中D型和H型分别为13株和3株, 均属于SENV序列. 来自SZ-54的11株SENV D型克隆中准种占81.8%(9/11). 本地3例患者的11株SENV D型阳性克隆与GeneBank的4株异地株, 共15株间的同源性为77.7-99.5%. 同一宿主9个克隆间的碱基变异个数为 8.5 ± 5.2 , 与同一地区不同宿主的11个克隆间的 28.9 ± 3.2 和不同地区不同宿主的15个克隆间的 29.6 ± 7.8 比较, 有显著性差异(P 均 <0.001). 3株SENV H型阳性克隆与GeneBank的4株异地株共7株间的同源性为74.6-95.0%. 进化分析表明, 来自同一宿主的分离株遗传关系最近, 同地区不同宿主的分离株其次, 与4株异地分离株的遗传距离较远.

结论: SENV核酸的变异性高, 个体间存在较大差异, 且在同一个感染者体内也存在大量SENV准种. 在检测SENV的方法选择、比较SENV的序列差异和分析SENV的临床意义时应充分考虑到SENV的这种特性.

唐蔚, 彭晓谋, 杨山麦, 王召钦, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平. SEN病毒核酸异质性及准种现象的观察. 世界华人消化杂志 2004;12(3):604-606

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/604.asp>

0 引言

自1997年日本学者Nishizawa et al^[1]首先从未知病原的

输血后肝炎患者血清中分离得到一种被称为TTV的病毒以来, 世界各地的学者做了大量的研究. 这是一组单链DNA病毒, 陆续报道有新的型别和种群如SANBAN病毒^[2]、YONBAN病毒^[3]、SEN病毒(SEN virus, SENV)^[4-5]、PM病毒(PM virus, PMV)^[6]等被分离. SENV有8个亚型^[7], 且感染率有显著的地区差异^[8], 本课题组对深圳地区进行SENV的流行病学调查^[9]时, 还显示该病毒核酸存在显著的个体差异. 为此, 本研究进一步探讨了SENV感染者体内的准种情况和意义.

1 材料和方法

1.1 材料 检测SENV D型或H型阳性的患者各3例均从流行情况调查^[9]中随机选出. SENV D型阳性的SZ-6、SZ-71和SZ-54均为慢性乙肝患者, 男2例, 女1例, 年龄23-47岁. SENV H型阳性的3例中SZ-18为慢性丙肝患者, SZ-41为慢性乙肝患者, SZ-44为非甲-戊型肝炎患者, 均为男性, 30-41岁. 诊断参照《病毒性肝炎防治方案》^[10].

1.2 方法 按照文献报道的步骤, 采用巢式PCR方法对6份血清进行PCR扩增, 产物经纯化后克隆至pMD-18 T载体中, 编号为SZ-54的标本挑选11个克隆外, 其余5份分别挑选1个克隆, 共16株, 完成阳性克隆鉴定、抽提纯化和测序, 获得DNA序列. 用Lasergene99和MegAlign软件先将SZ-54标本的11株克隆进行序列比对, 剔除相同的序列, 计算准种株的比例. 将剩余的SENV D型深圳株的克隆序列与GeneBank上公布的北京株、美国株、意大利株和日本株(Accession Number见表1)一起排序, 并列表进行同源性比较. 分别计算所有核苷酸序列之间碱基变异的个数, 列表并将数据分为同宿主组、同地区不同宿主组和不同地区不同宿主组, 组间数据用方差分析作统计学处理. 将3株SENV H型深圳株克隆序列与GeneBank上公布的北京株、美国株、意大利株和日本株(Accession Number见表1)一起排序, 并列图表进行同源性比较. 用MegAlign软件将所有SENV克隆序列14株, 连同GeneBank公布各国家地区SENV D型和H型代表株8株一起进行种系进化分析,

并作进化树图.

表1 GeneBank SENV 主要分离株

	SENV D	SENV H
北京株	AY072045	AY153769
美国株	AB075263	AB075283
意大利株	AX025730	AX025838
日本株	AB059352	AB059353

2 结果

SENV D型11株克隆与GeneBank来自北京、美国、意大利和日本的序列的排序图、同源性分析表和碱基变异个数统计表分别见图1、表2. SZ-54的11株克隆中, 有3株序列相同, 准种株9株占81.8%(9/11). 这9株克隆间的核苷酸同源性介于91.4-99.5%, SZ-6、SZ-54和SZ-71的11株克隆间的同源性为82.7-91.4%, 与北京、美国、意大利和日本的4株克隆间的同源性介于77.7-90.4%. 突变无明显热点.

如表2所示, 将克隆序列的碱基变异个数按宿主和地区再进行分组: 黄色区域代表同宿主组, 绿色区域为同地区不同宿主组, 蓝色区域为不同地区不同宿主组, 各组碱基变异个数的均值(个)分别为 8.5 ± 5.2 、 28.9 ± 3.2 和 29.6 ± 7.8 . 经方差分析, 同宿主组的碱基变异个数均数与同地区不同宿主组和不同地区不同宿主组相比, P值<0.001, 后两组相比, P>0.05. 表明SENV D型序列间有明显的个体差异.

SENV H型3株克隆与GeneBank来自北京、美国、意大利和日本的序列的排序图和同源性分析表. 深圳地区3个感染者的3株克隆间的同源性为89.5-95.0%, 来自深圳及北京、美国、意大利和日本的7株克隆间的同源性为74.6-90.6%. 突变无明显热点.

所有16株克隆序列与GeneBank来自北京、美国、意大利和日本的序列的进化分析树. 进化树分析进一步证实16株克隆分属SENV D型和H型, 同一宿主的分离株遗传关系最近, 同一地区不同宿主的分离株其次, 与4株异地分离株的遗传距离最远.

表2 SENV H型核苷酸序列同源性分析(%)

	AY153769	AB075283	AX025838	AB059353	SZ-18	SZ-41	SZ-44
AY153769	***	93.9	84.0	80.7	89.5	95.0	90.6
AB075283		***	89.0	85.6	85.6	90.1	84.5
AX025383			***	95.0	78.5	80.1	78.5
AB059353				***	74.6	77.3	77.3
SZ-18					***	95.0	89.5
SZ-41						***	95.0
SZ-44							***

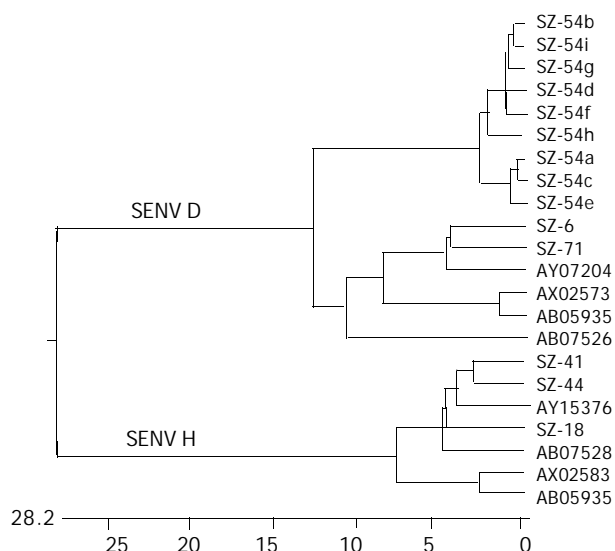


图1 SENV 进化分析树.

3 讨论

DNA 病毒的碱基突变率与基因组长度成反比, 环状病毒是最小的 DNA 病毒, 所以 SENV 碱基突变的速度也快. 日本学者 Takeji 比较了 2 例慢性 SENV-D 感染患者间隔 12 a 的系列血清 SENV 核酸序列^[11], 发现(1)在 SENV 的高突变区域(HVRs)的同义替代率远小于非同义替代率($d_s/d_n < 1$), 反映了出于免疫压力, 持续感染的变异株被选择出来, 以逃避宿主的免疫监控, 形成持续感染. (2) SENV D ORF1 和 ORF2 的同义替代率是 7.32×10^{-4} 位点/年, 与 RNA 病毒相似, 比 DNA 病毒高, 表明 SENV 在复制时基本无或仅有很低的校对功能. 以上研究合理地解释了 SENV 序列存在高度变异性的原因. 本研究显示, 同一感染者体内检测到不同的 SENV 序列属准种群, 与 HCV^[12-13]和 HIV^[14]等易形成准种的情况高度类似, 但准种的数量更多, 变异更大. SENV D型和H型的核苷酸序列存在明显的个体差异. 本研究虽然只运用了普通的 Taq DNA 聚合酶, 但其错配率为 10^{-3-4} , 而目的片段长度仅约 200 bp, 因此可排除由于 PCR 扩增的错配而导致的突变.

SENV 基因组核苷酸序列的高异质性特点, 是环状单链 DNA 病毒的共同特性^[5]. Takeji 估计, SENV 是通过宿主的 DNA 聚合酶系统进行无校正复制的, 因为在 SENV 基因组中缺少编码聚合酶的基因. 那么, SENV 的基因组可能是由功能相对不重要的基因如假基因等组成的, 这些基因比功能相关基因进化得快^[15]. 对 SENV 核苷酸异质性和准种现象的观察的意义在于我们选择检测 SENV 的方法、比较 SENV 的序列差异和分析 SENV 的临

床意义时应充分考虑到这种特性. 如选择检测方法时, 选择检测方时, 既要检测 SENV 总感染率, 也要对其进行型、株和准种的鉴定. 虽然从流行病学上分析, SENV 可能不具备致病性, 但目前尚不能排除个别型或株, 甚至部分准种存在致病性的可能性.

4 参考文献

- 1 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241: 92-97
- 2 Hijikata M, Takahashi K, Mishiho S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999;260:17-22
- 3 Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, Mishiho S. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* 2000;43:119-123
- 4 Primi D, Fiordalisi G. International patent number WO0028039 (<http://ep.espacenet.com/>)
- 5 Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, Alter HJ, Shih JW. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Infect Dis* 2001; 183:359-367
- 6 Hallett RL, Clewley JP, Bobet F, McKiernan PJ, Teo CG. Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J Gen Virol* 2000;81:2273-2279
- 7 Sottini A, Mattioli S, Fiordalisi G, Mantero G, Imberti L, Moratto D, Primi D. Molecular and biological characterization of SEN viruses: a family of viruses remotely related to the original TTV isolation. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. H. Margolis (Ed), Meditech Media, Atlanta. 2001
- 8 Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis* 2002;185:389-392
- 9 唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平. 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1540-1543
- 10 《病毒性肝炎防治方案》. *中华传染病杂志* 2001;19:56-64
- 11 Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K, Alter HJ, Shih JW. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus)(1). *FEBS Lett* 2002; 510:171-174
- 12 McAllister J, Casino C, Davidson F, Power J, Lawlor E, Yap PL, Simmonds P, Smith DB. Long-term evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus in a common-source-infected cohort. *J Virol* 1998;72:4893-4905
- 13 Smith DB, Simmonds P. Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol* 1997;45:238-246
- 14 Yamaguchi Y, Gojobori T. Evolutionary mechanisms and population dynamics of the third variable envelope region of HIV within single hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1264-1269
- 15 Li WH, Gojobori T, Nei M. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 1981;292:237-239

乙型肝炎病毒感染与血清自身抗体的相关性

周明欢, 欧 强, 谭德明

周明欢, 湘西自治州人民医院消化内科 湖南省吉首市 416000
欧强, 谭德明, 中南大学湘雅医院传染病研究所 湖南省长沙市 410008
周明欢, 1961-01-16, 湖南省凤凰县人, 苗族, 1983 年湖南医科大学本科毕业, 消化内科主任, 主任医师. 主要从事病毒性肝炎、肝硬化及胃肠病的研究. 湖南省湘西州自然科学基金资助项目, No. (2003)39
项目负责人: 周明欢, 410006, 湖南省吉首市, 湘西自治州人民医院消化内科.
电话: 0743-8267248
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-12-06

Relationship between HBV infection and autoantibodies

Ming-Huan Zhou, Qiang Ou, De-Ming Tan

Ming-Huan Zhou, Department of Gastroenterology, People Hospital, Xiangxi Autonomy State, Jishou 416000, Hunan Province, China
Qiang Ou, De-Ming Tan, Viral Hepatitis Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Xiangxi Autonomy State, Hunan Province. No. (2003)39
Correspondence to: Ming-Huan Zhou, Department of Gastroenterology, People Hospital, Xiangxi Autonomy State, Jishou 416000, Hunan Province, China.
Received: 2003-10-10 Accepted: 2003-12-06

Abstract

AIM: To investigate the relationship between infection of hepatitis B virus (HBV) and development of autoantibodies.

METHODS: HBV-DNA and HBVM were tested in 160 serum samples by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively. Anti-nuclear antibodies (ANA), an-double strain DNA antibodies. Ads-DNA Ab, thyroglobulin antibody and thyroid microsome antibody (TGA/TMA), rheumatoid factor (RF) were measured by using indirect immunofluorescent assay, radioimmunoassay, and immune emulsion agglutination respectively.

RESULTS: The positive rates of autoantibodies were significantly higher in patients with HBV infection compared to those in normal control (63.1% vs 20.8% $\chi^2=15.28$, $P<0.01$). The antibodies such as ANA and RF appeared frequently. There was no remarkably difference in the age and sex between autoantibodies positive and autoantibodies negative patients ($P>0.05$). Compared to HBV infected patients without autoantibodies, ALT and TBIL and the positive rates of HBV-DNA and the time of HBV infection significantly increased in patients with autoantibodies ($P<0.05$).

CONCLUSION: HBV infection can induce autoimmune reactions, resulting in production of autoantibodies. The autoimmune reaction has no connection with age and sex. It is in connection with the time of HBV infection, the positive rates of HBV-DNA and the liver dysfunction severity.

Zhou MH, Ou Q, Tan DM. Relationship between HBV infection and autoantibodies. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):607-609

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒感染与自身抗体的相关性.

方法: 采用 ELISA 法、荧光 PCR 法分别检测 160 例 HBV 感染者血清 HBV 标志物和 HBV-DNA. 采用间接免疫荧光法、金标法、放射免疫法、免疫乳胶凝集法分别检测所有研究对象的抗核抗体(ANA)、抗双链 DNA 抗体(Ads-DNA)、抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)、类风湿因子(RF).

结果: 160 例 HBV 感染者血清中检出多种自身抗体, 总检出率达 61.3%, 显著高于正常对照组($P<0.01$), 检出的自身抗体以 ANA, RF 多见, 滴度分布以低滴度为主. 自身抗体阳性和自身抗体阴性组年龄、性别并无明显差异($P>0.05$). 与自身抗体阴性组相比, 阳性组 HBV 感染者 ALT, TBIL 水平、HBV-DNA 定量的对数值、HBV-DNA 阳性检出率明显增高, HBV 感染史明显增长, 差异有显著性($P<0.05$).

结论: HBV 感染可引发自身免疫性反应, 导致多种自身抗体的产生. 这种自身免疫性反应与感染者的年龄、性别无关, 而与 HBV 感染史的长短、病毒的复制水平以及肝功能损害的程度有关.

周明欢, 欧强, 谭德明. 乙型肝炎病毒感染与血清自身抗体的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(3):607-609

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/607.asp>

0 引言

我国是慢性肝病的高发区^[1-6], 病毒性肝炎占大多数^[7-10], 严重威胁着人们的身体健康. 乙肝慢性化及慢性肝炎炎症变的发生机制是多年来肝病研究的重点^[11-12]. 慢性病毒性肝炎患者(主要是乙型、丙型)血清中存在多种自身免疫性抗体, 与正常人相比有显著性差异^[13-20]. 自身免疫在病毒性肝炎发病机制、病情转归及癌变中的作用正日趋受到人们的重视. 为进一步探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染后引发自身免疫反应的机制及自身抗体对肝脏功能损害的病理意义, 我们检测了 HBV 感染者 160 例血清中的有关自身抗体, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我科 2003-01/2003-06 门诊和住院 HBV 感染者 160 例, 男 103 例, 女 57 例, 年龄 14-68 岁; 其中无症状病毒携带者 30 例, 慢性乙肝 48 例, 慢性重型乙肝 67 例, 乙肝肝硬化 15 例. HBV 感染的诊断根据血清

HBV 标志物和 HBV-DNA 测定, 所有病例均符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》诊断标准^[21]. 重叠有甲、丙、戊肝病毒或庚肝病毒(HGV)感染, 及合并有其他严重疾病的患者均从研究对象中去除. 所有病例近 3 mo 内未使用免疫调节剂. 随机选择健康献血员 24 名作为正常对照, 均已除外肝炎病毒感染. 清晨采集受检者空腹静脉血 4 ml, 分离血清, -20 °C 保存备用.

1.2 方法 使用 ELISA 法检测血清 HBV 标志物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HbcAb). 试剂盒购于洛阳华美生物工程公司. 严格按说明书操作, 结果由酶标仪测定. 采用核酸扩增技术(PCR)结合荧光标记探针杂交方法检测 HBV-DNA, 试剂盒购于上海申友生物技术有限公司. 取裂解缓冲液 20 μ L 加入离心管后, 分别加入血清标本, 阴性对照、阳性对照、临界对照液 20 μ L, 混匀. 开水浴 10 min, 1 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 μ L 做 PCR 反应. 荧光实时定量 PCR 反应在 Icyler 仪中进行. 参比品分别设定 3×10^{11} , 3×10^{10} , 3×10^9 , 3×10^8 拷贝/L 以绘制标准曲线. 结果判断: 大于 10^7 拷贝/L 为 HBV-DNA 阳性. 血清谷丙转氨酶(ALT)测定采用赖氏法, 总胆红素(TBIL)测定采用 Jendrassick-Groff 法, 试剂均购自上海荣盛生物试剂厂, 按说明书严格操作. 抗核抗体(ANA)测定采用间接免疫荧光法, 大鼠肝抗原片由本院免疫室制备, 羊抗人 IgG 荧光抗体购自卫生部上海生物制品研究所. 将待测血清用 PH7.2PBS 缓冲液按 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 稀释, 分别加入抗原基质片上, 内置 37 °C 水浴箱孵育 30 min, 取出放入染色缸中用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 吸水纸吸干, 加入荧光抗体, 室温孵育 30 min, PBS 缓冲液洗片 3 次, 以甘油缓冲液封片, 荧光显微镜镜下观察. 抗双链 DNA 抗体(Ads-DNA)测定采用金标斑点渗滤法, 试剂购自福建三强生物技术公司. 将反应板回温到 35 °C, 滴加 100 μ L 试剂 B 于反应孔中使其完全渗入. 滴加待测血清 100 μ L 于反应孔中待完全渗入后再加入 150 μ L 试剂 A, 最后滴加 100 μ L 试剂 B 于反应孔中, 2min 后观察结果. 抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)测定采用放射免疫法, 试剂购自卫生部上海生物制品研究所. 将 125 I-TG 和 125 I-TM 各 100 μ L 分别加入 T 管和待测管, 加 20 μ L 待测血清和 200 μ L 缓冲液于待测管中, 然后将两管摇匀, 37 °C 孵育 60 min, 再加入分离试剂 TMAB, TGAB, 摇匀, 室温 30 min 3 500 r/min, 离心 15 min, 吸上清液, 测 T 管和待测管沉淀. 类风湿因子(RF)采用免疫乳胶凝集法测定, 试剂购自上海伊华医学科技有限公司. 将待测血清用生理盐水 1:20 稀释后, 加 50 μ L 于玻璃板上, 滴加一滴胶乳试剂, 充分摇匀, 3 min 后观察结果, 凝集为阳性.

统计学处理 HBV-DNA 定量结果采用对数平均值来计算, 阴性作 0 计算; 计量资料以 mean \pm SD 表示, 采用组间均数 t 检验; 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验. 所有数据均在计算机中经 SPSS10.0 统计软件处理.

2 结果

2.1 HBV 感染者自身抗体在 HBV 感染者 160 例中有 101 例检出至少一种以上的自身抗体, 自身抗体总检出率达 63.1%, 显著高于正常对照组(63.1% vs 20.8% $\chi^2=15.28$, $^aP < 0.01$). 慢性乙肝、慢性重型乙肝、乙肝肝硬化组自身抗体检出率分别为 66.7%, 68.7% 和 73.3%, 均显著高于 HBV 健康携带者($^bP < 0.01$), 但三组间自身抗体检出率比较无统计学意义($P > 0.05$ 表 1). HBV 感染者血清中检出的自身抗体以 ANA 和 RF 多见, 滴度分布以低滴度为主. 59 例 ANA 阳性者检出 1:40 者 50 例, 1:80 者 6 例, 1:160 者有 2 例, 1:320 者 1 例.

表 1 HBV 感染者与正常对照组血清自身抗体检测结果

分组	n	总阳性(%)	ANA	Ads-DNA	RF	TGA	TMA
正常对照组	24	5 (20.8)	5	0	0	1	2
HBV 感染者	160	101 (63.1)	59	1	36	18	18
HBV 健康携带者	30	12 (40.0)	10	0	2	2	1
慢性乙肝	48	32 (66.7)	22	0	13	5	6
重型乙肝	67	46 (68.7)	21	1	17	10	10
乙肝肝硬化	15	11 (73.3)	6	0	4	1	1

ANA: 抗核抗体; Ads-DNA: 抗双链 DNA 抗体; TGA/TMA: 抗甲状腺球蛋白抗体 / 抗甲状腺微粒体抗体; RF: 类风湿因子.

2.2 HBV 感染者自身抗体与病情 自身抗体阳性和自身抗体阴性组年龄、性别均无明显差异($P > 0.05$). 与自身抗体阴性组相比, 阳性组 HBV 感染者 ALT, TBIL 水平明显增高, HBV 感染史明显增长, 差异有显著性($^aP < 0.05$ 表 2).

表 2 HBV 感染者自身抗体与病情的相关性

自身抗体	n	年龄(岁)	(男/女)	病程(a)	ALT(μ kat/L)	TBIL(μ mol/L)
阳性	101	36.3 \pm 10.8	88/13	8.4 \pm 5.9 ^a	4.2 \pm 4.8 ^a	242 \pm 236 ^a
阴性	59	38.4 \pm 10.4	45/14	2.5 \pm 2.3	2.5 \pm 3.9	155 \pm 221

^a $P < 0.05$ vs 阴性.

2.3 HBV 感染者自身抗体与病毒负荷量 自身抗体阳性 101 例 HBV 感染者中有 70 例检出 HBV-DNA 阳性, 阳性率为 69.3%, 59 例自身抗体阴性的 HBV 感染者检出 HBV-DNA 阳性 27 例, 阳性率为 49.2%, 两组 HBV-DNA 阳性检出率比较有显著性差异($\chi^2=6.41$, $^aP < 0.05$), 两组 HBV-DNA 定量的对数均值比较差异有显著性(5.8 ± 1.4 vs 3.7 ± 1.3 $^bP < 0.01$).

3 讨论

HBV 感染的致病机制非常复杂. 目前认为 HBV 感染后的肝组织损伤并非 HBV 在肝细胞内复制繁殖直接作用的结果, 而是机体一系列免疫反应造成肝细胞的病理免疫损害. 这种乙肝免疫损伤包括细胞介导的免疫损

伤、免疫复合物引起的免疫损伤及自身免疫反应引起的免疫损伤。自身免疫是针对自身成分的抗体或细胞性免疫效应的现象, 是机体对自身组织成分的免疫应答过于亢进的表现。国内外学者近年来发现HBV感染存在各种自身免疫现象, 主要表现为血清中检测出各种自身抗体, 自身免疫在乙型肝炎发病机制中的作用越来越受到了人们的重视。

我们在HBV感染者血清中检出多种自身抗体, 总检出率显著高于正常对照组($P < 0.001$), 检出的自身抗体以ANA、RF多见, 滴度分布以低滴度为主, 与文献报道基本一致。研究结果显示, HBV感染可引发自身免疫性反应, 导致机体自身免疫紊乱。其可能机制为: (1) 肝炎病毒感染诱导自身抗原修饰, 从而激发自身免疫; (2) 肝炎病毒感染导致控制自身免疫的机制紊乱; (3) 肝炎病毒抗原与机体自身抗原之间的分子模拟。TMA/TGA是甲状腺特异性自身抗体, 本组106例HBV感染者中, 36例TMA/TGA阳性, 与正常组相比 $P < 0.01$, 提示HBV感染能促进甲状腺自身抗体的产生, 推测可能原因是甲状腺组织成分与HCV结构有部分相似性, 但不排除HBV感染直接导致自身免疫性甲状腺疾病, 有待进一步研究证实。我们还观察到出现临床症状的HBV感染者包括慢性乙肝、慢性重型乙肝、乙肝肝硬化三组自身抗体检出率均显著高于HBV健康携带者($P < 0.01$), 提示自身抗体的出现可能加剧肝脏的病理损害, 自身免疫在乙型肝炎肝细胞损伤中起重要作用。

为进一步明确HBV感染者血清自身抗体存在的临床意义, 我们详细询问了所有HBV感染者的病史并检测了肝功能, 发现自身抗体阳性和自身抗体阴性组年龄、性别并无明显差异。与自身抗体阴性组相比, 阳性组HBV感染者ALT、TBIL水平显著增高, HBV感染史明显增长, 说明HBV感染后引发的自身免疫性反应与感染者的年龄、男女性别间的免疫差异无关, 而与HBV感染史的长短和肝功能损害的程度有关。HBV感染史长及肝功能损害明显的HBV感染者自身抗体阳性率相对较高, 机体自身免疫现象更为明显。上述结果进一步证实HBV感染后的自身免疫反应可引起肝功能损害, 是乙型肝炎的重要发病机制之一。值得提出的是在乙型肝炎中检出的自身抗体大多滴度较低, 不会引发自身免疫性疾病。对于滴度明显偏高且肝功能损害严重的乙型肝炎患者应怀疑重叠自身免疫性肝病的可能。本组检出ANA阳性1:160者2例, 均为慢性重型乙肝患者, 后完善相关检查确诊1例重叠自身免疫性肝炎; ANA 1:320者1例, 为乙肝肝硬化, 后查抗线粒体抗体(AMA)阳性证实合并原发性胆汁性肝硬化。

慢性丙型肝炎存在与HCV复制有关的自身免疫现象^[21]。我们采用核酸扩增技术(PCR)结合荧光标记探针杂交方法定量检测了160例HBV感染者的HBV-DNA, 发现自身抗体阳性组的HBV-DNA阳性率明显高于自身抗体阴性组, 且两组HBV-DNA定量的对数值比较

有显著性差异。这说明自身抗体的出现与HBV在体内的活跃复制有关, HBV复制可促进自身免疫, 最终加重肝脏的病理损害。

总之, HBV感染与自身免疫密切相关。HBV感染引发的自身免疫性反应与感染者的年龄、性别无关, 而与HBV感染史的长短、病毒的复制水平以及肝功能损害的程度有关。自身免疫是乙型肝炎的重要发病机制之一。我们认为, 乙肝患者检出自身抗体阳性, 提示机体免疫紊乱明显, 可在保肝、抗病毒治疗的基础上加用免疫调节剂治疗。对于检出高滴度自身抗体的乙肝患者还要高度警惕重叠自身免疫性疾病可能。

4 参考文献:

- 1 李兰娟, 吴仲文. 重视肠道微生态变化在慢性肝病中作用的研究. 中国微生态学杂志 2002;14:63-64
- 2 李异玲, 傅宝玉. 慢性肝病的治疗. 辽宁药物与临床 2003;6:113-117
- 3 金仙玉, 张新宇. 乙型肝炎病毒母婴传播及其预防的研究现状. 中华围产医学杂志 2000;3:258-260
- 4 屠小卿, 仲人前, 范列英, 朱烨, 薛葛, 叶伟民. 自身免疫性肝病患者自身抗体的分析. 上海医学检验杂志 2002;17:349-351
- 5 姬新颖, 付恩清, 白雪帆, 王海涛, 杨为松. 新型肝炎病毒TTV的研究进展. 微生物学免疫学进展 2000;28:53-59
- 6 齐名, 熊华, 刘新钰, 吴引伟, 李鹤林, 李保全, 宗永兰, 邵海枫. 不同基因型丙型肝炎病毒感染者的自身免疫表现. 临床检验杂志 2002;20:8-10
- 7 李健, 倪季军. 乙型肝炎病毒母婴传播问题探讨. 厦门大学学报 2000;39:869-871
- 8 陈勇, 洪艳, 杨连华, 倪崖, 陈念良, 凌志强, 俞为群, 毛江森. 中国五省市甲型肝炎病毒基因分型的研究. 病毒学报 2000;16:309-311
- 9 霍艳英, 徐德忠, 赵小宁, 李如琳, 刘蓬勃, 王全楚, 王歆. 西安和郑州地区丙型肝炎患者的HCV基因分型. 第四军医大学学报 2002;23:749-751
- 10 佟玉品, 詹美云, 毕胜利. 戊型肝炎病毒分子生物学及疫苗研究进展. 病毒学报 2002;18:93-96
- 11 范列英, 仲人前, 孔宪涛, 徐玲玲, 薛葛. 慢性肝炎与肝癌患者血清中肝特异性自身抗体的差异分析. 上海医学 2000;23:279-281
- 12 张春英, 全文斌, 冯百芳, 王琰, 陶其敏. 抗-HBs基因水平的研究. 中华微生物和免疫学杂志 1997;17:284-286
- 13 McMurray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26:689-701
- 14 Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttig B, Manns M, Bonkovsky HL. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;21:613-619
- 15 Unal F, Genel F, Ozgenc F, Aksu G, Aydogdu S, Kutukculer N, Yagci RV. Immune status and autoantibody formation in children with chronic hepatitis B infection. *Panminerva Med* 2002;44:353-357
- 16 范列英, 仲人前, 孔宪涛, 薛葛, 徐玲玲. 慢性乙型肝炎患者血清中肝特异性自身抗体的检测. 第二军医大学学报 2000;21:309-312
- 17 Jablonska J, Zabek J, Kozłowska J, Cianciara J. Immunological disorders in patients with chronic viral hepatitis type C. *Przegl Epidemiol* 2001;55:459-464
- 18 Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi N, Matsushima H, Kawashima Y, Hankins RW, Miyakawa H. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and -positive patients. *J Autoimmun* 2001;17:243-249
- 19 Squadrito G, Previti M, Lenzi M, Le Rose EP, Caccamo G, Restuccia T, Di Cesare E, Pollicino T, Raimondo G. High prevalence of non-organ-specific autoantibodies in hepatitis C virus-infected cirrhotic patients from southern Italy. *Dig Dis Sci* 2003;48:349-353
- 20 Liu WE, Tan DM, Zhang Z. A study of the autoimmune pathogenesis of chronic HCV infection. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2000;25:367-370
- 21 刘文恩, 谭德明, 范学工, 欧阳颖, 张铮. 丙型病毒性肝炎发病机制中自身免疫反应的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:120-121

IFN 治疗慢性丙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞 HCV 的变化

付丽娟, 吕淑兰, 程险峰, 王晓燕

付丽娟, 吕淑兰, 王晓燕, 哈尔滨医科大学附属第二医院传染科 黑龙江省哈尔滨市 150076
程险峰, 黑龙江省医院南岗分院 黑龙江省哈尔滨市 150001
付丽娟, 女, 1974-08-24 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2001 年哈尔滨医科大学硕士研究生, 主要从事丙型病毒性肝炎的研究。
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. GC02C159
项目负责人: 吕淑兰, 150076, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院传染科。lijuan_fu_8@hotmail.com
电话: 0451-86605614
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-16

Alterations of HCV in peripheral blood mononuclear cells from IFN-treated patients with chronic HCV RNA infection

Li-Juan Fu, Shu-Lan Lü, Xian-Feng Cheng, Xiao-Yan Wang

Li-Juan Fu, Shu-Lan Lü, Xiao-Yan Wang, Department of Infectious Diseases, The Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China
Xian-Feng Cheng, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by the Provincial Natural Science Foundation of Heilongjiang, No. GC02C159
Correspondence to: Dr. Shu-Lan Lü, Department of Infectious Diseases, The Second Hospital of Harbin Medical University, 456 Xuefu Street, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China. lijuan_fu_8@hotmail.com
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To study HCV RNA and HCV protein expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and to evaluate the therapeutic efficacy of alpha 2b interferon on the treatment of HCV RNA in PBMC of patients with chronic hepatitis C.

METHODS: Fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect the quantitation of HCV RNA in PBMC and plasma, and immunohistochemistry assay was applied to identify HCV NS3 protein expression in PBMC from 20 patients with chronic hepatitis C; Eight patients with chronic hepatitis C received IFN therapy (5 MU/d, three times/week for 16 weeks). HCV RNA load in plasma and PBMC was tested with a quantitative assay before and after treatment for 16 weeks and compared with that of the control. The data were analyzed by Wilcoxon 2-sample test and Fisher's exact test.

RESULTS: HCV RNA in plasma was found in 15 of 20 (75 %) chronic hepatitis C patients and in PBMC was found in 9 of 20 (45%) by fluorescence quantitative RT-PCR. HCV NS3 protein expression was found in 7 of 20 (35%) chronic hepatitis C patients by immunohistochemical assay. HCV RNA loads in PBMC was uncorrelated with those in plasma. In 8 patients, but there are significant differences of the decreasing of HCV-RNA loads in plasma and PBMC between before and after interferon treatment for 16 weeks ($^aP =$

0.0 017, $^bP = 0.0 059$). The loads of HCV in plasma and PBMC in patients were significantly lower than that of controls after interferon treatment for 16 weeks ($^cP = 0.0 042$, $^dP = 0.0 155$).

CONCLUSION: HCV can infect, replicate and express in PBMC. HCV RNA loads in PBMC is uncorrelated with those in plasma. HCV RNA in PBMC could be clean out by alpha 2b interferon treatment.

Fu LJ, Lü SL, Cheng XF, Wang XY. Alterations of HCV in peripheral blood mononuclear cells from IFN-treated patients with chronic HCV RNA infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):610-613

摘要

目的: 应用荧光定量反转录多聚酶链反应技术(RT-PCR)及免疫组化技术研究慢性丙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)丙型肝炎病毒感染并评价干扰素对外周血单个核细胞中HCV的作用。

方法: 20 例慢性丙型病毒性肝炎患者血浆、PBMC 中的 HCV RNA 含量应用荧光定量 RT-PCR 检测, 应用免疫组化技术检测 HCV NS3 在 PBMC 中的表达; 荧光定量 RT-PCR 法检测 8 例血浆及 PBMC 均阳性患者接受 α -2b 干扰素治疗; 对照组 6 例血浆及 PBMC 荧光定量 RT-PCR 法检测均阳性, 未用干扰素治疗。比较治疗前后用药组与对照组血浆及 PBMC 中 HCV RNA 载量变化。应用双侧 Wilcoxon 秩和检验(wilcoxon 2-sample test), 确切概率法(fisher's exact test)进行分析。

结果: 20 例中荧光定量 RT-PCR 检出血浆 15 例、PBMC 9 例阳性; 免疫组化法检出 7 例 PBMC 阳性。应用确切概率法分析 PBMC 感染 HCV RNA 与血浆中病毒水平无相关性 ($P = 0.319$)。8 例患者接受干扰素治疗后其血浆及 PBMC 中 HCV RNA 载量均下降, 与治疗前相比有显著性差异 ($^aP = 0.0 017$, $^bP = 0.0 059$); 与对照组相比治疗后差异有显著性 ($^cP = 0.0 042$, $^dP = 0.0 155$)。

结论: PBMC 是丙型肝炎病毒肝外复制并表达的场所。PBMC 感染 HCV RNA 病毒载量与血浆病毒水平无关。干扰素对 PBMC 感染的 HCV RNA 有清除作用。

付丽娟, 吕淑兰, 程险峰, 王晓燕. IFN 治疗慢性丙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞 HCV 的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):610-613
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/610.asp>

0 引言

丙型肝炎是威胁人类健康的全球性疾病^[1-8], 50-70% 会导致慢性化, 最终发展致肝硬化^[9-11], 并与原发性肝癌的发病关系密切^[12-15]. 丙型肝炎病毒慢性化机制尚不清楚, 众多学者认为丙型肝炎病毒感染外周血单个核细胞、甲状腺、胰腺、骨髓、脑脊液、脾脏等肝外组织可能与其慢性化机制相关, 其中以感染外周血单个核细胞与其慢性化机制关系最为密切^[16-17]. 检测 PBMC 中 HCV RNA 正链及 HCV RNA 负链只表明 HCV-RNA 的存在, 不能说明病毒载量的变化. 因此我们应用荧光定量 RT-PCR 方法检测 PBMC 中 HCV RNA, 并对干扰素治疗前后病毒载量的变化进行分析, 从而进一步探讨 HCV-RNA 感染 PBMC 的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者 20 例, 男 16 例, 女 4 例, 年龄 39.5 ± 16.5 岁. 诊断标准符合 2000-09 西安传染病与寄生虫病学术会议修订标准. 所有病例抗 HCV(+), ALT(160 ± 100 u/L), TBIL(12.3 ± 6.7 μ mol/L), 并排除其他类型肝炎, 无饮酒及服用肝损害药物史. 其中 8 例荧光定量 RT-PCR 法血浆及 PBMC 均阳性患者接受干扰素治疗, 5MU 隔日 1 次, 共 16 wk; 对照组 6 例血浆及 PBMC 均阳性, 未用干扰素治疗. 淋巴细胞分离液(购于中国医学科学院血液研究所)、Trizol 提取液(invitrogen 公司)、HCV 核酸扩增荧光检测试剂盒(购于达安公司)、NS3 mAb(购于北京病毒研究所)、SABC 免疫组化试剂盒(购于天津灏洋生物有限公司)、DAB 染色试剂盒(购于武汉博士德公司)、Roche LightCycler 荧光检测仪、高速离心机

1.2 方法 EDTA 抗凝静脉血 4 mL, 离心取血浆 0.5 mL 用于提取血浆 HCV-RNA, 剩余部分混匀应用淋巴细胞分离液梯度离心分离 PBMC. 生理盐水洗涤 2 次, 按文献^[18] 方法加胰酶及 RNA 酶以清除血浆 HCV RNA 污染. 洗涤定容 2 mL, 1 mL 用于滴片, 1 mL 离心沉淀用于 HCV RNA 提取. Trizol 提取液按说明操作提取 PBMC 总 RNA, 于无水乙醇中 -70 °C 冰箱保存. 两步法荧光定量试剂盒按说明操作, 荧光检测仪、软件定量分析. 琼脂糖凝胶电泳检测预期产物. 多聚赖氨酸预先处理玻片, PBMC 混悬液涂片, 丙酮固定, 双氧水甲醇溶液浸泡, 1 g/L Triton X-100 滴片, 抗 NS3mAb 滴片, 按 SABC 试剂盒、DAB 试剂盒说明操作. 设置正常对照、空白对照及 PBS 替代对照.

统计学处理 应用双侧 Wilcoxon 秩和检验(Wilcoxon 2-sample test), 确切概率法(fisher's exact test)进行数据分析.

2 结果

慢性丙型肝炎患者 20 例中荧光定量 RT-PCR 检出血浆 HCV 定量(4.42×10^5 - 1.05×10^{10} copy/L)15 例,

0 copy/L 5 例, 血浆阳性 15 例中 PBMC 检出 8 例(1.00×10^4 - 2.20×10^7 copy/L), 血浆阴性 5 例中 PBMC 检出 1 例(1.02×10^5 copy/L)并应用免疫组化法检测此例为阳性. 经统计分析 PBMC 中 HCV RNA 载量与血浆病毒水平无相关性($P=0.319$). 荧光定量 RT-PCR 检测血浆及 PBMC 均阳性 8 例患者接受干扰素治疗 16 wk 后其血浆及 PBMCs 中 HCV RNA 载量均下降, 与治疗前相比有显著性差异($^aP=0.0017$, $^bP=0.0059$), 与对照组相比治疗后血浆及 PBMC 中病毒载量差异有显著性($^cP=0.0042$, $^dP=0.00155$); 而血浆与 PBMC 中 HCV-RNA 载量评价干扰素疗效, 二者比较无显著性差.

应用免疫组化法检测 PBMC 中 HCVNS3 20 例阳性 7 例. 阳性产物成棕黄色, 细颗粒状, 不均匀或呈弥漫分布定位于胞质和胞膜(图 1、2).



图1 外周血单个核细胞免疫组化. HCV NS3 抗原阳性, 棕黄色物定位于胞质×400.

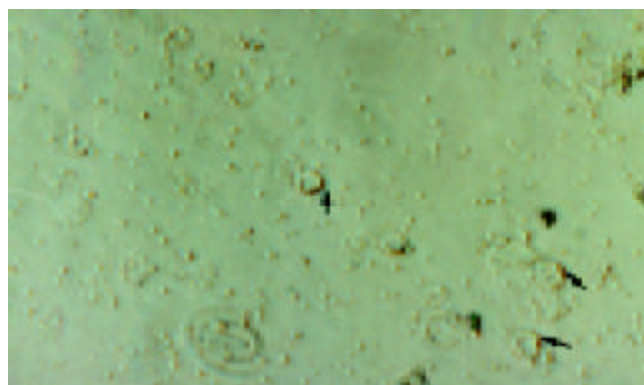


图2 外周血单个核细胞免疫组化. HCV NS3 抗原阳性, 棕黄色物定位于胞膜×400.

3 讨论

丙型肝炎是一种广泛威胁人类健康的疾病, 陈良标 et al^[18-21] 于 PBMC 中检测出完整病毒颗粒及 HCV-RNA 正负链, 表明 PBMC 是 HCV-RNA 肝外复制并表达的场所, HCV RNA 亦可在 PBMC 中持续存在^[22]. 但定性实验只能确定病毒的存在而不能对病毒复制的活跃程度进行分析, 因此我们应用荧光定量 RT-PCR 及免疫组化方法对 20 例慢性丙型肝炎患者进行检测. 其中血浆病毒载量检测出 75%, PBMC 检出 45%, 免疫

组化检出35%胞质及胞膜表达HCV NS3. 进一步证实丙型肝炎病毒可以感染慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞, 并在其中复制和表达. Meier et al^[23]认为是由于污染或被动吸附血浆中HCV RNA而导致PBMC检测HCV RNA阳性. 但是本实验经荧光定量RT-PCR检测血浆及PBMC中HCV RNA载量经Fisher's exact test, ($P=0.319$), 表明PBMC中HCV RNA与血浆载量无关. 本实验中1例患者血浆病毒载量为0copy/L, PBMC中检测出HCV RNA为(1.02×10^5 copy/L)并且免疫组化检出此例PBMC中HCV NS3表达阳性, 表明HCV RNA可独立感染慢性丙型肝炎患者外周血PBMC. 同时我们发现检测PBMC感染HCV RNA荧光定量RT-PCR法与免疫组化法灵敏度相比无显著性差异, 但荧光定量RT-PCR法操作简便、节省时间更适用于临床应用.

干扰素治疗慢性丙型肝炎现已被公认为是较为有效的药物, 临床已应用于检测血浆病毒载量作为评价干扰素疗效的指标之一. 本实验采用荧光定量RT-PCR检测干扰素治疗(16 wk)前后PBMC中及血浆中HCV-RNA病毒载量变化. 结果干扰素治疗后血浆及PBMC中病毒含量均有下降, 与治疗前及对照组相比有显著性差异, 表明干扰素对于PBMC内的HCV-RNA也有清除作用^[24-25]. 有研究表明慢性丙型肝炎患者PBMC感染HCV使CD4细胞比例减低, CD4/CD8比值降低甚至倒置^[26], 从而影响机体细胞免疫机制, HCV RNA感染亦可引起机体细胞因子(IL, TNF等)失调, 使机体清除病毒能力降低, 导致病毒持续感染^[27]. 而干扰素具有抗病毒和调节免疫双重功能, 探讨干扰素对慢性丙型肝炎患者外周血PBMC中HCV RNA清除的机制: (1)有研究表明干扰素可使CD4细胞增多从而增强机体的细胞免疫反应, 促使分泌IL-2、 γ -IFN增加、IL-12降低, 从而增强了Th2细胞效应提高机体的抗病毒能力^[28-30]. (2)干扰素可诱导PBMC双链RNA激活蛋白酶(PKR)mRNA及MxAmRNA表达生成抗病毒蛋白清除HCV RNA^[31]. 本实验表明监测PBMC中HCV-RNA载量可作为评价干扰素治疗效果指标之一, 因有报道复发病例中HCV RNA再现于PBMC中比血浆中早, 故亦可作为干扰素治疗后复发的监测指标^[32]. 但HCV RNA感染PBMC对于干扰素治疗效果的影响尚需结合病毒基因型、HCV-RNA水平、及HCV变异株等进一步研究^[33-34].

总之, 应用荧光定量RT-PCR方法可证实HCV RNA可感染PBMC, 与免疫组化方法相比敏感性无差异, 但更适用于临床应用. 虽然应用荧光定量RT-PCR方法证实干扰素对PBMC中感染的HCV RNA有近期的清除作用, 但对远期的治疗效果尚需进一步随访观察.

4 参考文献

- Sherriff LC, Mayon-White RT. A survey of hepatitis C prevalence amongst the homeless community of Oxford. *J Public Health Med* 2003;25:358-361
- Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M. Analysis of approach to therapy for chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan. *Hepatol Res* 2004;28:30-35
- Fleckenstein J. Chronic hepatitis C in African Americans and other minority groups. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:66-70
- Poynard T, Yuen MF, Ratzin V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100
- Mohan P, Chandra RS, Kleiner DE, Luban NL. An unusual presentation of perinatally transmitted hepatitis C. *Arch Dis Child* 2003;88:160-161
- Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003;13:57-68
- Strickland GT, Elhefni H, Salman T, Waked I, Abdel-Hamid M, Mikhail NN, Esmat G, Fix A. Role of hepatitis C infection in chronic liver disease in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:436-442
- Laufs R, Polywka S, Feucht HH, Schroter M, Zollner B, Oehler G. Hepatitis C. Virology, transmission modes, clinical aspects, prevention and therapy. *Anaesthesist* 2002;51:884-889
- Chopra KB, Demetris AJ, Blakolmer K, Dvorchik I, Laskus T, Wang LF, Araya VR, Dodson F, Fung JJ, Rakela J, Vargas HE. Progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2003;76:1487-1491
- Puoti C, Castellacci R, Bellis L, Montagnese R, Corvisieri P, Festuccia P, Mellozzi M, Villani AR. Hepatitis C virus RNA quantitation in hepatic veins and peripheral blood in patients with liver cirrhosis: evidence for low level intrahepatic hepatitis C virus replication in advanced liver disease. *Dig Liver Dis* 2002;34:802-807
- Costa LB, Ferraz ML, Perez RM, Ferreira AS, Matos CA, Lanzoni VP, Silva AE. Effect of host-related factors on the intensity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Braz J Infect Dis* 2002;6:219-224
- Nagao Y, Tanaka K, Kobayashi K, Kumashiro R, Sata M. A cohort study of chronic liver disease in an HCV hyperendemic area of Japan: a prospective analysis for 12 years. *Int J Mol Med* 2004;13:257-265
- Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase dependent survival signalling cascade. *J Biol Chem* 2004;5
- Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Yoshikawa M, Sugiura N, Saisho H, Kondo F, Yukawa M. Metal contents in the liver of patients with chronic liver disease caused by hepatitis C virus. Reference to hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2003;65:323-330
- Persico M, Palmentieri B, Coppola L, Di Giacomo Russo G, De Marino F, De Sio I, Torella R. Occurrence of HCC in asymptomatic HCV-related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 2002;47:2407-2410
- Laskus T, Radkowsky M, Bednarska A, Wilkinson J, Adair D, Nowicki M, Nikolopoulou GB, Vargas H, Rakela J. Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *J Virol* 2002;76:10064-10068
- Li CP, Wang KX, Wang J, Pan BR. mL-2R, T cell subsets & hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:298-300
- 安萍, 陈良标, 田惠英, 陈佩兰, 李琳, 刘超英. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞丙型肝炎病毒检测及其意义. *中华内科杂志* 1999;11:737-739
- Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, He Y, Su XS. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9:291-294
- 陈良标, 陈佩兰, 安萍, 田惠英, 刘英超, 李琳. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞丙型肝炎病毒感染研究. *中华肝脏病杂志* 2000;5:266-268
- Mazur W, Mazurek U, Jurzak M, Wilczok T, Bulanowski Z, Gonciarz Z. Positive and negative strands of HCV-RNA in sera and peripheral blood mononuclear cells of chronically hemodialyzed patients. *Med Sci Monit* 2001;7: 108-115
- Chen L, Chen P, Fan G, Li L, Liu C. Localization of hepatitis C

- virus core protein in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells of hepatitis C patients. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:37-39
- 23 Meier V, Mihm S, Braun Wietzke P, Ramadori G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7:228-234
 - 24 Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Tsuchiya K, Hamano K, Kanazawa N, Itakura J, Miyake S, Sakai T. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001;34:377-384
 - 25 Trimoulet P, Bernard PH, de Ledinghen V, Oui B, Chene G, Saint-Marc Girardin MF, Dantin S, Couzigou P, Fleury H. Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferon-alpha. *Dig Dis Sci* 2000;45:175-181
 - 26 Wozniakowska-Gesicka T, Wisniewska-Ligier M, Kups J, Borowska-Rybus B, Sulat-Syncerek D, Grzegorzczak W. Influence of interferon-alpha therapy on the count and function of T lymphocytes in children with chronic hepatitis C. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;11:344-347
 - 27 Jia HY, Du J, Zhu SH, Ma YJ, Chen HY, Yang BS, Cai HF. The roles of serum IL-18, IL-10, TNF-alpha and sIL-2R in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2002; 1:378-382
 - 28 Piazzolla G, Tortorella C, Fiore G, Fanelli M, Pisconti A, Antonaci S. Interleukin-12 p40/p70 ratio and in vivo responsiveness to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:453-461
 - 29 Jia H, Du J, Zhu S, Ma Y, Cai H. Clinical observation of serum IL-18, IL-10 and sIL-2R levels in patients with chronic hepatitis C pre- and post antiviral treatment. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:605-608
 - 30 Mazur W, Mazurek U, Jurzak M, Wilczok T, Gonciarz M, Gonciarz Z. Short-term changes of serum IL-2 and IL-6 induced by interferon alpha-2b in patients with chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 2001;7(Suppl 1):151-156
 - 31 Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Nishimura Y, Inoue K, Ueda K, Tsuchiya K, Hamano K, Itakura J, Miyake S. Interferon-stimulated gene expression and hepatitis C viral dynamics during different interferon regimens. *J Hepatol* 2003; 39:421-427
 - 32 Trimoulet P, Bernard PH, de Ledinghen V, Oui B, Chene G, Saint-Marc Girardin MF, Dantin S, Couzigou P, Fleury H. Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferon-alpha. *Dig Dis Sci* 2000;45:175-181
 - 33 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽. 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:1135-1138
 - 34 张琳, 赵桂珍, 李颖, 石理兰. 慢性丙型肝炎患者干扰素治疗前后 HCV HVR1 准种的动态变化. *世界华人消化杂志* 2003;11:182-184

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.

乙肝病毒X基因真核表达载体的构建及人肝细胞株HL-7702 转染

陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众

陈红英, 张生君, 陈治新, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
唐南洪, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科 福建省福州市 350001
陈红英, 女, 1975-12-04 生, 福建省漳州市人, 汉族, 2001 年福建医科大学协和医院消化内科硕士生, 主要从事肝脏疾病研究。
项目负责人: 王小众, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科。drwangxz@pub6.fz.fj.cn
电话: 0591-3357896-8482
收稿日期: 2003-10-31 接受日期: 2003-12-08

Construction of hepatitis B virus X gene expression vector in eucaryotic cells and its transfection in HL-7702 cells

Hong-Ying Chen, Nan-Hong Tang, Sheng-Jun Zhang, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang

Hong-Ying Chen, Sheng-Jun Zhang, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Nan-Hong Tang, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Correspondence to: Dr. Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. drwangxz@pub6.fz.fj.cn
Received: 2003-10-31 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To establish a human hepatocyte cell line which can express hepatitis B virus (HBV) X gene.

METHODS: HBV X gene was obtained through PCR technology. After A-tailing added, X gene was connected into vector PUCmT. Vector PUCmT-X and PcDNA3 were digested with *EcoRI* and *HindIII*. The fragments of X and PcDNA3 were connected to establish reconstituted plasmid PcDNA3-X. Then PcDNA3-X and PcDNA3 were transfected into HL-7702 cells by lipid-mediated transfection. After selected with G418, HL-7702/HBx cells were analysed by the reverse transcription-PCR to confirm the steady expression of X gene in HL-7702.

RESULTS: Reconstituted plasmid PcDNA3-X included the anticipated fragment of HBV X gene was proved by auto-sequencing assay. RT-PCR analysis showed that reconstituted plasmid PcDNA3-X could express the X protein efficiently in HL-7702 cells.

CONCLUSION: Hepatocyte can express HBV X gene which is an ideal model to study the effect of HBV X gene on the development of hepatitis and hepatocellular carcinoma.

Chen HY, Tang NH, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Construction of hepatitis B virus X gene expression vector in eucaryotic cells and its transfection in HL-7702 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):614-617

摘要

目的: 构建表达乙肝病毒(HBV)X基因的人肝细胞株。

方法: 用 PCR 法扩增 HBV X 基因序列, 将其添 A 后连至 PUCmT 载体上, 用 *EcoI* 和 *HindIII* 双酶切 PUCmT-X 和 PcDNA3 载体, 连接酶切片段 PcDNA3 及 X 片段以构建重组质粒 PcDNA3-X。用脂质体转染法将 PcDNA3-X 及空质粒 PcDNA3 导入肝细胞 HL-7702 中, G418 选择培养, RT-PCR 鉴定其稳定表达。

结果: 已构建的 PcDNA3-X 经序列测定含有完整的 HBV X 基因片段, 转入 HL-7702 细胞后经 RT-PCR 证实该细胞有稳定表达 X 蛋白。

结论: 成功构建了表达 HBV X 基因的肝细胞株, 为进一步探讨 HBV X 基因在肝炎与肝癌发生中的作用提供了理想的实验模型。

陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众. 乙肝病毒 X 基因真核表达载体的构建及人肝细胞株 HL-7702 转染. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):614-617
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/614.asp>

0 引言

乙肝病毒(HBV)感染在我国较严重^[1-9], 已成为研究的热点。HBV X 基因是 HBV 基因组中最小的一个开放读码框架, 编码基因区位于 1 374-1 838 核苷酸之间, 其编码的 X 蛋白由 154 个氨基酸组成。目前认为 HBV X 基因及其产物在肝炎与肝癌的发生与发展中起重要的作用, 但具体机制尚未完全清楚^[10]。我们通过构建含 X 基因的真核表达载体并将其转染肝细胞 L02, 以建立稳定表达 HBV X 基因的人肝细胞株, 为进一步探讨 HBV X 基因在肝炎与肝癌(HCC)发生中的作用提供了理想的实验模型。

1 材料和方法

1.1 材料 Taq DNA 聚合酶、dNTP、胶回收试剂盒、添 A 试剂盒、PUCmT 载体与 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程服务有限公司; *EcoI* 和 *HindIII* 内切酶, T4DNA 连接酶, 质粒抽提试剂盒与脂质体转染试剂盒购自 Promega 公司; RNA 抽提试剂盒购自深圳生物晶美公司; PcDNA3 表达载体由本院风湿免疫研究所提供; 肝细胞株 HL-7702 和 E.coli DH5 α 由本院肝胆外科研究所

提供; 其余生化试剂均为国产或进口的分析纯试剂。

1.2 方法 表达载体的构建: X 基因扩增引物设计为上游: ATGCAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTACTG 和下游: TGC GAATTCTTAGGC AGAGGTGAAAAAGTTG, 由上海生工生物工程服务有限公司合成。用酚/氯仿抽提法从 HBV 感染患者血清中扩增出 X 基因片段。PCR 扩增采用 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 经 30 个循环。将 PCR 产物添 A 后与 PUCmT 载体连接, 将连接产物 PUCmT-X 转化入 E.coli DH5 α 中扩增, 抽提纯化 PUCmT-X 并测序。选择正向连接的克隆提取质粒, 经 Ecol I 和 Hind III 双酶切后连接于真核表达载体 PcDNA3, 构建 HBV X 基因真核表达载体 PcDNA3-X。经 PCR 和酶切方法确认为重组载体后由上海生工生物工程服务有限公司测定序列。酶切及连接方法参照分子克隆常规方法进行。将肝细胞株 HL-7702 培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DF 培养基 (DMEM : F12=3 : 1) 中。选择状态良好的对数生长早期肝细胞 HL-7702, 采用脂质体转染的方法(按脂质体转染试剂盒的说明书操作), 将重组质粒 PcDNA3-X 导入肝细胞 HL-7702 中, 同时将 PcDNA3 导入肝细胞 HL-7702 以作为空载体对照, 并以未进行基因转染的细胞为空白对照。转染细胞经 G418 600 mg/L 选择培养 2 wk 后, 挑取单克隆扩增鉴定。将转染有 PcDNA3-X, PcDNA3 的 HL-7702 分别命名为 HL-7702/HBx 和 HL-7702/PcDNA3。转染细胞 X 基因的鉴定: (1) 细胞基因组中目的基因的检测 DNA 抽提试剂盒提取 HL-7702/HBx 细胞的 DNA, 用 HBV X 基因的引物进行 PCR 扩增, 以 HL-7702/PcDNA3、HL-7702 细胞作对照。HBV X 基因扩增引物设计为上游: CCGTCTGTGCCTTCTCATCT 和下游: TAATCTCCTCCCCAACTCC。PCR 条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 35 s, 65 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 1 min, 经 32 个循环。(1) RT-PCR 鉴定 X 基因的表达。用 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA, 按试剂盒说明书进行 RT 反应, 取逆转录反应产物 5 μ L 作为模板, 用 HBV

X 基因的引物进行 PCR 扩增, 仍以 HL-7702/PcDNA3、HL-7702 细胞作对照。HBV X 基因的引物及 PCR 条件同上。

2 结果

2.1 HBV X 的基因克隆 应用 PCR 技术从 HBV 感染患者的血清中扩增出 HBV X 基因片段。特异性的电泳条带出现在 500 bp 左右, 与预计的 470 bp 相符(图 1)。

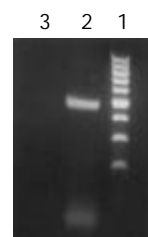


图 1 PCR 扩增出 HBV X 基因片段。1: 100 bp DNA ladder; 2: HBV X 基因阳性片段; 3: 阴性对照。

2.2 X 基因重组体的鉴定 PUCmT-X 测序结果示 X 基因正向插入 PUCmT 载体, 故选用 Ecol I 和 Hind III 双酶切 PUCmT-X 和 PcDNA3 载体。用 Ecol I 和 Hind III 对构建好的 PcDNA3-X 进行酶切分析, 以 PcDNA3 作对照, 电泳结果如预期, PcDNA3-X 酶切后出现 500 bp 左右的 X 酶切片段(图 2)。PcDNA3-X 的测序(图 1)与 X 基因序列比较表明 X 基因真核表达载体构建成功。

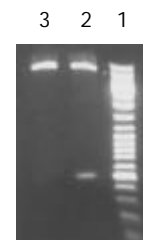


图 2 PcDNA3-x 双酶切鉴定结果。1: 1 Kb DNA ladder; 2: PcDNA3-x 双酶切产物; 3: PcDNA3 双酶切产物。

845 bases in 10174 scans

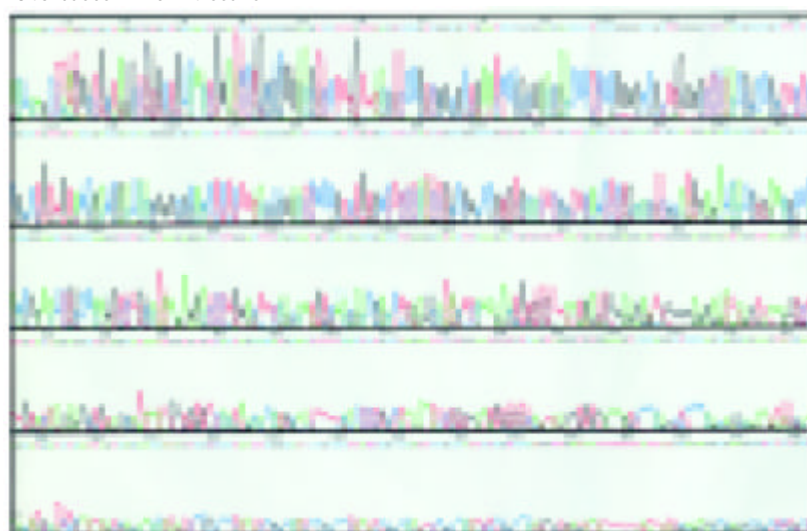


图 3 PcDNA3-X 的测序结果。

2.3 转染细胞 X 基因的鉴定 提取 HL-7702/HBx, HL-7702/PcDNA3, HL-7702 细胞的 DNA, 用 HBV X 基因的引物进行 PCR 扩增, HL-7702/HBx 细胞扩增出特异的 200 bp 左右的片段, 说明 HBV X 基因已整合到细胞的基因组中. 提取三组细胞 RNA, 经反转录合成 cDNA 后, PCR 扩增, 可见 HL-7702/HBx 细胞有 HBV X 基因 mRNA 表达(图 4). 表明 HBV X 基因已导入 HL-7702 细胞, 并有稳定表达.

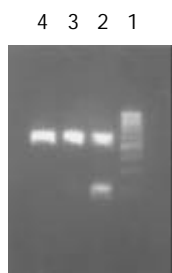


图 4 RT-PCR 检测 HL-7702 细胞 HBV X mRNA 转录. 1: 100 bp DNA ladder; 2: HL-7702/HBx; 3: HL-7702/PcDNA3; 4: HL-7702.

3 讨论

在我国, 乙型肝炎病毒(HBV)感染是引起 HCC 的主要病因之一^[11-17]. 流行病学调查表明, HBV 感染者 HCC 的发病率较对照人群高出 200 倍以上^[10-18]. 但 HBV 致 HCC 的具体机制一直未阐明. HBV X 基因的致癌作用已成了研究的热点. HBV X 基因的产物 X 蛋白大多存在于胞质中, 仅有一小部分在胞核内^[19]. 他是一种多功能蛋白^[20], 能作用于不同的目标(如: 转录因子, 细胞质激酶, 线粒体蛋白)^[21], 可能通过转录激活作用、抑制 DNA 的修复、调控肝细胞凋亡而诱发肝癌形成和促进肝癌发展的^[22]. 研究发现 HBV X 基因在少量表达时未显现出明显作用, 仅有当其表达产物积累到一定量, 聚集在一起时才起作用^[23]. 但 X 基因并非癌基因, 不含有特异致癌基因序列^[24]. 近几年来, 通过对转 HBV X 基因的肝细胞模型及小鼠动物模型的研究, 发现 HBV X 基因及产物 X 蛋白有以下生物学功能: (1)促进肝细胞凋亡, 诱导炎症的发生; (2)可与 P53 结合, 影响核苷的切补修复, 干扰细胞周期而促进肝癌细胞的增生^[25]; (3)作用于细胞因子和信号传导途径:上调 NF- κ B 的表达并转位于胞核内^[26-27]; 可激活^[28]并上调肝癌细胞表达 FasL; 能阻断 Bcl-2 介导的肝 Fas 途径的凋亡^[29]; 能使 Bid 的表达减少而阻断细胞凋亡^[30]; 可通过增加内源性激活因子 sn-1、2-DAG 短暂地激活 PKC^[31]; 可有效地抑制 TGF- β 引起的凋亡; 能激活 JNK 和 MAPK 信号传导途径^[32]; 能抑制 caspase3 的活性; 能通过下调 Sep 蛋白的表达而增加 TNF- α 的表达^[33]; (4)能引起线粒体膜电位的丢失而引发线粒体依赖性的细胞死亡^[34]; (5)能激活 IGF-IR 和 VEGF 基因的表达, 以促进肿瘤的生长与侵袭.

以上研究多以转 HBV X 基因的肝癌细胞株(如 HepG2、QG7701、HCC9204 等)和肝癌组织为对象, 探讨 HBV X 基因及其蛋白产物在肝癌细胞凋亡与增生

的信号传导通路、癌基因的激活等方面所起的作用, 以进一步揭示 HBV X 基因在 HBV 相关性 HCC 形成与发展中的意义. 而对于 X 基因及其产物在正常肝细胞中的作用报道甚少, 其影响尚未阐明. 因为这些研究的对象本身即为肝癌细胞, 故实验结果仅能说明 HBV X 基因在促进 HCC 发展中的作用, 而难以解释其诱发肝炎和 HCC 形成的作用. 理想的研究对象应为正常肝细胞, 将 X 基因导入正常的肝细胞, 观察转染后的肝细胞的形态与生物学功能的变化能较直观、较全面地了解 HBV X 基因的生物学功能. 我们以肝细胞 HL-7702 为研究对象, 利用 PcDNA3 载体将 HBV X 基因导入 HL-7702, 获得转 HBV X 基因的肝细胞株 HL-7702/HBx, 并用 PCR 和 RT-PCR 结果证明 HL-7702/HBx 基因组中有 HBV X 基因的整合, 且有 HBx mRNA 的转录表达. 说明 HL-7702/HBx 是可稳定表达 HBV X 基因的肝细胞株, 他为进一步探讨 HBV X 基因在肝炎和 HCC 发生、发展中的作用提供了一个理想的细胞模型.

4 参考文献

- Wang RX, Boland G, Guo Y, Lei SP, Yang CH, Chen J, Tian J, Wen JY, Du KH, van Hattum J, de Gast GC. Is a low dose of hepatitis B vaccine enough for a rapid vaccination scheme? *World J Gastroenterol* 2003;9:2353-2355
- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Cheng H, Zhang HZ, Shen WA, Liu YF, Ma FC. Expression of RNase H of human hepatitis B virus polymerase in *Escherichia coli*. *World J Gastroenterol* 2003;9:513-515
- Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol* 2004;10:82-85
- Bai YJ, Zhao JR, Lv GT, Zhang WH, Wang Y, Yan XJ. Rapid and high throughput detection of HBV YMDD mutants with fluorescence polarization. *World J Gastroenterol* 2003;9:2344-2347
- Wei J, Wang YQ, Lu ZM, Li GD, Wang Y, Zhang ZC. Detection of anti-preS1 antibodies for recovery of hepatitis B patients by immunoassay. *World J Gastroenterol* 2002;8:276-281
- Han HL, Lang ZW. Changes in serum and histology of patients with chronic hepatitis B after interferon alpha-2b treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:117-121
- Du DW, Jia ZS, Li GY, Zhou YY. HBV DNA vaccine with adjuvant cytokines induced specific immune responses against HBV infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:108-111
- 王小众, 陶其敏. 乙型肝炎 X 基因与肝癌. *世界华人消化杂志* 1999;7:1063-1064
- Garcia JM, Marugan RB, Garcia GM, Lindeman ML, Abete JF, Terron SD. TT virus infection in patients with chronic hepatitis B and response of TTV to lamivudine. *World J Gastroenterol* 2003;9:1261-1264
- Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X pro-

- tein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 14 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
 - 15 Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. P73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002;8:1094-1097
 - 16 Wang XZ, Chen XC, Chen YX, Zhang LJ, Li D, Chen FL, Chen ZX, Chen HY, Tao QM. Overexpression of HBxAg in hepatocellular carcinoma and its relationship with Fas/FasL system. *World J Gastroenterol* 2003;9:2671-2675
 - 17 Liu J, Li YH, Xue CF, Ding J, Gong WD, Zhao Y, Huang YX. Targeted ribonuclease can inhibit replication of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:295-299
 - 18 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
 - 19 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-660
 - 20 Jin YM, Yun C, Park C, Wang HJ, Cho H. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J Viral Hepat* 2001;8:322-330
 - 21 Birrer RB, Birrer D, Klavins JV. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:39-54
 - 22 陈红英, 王小众. HBV X 基因与肝细胞凋亡. 福建医科大学学报 2002;37:355-356
 - 23 Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1521-1524
 - 24 王小众, 陈治新, 李丹, 林建银. 肝癌及肝硬化患者血清 HBV X 基因异质性分析. 福建医科大学学报 2002;37:241-242
 - 25 Lin J, Zhu MH, Zhu S, Qu JH, Li FM, Ni CR. The role of hepatitis B virus X gene and p53 on hepatocellular carcinoma cell growth. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2003;32:43-47
 - 26 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
 - 27 Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers* 2001;17:153-157
 - 28 王小众, 陈晓春, 杨映红, 陈治新, 黄月红, 陶其敏. 肝癌患者 HbxAg 与 Fas/FasL 表达的研究. 癌症 2001;20:41-44
 - 29 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoœur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002;21:377-386
 - 30 Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer* 2001;37:1695-1702
 - 31 Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:189-205
 - 32 Oh JC, Jeong DL, Kim IK, Oh SH. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Exp Mol Med* 2003;35:301-309
 - 33 Yi YS, Park SG, Byeon SM, Kwon YG, Jung G. Hepatitis B virus X protein induces TNF-alpha expression via down-regulation of selenoprotein P in human hepatoma cell line, HepG2. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638:249-256
 - 34 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003;278:22071-22078

World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《World Journal of Gastroenterology, WJG》从 2003 年第 4-9 期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9 期共发表论文 322 篇, 其中 265 篇有点击和下载次数的记录, 占 82.29 %, 无点击和下载次数记录的为 57 篇(17.70 %). 2003-04-15/2003-10-13, 265 篇论文的点击次数为 35745, 平均每篇论文点击次数为 134.89, 最高点击次数为 1 918, 最低点击次数为 11. 其中每篇论文点击次数 100 次以上为 131 篇(49.43 %); 30-99 次为 123 篇(46.41 %); 11-29 次为 11 篇(4.15 %). 最高下载次数 1 087, 最低下载次数 10. 例如, 2003 年第 8 期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为 1 918, 下载次数为 1 087.

慢性乙型肝炎患者外周血CD14⁺细胞的功能状态

魏 然, 夏作理, 陈 彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰

魏然, 夏作理, 山东大学医学院生理教研室 山东省济南市 250012
陈彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰, 泰山医学院基础医学研究所
山东省泰安市 271000
魏然, 女, 1962-09-11 生, 江苏省徐州市人, 汉族, 美国加州大学旧金山医
学院博士后, 主要从事巨噬细胞在慢性炎症性疾病中作用研究。
项目负责人: 魏然, 250012, 山东省济南市, 山东大学医学院生理教研室。
jcyxys@tsmc.edu.cn
电话: 0538-6225075 传真: 0538-6222600
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-10-12

CD14⁺ cell dysfunction in patients with chronic active hepatitis B

Ran Wei, Zuo-Li Xia, Bin Chen, Ji-Ju Han, Dao-Ling Ren,
Ming-Feng Yang

Ran Wei, Zuo-Li Xia, Department of Physiology, Shandong University
School of Medicine, Jinan 250012, Shandong Province, China
Bin Chen, Ji-Ju Han, Dao-Ling Ren, Ming-Feng Yang, Institute of Basic
Medical Science, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong
Province, China
Correspondence to: Dr. Ran Wei, Institute of Basic Medical Science,
Taishan Medical College, 2 East Yingsheng Road, Taian 271000, Shandong
Province, China. jcyxys@tsmc.edu.cn
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-10-12

Abstract

AIM: To study the functional states of CD14⁺ cells in peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) by analyzing the expression of early active antigen, production of pro-inflammatory cytokines and phagocytosis with flow cytometry (FCM).

METHODS: PBMCs were isolated from 11 patients with chronic active hepatitis B and 10 healthy blood donors, and 4-colors flow cytometry and gate setting techniques were applied. The percentage of CD14⁺ cells and level of CD14 antigen were tested by FCM, after gate setting with CD14, side scatter (SSC) and activation-linked surface antigen (CD69) expression rate, percentage of TNF- α producing cells, level of intra-cellular TNF- α , the percentage of phagocytes and the ability of phagocytosis were investigated.

RESULTS: The SSC mean value of CD14⁺ cell of HBV patients was higher than that of health control ($P < 0.01$); There were no difference between two testing groups on the percentage of CD14⁺ cells and level of CD14 antigen, however the level of CD14 antigen was positively associated with the percentage of CD14⁺ cells. CD14/69 double expression rate was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$); No difference was observed on CD14/TNF- α double stain cells between testing groups; In comparison with control group, the level of cellular TNF- α in HBV group was higher ($P < 0.05$). In control group, the percentage of TNF- α producing cells were correlated with SSC value and number of phagocytes that expressed CD14/69. There was no difference in phagocytes that expressed CD14/69 in two groups. As compared with the control

group, there was more phagocytotic CD14⁺ cells in HBV group ($P < 0.01$), but the mean phagocytosis amount was significantly lower in this group ($P < 0.05$), and the number of phagocyte was negatively correlated with the level of CD14 antigen; while the SSC value and number of TNF- α producing cells were negatively correlated with level of CD14 antigen.

CONCLUSION: CD14⁺ cells in PBMCs from chronic active hepatitis B patients are over activated in a dysfunction stage.

Wei R, Xia ZL, Chen B, Han JJ, Ren DL, Yang MF. CD14⁺ cell dysfunction in patients with chronic active hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):618-621

摘要

目的: 研究慢性乙型肝炎患者外周血CD14⁺细胞早期活化抗原分子表达、炎症因子生成和吞噬能力。

方法: 采用四色荧光分析方法, 运用流式细胞术检测正常对照人群(10例)、慢性活动性乙型肝炎患者(11例)外周血单个核细胞(PBMC)CD14⁺细胞率和CD14抗原量; 并行CD14设门, 检测CD14⁺细胞前向角(FSC)、侧向角(SSC)值、细胞早期活化抗原(CD69)的表达率、TNF- α 表达率、细胞内TNF- α 水平、细胞吞噬率及吞噬力。

结果: HB组CD14⁺细胞SSC值高于对照组($P < 0.01$); HB组和对照组间外周血CD14⁺细胞比例、CD14抗原水平无统计学意义差别, 抗原水平与CD14⁺细胞率呈正相关; HB组CD14/CD69双表达细胞明显多于对照组($P < 0.01$); HB组CD14/TNF- α ⁺(细胞内)双染细胞与对照组间无差别, HB组CD14⁺细胞TNF- α 水平高于正常对照组($P < 0.05$); 对照组TNF- α ⁺细胞率与细胞颗粒度呈正相关, 与CD14/69双表达并发生吞噬细胞率一致。HB组CD69/CD14双阳性细胞荧光球吞噬率与对照组无差别($P > 0.05$); HBV组CD14⁺细胞荧光球吞噬率显著高于对照组($P < 0.01$), 吞噬力低于对照组($P < 0.05$), 荧光微球吞噬率与CD14抗原表达的量负相关; CD14⁺细胞SSC, TNF- α ⁺细胞率同CD14抗原表达的量也呈负相关。

结论: 慢性乙肝患者外周血存在过度活化CD14⁺单核细胞, 细胞吞噬力弱、胞内TNF- α 生成增多。

魏然, 夏作理, 陈彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰. 慢性乙型肝炎患者外周血CD14⁺细胞的功能状态. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):618-621
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/618.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是 HBV 在体内持续感染引起的^[1-6]。HBV 慢性感染相关的发病机制包括病毒因素、宿主免疫因素和遗传因素^[7-12]。T 细胞在慢性乙型肝炎发病机制中的作用研究较多^[13-15]，单核 - 巨噬细胞系统、树突细胞的作用也有报告^[16-17]，一般认为单个核细胞释放淋巴因子，可使细胞内病毒失活，既清除了病毒又避免了感染细胞破坏^[18]。另外，病毒抑制抗原处理和呈递，对病毒抗原的免疫耐受、病毒变异、是导致病毒感染持续存在的原因^[11]。我们研究慢性乙型肝炎患者外周血 CD14⁺ 细胞的功能状态，探讨活化单核 - 巨噬细胞在慢性乙型肝炎发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 住院慢性乙型肝炎 11 例，男 8 例，女 3 例，年龄 43.7±0.9 岁，其中 6 例乙型肝炎慢性轻度、4 例乙型肝炎慢性中度，符合 1995-05 北京全国第 5 次传染病与寄生虫病学术会议修订的诊断标准；体检正常 10 例，无肝炎及慢性炎性疾病 HBsAg(-)，血清 LAT 正常，男 7 例，女 3 例，平均年龄 28.0±6.3 岁。FACSCalibur 流式细胞仪；异硫氰酸荧光素(FITC)标记的人免疫球蛋白 G(MIgG₁-FITC)，FITC 标记的 TNF-α；藻红蛋白(PE)标记的鼠免疫球蛋白 G(MIgG₁-PE)；藻红蛋白标记的 CD69；PerCP 标记荧光微球(PerCP-Beads)、APC 标记的巨噬细胞表面抗原 CD14。以上均为 Becton-Dickinson (B-D)-PharMingen 公司产品。10 g/L 多聚甲醛(PFA)，分析纯，天津博迪化工有限公司产品；流式细胞仪四色校准微球(CaliBRITE Beads)、溶血素(FACS lysing solution)和破膜剂(FACS Perm2)为美国 B-D 公司产品；洗液为含 1 g/L 牛血清白蛋白(BSA，上海伯奥生物科技有限公司)的生理盐水。取正常对照及慢性活动性乙型肝炎患者空腹静脉血，用肝素钠抗凝。

1.2 方法 每份样本取荧光微球 20 μL，用人血清 200 μL (AB 型)于 37 °C 调理 30 min，用 PBS 洗 2 次，恢复原浓度，制备荧光微球(Beads)备用。四色流式细胞术分析 PBMC 活化 CD14⁺ 细胞及其功能状态^[19]：试管 1: IgG1-FITC/IgG1-PE/CD14-APC；试管 2: TNF-α-FITC/CD69-PE/PerCP-Beads/CD14-APC。用四色荧光微球校准流式细胞仪后，用 CellQuest 软件获取与分析，将流式细胞仪的 FSC 和 SSC 设置为线性放大，四色荧光的检测信号设置为对数放大，以 SSC/CD14-APC 双参数设门(图 1)，分别检测各管中 CD14⁺ 巨噬细胞的光散射、吞噬率及荧光强度，每测试管分析门内 5000 个细胞。数据分析时应用阴性对照管(试管 1)确定阴性界限。以流式细胞仪测定的分子平均荧光强度(mean fluorescence intensities)表示。

统计学处理 用 mean±SD 表示。显著性分析采用 t 检验，相关性分析采用秩和检验，使用 SPSS 软件在计算机上完成。

2 结果

2.1 PBMC CD14⁺ 细胞功能 实验人群 CD14⁺ 细胞占 PBMC 总量的 2.1-5.8%，两组间无显著差别，CD14 抗原表达水平亦无不同；采用 CD14-SSC 设门技术，测得 HB 组和对照组间 CD14⁺ 细胞 FSC 值没有明显差别；HB 组 CD14⁺ 细胞 SSC 值(778 ± 172 道)高于正常对照组 SSC(546 ± 74 道)(P < 0.01，表 1)；HB 组 CD14/CD69 双表达(图 2)细胞率(10.5 ± 8.2%)明显高于正常对照组(1.7 ± 1.2%) (P < 0.01)；HB 组 CD14 细胞 TNF-α⁺ (图 3)细胞率与对照组间无差别，细胞 TNF-α 水平(图 4) (22.7 ± 13.6)高于对照组(3.9 ± 3.9)(P < 0.05)；荧光球吞噬实验 HB 组 CD14⁺ 细胞荧光微球吞噬率(31.64 ± 14.93%)显著高于对照组(5.8 ± 2.2%) (P < 0.01)，然而吞噬的量(26.7 ± 6.0)明显少于对照组(22.3 ± 6.4%) (P < 0.05)；HB 组 CD14/CD69 双表达细胞荧光球吞噬率与对照组无差别(P > 0.05)。

表 1 慢性肝炎患者外周血 CD14⁺ 细胞功能

	对照组 n=11 mean±SD	HB 组 n=10 mean±SD	P 值
FSC (道)	683 ± 81	652.90 ± 27.99	0.360
SSC (道)	546 ± 74	778 ± 172	0.001
CD14-Percent(%)	3.6 ± 1.5	4.2 ± 1.6	0.290
CD14-Median (道)	472 ± 92	365 ± 78	0.290
CD69 ⁺ (%)	1.7 ± 1.2	10.5 ± 8.2	0.0017
TNF-α ⁺ (%)	0.8 ± 1.4	2.4 ± 3.2	0.020
TNFα-Median (道)	80.3 ± 53.4	51.3 ± 16.0	0.105
PerCP-Beads 吞噬率(%)	5.8 ± 2.2	31.6 ± 14.9	0.002
CD14/69PerCP-Beads-Median (道)	26.7 ± 6.0	22.3 ± 6.4	0.023
CD14+CD69+ PerCP-Beads positive (%)	4.2 ± 4.8	1.8 ± 2.1	0.127

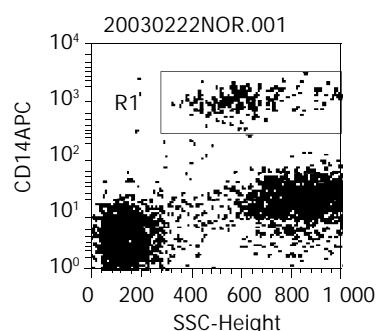


图 1 SSC-CD14 设门。

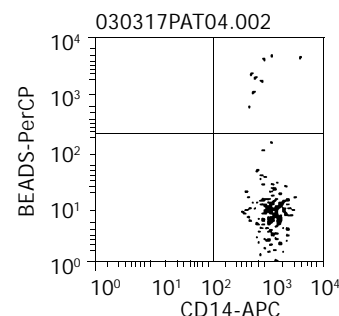
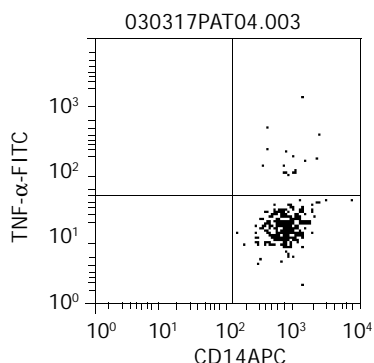
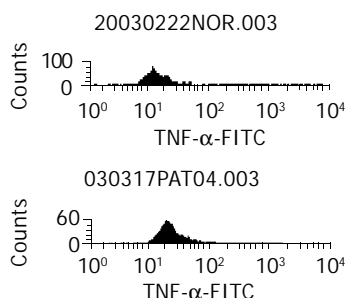


图 2 患者 CD14⁺/CD69⁺ 细胞吞噬率。

图3 患者CD14和TNF- α 表达.图4 对照和患者TNF- α 水平.

2.2 CD14⁺细胞功能指标间相关性(表2) HB组和对照组PBMC CD14抗原水平与CD14⁺细胞率呈正相关;对照组TNF- α ⁺细胞率与细胞颗粒度、CD14/CD69双表达细胞荧光球吞噬率有正相关关系. HB组PBMC细胞CD14抗原表达的量与CD14⁺细胞SSC、荧光球吞噬率、TNF- α ⁺细胞率呈负相关.

表2 慢性肝炎患者外周血CD14⁺细胞观测指标间相关性分析

分组	观测指标	P值
对照组	SSC vs TNF- α	0.040 (+)
	TNF- α vs CD69/14 PerCP-beads positive	0.041 (+)
	CD14 median vs CD14 percent	0.011 (+)
HBV组	CD14 median vs SSC	0.026 (-)
	CD14 median vs 吞噬率	0.010 (-)
	CD14 median vs TNF- α	0.047 (-)
	CD14 median vs CD14 percent	0.023 (+)

3 讨论

对慢性乙肝细胞免疫状况的研究中, T细胞的研究报告较多, 树突细胞、巨噬细胞研究可见少量报道^[20-21]. 大量数据表明, 慢性的、广泛的、重度的HIV感染和非感染巨噬细胞系激活形成巨噬细胞功能异常的自主激活持续状态, 分泌大量细胞毒物质, 尽管中枢神经系统内病毒感染是始发因素, 过度激活巨噬细胞的数量而非病毒的含量是造成神经损伤的主要原因^[22-24]. 巨噬细胞系及其产生的炎症因子在细胞损伤中发挥重要作用^[25-27]. 鉴于巨噬细胞在慢性炎症疾病中的作用逐渐

受到重视, 我们从多方面观察了慢性活动性肝炎患者外周血CD14⁺细胞功能状态.

采用流式细胞术检测的CD14⁺细胞外周血占2.1-5.8%, 平均5.09%, 与常规PBMC单个核细胞分布相同. 实验组和对照组间PBMC CD14⁺细胞的大小、占PBMC比例、CD14抗原水平无明显差别; 无论实验组还是对照组CD14抗原表达量与CD14⁺细胞在PBMC中的比率均一致. 不同的是HB组CD14/CD69活化抗原双表达细胞数增多、HB组发生吞噬的CD14⁺细胞百分率高达31.6%, 高于对照组(5.8%). CD69表达、吞噬功能都是吞噬细胞活化的标志, 本实验HB组CD14⁺细胞增高的CD69表达率和高吞噬率表明HB组患者PBMC单核巨噬细胞活化率增高. 但是荧光强度显示的CD14⁺细胞吞噬量显示患者CD14⁺细胞吞噬力降低, 患者组高表达CD14抗原者荧光球吞噬率降低; CD14抗原表达量上调与CD69活化抗原表达一样也是单核-巨噬细胞活化的标志, 但在慢活肝患者两种途径相关的活化或表现吞噬率低、或吞噬率不变, 与患者组整体CD14⁺细胞吞噬率升高不一致. 过度活化巨噬细胞也称炎症性巨噬细胞, 此状态细胞以产生大量炎症因子为特征, 如IL-1、IL-6、TNF- α , 炎症性巨噬细胞吞噬力降低^[20]. 实验结果表明所检测肝炎慢性轻度、中度患者外周血CD14⁺细胞活化率高, 且存在过度活化状态. 血液中的单个核细胞表达强的CD14, 依据其表达程度将血液中的单核细胞分成两个亚群, CD14 bright (CD14⁺)和CD14 dim(CD14⁺), 正常时血液中CD14⁺亚群占主导地位. 两个亚群的单核细胞除CD14表达不同外, 还有其他抗原成分不同, 形态上也存在差异. LPS、葡萄球菌细胞壁提取物、双链RNA等通过CD14的途径激活细胞. 感染时CD14水平的升高程度与疾病的严重程度相关. 机体可通过对CD14的调节作用而影响细胞因子的释放, 从而影响整个炎症反应进程. 从CD14水平角度分析本实验患者组高表达CD14抗原者荧光球吞噬率低. 同样支持慢活肝患者外周血存过度活化的单核细胞.

慢性病毒感染状态常发生TH1到TH2的漂移, 产生过量炎症递质、炎症因子, 促进肝内炎症反应, 介导肝细胞损伤, 诱导各类细胞分化增生, 从而使慢性肝脏炎症持续存在, 引起一系列免疫病理损伤^[28, 32]. 近年来, 由内毒素诱导的以TNF- α 为核心的炎症反应, 在重型肝炎患者肝细胞继发性损伤中的作用引起人们高度重视^[21, 29]. 肿瘤坏死因子是由单核巨噬细胞系统产生的一种重要的细胞调节因子, 具有多种生物学功能. 有研究报告TNF- α 能吸引和激活免疫细胞损害肝细胞^[31]. 多篇文献报道肝炎患者外周血TNF- α 水平升高, 慢性乙型肝炎患者外周血炎症因子IL-2, IL-10 and TNF- α 与HBeAg肝炎的活动度有关^[29, 30]. 本研究HB组CD14⁺细胞TNF- α ⁺检出率与对照组间无差别, 但是患者CD14⁺细胞内TNF- α 水平显著增高; 对照组CD14⁺细胞活化、TNF- α 产生、与吞噬率是一致的. HB组CD14

抗原水平上调途径活化的单个核细胞 TNF- α 水平低, 是否由于释放增多引起有待研究.

致谢: 感谢 Dr. M. McGrath 对完成本课题给予的指导和帮助.

4 参考文献

- 1 Xie Y, Zhao H, Dai WS, Xu DZ. HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2003;2:418-422
- 2 Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2221-2225
- 3 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
- 4 Wang JY, Liu P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2009-2011
- 5 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- 6 Jin YM, Yun C, Park C, Wang HJ, Cho H. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J Viral Hepat* 2001;8:322-330
- 7 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58
- 8 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- 9 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983
- 10 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50
- 11 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641-644
- 12 Koziel MJ. The immunopathogenesis of HBV infection. *Antivir Ther* 1998;3(Suppl 3):13-24
- 13 Bertolotti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 2003;60:61-66
- 14 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:422-424
- 15 Wang KX, Peng JL, Wang XF, Tian Y, Wang J, Li CP. Detection of T lymphocyte subsets and mIL-2R on surface of PBMC in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2017-2020
- 16 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 17 Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10:159-167
- 18 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:73-76
- 19 魏然, 陈彬, 甘田福, 韩继举, 周秀梅, 张玉琦, 任道凌. 流式细胞术检测外周血 CD14⁺ 细胞的活化程度. *中华检验医学杂志* 2003;26:22-24
- 20 McGrath SM, Kodelja V. Balanced macrophage activation hypothesis: A biological model for development of drugs targeted at macrophage function states. *Pathobiology* 1999;67:277-281
- 21 Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002;20(Suppl 4):A80-82
- 22 Williams KC, Hickey WF. Central nervous system damage, monocytes and macrophages and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:537-562
- 23 Boven LA, Middel J, Breij EC, Schotte D, Verhoef J, Soderland C, Nottet HS. Interactions between HIV infected monocyte-derived macrophages and human brain microvascular endothelial cells result in increased expression of CC chemokines. *J Neurovirol* 2000;6:382-389
- 24 Gartner S. HIV infection and dementia. *Science* 2000;287:602-604
- 25 Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM, Thurman RG. Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 2001;166:4737-4742
- 26 Glass JD, Wesselingh SL. Microglia in HIV-associated neurological diseases. *Microsc Res Tech* 2001;54:95-105
- 27 Williams K, Alvarez X, Lackner AA. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* 2001;36:156-164
- 28 Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis B (CHB) is correlated with a dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 1999;115:508-514
- 29 Bozkaya H, Bozdayi M, Turkyilmaz R, Sarioglu M, Cetinkaya H, Cinar K, Kose K, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Circulating IL-2, IL-10 and TNF-alpha in chronic hepatitis B: their relations to HBeAg status and the activity of liver disease. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1675-1679
- 30 邵沂, 宋家骏, 刘平. 肿瘤坏死因子与乙型病毒性肝病病情的探讨. *临床消化病杂志* 2000;12:118-119
- 31 Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lee PI. Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:540-545
- 32 Monsalve-De Castillo F, Romero TA, Estevez J, Costa LL, Atencio R, Porto L, Callejas D. Concentrations of cytokines, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD30 in sera of patients with hepatitis B virus infection during acute and convalescent phases. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1372-1375

HLA - II 类基因与慢性乙型肝炎重型化的相关性

蒋业贵, 王宇明

蒋业贵, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

蒋业贵, 男, 1966-12-20 生, 安徽巢湖市人, 汉族, 2002 年获第三军医大学内科学博士学位, 主治医师, 讲师. 主要从事肝炎、肝硬化和消化系统肿瘤的研究, 发表论文 30 篇.

项目负责人: 蒋业贵, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. jiangyegui@yahoo.com.cn

电话: 023-68754141

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-05

Association between HLA class II genes and severity of chronic hepatitis B

Ye-Gui Jiang, Yu-Ming Wang

Ye-Gui Jiang, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Ye-Gui Jiang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. jiangyegui@yahoo.com.cn

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-05

Abstract

AIM: To investigate the association between the polymorphism of HLA -DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and severity of chronic hepatitis B.

METHODS: HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles in 54 patients with chronic hepatitis B and 32 patients with chronic severe hepatitis B were analyzed by using polymerase chain reaction/sequence specific primer (PCR/SSP) technique.

RESULTS: The frequency of HLA-DRB1*1 001 allele in the chronic severe hepatitis B group was markedly higher than that in the chronic hepatitis B group (14.1% vs 1.9%, $\chi^2=19.2997$, $Pc=0.0281$, $RR=9.78$). No significant different allele frequencies of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles were observed between the chronic severe hepatitis B group and the chronic hepatitis B group.

CONCLUSION: HLA-DRB1*1 001 is closely associated with the severity of chronic hepatitis B, and may be a valuable marker of evaluating the prognosis of patients with chronic hepatitis B.

Jiang YG, Wang YM. Association between HLA class II genes and severity of chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):622-625

摘要

目的: 探讨 HLA -DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性与慢性乙型肝炎重型化之间的关系.

方法: 采用聚合酶链反应/序列特异性引物(PCR/SSP)技术对 52 例慢性乙型肝炎和 32 例慢性重症乙型肝炎的 HLA -

DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性进行了分析.

结果: HLA -DRB1*1 001 在慢性重症乙型肝炎组的等位基因频率明显高于慢性乙型肝炎组(14.1% vs 1.9%, $\chi^2=19.2997$, $Pc=0.0281$, $RR=9.78$). HLA -DQA1 和 HLA -DQB1 等位基因频率在慢性重症乙型肝炎组和慢性乙型肝炎组间差异无显著性.

结论: HLA -DRB1*1 001 与慢性乙型肝炎的重型化有关, 可能是一个对判断病情和预后有价值的实验指标.

蒋业贵, 王宇明. HLA - II 类基因与慢性乙型肝炎重型化的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(3):622-625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/622.asp>

0 引言

不同个体对乙型肝炎病毒(HBV)易感性的差异与个体的免疫特性有关, 而后者主要取决于人类主要组织相容性复合体(MHC). 人类白细胞抗原(HLA)是 MHC 的基因产物. HLA 复合体作为调节机体免疫应答的重要基因群, 与抗 HBV 免疫反应有着密切的关系, 某些特殊的 HLA 基因型可能影响着 HBV 感染的慢性化和重型化. 我们利用聚合酶链反应/序列特异性引物(polymerase chain reaction/sequence specific primer, PCR/SSP)技术通过对慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者中 HLA - II 类基因多态性的分析, 从基因水平研究免疫遗传因素在慢性乙型肝炎重型化发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 我科 2000 年住院慢性乙型肝炎 52 例, 男 43 例, 女 9 例, 平均年龄(33 ± 9 岁). 慢性重型乙型肝炎 32 例, 男 27 例, 女 5 例, 平均年龄(35 ± 9 岁). 符合 2000 年第十次全国传染病与寄生虫学术会议修订的诊断标准, 均为重庆地区无血缘关系的汉族人.

1.2 方法 基因组 DNA 提取 采用 ReadyPCR™ 全血基因组 DNA 纯化系统快速提取基因组 DNA, 试剂盒购自华美生物工程公司. PCR/SSP 技术测定 HLA -DRB1, -DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性 按 Olerup(Tissue Antigens, 1992;39:225; 1993;43:119)方法设计针对 HLA -DRB1, HLA -DQA1 和 HLA -DQB1 第 2 外显子区域多态性的 SSP 共 39 条, 组成 40 对特异性扩增引物对, 分别鉴定 HLA -DRB1*1-10 等位基因型别、所有已知有表达的 10 种 HLA -DQA1 和 13 种 HLA -DQB1 等位基因型别. SSP

由上海生工生物工程技术公司合成. PCR 扩增产物加样至含溴化乙锭的 20 g/L 琼脂糖凝胶中, 15 V/cm 凝胶电泳 20 min, 经紫外透射下泳道中见明显 DNA 条带为阳性, 确定其基因型别. PCR 反应假阴性质控 每一 PCR 反应中, 都含有一对扩增基因和一个内对照基因(人生长激素基因)的引物, 后者引物序列为: 5' -primer: 5' -GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3', 3' -primer: 5' -TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTTC-3', 扩增产物大小为 429 bp. 每次扩增后, 人生长激素基因作为 PCR 扩增的阳性内对照, 均应有阳性条带产物, 如这一基因受抑, 可能出现假阴性结果, 同时还有利于纯合子基因型检测的准确性. 假阳性质控 根据扩增 DNA 片段碱基数判断.

统计学处理 等位基因频率的计算采用直接算法,

两组间等位基因分布的差异用四格表法进行 χ^2 检验, 对 $\chi^2 > 3.84$ 者按 Fisher 法计算确切 P 值, 并计算校正 P 值(Pc), 相对危险性(RR)按 Woolf 公式计算.

2 结果

2.1 HLA - DRB1 等位基因检测 慢性重型乙型肝炎组的 HLA - DRB1*1001 等基因频率(14.1%)明显高于慢性乙型肝炎组(1.9%), 二者相比差异显著($\chi^2=19.2997$, Pc = 0.0281, RR=9.78, 表 1). 其他等位基因频率在慢性重型乙型肝炎组和慢性乙型肝炎组间差异无显著性.

2.2 HLA - DQA1 等位基因检测 慢性乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组的 HLA - DQA1 等基因频率相比差异无显著性(表 2).

表 1 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的 HLA - DRB1 等位基因频率

DRB1 等位基因	慢性乙型肝炎 (n=52)		慢性重型乙型肝炎 (n=32)		χ^2	Pc	RR
	阳性(n)	等位基因频率(%)	阳性(n)	等位基因频率(%)			
0101/0103	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0301	18	17.31	9	14.06	0.3826	> 0.05	0.74
0401/0411	13	12.50	9	14.06	0.1001	> 0.05	1.17
0701/0702	8	7.69	4	6.25	0.1346	> 0.05	0.79
0801/0804	6	5.77	3	4.69	0.0969	> 0.05	0.79
0901	16	15.39	9	14.06	0.0663	> 0.05	0.88
1001	2	1.92	9	14.06	19.2997	0.0281	9.78
1101/1104	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
1201/1202	15	14.42	8	12.50	0.1474	> 0.05	0.82
1301/1302	1	0.96	0	0.00	0.6228	> 0.05	0.00
1303/1304	1	0.96	0	0.00	0.6228	> 0.05	0.00
1401, 1404	6	5.77	3	4.69	0.0969	> 0.05	0.79
1402, 1403	0	0.00	0	0.00	0.0000	> 0.05	0.00
1501/1502	11	10.58	6	9.38	0.0709	> 0.05	0.86
1601/1602	2	1.92	1	1.56	0.0299	> 0.05	0.81
Blank	3	2.89	1	1.56	0.3054	> 0.05	0.53

表 2 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的 HLA - DQA1 等位基因频率

DQA1 等位基因	慢性乙型肝炎 (n=52)		慢性重型乙型肝炎 (n=32)		χ^2	Pc	RR
	阳性(n)	等位基因频率(%)	阳性(n)	等位基因频率(%)			
0101	9	8.65	4	6.25	0.3500	> 0.05	0.68
0102	22	21.15	12	18.75	0.1901	> 0.05	0.82
0103	5	4.81	3	4.69	0.0013	> 0.05	0.97
0104	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0201	3	2.88	1	1.56	0.3054	> 0.05	0.53
0301	15	14.42	8	12.50	0.1474	> 0.05	0.14
0302	0	0.00	0	0.00	0.0000	> 0.05	0.00
0401	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0501	27	25.96	20	31.25	0.8992	> 0.05	1.54
0601	12	11.54	6	9.38	0.2203	> 0.05	0.77
Blank	9	8.65	8	12.50	0.7262	> 0.05	1.59

表3 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的HLA-DQB1等位基因频率

DQA1 等位基因	慢性乙型肝炎 (n=52)		慢性重型乙型肝炎 (n=32)		χ^2	Pc	RR
	阳性(n)	等位基因频率(%)	阳性(n)	等位基因频率(%)			
0201	10	9.62	7	10.94	0.0859	> 0.05	1.18
0301	37	35.58	20	31.25	0.6802	> 0.05	0.68
0302	6	5.77	3	4.69	0.0969	> 0.05	0.79
0303	15	14.42	9	14.06	0.0051	> 0.05	0.97
0401	5	4.81	3	4.69	0.0014	> 0.05	0.97
0402	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0501	3	2.88	4	6.25	1.1748	> 0.05	2.33
0502	7	6.73	3	4.69	0.3154	> 0.05	0.67
0503	2	1.92	1	1.56	0.0299	> 0.05	0.81
0601	7	6.73	3	4.69	0.3154	> 0.05	0.67
0602	4	3.85	5	7.81	1.5036	> 0.05	2.22
0603	2	1.92	1	1.56	0.0299	> 0.05	0.81
0604	2	1.92	2	3.13	0.2524	> 0.05	1.67
Blank	3	2.89	2	3.13	0.0082	> 0.05	0.65

2.3 HLA-DQB1等位基因检测 慢性乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组的HLA-DQB1等基因频率相比差异无显著性(表3)。

3 讨论

不同个体在HBV感染后临床表型复杂多样,从一过性的抗原血症、自限性的急性肝炎、慢性病毒携带、进行性肝损害乃至肝硬化,形成了复杂的疾病谱。宿主在HBV感染后不同的临床发展过程,除了与病毒本身的因素有关外,更重要的是由于不同个体对HBV所发生的免疫反应的不同^[1-9],而后者主要取决于MHC。HLA是MHC的基因产物,是首次发现的与疾病有明确关系的遗传系统,为目前已知的最复杂的人类基因复合体,各基因座位均有众多的等位基因,这些基因位于人第6号染色体短臂上P21.3带处,占人体整个基因组的1/30 00^[10-27]。在HLA 128个功能基因中39.8%基因和免疫系统有关,特别是II类区域中几乎所有基因均显示免疫相关功能。HLA与疾病相关性的具体机制尚不清楚。HLA基因最显著的特征是具有明显的多态性,其多态性的差异决定个体免疫应答的不同。因此,推测HLA系统的特定等位基因是否在某些疾病的发生上起重要作用。HLA复合体作为调节机体免疫应答的重要基因群,与抗HBV免疫反应有着密切的关系,某些特殊的HLA基因型可能影响着HBV感染的慢性化和重型化^[28-32]。

严重的肝细胞损伤构成了重型肝炎发生的病理基础。目前,乙型肝炎肝细胞损伤机制的研究主要集中在HBV基因变异,包括前C区和S区变异。HBV DNA前C区1896位变异导致HBeAg前体蛋白的合成中断,造成HBeAg减少或消失,使抑制性T细胞(Ts)活性受到抑制,造成Ts对HBc/HBeAg特异性辅助性T细胞调节

作用降低,引起刺激HBc/HBeAg特异性CTL产生能力异常增强和T细胞等免疫性分泌细胞因子能力异常增强,而导致肝细胞坏死加重。但并非所有的慢性重型乙型肝炎患者的HBV DNA都发生变异,且HBV DNA发生变异是在机体免疫压力下造成的。不同个体的不同免疫特性可能是慢性乙型肝炎重型化的根本原因。我们研究发现,慢性重型乙型肝炎组的HLA-DRB1*1001的等位基因频率明显高于慢性乙型肝炎组,两者相比差异显著,说明该等位基因与慢性乙型肝炎重型化有关,可能是一个对判断病情和预后有价值的实验指标。进一步说明特异性遗传背景可增加或降低人群患慢性乙型肝炎的危险性。但这种HLA与慢性乙型肝炎连锁不平衡关联性受HLA基因的极其高度的多态性的影响,因此在加大样本的基础上还需进行慢性乙型肝炎家系的HLA基因的调查研究,从而为探讨和揭示慢性乙型肝炎重型化的发病机制提供更有价值的科学依据。

4 参考文献

- 1 Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:802-807
- 2 Chiari R, Hames G, Stroobant V, Texier C, Maille B, Boon T, Coulie PG. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res* 2000;60:4855-4863
- 3 Zhang SL, Liu M, Zhu J, Chai NL. Predominant Th₂ immune response and chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:513-515
- 4 Chen WN, Oon CJ. Mutation "hot spot" in HLA class I-restricted T cell epitope on hepatitis B surface antigen in chronic carriers and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:757-761
- 5 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from pa-

- tients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 6 Yan JC, Chen WB, Ma Y, Shun XH. Expression of vascular endothelial growth factor in liver tissues of hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:837-840
- 7 Jiang YG, Li QF, Mao Q, Wang YM. Primary human fetal hepatocytes with HBV infection *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:403-405
- 8 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
- 9 Du YP, Deng CS, Lu DY, Huang MF, Guo SF, Hou W. The relation between HLA-DQA1 genes and genetic susceptibility to duodenal ulcer in Wuhan Hans. *World J Gastroenterol* 2000; 6:107-110
- 10 Ding HL, Cheng H, Fu ZZ, Deng QL, 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
- 11 Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:965-968
- 12 Pu J, Yang XS, Zhang YL, Pan LJ, Zhou DY. Expression of HLA-DR in epithelie around lymphofollicle of human gastrointestinal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:706-707
- 13 Zhai SH, Liu JB, Zhu P, Wang YH. CD54, CD80, CD86 and HLA-ABC expressions in liver cirrhosis and hepato carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:292-295
- 14 Qu S, Li QF, Deng YZ, Zhang JM, Zhang J. Cloning and expression of HLA B27 gene. *World J Gastroenterol* 1999;5:345-348
- 15 Barrett S, Ryan E, Crowe J. Association of the HLA-DRB1*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish Cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *J Hepatol* 1999;30:979-983
- 16 Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, Modola G, Agostiano V, Gaudiano C, Andriulli A. HLA class II favors clearance of HCV infection and progrssion of the chronic liver damage. *J Hepatol* 1999; 30:984-989
- 17 Chang KM, Gruener NH, Southwood S, Sidney J, Pape GR, Chisari FV, Sette A. Identification of HLA-A3 and -B7-restricted CTL response to hepatitis C virus in patients with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol* 1999;162:1156-1164
- 18 De Maria A, Moretta L. HLA-class I-specific inhibitory receptors in HIV-1 infection. *Hum Immunol* 2000;61:74-81
- 19 Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 1999;283:1748-1752
- 20 Lekstrom-Himes JA, Hohman P, Warren T, Wald A, Nam J, Simonis T, Corey L, Straus SE. Association of major histocompatibility complex determinants with the development of symptomatic and asymptomatic genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Infect Dis* 1999;179:1077-1085
- 21 Lin J, Deng CS, Sun J, Zheng XG, Huang X, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. HLA-DRB1 allele polymorphisms in genetic susceptibility to esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:412-416
- 22 Harcourt G, Hellier S, Bunce M, Satsangi J, Collier J, Chapman R, Phillips R, Klenerman P. Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001;8:174-179
- 23 Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- 24 Ma X, Qiu DK. Relationship between autoimmune hepatitis and HLA-DR4 and DRbeta allelic sequences in the third hypervariable region in Chinese. *World J Gastroenterol* 2001;7:718-721
- 25 Godkin A, Jeanguet N, Thursz M, Openshaw P, Thomas H. Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4+ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *Eur J Immunol* 2001;31:1438-1446
- 26 Bosi I, Ancora G, Mantovani W, Miniero R, Verucchi G, Attard L, Venturi V, Papa I, Sandri F, Dallacasa P, Salvioli GP. HLA DR13 and HCV vertical infection. *Pediatr Res* 2002;51:746-749
- 27 Hue S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, Picon M, Rifflet H, Piette JC, Pol S, Caillat-Zucman S. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease. *J Infect Dis* 2002; 186:106-109
- 28 Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999;179:1004-1006
- 29 Sobao Y, Sugi K, Tomiyama H, Saito S, Fujiyama S, Morimoto M, Hasuie S, Tsubouchi H, Tanaka K, Takiguch M. Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A*2402, the most common HLA class I allele in East Asia. *J Hepatol* 2001;34:922-929
- 30 Thimme R, Chang KM, Pemberton J, Sette A, Chisari FV. Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol* 2001;75:3984-3987
- 31 Pellegris G, Ravagnani F, Notti P, Fissi S, Lombardo C. B and C hepatitis viruses, HLA-DQ1 and -DR3 alleles and autoimmunity in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2002;36:521-526
- 32 Desombere I, Gijbels Y, Verwulgen A, Leroux-Roels G. Characterization of the T cell recognition of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by good and poor responders to hepatitis B vaccines. *Clin Exp Immunol* 2000;122:390-399

小鼠 *H pylori* 长期感染模型研究

陶好霞, 刘纯杰, 刘秀丽, 李淑琴, 李 勤, 张兆山

陶好霞, 刘纯杰, 刘秀丽, 李淑琴, 李勤, 张兆山, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071

陶好霞, 女, 1968-08-06 生, 河南省鄢陵县人, 汉族. 1989 年医学检验专科毕业, 军事医学科学院生物工程研究所实验师. 主要从事 *H pylori* 疫苗的研发, 发表论文 7 篇.

国家“十五” 863 高技术研究发展计划基金资助项目, No. 2001AA215161
项目负责人: 刘纯杰, 100071, 北京市, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所. liucj@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66948834 传真: 010-63833521

收稿日期: 2003-08-28 接受日期: 2003-10-22

Establishment of mouse models with long-term infection of *H pylori*

Hao-Xia Tao, Chun-Jie Liu, Xiu-Li Liu, Shu-Qin Li, Ji Li, Zhao-Shan Zhang

Hao-Xia Tao, Chun-Jie Liu, Xiu-Li Liu, Shu-Qin Li, Ji Li, Zhao-Shan Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Supported by National foundation of the Advanced Technique Research and Development Project, No. 2001AA215161

Correspondence to: Dr. Chun-Jie Liu, Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China. liucj@nic.bmi.ac.cn

Received: 2003-08-28 Accepted: 2003-10-22

Abstract

AIM: To develop a mouse model with long-term infection of *H pylori*.

METHODS: Each mouse was inoculated with *H pylori* Sydney strain 1 (SS1). Noninfected control mice and infected mice were killed at 4, 12 and 24 wk after *H pylori* infection. A piece of gastric mucosa obtained from the posterior wall of the antrum of each mouse was used for culture of *H pylori*, rapid urease testing and histopathological detection. Serum was obtained to measure the IgG antibody level to *H pylori*.

RESULTS: After 4 wk of infection, the *H pylori* was cultured from 6 of 7 infected Balb/c mice and 5 of 7 the *H pylori*-infected C57BL/6 mice. After 12 and 24 wk of infection, all of 7 infected Balb/c and 6 of 7 the *H pylori*-infected C57BL/6 mice showed the positive results. At the different wk, the rapid urease test results were consistent with the *H pylori* culture test. At 12 wk after inoculation, chronic inflammation was observed in the pyloric mucosa by histopathological examination. At 24 wk after inoculation, lymphoid follicles were especially conspicuous in the submucosa, and they were also found in the deep portion of the mucosa.

CONCLUSION: *H pylori* SS1 can colonize easily in the glandular stomach mucosa of mouse, and the histopathological changes are similar to those of humans with *H pylori* infection.

Tao HX, Liu CJ, Liu XL, Li SQ, Li J, Zhang ZS. Establishment of mouse models with long-term infection of *H pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):626-629

摘要

目的: 用 *H pylori* SS1 (Sydney strain1) 感染 C57BL/6 小鼠及 Balb/c 小鼠, 建立稳定的 *H pylori* 感染的小鼠实验动物模型.

方法: 通过灌胃的方式用 *H pylori* SS1 菌株感染二级 C57BL/6 小鼠和 Balb/c 小鼠, 灌胃后 4、12 及 24 wk 分三次处死动物, 用胃黏膜匀浆液进行细菌培养试验、尿素酶试验、胃病理组织学检查以及血清学抗体检测试验.

结果: 灌胃 4 wk 后, 处死的 7 只 Balb/c 小鼠经胃组织细菌培养发现有 6 只显示阳性结果; 处死的 7 只 C57BL/6 小鼠中有 5 只显示阳性结果. 12 和 24 wk 后的实验组 7 只 Balb/c 小鼠胃组织细菌培养均为阳性, 而 7 只 C57BL/6 小鼠中有 6 只显示阳性结果. 在不同阶段尿素酶检测的阳性结果与细菌培养法结果一致. 实验组动物胃窦部及胃体部均出现了轻度至中度慢性活动性胃炎变化; 血清学 IgG 检查表明, 各实验组的实验动物产生了抗 *H pylori* 血清抗体; 而对照组动物的胃黏膜匀浆液经各项检测均为阴性.

结论: 成功地建立了 *H pylori* 感染的小鼠实验动物模型.

陶好霞, 刘纯杰, 刘秀丽, 李淑琴, 李勤, 张兆山. 小鼠 *H pylori* 长期感染模型研究. 世界华人消化杂志 2004;12(3):626-629

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/626.asp>

0 引言

H pylori 感染可导致人体发生慢性活动性胃炎和胃、十二指肠的消化性溃疡等, 同时有诱发机体发生胃癌的危险^[1-5]. *H pylori* 的感染率极高, 在发达国家 50% 以上的成年人感染该菌, 发展中国家的感染率达到 60-80%, 甚至更高^[6-10]. 调查表明, 90% 的胃炎和 70% 的胃溃疡由 *H pylori* 引起, 而且 *H pylori* 感染所致疾病的治疗尚未得到很好的解决^[11-14]. 目前, *H pylori* 的致病机制仍然不十分清楚, 从根本上解决防治 *H pylori* 相关性疾病的首要方法是 *H pylori* 疫苗的研发和临床应用, 而建立稳定的动物模型是探讨 *H pylori* 致病机制及开展特异性免疫预防与治疗的前提和保证^[15-16]. 现在建立的动物模型虽然不少, 但是方便而价廉的 *H pylori* 小鼠模型的建立还少有报道. 我们通过灌胃的方式用 *H pylori* SS1 菌株感染二级 C57BL/6 小鼠和 Bal b/c 小鼠, 表明 *H pylori* SS1 菌株可长期定植于 Balb/c 和 C57BL/6 小鼠胃黏膜, 并发生了胃黏膜炎症变化, 成功地建立了 *H pylori* 感染的小鼠实验动物模型, 为 *H pylori* 致病机制的研究、疫苗开发研制等奠定了一定基础. 结果如下.

1 材料和方法

1.1 材料 二级 C57BL/6 小鼠及 Balb/c 小鼠各 30 只, 17-20 g, ♀; 由本院实验动物中心提供, 本所动物房饲喂. H pylori SS1 (Sydney strain1)由广州中山医科大学陈旻湖教授惠赠.

1.2 方法 每种动物随机分成实验组(21只)和对照组(9只). 动物灌胃前进行 8 h 禁食和 4 h 禁水, 然后用 30 mg/L NaHCO₃ 0.25 mL 灌胃, 30 min 后用 1×10⁹ cfu/L H pylori SS1 0.5 mL 灌胃, 灌后 30 min 恢复进食和饮水^[17]. 对照动物灌服 PBS. 隔日连续灌服 3 次. 末次灌胃后的 4、12 及 24 wk 分 3 次, 每次 7 只, 眼球放血并处死动物. 于无菌超净台中取出处死动物的胃, 用灭菌生理盐水清洗胃中内容物, 沿胃大弯将胃黏膜纵切为两半, 其中一半置于甲醛液体中常规固定, 用于病理组织学检查; 另一半用剪刀剪碎后(剪碎前称质量), 各加生理盐水 0.5 mL 于研磨器中研磨至匀浆进行细菌培养计数, 并用 H pylori 快速检测试剂盒进行 H pylori 尿素酶检测. 采用空肠弯曲菌琼脂基础培养基(其中含 10 mg/L 盐酸万古霉素, 2.5 mg/L 多黏菌素 B, 2 mg/L 两性霉素 B 及 75 ml/L 脱纤维羊血)制平板, 将已研磨的匀浆用布氏肉汤分别稀释 10、100、1 000 倍, 取稀释液 100 μL 涂平板, 37 ℃微需氧(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂)培养 72 h. 挑取呈细小圆形、半透明菌落, 经 Gram 染色后, 于油镜下观察菌体形态. 从细菌培养平板上挑取呈细小圆形、半透明菌落, 用胃 H pylori 快速检测试剂盒 HPUT-H104 (购自福建三强公司)检测, 能使试剂变为橙色的为阳性菌落^[18].

胃黏膜经常规甲醛液体固定、梯度乙醇脱水、二甲苯脱乙醇、石蜡包埋切片、脱蜡、梯度复水、HE 染色、梯度脱水、二甲苯透明及树脂封片后, 于光学显微镜下观察胃组织病理改变^[19]. 动物眼球取血后, 将血液收集于 1.5 mL 离心管中, 常温下静置, 离心收集血清. 用酶联免疫黏附试验(ELISA)测定血清中抗 H pylori IgG 抗体.

2 结果

2.1 细菌分离培养及尿素酶试验 在 H pylori 感染后 4、12 及 24 wk, 分批处死实验组的小鼠, 在胃组织中分离到典型 H pylori, 平板培养的菌落呈圆形、凸起、光滑、半透明状. 经 Gram 染色后于油镜下观察, 其中被染成红色、呈弯曲螺旋状的菌体, 与在实验室中培养的 H pylori 标准菌株形态一致(图 1). 对照组的胃黏膜匀浆液中则未分离到典型 H pylori 菌落. 通过进一步的细菌分

离培养, 对每块平板进行计数, 结果见表 1. 实验组及对照组小鼠的胃黏膜匀浆液均进行快速尿素酶检测, 结果见表 2.

2. 2 病理组织学检查 H pylori 实验组于 12wk 在胃门前区小弯处可见有慢性炎症变化, 即有多量的淋巴细胞和嗜中性粒细胞浸润. 24wk 时炎症更加严重, 浸润细胞主要是淋巴细胞. 而对照组小鼠胃则未发现有炎性细胞浸润现象(图 2).

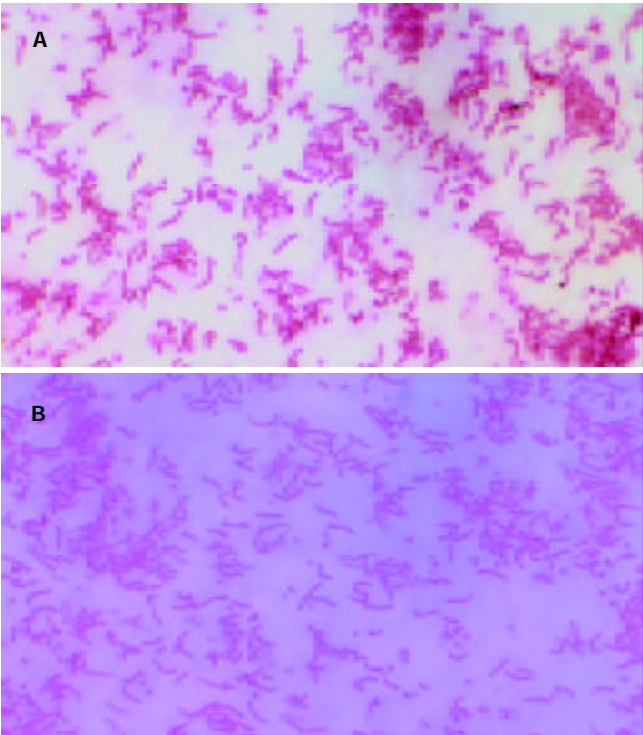


图1 H pylori 感染后 4 wk 小鼠胃部分离的 H pylori SS1 菌体形态. A: 标准株; B: 分离株.

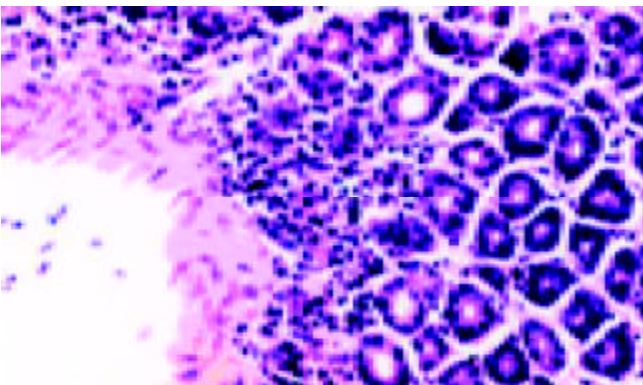


图2 H pylori 感染 24 wk 小鼠胃黏膜见大量淋巴细胞浸润(HE 染色)× 400.

表 1 菌落计数结果

小鼠类型		Balb/c			C57BL/6		
处理时间	处死小鼠只数	检出阳性只数	H pylori 菌数 / 克胃组织(mean±SD)		处死小鼠只数	检出阳性只数	H pylori 菌数 / 克胃组织(mean±SD)
4 wk	7	6	1.44 × 10 ⁶ ± 19.48		7	5	1.12 × 10 ⁶ ± 18.33
12 wk	7	7	1.25 × 10 ⁶ ± 25.61		7	6	1.53 × 10 ⁶ ± 32.41
24 wk	7	7	1.03 × 10 ⁶ ± 57.22		7	6	1.84 × 10 ⁶ ± 26.75

表2 H pylori 感染小鼠尿素酶检测结果

处理时间(wk)	尿素酶检测阳性(%)	
	Balb/c	C57BL/6
4	85.7	71.4
12	100	85.7
24	100	85.7

2.3 血清抗体测定 采用ELISA法检测小鼠血清中的抗H pylori IgG抗体水平. 其中抗原包被液为H pylori 超声粉碎抗原, 浓度为10 mg/L, 每孔各加100 μ L. 以对照组小鼠的血清作为对照, 一抗进行了1:1 000倍稀释, 二抗为HRP-兔抗鼠IgG抗体. 在各时间点H pylori 实验组血清中抗H pylori 的IgG抗体水平明显高于对照组($P < 0.01$), 说明小鼠已感染了H pylori (表3).

表3 H pylori 实验小鼠血清中抗H pylori IgG水平(mean \pm SD)

t/wk	对照组	H pylori 实验组
4	0.019 \pm 0.004	0.080 \pm 0.021
12	0.027 \pm 0.017	0.102 \pm 0.024
24	0.022 \pm 0.013	0.113 \pm 0.022

3 讨论

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)作为各种慢性胃病、慢性胃炎、消化性溃疡的重要病因, 已得到公认. 近年来世界各国对H pylori感染的免疫预防和免疫治疗的研究越来越重视, 而良好的动物感染模型的建立是该研究的前提基础. 尽管恒河猴、平顶猴、蒙古沙鼠及雪貂等是H pylori的天然宿主, 但由于受价格贵、数量少、饲养条件高等因素限制, 不适宜于做理想的动物模型研究^[20-23]. 迄今只有少数动物感染成功.

虽然国外采用某些实验动物如悉生小猪、胸腺机能正常或异常的无菌小鼠等做H pylori动物模型, 但这些动物不易大量获得, 也不能用于免疫学研究^[24-25]. 目前国际上公认的比较成熟的动物模型为Lee et al^[26]所建立的*Helicobacter felis* (Hf)小鼠模型, 但不能直接反应H pylori疫苗的效果, 不完全适用于H pylori疫苗免疫效果的评价. Karita et al^[27]也曾建立了H pylori的裸鼠感染模型, 而裸鼠本身免疫功能异常, 无法反映正常的免疫反应过程. 国内有诸多研究人员用不同的动物进行了感染模型的研究, 常用的有狗、大鼠、沙鼠等, 但感染率不是很理想, 并且感染的稳定性和重复性尚存在不同程度的问题^[28-30].

小鼠体型小、易繁殖、来源便利、属系多样, 是作为动物模型的较好材料^[31-35]. 我们经实验研究表明, 采用H pylori SS1菌株能成功感染Balb/c和C57BL/6小鼠, H pylori实验组胃黏膜匀浆液尿素酶检测试验结果: H pylori感染4 wk时Balb/c组阳性率为85.7%, C57BL/6组阳性率为71.4%, H pylori感染12 wk及24 wk

时, Balb/c组阳性率均为100%, C57BL/6组阳性率平均为85.7%, 并且能从感染小鼠分离到与H pylori标准菌株形态一致的菌落; 而对照组小鼠尿素酶检测为阴性, 且不能分离到典型H pylori菌落. 实验组动物胃窦部及胃体部均出现了轻度至中度慢性活动性胃炎变化, 而对照动物均未见炎症变化. 血清学IgG检查表明, 实验组动物产生了抗H pylori血清抗体, 而对照动物血清抗体阴性. 这里应指出的是, 在我们的实验中也出现了个别小鼠细菌分离阴性而血清抗体IgG检测呈阳性的情况, 我们初步分析原因为, 由于该鼠也同样经过了用H pylori菌液灌胃三次的实验步骤, 即至少说也经历了外源细菌的感染过程, 因而也产生了抗H pylori抗体. 只不过可能由于个体差异或其他原因, H pylori在其胃内没有能够长期定植和繁殖, 或者是由于定植密度太低而未能分离检测到.

以上结果表明, 我们已成功建立了H pylori的小鼠动物模型, 这对于H pylori的致病机制研究、疫苗开发研制等具有重要意义.

4 参考文献

- Shimoyama T, Fukuda Y, Sakagami T. The present status and problems of *Helicobacter pylori* eradication therapy with a special reference to gastric cancer. *Nippon Rinsho* 2003;61: 137-145
- Nishibayashi H, Kanayama S, Kiyohara T, Yamamoto K, Miyazaki Y, Yasunaga Y, Shinomura Y, Takeshita T, Takeuchi T, Morimoto K, Matsuzawa Y. *Helicobacter pylori*-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1384-1391
- Suleymanov Z. Expression of class I and II MHC receptors in *Helicobacter pylori*-positive patients with active gastritis and duodenal ulcer. *Turk J Gastroenterol* 2003;14:168-172
- Wong JE, Ito Y, Correa P, Peeters KC, van de Velde CJ, Sasako M, Macdonald J. Therapeutic strategies in gastric cancer. *Clin Oncol* 2003;21(23 Suppl):267s-269s
- Yanai A, Hirata Y, Mitsuno Y, Maeda S, Shibata W, Akanuma M, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. *Helicobacter pylori* induces antiapoptosis through nuclear factor-kappaB activation. *J Infect Dis* 2003;188:1741-1751
- Loughlin MF. Novel therapeutic targets in *Helicobacter pylori*. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:725-735
- Perri F, Qasim A, Marras L, O' Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):53-60
- Lamarque D, M Peek R Jr. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):21-30
- Nardone G, Morgner A. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):44-52
- Robertson MS, Clancy RL, Cade JF. *Helicobacter pylori* in intensive care: why we should be interested. *Intensive Care Med* 2003;29:1881-1888
- Watanabe H, Yamaguchi N, Kuwayama H, Sekine C, Uemura N, Kaise M, Nakamura T, Kubo M, Yoshida S, Haruma K, Inoue M, Shimatani T, Sanuki E, Mieno H, Kawanishi M, Nakazawa S, Tanaka T. Improvement in gastric histology following *Helicobacter pylori* eradication therapy in Japanese peptic ulcer patients. *J Int Med Res* 2003;31:362-369
- Leung WK, Graham DY. Ulcer and gastritis. *Endoscopy* 2001; 33:8-15
- Jimenez FP, Estevez MP. Role of cytokines in chronic gastritis

- by *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2001;31: 137-141
- 14 Tytgat G. *Helicobacter pylori*: past, present and future. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):G30-33
- 15 Fujioka T, Murakami K, Kodama M, Kagawa J, Okimoto T, Sato R. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma-from the view point of animal model. *Keio J Med* 2002;51(Suppl 2):69-73
- 16 Sugiyama T, Hige S, Asaka M. Development of an *H pylori*-infected animal model and gastric cancer: recent progress and issues. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 13):6-9
- 17 Enno A, O' Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol* 1995;147:217-222
- 18 Oyediji KS, Smith SI, Arigbabu AO, Coker AO, Ndububa DA, Agbakwuru EA, Atoyebi OA. Use of direct Gram stain of stomach biopsy as a rapid screening method for detection of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer and gastritis patients. *J Basic Microbiol* 2002;42:121-125
- 19 Ross JS, Bui HX, del Rosario A, Sonbati H, George M, Lee CY. *Helicobacter pylori*. Its role in the pathogenesis of peptic ulcer disease in a new animal model. *Am J Pathol* 1992;141:721-727
- 20 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Pajdo R, Drozdowicz D, Stachura J, Karczewska E, Hahn EG. Functional and morphological aspects of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in Mongolian gerbils. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:745-754
- 21 Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, Fox J. *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect Immun* 1990;58:2606-2612
- 22 Dubois A, Fiala N, Heman-Ackah LM, Drazek ES, Tarnawski A, Fishbein WN, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterology* 1994;106: 1405-1417
- 23 Kagawa J, Honda S, Kodama M, Sato R, Murakami K, Fujioka T. Enterocromaffin-like cell tumor induced by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002;7:390-397
- 24 Sjunnesson H, Sturegard E, Hynes S, Willen R, Feinstein R, Wadstrom T. Five month persistence of *Helicobacter pylori* infection in guinea pigs. *APMIS* 2003;111:634-642
- 25 Cantorna MT, Balish E. Inability of human clinical strains of *Helicobacter pylori* to colonize the alimentary tract of germfree rodents. *Can J Microbiol* 1990;36:237-241
- 26 Lee A, Chen M, Coltro N, O' Rourke J, Hazell S, Hu P, Li Y. Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter species* does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Zentralbl Bakteriell* 1993;280:38-50
- 27 Karita M, Kouchiyama T, Okita K, Nakazawa T. New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1596-1603
- 28 Fujiwara Y, Higuchi K, Tominaga K, Matsuo T, Watanabe T, Uchida T, Saeki Y, Arakawa T, Tarnawski A. Effect of *Helicobacter pylori* culture supernatant on acute reflux esophagitis in a rat model. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1611-1615
- 29 Yao YL, Xu B, Song YG, Zhang WD, Zhang YL, Zhang ZS. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric mucosal cell proliferation in Mongolian gerbils. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2002;22:348-350
- 30 Yan J, Hu AP, Li Q. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in Mongolian gerbil. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixueban* 2003;32:21-23
- 31 Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *A PMIS* 2003;111:514-522
- 32 Harris AG, Wilson JE, Danon SJ, Dixon MF, Donegan K, Hazell SL. Catalase (KatA) and KatA-associated protein (KapA) are essential to persistent colonization in the *Helicobacter pylori* SS1 mouse model. *Microbiology* 2003;149(Pt 3):665-672
- 33 Rabelo-Goncalves EM, Nishimura NF, Zeitune JM. Acute inflammatory response in the stomach of Balb/c mice challenged with coccoidal *Helicobacter pylori*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:1201-1206
- 34 Kim DH, Kim SW, Song YJ, Oh TY, Han SU, Kim YB, Joo HJ, Cho YK, Kim DY, Cho SW, Kim MW, Kim JH, Hahm KB. Long-term evaluation of mice model infected with *Helicobacter pylori*: focus on gastric pathology including gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18(Suppl 1):14-23
- 35 Han SU, Kim YB, Joo HJ, Hahm KB, Lee WH, Cho YK, Kim DY, Kim MW. *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis in a mice model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:253-261

World Journal of Gastroenterology 以国际最优秀的期刊为目标

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将完全按照国际标准办刊, 从收稿到出版的管理, 已完全实现市场化, 以质量为本. 从收稿到出版或退稿, 以公正科学的态度处理每一份稿件. 在学术水平和编辑质量方面以国际最优秀的期刊为目标. WJG 争取在国家、作者、读者, 全体编委和社会的大力支持下, 办成一份国际本专业具有突出影响的学术期刊.

幽门螺杆菌对胃上皮细胞Cox-2表达与凋亡的影响

余 琴, 刘南植, 龚建平

余琴, 刘南植, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科
湖北省武汉市 430030
龚建平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科
湖北省武汉市 430030

余琴, 女, 1977-04 生, 湖北省宜昌市人, 汉族. 1998 年湖北医科大学本科
毕业, 2003 年华中科技大学同济医学院硕士毕业, 主要从事胃癌的研究.

项目负责人: 刘南植, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科
技大学同济医学院附属同济医院消化内科.

电话: 027-83663611

收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-11-13

Cyclooxygenase-2 expression in gastric mucosal cells with *H pylori* infection and its relationship with apoptosis

Qin Yu, Nan-Zhi Liu, Jian-Ping Gong

Qin Yu, Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital,
Tongji Medical College, Hua Zhong University of Science and Technology,
Wuhan 430030, Hubei Province, China

Jian-Ping Gong, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji
Medical College, Hua Zhong University of Science and Technology,
Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology,
Tongji Hospital, Tongji Medical College, Hua Zhong University of Science and
Technology, 1095 Jie Fang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Received: 2003-09-15 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To investigate the expression of Cox-2 in MKN28 and AGS gastric cells and gastric mucosal lesions with *H pylori* infection, to determine whether Cox-2 gene expression by *H pylori* infection could influence gastric cell apoptosis and to identify the relationship between Cox-2 and gastric carcinoma.

METHODS: The total *H pylori* proteins of various concentrations were incubated with MKN28 and AGS gastric cells *in vitro*. RT-PCR and S-P immunohistochemical staining were used to detect the expression of Cox-2 before and after the incubation. 40 patients who underwent endoscopy were detected with S-P method. Apoptosis induced by *H pylori* or selective Cox-2 inhibitor NS-398 or both was characterized by cell cycle kinetics with flow cytometry.

RESULTS: Expression of Cox-2 in MKN28 gastric mucosal cells incubated with *H pylori* was significantly higher than that in non-incubated cells. Expression of Cox-2 protein in MKN28 gastric cells before and after incubated with *H pylori* was 0.26 and 0.40 respectively ($P < 0.05$), but in AGS gastric cells, the expression of Cox-2 protein was 0.29 and 0.31 before and after the incubation ($P > 0.05$). Expression of Cox-2 protein in gastric carcinoma (GC) was higher than that in chronic superficial gastritis (CSG) and chronic atrophic gastritis (CAG) ($P < 0.05$). The apoptosis rate when cells were incubated with *H pylori* for 24h and 48h was 1.0% and 5.7% ($P < 0.05$). Apoptosis cells were also observed

after treated with 10, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 for 24 h and 48 h, and apoptosis rate was 1.2%, 14.0% and 27.5%, and 1.5%, 31.4% and 51.8% respectively. However, the apoptosis induced by *H pylori* and NS-398 was lower than that induced by NS-398 alone ($P < 0.01$).

CONCLUSION: *H pylori* upregulates Cox-2 expression in MKN28 gastric mucosal cells *in vitro*. Cox-2 can inhibit the apoptosis, which may promote gastric carcinogenesis.

Yu Q, Liu NZ, Gong JP. Cyclooxygenase-2 expression in gastric mucosal cells with *H pylori* infection and its relationship with apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):630-634

摘要

目的: 研究 Cox-2 在胃癌细胞中及胃黏膜组织中表达的意义, 探讨其表达与胃上皮细胞凋亡的关系.

方法: 将粗制 *H pylori* 总蛋白与胃上皮细胞株 MKN28, AGS 共同孵育, 用 RT-PCR 及免疫组化染色法测定孵育前后细胞 Cox-2 表达的情况, 同时检测了 40 例患者胃镜活检胃黏膜病变标本的 Cox-2 蛋白的表达及 *H pylori* 感染情况. 用流式细胞术观察 *H pylori*、选择性 Cox-2 抑制剂 NS-398 及二者共同诱导细胞凋亡的情况.

结果: 与 *H pylori* 孵育后的 MKN28 细胞株中 Cox-2 表达增加; Cox-2 蛋白在与 *H pylori* 共同孵育前后的 MKN28 细胞株中表达强度分别为 0.26 和 0.40 ($P < 0.05$), AGS 细胞中为 0.29 和 0.31 ($P > 0.05$); Cox-2 在胃癌中的表达明显高于浅表性胃炎(CSG)、萎缩性胃炎(CAG)组 ($P < 0.05$). 流式显示, 与 *H pylori* 孵育 24, 48 h MKN28 细胞凋亡率分别为 1.0% 和 5.7% ($P < 0.01$); 与 10, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 孵育 24 h 及 48 h 的 MKN28 细胞凋亡率分别为 1.2%, 14.0%, 27.5% 及 1.5%, 31.2%, 51.8%, 具有浓度、时间依赖性 ($P < 0.01$). 与 *H pylori*, NS-398 共同孵育 24, 48h 的 MKN28 细胞凋亡率分别为 12.2%, 25.0%, 其凋亡率低于单用 NS-398 ($P < 0.01$).

结论: *H pylori* 感染上调 MKN28 细胞中 Cox-2 的表达; Cox-2 基因可抑制细胞凋亡, 在胃癌发生发展过程中起重要作用, 可能为胃癌形成的机制之一.

余琴, 刘南植, 龚建平. 幽门螺杆菌对胃上皮细胞 Cox-2 表达与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):630-634

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/630.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)作为 I 类致癌因

子, 已得到公认^[1-4], 但尚无证据阐明 H pylori 感染如何引起胃癌的发生. H pylori 感染可诱导 Cox-2 的表达^[5-8], 并被认为是 H pylori 感染增加胃癌发生危险性的可能机制之一. Cox-2 过表达可引起局部产生较多的前列腺素 (PGs), 同时他可作为分化和生长因子, 发挥类似免疫抑制剂及血管合成药物样作用, 促进肿瘤的增生发展^[9-12]. 研究表明, NSAID 药物的使用可以降低胃肠道肿瘤的发生^[13-16], NSAID 的作用靶点是 Cox, 即花生四烯酸转化成前列腺素代谢中的限速酶, 其至少有两种亚型, Cox-1 是一种看家基因, 其产生的前列腺素与胃肠道黏膜的完整性相关; Cox-2 则是一种早期诱导基因, 其与炎症及肿瘤发生相关. 为此, 研究了 H pylori 感染胃上皮细胞及胃黏膜病变 Cox-2 表达情况及其细胞生物学行为, 观察 H pylori, 不同浓度的选择性 Cox-2 抑制剂 NS-398 及二者共同诱导细胞凋亡的情况, 并对其凋亡的动力学及机制进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞 MKN28(管状腺癌)由上海第二医科大学惠赠, AGS 细胞(腺癌)购于中科院上海细胞生物研究所. 胃镜活检 40 例作胃黏膜组织学检查, 其中慢性浅表性胃炎(CSG)7 例, 慢性萎缩性胃炎(CAG)7 例, 肠化(IM)10 例, 异型增生(Dys)6 例, 胃癌(GC)10 例, 其中低分化腺癌 2 例, 高分化腺癌 2 例, 黏液细胞癌 4 例, 印戒细胞癌 2 例.

1.2 方法 人胃腺癌细胞系 MKN28, AGS 生长于 RPMI1640 培养液中, 按贴壁细胞传代培养法, 胰酶消化每 2-3 d 传代 1 次. 自胃溃疡患者活检胃黏膜组织中分离 H pylori, 37 °C 微需氧环境(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂)培养. 将其超声粉碎(60 μA × 5 min × 3 次, 间隔 15 s), 20 000 r/min 离心 20 min, 取上清. 调整细胞浓度为 1 × 10⁹/L, 加入相当于 10¹¹CFU/L 活菌量的 H pylori 粗制总蛋白, 再加入 RPMI1640 2 mL, 放入 37 °C 孵育 24 h, 以不加 H pylori 的等体积的培养液为对照. RT-PCR: Cox-2 上游引物序列: 5'-TCTGGTGCCTGGTCTGATGATGTA-3'; 下游引物序列为: 5'-CAGAAGGGGATGCCAGTGATAGAG-3'. 用 Trizol 法提取总 RNA, 并进行逆转录. 待细胞与不同浓度的粗制 H pylori 总蛋白(相当于 10⁹-10¹¹CFU/L 的活菌量)孵育 24 h 后, 用 SP 法检测 Cox-2 蛋白的表达. 同法检测 40 例胃镜标本中 Cox-2 蛋白表达的情况. 调整细胞浓度为 1 × 10⁹/L, 加入相当于 10¹¹CFU/L 活菌量的 H pylori, 不同浓度的 NS-398(10, 100, 200 μmol/L)及 H pylori +NS-398 (10, 100, 200 μmol/L), 以不加 H pylori 及 NS-398 的空白细胞为对照. 分别于培养 24, 48 h 后, PI 染色(含 Rnase 100 mg/L)上机测定凋亡细胞百分率及细胞同期.

统计学处理 所有实验数据以 mean±SD 表示. 采用 t 检验和精确概率法检验, 率的显著性差异检验选用方差分析, P < 0.05 认为差异有显著性.

2 结果

2.1 MKN28 细胞 Cox-2 表达 MKN28 细胞的 RT-PCR 产物经电泳分析, 可见 1 条约 314 bp 的扩增带, 特异性好, 阴性对照无相应条带出现. 在与 H pylori 总蛋白孵育前后的平均 Cox-2/β-actin 为 0.2698 ± 0.0124 和 0.6720 ± 0.0206, 提示 Cox-2 mRNA 在孵育后的细胞中表达水平增强(P < 0.05, 图 1). MKN28 细胞分别与相当于 10¹¹, 10¹⁰, 10⁹CFU/L 的 H pylori 粗制总蛋白孵育 24 h 的平均吸光度为 0.40 ± 0.13, 0.40 ± 0.08 和 0.30 ± 0.14; 未与 H pylori 孵育的 MKN28 Cox-2 表达的平均吸光度为 0.26 ± 0.18, 与 10¹¹, 10¹⁰CFU/L H pylori 孵育后 Cox-2 的表达相差显著(P < 0.05)(图 2, 3).

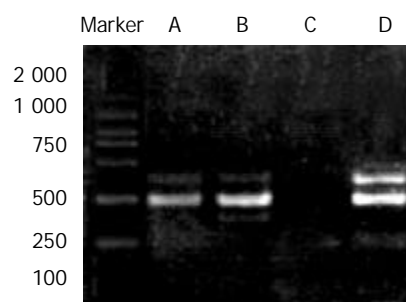


图 1 MKN28 细胞 Cox-2 mRNA 表达. A, B: 未与 H pylori 孵育; C: 空白对照; D: 与 H pylori 孵育后.

2.2 AGS 细胞 Cox-2 表达 AGS 细胞未与 H pylori 孵育及与相当于 10¹¹, 10¹⁰, 10⁹CFU/L 的 H pylori 粗制总蛋白孵育 24 h 的平均吸光度分别为 0.29 ± 0.22, 0.30 ± 0.19, 0.32 ± 0.24, 0.31 ± 0.15 (P > 0.05)(图 4, 5).

2.3 胃黏膜 Cox-2 蛋白表达 CSG, CAG, IM, Dys 及 GC 中 Cox-2 表达呈平行递增趋势, GC 与 CSG, CAG 中的表达差异有显著性(P < 0.05, 表 1). Cox-2 主要表达在胃癌细胞中, 血管平滑肌细胞, 成纤维细胞, 炎性单核细胞及肠化上皮, 不典型增生腺上皮细胞亦表达, 胞质显色, 弥漫性分布; 胃炎, IM, Dys 中 H pylori 感染率与 GC 中 H pylori 感染率差异有显著性(P < 0.05)(图 6-12).

表 1 胃黏膜 Cox-2 蛋白的表达及 H pylori 感染率

病变	n	Cox-2 表达	H pylori 感染 n (%)
GC	10	10 (100)	0 (0.0)
Dys	6	5 (83.3)	4 (66.7)
IM	10	8 (80.0)	6 (60.0)
CAG	7	4 (57.1)	6 (85.7)
CSG	7	2 (28.6)	6 (85.7)

2.4 MKN28 细胞凋亡 H pylori 可诱导 MKN28 细胞的凋亡, 且具有时间依赖性(表 2), NS-398 亦可诱导 MKN28 细胞的凋亡, 具有时间、剂量依赖性(表 3), H pylori+NS-398 对 MKN28 细胞凋亡, 也具有时间、剂量依赖性(表 4), 但其凋亡率低于单纯 NS-398 组.

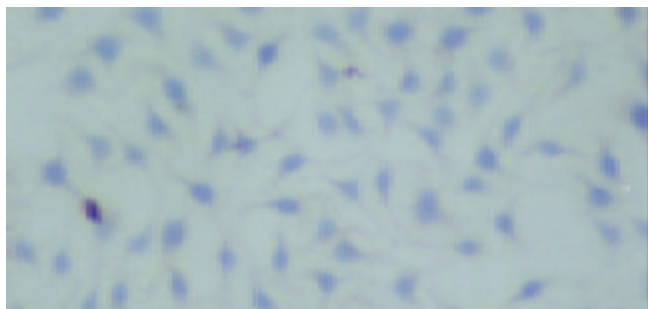


图2 未与 H pylori 孵育×100.

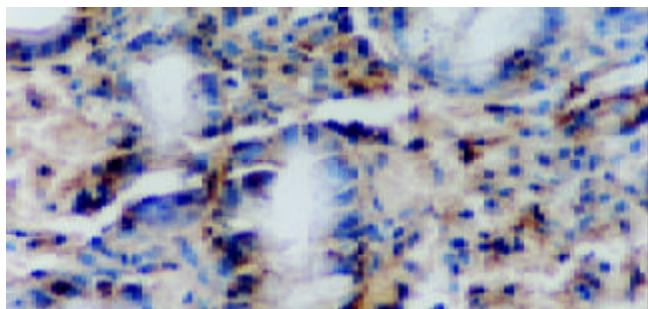


图7 CAG×200.

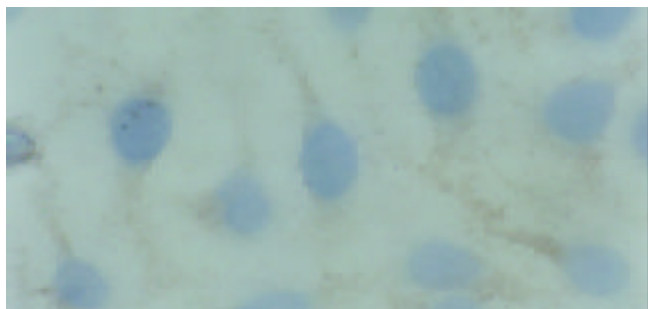


图3 与 H pylori 孵育后×400.

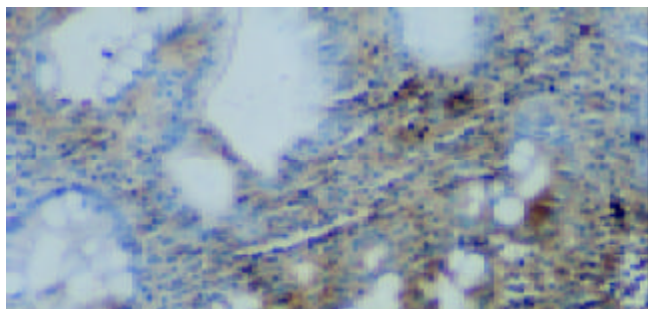


图8 IM×200.

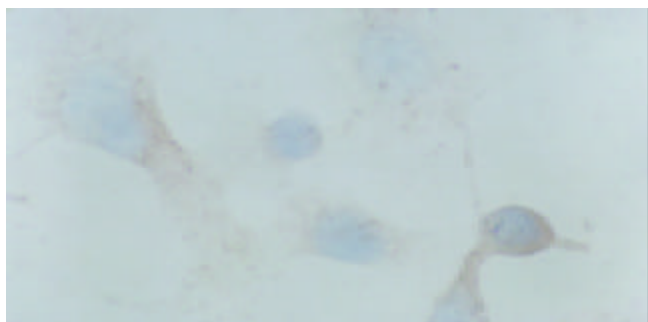


图4 未与 H pylori 孵育×400.

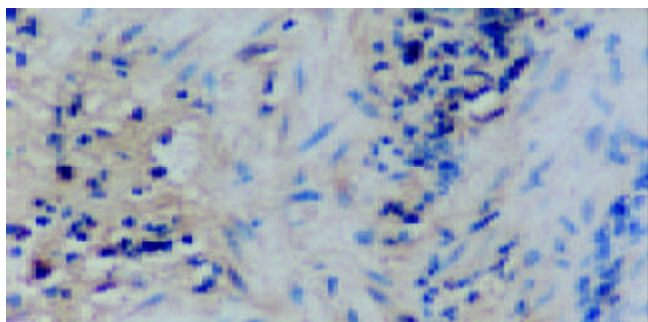


图9 DYS×200.

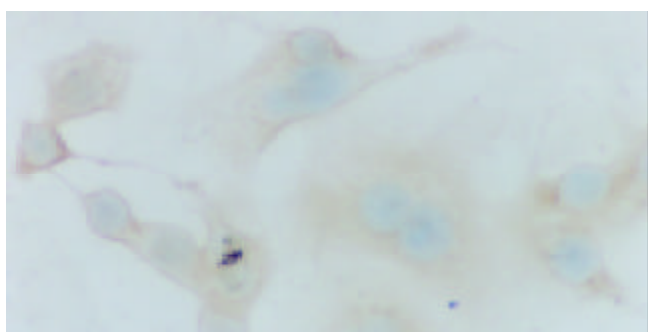


图5 与 H pylori 孵育×400.

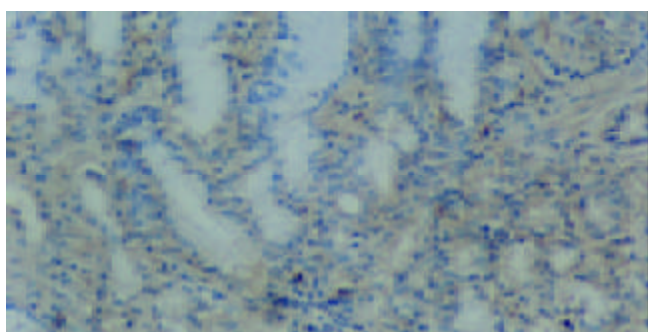


图10 腺癌×100.

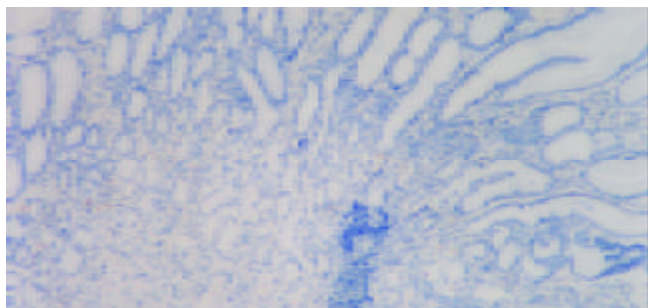


图6 CSG×100.

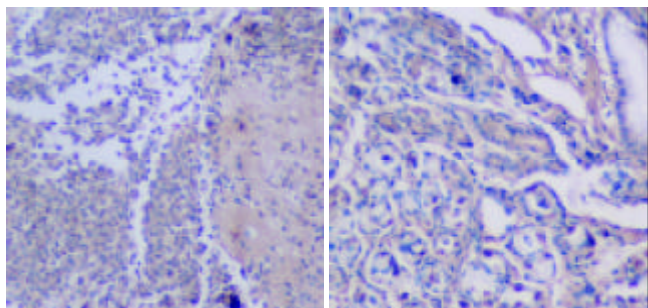


图11 黏液细胞癌×100.

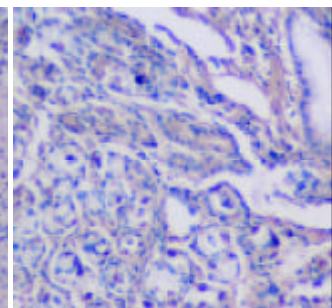


图12 印戒细胞癌×100.

表2 H pylori 诱导 MKN28 细胞的凋亡(%)

	凋亡率	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	0.4 ± 0.2	50.8 ± 2.1	27.6 ± 1.8	21.8 ± 1.6
24 h	1.0 ± 0.3	58.7 ± 2.5	19.3 ± 1.6	21.5 ± 0.9
48 h	5.7 ± 1.1 ^b	58.3 ± 1.9	17.2 ± 2.1	19.2 ± 1.4

^bP < 0.01, vs 对照组.

表3 NS-398 诱导 MKN28 细胞的凋亡(%)

NS-398	凋亡率	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 h				
对照	0.5 ± 0.3	51.1 ± 2.6	29.5 ± 1.6	19.9 ± 2.8
10 μmol/L	1.2 ± 0.8	48.1 ± 3.0	28.1 ± 2.1	23.0 ± 1.9
100 μmol/L	14.0 ± 2.1 ^{bd}	44.8 ± 2.3	15.5 ± 0.9	26.6 ± 1.3
200 μmol/L	27.5 ± 1.5 ^{bd}	34.9 ± 0.8	5.8 ± 2.2	32.4 ± 2.3
48 h				
对照	1.0 ± 0.5	55.3 ± 3.0	23.0 ± 1.7	21.2 ± 2.2
10 μmol/L	1.5 ± 1.1	53.5 ± 2.6	22.9 ± 1.8	22.7 ± 2.7
100 μmol/L	31.2 ± 2.5 ^b	33.1 ± 2.8	15.3 ± 0.9	20.9 ± 2.0
200 μmol/L	51.8 ± 2.2 ^b	25.2 ± 1.4	8.2 ± 1.9	15.4 ± 3.0

^bP < 0.01, vs 对照组, 10 μmol/L 组; ^dP < 0.01, vs 48 h 100 μmol/L 及 200 μmol/L 组.

表4 H pylori+ NS-398 诱导 MKN28 细胞的凋亡(%)

NS-398	凋亡率	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 h				
对照	0.5 ± 0.3	51.1 ± 2.3	29.5 ± 1.6	19.9 ± 2.8
100 μmol/L	1.5 ± 0.8 ^d	49.6 ± 2.9	11.6 ± 2.6	37.5 ± 3.1
200 μmol/L	2.2 ± 2.2 ^{bd}	40.4 ± 1.7	8.4 ± 1.2	39.5 ± 3.2
48 h				
对照	1.0 ± 0.5	55.3 ± 3.0	23.0 ± 1.7	21.2 ± 2.2
100 μmol/L	4.5 ± 1.6	61.1 ± 3.1	9.4 ± 0.9	25.2 ± 2.3
200 μmol/L	25.0 ± 2.5 ^b	30.7 ± 2.4	17.6 ± 0.5	27.3 ± 2.2

^bP < 0.01, vs 对照组, H pylori+ 100 μmol/L 组; ^dP < 0.01, vs 48 h H pylori+ 100 μmol/L 及 H pylori+200 μmol/L 组.

3 讨论

H pylori 感染与 GC 发生关系密切^[17-23], 而 Cox-2 是黏膜炎症和上皮细胞生长的重要调节物, 该基因表达是对 H pylori 感染直接的反应^[5-6, 24-27]. 因此, Cox-2 的表达可能参与了 H pylori 相关胃炎向癌前病变和胃癌的演变过程. 我们发现, H pylori 感染可上调 MKN28 细胞中 Cox-2 的表达, 且具有浓度依赖性, 当 H pylori 小于或等于 10⁹CFU/L 时, 对 MKN28 Cox-2 的表达并无明显影响; H pylori 对 AGS 细胞中 Cox-2 表达无明显影响, 这可能与不同胃上皮细胞中 Cox-2 启动子甲基化水平相关. Akhtar et al^[28]研究了 H pylori 感染的胃上皮细胞

中 Cox-2 启动子甲基化对 Cox-2 表达及其活性的影响. MKN28 细胞中的 Cox-2 启动子是未甲基化的, 而 AGS 细胞中 Cox-2 启动子是甲基化的. 用 H pylori 刺激 Cox-2 启动子未甲基化的 MKN28 细胞, 其 Cox-2 表达明显增加, 而用 H pylori 刺激 Cox-2 启动子甲基化的 AGS 细胞, 其 Cox-2 表达无明显增加. 但当用 H pylori 感染经去甲基化药物处理后的 AGS, Cox-2 表达呈 5-10 倍地增加, 表明 Cox-2 启动子甲基化的缺失可能促进了 Cox-2 表达和 H pylori 感染诱导胃癌的发生. 胃上皮细胞 Cox-2 启动子甲基化的缺失可能 H pylori 感染诱发胃癌的一个中心事件, 可促进 Cox-2 表达导致细胞凋亡和增生的失衡^[29-31].

本结果表明, 从 CSG → CAG → IM → Dys → GC, Cox-2 表达率增加, 可能为胃癌形成的早期事件. CSG, CAG, IM, Dys 中 H pylori 感染率与 GC 中 H pylori 感染率差异有显著性, 这与胃癌所致胃内 H pylori 生存环境改变有关. 如果 Cox-2 为胃肿瘤形成的早期事件, 则胃内炎症及 H pylori 感染为胃癌的更早期事件. H pylori 感染致炎症, 产生大量的炎症因子激活 Cox-2, 这可能为诱发癌变的机制之一. Cox-2 除了使细胞凋亡、增生失衡外, 还可促进肿瘤细胞相关血管的生成, 增加癌细胞的侵袭性, 激活基质金属蛋白酶 2 降解细胞外基质, 产生促血小板凝集的血栓烷等, 从而有助于肿瘤的侵袭和转移^[32]. 在体外, H pylori 粗制总蛋白可诱导细胞凋亡, 并且孵育时间越长, 细胞凋亡越多. 选择性 Cox-2 抑制剂 NS-398 能有效地促进 MKN28 细胞的凋亡, 且具有时间、浓度依赖性. 作用 24 h 时, 其凋亡率不很明显, 但细胞周期明显受阻, 停滞于 G₂ 期; 作用 48 h 时, 其凋亡率明显升高. 不同浓度 NS-398 对细胞凋亡影响亦不相同. 当用小剂量(10 μmol/L)作用时, 细胞凋亡不明显, 细胞周期受阻也不明显, 提示 10 μmol/L NS-398 并不能有效抑制 Cox-2, 诱导细胞凋亡; 而 100, 200 μmol/L NS-398 使 MKN28 细胞凋亡明显增加. 我们还发现, 尽管 H pylori 或 NS-398 单因素均可促进 MKN28 细胞的凋亡, 但二者同时作用于细胞时, 并未出现凋亡增加的情况, 相反, 其凋亡率竟远低于单纯用药组, 但其 G₂ 阻滞明显增加. 可能是由于 H pylori 感染上调了细胞 Cox-2 的表达, 而 Cox-2 促进了细胞的增生, 抑制了凋亡, 所以加同浓度的 Cox-2 抑制剂时, 其凋亡少于仅加同剂量的用药组.

总之, 我们认为 H pylori 感染增加胃癌发生的危险性, 可能与其上调 Cox-2 表达及其相关事件有关. 选择性 Cox-2 抑制剂的上市可望为胃癌的 NSAID 化学预防提供有利优势^[33-34].

4 参考文献

- Wang KX, Wang XF, Peng JL, Cui YB, Wang J, Li CP. School of medicine, Anhui university of science and technology, Huainan, Anhui Province, China. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2501-2504

- 2 Yang GB, Hu FL, Lu YY. Department of gastroenterology, first hospital, peking university, Beijing, China. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1331-1335
- 3 Li BQ, Zhang JZ, Zou QH, He LH, Yan XM. Department of diagnosis, Institute for communicable disease control and prevention, chinese center for disease control and prevention, Beijing, China. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2003;24:439-442
- 4 Bergin IL, Sheppard BJ, Fox JG. Division of comparative medicine, Massachusetts institute of technology, Cambridge, Massachusetts USA. *Dig Dis Sci* 2003;48:475-485
- 5 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Cancer institute, the first hospital, china medical university, shenyang 110001, liaoning province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 6 Guo X, Wang L, Yuan Y. Cancer institute, the first clinical college, china medical university, Shenyang, China. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:868-871
- 7 Wambura C, Aoyama N, Shirasaka D, Sakai T, Ikemura T, Sakashita M, Maekawa S, Kuroda K, Inoue T, Ebara S, Miyamoto M, Kasuga M. Second department of internal medicine and department of endoscopy, kobe university school of medicine, Japan. *Helicobacter* 2002;7:129-138
- 8 Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, Acquaviva AM, Del Vecchio Blanco C, Bruni CB, Zarrilli R. Dipartimento di biologiae patologia cellulare e molecolare "L. califano", universita federico ii, via pansini, napoli, Italy. *J Biol Chem* 1998;273:28560-28563
- 9 Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Second department of surgery, tokyo medical and dental university, Tokyo, Japan. *Cancer* 2001;91:1876-1881
- 10 Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Department of internal medicine, chonnam national university medical school, gwangju, Korea. *Clin Gastroenterol* 2003;37:28-33
- 11 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Department of gastroenterology, the first affiliated hospital, anhui medical university, anhui province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- 12 Yu HG, Li JY, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. Department of gastroenterology, renmin hospital of wuhan univeristy, jiefang road 238, China. *Cancer Lett* 2003;195:43-51
- 13 Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Department of gastroenterology, first hospital, peking university, beijing, China. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1784-1791
- 14 Sorensen HT, Friis S, Norgard B, Mellemkjaer L, Blot WJ, McLaughlin JK, Ekbohm A, Baron JA. Department of clinical epidemiology, aarhus university and aalborg hospital, denmark. *Br J Cancer* 2003;88:1687-1692
- 15 Bosetti C, Gallus S, La Vecchia C. Istituto di ricerche farmacologiche "Mario negri", via eritrea 62, milan, Italy. *Eur J Cancer Prev* 2002;11:535-542
- 16 Akre K, Ekstrom AM, Signorello LB, Hansson LE, Nyren O. Department of medical epidemiology, karolinska institutet, Sweden. *Br J Cancer* 2001;84:965-968
- 17 Huang JQ, Hunt RH. Department of medicine, division of gastroenterology, mcmaster university medical centre, hamilton, Canada. *Can J Gastroenterol* 2003;17(Suppl B):18B-20B
- 18 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwieciencin S, Pajdo R, Drozdowicz D, Stachura J, Karczewska E, Hahn EG. Department of medicine i, university of erlangen-nuremberg, erlangen, Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:745-754
- 19 Akre K, Ekstrom AM, Signorello LB, Hansson LE, Nyren O. Department of medical epidemiology, karolinska institutet, Sweden. *J Epidemiol* 2003;13:162-168
- 20 Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Unite de programmation moleculaire et de toxicologie genetique, institut pasteur, paris, France. *Gastroenterology* 2003;124:1408-1419
- 21 Sasaki A, Kitadai Y, Ito M, Sumii M, Tanaka S, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Dept. of medicine and molecular science, graduate school of biomedical sciences, hiroshima university, hiroshima, Japan. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:153-158
- 22 Chen X, Wang MW, You WD. Department of gastroenterology, general hospital of PLA, Beijing, 100853, P.R. China. *Ai Zheng* 2003;22:244-247
- 23 Takeuchi K, Ohno Y, Tsuzuki Y, Ando T, Sekihara M, Hara T, Kuwano H. Department of surgery, tone chuo hospital, gunma, Japan. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:321-324
- 24 Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco Cdel V, Ricci V, Ciardiello F, Romano M. Dipartimento di internistica clinica e sperimentalecattedra di gastroenterologia, seconda universita di napoli, Italy. *Clin Cancer Res* 2003;9:2015-2021
- 25 Seo JH, Kim H, Kim KH. Department of pharmacology and institute of gastroenterology, brain korea 21 project for medical science, yonsei university college of medicine, Korea. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:477-480
- 26 Kim H, Lim JW, Kim KH. Dept. of pharmacology and institute of gastroenterology, yonsei university college of medicine, Korea. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:706-716
- 27 Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. First department of medicine, hamamatsu university school of medicine, hamamatsu, Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:875-886
- 28 Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, Ashktorab H, Smoot DT, Meltzer SJ, Wilson KT. Department of medicine, university of maryland school of medicine and veterans affairs maryland health care system, USA. *Cancer Res* 2001;61:2399-2403
- 29 Yu J, Leung WK, Lee TL, Tse PC, To KF, Sung JJ. Department of medicine and therapeutics, prince of wales hospital, the chinese university of Hong Kong, China. *Int J Oncol* 2003;22:1025-1031
- 30 Kikuchi T, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hosokawa M, Imai K. First department of internal medicine, sapporo medical university, Japan. *Int J Cancer* 2002;97:272-277
- 31 Song SH, Jong HS, Choi HH, Inoue H, Tanabe T, Kim NK, Bang YJ. Cancer research institute, seoul national university college of medicine, Korea. *Cancer Res* 200;61:4628-4635
- 32 Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Department of internal medicine, chonnam national university medical school, Korea. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:28-33
- 33 Tang C, Wang C, Tang L. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, China. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:373-377
- 34 Li JY, Wang XZ, Chen FL, Yu JP, Luo HS. Department of gastroenterology, affiliated union hospital, fujian medical university, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:915-920

先天性巨结肠症 RET 和 EDNRB 基因的突变

魏明发, 王 果, 朱 珉, 易 斌, 王小林, 韩 杰, 史慧芬

魏明发, 王果, 朱珉, 易斌, 王小林, 韩杰, 史慧芬, 华中科技大学同济医学院同济医院小儿外科 湖北省武汉市 430030
魏明发, 男, 1951-07-09 生, 湖北省京山人, 汉族, 教授, 主任医师, 硕士生导师。主要从事小儿普外及消化道畸形的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 39670746
卫生部科学基金(卫科教规划《1998》第 55 号)资助, No.55
项目负责人: 魏明发, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院同济医院小儿外科。mfwei@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663405 传真: 027-83646605
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-30

Mutation of RET oncogene and endothelin B receptor gene in Hirschsprung's disease

Ming-Fa Wei, Guo Wang, Min Zhu, Bin Yi, Xiao-Lin Wang, Jie Han, Hui-Fen Shi

Ming-Fa Wei, Guo Wang, Min Zhu, Bin Yi, Xiao-Lin Wang, Jie Han, Hui-Fen Shi, Department of Pediatric Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670746 and the Science Foundation of Ministry of Health, No. 55
Correspondence to: Dr Ming-Fa Wei, Department of Pediatric Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. mfwei@tjh.tjmu.edu.cn.
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-07-30

Abstract

AIM: To clarify the relationship between the mutation of RET and EDNRB genes and Chinese patients with Hirschsprung's disease (HD), and to investigate whether the two genes mutation concurred in the disease.

METHODS: Patients with HD were divided into RET/EDNRB group (group A, 56 cases) and EDNRB group (group B, 40 cases) at random. Healthy children were used as controls (group C, 56 and 40 cases). Genomic DNA was obtained from peripheral blood, then the exons 6, 13, 15 and 17 of RET gene and the exons 4, 5 and 6 of EDNRB gene were analyzed for gene mutation. The mutation products were automatically sequenced.

RESULTS: In group A, two heterozygous mutations at exons 17 and 13 were discovered in 2 sporadic HD patients. Direct DNA sequence analysis identified gene polymorphisms, which showed CTG → CTT, and Leu769 → Leu. The sporadic mutation rate was 4% (2/48). Two heterozygous mutations were discovered in 2 familial HD patients at exon 15. DNA sequence analysis displayed a missense mutation Lys889 → Thr in one patient and two silent mutation at codons V906 and S909 in another (GTGAAGAGGAGCCA → GTTAAGAGGAGTCA). The familial mutation rate was 25% (2/8). One heterozygous mutation of EDNRB gene at exon 5 in a sporadic short segmental patient failed to sequence.

In group B, one heterozygous mutation was discovered in a sporadic short segmental patient. DNA sequence showed a G to A transversion at nucleotide 831, which resulted in a silent mutation Leu 277 → Leu. The mutation rate was 2.7% (1/37). No mutation was detected in three familial HD patients. In group C, RET and EDNRB genes were identified no mutation. The difference of the RET gene mutation between the familial and sporadic patients by statistical analysis was $\chi^2=4.95$ ($P<0.05$), oddsratio (OR)=8; 95% CI = 1.28-49.87.

CONCLUSION: The mutation of RET and EDNRB genes reliably has correlated with the pathogenesis of HD. The RET gene mutation rate in familial HD patients is 25% and majority of sporadic cases have mutation in EDNRB gene. No HD patient has the two genes mutation at the same time. The risk of familial patients to get HD is 8 times higher than that of sporadic patients, and the confidence interval is 95%.

Wei MF, Wang G, Zhu M, Yi B, Wang XL, Han J, Shi HF. Mutation of RET oncogene and endothelin B receptor gene in Hirschsprung's disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):635-638

摘要

目的: 了解中国人群先天性巨结肠症(HD)发病与 RET 基因, EDNRB 基因突变的关系, 及同一患者是否两个基因同时突变的状况。

方法: 随机将 HD 患者分 2 组, 即检测 RET/EDNRB 组(A 组)56 例及 EDNRB 组(B 组)40 例, 同时设二个相同数量对照组(C 组)。每人采集外周静脉血 2-3 mL 经盐析法提取 DNA 后, 应用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)方法, 对 RET 基因 20 个外显子中的第 6, 13, 15, 17 外显子(E6, 13, 15, 17)和 EDNRB 基因 7 个外显子中的第 4, 5, 6 外显子(E4, 5, 6)进行基因突变的检测, 将突变样品进行自动测序分析。

结果: A 组中 2 例散发性患者的 E13, E17 扩增片段在 SSCP 分析时有泳动变位, 并经 DNA 自动测序仪检测为基因多态, CTG → CTT, Leu769 → Leu, 散发性突变频率为 4% (2/48); 2 例家族性患者的 E15 扩增片段在 SSCP 分析有泳动变位, DNA 测序 1 例为错义突变 Lys889 → Thr, 另 1 例为两个同义突变 GTGAAGAGGAGCCA → GTTAAGAGGAGTCA 分别在 V906 和 S909 密码子上, 家族性突变频率为 25% (2/8); 1 例散发性短段型患者 EDNRB 基因 E5 在 SSCP 分析时有泳动变位未能测序; B 组中 1 例散发性短段型患者 EDNRB 基因的 E4 在 SSCP 分析有泳动变位, 经 DNA 测序证实核苷酸位点 831, 密码 277 上 G → A 的置换,

Leu277 → Leu 为同义突变, 突变频率为 2.7%(1/37), 家族性 3 例患者未检测出突变. C 组未检出 RET, EDNRB 基因的突变. 家族性患者与散发性患者 RET 突变结果经统计学处理 $\chi^2=4.95$, $P < 0.05$, $OR=8$, $OR95CI=1.28-49.87$.

结论: 中国人群的先天性巨结肠症发生确实与 RET 和 EDNRB 基因突变有关, 家族性 HD 患者 RET 基因突变达 25%, 散发性 HD 患者主要以 EDNRB 基因突变为主, 无 1 例患者有 RET 和 EDNRB 两个基因同时突变. 同时显示有家族史比没有家族史发生 HD 的危险性大 8 倍, 其可信限在 95%.

魏明发, 王果, 朱珉, 易斌, 王小林, 韩杰, 史慧芬. 先天性巨结肠症 RET 和 EDNRB 基因的突变. 世界华人消化杂志 2004;12(3):635-638

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/635.asp>

0 引言

先天性巨结肠症(Hirschsprung's disease HD)病因仍未完全清楚^[1-2], 但某些基因的突变可表现为临床上可见的先天性巨结肠症. 受体型酪氨酸激酶基因(receptor tyrosine kinases gene), 也称 RET 原癌基因(RET proto-oncogene)突变被认为是致家族性和散发性 HD 比例最高的, 其次是内皮素 B 受体基因(endothelin B receptorgene, EDNRB), 而胶质细胞源性神经营养因子(glia cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)作为 RET 的一种配体, 其突变发生较少而且可能并不足够引起 HD 的临床症状, EDNRB 的配体 EDN₃ 极少突变, NTN 作为 RET 的另一配体突变更为罕见^[3-5]. 我们收集了我院自 1998 年以来经临床和病理确诊的 HD 患儿 96 例, 并用 PCR-SSCP 技术和 DNA 测序对 RET 和 EDNRB 基因同时检测, 探讨 HD 患儿的 RET 和 EDNRB 基因的突变以及 HD 患儿是否存在 2 个基因同时突变如下.

1 材料和方法

1.1 材料 同时检测 RET 和 EDNRB 组(A 组): 56 例, 男 45 例, 女 11 例, 年龄 2 月 -14 岁, 其中散发性 48 例, 家族性 8 例, 为 7 个小家系. 全组中常见型 41 例, 短段型 15 例, 术后病理检查证实无神经节细胞肠段均在乙状结肠以远. 单项检测 EDNRB 组(B 组): 40 例, 男 31 例, 女 9 例, 年龄 4 月 -12 岁, 其中散发性 37 例, 家族性 3 例. 全组中长段型 8 例, 常见型 11 例, 短段型 21 例. 健康对照组(C 组): 分别以相同例数作对照(A 56 例, B 40 例), 无便秘病史. 全部患者均有典型的 HD 临床表现, 并经钡灌肠、直肠肛管测压和直肠黏膜乙酰胆碱酯酶(AchE)组织化学等检查为 HD, 并在术后病理检查证实. 对照组为与 HD 无关和无便秘史者. PCR 引物: A 组和 B 组引物序列依据文献[6-7], 由中国科学院微生物研究所基因工程中心、Beckman 公司和 Sigma 公司合成提供(表 1, 2).

表 1 RET 外显子 6, 13, 15, 17 PCR 用引物序列

RET 基因外显子	PCR 引物序列
exon6	5' -GGCTGGTTCTCAACCGGAAC-3' 5' -GGCTCGCCGATTTGCCAG-3'
exon13	5' -AGGCCTCTCTGTCTGAACTTGG-3' 5' -AGCCCTGTTCTCCCTCTTTC-3'
exon15	5' -GACTCGTGCTATTTTCTCTC-3' 5' -TATCTTCTCTAGGCTTCCCA-3'
exon17	5' -TCACTGGTCTTTCTACTCTCT-3' 5' -ATCTGTGTGCATTCCTCTC-3'

表 2 EDNRB 4, 5, 6 外显子 PCR 用引物序列

EDNRB 基因外显子	PCR 引物序列
exon4	5' -ATCCCTATAGTTTTACAAGACAGC-3' 5' -ATTTTCTTACCTGCTTTAGGTG-3'
exon5	5' -ATTTTCAGAGACGGAAGTGGCC-3' 5' -CCTTTCTTACCTCAAAGTTCA-3'
exon6	5' -TTTGTTCAGCTTTCTGTG-3' 5' -AGTCTCTTACCTTAAAGCAG-3'

1.2 方法 每例均采集外周血 3 mL, 盐析法提取 DNA^[6-7]. PCR 扩增: (1)A 组反应体系 25 μ L, 包括模板约 50-100 ng, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris/HCl pH8.4), 1.5 mmol/L MgCl₂, 引物各 0.25 μ mol/L, dNTP 各 100 μ mol/L 和 Tag DNA 聚合酶 1 U. 扩增条件: 反应体系 95 $^{\circ}$ C 5 min 变性后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 1 min 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 所得产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测. (2)B 组反应体系 50 μ L, 模板 200 ng, 10 \times buffer 5 μ L, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.25 μ mol/L 引物, dNTP 各 100 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1U. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min 变性后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 所得产物 2% 凝胶电泳检测; (3)C 组与相对应组条件相同. SSCP 分析: 采用 49:1 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 浓度为 50 g/L, 80 g/L 或 100 g/L, 含甘油 50 mL/L 或 100 mL/L, 在 4 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C 或 20 $^{\circ}$ C 下电泳, 然后进行银染方法显色观察^[6-7]. 纯化的 PCR 产物经 DNA 自动测序仪进行测序.

2 结果

2.1 RET 基因突变 A 组中有 2 例家族性患者和 2 例散发性患者的 RET 基因扩增片段行 SSCP 分析时发现泳动变位, 分别发生在 15, 15, 13, 17 外显子. 2 例发生 15 外显子泳动变位的家族性患者经测序证实为 1 例发生错义突变, 889 密码子处赖氨酸被苏氨酸替换(AAG \rightarrow ACC, Lys889 \rightarrow Thr, 图 1); 1 例在 V906, S909 密码子处分别存在(GTGAAGAGGAGCCA \rightarrow GTIAAGAGGAGICA 两个碱基置换, 导致两个同义突变, 图 2), 家族性患者突

变率为 25%(2/8); 发生在散发性患者的 13 号外显子泳动变位经测序证实为基因多态(CTG → CTT, Leu769 → Leu, 图 3), 散发性患者突变率为 4%(2/48).

2.2 EDNRB 基因突变 A 组中 1 例散发性短段型患者 EDNRB 的 5 号外显子检测出突变, SSCP 电泳显示除正常两条单链条带外还可见 1 条突变带型; 本组其他患者和对照组未测出突变; B 组中仅 1 例散发性短段型患者经 PCR-SSCP 分析, 发现在 EDNRB 的 4 号外显子除正常的两条单链外尚可见 1 条突变异常带, 再经 DNA 测序证实核苷酸位点 831, 密码子 277 上 G → A 的置换 (Leu277 - Leu, 图 4). 该突变为同义突变, 该样品外显子 5, 6 无突变, 散发性患者突变率为 2.7% (1/37), 其余 36 例散发性和 3 例家族性 HD 患者以及正常对照组未检测出突变. A 加 B 组全部 96 例, 在对 EDNRB 基因检测中发现仅 2 例突变分别发生在外显子 4 和 5, 突变率为 2%(2/96), 而且该 2 例突率均为散发性病例, 占散发性病例的突变率为 2.3%(2/85).

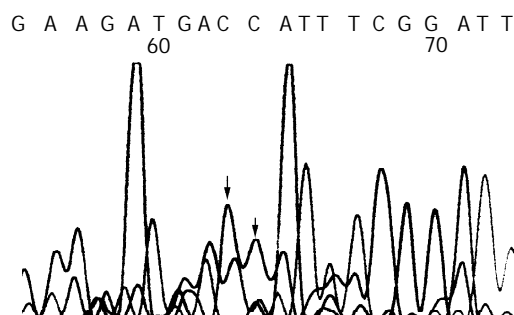


图 1 家族性 RET-exon15 PCR 测序结果(箭头:错义突变 AAG → ACC).

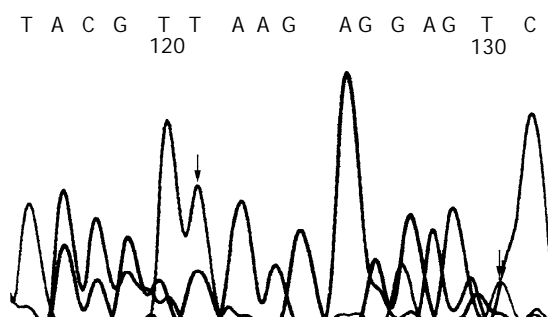


图 2 家族性 RET-exon15 PCR 测序结果(箭头:两个同义突变 GTGAA GAGGAGCCA → GTTAAAGAGGAGTCA).

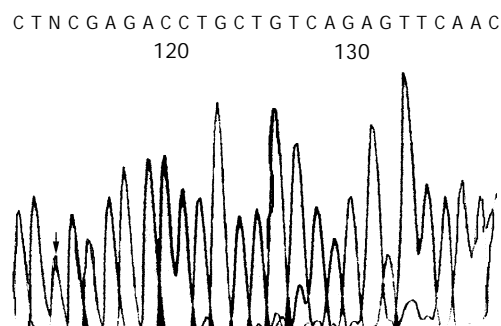


图 3 散发性 RET-exon13 测序结果(箭头:同义突变 CTG → CTT).

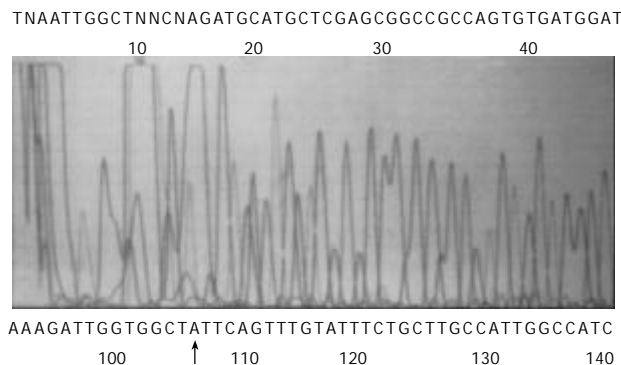


图 4 散发性 EDNRB-exon4 测序结果(箭头:同义突变 G → A).

2.3 RET 和 EDNRB 基因同时突变 A 组 56 例进行 RET 和 EDNRB 基因突变同时检测, 无同 1 例患者同时存在 RET 和 EDNRB 两个基因变异. A 组家族性与非家族性 RET 基因突变卡方检验: $\chi^2=4.95$, $P < 0.05$, $OR=8$, OR 95% CI = 1.28-49.87.

3 讨论

先天性巨结肠症(HD)的发生与多个基因有关, 提示了 HD 发生的遗传异质性^[8-9]. 这些基因中的任何一个突变是在这种疾病的基因型的足够表达. 由于 HD 是一种复杂的多因素遗传病, 因而在多个基因中任一突变的累积效果都有助于个体表型^[4], 微环境因素对 HD 的发生也产生一定影响^[10]. 本结果显示家族患者 RET 基因的突变率为 25%, 散发性患者 RET 基因的突变率仅为 4%; 家族性患者的 EDNRB 基因无突变, 散发性患者突变率也不高, 约 2.3%; 全部患者中未发现 RET 和 EDNRB 基因同时突变的病例; 对照组中无 RET 和 EDNRB 基因突变. 这确切证实中国人群 HD 的发生与 RET 和 EDNRB 基因突变有关, 而且同时显示中国人群家族性 HD 的发生主要与 RET 基因有关, EDNRB 基因突变主要发生在散发性短段型 HD 患者, 与国外报告一致^[4].

国外研究显示, 家族性 HD 患者的 RET 基因突变高达 50% 以上, 散发性 HD 患者的 RET 基因突变也在 10-20%, 而 EDNRB 基因突变相对较低约占全部 HD 患者中的 5-15%^[3-4]. 我们家族性 HD 患者 RET 基因突变达 25%, 但比国外报告为低, 其原因可能首先是 RET 基因有 20 个外显子, 我们仅检测了其中突变率比较高的 4 个外显子, 如突变发生在其他外显子我们未能检测到; 对 EDNRB 基因来说也是一样, 其 7 个外显子我们未能进行全部检测. 其次是在本研究的全部患者中长段型和全肠型表型少, 特别是检测 RET 基因 56 例中没有长段型表型患者, Fitze et al^[4] 许多学者研究证实“长段型的基因突变率明显高于短段型表型”, Tomiyama et al^[11-12] 报告 16 例全结肠 HD 患儿, 经检测发现 11 例 RET 或 SOX10 突变, 突变率高达 68.8%, 而主要是 RET 突变(10/16), 这 10 例突变者中又以 17 外显子为多; 1 例 SOX10 突变者同时合并有瓦尔敦堡综合征(Waardenburg-Shah syndrome,

WS). HD患者检测出有SOX10基因突变者多合并有其他畸形,如WS.国内虽有散在MEN-II病例报告,但未见合并先天性巨结肠畸形^[13-15].

HD为多基因遗传病^[1-11],其遗传度高达80%,这说明虽然遗传因素和环境因素都起作用,但遗传基础作用较大,而环境因素在决定易患性(liability)变异和发病上作用较小.现HD有10余种易患基因和候选基因^[16],即易患基因RET, GDNF, EDNRB, EDN-3^[17-21]和候选基因GDNFR-21, SOX10, ECE-1, Neurturin, Shc, Grb2, Grb10, HoxA4, HOXA9, ZFH1B, IHH.到目前为止^[4-11, 22-31],在检测HD有关国内外文献的基因突变中主要为RET和EDNRB.本研究也说明遗传因素在HD发病中起重要作用.有家族史与无家族史在统计学上有显著性差异,而且有家族史比没有家族史发生HD的危险性大8倍.

4 参考文献

- Duan XL, Zhang XS, Li GW. Clinical relationship between EDN-3 gene, EDNRB gene and Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 2003;9:2839-2842
- Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, Fava M, Chen B, Wu Y, Hofstra R, Laurie T, Griffiths M, Burge D, Tam PK. Incidence of RET mutations in Patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2000;35:139-143
- Gath R, Goessling A, Keller KM, Koletzko S, Coerdts W, Muentefering H, Wirth S, Hofstra RM, Mulligan L, Eng C, von Deimling A. Analysis of the RET, GDNF, EDN3, and EDNRB genes in patients with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease. *Gut* 2001;48:671-675
- Fitze G, Cramer J, Ziegler A, Schierz M, Schreiber M, Kuhlisch E, Roensner D, Schackert HK. Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutation and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet* 2002;359:1200-1205
- Inoue K, Shimotake T, Iwai N. Mutational analysis of RET/GDNF/NTN genes in children with total colonic aganglionosis with small bowel involvement. *Am J Med Genet* 2000;93:278-284
- 许娟, 魏明发, 史慧芬, 王果, 李辉, 黄尚志. 先天性巨结肠 RET 基因突变的研究. *中华小儿外科杂志* 1999;20:7-8
- 易斌, 黄珊, 魏明发. 先天性巨结肠内皮素 B 受体基因的突变. *同济医科大学学报* 2000;29(增刊):28-29
- Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2000;35:1017-1025
- 李龙, Vincent L, Mai HS, 谭广亨. Cdx1 和 Cdx2 基因表达异常与先天性巨结肠性肠炎的关系. *中华小儿外科杂志* 2003;24:406-408
- 赵雅男, 聂绍发, 魏明发, 朱桂宝. 先天性巨结肠症肠壁微环境改变的免疫组织化学研究. *中华小儿外科杂志* 2003;24:113-115
- Tomiyama H, Shimotake T, Ono S, Kimura O, Tokima K, Iwai N. Relationship between the type of RET/GDNF/NTN or SOX10 gene mutations and long-term result after surgery for total colonic aganglionosis with small bowel involvement. *J Pediatr Surg* 2001;36:1658-1688
- Solari V, Ennis S, Yoneda A, Wong L, Messineo A, Hollwarth ME, Green A, Puri P. Mutation analysis of the RET gene in total intestinal aganglionosis by wave DNA fragment analysis system. *J Pediatr Surg* 2003;38:497-501
- Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, Zatelli MC, Gullo M, Gobbo M, Collini P, Aiello A, Pansini G, Trasforini G, degli Uberti EC. RET mutation profile and variable clinical manifestations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *Surgery* 2002;131:382-383
- Nakao A, Naomoto Y, Kataoka M, Haisa M, Kataoka K, Saitoh S, Fujiwara T, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Umeoka T, Isozaki H, Futami H, Yamaguchi K, Tanaka N. A family of multiple endocrine neoplasia type 2A with the RET proto-oncogene mutation in codon 618 (Cys-->Arg). *Jpn J Clin Oncol* 2001;31:157-161
- Nishikawa M, Murakumo Y, Imai T, Kawai K, Nagaya M, Funahashi H, Nakao A, Takahashi M. Cys611Ser mutation in RET proto-oncogene in a kindred with medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease. *Eur J Hum Genet* 2003;11:364-368
- 段降龙, 张宪生. 先天性巨结肠症的分子遗传学研究进展. *中华小儿外科杂志* 2002;23:360-362
- Fitze G, Cramer J, Serra A, Schreiber M, Roesner D, Schackert HK. Within-gene interaction between c.135 G/A genotypes and RET proto-oncogene germline mutations in HSCR families. *Eur J Pediatr Surg* 2003;13:152-157
- Borrego S, Wright FA, Fernandez RM, Williams N, Lopez-Alonso M, Davuluri R, Antinolo G, Eng C. A founding locus within the RET proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet* 2003;72:88-100
- Li JC, Ding SP, Song Y, Li MJ. Mutation of RET gene in Chinese patients with Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 2002;8:1108-1111
- Carrasquillo MM, McCallion AS, Puffenberger EG, Kashuk CS, Nouri N, Chakravarti A. Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 2002;32:237-244
- Griseri P, Pesce B, Patrone G, Osinga J, Puppo F, Sancandi M, Hofstra R, Romeo G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I. A rare haplotype of the RET proto-oncogene is a risk-modifying allele in hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 2002;71:969-974
- Pusch CM, Sasiadek MM, Blin N. Hirschsprung, RET-SOX and beyond: the challenge of examining non-mendelian traits (Review). *Int J Mol Med* 2002;10:367-370
- Lui VC, Samy ET, Sham MH, Mulligan LM, Tam PK. Glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors are abnormally expressed in aganglionic bowel of a subpopulation of patients with Hirschsprung's disease. *Lab Invest* 2002;82:703-712
- Borghini S, Bocciardi R, Bonardi G, Matera I, Santamaria G, Ravazzolo R, Ceccherini I. Hirschsprung associated GDNF mutations do not prevent RET activation. *Eur J Hum Genet* 2002;10:183-187
- Inoue K, Shilo K, Boerkoel CF, Crowe C, Sawady J, Lupski JR, Agamanolis DP. Congenital hypomyelinating neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by SOX10 mutation. *Ann Neurol* 2002;52:836-842
- Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L. Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 2002;11:3075-3085
- Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 2003;72:465-470
- Wakamutsu N, Yamada Y, Yamada Y, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, Kitoh H, Mutoh N, Yamanaka T, Mushiaki K, Kato K, Sonta S, Nagaya M. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung's disease. *Nat Genet* 2001;27:369-370
- Garcia-Barcelo MM, Lee WS, Sham MH, Lui VC, Tam PK. Is there a role for the IHH gene in Hirschsprung's disease? *Neurogastroenterol Motil* 2003;15:663-668
- Mechine-Neuville A, Lefebvre O, Bellocq JP, Kedinger M, Simon-Assmann P. Increased expression of HOXA9 gene in Hirschsprung disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:1110-1117
- Crone SA, Negro A, Trumpp A, Giovannini M, Lee KF. Colonic epithelial expression of ErbB2 is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system. *Neuron* 2003;37:29-40

大鼠胃电节律失常模型胃肌间Cajal间质细胞含量的变化

李宇航, 王庆国, 陈 萌, 杨美娟, 赵丽云, 李丽娜, 张冬梅, 王 丹

李宇航, 王庆国, 陈萌, 杨美娟, 赵丽云, 李丽娜, 张冬梅, 王丹, 北京中医药大学基础医学院 北京市 100029

李宇航, 男, 1960-08-23 生, 北京市人, 汉族, 1984 年北京中医学院(现更名北京中医药大学)本科毕业, 1988 年北京中医学院(现更名北京中医药大学)硕士研究生毕业, 1998 年北京中医药大学博士研究生毕业, 教授, 主要从事中医方剂配伍规律的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271575

教育部优秀青年教师资助计划项目, No. 200240

项目负责人: 李宇航, 100029, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 北京中医药大学. liyuhang@bjucmp.edu.cn

电话: 010-64287002 传真: 010-64286871

收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-18

Changes of interstitial cell of Cajal content in a rat model of electrogastric dysrhythmias

Yu-Hang Li, Qing-Guo Wang, Meng Chen, Mei-Juan Yang, Li-Yun Zhao, Li-Na Li, Dong-Mei Zhang, Dan Wang

Yu-Hang Li, Qing-Guo Wang, Meng Chen, Mei-Juan Yang, Li-Yun Zhao, Li-Na Li, Dong-Mei Zhang, Dan Wang, Basic Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271575

Supported by Excellent Young Teacher sustentation plan of Ministry of Education, No. 200240

Correspondence to: Dr. Yu-Hang Li, Basic Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. liyuhang@bjucmp.edu.cn

Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-18

Abstract

AIM: To observe the change of the interstitial cells of Cajal (ICC) content in the stomach wall on the rats with electrogastric dysrhythmias, and to discuss the pathological mechanism of the rat model.

METHODS: Irregular feeding was adopted to establish a rat model of electrogastric dysrhythmias. Immunohistochemical staining was used to detect the content of c-kit positive ICC.

RESULTS: The content of ICC in the model group was higher than that in the control group, and showed a significant difference from that in the control group ($P < 0.001$).

CONCLUSION: The increase of the ICC content in the model group may lead to the increase of the abnormal pacing impulse points, which results in the electrogastric dysrhythmias in the stomach.

Li YH, Wang QG, Chen M, Yang MJ, Zhao LY, Li LN, Zhang DM, Wang D. Changes of interstitial cell of Cajal content in a rat model of electrogastric dysrhythmias. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):639-641

摘要

目的: 观察胃电节律失常大鼠模型中胃肌间Cajal 间质细胞

(Interstitial Cells of Cajal, ICC)含量的变化, 以探讨该模型病理机制, 为今后的研究奠定基础。

方法: 采用不规则喂养法制备大鼠胃电节律失常模型, 用免疫组化法检测其胃肌间c-kit阳性ICC含量的变化。

结果: 胃电节律失常模型大鼠的胃肌间c-kit阳性ICC含量比正常对照组明显升高($P < 0.001$)。

结论: 张氏大鼠胃电节律失常模型中作为起搏细胞的ICC的增加, 可能导致异常的胃电起搏点的增加, 从而引发胃电节律失常。

李宇航, 王庆国, 陈萌, 杨美娟, 赵丽云, 李丽娜, 张冬梅, 王丹. 大鼠胃电节律失常模型胃肌间Cajal 间质细胞含量的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):639-641
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/639.asp>

0 引言

胃电节律失常与胃功能性疾病密切相关^[1-2]。节律失常模型的建立对胃电节律失常的深入研究有重要意义。张勇 et al 采用的隔日进食、在饮水中加入盐酸的喂养方法成功建立了大鼠胃电节律失常模型。在此基础上, 我们通过免疫组化法观察了胃电节律失常大鼠模型中胃肌间c-kit 阳性Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)含量的变化。以探讨大鼠胃电节律失常模型的病理机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar ♂大鼠, 体重 180 ± 20 g, 共30只, 由中国医学科学院动物研究所提供。随机分为正常对照组和模型组各15只。LMS-2R二道热笔生理仪(成都仪器厂)。兔抗人多克隆c-kit抗体(CD117), 试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供(Santa Cruz公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立 按张氏法^[3], 模型组以不规则喂养方法饲养4 wk, 即动物逢单日正常进食、双日禁食, 以打乱正常的饮食节律; 自由饮水, 水中加入盐酸(每升水加10 mol/L 盐酸10 ml)以破坏胃内酸碱环境, 制备大鼠胃电节律失常模型。正常对照组常规饲养。从造模结束后第3 d开始, 1次/d予蒸馏水灌胃(1 ml/100 g体重), 连续2 wk。2 wk后从正常组随机抽取6只, 模型组随机抽取8只, 胃窦部浆膜下埋置银丝电极, 7 d后记录胃电慢波。

1.2.2 胃电参数分析 胃电记录以每10 min为一个时间段, 计算每组动物每一个时间段的慢波频率以及慢波频率变异系数。慢波频率变异系数 = 慢波频率标准差 /

慢波频率均值 $\times 100\%$ ^[4].

1.2.3 取材及检测方法 胃电检测完毕后, 将两组大鼠断头处死, 剖开腹腔, 迅速取出全胃, 沿胃小弯剖开, 生理盐水, 冲去内容物, 取胃体中 1/3 段的胃壁全层, 约为 0.5 cm \times 0.5 cm 大小. 立即置于 40 g/L⁻¹ 多聚甲醛中固定 2 h, 然后经洗涤、脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋后, 切片待测.

1.2.4 免疫组化染色 采用两步法. 所有免疫组化染色步骤均在室温条件下完成. 具体步骤如下: 将石蜡组织块切片(厚 4 μ m), 贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上; 60 $^{\circ}$ C 烘烤 1 h 后, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内烘烤 2 d; 逐级二甲苯脱蜡、梯度乙醇至水. 0.01MPBS 洗 3 min \times 2. 3% 过氧化氢孵育 15 min, 以阻断内源性过氧化物酶. 0.01MPBS 洗 3 min \times 2. 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C, 20 min, 充分暴露抗原. 0.01MPBS 洗 3 min \times 2. 将切片放入加满 PH6.0 枸橼酸缓冲液的抗原修复盒中, 微波炉 8 马力修复 9 min 后, 取出待其降至常温. 0.01MPBS 洗 3 min \times 2. 10% 正常羊血清封闭 15 min 后, 甩去不洗. 吸干组织旁的液体. 将一抗用 0.01 MPBS 稀释为 1:200, 滴在切片上, 并留出一块滴加 0.01MPBS 作阴性对照. 将切片放入湿盒中, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜. 0.01MPBS 洗 3 min \times 2. 吸干组织旁的液体. 将 DAB 显色剂滴在切片上, 在镜下观察 3-10 min, 直至阳性部位着色为止. 蒸馏水冲洗、复染、脱水、封片.

1.2.5 图像分析 采用美国 Tractor Northern 8502 图像分析仪, 以着色呈棕黄色者为阳性部位, 每张切片取 15 个视野, 计算每个视野中阳性部位的面积百分比, 来表示 ICC 的含量.

统计处理 全部数据以均数 \pm 标准差表示. 两均数间比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 经胃电参数分析, 模型组大鼠慢波频率变异系数明显高于正常组, 见表 1, 经统计处理有显著性差异($\alpha = 0.001$, $P < 0.001$).

表 1 两组胃电慢波频率变异系数(mean \pm SD)

组别	n	慢波频率变异系数(%)
对照组	6	3.275 \pm 1.059
模型组	8	7.834 \pm 1.832

P < 0.001 vs 对照组比较.

2.2 如图 1、2 所示, 光镜下, 胃肌间神经丛 c-kit 阳性 ICC 呈棕黄色, 位于环行肌层与纵行肌层之间、环行肌细胞之间以及环行肌层的内表面, 并尤以环纵肌之间为多. 存在于肌细胞之间的 ICC 形状较圆, 存在于环行肌层内表面的 ICC 的形状则为细长形. 光镜下, 模型组大鼠的胃肌间神经丛 c-kit 阳性 ICC 较正常组密集. 经图像分析显示, 模型组大鼠的胃肌间神经丛 c-kit 阳性

ICC 含量明显高于正常组, 见表 2. 经统计学检验, 正常组与模型组之间存在显著性差异($\alpha = 0.003$, $P < 0.001$).

表 2 两组胃肌间 c-kit 阳性 ICC 含量(面密度, 100%)比较

组别	n	面积百分比
正常组	15	0.399 \pm 0.291
模型组	15	3.699 \pm 2.356

P < 0.001 vs 对照组比较.

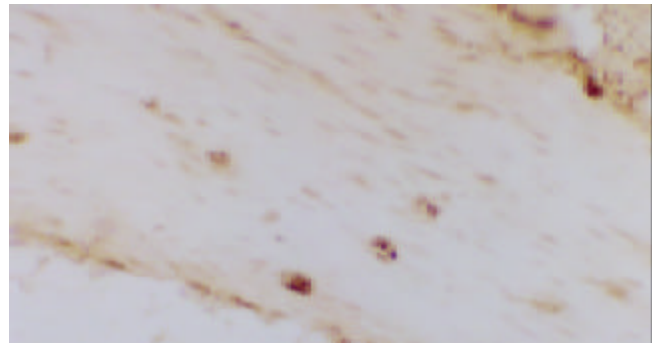


图 1 对照组大鼠胃肌层免疫组化染色 $\times 33$.



图 2 模型组大鼠胃肌层免疫组化染色 $\times 33$.

3 讨论

本实验根据张氏法, 通过不规则喂养打乱大鼠正常的进食习惯, 在饮水中加入盐酸以破坏胃内酸碱环境, 使大鼠出现不同类型的胃电失常. 实验结果显示, 模型组慢波频率变异系数明显高于正常组, 经统计处理, 有显著差异. 说明实验成功制备了大鼠胃电节律失常模型.

由于是在清醒状态下检测大鼠胃电, 埋置电极后需继续喂养 7 d, 其间部分电极被大鼠咬断甚至脱落, 不能检测胃电. 对照组有 6 只, 模型组有 8 只成功检测胃电, 免疫组化染色时, 所有大鼠胃体均取材进行染色, 造成胃电检测与免疫组化染色中的例数不同, 为保证两个指标时间上的平行, 且实验数据能满足统计学的要求, 故未增补胃电检测例数.

ICC 存在于胃肠纵肌与环肌之间, 是胃肠道平滑肌慢波电位的起搏者和传导者^[5]. 他既不属于特殊的神经元细胞, 也不是胶质细胞, 更不是平滑肌细胞, 而是具有独立功能的特殊间质细胞, 以网状结构存在于胃肠道^[6]. 大鼠 ICC 数量在胃窦比胃底多, 在结肠比小肠

多^[7]. ICC分布于环行肌细胞之间、环行肌层的内表面及环行肌层与纵行肌层之间, 往往与神经纤维末梢及神经束伴随存在, 并由许多的缝隙连接紧密连接在一起^[6]. ICC与胃肠道运动的发生和控制密切相关. 他可自发激活并产生节律性去极化慢波(slow wave, SW), 经由ICC形成的网络传向平滑肌细胞, 并向远端扩布. ICC的功能及分布的改变是很多动力紊乱性疾病的病理生理学基础. 已知的与ICC有关的人类疾病有: 先天性巨结肠、婴儿幽门肥厚性狭窄、慢性传输型便秘及肠易激惹综合征等^[9-12]. Ekblad发现大鼠肥大的回肠ICC-AP数目明显减少, ICC-DMP几乎完全缺如^[13], W^s/W^s大鼠回肠运动明显紊乱^[14]. 糖尿病大鼠胃肠功能紊乱时, ICC的超微结构发生了显著的改变, 最显著的变化为ICC之间、ICC与神经末梢之间和肌细胞之间的连接显著减少, 结构显著破坏, 连接松散, 这些变化必然影响其功能的发挥, 影响平滑肌的运动, 这很可能是糖尿病胃肠功能紊乱的发病原因^[15].

1996年Komuro et al研究显示豚鼠小肠肠肌间ICC表达c-kit^[16]. 1997年Burns et al用c-kit免疫组化法研究标记豚鼠胃肠道ICC, 结论提示c-kit免疫组化方法是一种优秀的, 有选择性的标记胃肠道ICC的方法. c-kit可以标记胃肌间神经丛ICC, 从而间接反映ICC的数目及含量^[17]. c-kit免疫反应能标记各种不同的细胞类型, 但在消化道c-kit仅能标记ICC和肥大细胞^[18-19], 二者在光学显微镜下可加以区分.

本实验观察了胃电节律失常大鼠模型中胃肌间c-kit阳性ICC含量的变化, 实验结果显示, 模型组大鼠的胃肌间c-kit阳性ICC含量明显高于正常组, 提示张氏大鼠胃电节律失常模型出现了胃肌间c-kit阳性ICC含量的异常增加. 张勇 et al研究发现不规则喂养后大鼠胃电节律失常的发生与胃窦部肌间神经丛内源性亮啡肽增加及继发乙酰胆碱减少有关^[20]. 陈代陆 et al也研究发现, 饥饿应激对大鼠肠神经系统神经递质存在一定的影响^[21]. 林丽娜 et al研究发现, 酸或碱性溶液对胃电活动有一定影响, 酸化或碱化内容物可使胃电慢波频率减少^[22]. 因此, 张氏法所造成的胃电节律失常, 可能与神经递质改变和破坏胃内酸碱环境等有关. ICC是胃肠道平滑肌活动的起搏细胞, 除了能推进电活动的传播, 还能调节神经递质的释放^[23-25], 有文献报道不规则喂养法建立的大鼠胃电节律失常模型中胃窦肌间神经丛内氮能神经明显增多^[26], 而ICC是一氧化氮(NO)的作用部位之一, 并能够合成NO, 从而起到放大器的作用^[27]. 我们推测张氏法所造成的胃电节律失常模型中可能存在类似的胃肠神经递质的改变, ICC可能是该模型中胃电节律失常形成的中介, 这有待于进一步的实验来证实. 大量文献报道了胃肠ICC的减少、缺乏或受损可影响胃肠电活动, 而ICC含量的异常增加与胃肠电活动的关系却未见报道. 我们推测张氏大鼠胃电节律失常模型中出现的ICC含量的异常增加可能与胃酸直接刺激和饥饿应激

刺激有关, 作为起搏细胞的ICC的增加, 可能导致异常的胃电起搏点的增加, 从而引发胃电节律失常.

4 参考文献

- 杨君佑, 许冠荪. 胃电节律紊乱及其机制. 国外医学生理病理与临床分册 1990;10:70-73
- Chen J, McCallum RW. Clinical applications of electrogastronomy. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1324-1336
- 张勇, 王振华. 大鼠胃电节律失常模型的建立. 华人消化杂志 1998;6:612-613
- 黄茂涛, 王振华, 余宁. 生长抑素及P物质在胃电节律失常中的作用. 重庆医学 1999;28:251-252
- Lee JC, Thuneberg L, Berezin I. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1999;277:G409-423
- Sanders KM, Ordog T, Koh SD. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:311-338
- Christensen J, Rick GA, Lowe LS. Distributions of interstitial cells of Cajal in stomach and colon of cat, dog, ferret, opossum, rat, guinea pig and rabbit. *J Auton Nerv Syst* 1992;37:47-56
- 张亚萍, 张宽学, 高草. 大鼠胃肠道Cajal间质细胞的超微结构研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:112-114
- Rumessen JJ, Peters S, Thuneberg L. Light and electron microscopical studies of interstitial cells of Cajal and muscle cells at the submucosal border of human colon. *Lab Invest* 1993;68:481
- Yamataka A, Kato Y, Tibboel D. A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in a ganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1995;30:441-444
- Langer JC, Berezin I, Daniel EE. Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructure abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Surg* 1995;30:1535-1543
- Cortesini C, Cianchi F, Infantino A. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig Dis Sci* 1995;40:2450-2455
- Ekblad E, Sjuve R, Amer A, Sundler F. Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. *Gut* 1998;42:836-844
- Nakama A, Hirota S, Okazaki T. Disturbed pyloric motility in Ws/Ws mutant rats due to deficiency of c-kit-expressing interstitial cells of Cajal. *Pathol Int* 1998;48:843-849
- 张亚萍, 张宽学, 罗金燕. 糖尿病大鼠肠道ICC结构变化的研究. 中华内科杂志 2002;41:310-312
- Komuro T, Tokui K, Zhou DS. Identification of the interstitial cells of Cajal. *Histol histopathol* 1996;11:769
- 傅诚强. Cajal间质细胞控制肠动力的作用. 国外医学外科学分册 1997;24:323-325
- Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:393-403
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S. Requirement of C-kit for development of intestinal Pacemaker system. *Development* 1992;116:369-375
- 张勇, 王振华, 黄茂涛. 亮啡肽与大鼠胃电节律失常的关系. 华人消化杂志 1998;6:969-971
- 陈代陆, 夏正武, 王振华. 长期饥饿应激对大鼠肠神经系统神经递质的影响. 临床消化病杂志 2001;13:195-196
- 林丽娜, 王万铁. 不同PH盐酸对家兔胃电的影响. 温州医学院学报 1995;(S):29
- Ward SM, Beckett EA, Wang X. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000;20:1393-1403
- Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of Cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999;295:247-256
- Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12008-12013
- 龙庆林, 王振华. 内源性一氧化氮与胃电节律失常关系的实验研究. 第三军医大学学报 2001;23:1065-1067
- Shuttleworth CW, Xue C, Ward SM. Immunohistochemical localization of 3', 5'-cyclicguanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 1993;56:513-522

原代培养大鼠肝细胞的基因转染

何 勇, 周 峻, 窦科峰, 陈 勇

何勇, 窦科峰, 陈勇, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
陕西省西安市 710032

周峻, 中国人民解放军第四军医大学秦都医院病理科 陕西省西安市 710032
何勇, 男, 1968-09-27 生, 辽宁省海城市人, 汉族, 医学博士, 讲师, 主治医师。
国家自然科学基金资助, No. 30170927, No. 30070210

项目负责人: 何勇, 710032, 陕西省西安市长乐西路 127 号, 中国人民解放军
第四军医大学西京医院肝胆外科。 heyong007@yahoo.com

电话: 029-83375259 传真: 029-83244986

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-05

Gene transfection for rat primary cultured hepatocytes

Yong He, Jun Zhou, Ke-Feng Dou, Yong Chen

Yong He, Ke-Feng Dou, Yong Chen, Department of Hepatobiliary
Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an
710032, Shaanxi Province, China

Jun Zhou, Department of Pathology, Qindu Hospital, Fourth Military
Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.
30170927, No. 30070210

Correspondence to: Dr. Yong He, 127 Changle West Road, Xi'an 710032,
Shaanxi Province, China. heyong007@yahoo.com

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-05

Abstract

AIM: To study the efficient and stable gene transfection method of rat primary cultured hepatocytes by liposome.

METHODS: Rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion, and the pEGFP-N₃ plasmid containing GFP and Neo gene was transfected into rat primary hepatocyte with liposome. The expression of GFP and Neo was observed by fluorescence microscopy and *in situ* hybridization.

RESULTS: The rate of live hepatocytes obtained was 95%. Under fluorescence microscope, hepatocyte transfected with pEGFP-N₃ plasmid showed green fluorescence. By using *in situ* hybridization method, expression of Neo gene was observed in hepatocyte transfected with pEGFP-N₃.

CONCLUSION: Rat hepatocyte can be transfected by pEGFP-N₃. pEGFP-N₃ expression vector and makes it easy to assess the expression of target gene in transfected hepatocyte, and it can be used for localization of transplanted hepatocyte.

He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. Gene transfection for rat primary cultured hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):642-645

摘要

目的: 研究原代培养大鼠肝细胞的基因转染的方法。

方法: 采用胶原酶灌注法获取原代培养大鼠肝细胞。利用脂质体转染法将含有绿色荧光蛋白(GFP)和Neo基因的真核细

胞表达载体(pEGFP-N₃)转染原代培养大鼠肝细胞。用荧光显微镜观察和Neo基因原位杂交染色方法检测肝细胞内基因表达情况。

结果: 获取的原代大鼠肝细胞活细胞率达95%。荧光显微镜下观察可见转染基因的细胞可发出绿色荧光, 原位杂交显示有Neo基因的表达。

结论: pEGFP-N₃基因可转入大鼠肝细胞并获得表达, 可用于标记原代培养的大鼠肝细胞, 有利于研究肝细胞移植后移植的肝细胞在体内的分布及功能。

何勇, 周峻, 窦科峰, 陈勇. 原代培养大鼠肝细胞的基因转染. 世界华人消化杂志 2004;12(3):642-645

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/642.asp>

0 引言

我们在建立一个肝细胞原代培养系统的基础上, 转染携带Neo基因和GFP基因的真核细胞表达载体, 并观察标记基因在肝细胞内的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ 幼龄 Sprage-Dawley 大鼠(第四军医大学实验动物中心), 体质量 180-220 g, 普通块料喂养, 随意饮水, 室温 18-22 °C, 每日光照 12-14 h, 术前禁食 12 h。IV型胶原酶、地塞米松、胰岛素及 HGF 为 Sigma 公司产品; RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品。参照 Seglen (Exp Cell Res 1972;74:450)的方法进行肝细胞的分离纯化并作了部分改进。大鼠用 20 g/L 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(30 mg/kg), 同时腹腔内注射肝素钠溶液 200 U。消毒皮肤后, 取正中切口进入腹腔。显露门静脉后在距肝门 2 cm 处插入 18 号导管, 导管与一次性输血器相接, 后者连接输液瓶, 先以 30 mL/min 的速度输注无钙镁的 Hanks 液(含 EDTA 1 mmol/L)200 mL, 夹闭肝上下腔静脉, 在肝下腔静脉插入 16 号导管放出积血积液, 再输注含 0.5 g/L IV型胶原酶的 Hanks 液 100 mL, 输注速度为 15 mL/min, 取下肝脏, 置于含 4 °C Hanks 液的平皿中, 去除肝包膜及血管, 钝性撕裂肝组织, 多层纱布过滤, 制成细胞悬液, 将此悬液以 100 目及 200 目不锈钢网过滤, 以 500 r/min 离心 2 min, 弃上清, 以 4 °C Hank 液清洗并离心 3 次, 用 4g/L 台盼蓝进行染色判断细胞活率, 用血细胞计数板计数细胞浓度并计算细胞产量。将分离、纯化的肝细

胞用合成培养基(含 RPMI1640 80 mL, 新生小牛血清 20 mL, HGF 5 $\mu\text{g/L}$, 地塞米松 10^{-7} mol/L, 牛胰岛素 10^{-8} mol/L, 青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L)稀释成 $0.5 \times 10^6/\text{L}$, 在 37°C , 50 mL/L CO_2 条件下培养, 每 24 h 更换培养基 1 次, 每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.2 方法 采用脂质体介导的基因转染法, 脂质体为 Gibco 公司的 lipofectamine2000, 真核细胞表达质粒 pEGFP-N₃ 含有 Neo 基因和 GFP 基因两个标记基因。取 pEGFP-HGF 质粒 2 μg , lipofectamine 12 μL , 与适量无血清无抗生素的 RPMI1640 在室温下混合摇匀成转染液。取在 35 mm 培养皿中(培养皿中铺有盖玻片)培养生长 3 d 的肝细胞, 吸去培养液, 先用无血清无抗生素的 RPMI1640 将待转染细胞洗 2 遍, 再加入转染液, 转染 6 h 后更换成新鲜的含 200 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养。1 次/d, 重复转染 4 次。基因表达情况的检测: (1) GFP 蛋白表达的检测用 PBS 洗细胞铺片 2 次, 40 g/L 多聚甲醛(PBS 配制)室温固定 30 min, PBS 振洗, 在荧光显微镜下, 488 nm 激发波长下观察, 表达 GFP 的细胞发绿色荧光。(2) Neo 基因表达检测细胞铺片经 3 mL/L Triton X-100/PBS, 0.2 mol/L HCl 及蛋白酶 K 处理, 2 mL/L 甘氨酸终止反应, 40 mL/L PFA 后固定, 梯度酒精脱水干燥。滴加热变性后经地高辛标记的 Neo 探针, 42°C 杂交过夜, 分别用 $2 \times \text{SSC}$, $1 \times \text{SSC}$, $0.5 \times \text{SSC}$ 充分漂洗, 20 mL/L 正常羊血清封闭, 滴加标记碱性磷酸酶抗地高辛抗体(anti-Dig-AP, 1:100), 37°C 温育 2 h, Buffer I, Buffer III 充分漂洗后 NBT/BCIP 暗处显色 24 h, TE 终止反应, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。

2 结果

2.1 肝细胞的分离和培养 采用胶原酶灌注法, 每只大鼠(体质量 180-220 g)的肝脏大约可分离出 2×10^8 个肝细胞, 活细胞率在 95% 以上。新鲜分离的肝细胞在显微镜下呈单个分散状态, 为具有立体感的圆球形, 晶莹剔透, 体积上大小一致, 整个细胞透明无色。培养 3 h 后, 绝大多数细胞贴壁生长, 培养 24 h 后细胞由球形变扁变薄呈多边形, 胞质均匀, 核清晰, 以双核细胞为主, 并以多个细胞聚集成簇排列, 3 d 后细胞逐渐生长融合形成单层膜状。

2.2 基因转染后标记基因的表达 经 Dig 标记的 Neo 探针原位杂交结果显示, 在转染基因的细胞中均有较强的紫蓝色颗粒样 Neo 基因阳性杂交信号(图 1), 而对照组肝细胞中无 Neo 基因表达杂交信号, 即为阴性表达。经基因转染的肝细胞爬片在荧光显微镜下观察, 可发现细胞表达 GFP, 表现为细胞发出明亮的绿色荧光, 这些细胞多成对出现, 或数个发光细胞聚在一起(图 2)。此外, 还可见到个别发出弱绿色荧光的细胞。未转染基因的肝细胞中未见绿色荧光。

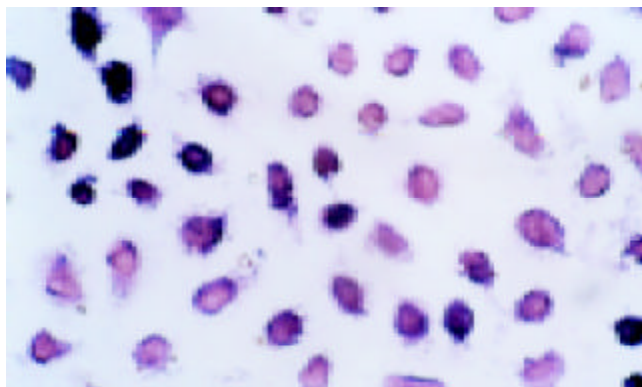


图 1 在基因转染的肝细胞中有紫蓝色颗粒样 Neo 基因阳性信号(原位杂交 100 \times)。

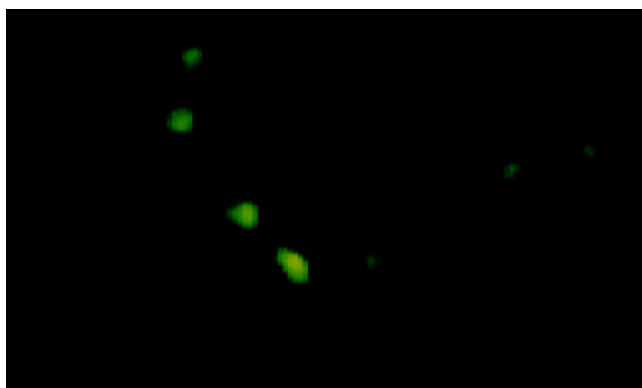


图 2 基因转染的肝细胞中可见绿色荧光(荧光显微镜 100 \times)。

3 讨论

目前有多种方法可用于分离肝细胞^[1-10], 直接法是通过挤压、剪碎和振荡等机械手段, 使肝细胞从肝组织脱落而获得, 操作时间较长, 加之机械损伤, 其肝细胞收获量和细胞成活率均远远低于 Seglen 灌注法。我们采用经过改进的灌注法获得的肝细胞纯度达 95% 以上, 减少了非实质细胞的污染, 有利于细胞在体外培养并进行各种研究。

肝细胞移植是替代肝移植治疗各种原因引起肝功能衰竭的疗法^[11-18]。肝细胞可经多途径注射至体内, 在合适的环境下植入肝细胞表达肝脏特异性功能。由于缺乏移植的肝细胞标记, 因此无法判断移植后肝细胞在体内的分布, 无法确定植入后肝细胞功能与疗效的关系。随着分子生物学技术的不断发展, 细胞标记基因的产生使肝细胞移植可采用基因标记肝细胞, 以便于追踪研究移植细胞的生物学特性。肝脏活体外基因治疗的基本方法是首先获得原代肝细胞, 进行体外培养, 并选用靶基因进行体外转染, 再将表达靶基因的肝细胞移植到受体体内^[19-26]。另外肝细胞移植也需要带有标记基因的肝细胞以研究肝细胞在体内的分布情况等。我们通过脂质体介导的基因转染法, 将含有 Neo 基因和 GFP 基因两个标记基因的真核细胞表达载体转导入原代培养的肝细胞。通过 Neo 基因原位杂交、荧光显微镜观察的方法证实标记基因都获得了表达, 这也充分证实基因

转染获得了成功. 我们所选择的 pEGFP-N₃ 载体中带有绿色荧光蛋白(GFP)序列, GFP 可用与活体、原位、即时的检测基因表达及蛋白定位. GFP 非常稳定, 不依赖于物种, 对活细胞没有伤害性. 而且 GFP 荧光在甲醛固定的细胞中能维持很长时间, 很适于和其他荧光标记进行双标实验. 这种新型的报告分子在暴露于紫外线后即可发出明亮的绿色荧光, 因而, pEGFP-N₃ 常被用于检测细胞中 GFP 融合蛋白的表达情况及蛋白定位^[27-40]. 本研究表明脂质体介导的基因转染法可用于体外肝细胞转染, 而可作为标记基因标记移植的肝细胞, 有利于研究肝细胞移植后移植的细胞在体内的分布、寿命和功能等情况, 为肝细胞移植^[41-42]治疗急性肝衰^[43-49]提供了实验基础.

4 参考文献

- 张颖, 白雪帆, 黄长形, 吴军正. 肝细胞体外培养技术的研究现状. 世界华人消化杂志 2002;10:343-345
- Wang YJ, Wang YM, Li MD. Morphology and function of cultured human fetal hepatocytes. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:291-292
- 王宇明, 陈耀凯. 肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:337-342
- 于聪慧, 冷希圣, 魏玉华, 刘继超, 杜如昱. 微囊内残余海藻酸钠对微囊化大鼠肝细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1052-1053
- Li XQ, Zeng MX, Ling QH. Effects of interferon α on DNA synthesis and collagen production of cultured rat hepatocytes. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:488-490
- Yao D, Li DG, Cheng F, He TY, Xu QF. Expression of type I and II procollagen mRNAs in rat hepatocytes with or without platelet derived growth factor. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:300-302
- Han JQ, Hu C, Liu SX, Xiu HM, Xu Z, Hu DR. The mechanism of the Chinese herbal compound in protecting hepatocyte in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:902-906
- 李璟, 温博贵, 陈爱云, 吴健宜, 李冠武. 四氯化碳中毒大鼠肝细胞核基质蛋白的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:844-845
- Donini A, Baccarani U, Piccolo G, Lavaroni S, D'Alti V, Cautero N, Risaliti A, Degraffi A, Scalamogna M, Bresadola F. Hepatocyte isolation using human livers discarded from transplantation: analysis of cell yield and function. *Transplant Proc* 2001;33:654-655
- Kobayashi N, Westerman KA, Taguchi T, Sakaguchi M, Fujiwara T, Urata H, Kishimoto N, Hayashi N, Nakaji S, Murakami T, Leboulch P, Tanaka N. Expansion of human hepatocyte populations by a retroviral gene transfer of simian virus 40 large T antigen. *ASAIO J* 2001; 47: 481-485
- 王悍, 滕皋军. 肝细胞移植技术新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:966-968
- Zhang WJ, Gong NQ, Li JW, Ma XX, Zhuo LQ, Guo H, Li GS. Treatment of acute hepatic failure by transplantation of microencapsulated xenogenic hepatocyte. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:1396-1398
- Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN- γ gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17
- Ahmad TA, Fujioka H, Eguchi S, Yanaga K, Kamohara Y, Furui J, Kanematsu T. Long-term effect of hepatocyte transplantation on fulminant hepatic failure in rats. *Hepatogastroenterology* 2003;50:467-471
- Ambrosino G, Varotto S, Basso SM, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, De Silvestro G, Plebani M, Abatangelo G, Donato D, Cestroni A, Giron G, D'Amico DF. Hepatocyte transplantation in the treatment of acute liver failure: microencapsulated hepatocytes versus hepatocytes attached to an autologous biomatrix. *Cell Transplant* 2003;12:43-49
- Gupta S. Hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S287-S293
- Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:439-446
- Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001;79:617-630
- Liao D, Xie Q, Zhou XQ, Qian SB, Chen SS, Li DG. Retrovirus mediated transduction of primary rat hepatocyte. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:586-589
- Van Rosenberg SM, Sliedregt-Bol KM, Koning G, Van Den Elst H, Van Berkel TJ, Van Boom JH, Van Der Marel GA, Biessen EA. Improvement of hepatocyte-specific gene expression by a targeted colchicine prodrug. *ChemBiochem* 2003;4:633-639
- Borlak J, Dangers M, Thum T. Aroclor 1254 modulates gene expression of nuclear transcription factors: implications for albumin gene transcription and protein synthesis in rat hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:79-88
- Tzanakakis ES, Waxman DJ, Hansen LK, Rimmel RP, Hu WS. Long-term enhancement of cytochrome P450 2B1/2 expression in rat hepatocyte spheroids through adenovirus-mediated gene transfer. *Cell Biol Toxicol* 2002;18:13-27
- Park SW, Lee HK, Kim TG, Yoon SK, Paik SY. Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:444-450
- Kobayashi N, Noguchi H, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Miyazaki M, Fukaya K, Namba M, Tanaka N. Insertion of a suicide gene into an immortalized human hepatocyte cell line. *Cell Transplant* 2001;10:373-376
- Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-57
- Lewin M, Clement O, Belguise-Valladier P, Tran L, Cuenod CA, Siauve N, Frija G. Hepatocyte targeting with Gd-EOB-DTPA: potential application for gene therapy. *Invest Radiol* 2001;36:9-14
- He Y, Zhou J, Dou KF. Construction of hepatocyte growth factor expression vector and detection of expression in human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1143-1146
- Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang SZ. Construction and expression of anti-HCC immunotoxin of sFv-TNF- α and GFP fusion proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:640-644
- Lin T, Ding J, Meng FP, Han QL, Yu ZC, Guo CC, Liu ZG, Fan DM. Construction and identification of recombinant adenovirus vaccines of gastric cancer MG7-Ag mimotope. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:14-17
- Fujikawa T, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Yamaoka Y. Purification of adult hepatic progenitor cells using green fluorescent protein(GFP)-transgenic mice and fluorescence-activated cell sorting. *J Hepatol* 2003;39:162-170
- Scarff KL, Ung KS, Sun J, Bird PI. A retained selection cassette increases reporter gene expression without affecting tissue distribution in SPI3 knockout/GFP knock-in mice. *Genesis* 2003;36:149-157
- Waldo GS. Improving protein folding efficiency by directed evolution using the GFP folding reporter. *Methods Mol Biol* 2003;230:343-359
- Nakanishi H, Mochizuki Y, Kadera Y, Ito S, Yamamura Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A, Tatamatsu M. Chemosensitivity of peritoneal micrometastases as evaluated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Cancer Sci* 2003;94:112-118
- Jockusch H, Voigt S, Eberhard D. Localization of GFP in fro-

- zen sections from unfixed mouse tissues: immobilization of a highly soluble marker protein by formaldehyde vapor. *J Histochem Cytochem* 2003;51:401-404
- 35 Luby-Phelps K, Ning G, Fogerty J, Besharse JC. Visualization of identified GFP- expressing cells by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2003;51:271-274
 - 36 Ahmed F, Wyckoff J, Lin EY, Wang W, Wang Y, Hennighausen L, Miyazaki J, Jones J, Pollard JW, Condeelis JS, Segall JE. GFP expression in the mammary gland for imaging of mammary tumor cells in transgenic mice. *Cancer Res* 2002;62:7166-7169
 - 37 Dunder M, McNally JG, Cohen J, Misteli T. Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. *J Struct Biol* 2002;140:92-99
 - 38 Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002;297:1873-1877
 - 39 Rodgers W. Making membranes green: construction and characterization of GFP-fusion proteins targeted to discrete plasma membrane domains. *Biotechniques* 2002;32:1044-1046
 - 40 Takenaka Y, Haga N, Harumoto T, Matsuura T, Mitsui Y. Transformation of *Paramecium caudatum* with a novel expression vector harboring codon-optimized GFP gene. *Gene* 2002; 284:233-240
 - 41 Tang NH, Chen YL, Wang XQ, Li XJ, Yin FZ, Wang XZ. Construction of IL-2 gene- modified human hepatocyte and its cultivation with microcarrier. *World J Gastroenterol* 2003;9:79-83
 - 42 Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:324-330
 - 43 Pan BR, Yang SF, Ma LS. Acute liver failure: a progress report. *China Nati J New Gastroenterol* 1995;1:4-8
 - 44 Xue YL, Zhao SF, Luo Y, Li XJ, Duan ZP, Chen XP, Li WG, Huang XQ, Li YL, Cui X, Zhong DG, Zhang ZY, Huang ZQ. TECA hybrid artificial liver support system in treatment of acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:826-829
 - 45 Chen XP, Xue YL, Li XJ, Zhang ZY, Li YL, Huang ZQ. Experimental research on TECA-I bioartificial liver support system to treat canines with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:706-709
 - 46 Qin JM, Zhang YD. Intestinal expressions of eNOSmRNA and iNOSmRNA in rats with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:652-656
 - 47 Riordan SM, Williams R. Transplantation of primary and reversibly immortalized human liver cells and other gene therapies in acute liver failure and decompensated chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2000;6:636-642
 - 48 Xue YL, Zhao SF, Zhang ZY, Wang YF, Li XJ, Huang XQ, Luo Y, Huang YC, Liu CG. Effects of a bioartificial liver support system on acetaminophen induced acute liver failure canines. *World J Gastroenterol* 1999;5:308-311
 - 49 Ding YT, Qiu YD, Chen Z, Xu QX, Zhang HY, Tang Q, Yu DC. The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:829-832

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.

生长激素对短肠综合征鼠残存肠道代偿及吸收功能的影响

苏震东, 秦环龙

苏震东, 上海第二医科大学附属宝钢医院普外科 上海市 201900
秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
苏震东, 男, 1969-05-13 生, 汉族, 上海人, 1993 年上海第二医科大学毕业, 医学学士, 普外科主治医师。
上海市卫生局青年基金资助项目, No.13104Y28
项目负责人: 苏震东, 201900, 上海市, 第二医科大学附属宝钢医院普外科。
111szd@126.com
电话: 021-56691101
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

Effects of growth hormone on intestinal adaptation of rat with short bowel syndrome

Zhen-Dong Su, Huan-Long Qin

Zhen-Dong Su, Department of General Surgery, Baogang Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 201900, China
Huan-Long Qin, Department of General Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200233, China
Supported by the Youth Foundation of Shanghai Municipal Hygiene Bureau, No.13104Y28
Correspondence to: Dr. Zhen-Dong Su, Department of General Surgery, Baogang Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 201900, China. 111szd@126.com
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To evaluate the effects of growth hormone (GH) on the residual small intestine of rats with short bowel syndrome (SBS), including adaptive hyperplasia and absorption of glucose and amino acids.

METHODS: Forty Sprague-Dawley (SD) male rats with more than 85% small intestine resected were equally divided into five groups randomly: H-GH group (high dose at 7.5 IU/kg per day), M-GH group (moderate dose at 3.75 IU/kg per day), L-GH group (low dose at 1.88 IU/kg per day), SBS group and sham operation group. From the second to the 15th day after operation, all the GH-managed groups were treated by sc injection twice a day, while SBS group and sham group were managed with same volume normal saline for injection. All samples were gained by laparotomy under anesthesia at the 16th day after operation.

RESULTS: Weight loss of rats in H-GH group (36 ± 4.4 g), which was the least among the four groups except sham group, was significantly less than that in SBS group (94 ± 10.0 g) ($P < 0.05$). But preoperative body weight of rats in the four groups except sham group was not retrieved. Among all groups there was no significant difference in the length of jejunum and ileum, as well as no significant difference in the morphological variables of colon. Mucosal height of jejunum and ileum was greater in H-GH group and M-GH group (997 ± 65.9 μ m, 752 ± 79.3 μ m and 974 ± 67.6 μ m, 788 ± 75.1 μ m respectively) than those in SBS group (776 ± 61.0 μ m, 664 ± 64.0 μ m) ($P < 0.05$). Similarly, intestinal

wall width of jejunum and ileum was also thicker in H-GH group and M-GH group (1142 ± 65.4 μ m, 884 ± 91.2 μ m and 1145 ± 78.7 μ m, 895 ± 95.6 μ m respectively) than those in SBS group (848 ± 194.7 μ m, 776 ± 57.5 μ m) ($P < 0.05$). But mucosal height and intestinal wall width of jejunum and ileum in H-GH group were not significantly greater than those in M-GH group. Blood insulinlike growth factor 1 (IGF-1) concentration and PCNA index of liver did not differ among the five groups. No significant differences of blood glucose and amino acids concentrations were detected after nutritional administration among the five groups.

CONCLUSION: Treatment of SBS with GH only slows body weight decrease rather than promotes body weight gain by the support of enteral nutrition. GH enhances adaptive mucosal hyperplasia after massive resection of small intestine, while its enhanced effect does not parallel its dose increase. Because of GH resistance resulted from the SBS-induced malnutrition, elevation of blood IGF-1 is impaired and absorption of glucose and amino acids is not enhanced.

Su ZD, Qin HL. Effects of growth hormone on intestinal adaptation of rat with short bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):646-649

摘要

目的: 观察在肠内营养(EN)条件下不同剂量生长激素(GH)对短肠大鼠残存肠道代偿性增生和吸收功能的影响。

方法: 40 只 SD δ 鼠, 切除 85% 以上小肠制成短肠综合征(SBS)模型, 随机分成假手术组($n=8$)、SBS 组($n=8$)、大剂量 GH(H-GH)组($n=8$)、中剂量 GH(M-GH)组($n=8$)和小剂量 GH(L-GH)组($n=8$)。GH 注射剂量: H-GH 组每日 7.5 IU/kg, M-GH 组每日 3.75 IU/kg, L-GH 组每日 1.88 IU/kg, 术后 2-15 d 每日 2 次皮下注射 GH; 假手术组和 SBS 组注射等量生理盐水。术后 16 d 取残留小肠、结肠作组织学检查, 测血浆血糖、氨基酸、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和免疫组化法测定肝 PCNA。

结果: 除假手术组外, 其余各组术后体质量均明显下降, H-GH 组体质量下降幅度最小, 与 SBS 组相比存在显著差异(36 ± 4.4 g vs 94 ± 10.0 g, $P < 0.05$)。各组术后空、回肠长度无显著差异, 但各组空、回肠黏膜厚度差异显著, H-GH 组和 M-GH 组显著大于 SBS 组(分别为 997 ± 65.9 μ m, 752 ± 79.3 μ m 和 974 ± 67.6 μ m, 788 ± 75.1 μ m vs 776 ± 61.0 μ m, 664 ± 64.0 μ m, $P < 0.05$)。同样, 各组空、回肠肠壁厚度也差异显著, H-GH 组和 M-GH 组也显著大于 SBS 组(分别为 1142 ± 65.4 μ m, 884 ± 91.2 μ m 和 1145 ± 78.7 μ m, 895 ± 95.6 μ m vs 848 ± 194.7 μ m, 776 ± 57.5 μ m, $P < 0.05$)。但 H-GH 组和 M-GH 组的空、回

肠黏膜和肠壁厚度均无显著差异. 能全力推注1.5 h后各组血氨基酸、葡萄糖浓度无显著差异. 各组血IGF-1浓度和肝PCNA无显著差异.

结论: GH可减缓体质量下降幅度; 能促进肠黏膜代偿性增生, 但其促进增生的作用并不始终随GH的剂量增加而增加; 未促进葡萄糖和氨基酸吸收.

苏震东, 秦环龙. 生长激素对短肠综合征鼠残存肠道代偿及吸收功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):646-649

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/646.asp>

0 引言

生长激素(GH)在短肠综合征(SBS)治疗中发挥着重要作用, 已发现GH能促进SBS残留肠道的适应性代偿和使营养素吸收增加. 但也有不少学者在动物实验或临床上未能发现GH显著促进肠道增生和吸收, 并认为GH的量效关系还有待明确. 我们应用肠内营养(EN)和GH治疗鼠SBS模型, 观察不同剂量GH对残留肠道代偿增生和吸收功能的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD鼠40只, 体质量约300 g. EN用能全力(荷兰Nutricia公司), GH为长春金赛药业产品.

1.2 方法 术前禁食12 h, 不禁水. 用25 g/L戊巴比妥钠腹腔麻醉, 无菌条件下作上腹正中切口. SBS组和各剂量GH组保留距Treitz韧带约7 cm的空肠和距回盲部约7.5 cm的回肠, 切除85%以上的小肠, 两断端用7-0无创缝线间断吻合; 假手术组在距回盲部约7.5 cm处切断回肠后再用7-0无创缝线间断吻合, 模拟手术创伤. 术后鼠各置一笼分别饲养. 40只SD鼠随机分成假手术组(Sham)、SBS组、大剂量GH组(H-GH组)、中剂量GH组(M-GH组)和小剂量GH组(L-GH组)5组, 每组8只. 均在术后当日给50 g/L GNS 150 mL喂服, 术后1 d给能全力75 mL加生理盐水(NS)75 mL喂服, 术后2-15 d给能全力125 mL加NS125 mL喂服. 术后2-15 d 2次/d scGH, H-GH组7.5 IU/kg, M-GH组3.75 IU/kg, L-GH组1.88 IU/kg, 假手术组和SBS组注射等量生理盐水. 手术当日和术后4 d、8 d、12 d、16 d称体质量.

量. 术后16 d晨经一夜禁食后再次麻醉开腹. 分别测量残留空肠和回肠的长度, 并作形态学检查, 测量肠黏膜厚度和肠壁全厚等, 免疫组化法测定肝PCNA表达情况, 相应图像处理软件采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告管理系统(同济大学出版). 营养吸收检测参考Kato et al (J Pediatr Surg 1998;33:235-239)的方法, 距回盲部3 cm处选取一段长1.5 cm的回肠, 两端结扎, 两结扎处内侧分别用22GA静脉留置针插管, 近端为进管, 远端为出管, 开放. 等量能全力和NS混合置入10 mL注射器并接进管, 用Intima-II型静脉推泵(日本BD公司)推注, 2 mL/h, 持续1.5 h. 血标本用22GA静脉留置针穿刺下腔静脉抽取, 能全力推注前抽血测血糖(Glu)和血氨基酸(AA)浓度, 1.5 h后再测血Glu, AA(比色法)和IGF-1浓度(ELISA法).

统计学处理 采用mean±SD表示. 用SPSS11.0版统计软件包统计分析, 数据的方差齐性用Levene方法检验, 比较用One-Way ANOVA过程, 若存在显著差异, 再用SNK方法两两比较, P<0.05表示统计学上有显著差异.

2 结果

所有实验动物无伤口裂开、肠痿、腹腔感染等并发症发生, 无死亡.

2.1 体质量变化 术后所有SBS动物体质量均下降. 其中SBS组和L-GH组下降最明显, H-GH组下降幅度最小. 比较术后4, 8, 12, 16 d体质量, 各组间存在显著差异(P=0.000). H-GH组和M-GH组均显著高于SBS组(P<0.05), 且H-GH组显著高于M-GH组(P<0.05)(图1).

2.2 形态学改变 各组空、回肠长度无显著差异. H-GH组和M-GH组空、回肠黏膜厚度均显著大于SBS组(P<0.05), 而SBS组又显著大于假手术组(P<0.05), 但SBS组和L-GH组间无显著差异. 各组结肠组织学指标差异不显著(表1).

2.3 血指标变化 比较各组能全力推注前血AA浓度及其推注前后浓度差, SBS组与其余各组间存在显著差异(P分别为0.020和0.001), 能全力推注后血AA浓度各组差异不显著. 相关血Glu指标、血IGF-1浓度各组间无显著差异. 各组肝PCNA无显著差异(表2).

表1 SD鼠空回肠变化

分组	空肠(cm)		回肠(cm)		空肠(μm)		回肠(μm)		结肠(μm)	
	d1	d16	d1	d16	黏膜厚度	肠壁厚度	黏膜厚度	肠壁厚度	黏膜厚度	肠壁厚度
sham					576 ± 61	716 ± 68	531 ± 48	652 ± 66	611 ± 109	788 ± 112
SBS	6.9 ± 0.6	10.0 ± 0.6	7.2 ± 1.0	8.0 ± 1.3	776 ± 61 ^a	848 ± 195	664 ± 64 ^a	776 ± 57 ^a	711 ± 206	888 ± 182
H-GH	7.0 ± 0.0	10.6 ± 1.3	7.0 ± 0.0	8.6 ± 1.3	997 ± 66 ^b	1 142 ± 65 ^b	752 ± 79 ^b	884 ± 91 ^b	554 ± 103	767 ± 126
M-GH	7.1 ± 0.2	10.4 ± 1.1	7.9 ± 1.0	8.8 ± 1.2	974 ± 68 ^b	1 145 ± 79 ^b	788 ± 75 ^b	895 ± 96 ^b	632 ± 152	649 ± 76
L-GH	7.3 ± 0.3	9.9 ± 0.8	7.8 ± 0.3	8.4 ± 0.4	773 ± 144 ^a	949 ± 174	694 ± 33 ^a	809 ± 42 ^a	832 ± 179	810 ± 60

^aP<0.05, vs sham; ^bP<0.05, vs SBS.

表2 SD 鼠血指标变化

分组	AA (mmol/L)			Glu (mmol/L)			IGF-1 (μg/L)	肝 PCNA/%
	AA1	AA2	AA2-1	Glu1	Glu2	Glu2-1		
sham	4.52 ± 0.41	5.85 ± 0.76	1.33 ± 0.47	5.50 ± 2.50	10.21 ± 1.46	4.71 ± 1.17	22.56 ± 20.91	0.38 ± 0.22
SBS	4.03 ± 0.39 ^a	7.83 ± 1.91	3.80 ± 0.70 ^a	7.90 ± 0.55	13.50 ± 6.07	5.60 ± 5.93	13.38 ± 1.73	0.65 ± 0.32
H-GH	4.74 ± 1.00	6.44 ± 0.77	1.70 ± 0.36	11.18 ± 5.69	18.04 ± 5.74	6.86 ± 1.16	20.79 ± 3.32	0.28 ± 0.18
M-GH	5.57 ± 0.80	6.88 ± 0.15	1.32 ± 0.81	9.75 ± 1.09	15.47 ± 3.42	5.72 ± 0.81	16.39 ± 5.40	0.33 ± 0.20
L-GH	5.21 ± 0.51	6.06 ± 0.34	0.85 ± 0.28	7.93 ± 2.15	13.11 ± 2.04	5.17 ± 0.48	13.35 ± 7.78	0.45 ± 0.36

^aP < 0.05, vs sham 1: 能全力推注前; 2: 能全力推注后; 2-1: 2与1的差值。

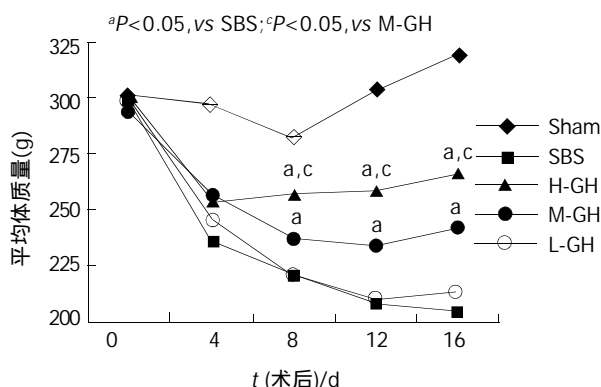


图1 SD 鼠体质量变化。

3 讨论

已知GH能促进蛋白质合成, 抑止葡萄糖氧化, 增加糖原储存, 且小肠黏膜有GH受体^[1], 理论上存在着促进体质量增加的可能. 有研究报告SBS实验动物用GH治疗后体质量显著大于未用GH治疗的动物^[2-3], 说明GH治疗对SBS发生后的体质量变化存在着影响, 而另一些动物实验和临床试验未发现GH对体质量增加有影响^[4-7]. 本结果提示, GH对体质量的这种影响就是GH延缓了体质量下降的程度, 并且这种延缓程度与GH剂量有关, 随着GH剂量的增加, 体质量下降程度则呈相应减缓的态势. 有关GH是否促进SBS残留小肠代偿性增生, 多数学者持肯定意见^[8-12], 认为GH能促进小肠黏膜显著增生. 本实验结果显示SBS组空、回肠黏膜厚度均显著大于假手术组, 而H-GH组和M-GH组又显著大于SBS组, 说明SBS的发生诱导了小肠黏膜代偿增生, 而GH能显著加强这种代偿增生. 同时也发现SBS组空、回肠黏膜厚度与L-GH组差异不显著, 表明GH剂量和小肠黏膜增生间的量效关系并不同步, 即GH在一定剂量以下, 促进残留小肠增生的作用不明显, 而超过一定剂量, GH才能显著促进增生, 但这种促进作用并不随GH剂量进一步增加而加强. 首先, 这可能与SBS引起的严重营养不良导致GH受体功能障碍有关, 被称之为对GH的抵抗状态, 只有当GH剂量大到足以克服这种GH抵抗状态, 才能促进小肠黏膜增生. 其次, 当GH剂量继续增加时, 所有小肠黏膜柱状细胞的绒毛和隐窝上的GH受体都被结合, 即使增

加GH的剂量也无法获得更强的刺激增生作用. 我们既往研究表明用很大剂量GH(每日15 IU/kg)也不能进一步促进代偿增生^[13]. GH促进残留小肠代偿增生的作用还与营养供给方式有关^[14-15]. EN能增强GH的这种促进作用, 使较小剂量GH就能有效促进残留小肠的代偿增生. 在其他条件基本相同的情况下, Eizaguirre et al^[8]给SBS鼠全胃肠外营养(TPN)支持, 每日用GH1 mg/kg才使残留空肠黏膜显著增生; Zhou et al^[9]给EN, 每日用GH 0.45 mg/kg就使空肠黏膜显著增生. 而且, 在SBS较重的情况下, EN可使GH剂量不显著增加而仍达到原有的促进代偿增生的效果. 本实验与Eizaguirre et al^[8]的实验在鼠术前体质量和GH用量及疗程等方面基本相同, 我们给予EN, Eizaguirre et al给TPN, 尽管我们切除的小肠长度要大于Eizaguirre et al做的(85% vs 80%), 但空肠黏膜的代偿增生比例却是相似的(29% vs 28%). 目前已认识到SBS发生后给予所谓肠道休息的治疗是无益的, 因为他使肠道处于较长时间的废用状态, 使残留肠道黏膜得不到食物刺激和食物中有关营养素的直接营养以及肝胰等分泌的消化液的经常作用等. 早期EN有利于残留肠道的代偿增生和消化功能的尽快恢复, 这已被许多临床研究证实^[16-20]. 所以, 在临床实践中, 如果条件允许, 应尽可能早期多用EN. 此外, 本研究还发现H-GH组能显著刺激空、回肠肠壁厚度增加, 而SBS组、L-GH组只能使回肠肠壁厚度显著增加, 提示回肠对GH的刺激更敏感, 这与其他研究报告相一致^[21]. 在临床治疗中首先应尽可能保留回肠, 另外考虑到大剂量GH时空肠也有代偿功能, 所以空肠也要注意保留.

SBS发生后尽管残留小肠代偿性增生, 但总吸收面积仍比原来小得多, 因而不能在短时间内吸收大量葡萄糖形成更高的血糖高峰. Sigalet et al^[22]发现小肠黏膜对葡萄糖的转运速率在GH组和假手术组无显著差异, 而Tavakkolizadeh et al^[23]报告GH未使小肠黏膜葡萄糖载体对葡萄糖的亲合力显著提高. 同样, GH也未使小肠黏膜上有关氨基酸转运系统的转运能力提高^[24-25]. 本研究在能全力推注后测血糖、血氨基酸, 发现各组血糖、血氨基酸浓度无显著差异, 这与其他学者的结果是一致的^[4-5, 26], 提示随着GH剂量增大并未促进营养素的吸收. 已知, GH可通过IGF-1介导促代偿作用, 并

可刺激肝脏合成 IGF-1. Fadrique et al^[27]报告 GH 组和 SBS 组血 IGF-1 浓度无显著差异, 本实验中也发现各组血 IGF-1 浓度无显著差异. 这些现象的发生被认为与机体营养状况有关^[28]. 在营养不良情况下, 尤其是蛋白质缺乏时, GH 升高 IGF-1 的作用减弱. 肝 PCNA 的变化可反映肝蛋白合成的变化情况, PCNA 直接参与 DNA 前导链的合成, 与基因的复制、表达密切相关. 本实验各组肝 PCNA 表达无显著差异, 说明 SBS 引起肝 PCNA 的低表达, 并提示存在着 IGF-1 的合成障碍. 因此, 我们认为在 GH 治疗中, 营养状况是影响血 IGF-1 浓度的关键, 严重营养不良时即使加大 GH 剂量, 对 IGF-1 合成也无促进作用.

总之, 在 SBS 治疗中 GH 可减慢体质量下降幅度; 能促进残留小肠的代偿性增生, 但并非剂量越大, 促代偿作用就越强; 对糖和氨基酸吸收基本无促进作用. 由于 EN 能直接刺激和营养残留小肠黏膜, 有利于后者的代偿增生, 因而在 GH 治疗中联用 EN 能有效地增强 GH 的疗效. 此外, 为了尽快改善 SBS 患者的全身营养状况, 综合治疗中也有必要在 GH 治疗的同时, 视情况结合使用 PN 和谷氨酰胺等治疗以达到更为理想的效果^[29-33].

4 参考文献

- Shulman DI. Gastrointestinal effects of growth hormone. *Endocrine* 2000;12:147-152
- 顾岩, 吴肇汉, 靳大勇. 添加生长激素肠外营养对短肠大鼠代谢效应的影响. *上海医科大学学报* 2000;27:117-120
- Ljungmann K, Grofte T, Kissmeyer-Nielsen P, Flyvbjerg A, Vilstrup H, Tygstrup N, Laurberg S. GH decreases hepatic amino acid degradation after small bowel resection in rats without enhancing bowel adaptation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:700-706
- Szkudlarek J, Jeppesen PB, Mortensen PB. Effect of high dose growth hormone with glutamine and no change in diet on intestinal absorption in short bowel syndrome. *Gut* 2000;47:199-205
- Jeppesen PB, Szkudlarek J, Hoy CE, Mortensen PB. Effect of high-dose growth hormone and glutamine on body composition, urine creatinine excretion, fatty acid absorption, and essential fatty acids status in short bowel patients: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:48-54
- Garcia-Sancho Tellez L Jr, Gomez de Segura IA, Vazquez I, De Miguel E, Garcia-Sancho L. Growth hormone effects in intestinal adaptation after massive bowel resection in the suckling rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:477-482
- Li L, Irving M. The effectiveness of growth hormone, glutamine and a low-fat diet containing high-carbohydrate on the enhancement of the function of remnant intestine among patients with short bowel syndrome: a review of published trials. *Clin Nutr* 2001;20:199-204
- Eizaguirre I, Aldazabal P, Barrena MJ, Garcia-Arenzana JM, Ariz C, Candelas S, Tovar JA. Effect of growth hormone, epidermal growth factor, and insulin on bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2000;35:692-695
- Zhou X, Li YX, Li N, Li JS. Glutamine enhance the gut-tropic effect of growth hormone in rat after massive small bowel resection. *J Surg Res* 2001;99:47-52
- Zhou X, Li N, Li JS. Growth hormone stimulates remnant small bowel epithelial cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2000;6:909-913
- Gu Y, Wu ZH. The anabolic effects of recombinant human growth hormone and glutamine on parenterally fed, short bowel rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:752-757
- Scolapio JS. Treatment of short-bowel syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:557-560
- 苏震东, 秦环龙. 早期短程大剂量生长激素对鼠短肠综合征肠道增生作用. *上海医学* 2002;25(增刊):33-35
- Ukleja A, Scolapio JS, Buchman AL. Nutritional management of short bowel syndrome. *Semin Gastrointest Dis* 2002;13:161-168
- Jeppesen PB, Mortensen PB. Enhancing bowel adaptation in short bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:338-347
- Prasad TR, Bajpai M. Intestinal atresia. *Indian J Pediatr* 2000;67:671-678
- Kocoshis S. Small intestinal failure in children. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2001;4:423-432
- Li N, Zhu W, Guo F, Ren J, Li Y, Wang X, Li J. Rehabilitative therapy of short bowel syndrome: experimental study and clinical trial. *Zhonghua Waike Zazhi* 2000;38:565-569
- Wilmore DW. Indications for specific therapy in the rehabilitation of patients with the short-bowel syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:895-906
- Jeppesen PB, Mortensen PB. Experimental approaches: dietary and hormone therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:1041-1054
- Durant M, Gargosky S, Dahlstrom K, Fang R, Hellman B JR, Castillo R. The role of growth hormone in adaptation to massive small intestinal resection in rats. *Pediatr Res* 2001;49:189-196
- Sigalet DL, Martin GR. Hormone therapy for short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2000;35:360-363
- Tavakkolizadeh A, Shen R, Jasleen J, Soybel DI, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Effect of growth hormone on intestinal Na⁺/glucose cotransporter activity. *J Parenter Enteral Nutr* 2001;25:18-22
- Ray EC, Avissar NE, Vukcevic D, Toia L, Ryan CK, Berlanga-Acosta J, Sax HC. Growth hormone and epidermal growth factor together enhance amino acid transport systems B₀,+ and A in remnant small intestine after massive enterectomy. *J Surg Res* 2003;115:164-170
- Ray EC, Avissar NE, Vukcevic D, Toia L, Ryan CK, Berlanga-Acosta J, Sax HC. Growth hormone and epidermal growth factor together enhance amino acid transport systems B₀,+ and A in remnant small intestine after massive enterectomy. *J Surg Res* 2003;113:257-263
- Scolapio JS. Effect of growth hormone and glutamine on the short bowel: five years later. *Gut* 2000;47:164
- Fadrique B, Lopez JM, Bermudez R, Gomez de Segura IA, Vazquez I, De Miguel E. Growth hormone plus high protein diet promotes adaptation after massive bowel resection in aged rats. *Exp Gerontol* 2001;36:1727-1737
- Krsek M, Rosicka M, Haluzik M, Svobodova J, Kotrlikova E, Justova V, Lacinova Z, Jarkovska Z. Plasma ghrelin levels in patients with short bowel syndrome. *Endocr Res* 2002;28:27-33
- Wu GH, Wu ZH, Wu ZG. Effects of bowel rehabilitation and combined trophic therapy on intestinal adaptation in short bowel patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:2601-2604
- Zhu W, Li N, Ren J, Gu J, Jiang J, Li J. Rehabilitation therapy for short bowel syndrome. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:776-778
- Gu Y, Wu ZH, Xie JX, Jin DY, Zhuo HC. Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. *Clin Nutr* 2001;20:159-166
- Zhu WM, Li N, Ren JA, Gu J, Jiang J, Li JS. Rehabilitation therapy for short bowel syndrome. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:868-870
- 顾岩, 谢建新, 吴肇汉, 左焕琛. 重组生长激素与谷氨酰胺协同促进短肠大鼠小肠的代偿. *中华消化杂志* 2001;21:8-10

红霉素对糖尿病结肠运动障碍和四种胃肠激素的影响

林琳, 计敏, 张红杰, 林征, 赵志泉

林琳, 计敏, 张红杰, 林征, 赵志泉, 南京医科大学第一附属医院消化科
江苏省南京市 210029
林琳, 女, 1957-03-27 生, 江苏省南京市人, 汉族. 1982 年南京医科大学学士, 消化科主任医师, 副教授, 硕士生导师. 主要从事胃肠病学和胃肠动力性
疾病的基础和临床研究.
江苏省自然科学基金(社会发展)基金项目, No. BS99037
江苏省教育厅自然科学基金项目, No. 98KJD320007
项目负责人: 林琳, 210029, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第
一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn
电话: 025-3718836-6920 传真: 025-3673363
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-10-18

Effects of erythromycin on colon dysmotility and neuroendocrine peptides in diabetic mellitus

Lin Lin, Min Ji, Hong-Jie Zhang, Zheng Lin, Zhi-Quan Zhao

Lin Lin, Min Ji, Hong-Jie Zhang, Zheng Lin, Zhi-Quan Zhao, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BS99037; the Natural Science Foundation of the Education Department of Jiangsu Province, No. 98KJD320007.
Correspondence to: Dr. Lin Lin, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Lu, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China.
lin9100@yahoo.com.cn
Received: 2003-08-23 Accepted: 2003-10-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of erythromycin on contractive activity of isolated proximal colon smooth muscle and the change of somatostatin, vasoactive intestinal peptide, motilin and substance P in diabetic mellitus rats.

METHODS: Thirty male Sprague-Dawley rats were divided into three groups: the control ($n=10$), the diabetic ($n=10$) and erythromycin ($n=10$). The resting tension, the mean contractile amplitude and frequency of spontaneous changes of isolated longitudinal, circular proximal colon smooth muscle strips were measured by transducer, and somatostatin, vasoactive intestinal peptide, motilin, substance P levels in plasma and proximal colon tissue extracts were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: In isolated proximal colon smooth muscle strips, the motility parameters were significantly lower in diabetic rats than those in control ($P<0.01$). After taking erythromycin, the colon motility parameters were significantly strengthened compared with those in diabetic rats ($P<0.01$). In diabetic rats, the plasma levels of somatostatin, vasoactive intestinal peptide and motilin were higher than those in control ($P<0.05$), while substance P level was decreased ($P<0.05$). In the proximal colon, the levels of somatostatin and vasoactive intestinal peptide were significantly lower than that in control ($P<0.01$, $P<0.05$), the

level of substance P was higher than that in the control ($P<0.05$), and the level of motilin did not differ from that in the control ($P>0.05$). After taking erythromycin, the plasma level of somatostatin was higher than that in diabetic rats ($P<0.05$). The serum glucose was decreased in diabetic rats after erythromycin treatment ($P<0.01$).

CONCLUSION: Erythromycin has direct effect on colon smooth muscle, and has little effect on neuroendocrine peptides. Colonic motility disorders in diabetes rats are related with the changes of neuroendocrine peptides' levels in plasma and colon tissue.

Lin L, Ji M, Zhang HJ, Lin Z, Zhao ZQ. Effects of erythromycin on colon dysmotility and neuroendocrine peptides in diabetic mellitus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):650-653

摘要

目的: 应用红霉素对糖尿病大鼠离体结肠平滑肌自发性收缩进行干预, 探讨其在糖尿病结肠动力障碍中与平滑肌运动、血浆和结肠组织中生长抑素, 血管活性肠肽, 胃动素, P 物质等的相关性。

方法: 建立糖尿病大鼠模型, 制备糖尿病组、糖尿病红霉素治疗组和对照组大鼠离体近端结肠环行肌及纵行肌肌条, 应用张力换能器测定其静息张力、平均振幅、收缩频率等运动指标; 用放免法同批测定三组大鼠血浆和结肠组织中生长抑素, 血管活性肠肽, 胃动素及 P 物质含量。

结果: 糖尿病组结肠肌条自发性收缩多项指标均较对照组明显降低($P<0.01$); 红霉素治疗组结肠肌条收缩振幅和频率较糖尿病组明显增高($P<0.01$)。与对照组相比, 糖尿病组血浆生长抑素、血管活性肠肽、胃动素增加($P<0.05$), P 物质降低($P<0.05$), 而结肠组织中生长抑素和血管活性肠肽降低($P<0.01$, $P<0.05$), P 物质增加($P<0.05$), 胃动素无显著差异; 与糖尿病组相比, 红霉素治疗组除血浆生长抑素升高($P<0.05$)外, 余三种激素(血浆和结肠组织中)均无显著差异。红霉素治疗组较糖尿病组血糖明显下降($P<0.01$)。

结论: 红霉素通过对结肠平滑肌直接作用而改善糖尿病结肠运动障碍; 他对胃肠激素影响不大; 糖尿病结肠运动障碍与血浆和结肠组织中胃肠激素变化有关。

林琳, 计敏, 张红杰, 林征, 赵志泉. 红霉素对糖尿病结肠运动障碍和四种胃肠激素的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):650-653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/650.asp>

0 引言

糖尿病性胃肠病是糖尿病常见慢性并发症, 发生率为

30-76%^[1-2], 糖尿病患者约有 60% 便秘和 22% 腹泻, 许多无消化道症状的糖尿病患者也存在胃肠排空异常^[3]. 我们通过红霉素对糖尿病大鼠结肠平滑肌运动的干预, 分析糖尿病红霉素治疗组、糖尿病组和正常对照组大鼠结肠平滑肌运动指标, 以及血浆和结肠组织中生长抑素(somatostatin, SS), 血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP), 胃动素, P 物质含量的变化, 旨在探讨红霉素对糖尿病结肠运动障碍有何影响及其意义.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley 大鼠(南京医科大学实验动物中心提供), 质量 180-220 g, 随机分为正常对照组(n=10), 糖尿病组(n=10)和糖尿病红霉素治疗组(红霉素组)(n=10). 糖尿病大鼠模型建立, 按 100 mg/kg (溶解在 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液中, pH4.5)给造模大鼠单剂量腹腔注射链脲佐菌素; 对照组注射等量枸橼酸缓冲液; 48-72 h 后尾静脉采血, 测全血血糖, 血糖大于或等于 16.7 mmol/L, 尿糖在 3+~4+, 且能维持 1 wk 以上者确定为糖尿病模型建立.

1.2 方法 糖尿病造模后, 红霉素组按每天 50 mg/kg 灌胃, 每周给药 6 d, 连续 4 wk; 糖尿病组给生理盐水作对照. 每周测定 1 次各组大鼠血糖、尿糖. 造模后 4 wk 将大鼠麻醉, 腹主动脉抽血 3 mL, 立即注入预冷的 0.3 mol/L EDTA.2Na 60 mL 和抑肽酶 1 500 U 中, 混匀后离心, 取上清液 -70 °C 保存备测. 抽血后剪取近端结肠(距结-盲肠连接处 0.5 cm 以下), 洗净后加生理盐水煮沸 5-10 min, 称重后加入 1 mol/L HAC 1 mL 匀浆, 再加入等体积 1 mol/L NaOH 混匀, 离心后取上清液 -70 °C 保存备测. 按常规方法取结肠纵行肌和环形肌肌条(各长 7 mm, 宽 1 mm)^[4]; 肌条固定于浴槽中, 与张力换能器相连, 持续灌流含 950 mL/L O₂+50 mL/L CO₂ 的 37 °C 恒温台氏液, 以 Doctor-95 Super Lab 微机生理实验系统记录平滑肌条自发性等长收缩活动, 测定近端结肠纵、环形肌条静息张力、平均振幅、收缩频率等指标. 放免法同批检测血浆和结肠组织中 SS, VIP, 胃动素, P 物质含量; 药盒由第二军医大学神经生物学教研室提供.

统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件处理全部数据, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$; 组间比较用 t 检验; 显著性差异为 $P < 0.05$.

2 结果

造模前 3 组大鼠血糖无明显差异($P > 0.05$); 造模后 2 组糖尿病大鼠血糖均高于对照组($P < 0.01$), 其后红霉素组大鼠血糖逐渐下降, 4 wk 后明显低于糖尿病组($P < 0.01$), 但仍高于对照组($P < 0.01$).

2.1 结肠平滑肌肌条动力 糖尿病大鼠近端结肠环形肌(proximal-colon circular-muscle, PC)静息张力, 平均振

幅和收缩频率均比对照组明显降低($P < 0.01$); 红霉素组静息张力同糖尿病组, 收缩振幅和频率比糖尿病组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与对照组无差异($P > 0.05$). 结肠纵行肌(proximal-colon longitudinal-muscle, PL)三组静息张力无差异($P > 0.05$), 糖尿病组收缩振幅和频率明显低于对照组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 红霉素组较糖尿病组明显改善($P < 0.01$), 与对照组无差异($P > 0.05$). 图 1-3.

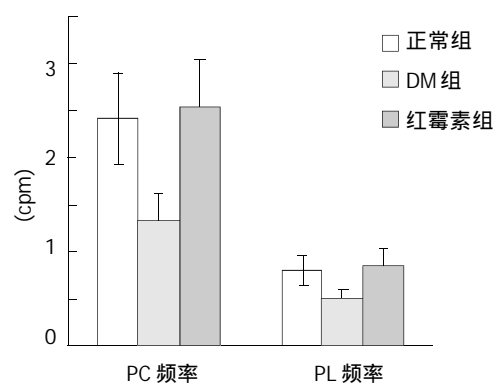


图 1 糖尿病大鼠结肠平滑肌收缩频率.

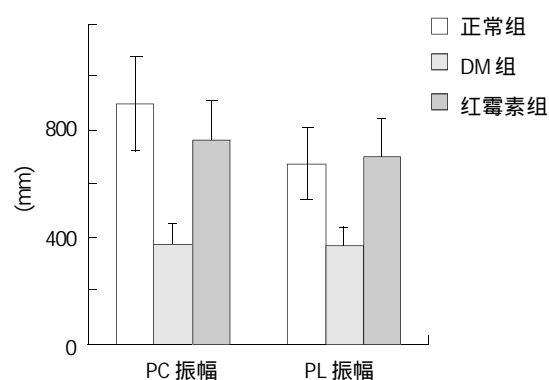


图 2 糖尿病大鼠结肠平滑肌收缩振幅.

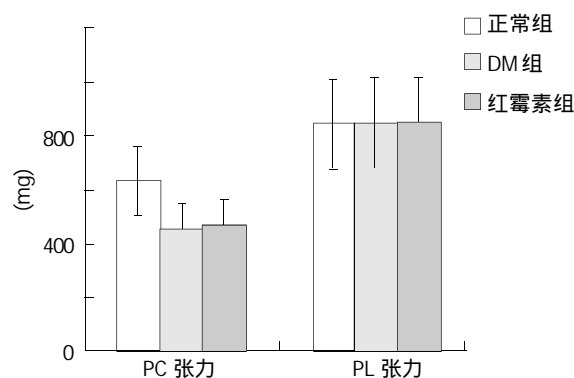


图 3 糖尿病大鼠结肠平滑肌静息张力.

2.2 血浆和结肠组织中胃肠激素 与对照组比较: 糖尿病组血浆 SS 和 VIP 明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而结肠组织中则明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 红霉素组血浆 SS 较糖尿病组升高($P < 0.05$), 余和糖尿病组无差异; 糖尿病组和红霉素组血浆胃动素明显升高($P < 0.05$), 肠组织中无变化($P > 0.05$); 糖尿病组和红霉素组血浆 P 物质

降低($P < 0.05$), 而肠组织中明显升高($P < 0.05$). 图 4-7.

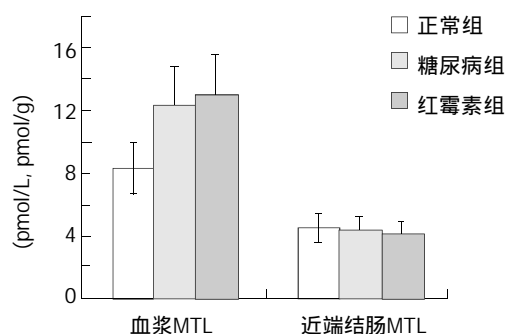


图 4 糖尿病大鼠血浆和组织中 MTL 比较.

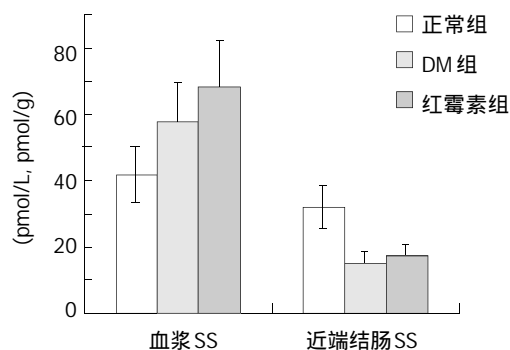


图 5 糖尿病大鼠血浆和组织中 SS 比较.

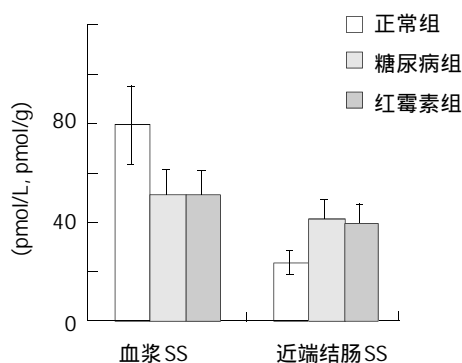


图 6 糖尿病大鼠血浆和组织中 SP 比较.

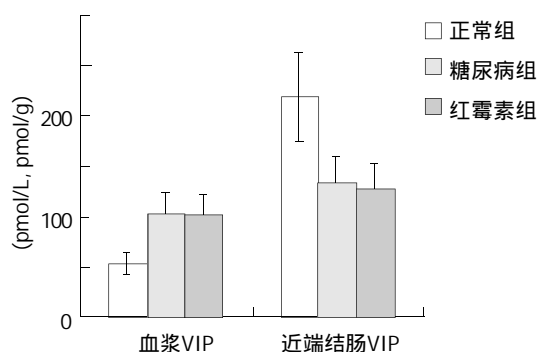


图 7 糖尿病大鼠血浆和组织中 VIP 比较.

3 讨论

近年研究显示糖尿病胃肠病发病率高达 30-76% 左右, 不仅影响患者生活质量, 而且妨碍降糖药物吸收, 干扰治疗^[1-2]. 糖尿病胃肠病的机制尚不完全清楚, 可能与

慢性神经病变、高血糖及胃肠激素分泌异常等有关^[5]. 糖尿病结肠动力障碍也是糖尿病常见并发症, 其中便秘最为常见, 约占 60%, 表现为结肠张力和收缩力下降, 运动缓慢, 排空延迟, 胃结肠反射消失, 进餐后糖尿病患者结肠电和结肠动力反应迟钝^[4]. 红霉素是大环内酯类抗生素, 研究表明红霉素及其衍生物是胃动素受体激动剂, 红霉素分子电荷及空间结构与胃动素完全相同, 他直接与平滑肌细胞膜胃动素受体结合后, 阻断细胞外钙离子内流, 同时细胞内钙离子外流增加, 因而钙离子可能介导了红霉素结合胃动素受体后所产生的促动力效应^[6]; 胆碱能神经通路机制也介导了红霉素的促动力作用. 胃动素主要作用于胃及十二指肠, 而红霉素则表现为全胃肠道促动力作用^[7-8]. 他的这一作用呈量效关系, 小剂量诱发消化间期移行性复合运动, 大剂量使胃肠平滑肌强烈收缩, 引起恶心、呕吐、腹痛等^[9]. 我们发现糖尿病组 PC 静息张力、收缩振幅和频率, 以及 PL 收缩振幅和频率均较对照组明显降低, 表明糖尿病大鼠存在结肠运动障碍. 红霉素组收缩振幅和频率均比糖尿病组明显增加, 提示红霉素对糖尿病结肠运动障碍具有改善作用, 临床也证实红霉素对结肠粪便传输有推进作用^[10-11]. 文献报道红霉素治疗糖尿病患者后, 可促进血糖恢复^[12], 本实验结果红霉素组大鼠血糖明显低于糖尿病组.

SS 除在神经系统分布(25%)外, 在胃肠道分布占 60-70%^[13], 是广泛抑制胃肠运动的脑肠肽, 他与平滑肌 SS 受体结合, 抑制乙酰胆碱释放, 或作为肠神经系统神经递质参与胃肠下行抑制性运动反射, 抑制平滑肌收缩^[14]. 本实验结果糖尿病鼠血浆 SS 明显升高, 与文献^[15]报道糖尿病患者结果一致, 史雪川 et al^[16]研究小儿腹泻患者血 SS 与胃肠动力关系发现, 胃排空与血浆 SS 水平呈负相关, 也说明 SS 对胃肠运动有抑制作用. 本研究显示糖尿病结肠组织 SS 含量降低; 红霉素组血浆 SS 较糖尿病组升高, 而肠组织 SS 与糖尿病组无差异, 可能提示 SS 通过内分泌影响结肠平滑肌运动, 或通过 VIP 释放途径介导 SS 对结肠下行性运动的抑制^[17], 因 SS 释放受多因素的影响, 机制尚待进一步研究. VIP 主要由肠神经元释放, 在中枢神经系统也大量存在, 是重要的脑肠肽; VIP 是抑制胃肠运动的主要神经递质之一, 松弛胃肠平滑肌; 此外, VIP 具有促进分泌和吸收功能, 可促进肠道水和电解质分泌^[18-19]. 本实验中糖尿病鼠血浆 VIP 升高, 与文献^[20]报道一致, 推测其主要以内分泌方式调节结肠运动; 肠组织 VIP 明显降低, 可能局部 VIP 浓度降低使结肠过度节段性蠕动, 而有效的推进性运动减弱, 或如同慢传输型便秘患者, 可能存在不同肠段 VIP 的分布差异^[21-23]; 红霉素组血浆及结肠 VIP 都与糖尿病组无差异, 是否提示红霉素影响结肠运动的作用与 VIP 无相关性. P 物质作为一种重要的胃肠肽广泛分布于肠神经系统和整个胃肠道, 既可以激素的形式亦可作为神经递质参与胃肠运动的

调控^[24];对胃肠道主要起兴奋性神经递质作用,表现为胃肠纵行肌和环行肌的双重收缩效应,包括直接的短时间作用和紧随的由胆碱能?直接作用于全结肠肠肌,并激活 NO 依赖的抑制性神经通路,而非直接作用于抑制性神经通路^[25].本实验中糖尿病鼠血浆 P 物质降低,国内学者对糖尿病胃肠病变患者血浆 P 物质的研究也提示其含量减低,说明该病患者体内 P 物质缺乏,而抑制了胃肠道免疫调节,出现一系列胃肠道症状^[26];本实验糖尿病结肠 P 物质增高,与血浆反应不一致,肠组织 P 物质与糖尿病结肠运动障碍的关系尚不肯定;红霉素组血浆和肠组织 P 物质与糖尿病鼠无差异,推测红霉素治疗作用与 P 物质无明显相关性.胃动素是一个含 22 个氨基酸残基的脑肠肽,其细胞主要分布于十二指肠和近端空肠黏膜内,小量存在于胃底、胃窦、垂体等;他对胃底、胃窦及奥迪括约肌有兴奋作用,促进胃肠排空,协调胃十二指肠运动^[27].本实验中糖尿病鼠血浆胃动素异常升高,与文献^[28]报道一致,国内学者对糖尿病胃肠病变患者血浆胃动素的研究发现其水平高于单纯糖尿病组,并显著高于正常人,认为胃动素升高与糖尿病胃肠动力异常有关;本实验糖尿病结肠胃动素无明显改变,可能与胃动素通过内分泌方式影响胃肠运动有关.胃动素作用机制尚不清楚,可能与糖尿病高血糖减少了胃肠激素分泌抑制,使胃动素升高,或糖尿病血管病变致迷走神经张力升高,刺激胃动素分泌^[26],他对糖尿病结肠运动影响有待进一步研究;红霉素组血浆及结肠胃动素变化与糖尿病组无差异,文献^[9]报道静脉注射红霉素不引起血浆胃动素增加,提示红霉素引起的胃肠收缩可能与胃动素释放无关.但也有报道用红霉素后血浆胃动素明显增高^[29].

文献报道糖尿病大鼠 70% 可出现胃肠病变,主要表现为胃轻瘫、便秘或腹泻,并与糖尿病患者的胃肠病变基本一致^[30].我们发现糖尿病大鼠血浆和结肠组织中 4 种胃肠激素有明显变化,且与结肠运动异常有关;红霉素对糖尿病结肠平滑肌运动有直接促动力作用,并能使血糖下降,但与 4 种胃肠激素的相关性尚不明确.

4 参考文献

- 1 刘剑峰,韩翠华,梁延杰,胡家露,张忠兵.糖尿病性胃肠病患者血浆胃动素的水平及临床意义.北京医学 2000;22:55
- 2 刘云,缪珩.糖尿病患者 26 例胃肠激素测定及其临床意义.南京医科大学学报 2000;20:495-496
- 3 周吕,柯美云.胃肠动力学 - 基础与临床.第 1 版.北京:科学出版社,1999:293-295
- 4 鲁素彩,田自力,言红健,李瑞芬,魏双灵,郭雅卿,崔克勤,程增新.糖尿病患者胃肠通过时间及其影响因素.世界华人消化杂志 2000;8:580-582
- 5 陈波,王雁.糖尿病性胃肠动力障碍.中国实验临床免疫学杂志 1999;11:61-63
- 6 Lu G, Sarr MG, Szurszewski JH. Effect of motilin and Erythromycin on calcium-activated potassium channels in rabbit

- colonic myocytes. *Gastroenterology* 1998;114:748-754
- 7 Parkman HP, Pagano AP, Vozzelli MA, Ryan JP. Gastrokinetic effects of erythromycin: myogenic and neurogenic mechanisms of action in rabbit stomach. *Am J Physiol* 1995;269:G418-426
- 8 Shiba Y, Mizumoto A, Inatomi N, Haga N, Yamamoto O, Itoh Z. Stimulatory mechanism of EM523-induced contractions in postprandial stomach of conscious dogs. *Gastroenterology* 1995;109:1513-1521
- 9 杨春敏,张秀荣,毛高平,张映辉,曹传平,步晓华.红霉素对狗消化间期和餐后胃肠运动的影响及机制探讨.中国药理学通报 2001;17:186-190
- 10 朱金照.促胃肠动力药物的研究现状.世界华人消化杂志 2001;9:1440-1444
- 11 Moussa F, Alaswad B, Garcia J. Erythromycin eye ointment: effect on gastrointestinal motility. *Am J Gastroenterol* 2000;95:826
- 12 Ueno N, Inui A, Asakawa A, Tani S, Komatsu Y, Itoh Z, Kasuga M. Erythromycin improves glycaemic control in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43: 411-415
- 13 张芳林,张闾珍.生长抑素与糖尿病.国外医学内分泌学分册 2001;21:1-3
- 14 周吕,柯美云.胃肠动力学 - 基础与临床.第一版.北京:科学出版社,1999:144-146
- 15 时宏珍,王自正,杜同信,刘家琴,魏敬,齐绍康.生长抑素与糖尿病关系初步探讨.中华核医学杂志 1996;16:113-115
- 16 史雪川,朱文平,敬宗玉,黄华,郑庆雄.小儿腹泻病血胃泌素、胃动素和生长抑素含量变化与胃肠运动功能的关系.中国儿童保健杂志 2002;10:104-106
- 17 Grider JR, Arimura A, Makhlof GM. Role of somatostatin neurons in intestinal peristalsis: Facilitatory interneurons in descending pathways. *Am J Physiol* 1987;253(4 Pt1):G434-438
- 18 周吕,柯美云.胃肠动力学 - 基础与临床.第一版.北京:科学出版社,1999:137-139
- 19 Evangelista S. Involvement of tachykinin in intestinal inflammation. *Curr Pharm Des* 2001;7:19-30
- 20 李志芳,孙大裕,陆玮.糖尿病患者胃肠运动功能障碍的胃肠动力学与胃肠激素研究.中华消化杂志 1997;17:248
- 21 Sjolund K, Fasth S, Ekman R, Hulten L, Jibrn H, Nordgren S, Sundler F. Neuropeptides in idiopathic constipation (slow transit constipation). *Neurogastroenterol Motil* 1997;9:143-150
- 22 Milner P, Crowe R, Kamm MA, Lennard-Jones JE, Burnstock G. Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diverticular disease. *Gastroenterology* 1990;99:666-675
- 23 Gao F, Zhang SB, Zhang LY, Chen L. An immunohistochemical study of colonic vasoactive intestinal peptide, substance P and S-100 protein in slow transit constipation. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:141-143
- 24 Tao K, Chen B, Li ZY, Hu DH, Wang BT. Correlation of Sub P positive nerves and vascular permeability in jejuna of rats in early stage deep partial-thickness skin burns. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 1999;20:412-415
- 25 Kunt T, Forst T, Schmidt S, Pfutzner A, Schneider S, Harzer O, Lobig M, Engelbach M, Goitom K, Pohlmann T, Beyer J. Serum levels of substance P are decreased in patients with type I diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108: 164-167
- 26 吴波,郑长青,林连捷,周卓.糖尿病性胃肠病变患者血浆 P 物质和胃动素的水平及意义.世界华人消化杂志 2003;11:367-368
- 27 任平,黄熙,张莉,王丽丽,李月彩,陈建宗.脾虚大鼠 IMC - 胃肠运动 Mot 间的关系.世界华人消化杂志 2000;8:516-519
- 28 张彤彦,袁申元,王雁,李红兵,丁燕,陈波,万小平.西沙比利对糖尿病胃轻瘫患者胃动素与消化间期移行性复合运动的影响.北京医学 2000;22:247
- 29 黄瑛,邵肖梅,曾纪骅,赵瑞芳,李志英,袁红.新生儿喂养困难与红霉素促胃肠动力的研究.中华儿科杂志 2000;38:696-698
- 30 Ordog T, Takayama T, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000;49:1731-1739

大鼠短间隔连续部分肝切除中再生肝的基因表达差异

徐存拴, 韩鸿鹏, 袁金云, 常翠芳, 李文强, 杨柯金, 赵利峰, 李玉昌, 张会勇, Salman Rahman, 章静波

徐存拴, 韩鸿鹏, 袁金云, 常翠芳, 杨柯金, 赵利峰, 河南师范大学生命科学学院 河南省新乡市 453002
李文强, 李玉昌, 张会勇, 章静波, 细胞分化调控国家重点实验室培育基地 河南省新乡市 453002
Salman Rahman, 伦敦大学血友病研究中心 英国伦敦市 SE17EH
徐存拴, 男, 1958-02-02 生, 河南省林州市人, 汉族. 1995 年德国 Bremen 大学博士毕业, 教授. 主要从事细胞分化和去分化机制研究.
国家自然科学基金, No. 30270673
国家重点实验室基金资助项目, No. 030001
项目负责人: 徐存拴, 453002, 河南省新乡市建设路 148 号, 河南师范大学生命科学学院. xucs@x263.com.cn
电话: 0373-3326001/3326609 传真: 0373-3326524
收稿日期: 2003-10-28 接受日期: 2003-12-08

Gene expression difference in regenerating rat liver after 0-36-40-44h short interval successive partial hepatectomy

Cun-Shuan Xu, Hong-Peng Han, Jin-Yun Yuan, Cui-Fang Chang, Wen-Qiang Li, Ke-Jing Yang, Li-Feng Zhao, Yu-Chang Li, Hui-Yong Zhang, Salman Rahman, Jing-Bo Zhang

Cun-Shuan Xu, Hong-Peng Han, Jin-Yun Yuan, Cui-Fang Chang, Ke-Jing Yang, Li-Feng Zhao, College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian 453002, China
Wen-Qiang Li, Yu-Chang Li, Hui-Yong Zhang, Jing-Bo Zhang, State Key Laboratory of the Cell Differentiation and Regulation Built by Province and Ministry, Xinxian 453002, China
Salman Rahman, Haemophilia Research Center, London SE17EH, U.K
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30270673 and National Key Laboratory, No. 030001
Correspondence to: Dr. Cun-Shuan Xu, College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian, 453002, Henan Province, China.
xucs@x263.net.cn
Received: 2003-10-28 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To identify genes related to rat liver regeneration (LR) after 0-36-40-44h short interval successive partial hepatectomy (SISPH) and to analyze their action and expression profile in LR.

METHODS: A cDNA microarray containing 551 elements (liver chip) was made to analyze extensively expression changes of them in 0-36-40-44h SISPH, which were selected from subtractive cDNA libraries of the LR. Cluster analysis of these gene expression profile was performed by Genemath.

RESULTS: Among the selected 551 cDNA, 157 were up- or down-regulated more than twofold at one or more time points. Of the 157 elements, 86 were up-regulated and 71 down-regulated, and 70 were unreported and 87 were reported, which had not been previously reported to be involved in LR. By cluster analysis and generalization analysis, 6 distinct temporal induction or suppression patterns showed that immediate induction, intermediate

induction, late induction, immediate suppression, intermediate suppression, and late suppression. Comparison of the gene expression in SISPH with after PH found that 38 genes were specially altered in SISPH, and the expression trends for other 119 genes were similar between SISPH and PH, except of the various abundance at the different time points.

CONCLUSION: In 0-36-40-44h SISPH, the numbers of the up-regulated and down-regulated genes show no apparent difference. The genes expressed lately are more than that immediately, and much more than that intermediately. The genes expressed abundantly are much less than that increased 2-5 folds.

Xu CS, Han HP, Yuan JY, Chang CF, Li WQ, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB. Gene expression difference in regenerating rat liver after 0-36-40-44h short interval successive partial hepatectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):654-663

摘要

目的: 鉴定 0-36-40-44 h 大鼠短间隔连续部分肝切除(0-36-40-44 h SISPH)中与肝再生有关的基因, 并分析他们在肝再生中的表达动态和作用.

方法: 从 0-36-40-44h SISPH 再生肝消减 cDNA 文库中筛选与肝再生有关的基因, 用基因芯片技术分析其在肝再生中的表达动态, 并用 GeneMath 软件对有关基因进行聚类分析.

结果: 用基因芯片技术分析的 551 个与肝再生有关基因中, 157 个基因至少在肝再生的一个时间点表达变化达 2 倍以上, 其中, 上调表达的基因有 87 个, 下调表达的基因有 70 个; 157 个基因中的 71 个属未报道的基因, 86 个为已报道基因, 但在此之前尚不清楚他们与肝再生有关; 聚类分析和统计学分析表明, 0-36-40-44 h SISPH 的基因表达模式分为 6 类, 即早期诱导, 中期诱导, 晚期诱导, 早期抑制, 中期抑制, 晚期抑制. 与 PH 相比, 38 个基因在 0-36-40-44 h SISPH 中特异性表达, 119 个基因在这两个模型中表达趋势相同, 但在各时间点的表达丰度不同.

结论: 0-36-40-44 h SISPH 中, 上调和下调表达的基因数目相差不大; 晚期表达的基因多于早期表达的基因, 远多于中期表达的基因; 表达幅度小的基因(2-5 倍)多于表达幅度大的基因.

徐存拴, 韩鸿鹏, 袁金云, 常翠芳, 李文强, 杨柯金, 赵利峰, 李玉昌, 张会勇, Salman Rahman, 章静波. 大鼠短间隔连续部分肝切除中再生肝的基因表达差异. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):654-663

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/654.asp>

0 引言

肝脏再生能力极强, 部分切除后, 残肝代偿性增生, 恢复丢失的肝量^[1]. 肝再生是一个受到精细调控的过程^[2-3], 所以, 肝再生的研究已成为热点^[4-24]. 但是, 到目前为止, 人们尚不完全清楚所有与肝再生有关的基因, 更不清楚肝再生的确切分子机制^[25-27]. 为此, 我们以肝再生中的细胞活动特点为依据, 选择肝再生的细胞分裂启动阶段(部分肝切除后4 h)和细胞分裂高峰时间(部分肝切除后36 h)及两个时点的相互交叉时点进行连续部分肝切除, 建立了短间隔连续部分肝切除模型(short interval successive partial hepatectomy, SISPH)^[28-29], 并用抑制性消减杂交技术与基因表达谱芯片分析技术相结合的方法分析了0-36-40-44 h SISPH的再生肝中基因表达情况.

1 材料和方法

1.1 材料 SD纯系大鼠由河南师范大学实验动物中心提供, 雌雄各半, 10-12周龄, 体重200-250 g, 按徐存拴 et al 方法^[29-30]建立的0-36-40-44 h短间隔连续部分肝切除(0-36-40-44 h SISPH)模型进行大鼠部分肝切除, 即第一次切除大鼠肝的左外叶(0 h), 恢复36 h切除大鼠肝的左中叶和中叶(36 h), 再恢复4 h后切除大鼠肝的右叶(40 h), 又恢复4 h后切除大鼠肝的尾状叶(44 h), 收集各次切下的肝叶备用.

1.2 方法 用预冷的1 × PBS冲洗切除的肝叶, 然后放入-80℃冰箱用于提取RNA和蛋白质. 总RNA提取按Trizol kit (invitrogen)进行. 首先用含苯酚和异硫氰酸胍(阳离子去垢剂)的变性剂溶解RNA, 然后用苯酚-氯仿-异戊醇纯化沉淀. 用EB染色的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 用紫外分光光度计测定RNA浓度. 然后, 按Clontech公司的PCR-Select™ cDNA Subtraction kit构建消减文库, 测定阳性克隆的核酸序列(EST), 并通过NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) GeneBank数据库查找ESTs相应的基因.

1.2.1 基因芯片制作 以筛选的阳性克隆核酸序列(EST)为模板, 用Nested PCR Primer1和Primer2进行PCR扩增, 产物用醋酸铵/异丙醇纯化法进行纯化, 用EB染色的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物纯度. 借助ProSys-5510A点样仪和SMP3将PCR产物点到基片上, 于点样仪中水合30 min, 室温干燥2 h, 以封闭液封闭15 min, 水冲洗、室温干燥后备用. 共计1 152个点(片内重复), 其中控制系统50个(包括阴性对照8个; 空白对照12个; 内参基因30个), 待研究的基因551个; 分为8个亚矩阵, 每个亚矩阵中有12 × 12个点, 点样面积为9 mm × 18 mm. 点间距为0.375 mm. 芯片经脱水, 封闭, 干燥备用.

1.2.2 cDNA探针荧光标记和杂交、扫描 以正常肝脏为对照, 以变性的RNA为模板, 用MMLV反转录酶(Promega公司提供), 含有Cy3-dCTP(对照组)和Cy5-dCTP(实验组)的dNTP (amersham-pharmacia biotech公司提供)和oligo (dT)引物系统进行反转录. 42℃孵育2 h,

加入标记缓冲液I和II, 然后将对照组和实验组合并, 充分混匀后在含有新鲜变性鲑鱼精子DNA的预杂交液中42℃预杂交5-6 h, 再加入标记过的变性探针, 42℃杂交过夜(16-18 h), 再用含5 g/L SDS的2 × SSC室温洗片2次(5 min/次), 含5 g/L SDS的0.2 × SSC在60℃洗片1次(10 min). 用GenePix4000A荧光激光扫描系统(axon instruments, Inc., foster city, CA)对芯片照片进行扫描, 每个时间点均做2次杂交, 最终得到半定量的杂交结果: 绿色信号(下调); 黄色信号(变化不显著); 红色信号(上调). 通过GenePix Pro 3.0软件将cy3和cy5荧光标记按信号强弱进行定量, 用经典的直线回归技术, 将得到的数字资料作标准化处理. 先将所有数据的前景值与背景值相减, 得出cy3, cy5标记的强度值; 将cy5小于200的强度值以200取代. 计算总数为 n 的有效基因(cy3, cy5值二者皆大于200或其一大于800, $R_i = \text{cy5}/\text{cy3}$ 在0.1-10之间的 $R_i = \text{cy5}/\text{cy3}$ 的自然对数值 $R_i' = \ln(R_i)$), 均一化系数 $ND = \text{EXP}(R')$. 将所有数据项的cy3标记强度乘上Normalize系数, 得出调整后的cy3*. 将所有cy3*小于200的强度值以200取代, 算出所有调整后的Ratio值($\text{cy5}/\text{cy3}^*$). 筛选出Ratio大于2或小于0.5的元素进行数据分析, 他们分别代表不同的基因在一个时间点以上表达变化2倍以上. 用GeneMath, GeneSpring (silicon genetics, san carlos, CA), Microsoft Excel (microsoft, redmond, WA)数据分析软件对各组数据进行聚类和分析. 将筛选的ESTs序列递交NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) GeneBank数据库, 进行同源和相似性检索, 借助于大鼠基因组图谱(RGD), 用电子克隆方法进行基因的染色体定位和查找ESTs相应的cDNA全长.

2 结果

2.1 SISPH中与肝再生有关基因的种类 点于芯片上的551个待检测的基因中, 157个基因在0-36-40-44 h SISPH中表达变化显著(变化倍数达2倍以上), 其中, 87个为上调表达, 70个为下调表达. 71为未报道的基因, 86为已报道的基因, 可按功能把这86个基因分为20类, 即参与应急反应的蛋白, 参与糖类代谢的酶, 参与脂肪或类固醇代谢的酶, 参与氧化还原反应的蛋白, 参与生物调节的蛋白, 糖蛋白, 脂蛋白, 核蛋白, 各种因子, 免疫蛋白, 细胞骨架蛋白, 标记蛋白, 受体蛋白, 参与氨基酸代谢的酶, 蛋白水解酶, 蛋白水解酶抑制因子, 磷酸化酶, 磷酸酶, 合成酶, 转移酶等(表1).

2.2 SISPH中与肝再生相关基因的聚类分析 从36 h到44 h, 基因表达谱一直是分散的, 说明与肝再生相关的基因表达一直十分活跃(图1A), 用GeneSpring软件对0-36-40-44 h SISPH的4个时间点差异表达基因进行等级聚类分析表明, 各时间点的基因表达轮廓没有相似性(图1B). 为了更好地解释和说明这些数据, 用

GeneMath 进行均一化分析表明, 这些基因可分为 8 个不同的分支聚类(图2). 对基因表达变化达到最大的时间点

进行聚类分析表明, SISPH 中存在 6 个典型的基因表达模式, 即早期诱导, 中期诱导, 晚期诱导, 早期抑

表 1 SISPH 中与肝再生相关的基因及变化(* SISPH 中特异性表达的基因)

编号	名称	差异值	编号	名称	差异值
未报道的基因					
1	AW558171	0.3	89	细胞色素 P450 3A1 (PNCN inducible, Cyp3A1)	0.3
2	CG31759-PA	2.2	90	细胞色素 P450 2E1	0.2
*3	CH230-11N5	2.4	91	细胞色素 P450 花生四烯酸环氧酶 (Cyp 2C23)	0.3
4	CH230-186B23	0.3	92	细胞色素 P450, 2c39 (Cyp2c39)	0.5
5	CH230-206C20	0.4	*93	细胞色素 P450, 2b19 (Cyp2b15)	0.4
6	CH230-329D3	2.8	94	黄素单加氧酶 1 (Fmo1)	0.2
7	CH230-372C24	0.3	95	对氧酶 1 (Pon1)	0.4
8	CH230-7A22	0.3	96	过氧化物酶体肌氨酸氧化酶 (PSO)	0.4
9	Citb585c7	0.3	*97	核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶	0.4
*10	CTD-2328C19	2.5	参与生物调节的蛋白		
11	FLJ20356	2.5	98	含 34 肽重复序列的蛋白 II	0.5
12	LOC119392	2.3	*99	RAKb	0.3
*13	LOC311304	2.0	糖蛋白		
14	LRRP Aa2-020	0.5	100	α -1-B 糖蛋白 (A1bg)	0.2
15	LRRP Ab1-021	3.0	101	纤维蛋白原 γ (Fgg)	6.9
16	LRRP Aa2-028	2.6	102	纤连蛋白 1 (Fn1)	2.4
*17	LRRP Aa2-111	0.5	103	富含组氨酸的糖蛋白 (Hrg)	0.4
18	LRRP Aa2-174	0.2	104	鞘磷脂相关的糖蛋白 (L-MAG)	5.1
19	LRRP Aa2-296	3.1	105	UDP-葡萄糖醛基粘蛋白	0.4
20	LRRP Ab1-114	3.0	脂蛋白		
*21	LRRP Ab1-119	2.1	106	载脂蛋白 C-I (ApoC1)	0.4
22	LRRP Ab1-216	5.2	107	可溶性载体家族 20, 成员 1 (Slc20a1)	0.4
23	LRRP Ab1-331	3.0	108	TNF α -诱导的脂肪相关蛋白	2.4
24	LRRP Ab1-334	2.8	*109	甲状腺素运载蛋白 (TTN)	0.3
25	LRRP Ab2-008	2.0	核蛋白		
*26	LRRP Ab2-018	2.0	110	RNA 酶 A 家族 4	0.4
27	LRRP Ab2-034	3.0	各种因子		
*28	LRRP Ab2-079	2.0	111	血管生成素	0.4
*29	LRRP Ab2-093	2.1	112	真核生物翻译起始因子 4A1	2.5
30	LRRP Ab2-095	2.3	113	B 细胞前体集落增强因子 (Pbaf)	3.3
*31	LRRP Ab2-131	0.4	与免疫有关的蛋白		
32	LRRP Ab2-225	0.4	114	补体成分 5 (C5)	11.8
33	LRRP Ab2-232	0.4	115	免疫球蛋白 C- κ	0.4
*34	LRRP Ab2-255	0.4	116	巨噬细胞趋化因子 1 (JE/MCP-1)	3.3
35	LRRP Ab2-371	0.3	*117	免疫球蛋白恒定区 III γ 受体	4.8
36	LRRP Ab2-379	2.2	细胞骨架蛋白		
*37	LRRP Ab2-390	2.1	118	肌动蛋白 γ	2.6
*38	LRRP Ab2-416	0.5	119	网纹蛋白重链 (Hc)	2.0
39	LRRP Ab2-417	0.4	*120	突变型肌动蛋白 β (beta-actin)	2.0
40	LRRP Ac1177	3.6	标记蛋白		
41	LRRP Ac1233	2.1	*121	CD44 抗原 (Cd44)	2.2
42	LRRP Ac1873	5.4	122	血浆淀粉样蛋白 a-5	84.8
43	LRRP Ac2-019	4.1	123	抑制性亚染色体转移片段 4	0.5
44	LRRP Ac2-061	7.4	受体蛋白		
45	LRRP Ac2-143	3.1	*124	可可蛋白	2.3
46	LRRP Ac2-193	2.1	125	ATP 结合框亚家族 C	0.2
47	LRRP Ac2-223	2.1	126	细胞核受体超家族 0, 成员 2 (Nr0b2)	0.4
48	LRRP Ba1-647	4.9	127	I 型白介素 1 受体 (Il1r1)	4.6
49	LRRP Bm403207	7.7	参与氨基酸代谢的酶		
50	LRRP Cb1-739	2.4	128	精氨酸酶 1 (Arg1)	2.6
51	LRRP Cc1-27	0.3	129	精氨酸琥珀酸裂解酶 (Asl)	2.9
52	LRRP Cc1-38	0.2	*130	天冬氨酸转氨酶	3.9
53	LRRP Cc1-9	4.4	*131	苯丙氨酸羟化酶 (Pah)	0.5
*54	LRRP Da1-10	2.1	132	2-酪氨酸辅酶 A 裂解酶 (Hpci2)	0.4
*55	LRRP Da2-4	2.3	蛋白水解酶		
56	LRRP zbs559	2.0	*133	α/β 羟化酶 1	2.7
57	LRRPAb2-132	0.3	134	半胱氨酸蛋白酶 1 (Casp1)	2.4
*58	MGC38937	2.0	蛋白酶抑制因子		
59	RIKEN 1110061A24	2.0	135	α -2-巨球蛋白 (A2m)	7.3
60	RIKEN 1300002A08	0.3	136	α -胰蛋白酶抑制因子重链 4	0.3
*61	RIKEN 1500012D08	2.2	137	依赖 Ca^{2+} 的蛋白水解酶抑制因子	8.3
62	RP11-281N10	0.5	138	丝氨酸蛋白酶抑制因子 1	3.7
63	RP23-195K1	2.7	磷酸化酶		
64	RP23-235O1	0.5	*139	CDK103	2.5
65	RP23-417P22	0.5	140	胸苷酸激酶	2.8
66	RP23-92K11	2.4	141	促黏液蛋白 4	3.6
*67	RP24-176A1	2.4	*142	嘌呤核苷酸磷酸化酶	0.5
68	RP32-28p17	0.3	磷酸酶		
69	DNA segment of Chr 1	4.8	*143	焦磷酸酶 1 (Enpp1)	4.2
70	Adult male mouse liver cDNA	0.2	144	磷脂酰丝氨酸酯酶 A1	2.9
*71	12 days embryo like cDNA	2.2	*145	磷酸酶 1 (GL-subunit)	0.2
参与应急反应的蛋白			*146	分泌型磷酸酶 1 (Spp1)	2.2
72	α 主要急性蛋白	9.8	147	UTP-葡萄糖-1-磷酸酶	0.5
73	血管紧张素原 (Agt)	6.6	合成酶		
*74	C-反应蛋白	2.0	148	谷氨酰脯氨酰-tRNA 合成酶 (Eprs)	3.1
75	激肽原	4.9	149	脂肪酰基化酶 1 (rELO1)	0.2
76	Petaxin	2.1	*150	泛素连接酶 E2N (Ube2n)	2.0
77	T-激肽原 (Kng)	9.6	转移酶		
参与糖代谢的酶			151	谷胱甘肽巯基转移酶 Y(b) 亚基	0.3
78	乙醇脱氢酶 (ADH)	0.4	152	肉毒碱 O-乙酰转移酶 (Crot)	0.3
79	甘油 3-磷酸脱氢酶 (Gpd3)	0.4	153	谷胱甘肽巯基转移酶 α -1 (Gsta1)	0.2
80	异柠檬酸脱氢酶 1 (Idh1)	0.3	154	3 型谷胱甘肽巯基转移酶, (Yb3) (Gstm3)	0.3
*81	3-磷酸甘油酸脱氢酶	17.6	155	巯基转移酶 K2	0.3
参与脂肪或类固醇代谢的酶			156	唾液酸转移酶 1 (Siat1)	0.4
82	丙二酰辅酶 A 脱羧酶	0.5	157	UDP-葡萄糖醛基转移酶 2, 成员 5 (Ugt2b5)	0.4
83	NAD(P) 依赖的脱氢酶	0.3			
84	细胞色素 P450 胆固醇 7- α -羟化酶 (P450 VII)	0.2			
85	前列腺素 D2 合成酶 2 (Ptgds2)	2.0			
86	3- α -羟类固醇脱氢酶	0.2			
参与氧化还原反应的蛋白					
87	细胞色素 b5 (Cyb5)	0.4			
88	细胞色素 P450	0.4			

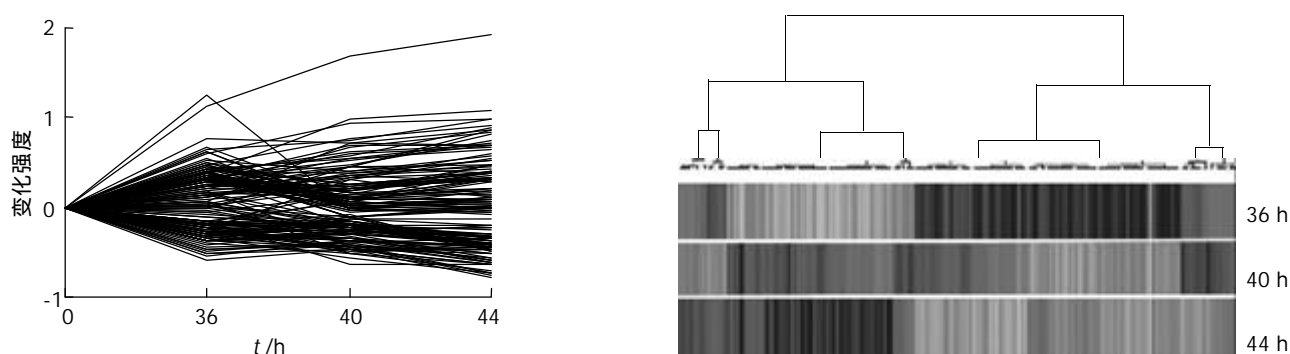


图1 157个基因的聚类分析. A: 至少 SISPH 一个时间点的基因表达变化强度达2倍以上; B: SISPH 各时间点的基因表达轮廓没有相似性.

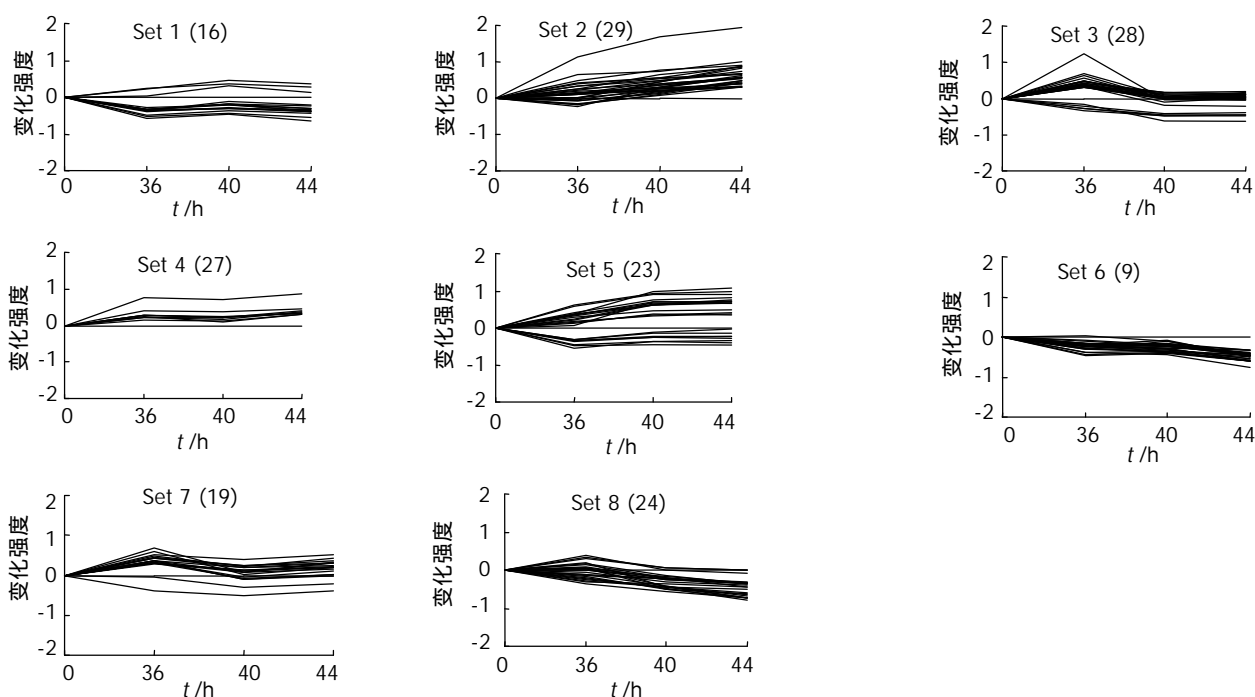


图2 按 GeneMaths 聚类分析方法得到的8类基因表达轮廓.

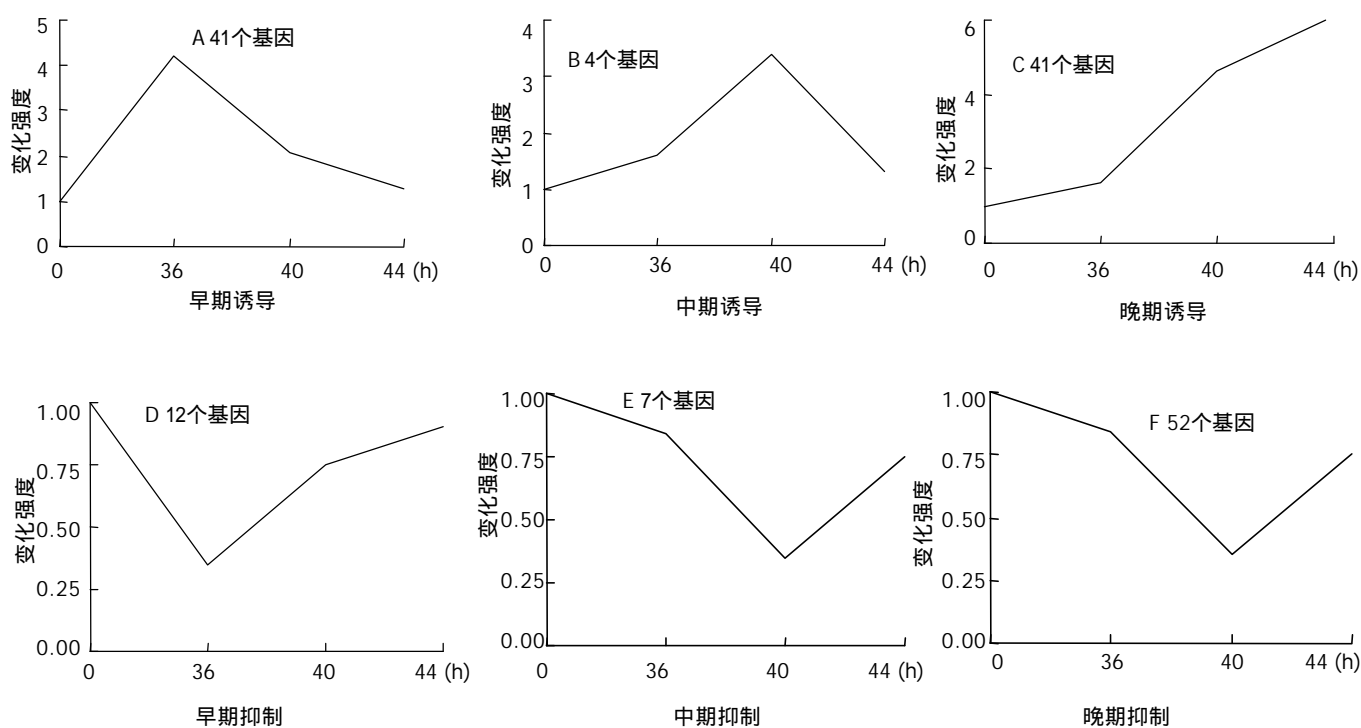


图3 SISPH 不同时间点的基因表达模式.

2.3 SISPH 各时间点表达的基因差异 在0-36-40-44 h SISPH 中, 不同时间点上表达的基因不同, 具体可分为36 h, 36-44 h, 40 h, 40-44 h, 44 h等5类. 在36 h中, 34个基因表达上调, 7个基因表达下调; 在

36-44 h中, 20个基因表达上调, 21个基因表达下调; 40 h中, 2个基因表达上调, 1个基因表达下调; 在40-44 h中, 18个基因表达上调, 14个基因表达下调; 在44 h中, 25个基因表达上调, 15个基因表达下调(图4).

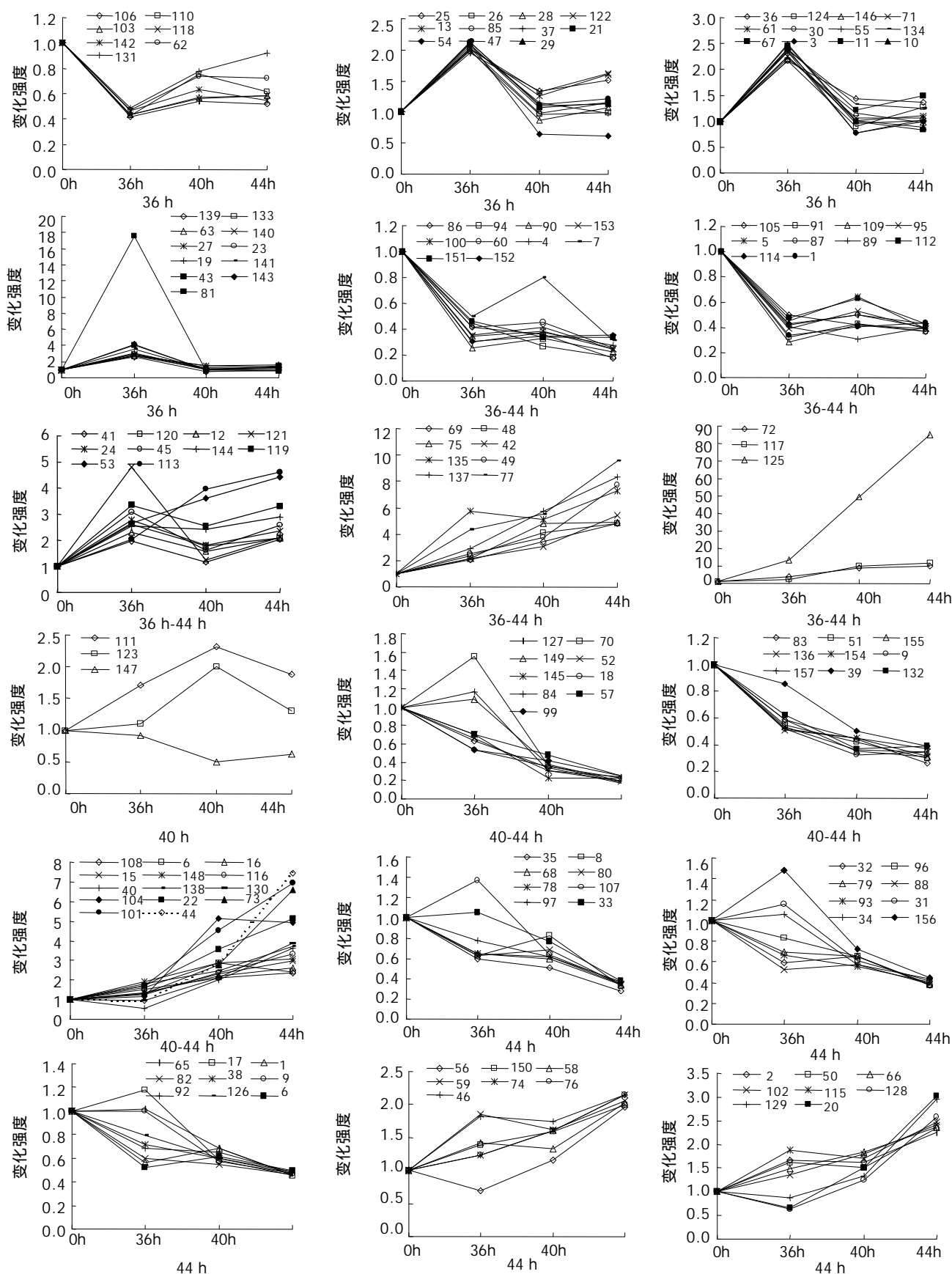


图4 0-36-40-44 h SISPH 中基因的表达动态.

2.4 SISPH 与 PH 中基因表达的比较 与 PH 相比, 38 个基因在 SISPH 中特异性表达(表 1 中 * 标出), 119 个

基因在两个模型中均有表达, 他们在两个模型中的表达趋势相似, 但在相同时间点的表达丰度不同(表 2).

表 2 SISPH 和 PH 的基因表达情况比较

名称	差异值		名称	差异值		
	SISPH	PH		SISPH	PH	
未报道的基因						
AW558171	0.3	0.3	细胞色素 P450 2E1 (Cyp 2E1)	0.2	0.1	
CG31759-PA	2.2	2.9	细胞色素 P450 花生四烯酸环氧化酶 (Cyp 2C23)	0.3	0.2	
CH230-186B23	0.3	0.2	细胞色素 P450, 2c39 (Cyp2c39)	0.5	0.1	
CH230-206C20	0.4	0.2	含黄素的单加氧酶 1 (Fmo1)	0.2	0.1	
CH230-329D3	2.8	2.0	对氧磷酶 1 (Pon1)	0.4	0.2	
CH230-372C24	0.3	0.1	过氧化物酶体肌氨酸氧化酶 (PSO)	0.4	0.3	
CH230-7A22	0.3	0.1	参与生物调节的蛋白			
Citb585c7	0.3	0.2	含 34 肽重复序列的蛋白 II	0.5	0.2	
FLJ20356	2.5	2.5	糖蛋白			
LOC119392	2.3	2.1	α -1-B 糖蛋白 (A1bg),	0.2	0.1	
LRRP Aa2-020	0.5	0.4	纤维蛋白原 γ (Fgg)	6.9	5.1	
LRRP Ab1-021	3.0	6.3	纤连蛋白 1 (Fn1)	2.4	7.2	
LRRP Aa2-028	2.6	2.1	富含组氨酸的糖蛋白 (Hrg)	0.4	0.1	
LRRP Aa2-174	0.2	0.1	鞘磷脂相关的糖蛋白 (L-MAG)	5.1	7.0	
LRRP Aa2-296	3.1	2.1	UDP-葡萄糖醛酸基粘蛋白	0.4	0.3	
LRRP Ab1-114	3.0	4.2	脂蛋白			
LRRP Ab1-216	5.2	6.8	载脂蛋白 C-I (Apoc1)	0.4	0.3	
LRRP Ab1-331	3.0	2.2	可溶性载体家族 20, 成员 1 (Slc20a1)	0.4	0.4	
LRRP Ab1-334	2.8	2.7	甲状腺素运载蛋白-related protein (TTN)	0.3	0.3	
LRRP Ab2-008	2.0	2.1	核蛋白			
LRRP Ab2-034	3.0	2.3	RNA 酶 A 家族 4	0.4	0.2	
LRRP Ab2-095	2.3	3.1	各种因子			
LRRP Ab2-225	0.4	0.3	血管生成素	0.4	0.2	
LRRP Ab2-232	0.4	0.2	真核生物翻译起始因子 4A1	2.5	3.8	
LRRP Ab2-371	0.3	0.4	B 细胞前体集落增强因子 (Pbef)	3.3	3.4	
LRRP Ab2-379	2.2	2.2	与免疫有关的蛋白			
LRRP Ab2-417	0.4	0.2	补体成分 5 (C5)	11.8	8.8	
LRRP Ac1177	3.6	3.3	I 免疫球蛋白 C- κ	0.4	0.2	
LRRP Ac1233	2.1	4.2	巨噬细胞趋化因子 (JE/MCP)	3.3	4.0	
LRRP Ac1873	5.4	6.0	细胞骨架蛋白			
LRRP Ac2-019	4.1	2.0	肌动蛋白 γ	2.6	4.7	
LRRP Ac2-061	7.4	7.6	网格蛋白重链 (Hc)	2.0	3.3	
LRRP Ac2-143	3.1	3.3	标记蛋白			
LRRP Ac2-193	2.1	2.3	血浆淀粉样蛋白 a-5	84.8	90.5	
LRRP Ac2-223	2.1	2.4	抑制性亚染色体转移片段 4	0.5	0.3, 2.3	
LRRP Ba1-647	4.9	3.2	受体蛋白			
LRRP Bm403207	7.7	5.7	ATP-结合框亚家族 C	0.2	0.2	
LRRP Cb1-739	2.4	2.3	细胞核受体超家族 0, 成员 2 (Nr0b2)	0.4	0.2	
LRRP Cc1-27	0.3	0.1, 2.2	I 型白介素 1 受体(I1r1)	4.6	7.9	
LRRP Cc1-38	0.2	0.2	参与氨基酸代谢的酶			
LRRP Cc1-9	4.4	2.5	精氨酸酶 1 (Arg1)	2.6	3.5	
LRRP zbs559	2.0	3.1	精氨酸琥珀酸裂解酶 (Asl)	2.9	4.9	
LRRPAb2-132	0.3	0.1	2-酪氨酸辅酶 A 裂解酶(Hpcl2)	0.4	0.4	
RIKEN 1110061A24	2.0	3.0	蛋白水解酶			
RIKEN 1300002A08	0.3	2.4	半胱氨酸蛋白酶 1 (Casp1)	2.4	2.6	
RP11-281N10	0.5	0.3	蛋白酶抑制因子			
RP23-195K1	2.7	2.4	α -2-巨球蛋白 (A2m)	7.3	21.3	
RP23-235O1	0.5	0.2	α -胰蛋白酶抑制因子重链 4	0.3	0.2	
RP23-417P22	0.5	0.1	依赖 Ca ²⁺ 的蛋白水解酶抑制因子	8.3	6.6	
RP23-92K11	2.4	2.7	丝氨酸蛋白水解酶抑制因子 1	3.7	5.0	
RP32-28p17	0.3	0.3	磷酸化酶			
DNA segment of Chr 1	4.8	6.1	胸苷酸激酶	2.8	3.0	
Adult male mouse liver cDNA	0.2	0.1	促黏液蛋白 4	3.6	2.1	
参与应急反应的蛋白						
α -1 主要急相蛋白	9.8	6.2	磷酸酶			
血管紧张肽原 (Agt)	6.6	8.4	磷脂酰丝氨酸磷脂酶 A1	2.9	2.8	
激肽原	4.9	3.4	UTP-葡萄糖-1-磷酸酶	0.5	0.4	
Petaxin	2.1	2.2	合成酶基			
T-激肽原	9.6	5.9	谷氨酰脯氨酸-tRNA 合成酶 (Eprs)	3.1	4.5	
参与糖类代谢的酶						
乙醇脱氢酶 (ADH)	0.4	0.1, 2.4	脂肪酰辅酶 A 合成酶 (Eprs)	0.2	0.2	
甘油 3-磷酸脱氢酶 (Gpd3)	0.4	0.4	转移酶			
异柠檬酸脱氢酶 1 (Idh1)	0.3	0.3	谷胱甘肽巯基转移酶 Y(b) 亚基	0.3	0.3, 2.0	
参与脂肪或类固醇代谢的酶						
丙二酰辅酶 A 脱羧酶	0.5	0.3	肉碱 O-辛酰转移酶 (Crot)	0.3	0.3	
NAD (P) 依赖的脱羧酶	0.3	0.4	谷胱甘肽巯基转移酶 α -1 (Gsta1)	0.2	0.1	
细胞色素 P450 胆固醇 7-α 羟化酶 (P450 VII)	0.2	0.4, 2.3	3 型谷胱甘肽巯基转移酶, (Yb3) (Gstm3)	0.3	0.3	
前列腺素 D2 合成酶 2 (Ptgds2)	2.0	3.0	磺基转移酶 K2	0.3	0.3	
3-α 羟类固醇脱氢酶	0.2	0.2	噻唑转移酶 1 (Siat1)	0.4	2.6	
参与氧化还原反应的蛋白						
细胞色素 b5 (Cyb5)	0.4	0.2	UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 2, 成员 5 (Ugt2b5)	0.4	0.3	
细胞色素 P450	0.4	0.2				
细胞色素 P450 3A1 (PNCN, Cyp 3A1)	0.3	0.2				

制, 中期抑制, 晚期抑制(图3).

2.5 SISPH 中基因表达的丰度差异 在 0-36-40-44 h SISPH 中, 不同基因的变化幅度不同, 根据上调或下调的幅度, 可以将这些基因分为 3 类: (1)70 个基因下调超过 0.5; (2)84 个基因上调在 2-10 之间; (3)3 个基因上调达 10 以上(图 5).

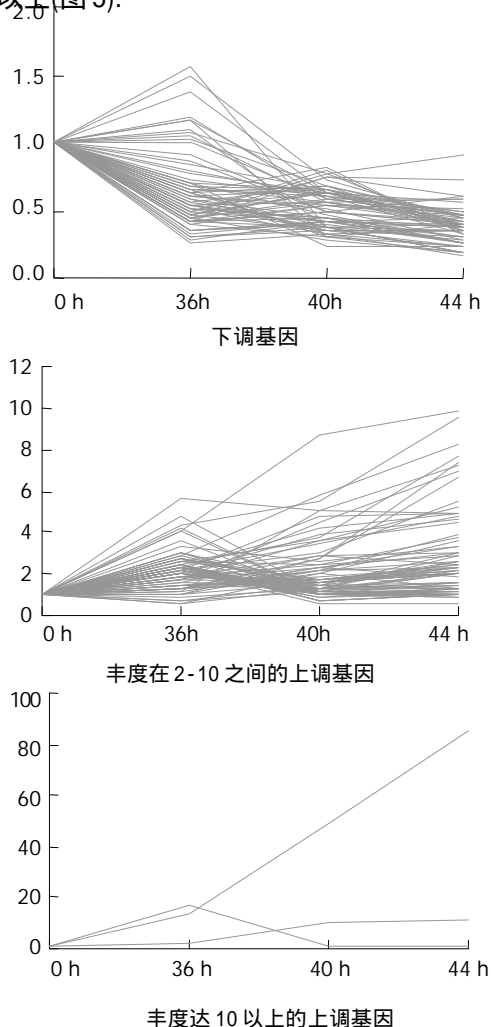


图 5 0-36-40-44 h SISPH 中基因表达丰度.

3 讨论

3.1 肝再生过程中上调表达的基因 41 个基因在 SISPH 的 36 h 达到表达高峰, 表明这些基因可能与肝再生的细胞分裂和增生有关. 其中, 前列腺素 D2 合成酶 2 可催化前列腺素 D2 的合成和转运类维生素 A^[31], 他的上调表达意味着这两类维生素在肝再生中起重要作用. 巨噬细胞趋化因子(JE/MCP1)是多种炎症反应和免疫反应的抑制剂^[32], 他的大量表达可能与减少部分肝切除引起的炎症反应有关. 网格蛋白可以合成或捕获内吞囊泡并定位于高尔基体的反面膜^[33], 他的大量表达表明细胞内运输和消化活跃. CD44 是结合在透明质酸上的一类跨膜糖蛋白, 他的上调可能与新生肝细胞的粘连有关^[34]. 胸苷激酶为 dTTP、氨酰化嘧啶和氨基酸合成所必须, 他在 SISPH 的 36 h 大量表达, 说明这个时期的核苷酸和蛋

白质合成很旺盛. Mss4 蛋白是一个细胞核磷蛋白^[35-36], 他调节 Ras 信号途径, 因此他的大量表达可能是通过该信号途径抑制肝细胞的凋亡. 作为细胞周期蛋白, CDK 103 的大量表达可能促进肝细胞的大量分裂. α -2 巨球蛋白是新生肝细胞产生的一种蛋白水解酶抑制因子^[36], 他的上调表达意味着肝再生中细胞的异化作用受到抑制. Fc- γ 受体 III 能促进巨噬细胞炎症蛋白 1- α 的合成^[37]和导致依赖 IgG 的细胞毒性及多种细胞因子和化学因子的产生^[38-39], 故他的大量表达可能与肝切除后的多种免疫反应或炎症反应有关. 肌动蛋白 γ 能参与细胞分裂过程中细胞质的组织结构^[40], 他的上调表达表明他与肝再生的细胞结构和功能建成有关. 鞘磷脂糖蛋白、可可蛋白、突变型肌动蛋白 β 和一个尚未报道过的蛋白基因在 SISPH 的 40 h 达到表达高峰, 鞘磷脂糖蛋白对神经系统的重建具有重要作用^[41], 他可能参与肝脏神经系统的再生. 可可蛋白可以防止早期乙醇诱导的肝损伤^[42], 他的上调表达可能有助于保护再生肝不受醇类的伤害. α -1 主要急相蛋白属半胱氨酸蛋白水解酶抑制因子, 补体成分 5 不仅诱导肝细胞分泌葡萄糖, 还参与急相免疫反应的启动^[43], 他们的共同作用可能有助于再生肝的血液循环和炎症消除. 血浆淀粉样蛋白 A5 基因上调达 85, 推测他能参与损伤蛋白及其他无用成分的聚集. 依赖 Ca^{2+} 的丝氨酸蛋白水解酶抑制因子参与蛋白糖基化并促进其成熟^[44], 他在该时期的过量表达有助于细胞粘连. 磷脂酰丝氨酸磷脂酶 A1 能参与磷脂水解成 2-酰基溶血磷脂和抑制溶血磷脂的合成^[45-46], 他的上调表达可能与肝再生中的脂质转化有关. 具有血管活性的血管紧张肽^[47-49]的大量表达可能有利于改善肝脏的血液循环, 加快肝再生的进程. B 细胞前体集落增强因子是造血细胞的分裂素, 他在 SISPH 的 44h 剧烈表达可能有助于肝细胞通过 G₁ 检验点进行 DNA 复制和肝细胞增生^[26]. 纤维蛋白原 γ 是 II 型急相反应蛋白中的一类, 促进血小板的凝集和纤粘连斑的形成, 并对手术损伤(如肝切除等)产生非特异性的急相反应^[50-52], 他的上调表达与肝切除后的急相反应有关. 天冬氨酸转氨酶是嘌呤碱合成所必需的, 他的上调说明细胞需要大量嘌呤. 丝氨酸蛋白酶抑制因子 1 是丝氨酸蛋白酶抑制因子超家族中的一种, 可能具有中和肝切除产生的炎症反应作用. 纤连蛋白 1 参与诱导细胞的有丝分裂并能形成细胞外基质的纤维网络复合物^[53-55], 因此, 他的上调表达可能会加快残肝细胞的分裂, 从而促进细胞的结构功能建成和残肝的再生. 精氨酸琥珀酸裂解酶是鸟氨酸循环中的限速酶, 同时, 他催化精氨酸的生物合成^[56-58], 另外, 他防止肝脏的纤维化损伤, 他的上调表达在肝再生中也起着积极的作用.

3.2 肝再生过程中下调表达的基因 12 个基因在 SISPH 的 36 h 表达达到最少, 表明这些基因可能与增生抑制有关. 其中, 富含组氨酸的糖蛋白能抑制肝磷脂的抗凝血酶活性^[59-61], 他的下调表达有助于再生肝的血液循

环. 载脂蛋白 C-I 是脂蛋白与 LDL 受体和 VLDL 受体结合的抑制因子, 也是血浆胆固醇脂转运蛋白的抑制因子^[62], 他的下调可能更有利于肝再生所需要的脂类转运. 苯丙氨酸羟化酶能催化苯丙氨酸转变为酪氨酸^[63], 为再生肝提供合成蛋白质所必须氨基酸. 甲状腺素运载蛋白参与嘌呤的分解代谢^[64], 他的下调表达表明, 这个时期再生肝可能需要更多的嘌呤. 血管生成素与血管发育有关, 是新血管形成的主要因子之一^[65], 他的下调表达说明这个时期血管生成较少. 肉毒碱 O- 辛酰转移酶能协助中链或长链脂肪酸进出过氧化物酶体和线粒体^[66], 他的下调表达说明, 这个时期的再生肝的饱和脂肪酸的代谢较弱. 细胞色素 P450 花生四烯酸环氧化酶、肉毒碱 O- 辛酰转移酶等都是与再生肝的脂代谢有关, 他们的下调表达表明, 在 SISPH 的 36 h, 残肝的脂代谢很弱. 7 个基因在 SISPH 的 40 h 下调表达至最低点, 其中, 与氧化还原及降解外源毒素和内源雌激素等^[67]有关的酶 2- 酪氨酸辅酶 A 裂解酶、细胞色素 P450 3A1 (Cyp 3A1)、谷胱甘肽巯基转移酶 Y (b) 等的下调表达可能有助于保护残肝免受氧化作用的毒害. 磷酸酶 1 催化微管蛋白羧基酶与微管的缔合作用, 进而促进微管蛋白的降解^[68], 他的下调暗示这个时期的肝细胞需要大量合成微管蛋白. 谷胱甘肽巯基转移酶能清除外源致癌物, 同时他还具有抗氧化作用^[69], 他的下调可能有助于保持再生肝的谷胱甘肽高水平. 在 SISPH 的 44h 表达量最少的 52 个基因中, 与脂代谢有关的酶如异柠檬酸脱氢酶 1、丙二酰辅酶 A 脱羧酶 (MCD)、可溶性载体家族 20、唾液酸转移酶 1、细胞色素 P450 胆固醇 7- α 羟化酶、NAD (P) 依赖的类固醇脱氢酶、3- α 羟类固醇脱氢酶等的下调表明, 残肝的脂代谢仍然很弱^[70-72]. 亚胺对肝细胞有毒性, 与亚胺合成有关的异柠檬酸脱氢酶 1 在再生肝中的下调表达有助于肝再生的进行. 乙醇脱氢酶的下调表达说明肝再生中乙醇代谢途径受到了抑制. 肌氨酸氧化酶参与线粒体氧化磷酸化的电子传递, 他的下调表明这个时期再生肝的氧化磷酸化作用较弱. 细胞色素 P450 胆固醇 7- α 羟化酶在保持肝脏的胆固醇水平方面起重要作用^[73], 他的下调表达表明再生肝的胆固醇合成较弱. ATP 结合框亚家族 C 与异质蛋白由内质网运输到高尔基体有关^[74], 他的下调表达表明, 再生肝很少合成异质蛋白. 3- α 羟类固醇脱氢酶参与胆汁酸的生物合成^[75], 他的下调表明再生肝的分化程度较低. α -1-B 糖蛋白能刺激血小板的分泌和积聚^[76], 他的下调表达可能有助于再生肝的血液循环. 与氧化还原有关的酶如细胞色素 P450 (Cyp), 细胞色素 P450 2b19 (Cyp 2b19), 细胞色素 P450 2c39 (Cyp 2c39), 细胞色素 B5, 黄素单加氧酶, 细胞色素 P450 2E1 (Cyp 2E1), 对氧磷酶等^[77]的下调表达可能有助于保护残肝免受氧化作用的毒害. 总之, 肝再生是个复杂的过程, 涉及到许许多多基因和蛋白质及他们的协同作用, 应该进一步的深入研究.

致谢: 感谢上海博星生物基因芯片有限责任公司的帮助.

4 参考文献

- Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Moint* 2002;8:RA53-63
- Li YC, Xu CS, Zhu WL, Li WQ. Isolation and analysis of a novel gene over-expressed during liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2003;9:1282-1286
- Xu CS, Li YC, Lin JT, Zhang YH. Cloning and analysing the up-regulated expression of transthyretin-related gene (LR1) in rat liver regeneration following short interval successive partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2003;9:148-151
- Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, Aldegue X, Que X, Shaked A, Olthoff KM. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. *Hepatology* 2003;38:1563-1572
- Gandillet A, Alexandre E, Royer C, Cinqualbre J, Jaeck D, Richert L. Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis. *Eur Surg Res* 2003;35:148-160
- Xu CS, Lu AL, Feng QC, Li GW. Effects of short interval successive partial hepatectomy on ACP, AKP, HSC70/HSP68 and PCNA in rat liver. *Shiyan Shengwu Xuebao* 2001;34:197-206
- Qin JM, Fu XY, Li SJ, Liu SQ, Zeng JZ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. Gene and protein expressions of p28GANK in rat with liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2003;9:2523-2527
- Xu CS, Lu AL, Xia M, Li XY, Li YH, Zhao XY. The effect of heat shock before rat partial hepatectomy on HSC70/HSP68 expression and phosphatase activities. *Shiyan Shengwu Xuebao* 2000;33:1-11
- 龚作炯, 吴亚斌, 杨丽华. 生长激素和肝细胞生长因子对大鼠肝大部切除后再生的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1905-1908
- 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控. *世界华人消化杂志* 2003;11:1152-1155
- Xia M, Xu C, Ji S, Xue S. Shedding of Fas ectodomain that affects apoptosis of hepatocytes occurring in regenerative liver. *J Gastroenterol* 2002;37:1042-1047
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130
- Xia M, Xue SB, Xu CS. Shedding of TNFR1 in regenerative liver can be induced with TNF alpha and PMA. *World J Gastroenterol* 2002;8:1129-1133
- Schoen JM, Lauth WW. Nitric oxide potentiates C-Fos mRNA expression after 2/3 partial hepatectomy. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:47-48
- Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X. The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 2002;37:606-612
- 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化. *世界华人消化杂志* 2003;11:434-437
- Papalampros E, Felekouras ES, Filis K, Angelopoulou R, Kourelis T, Tsamandas AC, Bastounis E. Liver pathology and cell proliferation after octreotide administration following partial hepatectomy in rats: an experimental study. *Dig Dis Sci* 2002;47:1953-1958
- Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF- α /IL-6 dependent mechanism. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):812-818
- Kong D, Kusano M, Arase T, Nishino N, Jin Z, Kameyama S, Kato H, Niiya T, Fujioka T, Murakami M, Itoh Y. Liver regeneration after portal vein plus hepatic artery ligation performed heterochronously in rats. *Hepatobiliary J Pancreat Surg* 2002;9:86-92
- Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van den Berge V, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2002;36:645-652

- 21 Xu M, Han B, Xue L, Gong J. Ursodeoxycholic acid promotes liver regeneration after partial hepatectomy in bile duct obstructive rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:103-105
- 22 Xu WX, Wang SY, Wei HD, Yang XM. Isolation of regulation genes related with liver regeneration by representational difference analysis. *Shengli Xuebao* 2000;52:277-280
- 23 Yamano T, Hirai R, Hato S, Uemura T, Shimizu N. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor-beta1 mRNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery* 2002;131:163-171
- 24 Alhonen L, Rasanen TL, Sinervirta R, Parkkinen JJ, Korhonen VP, Pietila M, Janne J. Finland. Polyamines are required for the initiation of rat liver regeneration. *Biochem J* 2002;362(Pt 1):149-153
- 25 Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojinma S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:784-792
- 26 Li YC, Lin JT, Li WQ, Zhang HY, Wei MX, Xu CS. Cloning and functional analysis of up-regulated expressed genes in rat liver regeneration following short interval successive partial hepatectomy. *Devel Reproductive Biol* 2002;11:151-160
- 27 Li YC, Ma ZQ, Xu CS. Change of TNF- β , c-myc, p53, p21, PCNA, Bcl-2, TGF- β related with the cell preolification in rat liver regeneration following short interval successive partial hepatectomy. *Devel Reproductive Biol* 2002;11:253-260
- 28 Jensen SA. Liver gene regulation in rats following both 70 or 90% hepatectomy and endotoxin treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:525-530
- 29 徐存拴, 李永辉, 段瑞峰, 卢爱灵, 夏民, 吉爱玲. 短间隔连续部分肝切除对大鼠生存和肝组织结构的影响. *动物学报* 2001;47:659-665
- 30 段瑞峰, 吕静峰, 张冬芬, 夏民, 徐存拴. 短间隔连续部分肝切除 (SISPH) 对肝细胞核和核仁的影响. *动物学报* 2001;47:199-206
- 31 Tzanakakis GN, Krambovitis E, Tsatsakis AM, Vezeridis MP. The preventive effect of ketoconazole on experimental metastasis from a human pancreatic carcinoma may be related to its effect on prostaglandin synthesis. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;32:23-30
- 32 Awahara RS, Deng ZW, Denking DJ, Deuel TF. Role of serine/threonine protein kinases in the induction of JE, a platelet-derived growth factor inducible gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1815-1820
- 33 Wu XF, Zhao XH. Greene clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2001;155:291-300
- 34 Della Fazio MA, Pettirossi V, Ayroldi E, Riccardi C, Magni MV, Servillo G. Differential expression of CD44 isoforms during liver regeneration in rats. *J Hepatol* 2001;34:555-561
- 35 Audhya A, Emr SD. Regulation of PI4, 5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* 2003;22:4223-4236
- 36 Audhya A, Emr SD. Regulation of PI4, 5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* 2003;22:4223-4236
- 37 Hope C, Mettenburg J, Gonias SL, DeKosky ST, Kamboh MI, Chu CT. Functional analysis of plasma alpha(2)-macroglobulin from Alzheimer's disease patients with the A2M intronic deletion. *Neurobiol Dis* 2003;14:504-512
- 38 Song XY, Shapiro S, Goldman DL, Casadevall A, Scharff M, Lee SC. Fc γ Receptor I- and III-mediated macrophage inflammatory protein 1alpha induction in primary human and murine microglia. *Infect Immun* 2002;70:5177-5184
- 39 Arase N, Arase H, Hirano S, Yokosuka T, Sakurai D, Saito T. IgE-mediated activation of NK cells through Fc gamma RIII. *J Immunol* 2003;170:3054-3058
- 40 Ducret A, Nguyen M, Breckenridge DG, Shore GC. The resident endoplasmic reticulum protein, BAP31, associates with gamma-actin and myosin B heavy chain. *Eur J Biochem* 2003;270:342-349
- 41 Ito H, Ishida H, Collins BE, Fromholt SE, Schnaar RL, Kiso M. Systematic synthesis and MAG-binding activity of novel sulfated GM1b analogues as mimics of Chol-1 (alpha-series) gangliosides: highly active ligands for neural siglecs. *Carbohydr Res* 2003;338:1621-1639
- 42 McKim SE, Konno A, Gabele E, Uesugi T, Froh M, Sies H, Thurman RG, Arteel GE. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys* 2002;406:40-46
- 43 Mack C, Jungermann K, Gotze O, Schieferdecker HL. Anaphylatoxin C5a actions in rat liver: synergistic enhancement by C5a of lipopolysaccharide-dependent alpha (2)-macroglobulin gene expression in hepatocytes via IL-6 release from Kupffer cells. *J Immunol* 2001;167:3972-3979
- 44 Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G. Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L412-L417
- 45 Wen XY, Stewart AK, Skaug J, Wei E, Tsui LC. Murine phosphatidylserine-specific phospholipase A1 (Ps-pla1) maps to chromosome 16 but is distinct from the lpd (lipid defect) locus. *Mamm Genome* 2001;12:129-132
- 46 Aoki J, Nagai Y, Hosono H, Inoue K, Arai H. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:26-32
- 47 Grammatopoulos TN, Morris K, Bachar C, Moore S, Andres R, Weyhenmeyer JA. Angiotensin II attenuates chemical hypoxia-induced caspase-3 activation in primary cortical neuronal cultures. *Brain Res Bull* 2004;62:297-303
- 48 Zhang Y, Yang X, Wu P, Xu L, Liao G, Yang G. Expression of angiotensin II type 1 receptor in rat hepatic stellate cells and its effects on cell growth and collagen production. *Horm Res* 2003;60:105-110
- 49 Carvalho TH, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 2003;42:707-712
- 50 Mosesson MW. Fibrinogen gamma chain functions. *J Thromb Haemost* 2003;1:231-238
- 51 Yakovlev S, Loukinov D, Medved L. Structural and functional role of the beta-strand insert (gamma 381-390) in the fibrinogen gamma-module. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:122-124
- 52 Gerner C, Steinkellner W, Holzmann K, Gsur A, Grimm R, Ensinger C, Obrist P, Saueremann G. Elevated plasma levels of crosslinked fibrinogen gamma-chain dimer indicate cancer-related fibrin deposition and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2001;85:494-501
- 53 Ni H, Papalia JM, Degen JL, Wagner DD. Control of thrombus embolization and fibronectin internalization by integrin alpha IIb beta 3 engagement of the fibrinogen gamma chain. *Blood* 2003;102:3609-3614
- 54 Gao M, Craig D, Lequin O, Campbell ID, Vogel V, Schulten K. Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:14784-14789
- 55 Nishizawa Y, Fukai F, Natori Y, Kato R, Tanuma S, Katayama T. Mesangial cell apoptosis induced by a fibronectin fragment. *Apoptosis* 1998;3:407-412
- 56 Mori T, Nagai K, Mori M, Nagao M, Imamura M, Iijima M, Kobayashi K. Progressive liver fibrosis in late-onset argininosuccinate lyase deficiency. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5:597-601
- 57 Yu B, Howell PL. Intragenic complementation and the structure and function of argininosuccinate lyase. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1637-1651
- 58 Masaki IM, Shoji TK, Toda YH, Totani MY. Liver-type arginase is a highly sensitive marker for hepatocellular damage in rats. *Clin Chem* 2001;47:946-948

- 59 Mori S, Takahashi HK, Yamaoka K, Okamoto M, Nishibori M. High affinity binding of serum histidine-rich glycoprotein to nickel-nitrilotriacetic acid: the application to microquantification. *Life Sci* 2003;73:93-102
- 60 Gorgani NN, Smith BA, Kono DH, Theofilopoulos AN. Histidine-rich glycoprotein binds to DNA and Fc gamma RI and potentiates the ingestion of apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2002;169:4745-4751
- 61 Fu CL, Horn MK 3rd. Histidine-rich glycoprotein plus zinc to neutralize heparin. *J Lab Clin Med* 2002;139:211-217
- 62 Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:297-304
- 63 Doskeland AP, Flatmark T. Conjugation of phenylalanine hydroxylase with polyubiquitin chains catalysed by rat liver enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1547:379-386
- 64 Eneqvist T, Lundberg E, Nilsson L, Abagyan R, Sauer-Eriksson AE. The transthyretin-related protein family. *Eur J Biochem* 2003;270:518-532
- 65 Hisai H, Kato J, Kobune M, Murakami T, Miyanishi K, Takahashi M, Yoshizaki N, Takimoto R, Terui T, Niitsu Y. Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity. *Clin Cancer Res* 2003;9:4852-4859
- 66 Morillas M, Gomez-Puertas P, Rubi B, Clotet J, Arino J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G. Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain. *J Biol Chem* 2002;277:11473-11480
- 67 Galant C, Gala JL, Van Den Berge V, Berliere M, Haumont E, Horsmans Y. Immunolocalisation of cytochrome P-450 3A enzymes in human breast carcinoma: relationship with tumour differentiation and steroid receptors. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:142-146
- 68 Contin MA, Purro SA, Bisig CG, Barra HS, Arce CA. Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A decrease the level of tubulin carboxypeptidase activity associated with microtubules. *Eur J Biochem* 2003;270:4921-4929
- 69 Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Nakajima J, Teramoto S, Ouchi Y, Matsuse T. Depletion of glutathione S-transferase P1 induces apoptosis in human lung fibroblasts. *Exp Lung Res* 2003;29:523-536
- 70 Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 2003;378(Pt 3):938-990
- 71 Kerner J, Hoppel CL. Radiochemical malonyl-CoA decarboxylase assay: activity and subcellular distribution in heart and skeletal muscle. *Anal Biochem* 2002;306:283-289
- 72 Lee GY, Kim NH, Zhao ZS, Cha BS, Kim YS. Peroxisomal proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the rat hepatic malonyl-CoA decarboxylase gene; A key regulation of malonyl-CoA level. *Biochem J* 2003;Pt
- 73 Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Research* 2002;43:533-543
- 74 Tate G, Li M, Suzuki T, Mitsuya T. A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Genes Genet Syst* 2002;77:117-121
- 75 Espey LL, Yoshioka S, Ujioka T, Fujii S, Richards JS. 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA transcription in the immature rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Biol Reprod* 2001;65:72-78
- 76 Adam F, Verbeuren TJ, Fauchere JL, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost* 2003;1:798-804
- 77 Chanas B, Wang H, Ghanayem BI. Differential metabolism of acrylonitrile to cyanide is responsible for the greater sensitivity of male vs female mice: role of CYP2E1 and epoxide hydrolases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;193:293-302

K-ras基因在胰腺癌和慢性胰腺炎中突变和表达异常及其临床意义

任玥欣, 许国铭, 李兆申, 刘 枫

任玥欣, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化疾病研究所
广东省广州市 510515
许国铭, 李兆申, 刘枫, 中国人民解放军第二军医大学长海医院
上海市 200433
任玥欣, 女, 1974-12-09 生, 山东省济南市人, 汉族. 第一军医大学南方医院消化疾病研究所博士生.
上海市科学委员会重点资助项目, No. 994119044
项目负责人: 任玥欣, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化疾病研究所. yzxu@fimmu.com
电话: 020-61641544
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-10-27

Aberrant expression and mutations of K-ras gene in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis

Yue-Xin Ren, Guo-Ming Xu, Zhao-Shen Li, Feng Liu

Yue-Xin Ren, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Guo-Ming Xu, Zhao-Shen Li, Feng Liu, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Yue-Xin Ren, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. yzxu@fimmu.com
Received: 2003-08-23 Accepted: 2003-10-27

Abstract

AIM: To investigate frequency and clinical significance of P21^{ras} expression and K-ras mutations in pancreatic diseases and to identify their diagnostic values in pancreatic carcinoma.

METHODS: A total of 117 ductal lesions were identified in the available sections from pancreatic resection specimens of patients with pancreatic diseases, comprising 24 pancreatic ductal adenocarcinoma, 19 peritumoral ductal atypical hyperplasia, 58 peritumoral ductal hyperplasia and 19 normal duct at the tumor free resection margin. 24 ductal lesions were gotten from 24 chronic pancreatitis. The expression of P21^{ras} was examined by immunohistochemical method. DNA was extracted. Codon 12 K-ras mutations were examined using the two-step polymerase chain reaction (PCR) combined with restriction enzyme digestion, followed by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis by means of automated DNA sequencing.

RESULTS: The expression level of P21^{ras} in pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis was higher than that of normal pancreatic tissue, but the expression of P21^{ras} in ductal hyperplasia neighboring pancreatic carcinoma was similar to that in ductal hyperplasia of chronic pancreatitis. P21^{ras} showed a gradual stepwise increase in the frequency

of expression ranged from normal pancreatic duct (0%), to hyperplasia duct (36.6%) and to atypical hyperplasia duct (78.9%). The expression level of P21^{ras} of atypical hyperplasia duct was higher than that of hyperplasia duct ($P < 0.01$). K-ras mutation rate of the pancreatic carcinoma was 79% which was significantly higher than that in the chronic pancreatitis (33%) ($P < 0.01$). It was also found that K-ras mutation rate was gradually increased from normal duct at the tumor free resection margin, peritumoral ductal hyperplasia, peritumoral ductal atypical hyperplasia to pancreatic ductal adenocarcinoma. The mutation pattern of K-ras 12 codon of chronic pancreatitis was GGT → GAT, GGT and CGT, which was identical to that in pancreatic carcinoma.

CONCLUSION: Overexpression of P21^{ras} and K-ras mutation may play roles in the malignant transformation of pancreatic ductal cell. K-ras mutation only is not specific enough to diagnose pancreatic carcinoma.

Ren YX, Xu GM, Li ZS, Liu F. Aberrant expression and mutations of K-ras gene in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):664-668

摘要

目的: 探讨Ras蛋白过度表达与胰腺癌和慢性胰腺炎临床病理的关系, 以及K-ras突变在慢性胰腺炎中的临床意义和在胰腺癌诊断中的价值。

方法: 应用EnVision显色系统免疫组化方法分别检测胰腺癌组织(24例)、癌旁组织(77例)、手术切缘正常组织(16例)和慢性胰腺炎(24例)石蜡包埋组织中P21^{ras}的表达情况. 应用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)方法分别检测胰腺癌、癌旁组织、手术切缘正常组织、慢性胰腺炎石蜡包埋组织的K-ras突变并进行DNA测序确认。

结果: P21^{ras}在胰腺导管腺癌组织中的表达阳性率为58.3% (14/24), 与慢性胰腺炎胰腺导管增生组织的P21^{ras}表达阳性率45.8% (11/24)相比, 二者差异无显著性($P > 0.05$); P21^{ras}在良、恶性胰腺疾病增生性病变中的表达阳性率为36.6% (30/82), 与其在正常胰腺组织中的表达阳性率(0%)相比, 有显著性差异($P < 0.05$); P21^{ras}蛋白在正常胰腺组织、导管增生性病变、导管不典型增生中的表达阳性率分别为0%、36.6%和78.9%, 呈渐进过程, 而且增生性导管病变与不典型增生相比, P21^{ras}表达阳性率的差异具有显著性($P < 0.05$)。胰腺癌K-ras12密码子突变率(79%)显著高于慢性胰腺炎(33.3%) ($P < 0.01$), 且在切缘正常组织→癌周导

管增生→癌周不典型增生→胰腺癌过程中,突变率有逐渐上升的趋势. 突变方式以 12 密码子 GGT→GAT、GTT、CGT 为主且同 1 例患者突变方式一致.

结论: P21^{ras}过度表达和 K-ras 基因突变在胰腺癌发生中起到作用,但 K-ras 基因突变作为胰腺癌诊断的分子标志缺乏特异性.

任玥欣, 许国铭, 李兆申, 刘枫. K-ras 基因在胰腺癌和慢性胰腺炎中突变和表达异常及其临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(3):664-668

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/664.asp>

0 引言

胰腺癌为一高度恶性肿瘤^[1-6], 临床确诊者大多属晚期癌^[7-14], 提高早期发现率, 能获得手术切除而提高其生存率. K-ras 基因与胰腺癌高度相关, 其第一外显子 12 密码子的点突变在胰腺导管腺癌组织中高达 70-100%, 且是胰腺肿瘤发生的早期事件. K-ras 基因突变可导致基因扩增, mRNA 稳定性增加, 而使蛋白表达增高, 产生持续性刺激信号, 使细胞持续生长, 但 K-ras 突变发生的最早阶段尚不清楚. 而 K-ras 突变亦可见于良性胰腺疾病及正常胰腺, 对他可作为胰腺癌早期诊断的分子标志提出了疑问. 我们探讨 Ras 蛋白过度表达与胰腺癌和慢性胰腺炎临床病理的关系, 以及 K-ras 突变在慢性胰腺炎中的临床意义和在胰腺癌诊断中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 长海医院 1996-01/2001-02 病理证实良恶性胰腺疾病术后石蜡包埋组织标本: 胰腺导管腺癌组织 24 例, 癌旁胰腺导管增生组织 58 例, 癌旁胰腺导管不典型增生组织 19 例和手术切缘正常胰腺组织 16 例; 慢性胰腺炎 24 例, 选择胰腺导管增生组织蜡块, 慢性胰腺炎患者经 1-5 a 随访全部健在且无 1 例发展为胰腺癌. 7 例正常胰腺组织为非胰腺疾病患者尸检标本. 胰腺癌细胞株 Patu-8988 由德国 Marbury 市 Philips 大学分子生物学和分子病理学研究所 Elsasser 博士惠赠. K-ras P21 单抗(鼠抗人)购自 Novocastra Laboratories 公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用 EnVision 显色系统(Dako 公司), 染色步骤按说明书方法进行. 以胞质着棕褐色为阳性细胞. 随机观察 10 个高倍视野, 计数至少 300 个胰腺癌细胞或胰导管细胞, 按阳性细胞数小于 5%(-), 5-10%(+), 10-40%(++), 大于 40%(+++). 阴性对照: 以 PBS 代替一抗; 阳性对照: 已知阳性的人胰腺癌石蜡组织切片.

1.2.2 K-ras 突变检测 每份标本一部分切成 5 μ m 薄片, HE 染色光镜下组织鉴定, 另取 10 μ m 薄片 3-5 片(表面积约 1.0 cm²)放入 1.5 mL 消毒塑料离心管中, 经二甲苯脱蜡乙醇漂洗, 离心后干燥沉淀物. 采用柱离心式小量组织基因组 DNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程公司), 按说明书操作. 经纯度鉴定后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用. 半

巢式聚合酶链反应(PCR) 引物由上海生工生物工程公司合成, 其序列为 R1=5' ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT 3'; R2=5' TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC 3'; R3=5' TAA TAT GTC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC 3'. 配对方式为 R1-R2, R1-R3. 半巢式 PCR 需经两次 PCR 一次酶切. DNA 扩增仪为 Perkin-Elmer 9600 型, PCR 试剂盒购于 Promega 公司的 PCR Core 系统. PCR 反应总体积 50 μ L, 含 4 种 dNTP 浓度各 0.2 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, PCR buffer 1 \times (MgCl₂-Free), 引物浓度 1 μ mol/L, 25 ku/L Taq 酶. 每次 PCR 均设置阴阳性对照各 1 例, 阳性对照所用模板及引物系 Promega 公司配给. R1 和 R2 为引物, PCR 参数为 95 $^{\circ}$ C、5 min 预变性, 加入 Taq 酶, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 循环 25 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min. 扩增片段为 157 bp, 酶切条件为酶切反应体系 50 μ L 中含 BstN1(Biolab 公司) 0.25 μ L、BSA 0.5 μ L、Buffer 25 μ L, 60 $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 煮沸灭活酶. 取酶切产物 2 μ L 用做第 2 次 PCR 模板, R1 和 R3 为引物, PCR 条件同前, 惟循环次数为 30 次. 扩增片段为 135 bp, 取产物 8 μ L 作 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析(图 2). 单链构象多态性分析(SSCP) 为寻找基因变异, 每一被检样本均在 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶下进行电泳, 观察 SSCP 条带情况. 以正常人外周血白细胞 DNA 扩增产物为阴性对照, 胰腺癌细胞株 Patu-8988 DNA 扩增产物为阳性对照, 电泳前将 PCR 产物煮沸 5 min 热变性, 立即置冰浴, 然后经 4 $^{\circ}$ C、35 V 电泳, 电泳 21 h, 至二甲苯青距胶底部约 0.5 cm, 结束电泳, 以银染显示条带, 照相分析. 对每个样本均经 2-3 次电泳以保证实验的准确性(图 3). DNA 测序 所有经 PCR-SSCP 筛选分析、显示条带异常的胰腺癌和慢性胰腺炎患者的 PCR 产物经胶回收式纯化、克隆入 pUCm-T 载体中, 并进行插入片段的序列分析. 测序用 PE 公司测序试剂盒, 再 PE 公司 ABI PRISM 377 DNA 测序仪上进行.

统计学处理 应用 SPSS 统计软件, 采用 χ^2 检验、Fisher 精确检验和 t 检验.

2 结果

2.1 P21^{ras} 的表达 P21^{ras} 阳性物呈棕褐色颗粒状, 定位于胞质, 可见于增生性胰腺导管上皮细胞及导管腺癌细胞. 阳性细胞呈散在、灶性或弥漫分布(图 1) P21^{ras} 在胰腺导管腺癌组织与慢性胰腺炎胰腺导管增生组织中阳性表达率分别为 58.3% 和 45.8%, 二者差异无显著性 ($P > 0.05$); P21^{ras} 在良恶性胰腺疾病增生性病变中的表达阳性率为 36.6%, 与其在正常胰腺组织中的表达阳性率 (0%) 相比, 有显著性差异 (Fisher 精确检验 $P < 0.05$); 胰腺癌周胰腺导管增生组织的 P21^{ras} 表达阳性率 (32.8%) 与慢性胰腺炎导管增生组织的 P21^{ras} 表达阳性率 (45.8%) 相比, 二者差异无显著性 ($P > 0.05$); P21^{ras} 在正常胰腺组织、导管增生性病变、导管不典型增生中的表达阳性

率分别为0%, 36.6%和78.9%, 呈渐进过程.

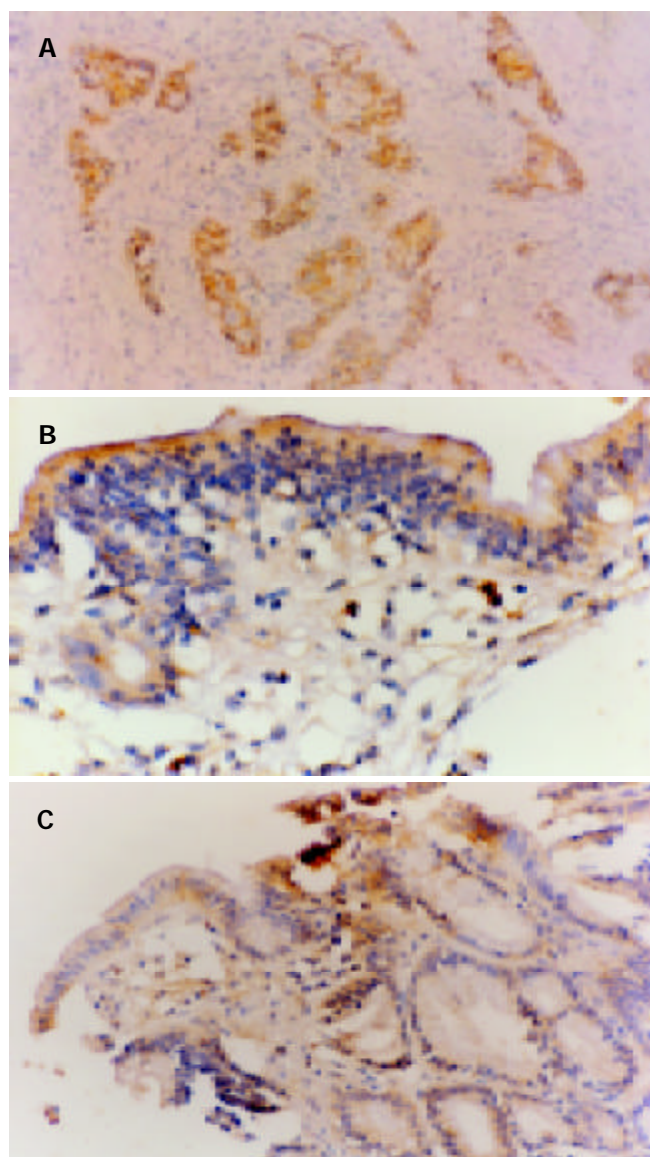


图1 P21^{ras}免疫组化EnVision染色阳性结果. A: 胰腺导管腺瘤样增生(3.3 × 20 × 3.5); B: 胰腺导管鳞状化生(3.3 × 40 × 3.5); C: 胰腺癌(3.3 × 10 × 3.5).

表1 不同胰腺病变K-ras12密码子突变率的比较

病理类型	n	野生型	突变型	突变率(%)
胰腺癌	24	5	19	79.2
癌周导管不典型增生	19	15	4	21.1
癌周导管增生	58	38	20	34.5 ^b
切缘正常组织	16	16	0	0 ^b
慢性胰腺炎	24	16	8	33.3 ^b
正常胰腺组织	7	7	0	0 ^b

^bP < 0.01 vs 胰腺癌组.

2.2 K-ras12 密码子突变 K-ras12 密码子由切缘正常组织→癌周导管增生组织→癌周不典型增生组织→胰腺癌组织的过程中, 突变率有逐渐上升的趋势, 且胰腺癌组突变率明显高于正常胰腺、慢性胰腺炎、切缘正常

组织及癌周导管增生组(P < 0.01). (表1)突变方式以12密码子GGT→GAT、GTT、CGT为主, 未见13密码子突变(表2). 胰腺癌组织K-ras12密码子突变与各临床病理参数无明显相关性.

表2 不同胰腺病变K-ras12密码子突变方式

病理类型	K-ras12 密码子突变方式		
	GAT	GTT	CGT
胰腺癌	8	4	7
癌周导管不典型增生	7	2	3
癌周导管增生	10	3	7
慢性胰腺炎	4	2	2

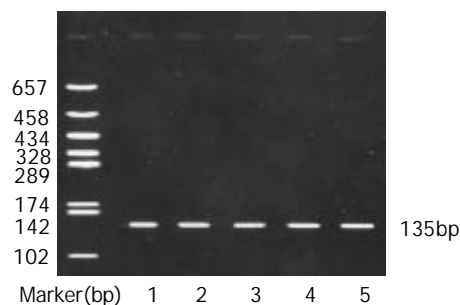


图2 K-ras 基因PCR扩增产物电泳图.

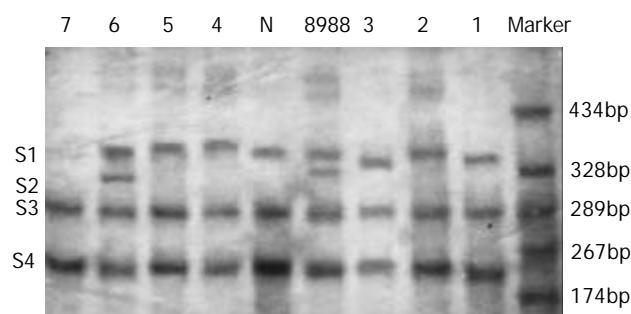


图3 银染PCR-SSCP检测K-ras点突变结果. N: 正常人外周白细胞8 988; 胰腺癌细胞株 Patu-8988(已知突变) 1, 3, 4; K-ras 突变之慢性胰腺炎; 2, 5: 无K-ras 突变之慢性胰腺炎; 6: K-ras 突变之胰腺癌 7: 正常胰腺组织; S1-S4: 单链DNA带(双链已泳出凝胶).

3 讨论

胰腺癌早期诊断困难, 手术病死率高达5-10%. 若能早期确诊并根治性切除, 5a生存率可提高至19-41%^[15-18]. 众多研究表明K-ras基因突变是胰腺肿瘤发生的早期事件, 可用于早期诊断胰腺癌. 文献报道胰腺癌K-ras突变率高达70-100%, 且几乎都集中于第一外显子的12密码子. K-ras12密码子的野生型为GGT, 突变型常见为GAT、GTT、CGT, 此三种类型占所有突变类型的60-100%. Cerny et al^[19]通过亚硝酸诱发叙利亚仓鼠胰腺癌模型发现, 诱变剂作用下, 胰腺导管腺癌发生之前存在小灶性增生、乳头状增生和原位癌的序列性导管损伤, 其中均可检测到K-ras基因异常, 因而认为K-ras突变是胰腺导管腺癌发生的早期事件. 因此, K-ras突变可能预示着潜在的早期胰腺癌, 具有早期

诊断价值. 而Rivera et al^[20]在42例慢性胰腺炎患者中筛选出11例存在导管增生的为实验组, 4例无导管增生的为对照组检测K-ras突变, 应用显微切割法(microdissection)在组织切片上精确地切割胰腺导管上皮, 经抽提DNA、PCR扩增、探针杂交、DNA直接测序, 结果, 实验组18%(2/11)的患者存在K-ras突变, 对照组均为阴性, 因而得出: 慢性胰腺炎有胰腺导管增生且存在K-ras突变是慢性胰腺炎向胰腺癌发展的潜在原因. 慢性胰腺炎患者(1991-1999)774例的回顾性分析表明, K-ras12密码子平均突变率为13%(0-60%)^[21]. 而最近对2015例慢性胰腺炎患者的流行病学研究发现, 慢性胰腺炎患者发生胰腺癌的危险性较正常人群显著为高, 而且胰腺癌的发生与慢性胰腺炎病程呈正相关, 经10 a、20 a的随访, 分别有2%和4%的慢性胰腺炎发展为胰腺癌, 从而提出, 慢性胰腺炎倾向于向胰腺癌发展^[22]. 一个正常细胞转化为恶性表型之前必须经历多种变化, 有研究发现, 胰腺癌周组织发生胰腺导管增生显著高于非恶性对照组, 与癌变模型极相似, 提出可能由胰腺导管增生向胰腺癌发展. Lüttges et al^[23]发现: K-ras突变阳性的胰腺导管腺癌, 其癌旁组织胰腺导管增生亦存在K-ras突变. 因此, 目前认为, 慢性胰腺炎与胰腺导管腺癌的相关性本质上是由于慢性胰腺炎中存在胰腺导管增生, 其被认为是胰腺导管腺癌发生中的一个环节, K-ras突变是此种细胞演进过程中的分子事件. 而基因突变致基因表达水平的改变是细胞癌变的早期事件, 有研究表明P21^{ras}过量表达可能是细胞增生活跃的指标.

本结果显示, 胰腺癌周组织中胰腺导管增生的P21^{ras}阳性表达率(32.8%)与慢性胰腺炎中胰腺导管增生的P21^{ras}表达阳性率(45.8%)相比, 二者差异无显著性, 表明良、恶性胰腺疾病导管增生病变中P21^{ras}过量表达无统计学差异. P21^{ras}在良、恶性胰腺疾病增生性病变中的表达阳性率为36.6%(30/82), 与其在正常胰腺组织中的阳性表达率(0%)相比, 差异显著(Fisher精确检验 $P < 0.05$), 这表明胰腺导管增生性病变与正常胰腺导管的P21^{ras}过度表达有统计学差异. P21^{ras}在正常胰腺组织、导管增生性病变、导管不典型增生中的阳性表达率分别为0%, 36.6%和78.9%, 呈渐进过程, 而且增生性导管病变与不典型增生相比, P21^{ras}表达阳性率的差异具有显著性($P < 0.05$), 且不典型增生是导管腺癌明确的癌前病变, 这就表明P21^{ras}过度表达在胰腺导管细胞向恶性转变过程中起作用. P21^{ras}在不典型增生中的阳性表达率(78.9%)与导管腺癌组织(58.3%)相比, 差异无显著性($P > 0.05$), 但趋势是下降的. P21^{ras}阳性表达与K-ras12密码子突变在胰腺导管增生性损伤及慢性胰腺炎导管损伤性病变中密切相关($P < 0.05$). 因本研究中, 胰腺癌临床分期绝大多数为Ⅱ期以上, 这与以前的研究结果 - “基因表达水平的改变是细胞癌变的早期事件”是一致的, 也就解释了以往研究及本研究中ras基因在胰腺癌中高突变率(79.2%)与本实验中的P21^{ras}在

胰腺癌组织中较低表达阳性率(58.3%)之间的较大差异. P21^{ras}在胰腺癌各种组织学类型和各临床分期中过量表达的差异无显著性, 表明P21^{ras}过量表达并不能作为判断胰腺癌恶性程度和临床进展的参数.

本研究中胰腺癌K-ras基因突变率(79%)显著高于慢性胰腺炎(33.3%), 表明以K-ras基因为分子标志诊断胰腺癌敏感性较高, 但缺乏特异性. 进一步发现, 切缘正常组织→癌周导管增生组织→癌周不典型增生组织→胰腺癌组织的过程中, K-ras突变率有逐渐升高的趋势, 且发现无K-ras突变的胰腺癌, 其癌旁和手术切缘各种组织均无K-ras突变. 对突变者的PCR产物测序发现, 胰腺癌与慢性胰腺炎K-ras12密码子突变方式均表现为GGT→GAT, GTT, CGT, 且同1例患者突变方式一致. 此虽与苍鼠胰腺癌模型中结果相似, 表明K-ras突变与胰腺导管增生性损伤密切相关, 在胰腺癌发生中起到作用, 但尚需长期随访慢性胰腺炎患者以明确K-ras突变是否提示潜在肿瘤的发生、是否可作为胰腺癌的高危因素. 且因胰腺癌的发生发展与其他肿瘤一样, 是一个多种癌基因和/或抑癌基因的作用失衡而产生的细胞演进过程, 也需探讨p16, DPC4, 和BRCA2等其他基因突变和信号通路在胰腺癌发生中的作用, 确定另外的分子靶, 与敏感性较高的K-ras突变联合检测, 方能提高诊断价值^[24-31].

4 参考文献

- Hua Z, Zhang YC, Hu XM, Jia ZG. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2764-2767
- Wang ZQ, Li JS, Lu GM, Zhang XH, Chen ZQ, Meng K. Correlation of CT enhancement, tumor angiogenesis and pathologic grading of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2100-2104
- Zhou JH, Zhang HM, Chen Q, Han DD, Pei F, Zhang LS, Yang DT. Relationship between telomerase activity and its subunit expression and inhibitory effect of antisense hTR on pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1808-1814
- Zheng M, Liu LX, Zhu AL, Qi SY, Jiang HC, Xiao ZY. K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses. *World J Gastroenterol* 2003;9:188-191
- Tan ZJ, Hu XG, Cao GS, Tang Y. Analysis of gene expression profile of pancreatic carcinoma using cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:818-823
- Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 薛刚, 程莹, 孙志勇, 周庆贤, 姚臻祥. CA19-9在胰腺癌诊断与随访中的价值. *世界华人消化杂志* 2004;12:221-222
- 丁新民, 顾瑛, 刘凡光. 胰腺癌的光动力学治疗. *世界华人消化杂志* 2003;11:1621-1623
- 杨竹林, 王伟伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国. 胰腺癌组织ChAT, GAD65和PKC酶活性的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:1554-1557
- 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大. 选择性环氧合酶-2抑制剂Celebrex对胰腺癌PGE2和血管内皮因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:979-981
- 徐永泉, 刘香, 夏玉亭. 胰腺癌组织c-Ki-ras基因点突变分析. *世界华人消化杂志* 2001;9:1329-1330

- 12 刘民培, 马景云, 潘伯荣, 马连生. 中国胰腺癌的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:1103-1109
- 13 谢传高, 王兴鹏. 血管生成与胰腺癌. 世界华人消化杂志 2001;9:338-341
- 14 陈建锋, 俞金龙, 汪爽, 高毅. 胰腺癌组织 P16 蛋白表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:237
- 15 Postier RG. Past, present, and future of pancreatic surgery. *Am J Surg* 2001;182:547-551
- 16 Beger HG, Gansauge F, Leder G. Pancreatic cancer: who benefits from curative resection? *Can J Gastroenterol* 2002;16:117-120
- 17 Shankar A, Russell RC. Recent advances in the surgical treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:622-626
- 18 Lillemoe KD. Current management of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1995;221:133-148
- 19 Cerny WL, Mangold KA, Scarpelli DG. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer Res* 1992;52:4507-4513
- 20 Rivera JA, Rall CJ, Graeme-Cook F, Fernandez-del Castillo C, Shu P, Lakey N, Tepper R, Rattner DW, Warshaw AL, Rustgi AK. Analysis of K-ras oncogene mutations in chronic pancreatitis with ductal hyperplasia. *Surgery* 1997;121:42-49
- 21 Lohr M, Maisonneuve P, Lowenfels AB. K-ras mutations and benign pancreatic disease. *Int J Pancreatol* 2000;27:93-103
- 22 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1993;328:1433-1437
- 23 Lüttges J, Schlehe B, Menke MA, Vogel I, Henne-Bruns D, Kloppel G. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 1999;85:1703-1710
- 24 Kubrusly MS, Cunha JE, Bacchella T, Abdo EE, Jukemura J, Penteado S, Morioka CY, de Souza LJ, Machado MC. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a Brazilian casuistic. *JOP* 2002;3:144-151
- 25 Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Kloppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Lohr M, Scarpa A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 2001;439:798-802
- 26 Klump B, Hsieh CJ, Nehls O, Dette S, Holzmann K, Kiesslich R, Jung M, Sinn U, Ortner M, Porschen R, Gregor M. Frequent deletions of tumor suppressor genes in pure pancreatic juice from patients with tumoral or nontumoral pancreatic diseases. *Pancreatology* 2002;2:17-25
- 27 Fukushima N, Walter KM, Uek T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron JL, Hruban RH, Canto M, Yeo CJ, Goggins M. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice. *Cancer Biol Ther* 2003;2:78-83
- 28 Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:1573-1581
- 29 Ohtsubo K, Watanabe H, Yamaguchi Y, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Abnormalities of tumor suppressor gene p16 in pancreatic carcinoma: immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J Gastroenterol* 2003;38:663-671
- 30 House MG, Guo M, Iacobuzio-Donahue C, Herman JG. Molecular progression of promoter methylation in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas. *Carcinogenesis* 2003;24:193-198
- 31 Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003;63:2649-2657

国际肝胆协会中国分会第一届学术研讨会

国际肝胆胰协会成立近 10 年, 举办过五届学术研讨会, 他们的工作在国际肝胆胰外科领域获得广泛认可和赞扬. 国际肝胆胰协会下属有三个洲际组织, 即美洲, 欧洲和非洲以及亚太地区的肝胆胰协会; 另外, 一些较大的国家还成立了国家分会. 经与国际肝胆胰协会协商, 他们正式同意在中国成立一个分会(包括香港, 澳门和台湾地区), 名称为国际肝胆胰协会中国分会(The Chinese Hepato-Pancreato-Biliary Chapter of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association). 按照国际肝胆胰协会规定, 中国分会每 2 年召开一次学术研讨会, 第一次学术研讨会将于 2004 年 12 月中旬在武汉召开. 会议征稿内容包括: (1)肝胆胰疾病的基础研究; (2)肝胆胰疾病的影像学诊断; (3)肝胆胰良, 恶性肿瘤; (4)肝胆胰炎性疾病; (5)肝胆胰外伤; (6)肝胆胰结石; (7)肝硬化门静脉高压症; (8)内镜技术在肝胆胰疾病中的应用; (9)腔镜技术在肝胆胰疾病中的应用; (10)冷冻, 微波, 射频, X 刀和 g 刀等技术; (11)肝胆胰疾病的营养问题; (12)抗生素在肝胆胰疾病中的应用; (13)肝胆胰恶性肿瘤的免疫治疗; (14)肝胆胰恶性肿瘤介入治疗和化疗问题; (15)肝移植; (16)胰腺移植; (17)肝胆胰手术中的止血技术或止血剂的应用; (18)肝胆胰围手术期护理.

欢迎从事肝胆胰疾病基础研究, 影像诊断以及内, 外科医生积极投稿.

稿件请寄: 陈孝平所长或张志伟副所长收, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所. chenxp-53@163.com

(国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会筹委会 2004-02-16)

胰腺癌组织 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 的表达意义

杨竹林, 邓星辉, 李永国, 钟德珩, 苗雄鹰

杨竹林, 邓星辉, 李永国, 钟德珩, 苗雄鹰, 中南大学湘雅二医院肝胆疾病研究室 湖南长沙市 410011

杨竹林, 男, 1962-08-08 生, 湖南省涟源市人, 汉族, 1998 年湖南医科大学博士, 教授, 主要从事消化系统疾病的病理研究。

项目负责人: 杨竹林, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝胆疾病研究室。

收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-11-06

Expression of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ and its clinopathological significance in pancreatic carcinoma tissues

Zhu-Lin Yang, Xing-Hui Deng, Yong-Guo Li, De-Wu Zhong, Xiong-Ying Miao

Zhu-Lin Yang, Xing-Hui Deng, Yong-Guo Li, De-Wu Zhong, Xiong-Ying Miao, Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Zhu-Lin Yang, Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China.

Received: 2003-09-06 Accepted: 2003-11-06

Abstract

AIM: To study the expression of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ and their clinicopathological significances in the tissues of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma.

METHODS: The expressive levels of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ were assayed by immunohistochemical method of avidin-biotin complex on the formalin-fixed and routinely paraffin-embedded sections of surgical resected specimen with chronic pancreatitis ($n=10$) and pancreatic carcinoma ($n=51$).

RESULTS: The positive rates and the scores of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ were significantly higher in chronic pancreatitis than those of pancreatic carcinoma (MGMT: 100.0% vs 39.2%, 3.8 ± 0.8 vs 1.8 ± 1.4 ; hMLH₁: 100.0% vs 45.1%, 3.8 ± 1.0 vs 1.7 ± 1.6 ; hMSH₂: 90.0% vs 50.9%, 3.5 ± 0.9 vs 1.9 ± 1.7). The positive rates and the scores of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ were significantly higher in well-differentiated adenocarcinomas than those of poorly differentiated adenocarcinomas ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The positive rates and the scores of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ were higher in metastasis-free cases than those of ones with metastasis, but no statistic difference was found ($P > 0.05$). There was also no difference among the expression of three proteins and the other clinicopathological characteristics of pancreatic carcinoma.

CONCLUSION: The expression of MGMT, hMLH₁ or hMSH₂ might be related to the carcinogenesis and progression, and they might have inhibiting effect on the carcinogenesis and progression of pancreatic carcinoma.

Yang ZL, Deng XH, Li YG, Zhong DW, Miao XY. Expression of MGMT, hMLH₁ and hMSH₂ and its clinopathological significance in pancreatic carcinoma tissues. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):669-672

摘要

目的: 研究 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 在慢性胰腺炎和胰腺癌组织中表达特征及其临床病理意义。

方法: 胰腺癌($n=51$)和慢性胰腺炎($n=10$)手术切除标本经 40 g/L 中性甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片, MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 表达均采用常规 ABC 免疫组化法。

结果: 胰腺癌 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 表达阳性率(39.2%, 45.1% 和 50.9%)及其评分(1.8 ± 1.4 , 1.7 ± 1.6 和 1.9 ± 1.7)明显低于慢性胰腺炎阳性率(100.0%, 100.0% 和 90.0%)及其评分(3.8 ± 0.8 , 3.8 ± 1.0 和 3.5 ± 0.9), 均有显著或高度显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 转移病例三者表达阳性率及其评分较明显低于未转移病例, 但均无显著性差异($P < 0.05$); 三者表达与胰腺癌其他临床病理特征无明显关系。

结论: MGMT, hMLH₁ 或 hMSH₂ 表达与胰腺癌发生及进展密切相关, 均具有抑制胰腺癌发生及进展的作用。

杨竹林, 邓星辉, 李永国, 钟德珩, 苗雄鹰. 胰腺癌组织 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 的表达意义. 世界华人消化杂志 2004;12(3):669-672

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/669.asp>

0 引言

烷化剂是环境中普遍存在的致 DNA 损伤的一类物质, O⁶- 甲基鸟嘌呤 -DNA 甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)是机体修复烷基化化合物的关键酶, 对抗烷化剂造成的 DNA 损伤, 在肿瘤发生及化疗中有十分重要意义^[1-11]. 错配修复是细胞复制后一种修复机制, 起着维持 DNA 复制保真度和控制基因突变的作用, 目前至少发现 6 个参与错配修复功能的基因, 其中最主要的有 hMLH₁ 和 hMSH₂, 该系统任一基因突变都会导致细胞错配修复功能缺陷, 表现为复制错误或微卫星不稳定, 因而与肿瘤发生密切相关^[4-8, 12-23]. 我们应用免疫组化方法研究胰腺癌和慢性胰腺炎组织中 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 表达特征及其临床病理意义。

1 材料和方法

1.1 材料 我院及湘雅医院胰腺癌手术切除标本 51 例,

男38例,女13例,年龄21-73(51 ± 17 岁);均为胰腺导管上皮癌,包括高分化腺癌20例,中分化腺癌12例和低分化腺癌19例;临床和(或)病理证实发生胰腺外转移(包括区域淋巴结、网膜、邻近组织器官等)35例(68.6%)。另慢性胰腺炎手术切除标本10例,男7例,女3例,年龄35-55(44 ± 10 岁)。标本经固定后常规制作石蜡包埋切片,切片厚4 μ m。HE染色复述病理组织学特征,其他切片行免疫组化染色。兔抗人MGMT, hMLH₁和hMSH₂多克隆抗体,生物素标记羊抗兔IgG, ABC试剂及DAB-Hcl显色试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.2 方法 MGMT, hMLH₁和hMSH₂表达均为常规ABC免疫组化法,胞质内出现明显棕黄色颗粒者为阳性细胞。参照三者评分标准^[6, 8, 11, 23, 25]将细胞染色强度评分(无, 0分;弱, 1分;中度, 2分;强度, 3分)和阳性细胞率评分(小于5%, 0分; 5-10%, 1分; 10-20%, 2分; 20-50%, 3分; 大于50%, 4分)之和为该病例评分值,将评分值小于或等于2分定为阴性病例,大于2分定为阳性病例。以博士德公司提供的阳性切片作为染色的阳性对照,以0.01 mol/L PBS液(pH7.4)替代-抗作为每次染色的阴性或替代对照。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包进行t检验, χ^2 检验或Fischer精确概率法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

MGMT, hMLH₁和hMSH₂免疫反应阳性物质主要定位

于胞质,部分病例偶见胞核着色(图1-3)。三者在癌组织中分布呈较明显异质性,同一切片不同视野阳性细胞率及着色程度可有较明显不同。胰腺癌51例MGMT, hMLH₁和hMSH₂阳性病例分别为20(39.2%)、23(45.1%)和26(50.9%)例,其评分值分别 1.8 ± 1.4 , 1.7 ± 1.6 和 1.9 ± 1.7 ;慢性胰腺炎10例仅hMSH₂ 1例阴性表达,其评分值分别为 3.8 ± 0.8 、 3.8 ± 1.0 和 3.5 ± 0.9 ,胰腺癌三者表达阳性率及其评分均明显低于慢性胰腺炎($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。高分化腺癌三者表达阳性率及其评分明显高于低分化腺癌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);未转移胰腺癌病例三者表达阳性率及其评分较明显高于转移病例,但均无统计学差异($P > 0.05$, 表1)。胰腺癌其他临床病理特征与三者表达均无明显关系($P > 0.05$)。

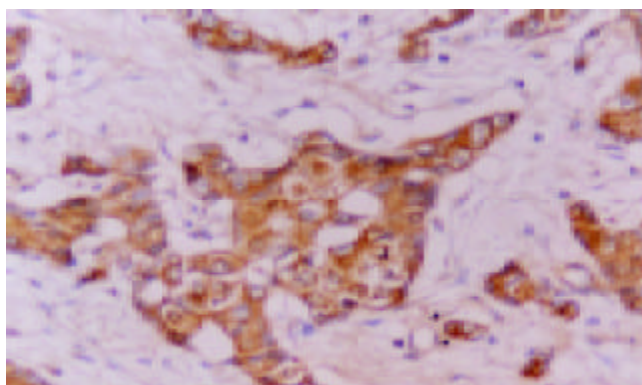


图1 胰中分化腺癌, MGMT阳性, 评分6分, ABC $\times 200$ 。

表1 胰腺癌分化程度和是否转移与MGMT、hMLH₁和hMSH₂表达的关系

病理特征	n	MGMT		hMLH ₁		hMSH ₂	
		阳性(%)	评分	阳性(%)	评分	阳性(%)	评分
高分化	20	65.0	2.4 ± 1.5	80.0	2.6 ± 1.2	75.0	2.6 ± 1.4
中分化	12	25.0 ^b	1.6 ± 1.2^a	25.0 ^a	1.3 ± 1.7^a	58.3 ^a	2.4 ± 1.8
低分化	19	21.0 ^b	1.2 ± 1.3^b	21.0 ^b	0.9 ± 1.4^a	21.0 ^b	1.0 ± 1.4^a
无转移	16	50.0	2.3 ± 1.1	62.5	2.2 ± 1.6	62.5	2.3 ± 1.8
有转移	35	34.3	1.5 ± 1.5	37.1	1.4 ± 1.5	45.7	1.8 ± 1.6

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 高分化或无转移。

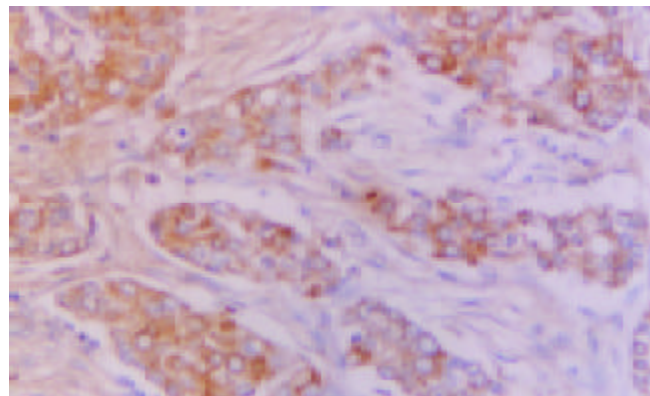


图2 胰低分化腺癌, hMLH₁阳性, 评分5分, ABC $\times 200$ 。

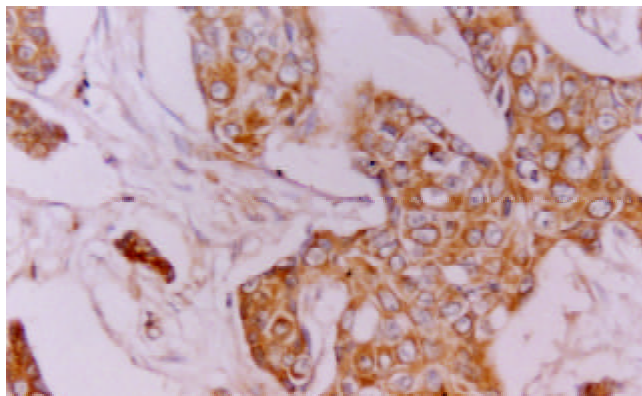


图3 胰中分化腺癌, hMSH₂阳性, 评分6分, ABC $\times 200$ 。

3 讨论

人 MGMT 基因定位于 10q²⁶, 编码由 207 个氨基酸组成的蛋白质, 活性位点在 145 位半胱氨酸残基. 生理条件下 MGMT 是一种含磷蛋白, 磷酸化可抑制其活性, 蛋白激酶 C、酪氨酸激酶 II 等可使其磷酸化, 影响其功能, 但该酶磷酸化后可抵抗蛋白酶对他的消化而得以保存活性, 碱性磷酸酶可使其去磷酸化而恢复活性^[5-11, 25]. MGMT 在正常及大多数肿瘤组织中均有表达(称为 Mer⁺ 表型), 约 5% 肿瘤组织和 20% 肿瘤细胞株检测不到 MGMT 活性(称为 Mer⁻ 表型)^[1-2]. MGMT 表达与许多肿瘤的发生及肿瘤耐药性密切相关, 如食管癌、乳腺癌、胃癌、肝癌等^[4-11]. MGMT 表达具有组织及细胞类型特异性, Mer⁻ 细胞内 MGMT 基因本身极少发生突变、缺失、重排等改变, 其 mRNA 水平和蛋白水平是一致的. 但关于其在转录水平的精确调控机制尚不清楚, 可能与启动子区域 CpG 岛甲基化有关^[1-3]. MGMT 基因调节失活增加了靶细胞对烷化剂损伤的易感性, 在早期肿瘤发生中起重要作用^[1, 3, 11]. 烷化剂与胸腺嘧啶错配, 发生 G:C → A:T 突变, 可导致癌基因激活和抑癌基因失活, 进一步发展为肿瘤^[4-11]. 我们发现胰腺癌 MGMT 表达阳性率及其评分明显地低于慢性胰腺炎, 高分化腺癌 MGMT 表达阳性率及其评分也明显地高于低分化腺癌, 与国外文献^[4-11]报道较一致. 说明 MGMT 在抑制胰腺癌发生和进展方面可能起重要作用, 其机制除与 MGMT 本身生物学作用有关外仍需进一步研究.

hMLH₁ 基因位于染色体 3p²¹, 与酿酒酵母 MLH₁ 高度同源. 已证实约 30% HNPCC(遗传性非息肉性大肠癌)病因与 hMLH₁ 突变有关^[13]. 研究发现 HCT₁₁₆ 细胞(结肠肿瘤细胞)中有 hMLH₁ 缺陷, 表现为错配修复功能缺陷和微卫星序列不稳定, 且对 MNNG 耐受. 微细胞融合技术将 3 号染色体上野生型 hMLH₁ 基因导入 HCT₁₁₆ 细胞中, 该细胞株恢复了错配. hMLH₁ 高度甲基化是引转微卫星不稳定的重要原因, 在散发性大肠癌、子宫内膜癌和胃癌等肿瘤中均有发现^[5, 7, 13-24]. hMSH₂ 是第一个被分离的人类错配修复基因, 位于染色体 2p²²⁻²² 或 2p¹⁶ 上. 研究发现约 60% HNPCC 与 hMSH₂ 突变有关, 突变无明显热点, 但相当多突变为缺失性突变和移码突变形成新的终止密码, 产生截短蛋白^[13]. 在其他家族性结肠癌综合征中也发现有 hMSH₂ 突变(如 Muir-Totte 综合征), 在散发性结肠癌、子宫内膜癌、胃癌、肝癌、胆管癌、膀胱癌、黑色素瘤等恶性肿瘤中发现错配修复蛋白功能的缺陷, 证实有 hMSH₂ 突变^[5, 7, 13-24]. 现已证实 hMSH₂ 以复合蛋白质的形式与错配因子进行结合, 这种错配结合因子是由两种不同蛋白质组成的二聚体, 能特异性地识别并结合错配的 DNA 序列^[5, 7]. 故 DNA 错配修复系统缺陷在许多肿瘤的发生及进展过程中起重要作用, 对大肠癌发生发展的影响作用研究尤为深入^[5, 7]. 我们发现胰腺癌 hMLH₁, hMSH₂ 表达阳性率及其评分明显低于慢性胰腺炎, 高分化腺癌二者表达阳性率及

其评分也明显高于低分化腺癌. 说明 hMLH₁ 和 hMSH₂ 表达水平与胰腺癌发生和分化程度有关, 二者表达可抑制胰腺癌发生和进展. 目前, 胰腺癌发病在增加^[26-27], 早期诊断困难^[28-33], 临床治疗仍不满意^[34-38], 受到关注.

我们发现未转移癌 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 表达阳性率及其评分较明显高于转移癌, 但均无显著性差异, 可能与病例数少有关, 如要确证三者表达与抑制胰腺癌转移发生有关仍需积累研究病例和进行更深入研究. 研究发现 MGMT, hMLH₁ 和 hMSH₂ 表达与一些恶性肿瘤预后有关, 绝大多数文献显示 MGMT₁ 和 hMSH₂ 低表达的恶性肿瘤预后明显差于高表达者, 而 hMLH₁ 低表达者预后较高表达者好^[5, 7, 9, 12, 19, 22-23].

4 参考文献

- 1 Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alteration in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003; 532:39-49
- 2 Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 2002;196:1-7
- 3 Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Letter* 2003;190:125-133
- 4 Oue N, Sentani K, Yokozaki H, Kitadai Y, Ito R, Yasui W. Promoter methylation status of DNA repair genes hMLH₁ and MGMT in gastric carcinoma and metaplastic mucosa. *Pathobiology* 2001;69:143-149
- 5 Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, Tanaka M, Sekiguchi M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH₁, and hMSH₂ during tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003;6:86-95
- 6 Matsukura S, Miyazaki K, Yakushiji H, Ogawa A, Chen Y, Sekiguchi M. Combined loss of expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and hMLH₁ accelerates progression of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2003;82:194-200
- 7 Kohya N, Miyazaki K, Matsukura S, Yakushiji H, Kitajima Y, Kitahara K, Fukuhara M, Nakabeppu Y, Sekiguchi M. Deficient expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase combined with mismatch-repair proteins hMLH₁ and hMSH₂ is related to poor prognosis in human biliary tract carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:371-379
- 8 Ma S, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Immunohistochemical analysis of DNA mismatch repair protein and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma metastases in relation to clinical response to DTIC-based chemotherapy. *Oncol Rep* 2002;9:1015-1019
- 9 Matsukura S, Miyazaki K, Yakushiji H, Ogawa A, Harimaya K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M. Expression and prognostic significance of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in hepatocellular, gastric, and breast cancers. *Ann Surg Oncol* 2001;8:807-816
- 10 Kim SH, Bae SI, Lee HS, Kim WH. Alteration of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in colorectal neoplasms in sporadic and familial adenomatous polyposis patients. *Mol Carcinog* 2003;337:32-38
- 11 Cayre A, Penault-Llorca F, De Latour M, Rolhion C, Feillel V, Ferriere JP, Kwiatkowski F, Finat-Duclos F, Verrelle P. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression and prognosis in breast carcinoma. *Int J Oncol* 2002;21:1125-1131
- 12 Taubert HW, Bartel F, Kappler M, Schuster K, Meyer A. Reduced expression of hMSH₂ protein is correlated to poor survival for soft tissue sarcoma patients. *Cancer* 2003;97:2273-2278
- 13 Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Lorettelli C, Piga A, Bearzi I, Cellierino R, Porfiri E. Mutation of hMLH₁ and hMSH₂ in patient with suspected instability and abnor-

- malities of mismatch repair protein expression. *J Clin Oncol* 2002;20:1203-1208
- 14 Wang L, Bani-Hani A, Montoya DP, Roche PC, Thibodeau SN, Burgart LJ, Roberts LR. hMLH₁ and hMSH₂ expression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001;19:567-570
 - 15 Nunn J, Nagini S, Risk JM, Prime W, Maloney P, LiLoglou T, Jones AS, Rogers SR, Gosney JR, Woolgar J, Field JK. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH₂, hMLH₁, hPMS₁, hPMS₂ and hMSH₃, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2003;39:115-129
 - 16 Peiro G, Diebold J, Lohse P, Ruebsamen H, Baretton GB, Lohrs V. Microsatellite instability, loss of heterozygosity, and loss of hMLH₁ and hMSH₂ protein expression in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2002;33:347-354
 - 17 Scartozzi M, De Nictolis M, Galizia E, Carassai P, Bianchi F, Berardi R, Gesuita R, Piga A, Cellerino R, Porfiri E. Loss of hMLH₁ expression correlates with improved survival in stage III-IV ovarian cancer patients. *Eur J Cancer* 2003;38:1144-1149
 - 18 Kassem HS, Varley J M, Haman SM, Margison GP. Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH₁ and hMSH₂) in bladder cancer. *Br J Cancer* 2001;84:321-328
 - 19 Jasson A, Arbmman G, Zhang H, Sun XF. Combined deficiency of hMLH₁, hMSH₂, hMSH₃, hMSH₆ is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2003;22:41-49
 - 20 Yeh CC, Lee C, Dahiya R. DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:409-413
 - 21 Idikio HA. Expression of DNA mismatch repair proteins and the hMSH₂ and hMLH₁ and the cyclin G1 inhibitor p21(wasf1/cip) in pediatric tumors: correlation with response to therapy. *Oncol Rep* 2001;8:965-971
 - 22 Wani Y, Notohara K, Tsukayama C, Okada S. Reduced expression of hMLH₁ and hMSH₂ gene products in high-grade hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama* 2001;55:65-71
 - 23 Catto JW, Xinarianos G, Burton JL, Meuth M, Hamdy FC. Differential expression of hMLH₁ and hMSH₂ is related to bladder grade, stage and prognosis but not microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003;105:484-490
 - 24 Strom SS, Spitz MR, Yamaura Y, Babaian RJ, Scardino PT, Wwei Q. Reduced expression of hMSH₂ or hMLH₁ and risk of prostate cancer: a case-control study. *Prostate* 2001;47:269-275
 - 25 Dincer Y, Akcay T, Tortum B, Alademin Z, Onen S, Dogusoy G. Evaluation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in patients with gastric cancer. *Oncol Res* 2003;13:205-209
 - 26 Hua Z, Zhang YC, Hu XM, Jia ZG. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2764-2767
 - 27 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Wang DY. Bile from a patient with anomalous pancreaticobiliary ductal union promotes the proliferation of human cholangiocarcinoma cells via COX-2 pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1094-1097
 - 28 Dong WG, Sun XM, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2596-2600
 - 29 Sun XM, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Detection of type IV collagenase activity in malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2592-2595
 - 30 He YC, Peng W, Qiao JG, Cao J, Chen JW. Relationship between nuclear morphometry, DNA content and resectability of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1863-1865
 - 31 Tan ZJ, Hu XG, Cao GS, Tang Y. Analysis of gene expression profile of pancreatic carcinoma using cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:818-823
 - 32 Zheng M, Liu LX, Zhu AL, Qi SY, Jiang HC, Xiao ZY. K-ras gene mutation in the diagnosis of ultrasound guided fine-needle biopsy of pancreatic masses. *World J Gastroenterol* 2003;9:188-191
 - 33 Yao GY, Zhou JL, Lai MD, Chen XQ, Chen PH. Neuroendocrine markers in adenocarcinomas: an investigation of 356 cases. *World J Gastroenterol* 2003;9:858-861
 - 34 Bai YR, Wu GH, Guo WJ, Wu XD, Yao Y, Chen Y, Zhou RH, Lu DQ. Intensity modulated radiation therapy and chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer: results of feasibility study. *World J Gastroenterol* 2003;9:2561-2564
 - 35 Zhou JH, Zhang HM, Chen Q, Han DD, Pei F, Zhang LS, Yang DT. Relationship between telomerase activity and its subunit expression and inhibitory effect of antisense hTR on pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1808-1814
 - 36 He P, Shi JS, Chen WK, Wang ZR, Ren H, Li H. Multivariate statistical analysis of clinicopathologic factors influencing survival of patients with bile duct carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:943-946
 - 37 Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
 - 38 Liu B, Staren E, Iwamura T, Appert H, Howard J. Taxotere resistance in SUIT Taxotere resistance in pancreatic carcinoma cellline SUIT 2 and its sublines. *World J Gastroenterol* 2001;7:855-859

高脂高糖食致小鼠脂肪肝 SR - B1 表达

李莉, 张锦, 刘聪, 周一军, 彭阳, 孟馨

李莉, 张锦, 刘聪, 周一军, 彭阳, 孟馨, 中国医科大学附属第一医院内分泌科 辽宁省沈阳市 110001

李莉, 女, 1971-03-06 生, 四川省重庆市人, 汉族. 1995 年中国医科大学硕士毕业, 内分泌科讲师, 主治医师, 博士生, 研究方向为代谢性疾病.

项目负责人: 李莉, 110003, 辽宁省沈阳市三好街 36 号, 中国医科大学附属第一医院内分泌科. lilysy90@hotmail.com

电话: 024-83956986

收稿日期: 2003-11-11 接受日期: 2003-12-06

High fat and sugar diet induces fatty liver and expression of scavenger receptorB1 in C57BL/6J mice

Li Li, Jin Zhang, Cong Liu, Yi-Jun Zhou, Yang Peng, Xin Meng

Li Li, Jin Zhang, Cong Liu, Yi-Jun Zhou, Yang Peng, Xin Meng, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Li Li, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lilysy90@hotmail.com
Received: 2003-11-11 Accepted: 2003-12-06

Abstract

AIM: To investigate the liver pathology and the expression of scavenger receptor B1(SR-B1) in C57BL/6J mice with high fat and sugar diet, and the relationship between them.

METHODS: Ten normal diet, female C57BL/6J mice, fifteen high fat and sugar diet female C57BL/6J mice, five fed 8 weeks and ten fed 16 weeks, were measured serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), fasting blood glucose (FBG) insulin (INS) and liver weight, content of lipid and the expression of SR-B1 in serum and livers.

RESULTS: In the 16-week-old mouse with high fat and sugar diet, serum TC, and FBG were significantly higher than those of normal diet mouse (2.31 ± 0.16 mmol/L, 6.9 ± 1.8 mmol/L, and 2.04 ± 0.15 , 5.1 ± 1.9 mmol/L, $P < 0.05$. INS was also higher, but it was not statistically significant (12.5 ± 4.2 kU/L, 10.8 ± 4.0 kU/L, $P > 0.05$); serum HDL-C was lower than normal (fed high fat and sugar diet for 16 wk, 0.92 ± 0.14 mmol/L; fed for 8 wk, 0.67 ± 0.23 mmol/L; normal mice, 0.97 ± 0.08 mmol/L). High fat and sugar diet mouse had fatty liver, and the mouse was fed for 16 weeks was more severe than that fed for 8 weeks. The content of TG and TC in the liver of high fat and sugar mouse was higher than that of normal diet mouse, and the mouse fed for 16 weeks was more than 2 times of that in normal mouse. The expression of SR-B1 protein in the liver of high fat and sugar diet mouse was the higher than that of normal mouse, and the mouse fed for 16 weeks was higher than that fed for 8 weeks.

CONCLUSION: High fat and sugar diet leads to fatty liver

in the mice. The expression of SR-B1 in the liver is higher than that of normal control significantly, which may be related to the development of fatty liver.

Li L, Zhang J, Liu C, Zhou YJ, Peng Y, Meng X. High fat and sugar diet induces fatty liver and expression of scavenger receptorB1 in C57BL/6J mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):673-675

摘要

目的: 探讨进高脂高糖食糖尿病小鼠肝脏改变、肝脏 SR-B1 表达及二者的关系.

方法: 正常 C57BL/6J 小鼠 10 只, 进高脂高糖食 8 及 16 wk C57BL/6J 小鼠, 分别 5 只及 10 只. 测定血脂、血清胰岛素(INS)及空腹血糖, 肝脏质量、肝脏脂质含量及 SR-B1 蛋白表达.

结果: 高脂高糖食 16 wk 的小鼠血清总胆固醇(TC)、空腹血糖(FBG)明显高于正常小鼠(分别为 2.31 ± 0.16 mmol/L, 6.9 ± 1.8 mmol/L; 及 2.04 ± 0.15 , 5.1 ± 1.9 mmol/L, $P < 0.05$, 胰岛素高于正常小鼠, 但是无显著性(分别为 12.5 ± 4.2 kU/L, 10.8 ± 4.0 kU/L, $P > 0.05$). 高脂高糖食的小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)低于正常(高脂高糖食喂养 16 wk 小鼠为 0.92 ± 0.14 mmol/L, 喂养 8 wk 为 0.67 ± 0.23 mmol/L, 正常小鼠为 0.97 ± 0.08 mmol/L). 高脂高糖食小鼠肝脏有明显脂肪变性, 16 wk 重于 8 wk 的小鼠. 进高脂高糖食小鼠肝脏的 TC 和 TG 含量显著高于正常动物, 16 wk 的小鼠达到正常小鼠的 2 倍以上. 高脂高糖食小鼠肝脏 SR-B1 表达高于正常动物, 16 wk 强于 8 wk 的小鼠.

结论: 高脂高糖食可使 C57BL/6J 小鼠出现脂肪肝, SR-B1 蛋白表达增高, SR-B1 可能参与脂肪肝形成.

李莉, 张锦, 刘聪, 周一军, 彭阳, 孟馨. 高脂高糖食致小鼠脂肪肝 SR-B1 表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):673-675

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/673.asp>

0 引言

脂肪肝是常见的肝脏疾病^[1-6], 单纯的脂肪肝可转化为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝功能衰竭^[7-14], 因而越来越受到重视. 高热量摄入是肥胖和脂肪肝的常见原因. 清道夫受体 B1(SR-B1)是近年发现的高密度脂蛋白(HDL)受体, 在肝脏表达丰富, 参与脂质代谢. 我们观察进高脂高糖食小鼠肝脏变化及 SR-B1 表达, 探讨肝脏 SR-B1 表达与进高脂高糖食糖尿病小鼠肝脏改变的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 ♀ C57BL/6J 小鼠 6-8 周龄, SPF 级, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司. 正常对照组 10 只, 喂以正常鼠食含 40 g/kg 脂肪, 240 g/kg 蛋白, 45 g/kg 粗纤维) 16 wk; 进高糖高脂食组 15 只, 喂以高糖高脂食含 355 g/kg 脂肪(占总热量的 58%, 主要是猪油), 366 g/kg 碳水化合物(主要是蔗糖), 其中 5 只喂以正常食 8 wk, 之后喂以高糖高脂食 8 wk, 为 A 亚组; 10 只喂以高脂高糖食 16 wk, 为 B 亚组.

1.2 方法 禁食 12 h 后, 腹腔注射 100 ml/L 水合氯醛 4 ml/kg 麻醉之后眶窦取血, 分离血清, 采用日本日立 7600-020 全自动生化分析仪, 选择性遮蔽法测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C); 酶法测定空腹血糖(FBG); 放免法测定血清胰岛素(INS)(试剂购于北京原子能研究所). 将动物肝脏洗尽血迹, 测定肝质量. 取少量剪成小块, 置 110 °C 烘至恒质量, 精确称取干燥后的肝脏. 磨成细粉, 加氯仿: 甲醇(2:1, V/V), 抽提定容, 再按上述测定血清脂质的方法测脂质含量. 取肝脏一部分 40 g/L 甲醛固定后, 做石蜡切片, HE 染色. 取 -70 °C 保存的各组动物肝组织 100 mg, 提取细胞膜蛋白, LOWRY 法蛋白定量, 经 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印于 NC 膜, 先后加入一抗及二抗 Western blotting 方法, 一抗采用兔抗小鼠的 SR-B1 多克隆抗体(购自美国 Novus 生物工程公司)二抗采用小鼠抗兔抗体(购自北京中山生物工程公司), 显色至条带呈现, 采用 GIS-700D 数码凝胶图像处理系统扫描测定肝脏 SR-B1 的表达.

统计学处理 所有数据以 mean±SD 表示, 采用 t 检验.

2 结果

2.1 血清 TC、HDL、TG、INS 及 FBG 水平 高脂高糖食小鼠血清 TC 高于正常小鼠, B 亚组高于 A 亚组, B 亚组与正常小鼠间有显著差异($P < 0.01$); 血清 HDL-C 及 TG 低于正常小鼠, A 亚组与正常动物间有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表 1; 血清 FBG 及 INS 高于正常小鼠, B 亚组高于 A 亚组, B 亚组的 FBG 与正常小鼠间有显著差异($P < 0.05$).

表 1 高脂高糖食小鼠血清 TC, HDL, TG, INS 及 FBG 水平(mean±SD)

	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	FBG (mmol/L)	INS (kU/L)
正常食组	2.04 ± 0.15	0.97 ± 0.08	0.57 ± 0.07	5.1 ± 1.9	10.8 ± 4.0
高脂高糖食 A 组	2.23 ± 0.52	0.67 ± 0.23 ^a	0.45 ± 0.06 ^b	5.4 ± 1.7	11.8 ± 2.7
B 组	2.31 ± 0.16 ^b	0.92 ± 0.14	0.50 ± 0.16	6.9 ± 1.8 ^a	12.5 ± 4.2

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 正常组.

2.2 肝脏病理改变 高脂高糖食小鼠肝脏有明显脂肪变性, B 组重于 A 组. A 动物肝细胞排列紊乱, 肝细胞体积增大, 核大, 内可见空泡, 胞质内见大小及数量不等

的脂肪空泡; B 组动物肝细胞排列紊乱, 肝细胞增大, 核大小不等, 胞质内有大的脂肪空泡(图 1).

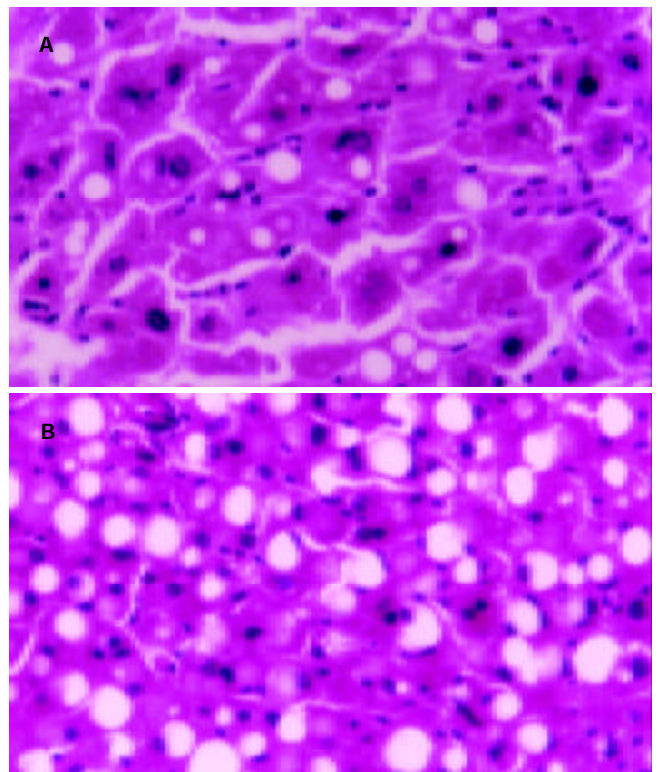


图 1 高脂高糖食小鼠肝脏弥漫性脂肪变性 HE × 200. A: 8 wk 中度; B: 16 wk 重度.

2.3 肝脏脂质含量 高脂高糖食小鼠肝脏的 TC 和 TG 含量显著高于正常动物, B 组高于 A 组. (表 2)

表 2 高脂高糖食小鼠肝脏干质量中脂质含量(mean±SD)

	n	肝质量(g)	TC(mmol/g)	TG (mmol/g)
正常食组	10	0.96 ± 0.04	0.028 ± 0.011	0.063 ± 0.023
高脂高糖食 A 组	5	0.95 ± 0.07	0.037 ± 0.008	0.148 ± 0.072 ^a
B 组	10	1.02 ± 0.11	0.058 ± 0.025 ^b	0.157 ± 0.017 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 正常组.

2.4 肝脏 SB-B1 表达 进高脂高糖食小鼠肝脏 SB-B1 表达密度($\times 10^5$)高于正常动物(vs 3.36 ± 0.28 , $P < 0.05$), 并且 B 组高于 A 组(4.36 ± 0.32 vs 3.97 ± 0.31 , $P < 0.05$)(图 2).

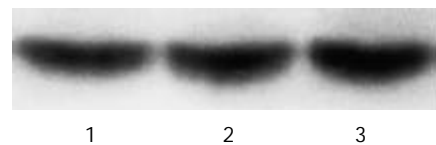


图 2 进高脂高糖食小鼠肝脏 SR-B1 蛋白表达. 1, 2, 3: 正常食, 高脂高糖食 8 及 16 wk.

3 讨论

C57BL/6J 小鼠进高脂高糖食后将出现肥胖、血清胰岛

素水平升高及血糖高^[15]。高脂饮食和肥胖又是脂肪肝的诱发因素^[16-19]。高脂及高糖饮食可使肝脏合成 TG 增多, 分解减慢, 导致高 TG 血症^[20-21]。高胰岛素血症时, 丙二酰辅酶 A 生成增多, 导致肉碱酰转移酶变构, 从而抑制了肉碱酰转移酶的活性, 使 β 氧化作用下降, 肝细胞内游离脂肪酸酯转化为 TG; 血糖轻度升高时, NADPH 供应充分, 乙酰辅酶 A 转变成胆固醇增多; 脂质沉积于肝细胞内导致脂肪肝, 因此 2 型糖尿病是非酒精性脂肪肝的常见病因。本研究中进高脂高糖食小鼠血清 TC 显著高于正常小鼠, TG 低于正常小鼠, 与国外学者研究结果一致^[15]。与国外学者结果比较, 血脂的变化不大可能由于两组小鼠后期进食量较少, 并且本实验中血清脂质水平均为空腹水平。进高脂高糖食的小鼠肝脏重量高于正常小鼠, 进食 16 wk 的小鼠肝脏中 TC 和 TG 的含量显著高于正常鼠, 均大于正常小鼠的 2 倍; 病理检查亦显示实验组肝脏出现明显的脂肪肝表现。并且随进高脂高糖食时间的延长血糖和 INS 有升高的趋势, 肝脏的脂质含量随之增加, 病理改变也逐渐加重, 说明糖代谢的改变与脂肪肝的改变是同时出现的。实验中肝脏的脂质含量的改变比血清中 TC 和 TG 变化大, 是因为肝脏的脂质含量主要决定于肝脏的摄取和利用脂质的能力及肝脏本身合成脂质速度, 而循环中脂质水平只是为肝脏摄取提供原料。另外由于条件所限, 仅测定了空腹血脂, 而未测定餐后血脂, 需进一步研究餐后血脂与肝脏脂质含量的关系。目前关于肝脏 TG 含量增高的研究较多, 增高的机制已较清楚, 肝脏中胆固醇含量增高还未受到重视, 胆固醇性脂肪肝的形成机制还不清楚。

HDL 是富含胆固醇的一种脂蛋白, 具有抗动脉粥样硬化作用。SR-B1 是首先被确认的 HDL 的受体, 广泛表达于肝脏、产类固醇组织、小肠刷状缘、动脉粥样硬化病变部位, 主要通过参与胆固醇的逆向转运及 HDL 代谢, 影响动脉粥样硬化的形成。研究已发现肝脏过度表达 SR-B1, 但动脉粥样硬化显著减少; SR-B1 活性消失后动脉粥样硬化加重。说明肝脏表达 SR-B1 影响从动脉壁到肝脏的胆固醇逆向转运的总速度。Sehayek et al 发现肝脏 SR-B1 的表达不仅参与摄取胆固醇, 还与向胆汁中分泌胆固醇有关。由于其具有摄取和排泄胆固醇的作用, 亦有可能参与胆固醇性脂肪肝的形成。研究显示进高脂高糖食 8 wk 和 16 wk 的小鼠肝脏 SR-B1 约为正常小鼠的 1.2 及 1.3 倍, 支持上述假设。Tu et al 向肝细胞培养液中加入不同浓度的葡萄糖, 发现肝细胞 SR-B1 表达增高, 提示进高脂高糖食小鼠肝脏 SR-B1 表达增加可能由血糖升高所致, 也可能与糖尿病患者脂肪肝的危险性高有关。另外 SR-B1 属于清道夫受体, 不仅可与 HDL 结合, 还可结合氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 及糖基化终末产物。研究已发现糖基化终末产物可使单核巨噬细胞 SR-B1 表达升高, OX-LDL 可使单核巨噬细胞 SR-B1 表达降低。对肝细胞的影响还未见报道, 是否与血清中 INS、TC、OX-LDL 及糖基化终

末产物水平有关? 是否上述因素通过 SR-B1 影响脂肪肝的形成? 还需进一步研究。

总之, 高脂高糖食可使 C57BL/6J 小鼠出现脂肪肝、肝脏中 TG 和 TC 的含量显著高于正常, SR-B1 蛋白表达增高, SR-B1 可能参与脂肪肝形成。需进一步运用基因敲除和基因转入等技术证实。

4 参考文献:

- 1 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:6-10
- 2 张一珏. 脂肪肝的临床及流行病学特征. 华人消化杂志 1998;6 (特刊 7): 442-443
- 3 Shen L, Fan JG, Shao Y, Zeng MD, Wang JR, Luo GH, Li JQ, Chen SY. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. *World J Gastroenterol* 2003;9:1106-1110
- 4 Wang JT, Liu YL. Non-alcoholic fatty liver disease: the problems we are facing. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2003;2:334-337
- 5 Harrison SA, Di Bisceglie AM. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003;63:2379-2394
- 6 Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol* 2003;38:954-961
- 7 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. 世界华人消化杂志 2002;10:392-396
- 8 Deng YQ, Fan XF. Liver fibrosis indexes in nonalcoholic fatty liver disease. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixueban* 2003;32:241-243
- 9 Hui JM, Kench JG, Chitturi S, Sud A, Farrell GC, Byth K, Hall P, Khan M, George J. Long-term outcomes of cirrhosis in non-alcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:420-427
- 10 Jorgensen RA. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Nurs* 2003;26:150-154
- 11 Kuwabara H, Yoshii Y, Mori H, Fujiwara S, Eiraku S, Kojima H, Miyaji K, Hongo Y, Katsu K. Nonalcoholic steatohepatitis-related cirrhosis with subacute liver failure: an autopsy case. *Dig Dis Sci* 2003;48:1668-1670
- 12 Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2042-2047
- 13 Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004;444:3-12
- 14 Jepsen P, Vilstrup H, Møllemlæ L, Thulstrup AM, Olsen JH, Baron JA, Sørensen HT. Prognosis of patients with a diagnosis of fatty liver—a registry-based cohort study. *Hepatogastroenterology* 2003;50:2101-2104
- 15 Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;136:17-24
- 16 Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling C, Newbury R, Lavine JE. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003;143:500-505
- 17 Tagle Arrospeide M. Non-alcoholic fatty liver. *Rev Gastroenterol Peru* 2003;23:49-57
- 18 Larrey D. From hepatic steatosis due to obesity to cirrhosis, in the absence of alcoholic intoxication. *Presse Med* 2003;32:512-518
- 19 Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003;23:363-370
- 20 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 21 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1037

实验性大鼠肝纤维化 TGF β 1 及其受体 mRNA 与 Smad3, 7 的表达

宋仕玲, 龚作炯, 张全荣

宋仕玲, 龚作炯, 张全荣, 武汉大学人民医院感染科 湖北省武汉市 430060
龚作炯, 男, 1962-12-01 生, 湖北云梦人, 汉族, 1987 年武汉大学医学院硕士研究生, 1996 年比利时鲁汶大学医学院博士研究生毕业, 1996-1998 年比利时鲁汶大学医学院博士后, 现任武汉大学人民医院感染科主任, 教授, 博士生导师。主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究。
项目负责人: 龚作炯, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院感染科。
zjgong@163.com
电话: 027-88041911-8385 传真: 027-88042922
收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-11-19

Expression of TGF β 1 and its receptors, Smad3 and Smad7 in rats with experimental liver fibrosis

Shi-Ling Song, Zuo-Jiong Gong, Quan-Rong Zhang

Shi-Ling Song, Zuo-Jiong Gong, Quan-Rong Zhang, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Zuo-Jiong Gong, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, WuHan University, WuHan 430060, Hubei Province, China. zjgong@163.com
Received: 2003-09-06 Accepted: 2003-11-19

Abstract

AIM: To investigate the expression of TGF β 1, TGFR I, TGFR II, Smad3, Smad7 in fibrotic liver induced by the exposure of carbon tetrachloride (CCl₄) in rats.

METHODS: A total of 24 Wistar rats were randomly allocated into two study groups: normal group and model group-CCl₄ rats. The latter group was administered with CCl₄ solution to induce liver fibrosis. All the rats were killed after 8 weeks. The level of TGF β 1, TGFR I and TGFR II mRNA were examined by RT-PCR. The expression of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 were detected by immunohistochemical staining in liver tissue. The serum hyalauronic acid (HA) and the liver histopathology were also examined by RIA and HE staining respectively.

RESULTS: In comparison with the normal group, TGF β 1, TGFR I and TGFR II mRNA were significantly increased in model rats, the expression of TGF- β 1 and Smad3 was increased and the expression of Smad7 was decreased in livers of the model group (TGF- β 1, Smad3 and Smad7 in normal and model group were 0.61 ± 0.33 vs 1.57 ± 0.53 , 0.248 ± 0.042 vs 0.785 ± 0.904 , 4.674 ± 1.143 vs 0.470 ± 0.097 respectively, $P < 0.05$). The content of serum HA was increased in model rats (HA in normal and model group was 78.4 ± 19.2 μ g/L) vs (263.2 ± 107.0) μ g/L, $P < 0.01$). The histological changes of fibrosis was also remarkable.

CONCLUSION: TGF β 1/TGF receptors /Smad signaling involve the formation and development of liver fibrosis. The TGF β 1 /

Smad signal pathway plays key roles in liver fibrogenesis. It may be a new pathway for the treatment of liver fibrosis.

Song SL, Gong ZJ, Zhang QR. Expression of TGF β 1 and its receptors, Smad3 and Smad7 in rats with experimental liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):676-679

摘要

目的: 研究四氯化碳(CCl₄)诱导肝纤维化大鼠肝脏转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 及其 I, II 型受体(TGFR)、Smad3、Smad7 的定位及表达。

方法: 将 24 只大鼠随机分为正常对照组与模型组, 模型组大鼠予以 40% 四氯化碳皮下注射 8 wk 后处死。RT-PCR 检测肝组织 TGF β 1, TGFR I 与 TGFR II; 免疫组化技术检测 TGF β 1, Smad3, Smad7 在肝脏的表达及细胞内的定位; 放射免疫方法检测透明质酸, 肝组织病理检查。

结果: 与正常组大鼠比较, RT-PCR 显示模型组大鼠肝内 TGF β 1、TGFR I 与 TGFR II mRNA 表达明显增高; 免疫组化结果显示 TGF β 1 与 Smad3 表达增加, 而 Smad7 的表达降低, TGF β 1 与 Smad3 的免疫阳性反应信号主要位于纤维间隔中的细胞质, Smad7 主要在肝细胞质表达(正常组与模型组大鼠 TGF β 1、Smad、Smad7 平均光度分别 0.61 ± 0.33 与 1.57 ± 0.53 , 0.248 ± 0.042 与 0.785 ± 0.904 , 4.674 ± 1.143 与 0.470 ± 0.097 , $P < 0.05$); 模型组大鼠血清透明质酸水平明显增高(正常组大鼠 78.4 ± 19.2 μ g/L, 模型组 263.2 ± 107.0 μ g/L, $P < 0.01$), 肝组织 HE 染色支持肝纤维化改变。

结论: 肝内 TGF β 1, TGFR I, TGFR II, Smad3 表达增强、Smad7 表达减弱, 提示 TGF β 1 及其受体与 Smad 信号通道蛋白参与了肝纤维化的发生发展, 可作为防治肝纤维化发生发展的新途径之一。

宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 实验性大鼠肝纤维化 TGF β 1 及其受体 mRNA 与 Smad3, 7 的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(3):676-679
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/676.asp>

0 引言

转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)是致肝纤维化的最重要的细胞因子^[1-5], 具有促进肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与沉积作用^[6-8]。

TGF-β1 通过其 I, II 型受体(transforming growth factor β receptor, TβR)以及细胞内 Smad 信号通道蛋白发挥作用, 以四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠肝纤维化, 并观察 TGF-β1 及其受体和胞内 Smad 信号通道蛋白的变化, 探讨 TGF-β1 及其受体与信号通道蛋白 Smad 之间的相互关系以及各自在肝纤维化中的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 CCl₄分析纯购自武汉亚法生物技术有限公司, 以食用色拉油配制成400 mL/L溶液; Catrimox-14™ RNA 提取试剂盒, Random primer, Ribonuclease inhibitor, Reverse transcriptase(AMV), Taq DNA 多聚酶, Marker 等均为 Takara 公司产品; Genbank 检索引物序列, 委托大连 Takara 公司合成(表 1)。抗 TGF-β1mAb 购自北京中山生物技术有限公司; 抗 Smad3, 抗 Smad7 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司; 透明质酸(hyaluronic acid, HA)试剂盒购自上海海军医学研究所。清洁级 Wistar 大鼠 24 只, 由武汉大学人民医院实验动物中心提供, 质量 200 ± 20 g, 雌雄各半。CCl₄ 肝纤维化大鼠模型制作参照 Wang et al.^[1]方法略加改进。大鼠随机分为 2 组: A 组为正常对照组 12 只, B 组为肝纤维化模型组 12 只。A 组予以生理盐水 3 ml/kg sc, B 组按 3 ml/kg sc 400 mL/L CCl₄, 2 次/wk。所有大鼠于第 8 wk 处死, 处死前称体重。摘眼球采血, 分离血清 -20 °C 冰箱保存。断颈椎, 剖腹取 1 cm × 1 cm × 1 cm 肝左叶组织 1 块 10% 中性甲醛固定, 其余肝左叶组织 -70 °C 冰箱保存。

1.2 方法 大鼠肝脏 TGF-β1, TβR I 与 TβR II mRNA 的 RT-PCR 分析 总 RNA 提取参照试剂盒说明书进行, 每样本取 1 μg 总 RNA 作逆转录模板合成 cDNA。循环温度与时间为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭显色, 采用 HPIAS-2000 型图像分析系统测定平均光度, 各指标平均光度与内参照 GAPDH 的比值代表其 mRNA 相对水平。大鼠肝脏 TGF-β1, Smad3 与 Smad7 免疫组织化学采用 SP 法检测, 具体操作参照说明书进行。PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。阳性组织呈棕色, 阴性组织呈蓝色。在全自动图像分析系统上, 采用 HPIAS-2000 型图像分析软件进行定量分析, 随机选取每张切片 10 个视野(× 400 倍)测定阳性细胞占面积及平均光度, 乘积值越大表明组织中该抗原含量越多。放射免疫分析法检测血清 HA 含量, 由专业人员按说明操作。常规 HE 染色光镜下观察肝组织病理学改变。肝纤维化病理学分级参照《肝纤维化诊断及诊疗评估共识》^[2]。

统计学处理 用 SPSS 统计软件(11.5 版)进行统计分析, 计量资料以 mean ± SD 表示, 并进行组间 t 检验。等级资料采用 R × C 表资料的 χ² 检验。

2 结果

TGF-β1, TβR I 与 TβR II mRNA 的表达 半定量分析显示, B 组肝脏 TGF-β1、TβR I 与 TβR II mRNA 比 A 组表达明显增高, 二者之间差异有显著性(P < 0.05, 图 1-4)。TGFβ1、Smad3 及 Smad7 的表达 A 组: Smad3 在正常肝细胞内几乎无表达, 在汇管区基质及间质细胞内 Smad3 可见少量表达, TGFβ1 在上述部位以及肝窦间隙表达较明显。Smad7 在肝细胞内表达十分明显, 部分肝细胞核膜也有表达, 在汇管区及 Disse 间隙内少量表达; B 组: 大鼠肝内 TGFβ1 与 Smad3 表达明显增强, 主要见于纤维化汇管区及纤维间隔里的梭状细胞类间质细胞中, TGFβ1 表达最为明显, 在近纤维间隔的肝血窦也有梭形细胞阳性着色, 但在肝细胞内无明显表达。本组肝组织内 Smad7 表达极少, 阳性颗粒集中在少数肝细胞及纤维间隔内的梭状细胞内, 阳性细胞着色淡, 纤维间隔中的 Smad7 表达较正常组增多。三种物质阳性表达均位于细胞质与少量胞膜。各组阴性对照未见阳性表达, 证实免疫组化检测结果具有特异性。半定量分析表明, B 组肝内 TGFβ1 及 Smad3 含量明显高于 A 组, 而 Smad7 在 A 组肝内含量高于 B 组, 两组间分别比较差异有显著性(P < 0.05, 表 2)。纤维化模型组大鼠血清 HA(263.2 ± 107.0 μg/L)明显高于正常对照组(78.4 ± 19.2 μg/L)(P < 0.01)。A 组肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞索排列规则有序, 未见变性、坏死, 肝窦与汇管区成纤维细胞少; B 组正常肝小叶结构紊乱, 肝细胞索排列紊乱, 肝细胞肿胀、坏死, 可见嗜酸性小体, 间质中有炎性细胞浸润, 坏死区及汇管区纤维结缔组织增生形成细小的条索, 纤维宽窄不一, 呈星芒状向肝小叶内延伸。肝纤维化分期: A 组(全为 0)与 B 组(2, 3, 4 期分别为 2, 7, 1 例)之间病理学分期差异有非常显著性(P < 0.01)。

表 1 TGF-β1, TGFR I, TGFR II 和 Smad7 引物序列

名称	引物	序列	扩增长度(bp)
TGFβ1	正义序列	5' - CACCATCCATGACATGAACC - 3'	404
	反义序列	5' - TCATGTTGGACAACCTGCTCC - 3'	
TGF receptor I	正义序列	5' - ATGGA CTGAGCTGTGTTGG - 3'	501
	反义序列	5' - TCAACGGATGGATCAGAAGG - 3'	
TGF receptor II	正义序列	5' - CTACAAGGCCAAGCTGAAGC - 3'	580
	反义序列	5' - AGCCATGGAGTAGACATCCG - 3'	
GAPDH	正义序列	5' - TCCCTCAACATTGTCTAGCAA - 3'	309
	反义序列	5' - AGCTCCACAACGGATACATT - 3'	

表 2 大鼠肝组织 TGFβ₁, Smad3, Smad7 定量分析结果(mean ± SD)

组别	TGFβ ₁ 含量	Smad3 含量	Smad7 含量
A 组	0.61 ± 0.33	0.248 ± 0.042	4.674 ± 1.143
B 组	1.57 ± 0.53 ^a	0.785 ± 0.904 ^a	0.470 ± 0.097 ^a

^aP < 0.05 vs 与 A 组比较。

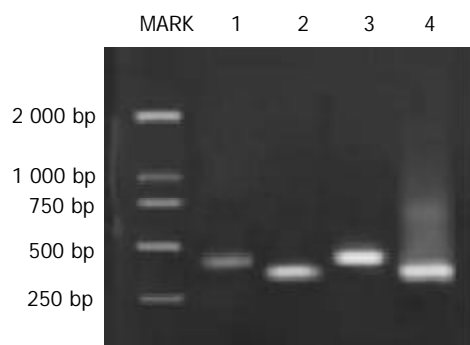


图1 RT-PCR 检测各组 TGF- β 1 和 GAPDH mRNA 表。1、3: 分别为 A、B 组大鼠肝组织 TGF- β 1 mRNA; 2、4: 分别为 A、B 组大鼠肝组织 GAPDH mRNA。

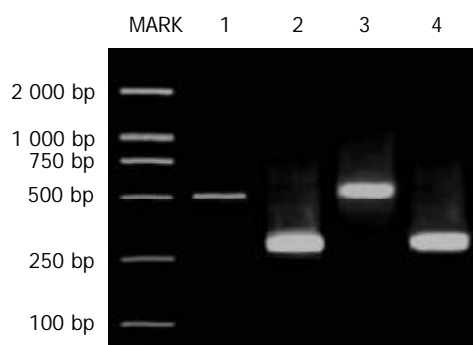


图2 RT-PCR 检测各组 TGF- β 1 和 GAPDH mRNA 表达水平。1、3: 分别为 A、B 组大鼠肝组织 TGF- β 1 mRNA; 2、4: 分别为 A、B 组大鼠肝组织 GAPDH mRNA。

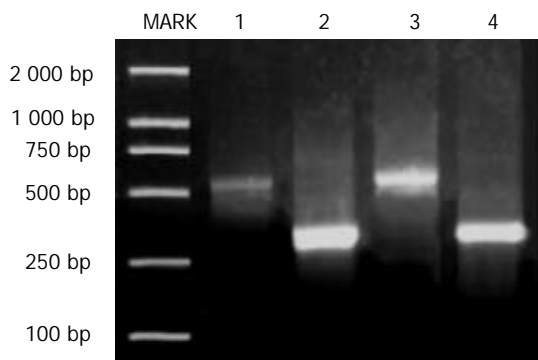


图3 RT-PCR 检测各组 TGF- β 1 mRNA 和 GAPDH mRNA 表达水平。1、3: 分别为 A、B 组大鼠肝组织 TGF- β 1 mRNA; 2、4: 分别为 A、B 组大鼠肝组织 GAPDH mRNA。

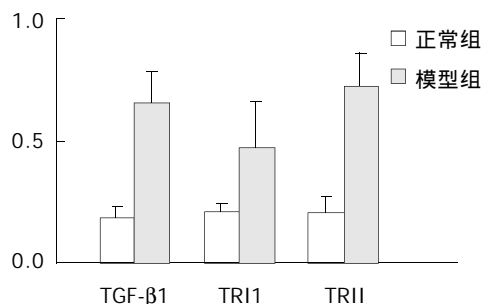


图4 RT-PCR 检测各组 TGF- β 1, TR I 和 TR II mRNA 的表达。

3 讨论

TGF- β 在肝内异常表达可导致各种肝病的发生^[6], 在

诱导肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)的致肝纤维化过程中作用更显著^[7-9]; TGF- β 可抑制肝细胞再生, 诱导肝细胞凋亡^[10-11]; TGF- β 在转录与翻译水平上促进肝脏胶原、纤维连接蛋白等合成, 同时抑制等多种水解酶的合成与分泌, 增加 TIMP 等蛋白酶抑制剂的表达, 具有拮抗 ECM 降解, 促使肝内结缔组织增多的作用^[12]. TGF- β 1 是 TGF- β 超家族中对 ECM 合成与沉积失调而导致组织纤维化最重要的调节因子, 多种器官纤维化、硬化、动脉粥样硬化都与之相关^[13-16]. TGF- β 必须活化并与其效应细胞上的受体结合才能发挥作用^[17], 他首先在细胞外与 T β R III 形成复合物, 将 TGF- β 传递给 T β R II, 或 TGF- β 直接与 T β R II 结合, 随后活性 T β R II 的蛋白激酶使 I 型受体磷酸化, 后者直接使 TGF- β 的信号通道蛋白 Smad2、3 MH2 结构域的 SSXS 基序磷酸化, 与 Smad4 形成异源寡聚体复合物, 该复合物转移到胞核调节相应靶基因转录, 在细胞水平介导 TGF- β 的生物学效应^[18-20]. 抑制型 Smad6、7 是细胞中 T β R I 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白^[3], 能牢固的与 T β R I 型受体结合, 抑制 Smad2、3 磷酸化, 完全阻断 TGF- β 的信号转导^[21], 抑制活化 Smad 复合物在核内移动, 减少 I 型胶原合成, 在 TGF- β 信号转导中构成负反馈调节环路。

HSC 与成纤维细胞内在分泌与旁分泌的 TGF β 不断刺激下, HSC 活化并转化为 MFB, 促进胶原合成增生^[22], 两种细胞内 T β R I 和 T β R II 表达都明显增高^[23]. 我们发现, 与正常组大鼠相比, 肝纤维化大鼠肝内 TGF β 1 及其 I, II 型受体 mRNA 高表达, 说明 CCl₄ 具有刺激 TGF β 分泌增加, 同时也诱导 T β R I 和 T β R II 表达的作用, TGF β 通过与不同受体结合发挥生理病理作用. 免疫组化结果显示, 肝纤维化大鼠肝内 TGF β 1 及 Smad3 表达明显增高, 主要分布在纤维间隔、汇管区的不规则细胞胞质内, 肝细胞内无明显表达, 表明 TGF β 通过激活 T β R I 后, 结合 Smad3 等下游分子, 作用于肝脏非实质细胞, 刺激胶原合成; 也说明 Smad3 与 TGF β 在纤维化肝脏的表达模式相似, 都在肝纤维化时表达上调. 研究证实^[24], 活化的 HSC 中 I 型胶原的大量表达需要 Smad3 参与; 同时发现在正常大鼠肝内 Smad7 表达明显, 主要位于肝细胞内, 说明在生理状态时, Smad7 主要存在于数量众多的肝细胞内, 对维持肝脏生理平衡状态有重要意义. 有研究发现 TGF- β 可快速诱导静止期 HSC 中 Smad7 和 α 2(I) 型胶原 mRNA 的表达, 由 HSC 转化的 MFB 失去 TGF- β 诱导下的 Smad7 表达上调敏感性, 而 Smad2、3 表达有增加^[22, 25-26]. 我们亦发现, 与正常肝脏相比较, 纤维化肝脏的肝细胞内 Smad7 表达明显减少, 而在肝间质细胞内表达增多, 可能与纤维化时, 聚集在纤维组织中的活化 HSC 中大量分泌 TGF- β 诱导 Smad7 表达有关, 故 Smad7 表达显著部位随着疾病出现而相应改变. 在 Smad7 的低水平表达

时, Smad2、Smad3 磷酸化作用增加, 使 TGF- β 与 T β R1 持续激活, 刺激 HSC 不断增生、合成分泌 ECM, 并不断激活周围静止的 HSC 活化并转化为 MFB, 是 TGF- β 致肝纤维化作用的主要原因^[3, 27]。

本研究表明, TGF- β , T β R1, T β R II 及其细胞内信号分子在肝纤维化形成发展中作用显著, 可针对 TGF- β 产生、与受体结合、以及下游 Smad 分子等活化的各个阶段采取相应对策, 阻断其生物和活性, 抑制 HSC 活化, 从而拮抗肝纤维化^[28-30]。已经有研究证实^[31], 可溶性 T β R II (soluble TGF- β type II receptor, STR) 对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型具抑制 TGF- β 和拮抗纤维化作用, STR 降低 I 型胶原 mRNA 含量, 并具有明显的剂量依赖性。对单侧肾小管阻塞大鼠采用转基因 Smad7 治疗, 可增加 Smad7 表达, 完全抑制 Smad2, 3 活性, 明显减少 I, II 型胶原 mRNA 及蛋白表达^[32]。封闭 TGF- β /Smad 信号通路, 采用腺病毒电穿孔基因转导 Smad7 注射入肾纤维化大鼠体内, 免疫组化检测发现肾髓质中有明显的 Smad7 沉积, 并显著抑制肾纤维化发生^[33]。由于在机体多组织多细胞都有 TGF- β 及其受体参与发挥生理作用, 长期完全阻断 TGF- β 以治疗肝纤维化必须考虑安全性问题。

4 参考文献

- Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, Kawada N, Kaneda K. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 2000;32:980-989
- 中华肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. 中华肝病杂志 2002;10:327-328
- Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF- β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35:49-61
- Chang JK, Chuang LY, Ho ML, Wang GJ. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on transforming growth factor-beta expression and bioactivity in rat osteoblast-enriched culture. *Kaohsiung J Med Sci* 2003;19:278-288
- Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, Hatzfeld A. Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res* 2003;13:445-453
- 许君望, 龚均, 冯新利, 花新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皑, 徐贵平. 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β 1 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1185-1188
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- 李清华, 秦成勇, 劳萍. 转化生长因子 β 1 在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨. 世界华人消化杂志 2003;11:103-105
- 姜虹, 李定国. TGF- β 1 与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003; 11:326-329
- Schuster N, Kriegelstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002;307:1-14
- Si XH, Yang LJ. Extraction and purification of TGF β and its effect on the induction of apoptosis of hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:527-531
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGF β signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10
- Xiong LJ, Zhu JF, Luo DD, Zen LL, Cai SQ. Effects of pentoxifylline on the hepatic content of TGF- β 1 and collagen in Schistosomiasis japonica mice with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:152-154
- Jones SE, Kelly DJ, Cox AJ, Zhang Y, Gow RM, Gilbert RE. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. *Kidney Int* 2003; 64:906-913
- Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF- β isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 2003;64:844-856
- Wen FQ, Kohyama T, Skold CM, Zhu YK, Liu X, Romberger DJ, Stoner J, Rennard SI. Glucocorticoids modulate TGF- β production by human fetal lung fibroblasts. *Inflammation* 2003;27:9-19
- Lu JP, Mao JQ, Li MS, Lu SL, Hu XQ, Zhu SN, Nomura S. In situ detection of TGF β s, TGF β receptor II mRNA and telomerase activity in rat cholangiocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:590-594
- Blobe GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* 2001;276:24627-24637
- Fortuno ES 3rd, LeSueur JA, Graff JM. The amino terminus of Smads permits transcriptional specificity. *Dev Biol* 2001; 230:110-124
- Calabrese F, Valente M, Giacometti C, Pettenazzo E, Benvegna L, Alberti A, Gatta A, Pontisso P. Parenchymal transforming growth factor beta-1: its type II receptor and Smad signaling pathway correlate with inflammation and fibrosis in chronic liver disease of viral etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1302-1308
- Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48:1964-1978
- Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001;187:117-123
- Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF- β . *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:1-10
- Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF- β -independent. *J Biol Chem* 2003;278:11721-11728
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001;34:89-100
- Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191
- Liu YK, Shen W. Inhibitive effect of cordyceps sinensis on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism. *World J Gastroenterol* 2003;9:529-533
- Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:739-745
- Garcia L, Hernandez I, Sandoval A, Salazar A, Garcia J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 2002;37:797-805
- Lin JS, Song YH, Kong XJ, Li B, Liu NZ, Wu XL, Jin YX. Preparation and identification of anti-transforming growth factor beta1 U1 small nuclear RNA chimeric ribozyme in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:572-577
- Yata Y, Gotwals P, Koteliensky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF- β soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002;35:1022-1030
- Lan HY, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, Morishita R, Johnson RJ. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1535-1548
- Terada Y, Hanada S, Nakao A, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Gene transfer of Smad7 using electroporation of adenovirus prevents renal fibrosis in post-obstructed kidney. *Kidney Int Suppl* 2002;61:94-98

胆囊癌组织 hPTTG1 和 bFGF 表达与血管生成的关系

王江, 窦科峰

王江, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
陕西省西安市 710032
王江, 男, 1972-07-31 生, 新疆乌鲁木齐人, 汉族. 第四军医大学西京医院
肝胆外科硕士生.
项目负责人: 窦科峰, 710032, 陕西省西安市, 第四军医大学西京医院肝胆
外科. wangjiangweiran@hotmail.com
电话: 029-83375255
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-08

Expression of hPTTG1 and bFGF in gallbladder carcinoma tissue and their correlation with angiogenesis

Jiang Wang, Ke-Feng Dou

Jiang Wang, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China
Correspondence to: Dr. Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China. wangjiangweiran@hotmail.com
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To investigate the expressions of hPTTG1 and bFGF in human gallbladder carcinoma tissues and their correlation with angiogenesis and other clinicobiological behaviors.

METHODS: The expression of hPTTG1 and bFGF in 41 cases of human gallbladder carcinoma and 22 cases of chronic cholecystitis was detected by immunohistochemical staining (SP method). The microvessels were highlighted by immunohistochemical staining (SP method) to detect antigen of CD34. Angiogenesis was represented by intratumor microvessel density (MVD).

RESULTS: In the gallbladder carcinoma, the positive rates of hPTTG1 and bFGF were 82.9% and 75.6% respectively, which were significantly higher than those in the chronic cholecystitis ($P=0.002$ and 0.006). The expression of hPTTG1 was significantly associated with clinical stages and lymph node metastasis status ($P=0.025$, 0.007), but not with histological differentiation ($P=0.144$). The expression of bFGF was significantly correlated with clinical stages and histological differentiation ($P=0.019$, 0.015), but not with lymph node metastasis status ($P=0.081$). There was a significant correlation between the expression of hPTTG1 and bFGF ($r=0.648$, $P=0.000$). Neither of them had relation with age, sex, histological type and cholelithiasis. The value of MVD in the gallbladder carcinoma was significantly higher than that in the chronic cholecystitis ($t=3.684$, $P=0.001$). The expression of hPTTG1 and bFGF was correlated with MVD in gallbladder carcinoma ($P=0.000$, 0.000). MVD in the gallbladder carcinoma was significantly associated with clinical stages and lymph node metastasis status ($P=0.007$, 0.024), but not with age, sex, histological type, histological

differentiation and cholelithiasis.

CONCLUSION: Overexpression of hPTTG1 is related to the tumorigenesis and angiogenesis in gallbladder carcinoma, which may provide a new target for therapy of gallbladder carcinoma.

Wang J, Dou KF. Expression of hPTTG1 and bFGF in gallbladder carcinoma tissue and their correlation with angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):680-684

摘要

目的: 通过检测胆囊癌组织中 hPTTG1、bFGF 的表达和胆囊癌组织血管生成状况, 探讨他们之间的相互关系及其与胆囊癌临床病理特征之间的关系。

方法: 用免疫组织化学 SP 法对 41 例胆囊癌和 22 例慢性胆囊炎组织中 hPTTG1 和 bFGF 的表达进行检测, 并用抗 CD34 抗体检测微血管密度 (MVD)。用 MVD 反映血管生成情况。

结果: 原发胆囊癌组织中 hPTTG1 和 bFGF 的表达阳性率分别为 82.9% 和 75.6%, 均高于在慢性胆囊炎中的表达阳性率 ($P=0.002$, 0.006)。hPTTG1 的表达与临床分期和淋巴结转移有关 ($P=0.025$, 0.007), 而与组织学分级无显著关系 ($P=0.114$); bFGF 的表达与组织学分级、临床分期有关 ($P=0.015$, 0.019), 而与淋巴结转移无显著关系 ($P=0.081$); hPTTG1 的表达与 bFGF 的表达密切相关 ($r=0.648$, $P=0.000$)。二者的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的种类, 是否伴有胆囊结石均无关。胆囊癌组织 MVD 值明显大于慢性胆囊炎组织 ($P=0.001$)。MVD 分别与胆囊癌组织 hPTTG1 的表达及 bFGF 的表达有关 ($P=0.000$, 0.000)。MVD 与胆囊癌组织 Nevin 分期及淋巴结转移有关 ($P=0.007$, 0.024); 而与患者的性别、年龄、肿瘤的种类、分化程度、是否伴有胆囊结石均无关。

结论: hPTTG1 的异常表达与胆囊癌的发生、发展过程及血管生成过程密切相关, 可能为胆囊癌的诊治提供了一条新的途径。

王江, 窦科峰. 胆囊癌组织 hPTTG1 和 bFGF 表达与血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):680-684
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/680.asp>

0 引言

垂体瘤转化基因 (pttg) 是在大鼠垂体瘤细胞中发现的一种癌基因^[1]。人垂体瘤转化基因 (hpttg) 是一个至少包含有三个成员的基因家族, 其中 hpttg1 与肿瘤的发生、细

胞增生和血管生成密切相关^[2-7]. 血管生成是实体肿瘤生长和转移过程中的关键步骤^[8-9]. 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是重要的促血管生长因子, 在许多肿瘤组织中均有较高水平的表达, 与肿瘤的生长、转移关系密切^[10-14]. 目前国内、外对于胆囊癌组织中 hPTTG1 表达尚无文献报道. 我们通过检测胆囊癌组织中 hPTTG1 和 bFGF 的表达及胆囊癌组织血管生成状况, 探讨他们之间的相互关系及其与胆囊癌临床病理特征之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 第四军医大学西京医院病理科存档, 1992-2002 年根治性手术切除胆囊癌蜡块标本 41 例. 男 13 例, 女 28 例; 年龄 32-80(平均 60.3, 中位 61 岁). 其中腺癌 36 例(包括乳突状腺癌 19 例, 管状腺癌 16 例, 黏液腺癌 1), 鳞癌 2 例, 腺鳞癌、腺棘癌、印戒细胞癌各 1 例. 高分化癌 17 例, 中分化癌 12 例, 低分化癌 12 例. Nevin I 期 1 例, II 期 2 例, III 期 5 例, IV 期 7 例, V 期 26 例. 伴有结石 22 例, 有淋巴结转移 31 例. 另取慢性胆囊炎标本 22 例作为对照组. 抗 hPTTG1 兔抗人多克隆抗体(SK601^[15])由 Kakar S S 教授(University of Louisville, USA)惠赠, 抗 FGF-2 (bFGF)兔抗人多克隆抗体系 Santa Cruz 公司产品. 抗 CD34 鼠抗人 mAb 及 SP 免疫组化试剂盒系北京中山生物技术公司产品, DAB 显色剂系 DAKO 公司产品.

1.2 方法 免疫组织化学 SP 法. 检测步骤: 组织切片常规脱蜡至水; 滴加 3 mol/L 尿素溶液室温静置 30 min; PBS 冲洗 5 min \times 2; 置枸橼酸盐抗原修复液中用微波炉进行抗原修复 10 min, 自然冷却至室温, PBS 冲洗 5 min \times 2; 30 ml/L H₂O₂ 浸泡 20 min, PBS 冲洗 5 min; 正常山羊血清 37 °C 封闭 30 min, 分别滴加抗 hPTTG1 兔抗人多克隆抗体 SK601 (1:100)、抗 bFGF 兔抗人多克隆抗体 (1:100)及抗 CD34 鼠抗人 mAb (1:50), 4 °C 冰箱过夜; PBS 冲洗 5 min \times 3; 滴加生物素标记二抗, 37 °C 孵育 30 min; PBS 冲洗 5 min \times 3; 滴加辣根酶标记的链霉卵白素, 37 °C 孵育 30 min; PBS 冲洗 5 min \times 3; DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染, 封片. 同时用 PBS 代替一抗作染色的阴性对照, 用已知的染色阳性切片作阳性对照. 结果判断: hPTTG1 以肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞(图 1). bFGF 以肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞(图 2). 二者采取统一的评价标准. 在 500 倍光镜下至少观察 5 个视野, 肿瘤阳性细胞大于 10% 定义为阳性表达, 小于或等于 10% 为阴性表达. 用抗 CD34 抗体进行 SP 法免疫组化染色, 在微血管内皮细胞膜、胞质着色呈棕黄色(图 3). 微血管密度(MVD)的测定参照 Weidner et al (N Engl J Med 1992;324:1-8)的方法, 在低倍镜(\times 125)下对每张切片进行观察, 找出 5 个微血管高密度区域作为“热点”, 再在高倍镜(\times 500)镜下对每个区域的微血管进行计数, 取 5 个区域的平均计数值即为 MVD 值. 典型的血管内皮细胞着色, 即使未形

成管腔, 也可作为独立新生微血管计数. 依据形态差异剔除浆细胞与巨噬细胞.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计学软件, 采用独立样本 t 检验和方差分析以及 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析. 显著性水准定为: $P < 0.05$.

2 结果

2.1 hPTTG1 和 bFGF 表达与临床病理特征的关系 hPTTG1 主要分布在细胞质中, 部分胞核着色, 少量癌旁浸润肝脏细胞着色, 无明显间质中纤维及淋巴细胞着色. bFGF 也主要分布在细胞质中, 部分胞核和血管内皮细胞着色. 胆囊癌组织 hPTTG1 表达阳性率高于慢性胆囊炎组织, 差别有显著意义($\chi^2=9.545$, $P=0.002$ 表 1). 胆囊癌组织 bFGF 表达阳性率高于慢性胆囊炎组织, 差别有显著意义($\chi^2=7.438$, $P=0.006$ 表 1). hPTTG1 在 Nevin IV - V 期胆囊癌组织中表达阳性率高于 I - III 期胆囊癌组织, 差别有显著意义($\chi^2=7.611$, $P=0.025$ 表 2); 伴有淋巴结转移的胆囊癌组织 hPTTG1 表达阳性率高于不伴有淋巴结转移胆囊癌组织, 差别有显著意义($\chi^2=7.258$, $P=0.007$ 表 2). hPTTG1 表达阳性率与性别、年龄、病理组织分化程度、病理类型、是否伴有胆石症无关. Nevin IV - V 期胆囊癌组织中 bFGF 表达阳性率明显高于 I - III 期, 差别有显著意义($\chi^2=5.471$, $P=0.019$ 表 2). 中、低分化的胆囊癌组织 bFGF 表达阳性率明显高于高分化胆囊癌组织, 差别有显著意义($P=0.015$ 表 2). bFGF 表达阳性率同性别、年龄、病理类型、是否伴有淋巴结转移及胆石症无关. 经 Spearman 等级相关检验, 本组胆囊癌标本, hPTTG1 表达阳性率同 bFGF 表达阳性率存在显著正相关关系($r=0.648$, $P=0.000$).

2.2 MVD 与临床病理学特征的关系 胆囊癌组织中新生血管内皮细胞胞膜、胞质着色, 呈现棕黄色; 胆囊癌组织中新生血管分布不均匀(图 3). 胆囊癌组织 MVD 值在高倍视野下(\times 500)为: 27 ± 7 个, 明显高于慢性胆囊炎组织 MVD 值: 21 ± 5 个, 差别有显著意义($t=3.684$, $P=0.001$ 表 1). Nevin IV - V 期胆囊癌组织 MVD 值: 28 ± 6 , 明显高于 I - III 期胆囊癌组织 MVD 值: 21 ± 6 , 差别有显著意义($t=2.879$, $P=0.007$ 表 2); 伴有淋巴结转移胆囊癌组织 MVD 值: 28 ± 6 , 不伴淋巴结转移胆囊癌组织 MVD 值: 23 ± 7 , 差别有显著意义($t=2.350$, $P=0.024$ 表 2). MVD 与患者的性别、年龄、肿瘤的种类、分化程度、是否伴有胆囊结石均无关.

2.3 hPTTG1 和 bFGF 表达同 MVD 的关系 胆囊癌组织中表达 hPTTG1 组 MVD 值大于未表达 hPTTG1 组, 差别有显著意义($t=4.113$, $P=0.000$, 图 4), 表达 hPTTG1 组 MVD 值较未表达 hPTTG1 组的 MVD 值变异范围大(图 4); 表达 bFGF 蛋白组 MVD 值大于未表达 bFGF 蛋白组, 差别有显著意义($t=7.148$, $P=0.000$, 图 5), 表达 bFGF 组 MVD 值较未表达 bFGF 组的 MVD 值变异范围大(图 5).

表1 胆囊癌与慢性胆囊炎 hPTTG1 和 bFGF 的表达差异及 MVD 的比较

组别	n	PTTG1			BFGF			MVD(个)		
		阳性	阴性	P 值	阳性	阴性	P 值	mean±SD	t 值	P 值
胆囊癌	41	34	7		31	10		27±7		
慢性胆囊炎	22	10	12	0.002	9	13	0.006	21±5	3.684	0.001

微血管密度(MVD)是每张图片在光镜 500× 的视野内计数抗 CD34 染色阳性微血管数目, 取其中 5 个最大计数值的均值, 以 mean±SD 记录。

表2 hPTTG1, bFGF 的表达和 MVD 与胆囊癌临床病理指标之间的关系

指标	n	PTTG1			BFGF			MVD(个)		
		阳性	阴性	P 值	阳性	阴性	P 值	mean±SD	t 值	P 值
性别										
男性	13	12	1		11	2		28±6		
女性	28	22	6	0.521	20	8	0.600	26±6	0.520	0.606
年龄(岁)										
>60	21	18	3		17	4		27±6		
<60	20	16	4	0.943	14	6	0.651	27±7	0.009	0.993
结石										
有	22	19	3		15	7		28±6		
无	19	15	4	0.831	16	3	0.408	26±7	1.11	0.274
病理类型										
腺癌	36	30	6		26	10		27±7		
非腺癌	5	4	1	0.855	5	0	0.310	28±5	0.319	0.751
分化程度										
高	17	12	5		9	8		26±8		
中	12	11	1		11	1		26±5		
低	12	11	1	0.144	11	1	0.015	29±5	0.680 [*]	0.513
Nevin 分期										
I - III	8	4	4		3	5		21±6		
IV - V	33	30	3	0.025	28	5	0.019	28±6	2.879	0.007
淋巴结转移										
阳性	31	29	2		26	5		28±6		
阴性	10	5	5	0.007	5	5	0.081	23±7	2.350	0.024

不同分化程度胆囊癌组织微血管密度的比较采用单因素方差分析, $F=0.680$ 。

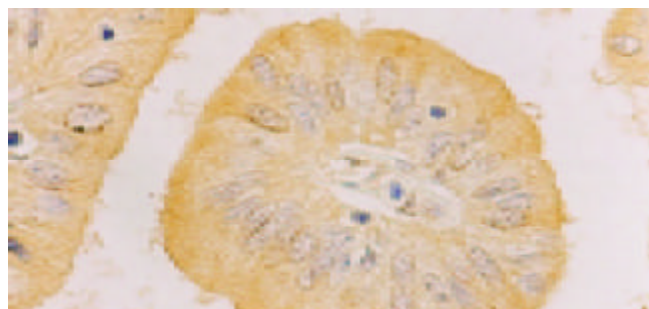


图1 hPTTG1 在胆囊癌组织中的阳性表达 (SP×400)。

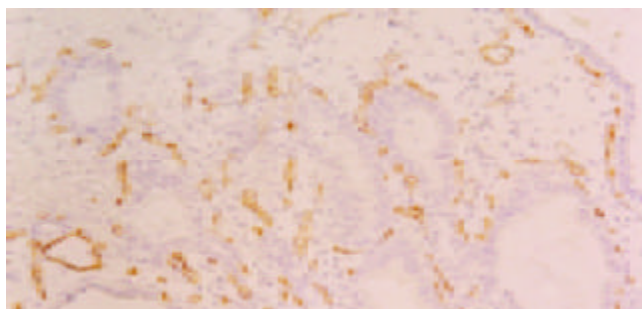


图3 胆囊癌组织中的微血管(SP 抗 CD34 染色 SP×100)。

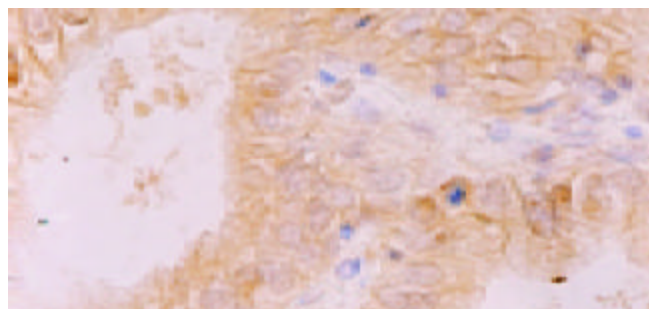
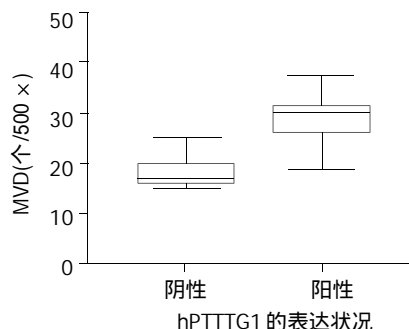


图2 bFGF 在胆囊癌组织中的阳性表达 (SP×400)。

图4 胆囊癌组织中 hPTTG1 表达同 MVD 的关系($P=0.000$)。

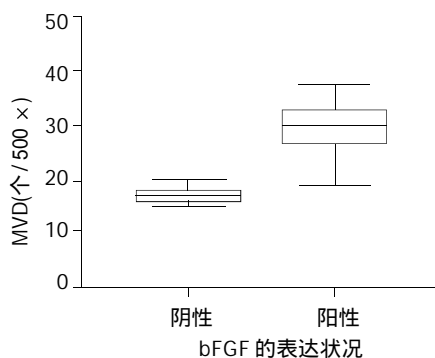


图5 胆囊癌组织中 bFGF 表达同 MVD 的关系($P = 0.000$).

3 讨论

垂体瘤转化基因(pttg), 可以在体外转化小鼠 3T3 细胞, 转化的 3T3 细胞在无胸腺裸鼠体内可以形成肿瘤^[1]. 人垂体瘤转化基因 1(hpttg 1) 定位于 5 号染色体长臂, 5q35 区, 其基因表达产物 hPTTG1 对人类细胞进行正常有丝分裂具有重要作用^[16-17]. 过度表达的 hPTTG 会抑制有丝分裂 M 期姊妹染色体分离, 进而发生染色体异常, 产生异倍体^[18-19]. hPTTG1 仅在睾丸、胸腺、胚胎肝脏中高表达, 在其他正常组织中仅弱表达甚至检测不到, 在乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、淋巴瘤等肿瘤组织及肿瘤细胞系中高表达^[4]. hPTTG1 的表达与结肠癌、食管癌等肿瘤的恶性程度、转移及预后密切相关^[20-21]. 我们发现: 在胆囊癌组织中, hPTTG1 表达阳性率明显高于慢性胆囊炎($P < 0.01$). 在胆囊癌组织中 hPTTG1 的表达阳性率同肿瘤病理分期有关, 在 Nevin IV - V 期胆囊癌组织中表达阳性率明显高于 I - III 期胆囊癌组织($P < 0.05$). 在胆囊癌组织中 hPTTG1 的表达阳性率还与淋巴结转移有关, 伴有淋巴结转移组 hPTTG1 表达阳性率明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$). 这表明 hPTTG1 的异常表达与胆囊癌的发生、发展及侵袭进程密切相关, hPTTG1 是反映胆囊癌侵袭性的有用指标.

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对肿瘤间质血管生成具有重要作用. bFGF 在多种肿瘤组织中高表达, 并与肿瘤的浸润、转移和预后差密切相关^[10-14]. 我们发现: 胆囊癌组织 bFGF 表达阳性率明显高于慢性胆囊炎组织($P < 0.01$). Nevin IV - V 期胆囊癌组织中 bFGF 蛋白表达阳性率明显高于 I - III 期($P < 0.05$). 中、低分化的胆囊癌组织 bFGF 表达阳性率明显高于高分化胆囊癌组织($P < 0.05$). 以上结果表明, bFGF 异常表达与胆囊癌发生及胆囊癌细胞去分化有关, 是反映胆囊癌恶性程度的有用指标.

肿瘤生长与转移依赖于血管生成. 微血管密度(MVD) 可以作为评估肿瘤血管生成的一个有用指标^[8]. 我们发现, 胆囊癌组织 MVD 值大于慢性胆囊炎组织 MVD 值($P < 0.01$), Nevin VI - V 期胆囊癌组织 MVD 值大于 I - III 期胆囊癌组织 MVD 值($P < 0.01$); 伴有淋巴结转移胆囊癌组织 MVD 值大于不伴有淋巴结转移的胆囊癌组织 MVD 值($P < 0.05$). 本研究结果提示: 同结、直肠癌^[21-23]、胆管癌^[24]等肿瘤组织一样, 胆囊癌组织中肿瘤新生血管形成与其肿瘤

恶性程度及侵袭性密切相关. 我们的研究结果与牛新捷 et al^[25]、白涛 et al^[26] 对胆囊癌组织 MVD 研究结果基本一致. 我们同时发现: 表达 hPTTG1 组较未表达 hPTTG1 组的 MVD 值大($P < 0.001$). 表达 bFGF 组较未表达 bFGF 组的 MVD 值大($P < 0.001$). 这表明在胆囊癌组织中肿瘤新生血管的形成同 hPTTG1 及 bFGF 的异常表达均密切相关. Melmed et al^[21] 对结肠癌组织中 hPTTG1 表达与 MVD 关系的研究结果与我们的研究结论一致.

我们发现胆囊癌组织中 hPTTG1 表达同 bFGF 表达存在正相关关系($r = 0.648$, $P < 0.001$). 对垂体肿瘤的研究表明, hPTTG1 可以诱导 bFGF 表达, 而 bFGF 的表达又可上调 hPTTG1 的表达, 二者之间存在正反馈关系^[7]. 我们的研究结果提示: 在胆囊癌组织中 bFGF 与 hPTTG1 可能也存在这样的协同作用. hPTTG1 异常表达可能通过上调 bFGF 的表达间接诱导胆囊癌新生血管形成, 进而促进胆囊癌生长与转移.

原发性胆囊癌是胆道系统常见肿瘤, 其发病率近年有增加趋势^[27-31]. 作为癌基因蛋白, hPTTG1 具有转化功能, 促进肿瘤新生血管形成, 与 bFGF 协同参与肿瘤的发生、发展及侵袭进程. 我们认为 hPTTG1 异常表达在胆囊癌的发生、发展及侵袭进程中具有重要意义, 可能成为反映胆囊癌侵袭性的重要指标. 针对 hpttg1 基因及其表达产物的治疗, 有望为胆囊癌治疗提供一条新的途径.

4 参考文献

- 1 Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 1997;11:433-441
- 2 Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 1999;13:156-166
- 3 Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* 2000;248:41-50
- 4 Hamid T, Kakar SS. PTTG and cancer. *Histol Histopathol* 2003;18:245-251
- 5 Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:867-874
- 6 McCabe C. Genetic targets for the treatment of pituitary adenomas: focus on the pituitary tumor transforming gene. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:620-625
- 7 Faglia G, Spada A. Genesis of pituitary adenomas: state of the art. *J Neurooncol* 2001;54:95-110
- 8 Teo NB, Shoker BS, Martin L, Sloane JP, Holcombe C. Angiogenesis in pre-invasive cancers. *Anticancer Res* 2002;22:2061-2072
- 9 吴静, 樊代明. 肿瘤血管生成与肿瘤血管抑制治疗. *世界华人消化杂志* 2001;9:316-321
- 10 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 11 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧. bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控. *世界华人消化杂志* 2003;11:1333-1336
- 12 Yu R, Melmed S. Oncogene activation in pituitary tumor. *Brain Pathol* 2001;11:328-341
- 13 McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittos NJ. Expression of pituitary tumour transforming gene

- (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour-behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58:141-150
- 14 Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000;55:800-806
- 15 Kakar SS, Chen L, Puri R, Flynn SE, Jennes L. Characterization of a polyclonal antibody to human pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1) protein. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1537-1546
- 16 Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 1999;285:418-422
- 17 Cohen-Fix O. The making and breaking of sister chromatid cohesion. *Cell* 2001;106:137-140
- 18 Honda S, Hayashi M, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Tsuchiya E. A role for the pituitary tumor-transforming gene in the genesis and progression of non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 2003;23:3775-3782
- 19 Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S. Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology* 2003;144:4991-4998
- 20 Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, Nishiwaki T, Kato J, Shinoda N, Sato A, Kimura M, Koyama H, Toyama T, Ishiguro H, Kudo J, Terashita Y, Konishi S, Fujii Y. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:233-237
- 21 Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S. Expression of pituitary-tumor transforming gene in colorectal tumor. *Lancet* 2000;355:716-719
- 22 贾玲, 陈天星, 孙建伟, 纳智明, 张会华. 大肠癌微血管密度及增生细胞核抗原与临床预后的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:74-76
- 23 陈卫昌, 刘强, 李锐, 康苏娅. 结直肠癌微血管密度与增生细胞核抗原的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:1222-1224
- 24 陈勇军, 俞亚红, 丁志强. 胆管癌组织 P53 和血管内皮生长因子表达与血管生成的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1827-1830
- 25 牛新捷, 王作仁, 张云峰, 吴胜利. 胆管癌组织微血管密度的临床意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:109-110
- 26 白涛, 郭仁宣, 王浩. 血管生成与胆管癌发展和预后的关系. *中国普外基础与临床* 2001;8:101-103
- 27 石景森, 杨毅军, 王作仁, 周连锁, 王林, 王健生, 何平, 卢云, 孙立江, 焦兴元, 刘绍浩. 原发性胆管癌 44 年诊治的临床回顾. *外科理论与实践* 2001;6:137-141
- 28 逢锦忠, 童赛雄. 原发性胆管癌分子生物学研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:441-444
- 29 Rashid A. Cellular and molecular biology of biliary tract cancers. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:995-1009
- 30 Misra S, Chaturvedi A, Misra NC, Sharma ID. Carcinoma of the gallbladder. *Lancet Oncol* 2003;4:167-176
- 31 Johnson CD. ABC of the upper gastrointestinal tract. Upper abdominal pain: Gall bladder. *BMJ* 2001;323:1170-1173

《严重急性呼吸综合征(SARS)基础与临床》出版

《严重急性呼吸综合征(SARS)基础与临床》一书是由第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心聂青和博士主编,国内20余名高等院校、科研机构从事SARS一线临床、科研、防疫专家学者们共同编写。承蒙著名呼吸病学专家、中国SARS防治首席科学家钟南山院士及著名传染病专家姜素椿教授为本书赐序。编写者们在总结分析现有文献的基础上,将自己战斗在SARS一线成功救治、预防、研究SARS丰富、宝贵的亲身实践经验及体会无私地奉献给读者。本书是在“后SARS时代”编写的一部SARS学术专著,全书从理论到实践全面系统地将SARS研究加以论述(76万字、28章),内容包括系统理论、临床、实验、预防及心理五个部分,专业涉及传染病学、呼吸病学、危重急救医学、儿科学、微生物学、免疫学、分子生物学、生物化学、流行病学、医学检验、放射医学、心理学、护理学及预防医学等学科。本书基础临床并重,广泛论及SARS方方面面,兼顾不同学术观点,内容丰富、信息量大,集系统性、先进性、科学性和实用性为一身,反映了SARS研究的最新进展。书末附有SRAS患者胸片、CT片、病理及病原学照片等极其珍贵的原始影像学资料百余幅。另将SARS重要网站、官方文件汇总、SARS大事记、SARS常见问题解答以及SARS患者X线胸片及CT片400余张等内容制作光盘一并出版,使这套作品内涵延伸、新颖、可读性强。可作为医务人员、科研工作者,尤其是传染病学、呼吸科、儿科、急诊科、放射科及卫生防疫人员的常备读物,也可作为其它临床科室、医学检验、心理学、护理学、实验动物学等工作者的参考书。同时也为生物医学类大学生、研究生的学习提供一本全新的参考教材。

《严重急性呼吸综合征(SARS)基础与临床》一书已由高等教育出版社(北京)2004年1月出版(全书760千字,28章,大16K精装本,定价48.60元含光盘)。

CTLA4Ig局部转基因对小肠移植急性排斥的治疗作用

王一芳, 许爱刚, 华一兵, 吴文溪

王一芳, 许爱刚, 华一兵, 吴文溪, 南京医科大学第一附属医院胃肠外科 江苏省南京市 210029

王一芳, 男, 1964-10-03 生, 江苏省宜兴市人, 汉族. 1997 年南京医科大学硕士, 现为南京医科大学博士研究生. 主要从事胃肠疾病的外科治疗.

南京医科大学创新基金资助项目, No. 200106

项目负责人: 吴文溪, 210029, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第一附属医院胃肠外科. wuwenxi@yahoo.com

电话: 025-83718836-6863

收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-12-08

Effect of local CTLA4Ig gene transfection on acute rejection of small bowel allografts in rats

Yi-Fang Wang, Ai-Gang Xu, Yi-Bing Hua, Wen-Xi Wu

Yi-Fang Wang, Ai-Gang Xu, Yi-Bing Hua, Wen-Xi Wu, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Innovative Foundation of Nanjing Medical University, No.200106

Correspondence to: Wen-Xi Wu, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wuwenxi@yahoo.com

Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the local expression of CTLA4Ig gene in small bowels and its action on preventing acute rejection of the small bowel allografts.

METHODS: Wistar rats underwent heterotopic small bowel transplantation from SD rats. The recipients were divided into experimental group (allografts were transfected with CTLA4Ig gene) and control group (CTLA4Ig gene not transfected) randomly. In the experimental group, the donor small bowels were perfused *ex vivo* with CTLA4Ig cDNA packaged with lipofectin vector *via* intra-superior mesenteric artery before transplantation, and the CTLA4Ig expression in the small bowel grafts post-transplantation was assessed by immunohistology. On days 3, 7 and 10 post-transplantation, the allografts in each group were harvested for the examination of histology and assay of apoptosis.

RESULTS: Small bowel allografts treated with CTLA4Ig cDNA showed abundant CTLA4Ig expression after transplantation. Acute rejection grade I on day 7 and grade II on day 10 after transplantation was noticed in the control allografts, and a dramatically increased number of apoptotic enterocytes in parallel to the progressive rejection could be recognized. In contrast, the allografts treated with CTLA4Ig cDNA showed nonspecific histological changes and only a few of apoptotic enterocytes were found after transplantation.

CONCLUSION: Local CTLA4Ig gene transfection of small bowel allograft is feasible, and the local CTLA4Ig expression

in the allograft can prevent acute rejection after transplantation.

Wang YF, Xu AG, Hua YB, Wu WX. Effect of local CTLA4Ig gene transfection on acute rejection of small bowel allografts in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):685-688

摘要

目的: 研究CTLA4Ig基因在移植小肠局部表达及其表达产物对急性排斥反应的治疗作用.

方法: 建立 SD → Wistar 的大鼠异位小肠移植模型, 并随机分为实验组(CTLA4Ig转基因组)和对照组(非转基因组). 实验组供肠移植前经肠系膜上动脉注入脂质体包裹的 CTLA4Ig cDNA, 术后应用免疫组织学检查移植小肠中 CTLA4Ig 转基因产物的表达. 移植术后 3, 7, 10 d 分别获取各组的移植小肠进行组织学检查及细胞凋亡测定.

结果: 经CTLA4Ig cDNA处理的小肠在移植术后可见大量的CTLA4Ig表达. 对照组移植肠在术后7, 10 d分别出现 I, II 度急性排斥反应, 同时凋亡细胞数量显著增加. 实验组移植肠术后未见排斥反应的病理学证据, 凋亡细胞偶见.

结论: CTLA4Ig 基因可在移植小肠局部转染表达, 其表达产物可防止移植术后急性排斥反应的发生.

王一芳, 许爱刚, 华一兵, 吴文溪. CTLA4Ig 局部转基因对小肠移植急性排斥的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):685-688

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/685.asp>

0 引言

CTLA4Ig 为小鼠细胞毒性淋巴细胞抗原 4 的胞外部分与人 IgG Fc 段的重组融合蛋白, 可与 B7-1/2 分子结合, 阻断抗原递呈细胞(APC)和抗原特异性 T 淋巴细胞之间的共刺激信号传递. 应用 CTLA4Ig 基因转染治疗移植排斥, 可延长移植物的存活时间, 诱导出供者特异的耐受状态^[1-7]. 将编码免疫抑制分子的基因转染移植器官, 旨在创造一个直接修饰免疫反应细胞的局部微环境^[8], 移植器官内 CTLA4Ig 基因转染表达可使许多移植长期存活^[9-12]. 然而在移植小肠内进行 CTLA4Ig 基因转染尚无报道. 我们应用脂质体包裹的 CTLA4Ig cDNA 质粒经肠系膜上动脉注入冷冻保存的小肠, 观察 CTLA4Ig 基因在移植肠段的表达及其对急性排斥治疗的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 体质量 250-300 g 的 ♂ SD 和 Wistar 大鼠由南京医

科大学动物实验中心提供;CTLA4Ig cDNA (AAVmCTLA4IgG质粒) 由法国 Anegon 教授赠送;脂质体(DOTAP: chol, in vivo geneshuttle)为 Qbiogene 公司产品;凋亡试剂盒购自 Boehringer 公司;甲基绿为 Vector Laboratories 公司产品;仓鼠抗小鼠 CTLA4 单克隆抗体 IgG 和生物素标记的小鼠抗仓鼠 Ig 抗体购自 BD Biosciences 公司;HRP 标记的抗生蛋白链霉素为 Woburn 公司产品。

1.2 方法 参照 Yang et al [13-17]的方法,将 SD 鼠小肠(切取长度为 20 cm)移植给 Wistar 鼠,制作大鼠异位小肠移植模型。所有动物在术后 24 h 内自由进水,1 d 后进食。在室温下将 AAVmCTLA4 IgG 质粒和脂质体混合 15 min 制成脂质体/cDNA 混悬液,其中 cDNA 浓度为 0.5 g/L。移植肠段从供体取下经生理盐水冲洗后,将 50 μ L 脂质体(对照组, $n=15$)或脂质体/cDNA 混悬液(实验组, $n=15$)经肠系膜上动脉于 5-10 min 内缓慢注入。经 1.5 h 冷冻保存后以 4 $^{\circ}$ C 生理盐水 5 mL 冲洗肠系膜上动脉 10 min,随后植入受体鼠腹腔。移植术后 3, 7, 10 d, 各组分别处死 5 只动物获取移植小肠,部分以多聚甲醛固定作组织学检查和凋亡测定,部分以液氮冷冻保存作免疫组织学检查。(1)组织学检查:石蜡包埋组织切片行 HE 染色,以 Kuusanmaki et al (Transplantation 1994; 58: 757-763)的标准判定排斥发生的等级;(2)凋亡细胞测定采用 TUNEL 技术[18-20],操作步骤严格按照凋亡试剂盒说明书进行,最后以甲基绿复染,在光镜下调亡细胞的核被染成棕色,每例切片随机选取 10 个高倍视野读取凋亡细胞数量(Transplantation 1997; 63: 947-951);(3)免疫组织学检查:组织冰冻切片 5 μ m 厚,以仓鼠抗小鼠 CTLA4 单克隆抗体 IgG (UC-4F10-11)为一抗,以生物素标记的小鼠抗仓鼠 Ig 抗体(G70-204&G94-56)为二抗。一抗与二抗的反应条件均为 37 $^{\circ}$ C, 60 min。最后以 HRP 标记的抗生蛋白链霉素和 DAB 显色、苏木素复染。在光镜下组织中表达的 CTLA4IgG 呈棕色颗粒。

统计学处理 数据以 mean \pm SD 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 时差异具有显著性。

2 结果

2.1 组织学检查 对照组移植肠于术后 3 d 未见特异性的排斥征象,仅见局灶性肠系膜炎、内皮细胞轻度空泡化、肠壁细胞轻度肿胀与脱落,绒毛结构基本正常;术后 7 d,肠系膜出现广泛的炎症性改变、肠壁中度炎症细胞浸润、绒毛变短、部分隐窝结构消失、肠系膜动脉内皮细胞肿胀增生、内膜增厚;术后 10 d,肠系膜与肠壁的炎症浸润进一步加重、血管内皮增生与内膜增厚导致管腔堵塞、肠壁出现糜烂与局灶性溃疡等隐窝坏死征象。然而,经 CTLA4 Ig 转基因处理的移植肠于移植术后 3, 7, 10 d,绒毛始终保持正常的形态结构,仅出现轻度的炎症细胞浸润与轻度的内皮细胞肿胀、脱落。

2.2 免疫组织学检查 经 CTLA4Ig 基因转染的移植肠组

织中可见大量的 CTLA4Ig 表达,CTLA4Ig 表达广泛分布于肠系膜血管壁、肠壁肌层、黏膜下及小肠绒毛。移植早期 CTLA4Ig 表达密度较高,但移植后 10 d 内均可见有 CTLA4Ig 的持续表达(图 1)。对照组移植肠组织于术后未见 CTLA4Ig 表达(图 2)。

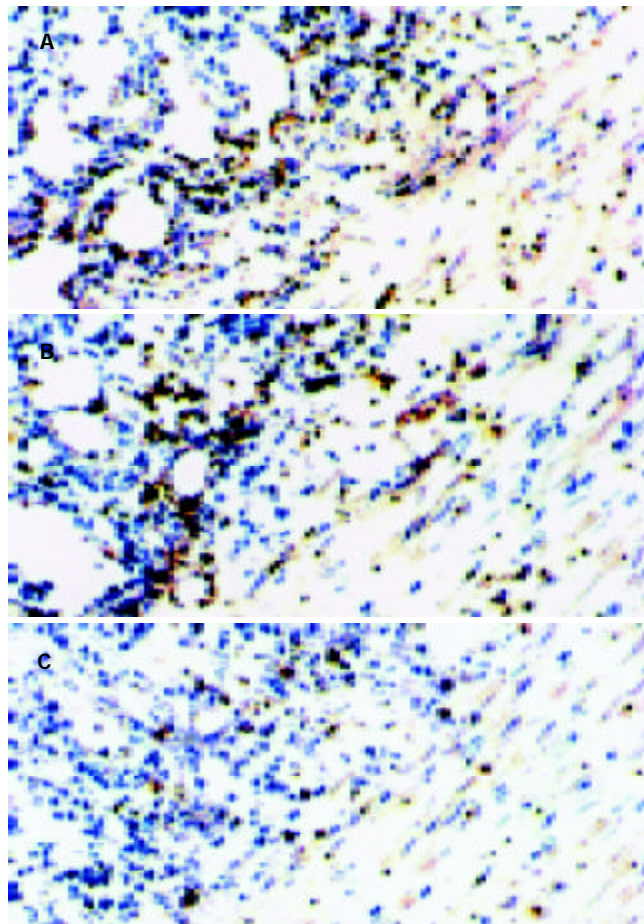


图 1 经 CTLA4Ig cDNA 转染的小肠移植术后组织中 CTLA4Ig 的表达 $\times 200$ A: 术后 3 d; B: 术后 7 d; C: 术后 10 d。

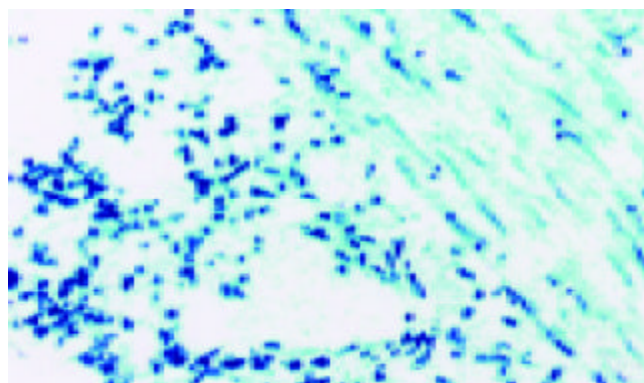


图 2 未经 CTLA4Ig cDNA 转染的小肠移植术后组织中 CTLA4Ig 的表达 $\times 200$ 。

2.3 细胞凋亡检测 主要为隐窝细胞出现凋亡。术后 3 d, 各组移植小肠组织中均有少量细胞凋亡,对照组为 5.3 ± 1.6 ($n=5$)、实验组为 5.8 ± 1.5 ($n=5$), 两组间细胞凋亡数量差异无显著性。对照组移植小肠组织中的凋亡细胞数量于术后 7 d 显著增加(61.8 ± 3.0 , $n=5$), 10 d 增加

更为明显(101 ± 5.5 , $n=5$). (见图 3). 但实验组移植小肠组织中的凋亡细胞数量于术后 7, 10 d 未见增加, 分别为 3.4 ± 1.1 ($n=5$) 和 3.6 ± 1.0 ($n=5$). (见图 4). 两组间细胞凋亡数量差异显著(7 d, $^aP < 0.005$, $t = 41.2954$; 10 d, $^bP < 0.005$, $t = 39.2425$).

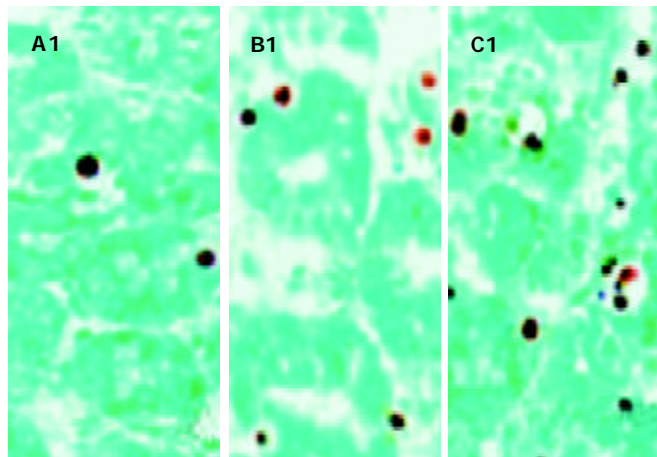


图3 未经 CTLA4Ig cDNA 转染的移植小肠组织中凋亡的隐窝细胞. A1, B1, C1 分别代表移植术后 3, 7, 10 d 的小肠组织切片 $\times 400$.

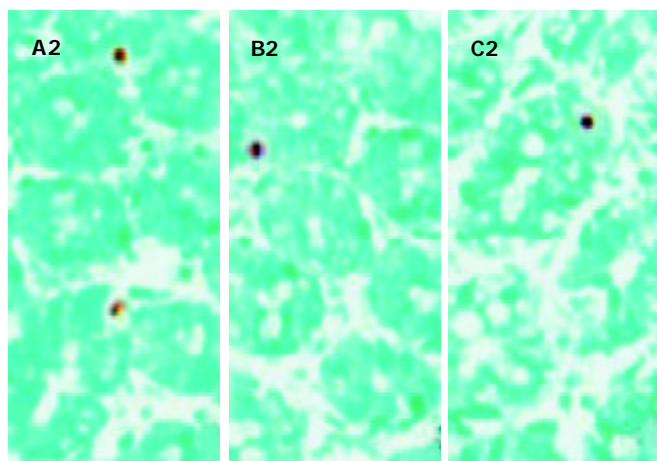


图4 经 CTLA4Ig cDNA 转染的移植小肠组织中凋亡的隐窝细胞. A2, B2, C2 分别代表移植术后 3, 7, 10 d 的小肠组织切片 $\times 400$.

3 讨论

小肠移植是治疗小肠功能衰竭的最终手段, 在一些器官移植中心小肠移植已作为常规疗法^[22-23], 然而, 移植排斥仍是其最大的障碍^[24-26]. 受体静脉内注入 AdCTLA4Ig 进行 CTLA4Ig 基因的系统转染, 可以延长移植小肠的存活时间^[27]. 但小肠富含淋巴组织与细菌, 与心、肝、肾等脏器比较, 移植后更容易发生严重的排斥反应与感染, 对移植肠段进行局部 CTLA4Ig cDNA 转染, 可以抑制受体对移植肠段发生免疫排斥, 同时受体在其他部位的免疫功能(如抗感染功能)保持完好, 可能是解决小肠移植排斥更为理想的方法. 局部 CTLA4Ig 基因转染在心、肝、肾、胰腺和肺移植研究中已经获得成功^[9-12], 但在移植小肠中尚未见有报道. 我们经肠系膜上动脉注入脂质体包裹的 CTLA4Ig cDNA, 经免疫组织学检查发现, 在移植后 3, 7, 10 d 移植小肠组织内有大量

CTLA4Ig 表达, 表明在移植小肠局部进行 CTLA4Ig cDNA 转染是可行的. 未经 CTLA4Ig 基因转染的小肠移植植物, 在移植术后 3 d 仅见少量凋亡细胞, 但在移植术后 7, 10 d 凋亡细胞数量显著增加. 同时, 组织学检查发现移植植物存在进行性的急性排斥反应的病理学证据: 虽然术后 3 d 未见特异性的排斥征象, 但术后 7 d 出现了 I 度急性排斥反应, 10 d 出现了 II 度急性排斥反应. 然而, 经 CTLA4Ig 基因转染的小肠移植植物于移植术后 3, 7, 10 d 均未见急性排斥反应的病理学证据, 凋亡细胞数量一直保持在很低的水平. 以上结果表明移植小肠局部 CTLA4Ig 基因转染可以防止移植术后急性排斥反应的发生. 局部 CTLA4Ig 基因转染防止小肠移植术后急性排斥反应发生的机制, 可能是由于同种异体抗原诱导下, T 细胞的分裂增生反应受到抑制. CTLA4Ig 基因局部基因转染可阻断移植小肠组织中抗原递呈细胞上 B7 分子的表达, 从而阻断 B7/CD28 介导的 T 细胞共刺激作用. 在缺乏 B7/CD28 共刺激信号下, T 细胞识别抗原将诱导特异的无反应性^[28-32].

细胞凋亡是细胞程序死亡的一种形式, 在生理或病理情况下均可发生. 在器官移植中, 凋亡是衡量移植排斥的一种重要的生化指标^[18-21]. 在器官移植急性排斥反应中, 介导移植植物损伤的效应细胞主要是细胞毒性 T 淋巴细胞, 其作用机制主要包括 Fas/FasL 系统和颗粒酶/穿孔素系统^[33-35], 二者均可诱导靶细胞的凋亡. 研究证明, 在移植植物排斥反应过程中, 穿孔素、颗粒酶 B 和 FasL 的表达水平明显上调^[36-39]. 本结果显示, 经 CTLA4Ig 基因转染的小肠移植植物于移植术后 3, 7, 10 d, 特别是术后 3 d, 可见少量的凋亡细胞. 这可能与冷保存和缺血再灌注损伤有关^[40-42], 因为小肠移植后移植植物内浸润的 T 淋巴细胞的毒性作用已经被移植植物内表达的 CTLA4Ig 所中和或阻断.

总之, 本结果提示经肠系膜上动脉灌注脂质体包裹的 CTLA4Ig cDNA, 可达到移植小肠局部 CTLA4Ig 基因转染的目的, 并可防止小肠移植后急性排斥反应的发生.

致谢: 南京医科大学实验研究中心郭锡荣教授提供实验指导.

4 参考文献

- Laumonier T, Potiron N, Boeffard F, Chagneau C, Brouard S, Guillot C, Soullillou JP, Anegon I, Le Mauff B. CTLA4Ig adenoviral gene transfer induces long-term islet rat allograft survival, without tolerance, after systemic but not local intragraft expression. *Hum Gene Ther* 2003;14:561-575
- Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, Uede T. Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation* 2003; 75:1374-1379
- Shiraishi T, Yasunami Y, Takehara M, Uede T, Kawahara K, Shirakusa T. Prevention of acute lung allograft rejection in rat by CTLA4Ig. *Am J Transplant* 2002;2:223-228
- Kita Y, Nogimura H, Ida M, Kageyama Y, Ohi S, Ito Y, Matsushita K, Takahashi T, Suzuki K, Kazui T, Hayashi S, Li XK, Suzuki S. Effects of adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene in rat heterotopic lung implants. *Transplant*

- Proc* 2002;34:1434-1436
- 5 Yanagida N, Nomura M, Yamashita K, Takehara M, Murakami M, Echizenya H, Konishi K, Kitagawa N, Furukawa H, Uede T, Todo S. Tolerance induction by a single donor pretreatment with the adenovirus vector encoding CTLA4Ig gene in rat orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33:573-574
- 6 Shindo J. Effect of CTLA4Ig gene transfer with adenovirus vector on allogeneic renal graft survival in the rat. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2001;76:251-256
- 7 Iwasaki N, Gohda T, Yoshioka C, Murakami M, Inobe M, Minami A, Uede T. Feasibility of immunosuppression in composite tissue allografts by systemic administration of CTLA4Ig. *Transplantation* 2002;73:334-340
- 8 Guillot C, Menoret S, Guillonnet C, Braudeau C, Castro MG, Lowenstein P, Anegon I. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003;101:3325-3333
- 9 Kita Y, Li XK, Nogimura H, Ida M, Kageyama Y, Ohi S, Suzuki K, Kazui T, Suzuki S. Prolonged graft survival induced by CTLA4IG gene transfection in rat lung allografting. *Transplant Proc* 2003;35:456-457
- 10 Umeda Y, Iwata H, Yoshikawa S, Matsuno Y, Marui T, Nitta T, Idia Y, Takagi H, Mori Y, Miyazaki J, Kosugi A, Hirose H. Gene gun-mediated CTLA4Ig-gene transfer for modification of allogeneic cardiac grafts. *Transplant Proc* 2002;34:2622-2623
- 11 Cheung ST, Tsui TY, Wang WL, Yang ZF, Wong SY, Ip YC, Luk J, Fan ST. Liver as an ideal target gene therapy: expression of CTLA4Ig by retroviral gene transfer. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1008-1014
- 12 Benigni A, Tomasoni S, Remuzzi G. Impediments to successful gene transfer to the kidney in the context of transplantation and how to overcome them. *Kidney Int* 2002;61(Suppl 1):115-119
- 13 Yang YL, Li JP, Dou KF, Li KZ. Influence of liver nonparenchymal cell infusion combined with cyclosporin A on rejection of rat small bowel transplantation. *World J Gastroenterol* 2003;9:2859-2862
- 14 Zhu M, Wei MF, Liu F, Shi HF, Wang G. Interleukin-10 modified dendritic cells induce allo-hyporesponsiveness and prolong small intestine allograft survival. *World J Gastroenterol* 2003;9:2509-2512
- 15 Wu XT, Li JS, Zhao XF, Li N, Ma YK, Zhuang W, Zhou Y, Yang G. Effects of n-3 fatty acid, fructose-1,6-diphosphate and glutamine on mucosal cell proliferation and apoptosis of small bowel graft after transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1323-1326
- 16 Wu XT, Li JS, Zhao XF, Zhuang W, Feng XL. Modified techniques of heterotopic total small intestinal transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:758-762
- 17 Li YX, Li JS, Li N. Improved technique of vascular anastomosis for small intestinal transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:259-262
- 18 Wu MY, Liang YR, Wu XY, Zhuang CX. Relationship between Egr-1 gene expression and apoptosis in esophageal carcinoma and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2002;8:971-975
- 19 Sun P, Ren XD, Zhang HW, Li XH, Cai SH, Ye KH, Li XK. Serum from rabbit orally administered cobra venom inhibits growth of implanted hepatocellular carcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:2441-2444
- 20 Huang ZH, Fan YF, Xia H, Feng HM, Tang FX. Effects of TNP-470 on proliferation and apoptosis in human colon cancer xenografts in nude mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:281-283
- 21 Zhao AG, Zhao HL, Jin XJ, Yang JK, Tang LD. Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:792-796
- 22 Platell CF, Coster J, McCauley RD, Hall JC. The management of patients with the short bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2002;8:13-20
- 23 Kato T, Ruiz P, Thompson JF, Eskind LB, Weppeler D, Khan FA, Pinna AD, Nery JR, Tzakis AG. Intestinal and multivisceral transplantation. *World J Surg* 2002;26:226-237
- 24 Ding J, Guo CC, Li CN, Sun AH, Guo XG, Miao JY, Pan BR. Postoperative endoscopic surveillance of human living-donor small bowel transplantation. *World J Gastroenterol* 2003;9:595-598
- 25 Zhang WJ, Liu DG, Ye QF, Sha B, Zhen FJ, Guo H, Xia SS. Combined small bowel and reduced auxiliary liver transplantation: case report. *World J Gastroenterol* 2002;8:956-960
- 26 Ghanekar A, Grant D. Small bowel transplantation. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:133-137
- 27 Echizenya H, Yamashita K, Takehara M, Konishi K, Nomura M, Yanagida N, Kitagawa N, Kobayashi T, Furukawa H, Inobe M, Uede T, Todo S. Adenovirus mediated CTLA4-IgG gene therapy in orthotopic small intestinal transplantation in rats. *Transplant Proc* 2001;33:183-184
- 28 Vasilevko V, Ghochikyan A, Sadzikava N, Petrushina I, Tran M, Cohen EP, Kesslak PJ, Cribbs DH, Nicolson GL, Agadjanyan MG. Immunization with a vaccine that combines the expression of MUC1 and B7 co-stimulatory molecules prolongs the survival of mice and delays the appearance of mouse mammary tumors. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:489-498
- 29 Chung JB, Wells AD, Adler S, Jacob A, Turka LA, Monroe JG. Incomplete activation of CD4 T cells by antigen-presenting transitional immature B cells: implications for peripheral B and T cell responsiveness. *J Immunol* 2003;171:1758-1767
- 30 Elhalel MD, Huang JH, Schmidt W, Rachmilewitz J, Tykocinski ML. CTLA-4, FasL induces alloantigen-specific hyporesponsiveness. *J Immunol* 2003;170:5842-5850
- 31 Arpinati M, Terragna C, Chirumbolo G, Rizzi S, Urbini B, Re F, Tura S, Baccarani M, Rondelli D. Human CD34(+) blood cells induce T-cell unresponsiveness to specific alloantigens only under costimulatory blockade. *Exp Hematol* 2003;31:31-38
- 32 Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003;192:161-180
- 33 Mandrup-Poulsen T. Beta cell death and protection. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:32-42
- 34 Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004;10:55-63
- 35 Catalfamo M, Henkart PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol* 2003;15:522-527
- 36 D'Errico A, Corti B, Pinna AD, Altamari A, Gruppioni E, Gabusi E, Fiorentino M, Bagni A, Grigioni WF. Granzyme B and perforin as predictive markers for acute rejection in human intestinal transplantation. *Transplant Proc* 2003;35:3061-3065
- 37 Liang LW, Zhang Q, Gjertson D, Gritsch HA, Reed EF. Non-invasive immune monitoring of perforin/granzyme B in peripheral blood may predict renal allograft rejection. *Hum Immunol* 2003;64(10 Suppl):S32
- 38 Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003;3:1121-1127
- 39 Zhang SG, Wu MC, Tan JW, Chen H, Yang JM, Qian QJ. Expression of perforin and granzyme B mRNA in judgement of immunosuppressive effect in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 1999;5:217-220
- 40 Wang SF, Li GW. Early protective effect of ischemic preconditioning on small intestinal graft in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1866-1870
- 41 Ma K, Yu Y, Bu XM, Li YJ, Dai XW, Wang L, Dai Y, Zhao HY, Yang XH. Prevention of grafted liver from reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2001;7:572-574
- 42 Zhu XH, Qiu YD, Shen H, Shi MK, Ding YT. Effect of matriline on Kupffer cell activation in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *World J Gastroenterol* 2002;8:1112-1116

肝硬化大鼠门静脉高压症不同手术方式对其肝脏的影响

徐新保, 蔡景修, 董家鸿, 何振平, 韩本立, 冷希圣

徐新保, 冷希圣, 北京大学人民医院肝胆外科中心 北京市 100044
蔡景修, 董家鸿, 何振平, 韩本立, 中国人民解放军第三军医大学西南肝胆外科医院 重庆市 400038

徐新保, 男, 1968-11-06 生, 河南省延津县人, 汉族, 1989 年第三军医大学本科毕业, 1994 年第三军医大学全军肝胆外科中心硕士研究生毕业, 2000 年第三军医大学西南肝胆外科医院博士毕业。现正在北京大学人民医院肝胆外科中心从事博士后工作。主要从事肝硬化、门静脉高压症及肝癌的临床和实验研究。项目负责人: 徐新保, 100044, 北京市西直门南大街 11 号, 北京大学人民医院肝胆外科中心。x_xb@163.net

电话: 010-68792703

收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-11-13

Effects of different operations on cirrhotic portal hypertensive liver in rats

Xin-Bao Xu, Jing-Xiu Cai, Jia-Hong Dong, Zhen-Ping He, Ben-Li Han, Xi-Sheng Leng

Xin-Bao Xu, Xi-Sheng Leng, Department of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China
Jing-Xiu Cai, Jia-Hong Dong, Zhen-Ping He, Ben-Li Han, Hepatobiliary Surgery Center, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Dr. Xin-Bao Xu, Department of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China. x_xb@163.net

Received: 2003-10-10 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To evaluate respectively the effects of portaazygous disconnection (PAD), mesocaval shunt (MCS) and distal splenocaval shunt (DSCS) on the portasytemic shunting (PSS), hepatic function (HF), hepatic mitochondrial respiratory function (HMRF) and its ultrastructure, anti-oxidation ability (HAOA) and lipoperoxide (LPO), so as to provide theoretical basis to select a suitable operation.

METHODS: Using the cirrhotic portal hypertensive model induced by CCl₄/ethanol in Wistar rats, we investigated PSS, HF, HMRF and its HAOA and LPO during three weeks after MCS, DSCS and PAD.

RESULTS: After MCS, the PSS were further increased, HF, HMRF and HAOA were significantly decreased, and LPO increased. Hepatic mitochondrial ultrastructure showed severely damaged. Only a little improvement was found on the third week. After DSCS and PAD, above mentioned indexes were less influenced, and they were restored a little more quickly in DSCS groups than that in PAD groups. During the first postoperative week, the PAD group showed the highest mortality.

CONCLUSION: DSCS may be a desirable operation among the three kinds of operation.

Xu XB, Cai JX, Dong JH, He ZP, Han BL, Leng XS. Effects of different operations on cirrhotic portal hypertensive liver in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):689-693

摘要

目的: 评价门奇断流术(PAD)、肠腔分流术(MCS)、远端脾腔分流术(DSCS)对门体分流率(PSS)、肝脏功能、线粒体功能和抗氧化能力的影响, 为合理选择手术方式提供理论依据。

方法: 用CCl₄/乙醇诱导大鼠肝硬化门脉高压症模型, 观察了不同术式(MCS、DSCS、PAD)的死亡率及手术前后肝功能、门体分流率(PSS)、肝细胞线粒体功能和超微结构及肝组织 SOD 活性、巯基水平、LPO 含量的变化, 并探讨了线粒体功能与抗氧化能力的内在关系。

结果: 肝硬化门脉高压时, PSS 远高于正常, 肝细胞线粒体功能、抗氧化能力均下降; 肠腔分流(MCS)组术后肝细胞线粒体功能、抗氧化能力进一步下降且恢复慢; 选择性远端脾腔分流术(DSCS)组和门奇断流术(PAD)组的上述指标变化小且恢复较快, 其中 DSCS 组恢复更快且死亡率低。

结论: 选择性分流术(DSCS)可能是较理想的术式。

徐新保, 蔡景修, 董家鸿, 何振平, 韩本立, 冷希圣. 肝硬化大鼠门静脉高压症不同手术方式对其肝脏的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):689-693
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/689.asp>

0 引言

肝硬化时, 机体能量代谢发生异常^[1], 主要表现为脂肪供能显著增加而糖供能相应减少。能量代谢的微观机制表现为线粒体结构的异常和功能的显著下降^[2-9]: 线粒体蛋白含量下降; IV 态呼吸率升高^[5], 呼吸控制比下降, 合成 ATP 能力降低, 导致肝细胞能荷下降; 电子传递链活性下降; 氧耗量下降可达 40% 以上; 葡萄糖合成(按每个线粒体的体积计算)可减少 60% 以上。肝硬化门脉高压症也伴有肝脏抗氧化机制受损, 表现为肝组织谷胱甘肽(GSH)含量、GSH-Px (谷胱甘肽过氧化物酶)活性^[10]和超氧化物歧化酶(SOD)活性^[11]均下降。同时, 自由基损伤加重, 肝组织脂质过氧化物(LPO)明显高于正常人^[12-13]。但也有报道 LPO 变化不明显者^[14]。

目前, 外科手术仍然是治疗肝硬化门脉高压症的重要手段^[15-17]。据认为, 线粒体损害会使机体产生对胰岛素的抵抗^[18]。肝脏线粒体结构和功能的正常有赖于门脉有效血流量及门脉血中的胰岛素等肝营养因子^[19-21]。因为胰岛素等营养因子能够部分纠正硬化肝脏异常的基因表达^[22], 改善营养物质的吸收^[23-24], 部分减轻肝硬化的程度^[25]。已知门体分流能引起和加重能量物质代谢障碍^[26-30], 这可能与肝脏线粒体结构和功能遭到进一

步破坏有一定关系. 我们研究大鼠肝硬化门脉高压症及不同手术方式对其门体分流率、肝脏功能、线粒体功能和抗氧化能力的影响, 并探讨了肝脏线粒体功能与抗氧化能力之间的内在联系, 旨在从多方面综合评价各种手术方式的治疗价值, 为临床上合理选择手术方式提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 采用CC1₄/乙醇诱导Wistar大鼠形成肝硬化门脉高压模型^[31]. 模型制成后正常饲养3 wk, 再分为3组, 在腹腔麻醉下(10 g/L戊巴比妥钠30 mg/kg), 分别行肠腔侧侧分流术(MCS)、选择性远端脾腔分流术(DSCS)^[32]和门奇断流术(PAD). 手术完成前后各测门压力1次. 每组观察术前及术后1、2、3 wk共3个时相点, 每组每个时相点保证8-10只鼠.

1.2 方法 测谷丙转氨酶(ALT)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(G)和白/球比值(A/G); 肝脏线粒体呼吸功能检测 II 态呼吸速率(S_3)和 IV 态呼吸速率(S_4), 计算呼吸控制率($RCR = S_3/S_4$)和磷氧比(P/O)^[33]; 肝组织ATP含量采用荧光素酶法测定^[34]; 门体分流率(PSS)测定采用放射微球法^[35]; 肝组织总巯基(T-SH)、非蛋白巯基(NP-SH)和蛋白巯基(P-SH)采用光谱法测定^[36]; 肝组织超氧化物歧化酶(SOD)采用光谱法测定^[37]; 肝组织脂质过氧化物(LPO)含量采用荧光分光光度计法测定^[38]; 肝组织学检查: 光镜及透射电镜检查.

统计学处理 以mean±SD表示. 进行方差分析检验、直线相关与回归分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性界限.

2 结果

模型制成后见肝脏缩小呈结节状. 光镜下见典型假小叶结构. 电镜下见狄氏间隙有大量成束排列的胶原纤维; 部分线粒体嵴紊乱, 但结构基本完整; 未见或极少有糖原颗粒. 自由门脉压力(FPP): 硬化组(CL)显著高于正常组(NL)(1.45 ± 0.08 kPa vs 0.77 ± 0.04 kPa, $P < 0.01$). MCS组术后超微结构改变明显, 可见肝脏部分线粒体肿胀、嵴排列紊乱、断裂或消失、空泡化甚至崩解、髓鞘样结构形成, 个别核染色质边集、核膜溶解, DSCS组、PAD组术后肝组织超微结构与CL组相比较变化不明显.

2.1 肝代谢指标 肝硬化门脉高压时, PSS远高于正常, 肝细胞线粒体功能和抗氧化能力下降; 肠腔分流(MCS)术后肝细胞线粒体功能、抗氧化能力进一步下降且恢复慢; 选择性远端脾腔分流术(DSCS)组和门奇断流术(PAD)组的上述指标变化小且恢复较快, 其中DSCS组恢复更快且死亡率低. 详见表1-7.

表1 SD大鼠肝硬化手术后FPP的变化($n=10$, mean±SD, kPa)

手术	MCS	DSCS	PAD
前	1.46 ± 0.07	1.45 ± 0.05	1.45 ± 0.06
后	1.10 ± 0.03^b	1.41 ± 0.04	1.43 ± 0.05

^b $P < 0.01$, vs 术前.

表2 SD大鼠肝硬化手术死亡情况($n=10$, %)

术式	<i>n</i>	术中		1 wk		2 wk		3 wk		1-3 wk		合计	
MCS	58	5	8.6	2	3.4	1	1.7	2	3.4	5	8.6	10	17.2
DSCS	52	1	1.9 ^a	1	1.9	1	1.9	0	0.0	2	3.8	3	5.8 ^a
PAD	72	0	0.0 ^a	17	23.6 ^{bd}	4	5.6	2	2.8	23	31.9 ^{bd}	23	31.9 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs MCS; ^d $P < 0.01$ vs DSCS. *n* 代表手术例数.

表3 SD鼠肝硬化手术后PSS的变化($n=8$, %)

术式	术前		术后(wk)		
	NL	CL	1	2	3
MCS			75.0 ± 7.6^b	81.8 ± 7.0^b	86.7 ± 5.9^{bc}
DSCS	0.9 ± 0.3	16.3 ± 3.5	10.2 ± 2.9^{ad}	11.6 ± 2.7^d	15.1 ± 3.3^{dc}
PAD			9.3 ± 2.7^{ad}	10.0 ± 2.8^d	13.9 ± 3.1^{dc}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs CL; ^d $P < 0.01$ vs MCS; ^c $P < 0.05$ vs 1 wk. *n* 代表大鼠数目.

表4 SD大鼠肝硬化手术后肝功能的变化($n=10$)

分组	ALT(IU/L)	TP(g/L)	ALB(g/l)	G (g/L)	A/G
NL	12 ± 6^b	72.6 ± 3.3^a	35.6 ± 2.5^b	37.0 ± 2.5	0.97 ± 0.13^b
CL	30 ± 7	67.0 ± 2.4	26.7 ± 2.7	40.3 ± 2.7	0.67 ± 0.11
MCS ₁	53 ± 9^b	59.2 ± 4.2^b	20.5 ± 3.3^b	38.7 ± 3.3	0.53 ± 0.10
DSCS ₁	31 ± 8^d	63.3 ± 3.4	24.2 ± 2.7	39.2 ± 3.1	0.62 ± 0.10
PAD ₁	66 ± 14^{bf}	58.1 ± 3.6^{be}	22.0 ± 2.3^a	36.1 ± 2.8	0.61 ± 0.09
MCS ₂	57 ± 10^b	56.1 ± 5.0^b	18.5 ± 2.6^b	37.6 ± 4.7	0.50 ± 0.10^a
DSCS ₂	31 ± 7^d	64.2 ± 3.6^d	25.0 ± 2.2^d	39.2 ± 3.2	0.64 ± 0.09
PAD ₂	48 ± 7^{bf}	60.4 ± 2.9^a	23.3 ± 2.5^d	37.1 ± 3.1	0.63 ± 0.10
MCS ₃	61 ± 11^b	53.7 ± 5.0^b	16.9 ± 1.8^b	36.8 ± 4.8	0.47 ± 0.09^a
DSCS ₃	31 ± 7^d	64.8 ± 3.2^d	25.5 ± 2.5^d	39.3 ± 3.4	0.66 ± 0.10^d
PAD ₃	31 ± 7^d	64.2 ± 3.5^d	25.3 ± 2.7^d	38.9 ± 3.1	0.66 ± 0.10^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs CL; ^c $P < 0.01$ vs MCS; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs DSCS. *n* 代表大鼠数目.

表5 SD大鼠肝硬化手术后肝脏线粒体功能的变化($n=8$)

分组	S ₃		S ₄		RCR	P/O	ATP(μmol/g)
	nmolO ₂ /min/mg						
NL	125.03 ± 13.48	30.29 ± 2.36 ^b	4.12 ± 0.23 ^b		1.74 ± 0.08 ^b	2.25 ± 0.15 ^b	
CL	115.05 ± 3.82	38.66 ± 2.78	2.99 ± 0.25		1.57 ± 0.06	1.45 ± 0.29	
MCS ₁	106.05 ± 13.77	55.00 ± 4.98 ^b	1.93 ± 0.23 ^b		1.25 ± 0.05 ^b	0.38 ± 0.10 ^b	
DSCS ₁	118.65 ± 0.39	41.34 ± 3.46 ^d	2.88 ± 0.20 ^d		1.53 ± 0.05 ^d	0.95 ± 0.08 ^{bd}	
PAD ₁	115.15 ± 4.70	46.66 ± 3.93 ^{bd}	2.48 ± 0.19 ^{bed}		1.34 ± 0.11 ^{be}	0.93 ± 0.09 ^{bd}	
MCS ₂	111.86 ± 4.76	49.26 ± 1.72 ^b	2.23 ± 0.18 ^b		1.33 ± 0.10 ^b	0.68 ± 0.08 ^b	
DSCS ₂	113.08 ± 6.27	38.56 ± 1.67 ^d	2.94 ± 0.25 ^d		1.56 ± 0.04 ^d	1.38 ± 0.24 ^d	
PAD ₂	113.94 ± 4.93	42.26 ± 3.37 ^d	2.73 ± 0.23 ^d		1.51 ± 0.08 ^d	1.35 ± 0.23 ^d	
MCS ₃	113.14 ± 6.09	44.58 ± 1.99 ^b	2.54 ± 0.16 ^b		1.36 ± 0.06 ^b	0.92 ± 0.08 ^b	
DSCS ₃	133.23 ± 7.53	38.48 ± 1.47 ^d	2.95 ± 0.24 ^c		1.56 ± 0.05 ^d	1.43 ± 0.29 ^d	
PAD ₃	111.53 ± 7.34	38.50 ± 2.10 ^d	2.91 ± 0.26 ^c		1.57 ± 0.15 ^d	1.42 ± 0.28 ^d	

^b $P < 0.01$ vs CL; ^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs MCS; ^e $P < 0.05$ vs DSCS. *n* 代表大鼠数目.

表6 SD 大鼠肝硬化手术后肝组织巯基含量的变化($n=8$, mean \pm SD, $\mu\text{mol/g}$)

组别	T-SH	NP-SH	P-SH
NL	28.20 \pm 2.25 ^b	8.29 \pm 0.69 ^a	19.92 \pm 2.67 ^a
CL	23.88 \pm 3.71	6.43 \pm 0.92	17.42 \pm 2.45
MCS ₁	13.24 \pm 1.51 ^b	4.84 \pm 1.26 ^a	8.40 \pm 1.44 ^b
DSCS ₁	21.14 \pm 2.14 ^{bd}	6.56 \pm 0.40 ^d	14.58 \pm 2.23 ^{bd}
PAD ₁	17.96 \pm 1.84 ^{bdf}	4.31 \pm 0.85 ^{bf}	13.65 \pm 1.59 ^{bd}
MCS ₂	17.50 \pm 1.80 ^b	5.26 \pm 1.65	12.24 \pm 2.06 ^b
DSCS ₂	23.40 \pm 2.69 ^d	5.95 \pm 1.69	17.46 \pm 1.43 ^d
PAD ₂	20.82 \pm 2.89 ^{bde}	6.73 \pm 0.74	14.08 \pm 1.08 ^{bf}
MCS ₃	17.65 \pm 2.98 ^b	4.80 \pm 1.23 ^a	12.84 \pm 1.75 ^b
DSCS ₃	23.63 \pm 2.59 ^d	6.34 \pm 1.20	17.29 \pm 1.11 ^d
PAD ₃	21.35 \pm 2.07 ^{ade}	6.45 \pm 0.97 ^c	14.90 \pm 1.39 ^{be}

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs CL; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs MCS; ^eP < 0.05, ^fP < 0.01 vs DSCS. *n* 代表大鼠数目。

2.2 手术组综合相关分析 将所有手术治疗的大鼠作为一个总体, 对上述指标进行分析, 结果发现: RCR 与 ATP、T-SH、SOD 均呈显著正相关, *r* 分别为 0.76、0.81、0.72, *P* 值均为 0.0 000; ATP 与 T-SH、SOD 呈显著正相关, *r* 分别为 0.77、0.77, *P* 值均为 0.0 000; T-SH 与 SOD 呈显著正相关(*r* = 0.80, *P* = 0.0 000); LPO 与 RCR、ATP、T-SH 及 SOD 均呈显著负相关, *r* 分别为 -0.53、-0.58、-0.67 及 -0.69, *P* 值均为 0.0 000。

3 讨论

据文献报道, CCl₄ 诱导的肝硬化门脉高压症大鼠具备了人类肝硬化的绝大多数病理特征, 其能量代谢特点和抗氧化能力变化也类似于人类肝硬化^[4-6, 14, 18-21]。因此, 本实验采用该模型是合理的。

目前, 晚期肝硬化门脉高压症的外科治疗主要有断流术、分流术、TIPS (transjugular intrahepatic portosystemic shunt) 和肝移植术。在我国, 断流术和门体分流术依然是最主要的外科手术方式。因此, 我们对常用的三种手术方式进行了比较全面的实验研究。PAD 组术后死亡率显著高于 MCS 组和 DSCS 组, MCS 组又显著高于 DSCS

组。PAD 组术后 1 wk 内死亡较多主要与手术破坏了胃的神经支配和血供, 导致急性胃缺血、胃潴留、胃扩张和胃坏死有关, 当然与脾切除后免疫功能下降所致的感染也有关系^[39]。MCS 组死亡原因主要是门脉血流丧失过多所致的肝衰^[26-30]。DSCS 组死亡率最低, 这与他有效地保存了门脉血流量^[32]和脾脏免疫功能有关。各手术组术后 3 wk 时的 PSS 均显著高于 1wk 时的 PSS, 这与新的侧枝循环形成及/吻合口扩大和断流(含 DSCS 时的脾胰断流)不彻底^[40]有关。

肝硬化本身就可引起线粒体结构和功能的显著下降^[1-2, 4-8]。肝硬化门脉高压症时所伴发的自发性门体分流减少了肝脏有效血流量, 使肝脏对能量物质吸收障碍, 加重线粒体功能障碍^[6, 9, 13, 21, 41-43], 因为门脉血中存在来自肠道和胰腺的激素及营养因子。正常肝脏至少要接纳 20% 的从胰腺回流来的血液才能维持肝线粒体氧化磷酸化的最低需要^[44]。门静脉血流减少或外科性门体分流可导致正常肝糖原含量、cAMP 和细胞色素 P₄₅₀ 含量降低, 引起线粒体功能下降^[21, 45-47], 引起或加重肝性脑病^[48]。MCS 组术后肝脏线粒体功能、ATP 含量、巯基水平及 SOD 活性基本上均进一步显著下降, 肝功能恶化, LPO 含量显著升高, 到术后 3 wk 上述指标仍未恢复。而 DSCS 组、PAD 组的上述指标变化较小, 至术后 2 wk 或 3 wk 大多恢复; 其中 DSCS 组恢复更快些。各组的线粒体功能变化与其超微结构改变基本一致。各手术组肝脏线粒体功能与肝组织 ATP 含量、SOD 活性及巯基含量之间均呈显著正相关, 与 LPO 含量呈显著负相关。MCS 组术后发生的上述变化与其向肝门脉血流的大量丧失有关。MCS 组的 PSS 于术后陡然增加了近 5 倍, 致使肝脏有效血流量锐减, 硬变肝脏处于低灌注、甚至缺氧状态, 能量基质吸收减少, 进一步损害了其线粒体结构和功能; 同时激发肝脏氧自由基(OFR)生成增加, LPO 升高; 由于合成减少和消耗增加, SOD 活性和巯基水平下降。由于上述变化, 细胞膜性结构进一步受损, 不能维持离子的正常运转, 导致细胞外 Na⁺、Ca²⁺ 等离子大量流入细胞内, 线粒体内 Ca²⁺ 也随之增加。Ca²⁺ 的超负荷引起线粒体肿胀, 以至于空化、崩解或形成髓鞘样结构。MCS 术后肠系膜静脉系

表7 SD 大鼠肝硬化手术后肝组织 SOD 活性和 LPO 含量的变化(u/mg) ($n=8$, mean \pm SD)

指标	术式	术前		术后(wk)		
		NL	CL	1	2	3
SOD(u/mg)	MCS			66.45 \pm 26.74 ^b	124.58 \pm 16.54 ^b	161.56 \pm 8.77 ^b
	DSCS	238.16 \pm 16.94 ^b	193.59 \pm 13.80	135.06 \pm 11.48 ^{bd}	163.89 \pm 8.13 ^{bd}	191.22 \pm 11.54 ^d
	PAD			135.71 \pm 12.28 ^{bd}	162.51 \pm 8.45 ^{bd}	191.70 \pm 10.93 ^d
LPO($\mu\text{mol/g}$)	MCS			0.39 \pm 1.45 ^b	5.78 \pm 0.31 ^b	4.44 \pm 0.35 ^b
	DSCS	2.36 \pm 0.29 ^b	3.35 \pm 0.46	4.46 \pm 0.36 ^{bd}	3.44 \pm 0.42 ^d	3.37 \pm 0.43 ^d
	PAD			4.54 \pm 0.39 ^{bd}	3.47 \pm 0.39 ^d	3.40 \pm 0.42 ^d

^bP < 0.01 vs CL; ^dP < 0.01 vs MCS. *n* 代表大鼠数目。

统压力下降,可引起一些毒素吸收增加^[49],加上肝脏解毒功能下降,这些毒素也可不同程度地破坏线粒体功能。MCS 术后的高胆酸血症也可损害线粒体功能。

DSCS 组和 PAD 组术后维护了向肝门脉血流灌注^[28],因此,其线粒体功能和抗氧化能力受到了较小的影响。DSRS 与其他非选择性分流相比,能够较好地保护肝脏功能^[50]。PAD 组由于切除了脾脏,硬变肝脏承担了更多的过滤、解毒及免疫等功能,因此,抗氧化能力恢复较 SDCS 组缓慢。MCS 组术后向肝门脉血流灌注锐减,肝功能、肝脏线粒体功能及抗氧化能力进步一下降,术后 3 wk 各指标仍未恢复。DSCS 组及 PAD 组的上述指标变化较小且恢复较快,其中 DSCS 组恢复更快些。PAD 组术后近期死亡率高。上述分析说明 DSCS 可能是较理想的术式,也说明选择性分流较好地维护了硬变肝脏的线粒体功能和抗氧化能力。

4 参考文献

- Tajika M, Kato M, Mohri H, Miwa Y, Kato T, Ohnishi H, Moriaki H. Prognostic value of energy metabolism in patients with viral liver cirrhosis. *Nutrition* 2002;18:229-234
- Perseghin G, Mazzaferro V, Benedini S, Pulvirenti A, Coppa J, Regalia E, Luzi L. Resting energy expenditure in diabetic and nondiabetic patients with liver cirrhosis: relation with insulin sensitivity and effect of liver transplantation and immunosuppressive therapy. *Am J Clin Nutr* 2002;76:541-548
- Poon RT, Fan ST. Clinical implications of altered energy metabolism in patients with cirrhosis. *Nutrition* 2002;18:283-284
- Cheng XD, Jiang XC, Liu YB, Peng CH, Xu B, Peng SY. Effect of ischemic preconditioning on P-selectin expression in hepatocytes of rats with cirrhotic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003;9:2289-2292
- Lei DX, Peng CH, Peng SY, Jiang XC, Wu YL, Shen HW. Safe upper limit of intermittent hepatic inflow occlusion for liver resection in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:713-717
- Mann DV, Lam WW, Hjelm NM, So NM, Yeung DK, Metreweli C, Lau WY. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. *Hepatology* 2001;34:557-565
- Froome PR, Ghabrial H, Morgan DJ, Angus PW. The effect of oxygen supplementation on the arterial ketone body ratio in human cirrhosis. *Digestion* 2002;66:257-261
- Spahr L, Negro F, Leandro G, Marinescu O, Goodman KJ, Rubbia-Brandt L, Jordan M, Hadengue A. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the ¹³C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med Sci Monit* 2003;9:CR6-11
- Tappy L, Schneider P, Chiolerio R, Bettschart V, Gillet M. Effects of a glucose meal on energy metabolism in patients with cirrhosis before and after liver transplantation. *Arch Surg* 2001;136:80-84
- Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Med Invest* 2002;49:172-181
- Guo MZ, Li XS, Shen DM, Guan XQ, Xu HR, Gao J. Effect of Rhein on the development of hepatic fibrosis in rats. Article in Chinese. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003;11:26-29
- Fiorelli G, De Feo TM, Duca L, Tavazzi D, Nava I, Fargion S, Cappellini MD. Red blood cell antioxidant and iron status in alcoholic and nonalcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 2002;32 (Suppl 1):21-27
- Liu DY, Peng ZH, Qiu GQ, Zhou CZ. Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1859-1862
- Gonzalez-Reimers E, Lopez-Lirola A, Olivera RM, Santolaria-Fernandez F, Galindo-Martin L, Abreu-Gonzalez P, Sanchez-Sanchez JJ, Martinez-Riera A. Effects of protein deficiency on liver trace elements and antioxidant activity in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Biol Trace Elem Res* 2003;93:127-140
- Lata J, Hulek P, Vanasek T. Management of acute variceal bleeding. *Dig Dis* 2003;21:6-15
- Patch D, Dagher L. Acute variceal bleeding: general management. *World J Gastroenterol* 2001;7:466-475
- 冷希圣. 门静脉高压症发病机制的研究现状. *世界华人消化杂志* 1999;7:369-371
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003;300:1140-1142
- Vyzantiadis T, Theodoridou S, Giouleme O, Harsoulis P, Evgenidis N, Vyzantiadis A. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:814-816
- Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1287-1291
- Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol* 2003;38:59-66
- Mirpuri E, Garcia-Trevijano ER, Castilla-Cortazar I, Berasain C, Quiroga J, Rodriguez-Ortigosa C, Mato JM, Prieto J, Avila MA. Altered liver gene expression in CCl₄-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:242-252
- Perez R, Castilla-Cortazar I, Nunez M, Prado A, Mirpuri E, Garcia M, Gonzalez Baron S, Picardi A. IGF-I does not improve fat malabsorption in cirrhotic rats. *J Physiol Biochem* 2001;57:59-60
- Fan ZR, Yang DH, Cui J, Qin HR, Huang CC. Expression of insulin like growth factor II and its receptor in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2001;7:285-288
- Muguerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S, Prieto J. Antifibrogenic effect in vivo of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta* 2001;1536:185-195
- Chandrasekhar R, Murase GN, Subbotin VM, Uemura T, Nalesnik M, Demetris AJ, Fung JJ, Starzl TE. Portacaval shunt causes apoptosis and liver atrophy in rats despite increases in endogenous levels of major hepatic growth factors. *J Hepatol* 2002;37:340-348
- 张曙光, 阮长乐, 于振海, 李光新, 李荔, 刘爱莲. 门静脉高压症的不同手术方式对门静脉系统血流动力学的影响. *中华普通外科杂志* 2002;17:143-145
- Chalasani N, Gorski JC, Patel NH, Hall SD, Galinsky RE. Hepatic and intestinal cytochrome P450 3A activity in cirrhosis: effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2001;34:1103-1108
- Geier A, Gartung C, Dietrich CG, Wasmuth HE, Reinartz P, Matern S. Side effects of budesonide in liver cirrhosis due to chronic autoimmune hepatitis: Influence of hepatic metabolism versus portosystemic shunts on a patient complicated with HCC. *World J Gastroenterol* 2003;9:2681-2685
- 张雷达, 董家鸿, 李昆. 门静脉转流下缺血对阻塞性黄疸大鼠肝脏能量代谢的影响. *第三军医大学学报* 2002;24:93-95
- Wu XL, Zeng WZ, Wang PL, Lei CT, Jiang MD, Chen XB, Zhang Y, Xu H, Wang Z. Effect of compound rhodiola sachalinensis A Bor on CCl₄-induced liver fibrosis in rats and its probable molecular mechanisms. *World J Gastroenterol*

- 2003;9:1559-1562
- 32 董家鸿, 刘吉奎, 蔡景修. 选择性远端脾腔分流术的评价. 中国实用外科杂志 2002;22:212-214
 - 33 Brandao ML, Roselino JE, Piccinato CE, Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003;110:235-240
 - 34 Cheng XD, Jiang XC, Liu YB, Peng CH, Xu B, Peng SY. Effect of ischemic preconditioning on P-selectin expression in hepatocytes of rats with cirrhotic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003;9:2289-2292
 - 35 Matheson PJ, Hurt RT, Mittel OF, Wilson MA, Spain DA, Garrison RN. Immune-enhancing enteral diet increases blood flow and proinflammatory cytokines in the rat ileum. *J Surg Res* 2003;110:360-370
 - 36 Singh K, Ahluwalia P. Studies on the effect of monosodium glutamate [MSG] administration on some antioxidant enzymes in the arterial tissue of adult male mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003;49:145-148
 - 37 Du WD, Yuan ZR, Sun J, Tang JX, Cheng AQ, Shen DM, Huang CJ, Song XH, Yu XF, Zheng SB. Therapeutic efficacy of high-dose vitamin C on acute pancreatitis and its potential mechanisms. *World J Gastroenterol* 2003;9:2565-2569
 - 38 Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2266-2269
 - 39 Zhang H, Chen J, Kaiser GM, Mapudengo O, Zhang J, Exton MS, Song E. The value of partial splenic autotransplantation in patients with portal hypertension: a prospective randomized study. *Arch Surg* 2002;137:89-93
 - 40 Mercado MA, Orozco H, Ramirez-Cisneros FJ, Hinojosa CA, Plata JJ, Alvarez-Tostado J. Diminished morbidity and mortality in portal hypertension surgery: relocation in the therapeutic armamentarium. *J Gastrointest Surg* 2001;5:499-502
 - 41 Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol* 2003;38:59-66
 - 42 Taylor RM, Bjarnason I, Cheeseman P, Davenport M, Baker AJ, Mieli-Vergani G, Dhawan A. Intestinal permeability and absorptive capacity in children with portal hypertension. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:807-811
 - 43 Wheeler MD, Katuna M, Smutney OM, Froh M, Dikalova A, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther* 2001;12:2167-2177
 - 44 Yamaoka Y, Sato M, Kimura K, Takasan H, Ozawa K. Role of portal venous blood supply from the pancreas in maintaining hepatic functional reserve. Appraisal of Warren's shunt operation. *Arch Surg* 1978;113:981-985
 - 45 Dasarathy S, Mullen KD, Conjeevaram HS, Kaminsky-Russ K, Wills LA, McCullough AJ. Preservation of portal pressure improves growth and metabolic profile in the male portacaval-shunted rat. *Dig Dis Sci* 2002;47:1936-1942
 - 46 Iwase M, Ogata H, Tashiro K, Tsuji H, Yoshinari M. Portal blood flow and glucose tolerance or peripheral insulin and glucagon concentrations in patients with liver cirrhosis. *Pancreas* 2002;24:109-110
 - 47 Yang LQ, Li SJ, Cao YF, Man XB, Yu WF, Wang HY, Wu MC. Different alterations of cytochrome P450 3A4 isoform and its gene expression in livers of patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:359-363
 - 48 Song G, Dhodda VK, Blei AT, Dempsey RJ, Rao VL. GeneChip analysis shows altered mRNA expression of transcripts of neurotransmitter and signal transduction pathways in the cerebral cortex of portacaval shunted rats. *J Neurosci Res* 2002;68:730-737
 - 49 Schepke M, Sauerbruch T. Transjugular portosystemic stent shunt in treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 2001;7:170-174
 - 50 Wong LL, Lorenzo C, Limm WM, Wong LM. Splenorenal shunt: an ideal procedure in the Pacific. *Arch Surg* 2002;137:1125-1129

World Journal of Gastroenterology 荣誉

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊, 2001 年入选中国期刊方阵“双百”期刊. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助(项目批准号: 30224801), 资助期限 2 年, 资助强度为每年 8 万元.

丹参注射液对胃黏膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性和胃黏膜屏障功能的影响

张超, 刘占奎, 余佩武

张超, 刘占奎, 余佩武, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科
重庆市 400038

张超, 男, 1956-04-02 生, 重庆市人, 汉族, 1982 年泸州医学院本科毕业, 1985 年第三军医大学硕士研究生毕业, 1994 年第三军医大学博士研究生毕业, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃肠外科疾病的研究。

项目负责人: 张超, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科. meizhang@yahoo.com

电话: 023-65399044

收稿日期: 2003-06-17 接受日期: 2003-08-18

Effect of Dansen on gastric mucosal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and gastric transmucosal potential difference during severe intraperitoneal infection in rats

Chao Zhang, Zhan-Kui Liu, Pei-Wu Yu

Chao Zhang, Zhan-Kui Liu, Pei-Wu Yu, Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Dr. Chao Zhang, Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. meizhang@yahoo.com

Received: 2003-06-17 Accepted: 2003-08-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of Dansen on gastric mucosal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and gastric transmucosal potential difference during severe intraperitoneal infection in rats.

METHODS: The intraperitoneal infection rat model was established by cecal ligation and puncture (CLP). Assay of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in gastric mucosal tissue was conducted by biochemical method. The electric-physiological recorder was used to measure gastric mucosal potential difference.

RESULTS: The activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ was markedly decreased in infected group at 3h after perforation, compared with the control group ($P = 0.0271 < 0.05$). There was a minimum of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity at 12h post-perforation in infected group ($P = 0.0062 < 0.01$), only about 48.5% matched to the control group. Gastric transmucosal potential difference (GTPD) of infected group decreased significantly as compared with the control group ($P = 0.0253 < 0.05$) at 6h after perforation, and rapidly dropped to the lowest at 12 h post-perforation ($P = 0.0025 < 0.01$). At 12 h and 24 h after perforation, GTPD was lower in infected group than that not only in the control group ($P = 0.0293 < 0.05$).

CONCLUSION: The reduce of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity may play an important role in gastric mucosal barrier damage following severe abdominal infection induced by CLP, and

the application of Dansen in earlier period can prevent the occurrence of stress ulcer.

Zhang C, Liu ZK, Yu PW. Effect of Dansen on gastric mucosal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and gastric transmucosal potential difference during severe intraperitoneal infection in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):694-696

摘要

目的: 探讨丹参注射液对严重腹腔感染状态下大鼠胃黏膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性变化和电位差的影响。

方法: 利用大鼠盲肠结扎穿孔造成腹腔严重感染动物模型, 应用生化法检测穿孔前和穿孔后 3、6、12、24、48 h 各时相大鼠胃黏膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性。应用电生理记录仪检测穿孔前和穿孔后 3、6、12、24、48 h 胃黏膜电位差(GTPD)变化。

结果: 盲肠穿孔后 3h $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性显著降低($P = 0.0271 < 0.05$), 12 h 降至最低($P = 0.0062 < 0.01$), 仅为对照组的 48.5%, 48 h 仍未恢复正常; 注射丹参组从 12h 开始 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性与感染组显示出差别($P = 0.0253 < 0.05$)。GTPD 穿孔后 3 h 即有下降, 6 h 显著下降($P = 0.0352 < 0.05$), 12 h 下降至最低($P = 0.0025 < 0.01$); 丹参组从 12 h 开始胃黏膜电位差与感染组显示出差别($P = 0.0293 < 0.05$)。

结论: 严重腹腔感染状态下胃黏膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性降低可能是引起胃黏膜屏障功能受损的主要原因。早期应用丹参对有效地预防应激性溃疡的发生有重要的临床意义。

张超, 刘占奎, 余佩武. 丹参注射液对胃黏膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性和胃黏膜屏障功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):694-696

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/694.asp>

0 引言

应激性溃疡是感染、创伤、休克等危重病症的常见并发症, 死亡率高达 10-20%, 尽管应激性溃疡的诊断和治疗已取得可喜进步, 但对其发生机制尚未完全阐明, 严重影响了救治率的进一步提高。目前的研究认为致损因子与保护因子间的动态平衡失调导致胃黏膜屏障功能受损可能是应激性溃疡发生的主要原因之一^[1-11]。正常情况下胃腔内 H^+ 浓度比胃黏膜内 H^+ 浓度高出 100-300 万倍, 胃黏膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性对于维持胃腔与黏膜内巨大的离子梯度是必不可少的, 是胃黏膜屏障功能

的重要保护因素. 近年来, 复方丹参注射液治疗应激性胃溃疡已有报道, 但其机制仍不清楚, 我们利用大鼠盲肠结扎穿孔动物模型, 观察了严重腹腔感染时丹参对大鼠胃黏膜 Na⁺-K⁺-ATPase 活性的影响, 为防治应激性胃黏膜损害提供客观的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康 wistar ♂ 大白鼠 180 只 (第三军医大学动物中心), 质量 220 ± 30 g, 标准饲料, 室温下单笼喂养 1 wk. 10 g/L 戊巴比妥钠腹腔内注入, 剂量为 30 mg/kg, 麻醉后腹部电推剃毛, 碘伏常规消毒, 中下腹正中切口入腹, 长约 2-3 cm, 提出并游离盲肠, 注意保护肠系膜血管, 找到盲肠与回结肠交界处, 用 4 号丝线环行结扎盲肠, 保持回结肠通畅. 在盲肠中部用 9 号针头贯穿后放回腹腔, 关腹. 术后皮下注射生理盐水, 以补充术中丧失的体液, 剂量为 50 ml/kg. 此后每隔 6 h 按上述剂量皮下注射生理盐水 1 次. 复方丹参注射液 (上海第九制药厂生产).

1.2 方法 随机将动物分为三组, 每组 60 只, 每个时相点 10 只动物: (1) 感染组按上述方法制作; (2) 丹参组按上述方法制作后, 在尾静脉内注射给药, 剂量为 0.02 ml/kg, 给药时间为穿孔前 30 min. (3) 对照组: 动物除不行盲肠结扎穿孔外, 其余处理与感染组相同. 分别于穿孔前、穿孔后 3、6、12、24、48 h 进行观察. 胃黏膜 Na⁺-K⁺-ATPase 活性测定, 按 Mozsik et al [Am J Dig Dis 1976;21:649-654] 的方法稍加修改. 取全胃沿大弯侧剪开, 用冷冻冲液 (内含 NaCl 130 mmol/L, EDTA-Na₂ 5 mmol/L, 咪唑 30 mmol/L, 调整 pH 至 7.5) 冲洗黏膜后, 刮取胃黏膜, 称重、剪碎, 加 9 倍体积的冷冻匀浆液 (冲洗液 + 2.4 mmol/L 脱氧胆酸钠) 作匀浆, 匀浆液 4 °C 离心 (3 000 g) 15 min, 取上清液再次 4 °C 高速离心 (20 000 g) 20 min, 弃上清, 沉淀物

用冷冻匀浆液洗涤两次, -20 °C 冰箱保存. 酶活力测定, 反应总体积 450 μl, pH 7.4. 分设 A、B 两管, A 管含 100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L 咪唑, 5.6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L ATP-Na₂; B 管加 1 mmol/L 哇巴因, 不加 KCl, 增加 NaCl 至 120 mmol/L, 其余同 A 管. 分别向 A、B 两管中加入酶制备样品 100 μl, 立即置于 37 °C 恒温水浴 15 min, 再向各管加入 150 g/L 三氯醋酸 100 μl, 终止反应; 4 °C 离心 (3 000 g) 15 min, 取上清 0.4 ml 加入定磷试剂, 45 °C 温育 15 min, 660 nm 波长下测 A (吸光值) 值. 根据 A、B 两管 A 值之差计算 Na⁺-K⁺-ATPase 活力. 在紫外分光光度计上用 280 nm 和 260 nm 波长测定样品中蛋白质含量. 酶活力单位: μmol pi/min/mg/pro. GTPD 的测定: 动物麻醉后开腹, 剪开胃体前壁约 0.5 cm, 暴露胃黏膜, 将两只自制的 AgCl₂ 电极连接于 PHS-10A 数字式酸度-离子计上, 测定电极轻轻接触胃黏膜, 参比电极置于腹部切口皮下, 稳定后记录电位值, 单位为 mV, 以绝对值表示.

统计学处理 所有计量资料均用 mean ± SD 表示, 用 spss 10.0 统计软件包进行 t 检验及方差分析

2 结果

2.1 胃黏膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性穿孔后 3 h 即发现显著下降 (P = 0.0 271 < 0.05), 12 h 降至最低, 仅为对照组的 48.5%, 48 h 仍未恢复正常. 注射丹参组从 12 h 开始 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性与感染组显示出差别 (P = 0.0 253 < 0.05). 见表 1.

2.2 黏膜电位差穿孔后 3h 即有下降, 6 h 显著下降 (P = 0.0 352 < 0.05), 12 h 下降至最低 (P = 0.0 025 < 0.01). 丹参组从 12 h 开始胃黏膜电位差与感染组显示出差别 (P = 0.0 293 < 0.05). 见表 2.

表 1 胃黏膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性变化 (μmol pi/min/mg/pro, mean ± SD, n=60)

分组	穿孔前	t (穿孔后)/h				
		3	6	12	24	48
感染组	152.9 ± 13.8	113.2 ± 12.5 ^a	106.8 ± 12.3 ^a	92.3 ± 9.8 ^b	95.5 ± 11.3 ^b	127.6 ± 12.7
丹参组	153.7 ± 13.3	115.7 ± 13.2 ^a	109.5 ± 13.1 ^a	132.9 ± 7.1 ^c	138.4 ± 11.9 ^c	140.3 ± 10.1
对照组	154.2 ± 13.5	152.8 ± 11.6	151.5 ± 13.2	152.8 ± 12.3	155.1 ± 13.1	153.2 ± 12.4

感染组 ^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照组; 丹参组 ^cP < 0.05 vs 对照组.

表 2 胃黏膜电位差变化 (mV, mean ± SD, n=60)

分组	穿孔前	t (穿孔后)/h				
		3	6	12	24	48
感染组	22.8 ± 1.4	20.0 ± 1.6	15.2 ± 1.4 ^a	11.5 ± 1.4 ^b	16.9 ± 1.4 ^a	18.8 ± 1.5
丹参组	21.9 ± 1.5	22.7 ± 1.5	16.5 ± 1.6 ^a	20.4 ± 1.4 ^c	21.1 ± 1.2 ^c	21.6 ± 1.4
对照组	22.8 ± 1.5	23.6 ± 1.6	23.1 ± 1.6	23.4 ± 1.5	22.6 ± 1.6	22.3 ± 1.4

感染组 ^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照组; 丹参组 ^cP < 0.05 vs 对照组.

3 讨论

GTPD的形成是由于黏膜对 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等离子流的转运而造成的离子梯度所致,其大小取决于各种离子流在黏膜两侧的梯度差及黏膜组织结构所具有的电阻抗。正常情况下,胃腔内的 H^+ 浓度比黏膜内高100-300万倍,当胃黏膜屏障功能受损时, H^+ 顺着巨大的离子梯度大量回渗到黏膜内, Na^+ 则从黏膜内流到胃腔,造成离子梯度发生变化,导致GTPD降低。胃黏膜对 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等离子的跨膜转运是一个主动的耗能过程,需要ATP提供能量,这一过程主要依赖于胃黏膜细胞膜上的 $Na^+-K^+-ATPase$ 来完成^[12-17]。丹参系唇形科鼠尾草属植物(*salvia miliorrhiza bunge*)的根,其性微寒,味苦。现代医学研究证实,丹参的成分中具有改善外周循环,提高常压和低压条件下肌肉的耐缺氧能力,加快微循环血流速度,增加毛细血管网等作用^[7-22]。实验表明:丹参注射液可以增加胃黏膜血流量(GMBF)^[23]。我们发现:感染组从穿孔后12 h开始 Na^+-K^+-ATP 酶活性即显著低于丹参组($P < 0.05$),胃黏膜PD的下降也显著低于丹参组。表明丹参在应激状态下,可能通过改变GMBF和 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性参与了胃黏膜细胞的能量代谢过程,从而使胃黏膜屏障功能免受致损因子的攻击,减少应激性胃黏膜损害的发生。

能量代谢障碍是胃黏膜损伤过程中的一个重要因素。某些应激性溃疡的发生是胃黏膜特异性能量不足的结果,而 $Na^+-K^+-ATPase$ -ADP系统和ATP-腺酸环化酶-cAMP系统的作用是能量代谢障碍的中心环节。他不仅是维持黏膜细胞正常功能和膜通透性的关键,而且是致病因素损伤胃黏膜的作用点,并与前列腺素等的细胞保护作用机制有关^[24-29]。深入研究胃黏膜损伤过程中能量代谢的变化,对阐明该类疾病的发生机制及其防治将十分有意义。我们的实验结果表明:严重腹腔感染状态下GMBF下降是引起胃黏膜屏障功能损害的基本因素,随着GMBF的下降,一方面胃黏膜清除过量 H^+ 的能力降低,更重要的是胃黏膜细胞内能量产生不足,ATP生成减少,细胞膜上的 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性降低,不能维持黏膜两侧的离子梯度,胃黏膜电位差下降,胃黏膜屏障功能受损。而在创伤早期应用丹参,可以有效的预防应激性溃疡的发生,其远期疗效有待于进一步深入研究。

4 参考文献

- Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosal in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:39-50
- 孙波, 李兆申. 非甾体类抗炎药胃黏膜损伤及预防实验研究. 世界华人消化杂志 2000;8:271-275
- Synnerstad I, Johnson M, Nylander O, Holm L. Intraluminal acid and gastric mucosal integrity: the importance of blood-borne bicarbonate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:121-129
- 陈国裕, 王志荣, 陈锡美. 热休克蛋白在胃黏膜保护中的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:969-971
- 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎. 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1068-1072
- 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭. 内皮素-1特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11:990-993
- 邓秋生, 龚青文. 消化性溃疡的病因探微. 世界华人消化杂志 2002;10:1085-1086
- Guo JS, Cho CH, Wang WP, Shen XZ, Cheng CL, Koo MW. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1767-1771
- Sun FP, Song YG, Cheng W, Zhao T, Yao YL. Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:375-378
- Lai YC, Wang TH, Huang SH, Yang SS, Wu CH, Chen TK, Lee CL. Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcers. *World J Gastroenterol* 2003;9:1537-1540
- Xia HH, Lam SK, Wong WM, Hu WH, Lai KC, Wong SH, Leung SY, Yuen ST, Wright NA, Wong BC. Antralization at the edge of proximal gastric ulcers: Does *Helicobacter pylori* infection play a role? *World J Gastroenterol* 2003;9:1265-1269
- Szlachcic A, Bilski R, Dziadus-Sokolowska A, Michalski J, Mroczka J. The effect of nitric oxide donors and L-arginine on the gastric electrolyte barrier. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:211-220
- Takeuchi K, Suzuki K, Mizoguchi H, Araki H, Nishiwaki H. Monchloramine impairs mucosal blood flow response and healing of gastric lesions in rats: relation to capsaicin-sensitive sensory neurons. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;3:282-289
- Tao W, Mathru M. Gut mucosal blood flow: regional regulation or systemic pressure dependence? *Chest* 2003;124:427-428
- Clark DL, Thomson SR. Attenuated gastric mucosal blood flow predicts non-healing of benign gastric ulcers. *Eur Surg Res* 2002;34:432-436
- Nakatsuka M. Assessment of gut mucosal perfusion and colonic tissue blood flow during abdominal aortic surgery with gastric tonometry and laser Doppler flowmetry. *Vasc Endovascular Surg* 2002;36:193-198
- Hu S, Sheng ZY. The effects of anisodamine and dobutamine on gut mucosal blood flow during gut ischemia/ reperfusion. *World J Gastroenterol* 2002;8:555-557
- 李崇瑞, 龚英. 丹参注射液改善维持性血液透析患者血流效果观察. 中国中西医结合肾病杂志 2002;5:297
- 唐启善, 丁波. 复方丹参注射液的临床应用及实验研究. 河南医药信息 2002;23:58-60
- 王世俊, 江凤霞. 复方丹参治疗中重度新生儿缺氧缺血性脑病的临床研究. 山东中医药大学学报 2001;5:341-343
- 王国中, 李光伟, 林岩, 金丽, 夏艳杰, 王冬梅, 刘守兰. 丹参对大鼠乙醇性胃黏膜损伤的影响. 齐齐哈尔医学院学报 2001;4:361-362
- 张建新, 程国祚, 李龙, 瞿建国. 急性坏死性胰腺炎大鼠胃黏膜微循环的动态变化及丹参对其的影响. 江苏医药杂志 2002;7:496-498
- 郑利民, 刘小玲, 夏中元. 体外循环心脏手术中复方丹参注射液对胃肠道保护作用的临床观察. 中国中西医结合杂志 2001;3:177-179
- Abe Y, Itoh K, Arakawa Y. Altered vascular response to acetylcholine in conditions of endothelial damage in the isolated perfused rat stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:93-98
- Xie Z. Molecular mechanisms of $Na^+/K^+-ATPase$ -mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 2003;986:497-503
- Hansen O. No evidence for a role in signal-transduction of $Na^+/K^+-ATPase$ interaction with putative endogenous ouabain. *Eur J Biochem* 2003;270:1916-1919
- Kaplan JH. Biochemistry of $Na^+, K^+-ATPase$. *Annu Rev Biochem* 2002;71:511-535
- Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. The polarized distribution of $Na^+, K^+-ATPase$ and active transport across epithelia. *J Membr Biol* 2001;184:299-304
- Jorgensen PL. Aspects of gene structure and functional regulation of the isozymes of $Na^+, K^+-ATPase$. *Cell Mol Biol* 2001;47:231-238

HGF和FGF4体外诱导人骨髓CD45⁺CD117⁺细胞向肝细胞分化的研究

李文晰, 段芳龄, 马 军, 陈香宇

李文晰, 段芳龄, 马军, 陈香宇, 郑州大学消化疾病研究所
河南省郑州市 450003
李文晰, 女, 1977-11-10 出生, 汉族, 河南省延津县人. 2003 年于郑州大学医学院获内科消化硕士学位, 主要从事干细胞基础和临床应用研究.
河南省卫生厅创新人才基金资助项目, No. 2002223
项目负责人: 段芳龄, 450003, 河南省郑州市经八路 2 号, 河南省郑州大学消化疾病研究所. wenxili@eyou.com
电话: 0371-3974183
收稿日期: 2003-07-19 接受日期: 2003-09-24

Differentiation of adult bone marrow CD45⁺CD117⁺ stem cells into hepatocyte *in vitro*

Wen-Xi Li, Fang-Ling Duan, Jun Ma, Xiang-Yu Chen

Wen-Xi Li, Fang-Ling Duan, Jun Ma, Xiang-Yu Chen, Institute of Digestive Disease, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Supported by the Chuangxin Rencai Foundation of Henan Health Bureau, No.2002223
Correspondence to: Fang-Ling Duan, Institute of Digestive Disease, Zhengzhou University Medical School, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. wenxili@eyou.com
Received: 2003-07-19 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To observe whether the CD117⁺CD45⁺ bone marrow cell can differentiate into the cells with characters of hepatocyte by the stimulation of hepatocyte growth factor (HGF) and fibroblast growth factor-4 (FGF4), and to explore the acting mechanism of the growth factors.

METHODS: Bone marrow cells were from the stern or ilium of 4 healthy volunteers between 4-40 years old. CD117⁺CD45⁺ bone marrow cells separated by magnetic cell sorting method, cultured in DMEM medium with FGF4, HGF, FGF4+HGF or no growth factor were divided into four groups: groups A, B, C, and D accordingly. Cells were collected on days 0, 7, 14, 21, and 28 for detecting the hepatocyte markers: AFP, CK18, albumin by immunocytochemistry, glycogen by PAS staining and c-met, FGFR2 mRNA by RT-PCR.

RESULTS: The specific markers of hepatocyte were positive in groups A, B and C but not in group D. C-met and FGFR2 mRNA expressed at a low level in the cells newly isolated or cultured in the medium without growth factor, but at increasing level after cultured with growth factor.

CONCLUSION: HGF and FGF4 can induce CD45⁺CD117⁺ differentiate into hepatocyte-like cells. The effect of growth factor on cell differentiation is probably by the positive regulation between the growth factor and its receptor.

Li WX, Duan FL, Ma J, Chen XY. Differentiation of adult bone marrow CD45⁺CD117⁺ stem cells into hepatocyte *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):697-701

摘要

目的: 探讨在 HGF、FGF4 诱导下人骨髓 CD45⁺CD117⁺ 细胞能否向肝细胞分化, 并探讨两种生长因子在诱导分化中可能的作用机制.

方法: 骨髓来自 4 名 4-40 岁健康志愿者的胸骨或髂骨. 用两步磁式分离法分离出 CD45⁺CD117⁺ 细胞, 分别用含有 FGF4, HGF, HGF+FGF4 或不加生长因子的 DMEM 培养基进行培养, 相应地分为 A, B, C, D 四组. 分别于新分离时和培养 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 时留细胞. 制备免疫细胞化学检测 AFP, CK18, 白蛋白, PAS 染色检测糖原等肝系细胞的特征型标志, RT-PCR 检测 C、D 组细胞 c-met (HGF 受体) 和 FGFR2 (FGF4R) mRNA 表达情况.

结果: A, B, C 三组加生长因子诱导培养后的细胞均可检测到肝系细胞的标志, D 组细胞不加生长因子培养后没有检测到肝系细胞的标志. c-met 和 FGFR2 mRNA 在新分离的和 D 组培养 7 d, 14 d 时的细胞均有较弱的表达, 而在 C 组细胞诱导培养 7 d, 14 d 时表达升高.

结论: HGF 和 FGF4 可诱导人骨髓 CD45⁺CD117⁺ 细胞向肝细胞样细胞分化. 生长因子诱导分化的作用可能通过与其受体之间的正反馈调节.

李文晰, 段芳龄, 马军, 陈香宇. HGF 和 FGF4 体外诱导人骨髓 CD45⁺CD117⁺ 细胞向肝细胞分化的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):697-701
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/697.asp>

0 引言

骨髓干细胞向肝细胞分化潜能的发现, 给肝病的治疗带来了新思路 and 新的前景. 但目前向肝细胞分化的具体的骨髓亚型来源及调控骨髓干细胞定向分化的机制尚不清楚. 我们选用了 CD45⁺CD117⁺ 细胞, 用 HGF 和 FGF4 诱导其向肝细胞分化, 为了进一步探讨肝细胞的骨髓源问题. 还检测了所用生长因子的受体诱导前后表达情况, 以探讨骨髓干细胞向肝细胞可能的分化机制. 为骨髓干细胞应用于临床奠定理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 抗人 CD45 Microbead、抗 PE Microbead 购自德国 Miltenyi 公司, 抗人 PE-CD117 抗体、HGF、FGF4 购自 BD 公司, 淋巴分离液购自 TBD 公司, DMEM、ITS

购自 GIBCO, 胎牛血清购自天津血研所, RNA 抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司, Revertaid First Strand cDNA synthesis kit 购自 MBI 公司, Probest Taq 酶购自 Takara 公司, DAPI 购自 Roche 公司, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder 购自 MBI 公司, 抗人 CK18 抗体、兔、鼠 SP 试剂盒购自福州迈新生物公司, 抗人白蛋白抗体、抗人 AFP 抗体购自 DAKO 公司, DAB 试剂盒购自北京中山生物公司, 鼠尾胶原, Schiff 试剂自制。

1.2 方法 骨髓源于 4 名健康志愿者, 年龄 4-40 岁, 从胸骨或髂骨抽取 8 mL 骨髓, 先用淋巴分离液初步分离出骨髓单个核细胞。再用磁式分离法分离出 CD45⁺CD117⁺ 细胞。具体步骤: (1) 密度梯度离心法分离出骨髓单个核细胞, 再将其过 Pre-separation filter 柱。 (2) 加 10 μ L PE 标记的抗人 CD117(c-kit) 于细胞悬液中 (10 μ L 抗体 / 10^7 个细胞), 混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光反应 5-10 min。 (3) 洗细胞后, 重悬细胞, 并加抗 PE 微磁珠 20 μ L, 混匀后 6-12 $^{\circ}$ C 孵育 15 min (20 μ L 磁珠 / 10^7 个细胞)。 (4) 用 2 mL 除气 Buffer 润湿 LD 柱, 将 3) 的细胞悬液加于柱子上, 让其流到一新备的收集管中, 既得 CD117⁺ 细胞。 (5) 重悬细胞并加抗人 CD45 磁珠混匀, 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。 (6) 洗细胞后, 将其重悬, 加到一新的 LD 柱。 (7) 收集流下的细胞, 得到的即为 CD117⁺CD45⁺ 细胞。留部分作细胞计数, 并分别通过台盼兰染色和 DAPI 复染细胞核计算细胞活率和纯度, 余用 Hank's 洗 1 遍后加培养基。分离好的细胞以 4×10^4 个细胞 / cm^2 的密度接种于铺有鼠尾胶原的 24 孔培养板上, 加低糖型 DMEM (GIBCO), 含 20 mL/L FBS, 1 \times ITS, 青霉素 100 kU/L, 链霉素 100 kU/L, 1 g/L BSA, 10^{-8} mol/L 地塞米松, 10^{-4} mol/L 抗坏血酸, 分为单独 HGF, 单独 FGF₄, HGF 与 FGF₄、无生长因子 4 个组, 分别计为 A, B, C, D 组, 每组 6 个复孔, 以后每周换液 2 次, 分别于培养 7, 14, 21, 28 d 时留取细胞以备检测。

免疫细胞化学 SP 法检测 CK18、AFP、白蛋白, 步骤: 留取的细胞用 Carnoy 固定液固定 10 min, 用 PBS 冲洗干净后, 加过氧化物酶阻断剂反应 10 min, 0.1 mol/L PBS 冲洗干净, 非免疫血清封闭 10 min, 甩弃多余封闭液, 加一抗: CK18 工作液, AFP 用 PBS 1:200 稀释, 白蛋白 1:300 稀释, 50 μ L/片, 室温反应 2 h, PBS 代替一抗作阴性对照。PBS 冲洗, 3 min \times 3。加生物标记的二抗 10 min。过氧化物酶标记的卵白素 10 min 冲洗, DAB 镜下显色, 冲洗, 苏木素复染或不复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜下观察, 选数个高倍视野进行细胞计数 (每个指标源于 4 标本), 共计 500 个细胞。

PAS 染色检测糖原: 留取细胞, 用 950 mL/L 酒精固定 10 min, 冲洗干净, 10 g/L 过碘酸水溶液反应 10 min, 冲洗, 晾干, 加 Schiff 试剂 30 min, 亚硫酸水洗 3 遍, 自来水冲洗, 晾干, 加 2% 甲绿反应 15 min, 自来水冲洗、脱水、透明、中性树胶封片。

RT-PCR 检测 c-met 和 FGFR2 mRNA: 分别取新鲜分离出的 CD117⁺CD45⁺ 细胞及 C 组、D 组诱导培养 7、14 d 的细胞, 各 5×10^6 个, 抽提 RNA (按试剂盒说明书进行), 加 600 μ L RLT 制成细胞悬液, 用自动匀浆器匀浆 30 s。加 700 mL/L 乙醇 600 μ L 到匀浆液中, 抽吸均匀后将其加于柱子上, 离心 15 s。加 700 μ L RW₁ 于柱子, 离心 15 s。加 500 μ L RPE 于 Rneasy 柱, 离心 15 s, 并重复。将柱子放入 1 个 1.5 mL 收集管中, 加 30-50 μ L 无 RNA 酶水于柱子中, 大于或等于 8 000 g 离心 1 min。用紫外分光光度计测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值, 按公式计算出 RNA 的浓度和纯度。逆转录参照试剂盒说明书, 冰上加: 总 RNA 10 μ L (0.2 mg), oligo (dT)₁₈ 引物 1 μ L; 水 1 μ L, 混匀 3-5 s。70 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 冰上速冷。按如下顺序在冰上加: 5 \times buffer 4 μ L; 核酶抑制剂 1 μ L; 10 mmol/L dNTP \times 2 μ L, 混匀并离心片刻。37 $^{\circ}$ C 反应 5 min。ReverAid M-MuLV 逆转录酶 (200 u/ μ L) 1 μ L, 混匀。42 $^{\circ}$ C 反应 60 min。之后在 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 冰上冷却结束反应。PCR 所用引物 C-met1, 5'-cattctgaagccgtttatgc-3'; C-met2, 5'-atgccctctcctatgatct-3', 产物长度 601 bp。FGFR2_U, 5'-aacaccacggacaaagagat-3'; FGFR2_L, 5'-tcttggtcgtgttcttcattcg-3', 产物长度 265 bp。β-actin1, 5'-ccaaggccaaccgcgagaagatga-3'; β-actin2, 5'-agggtacatggtggtgccgccaga-3', 产物长度 587 bp。

以肝癌组织 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 作为阳性对照, 以鉴定引物设计及合成质量, 以 β-actin 作内参。PCR 反应体系: 10 \times buffer 5 μ L; Taq 酶 0.125 μ L; dNTPs (2.5 mmol/L), 2.5 μ L; 引物 mix (100 pmol/L) 1 μ L; 模板 (100 ng/ μ L) 1 μ L; 灭菌水 17.875 μ L; 总体积 25 μ L。循环条件: 94 $^{\circ}$ C, 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C (c-met, FGFR₂) / 62 $^{\circ}$ C (β-actin) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 3 min。分别取 PCR 产物 5 μ L, DNA ladder 6 μ L, 用 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外投射仪下观察并照像, 用 Quantity one 软件分析。以 DNA ladder 的表达值为标准, 用各个待测条带的灰度值与标准参照相比得到校正值, 再分别将各标本的 c-met, FGFR₂ 的校正值与其相应的 β-actin 的校正值相比, 得出一个比值, 即二次校正值, 然后进行各组间比较。

统计学处理 阳性率在各组之间, 各时间点之间的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

在倒置相差显微镜下观察, 细胞大小均匀, 透光度良好, DAPI 染核后, 在荧光显微镜下观察, PE 标记的细胞占细胞总数的百分率小于 1%。台盼蓝染色, 细胞活率大于 95%。细胞均呈克隆性生长, 单个不形成克隆的细胞容易死亡。24 h 起开始有贴壁生长, 之后逐渐增多, 贴壁的细胞呈卵圆形或梭形。诱导至 28 d 时, 细胞形态呈上皮样细胞。C 组细胞生长速度快于 A、B 两组细胞。细胞达对数生长期的时间, 在不同的细胞供应者之间

有差异, 在 7-20 d 之间。

2.1 RT-PCR检测c-met与FGFR₂的结果 以肝癌cDNA为模板扩增, c-met, FGFR₂均有很亮的条带(图1)。以新鲜分离骨髓干细胞或诱导培养后细胞的cDNA为模板的RT-PCR产物, 其电泳结果经肉眼观察, 并用Quantity One分析的结果均表明: c-met与FGFR₂ mRNA在新鲜分离的骨髓 CD117⁺CD45⁺ 细胞有表达, 在 C 组细胞诱导培养 7, 14 d 时表达均升高, 而 D 组培养 7, 14 d 时表达量变化不明显(图 2, 3)。其内参对照 β -actin 在各组, 各时间点无明显差异(图 4), 均有较亮的条带。Quantity one 软件分析结果见表 1。

表 1 c-met 与 FGFR2 电泳条带分析结果

分组	β -actin		c-met		FGFR2	
	表达值	校正值	表达值	校正值	表达值	校正值
新分离的细胞	75.26	0.57	59.17	0.47	36.60	0.18
C 组 7 d	77.78	0.59	85.49	0.68	64.53	0.32
D 组 7 d	80.91	0.61	59.74	0.48	36.70	0.18
C 组 14 d	74.02	0.56	89.42	0.72	62.15	0.31
D 组 14 d	73.90	0.56	57.39	0.46	30.65	0.15

该组数据是 4 个标本的均数。



图 1 c-met, FGFR₂ 的 RT-PCR 产物。1: 肝癌为模板的 c-met; 2: CD117⁺CD45⁺ 细胞为模板的 c-met; 3: CD117⁺CD45⁺ 为模板的 FGFR₂; 4: Marker; 5: 肝癌为模板的 FGFR₂。

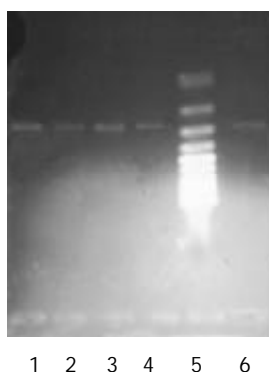


图 2 FGFR₂ RT-PCR 结果。1: C 组 14 d; 2: D 组 14 d; 3: C 组 7 d; 4: D 组 7 d; 5: Marker; 6: 新分离的细胞。

2.2 检测 AFP, CK18, 白蛋白和糖原的结果 AFP 在新分离的细胞有少数细胞表达, 阳性率在 2% 左右。在

加生长因子诱导培养 7 d, 14 d 时表达较高。诱导培养 21, 28 d 时较低。经统计学分析 AFP 表达从 7-28 d 呈下降趋势($P < 0.01$, 表 2, 图 5B)。但在 3 个组之间无明显差异($P > 0.05$)。不加生长因子培养的 7-28 d 细胞和无一抗对照均未见染色(见图 5A)。白蛋白在新分离的细胞有少数的细胞呈阳性, 加生长因子诱导的 3 组细胞, 阳性率随着诱导培养时间的延长有逐渐升高的趋势($P < 0.01$, 表 2, 图 5C), 在 3 组间白蛋白的表达无明显差异($P > 0.05$)。不加生长因子组在 7-28 d 均未见白蛋白表达, 无一抗对照未见染色。CK18 表达随着加生长因子诱导培养时间的延长, 有逐渐升高的趋势($P < 0.01$, 表 2, 图 5D), 在 3 组间未见明显差异。不加生长因子组和无一抗对照均未见阳性染色。随细胞培养时间的延长, 加生长因子诱导培养的 3 组细胞, 糖原染色的阳性率逐渐升高($P < 0.01$, 见表 2, 图 5E), 在 3 组间无明显差异($P > 0.05$)。而不加生长因子培养的细胞, 各个时间点均未见糖原阳性染色, 阴性对照未见染色。

表 2 各指标在不同组不同时间点的表达情况(单位为 %, $n=500$)

指标	组别	7 d	14 d	21 d	28 d	χ^2	P 值
AFP	A	80.0	42.0	8.8	2.0	804.42	0.000
	B	79.0	41.6	7.6	1.8	803.51	0.000
	C	78.4	40.0	9.2	2.0	771.22	0.000
白蛋白	A	19.0	76.4	94.0	96.0	774.06	0.000
	B	21.0	75.6	92.2	97.4	759.865	0.000
	C	19.4	76.0	95.2	98.0	808.6	0.000
CK18	A	17.4	65.0	89.8	92.8	672.496	0.000
	B	18.0	63.0	90.0	91.8	759.865	0.000
	C	18.4	64.8	90.4	92.6	808.6	0.000
糖原	A	1.2	8.0	61.0	88.0	1026.5	0.000
	B	1.4	8.4	60.4	87.0	998.8	0.000
	C	1.0	7.8	62.0	89.0	1054.6	0.000

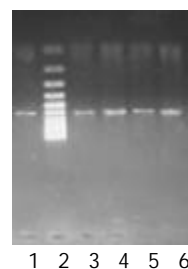


图 3 c-met RT-PCR 结果。1: 新分离的细胞; 2: Marker; 3: D 组培养 7 d; 4: C 组培养 7 d; 5: D 组培养 14 d; 6: C 组培养 14 d。

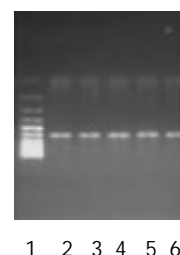


图 4 β -actin RT-PCR 结果。1: Marker; 2: D 组培养 14 d; 3: C 组培养 14 d; 4: D 组培养 7 d; 5: C 组培养 7 d; 6: 新分离的细胞。

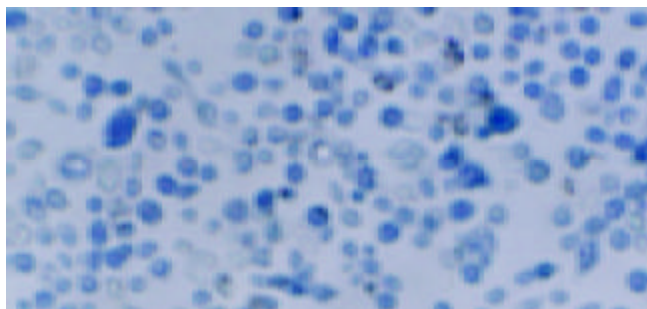


图5A C组细胞诱导培养28 d无一抗对照(× 400).

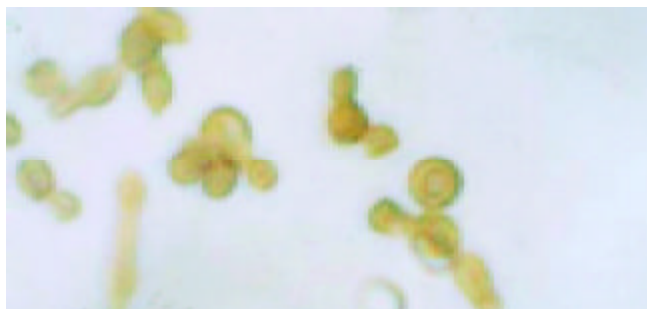


图5B A组诱导培养7 d AFP表达(× 400).

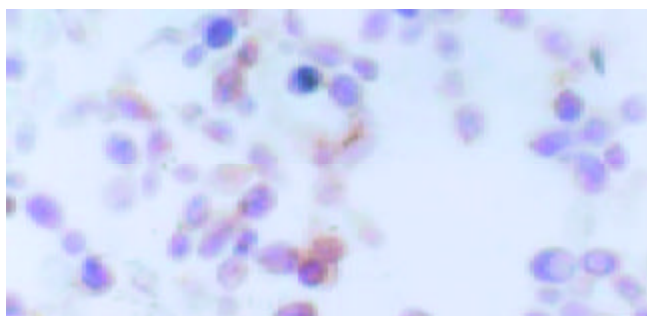


图5C C组诱导培养14 d时白蛋白表达情况(× 400).

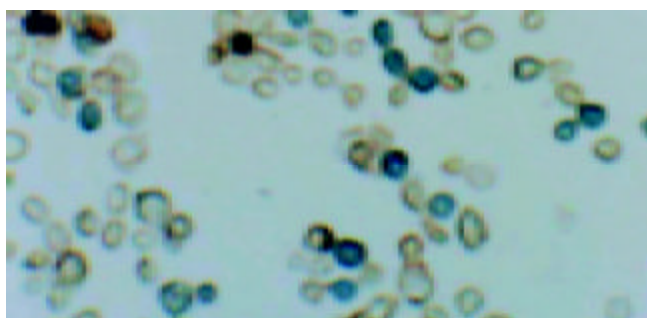


图5D B组诱导培养21 d时CK18表达情况(× 400).

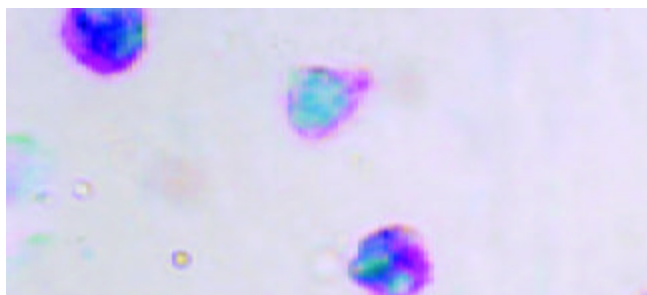


图5E C组诱导培养21 d时糖原染色情况(× 1 000).

3 讨论

体内外试验证实肝细胞可来源于骨髓干细胞^[1-6], 这为肝脏疾病的治疗提供了新思路, 因而人们对这方面的研究倾注了极大的热情, 但目前向肝细胞分化的骨髓来源问题还没搞清. CD117, 也叫 c-kit, 是干细胞因子(SCF)的受体, 表达于未分化的造血前体细胞, 是最常用的造血干细胞标志之一^[7-9]. CD45表达于除红细胞和血小板以及他们的前体以外的所有造血源性细胞^[10-12], 因而我们分离的CD117⁺CD45⁺细胞为骨髓非造血干细胞的一个亚型. 这种亚型的骨髓干细胞向肝细胞的分化情况目前尚无人研究. 本试验选择了CD117⁺CD45⁺细胞, 诱导他们向肝细胞分化, 旨在探讨肝细胞的骨髓来源问题.

磁式分离法可以利用细胞的表面标志分离出造血干细胞或非造血干细胞, 能更精确的将细胞分类. 我们用磁式分离得到的细胞, 透亮度好, 台盼蓝染色发现活细胞比率大于95%, 这说明本实验分离的细胞活力尚可, 适合用于细胞培养. 用荧光染料DAPI染核检测纯度, 荧光显微镜观察发现PE标记的细胞占总数的99%, 这说明此法分离出的细胞具有很高的纯度.

AFP是一种胞质蛋白, 由肝前体细胞分泌, 随着细胞逐渐成熟而消失^[13-15]. 我们实验中加生长因子诱导培养后, AFP符合一个规律: 7, 14 d时表达均处于较高水平, 21, 28 d时表达较低, 总体上呈下降趋势. 这一规律与肝系细胞从幼稚到成熟这一过程中AFP变化规律相一致.

CK18, 白蛋白, 糖原均是成熟肝细胞的标志. CK18在幼稚的肝前体细胞不表达, 当肝细胞趋于成熟或已成熟时表达^[16-18]. 白蛋白是肝细胞功能的一个标志物, 在体内他主要由成熟肝细胞分泌^[19-21]. 糖原合成和储存是正常肝细胞特有的功能^[22-24], 因而联合检测这三个指标能较准确的反应肝系细胞的特征.

我们的试验结果显示这些标志物在细胞诱导培养过程中的表达符合肝细胞逐渐趋于成熟过程中的表达规律.

目前对骨髓干细胞分化潜能的研究已比较多, 且骨髓干细胞的多向分化潜能已成定论. 但骨髓干细胞分化的机制及其定向分化的控制因素还是困扰研究者的一大难题, 这在骨髓干细胞应用于临床方面设置了巨大障碍. 生长因子是调控分化的众多因素中的一个重要元素. 我们试验中运用了2种生长因子: HGF和FGF4. HGF也叫肝细胞生长因子, 在胚肝发育成熟过程中发挥着重要作用, 并能促进未活化的肝细胞分化^[25-27]. 因其在体内的作用, 使其成为了目前体外诱导骨髓干细胞向肝细胞分化的研究中应用最多且效果比较肯定的一个生长因子. 本实验将其作为FGF4, FGF4与HGF联合的对照以观察他们诱导向肝细胞分化的作用. FGF4在内胚层的形成时是一重要的因子, 对保持内胚层的特异性起重要作用^[28-30]. 我们的结果显示不管单独HGF, 单独FGF4或二者联合刺激组均检测到了肝细胞表型和功能信号. 这说明了HGF, FGF4, 这两个生长因子均具有诱导骨

髓干细胞向肝细胞分化的功能. 当 FGF4 与 HGF 联合应用时, 虽肝细胞特异性标志阳性的细胞比率与单独 HGF、单独 FGF4 无明显差异, 但细胞生长速度要快于后者, 因而 HGF 与 FGF4 还是起到了一定的协同作用.

RT-PCR 作为鉴定引物质量和操作问题的阳性对照和内参对照均有较亮的条带, 这说明引物设计合成质量及 PCR 各项反应条件均合适. 对骨髓细胞的检测发现在新鲜分离的细胞有微弱的条带, 这提示了二者在 CD117⁺CD45⁺ 干细胞中的低表达状态, 也间接提示了这种亚型骨髓干细胞均有可能受 HGF 与 FGF4 的诱导, 这种假设在细胞培养过程中得到了验证. 动态观察诱导培养 7 d, 14 d 时 c-met、FGFR₂ 表达的情况, 发现加生长因子的一组细胞, 其 c-met、FGFR₂ mRNA 表达均升高, 而不加生长因子时则未见 c-met、FGFR₂ mRNA 表达变化. 这提示 HGF 与 FGF4 对其相应的受体可能有诱导其活化或诱导性表达的作用. 提示 HGF、FGF4 发挥作用时可能存在正反馈机制.

既然新鲜分离的骨髓干细胞表面就存在一些生长因子受体, 我们可以考虑从这些受体入手, 找出与之相应的配体, 然后再通过细胞培养或动物试验等方法检测这些配体的作用效果. 沿此路线去寻找调控分化的因素, 或许也是值得考虑的路径. 另外从检测骨髓干细胞与肝细胞表面共同存在的受体入手, 可能也是找出骨髓干细胞向肝细胞分化的调控因素的一种途径.

4 参考文献

- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:3769-3778
- 李文晰, 段芳龄, 马军, 朱武凌, 高天慧, 陈香宇, 颜伏归, 李蔚, 韩娜, 王晓, 孙艳, 孙嫣. 人骨髓单个核细胞向肝细胞诱导分化的体外研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003;12:144-147
- 马军, 段芳龄, 李文晰, 颜伏归, 王晓, 王智卿, 朱武凌, 陈香宇, 高天慧. 大鼠移植骨髓细胞向肝细胞转化的实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003;12:138-143
- 杨明智, 彭志海. 骨髓源性肝干细胞的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1035-1036
- Jordan JH, Walchshofer S, Jurecka W, Mosberger I, Sperr WR, Wolff K, Chott A, Buhning HJ, Lechner K, Horny HP, Valent P. Immunohistochemical properties of bone marrow mast cells in systemic mastocytosis: evidence for expression of CD2, CD117/Kit, and bcl-x (L). *Hum Pathol* 2001;32:545-552
- Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop CD. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2001;29:686-693
- Nadin BM, Goodell MA, Hirschi KK. Phenotype and hematopoietic potential of side population cells throughout embryonic development. *Blood* 2003;102:2436-2443
- Ohmura K, Kawamoto H, Lu M, Ikawa T, Ozaki S, Nakao K, Katsura Y. Immature multipotent hemopoietic progenitors lacking long-term bone marrow-reconstituting activity in the aorta-gonad-mesonephros region of murine day 10 fetuses. *J Immunol* 2001;166:3290-3296
- Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop CD. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2001;29:686-693
- McKinney-Freeman SL, Majka SM, Jackson KA, Norwood K, Hirschi KK, Goodell MA. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:806-814
- Fiegel HC, Kluth J, Lioznov MV, Holzhtuter S, Fehse B, Zander AR, Kluth D. Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:46-53
- Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, Nagano K, Tanaka Y, Terada K, Sugiyama T, Umeyama K, Matsumoto K, Yamamoto T, Endo F. Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 2003;38:104-113
- Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver. *Hepatology* 2003;37:1385-1394
- Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic progenitor cells correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can progenitor cells migrate? *J Pathol* 2000;192: 373-378
- Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* 2000; 33:76-84
- Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fandrich F. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 2003;21:428-436
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003;112:160-169
- Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003;37:983-993
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- Honda M, Yamada T, Nomura T, Miki Y, Kanda S, Seki A, Sasaki J. Differential, histochemical and immunohistochemical changes in rat hepatocytes after isoflurane or sevoflurane exposure. *Acta Med Okayama* 2003;57:1-12
- Ishizaka S, Shiroy A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J* 2002;16:1444-1446
- Hamamoto R, Kamihira M, Iijima S. Growth and differentiation of cultured fetal hepatocytes isolated various developmental stages. *Biosci Biotech Biochem* 1999;63:395-401
- Okano J, Shiota G, Matsumoto K, Yasui S, Kurimasa A, Hisatome I, Steinberg P, Murawaki Y. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:298-304
- Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Okuda Y, Nakamura H. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:158-161
- Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000; 127:1563-1572
- Isfort RJ, Cody DB, Kerckaert GA. Analysis of the transforming potential of growth and differentiation factors in syrian hamster embryo cells: reversible and irreversible transformation. *Vitr Mol Toxicol* 1999;12:133-148
- Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20:329-337

L-精氨酸对酒精性肝脂肪变大鼠肝组织 NOS 表达及氧应激的影响

田德安, 洪捷敏, 刘南植, 王家马

田德安, 洪捷敏, 刘南植, 王家马, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

田德安, 男, 1961-02-17 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 1984 年同济医科大学医学学士, 1987 年同济医科大学医学硕士, 1990 年德国 ULM 大学医学院医学博士. 现为湖北省消化学会委员、秘书, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科主任, 消化内镜中心副主任, 主要从事肝脏疾病及消化内镜诊治方面的研究.

项目负责人: 田德安, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. tiandeanwh@sina.com.cn

电话: 027-83643609 传真: 027-83668058

收稿日期: 2003-08-27 接受日期: 2003-10-06

Effects of L-arginine on expression of nitric oxide synthase and oxidative stress in rat liver tissues with alcoholic hepatic steatosis

De-An Tian, Jie-Min Hong, Nan-Zhi Liu, Jia-Long Wang

De-An Tian, Jie-Min Hong, Nan-Zhi Liu, Jia-Long Wang, The Division of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. De-An Tian, The Division of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.

tiandeanwh@sina.com.cn

Received: 2003-08-27 Accepted: 2003-10-06

Abstract

AIM: To study the effects of L-arginine on the expression of nitric oxide synthase and oxidative stress in rat liver tissues with alcoholic hepatic steatosis.

METHODS: The rat alcoholic hepatic steatosis models were made with ethanol supplied in the drinking water. 32 SD rats were randomly divided into four groups ($n=8$ in each group). Rats were fed with 400 mL/L ethanol for up to 16 (group A) or 20 (group B) weeks. Rats in group C were fed with ethanol as rats in group B and administered with L-arginine by intraperitoneal injection from the 17th week. Group D was the normal control. Rats in groups B and D were administered normal saline by intraperitoneal injection from the 17th week. The expression of protein and mRNA of NOS in the liver was detected with immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction. Meanwhile, NO, MDA, GSH, SOD contents were measured and histopathological changes were observed in the liver tissues.

RESULTS: In groups A and B, different degrees of steatosis could be seen. Steatosis was more significant in group B than in group A ($t=76.5$, $P<0.05$). Compared to group D, NO and MDA contents and the expression of iNOS were significantly increased ($P<0.01$). However, GSH and SOD contents and the expression of eNOS were significantly

decreased ($P<0.05$) in groups A and B. In comparison to group B, steatosis in the liver was reversed or significantly lessened ($t=62.5$, $P<0.05$), NO contents were unchanged, MDA contents and the expression of iNOS were significantly decreased ($P<0.05$), GSH and SOD contents and the expression of eNOS were markedly increased in the group C ($P<0.05$).

CONCLUSION: The therapeutic effects of L-arginine on alcoholic hepatic steatosis are probably involved in decreased iNOS expression, increased eNOS expression and alleviated oxidative stress.

Tian DA, Hong JM, Liu NZ, Wang JL. Effects of L-arginine on expression of nitric oxide synthase and oxidative stress in rat liver tissues with alcoholic hepatic steatosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):702-705

摘要

目的: 探讨 L-精氨酸对酒精性肝脂肪变大鼠肝组织 NOS 表达及氧应激的影响.

方法: 采用在饮水中加入酒精的方法建立酒精性肝脂肪变动物模型. 32 只 SD 大鼠随机分成 4 组, 每组 8 只. A, B 组分别喂饲 400 mL/L 乙醇至 16, 20 wk; C 组喂饲乙醇同 B 组, 自 17 wk 起腹腔注射 L-精氨酸; D 组为正常对照组. B, D 组自 17 wk 起腹腔注射等量的生理盐水. 应用免疫组化和逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)的方法检测肝组织中 NOS 的蛋白和 mRNA 表达, 同时测定肝组织中 NO, MDA, GSH, SOD 含量, 并观察肝组织病理变化.

结果: A, B 组肝组织出现了不同程度脂肪变性, B 组更为显著($t=76.5$, $P<0.05$). 与 D 组相比, A, B 组肝组织中 NO, MDA 含量、iNOS 表达明显增高($P<0.01$); GSH, SOD 含量、eNOS 表达明显降低($P<0.05$). 与 B 组相比, C 组肝组织脂肪变性被逆转或明显减轻($t=62.5$, $P<0.05$), NO 含量无显著改变, MDA 含量、iNOS 表达明显降低($P<0.05$); GSH, SOD 含量及 eNOS 表达明显升高($P<0.05$).

结论: L-精氨酸对酒精性肝脂肪变的治疗作用可能与 iNOS 表达降低、eNOS 表达升高以及氧应激减轻有关.

田德安, 洪捷敏, 刘南植, 王家马. L-精氨酸对酒精性肝脂肪变大鼠肝组织 NOS 表达及氧应激的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):702-705

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/702.asp>

0 引言

L-精氨酸不仅能显著减轻或完全阻止大鼠酒精引起的

肝损害^[1], 而且能逆转酒精所导致的肝脏炎症和纤维化^[2], 提示 L-精氨酸对酒精性肝损害有预防和治疗作用. 关于 L-精氨酸的作用机制, 目前尚不清楚. 我们研究 L-精氨酸对酒精性肝脂肪变大鼠肝组织 NOS 表达及氧应激的影响, 探讨 L-精氨酸作用的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠32只, 体重180-220 g, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、一氧化氮(NO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 兔抗鼠 iNOS 及 eNOS 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 免疫组织化学试剂盒(SP法)购自北京中山生物技术有限公司; Trizol 一步法 RNA 提取试剂购自美国 Gibco 公司; iNOS, eNOS 及 GAPDH 引物均由北京赛北盛工程公司合成; RT-PCR 试剂购自美国 Promega 公司产品; L-精氨酸由上海政翔化学试剂研究所生产.

1.2 方法 将实验大鼠适应性饲养 1 wk 后, 随机分成 A, B, C, D 四组, 每组 8 只. 采用在饮水中加入酒精的方法建立酒精性肝脂肪变动物模型, 造模方法为: 先给大鼠随意饮用 20 g/L 蔗糖溶液 3 d, 然后再加入 50 mL/L 的乙醇, 每隔 4 d 增加 50 mL/L 直至 150 mL/L, 然后再每周增加 50 mL/L 直至终浓度为 400 mL/L, 从此开始计算造模时间^[3-4], 大鼠进食普通饲料(脂肪占 50 g/L). A 组造模时间为 16 wk, B 组为 20 wk. C 组为 L-精氨酸干预组, 乙醇喂饲同 B 组, 另从 17 wk 开始每日腹腔注射 L-精氨酸 100 mg/kg. D 组为正常对照组, 饮用 20 g/L 蔗糖溶液, 时间为 20 wk. B, D 组从 17 wk 开始每日腹腔注射等量的生理盐水.

1.2.1 肝组织 NO, MDA, GSH 和 SOD 含量测定 大鼠颈椎脱臼处死后, 取肝右叶 1 g 湿重组织, 4℃下加生理盐水制成 100 g/L 的匀浆, 1 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 硝酸还原酶法测 NO 代谢产物 NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 间接反映 NO 水平, 硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量, 二硫代二硝基苯甲酸法测定 GSH 含量, 黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力(肝匀浆稀释成 10 g/L 的浓度), 双缩脲法测定肝组织中蛋白含量.

1.2.2 肝组织病理和免疫组化检查 取肝左叶组织, 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝组织病理变化. 肝细胞脂肪变性的半定量指标(中华病理学杂志 1994; 23: 14-16)按脂变肝细胞占肝细胞总数的百分数分为 5 个等级, 即: 脂变肝细胞 < 0.05 为 -; 0.05-0.25 为 +; 0.26-0.50 为 ++; 0.51-0.70 为 +++; 大于 0.70 为 ++++. eNOS, iNOS 免疫组化染色采用 SP 法, 第一抗体的工作浓度均为 1:50, 操作流程按试剂盒说明书进行, 以 PBS 代替一抗作阴性对照. 联苯二胺(DAB)显色, 苏木素复染, 封片. 通过 HPIAS-1000 型图像分析仪进行图像分析处理得出平均 A 值, 作为 eNOS, iNOS 蛋白表达的相对含量.

1.2.3 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR) 采用 Trizol 一步法提取总 RNA, 用 DNA/RNA 测定仪(英国 Pharmacia 公司)检测 RNA 浓度和纯度. 取总 RNA 4 μg, 加入 Oligo(dt)₁₅ 引物及逆转录酶, 在 20 μL 体系下, 45℃, 60 min 完成逆转录反应, cDNA 置 -20℃保存. iNOS 引物序列^[5]为: 上游 5' -ACA ACA GGA ACC TAC CAG CTC A -3', 下游 5' -GAT GTT GTA GCG CTG TGT GTC A -3'; eNOS 引物序列^[5]为: 上游 5' -GGA GAA GAT GCCAAG GCT GCT -3', 下游 5' -CTT CCA GTG TCC AGA CGC ACC -3'; GAPD 引物序列^[5]为: 上游 5' -CGG AGT CAA GGA TTT GGT CGT AT -3', 下游 5' -AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC -3'. 反应条件为 iNOS: 94℃, 1 min; 60℃, 30 s; 72℃, 1 min; 30 个循环; eNOS: 90℃, 1 min; 56℃, 30 s; 72℃, 1 min; 27 个循环; GAPDH: 94℃, 1 min; 56℃, 30 s; 72℃, 1 min; 30 个循环. iNOS, eNOS 及 GAPDH 的扩增产物大小分别为 651 bp, 224 bp 和 306 bp. 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 利用 MUVB-20 凝胶分析系统(美国 Ultralum 公司)对扩增产物条带进行扫描, 分别以 iNOS/GAPDH, eNOS/GAPDH 的平均 A 值作为 iNOS mRNA, eNOS mRNA 表达的相对含量.

统计学处理 应用 SAS 8.01 版软件进行统计学分析. 计量资料以 mean±SD 表示, 用方差分析检验组间的总差异, 两组间差异比较采用 q 检验, 等级资料采用秩和检验, P < 0.05 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织病理学的变化 B, C 组分别有 1, 2 只大鼠死亡; A, D 组大鼠全部存活. A 组肉眼见肝脏明显肿大, 呈黄色缺血状, 表面有油腻感. HE 染色显示肝细胞出现了 +--+ 级脂肪变性, 主要见于肝腺泡 II, III 区, 为胞质内以大泡型为主的混合脂滴, 空泡将肝细胞核挤向一侧. B 组肝细胞脂肪变性较 A 组更显著 (t = 76.5, P < 0.05), 伴有轻度炎性细胞浸润. C 组肝组织脂肪变性较 B 组明显减轻 (t = 62.5, P < 0.05), 表现为正常 (5/6 只) 或 + 级脂肪变性 (1/6 只). D 组大鼠肝组织的形态学表现正常, 肝脏色红, 肝窦清晰, 肝索排列整齐, 偶见个别肝细胞内有极少量细小脂滴散布于细胞核周围(表 1).

2.2 肝组织 iNOS 和 eNOS 的表达 iNOS 阳性反应产物呈黄色或棕黄色, 主要位于肝细胞及单核巨噬细胞胞质中. D 组(正常对照组)无或有少许 iNOS 表达; A, B 组 iNOS 表达升高. A, B 组 iNOS 平均 A 值较 D 组明显升高 (P < 0.01), 经 L-精氨酸干预后, C 组 iNOS 平均 A 值较 B 组明显降低 (P < 0.05, 图 1AB). 各组肝组织 iNOS mRNA RT-PCR 结果与免疫组化结果类似(图 3). eNOS 阳性反应产物呈黄色或棕黄色, 主要位于肝脏血管内皮细胞胞质中. A, B 组 eNOS 平均 A 值较 D 组明显降低 (P < 0.01), 经 L-精氨酸干预后, C 组 eNOS 平均 A 值与 B 组相比显著升高 (P < 0.05, 图 2AB). 各组肝组织 eNOS mRNA

RT-PCR 结果与免疫组化结果类似(图 4).

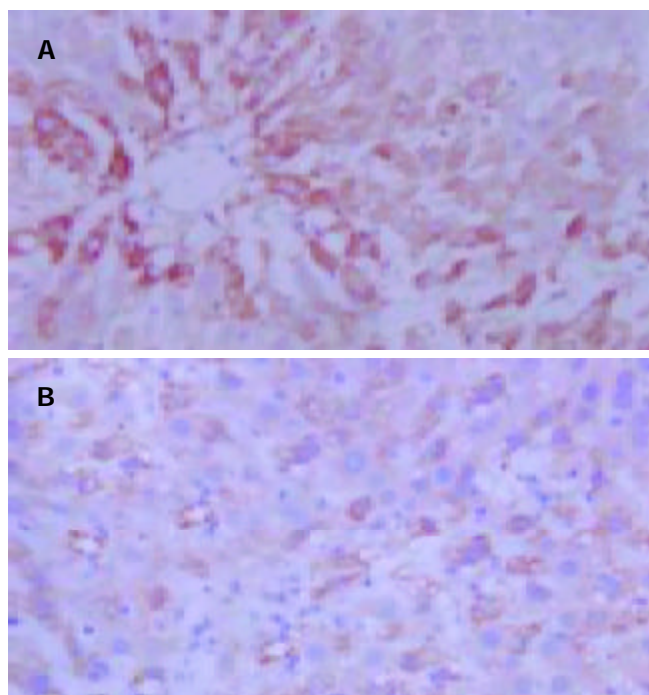


图1 肝组织 iNOS 蛋白表达 SP×400. A: 生理盐水组; B: L- 精氨酸组.

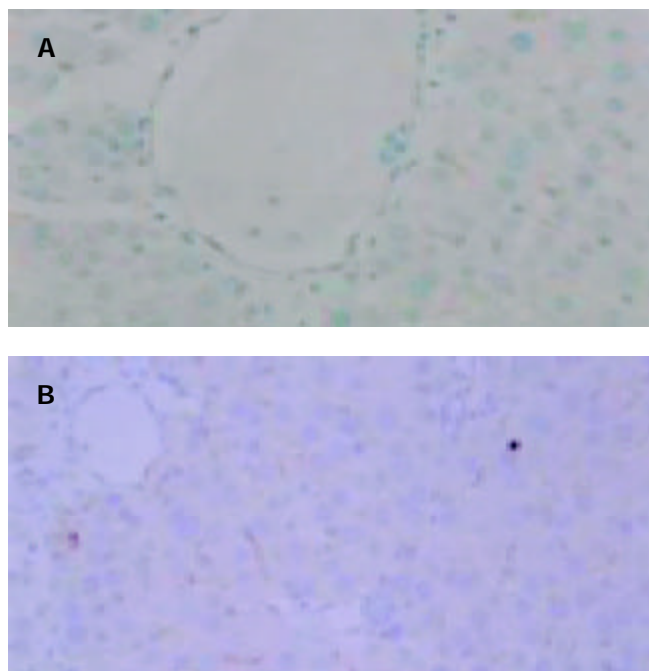


图2 肝组织 eNOS 蛋白表达 SP×400. A: 生理盐水组; B: L- 精氨酸组.

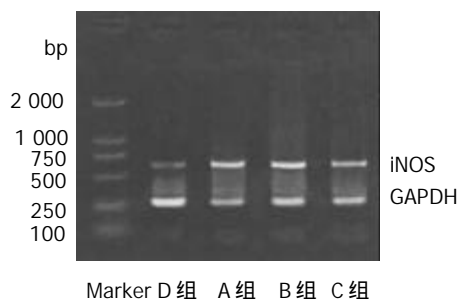


图3 iNOSmRNA RT-PCR 产物电泳图.

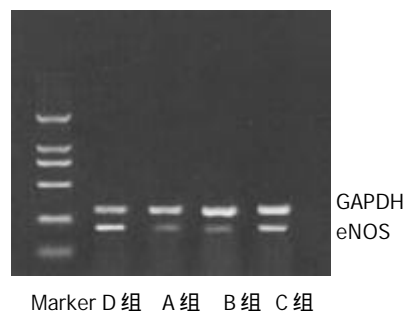


图4 eNOSmRNA RT-PCR 产物电泳图.

2.3 肝组织 NO, MDA, GSH 及 SOD 水平 A, B 组肝组织 NO, MDA 水平与 D 组相比显著增高($P < 0.01$), 而 GSH, SOD 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). 与 B 组相比, 经 L- 精氨酸干预后, C 组 NO 水平无明显改变($P > 0.05$), 而 MDA 水平显著降低($P < 0.01$); GSH, SOD 水平显著升高($P < 0.05$, 表 2).

表1 大鼠肝组织脂肪变性程度

分组	<i>n</i>	-	+	++	+++	++++
A 组	8	0	6	2	0	0
B 组 ^a	7	0	1	3	3	0
C 组 ^b	6	5	1	0	0	0
D 组	8	8	0	0	0	0

^a $P < 0.05$, $t = 76.5$, vs A 组; ^b $P < 0.05$, $t = 62.5$, vs B 组.

表2 大鼠肝组织 NO, MDA, GSH, SOD 水平

分组	<i>n</i>	NO ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (nmol/g)	GSH (mg/g)	SOD (kU/g)
A 组	8	1.81 ± 0.41^b	237.7 ± 21.9^b	31.5 ± 7.0^a	55.8 ± 6.8^b
B 组	7	2.78 ± 0.68^b	272.9 ± 32.5^b	21.7 ± 3.1^b	49.8 ± 5.5^b
C 组	6	2.96 ± 0.75	147.5 ± 21.8^d	58.2 ± 7.6^c	94.6 ± 7.9^c
D 组	8	0.53 ± 0.08	137.6 ± 17.4	60.7 ± 8.3	99.0 ± 9.7

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs D 组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs B 组.

3 讨论

酒精性脂肪肝形成机制较复杂, 由多种因素共同参与^[6-11]. 目前有学者提出了关于脂肪肝发病机制的“二次打击”学说, 认为各种不同病因通过氧应激促使反应性氧化物(ROS)增加作为发病的基础机制^[12]. ROS与膜磷脂的多不饱和脂肪酸起过氧化反应, 形成脂质过氧化物(LPO)^[13]. 脂质过氧化可干扰脂肪酸的氧化, 导致脂肪在肝中蓄积^[14]. 而脂质沉积的增多又能加重脂质过氧化反应, 遂形成恶性循环^[15]. 本结果显示, A 组大鼠肝组织中脂质过氧化产物MDA含量明显增加, 而反映抗氧化能力的指标 GSH, SOD 含量明显下降, 提示肝组织中促氧化物与抗氧化物之间的动态平衡失调, 导致氧应激和脂质过氧化, 促使肝脂肪变性发. B 组大鼠肝组织中

GSH, SOD 含量下降更明显, 抗氧化能力进一步削弱, 氧自由基对肝脏的损害加剧, 脂肪变性程度也更重。

嗜酒人群和慢性酒精摄入大鼠由于酒精损害了肠黏膜屏障, 肠壁通透性增加, 细菌毒素移位, 致使血中内毒素水平升高^[16-18], 而且慢性酒精摄入也使 TNF- α 产生增加^[19]。内毒素、TNF- α 等可诱导 iNOS 基因表达^[20], 而抑制 eNOS 基因转录^[21-22], 降低 eNOS mRNA 的稳定性^[23]使 eNOS 表达下调。本实验表明, A, B 组脂肪变性肝组织中 iNOS 表达明显上调, eNOS 表达明显减少, 可能与内毒素、TNF- α 等的产生增加有关。肝组织中 iNOS, eNOS 表达呈相反趋势, 但 NO 含量显著增加, 由此结果可推测, NO 含量增加主要通过 iNOS 表达上调所引起。iNOS 所产生的大量 NO 与 O₂⁻ 结合生成一种更强的氧化剂 ONOO⁻^[24], ONOO⁻ 不仅导致自由基反应加剧^[25-26], 而且可氧化蛋白质巯基、Fe/S 中心、锌指结构及硝基化蛋白质的酪氨酸残基, 从而使 SOD, GSH 等的合成和再生减少^[27-28], 显著减弱了抗氧化酶清除自由基的能力, 导致组织损伤。同时 eNOS 表达下降, 肝组织灌注减少, 血小板聚集, 微血栓形成^[29], 自由基产生增加^[30], 进一步加重了对肝组织的损害。

Nanji et al^[2]研究表明, NO 前体 L-精氨酸可降低酒精性肝损害大鼠血浆内毒素和肝组织 TNF- α mRNA 水平。本实验表明, 与 B 组相比, C 组经 L-精氨酸干预后, 由于诱导 iNOS 或下调 eNOS 表达的刺激因素作用降低, 肝组织中 iNOS 表达明显降低, eNOS 表达明显升高, NO 含量无明显改变。iNOS 表达降低可减轻 ONOO⁻ 对 GSH、SOD 等抗氧化酶的损害, GSH、SOD 含量明显升高, 肝脏的抗氧化能力增强, 氧应激减轻, 脂质过氧化产物 MDA 含量减少。同时 eNOS 表达升高可增加肝组织灌注, 减少血小板聚集及微血栓形成, 有利于肝组织的损伤修复^[31], 因而给予 L-精氨酸治疗后肝脂肪变性被逆转或明显减轻。总之, L-精氨酸对酒精性脂肪肝的治疗作用可能与降低 iNOS 的表达、升高 eNOS 表达以及减轻氧应激有关。

4 参考文献

- Nanji AA, Greenberg SS, Tahan SR, Fogt F, Loscalzo J, Sadrzadeh SM, Xie J, Stamler JS. Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: role in protection from injury. *Gastroenterology* 1995;109:899-907
- Nanji AA, Jokelainen K, Lau GK, Rahemtulla A, Tipoe GL, Polavarapu R, Lalani EN. Arginine reverses ethanol-induced inflammatory and fibrotic changes in liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:832-839
- Keegan A, Martini R, Batey R. Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *J Hepatol* 1995;23:591-600
- 戴宁, 曾民德, 邱德凯, 范竹萍, 茅益民, 彭延申, 陆伦根. 酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 II E1 的表达与氧化抗氧化的关系. *中华消化杂志* 1999;19:312-31
- Liu H, Ma Z, Lee SS. Contribution of nitric oxide to the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats. *Gastroenterology* 2000;118:937-944
- 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. *世界华人消化杂志* 1999;7:75-76
- Waluga M, Hartleb M. Alcoholic liver disease. *Wiad Lek* 2003;

- 56:61-70
- Maher JJ. Alcoholic steatosis and steatohepatitis. *Semin Gastrointest Dis* 2002;13:31-39
- Stewart S, Jones D, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol Med* 2001;7:408-413
- Hegedus G. Pathology of alcoholic liver disease. *Orv Hetil* 2000;147:331-336
- Piao YF, Li JT, Shi Y. Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P450IIE1 and fatty liver. *World J Gastroenterol* 2003;9:2612-2615
- 曾民德. 脂肪肝发病机制及其“二次打击”假设. *中华消化杂志* 2002;22:167-168
- Zhou JF, Cai D, Zhu YG, Yang JL, Peng CH, Yu YH. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:501-507
- Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997;25:351-355
- 林育纯, 林忠宁. 肝脂类水平与脂质过氧化指标的多元相关分析. *中国公共卫生学报* 1997;16:84
- Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742-747
- Zuo GQ, Gong JP, Liu CA, Li SW, Wu XC, Yang K, Li Y. Expression of lipopolysaccharide binding protein and its receptor CD14 in experimental alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2001;7:836-840
- Chen XM, Xu RL, Ma XH, Zhou YC, Han DW. Mucosal permeability to lipopolysaccharides in the colon in chronic alcoholic rats. *China Nati J New Gastroenterol* 1996;2:125-127
- Shi L, Kishore R, McMullen MR, Nagy LE. Chronic ethanol increases lipopolysaccharide-stimulated Egr-1 expression in RAW 264.7 macrophages: contribution to enhanced tumor necrosis factor alpha production. *Biol Chem* 2002;277:14777-14785
- Taylor BS, Geller DA. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 2000;13:413-424
- Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:1-37
- Lu JL, Schmiede LM, Kuo L, Kuo L, Liao JC. Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:1-5
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Cir Res* 1993;73:205-209
- Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2003;138:532-543
- Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002;383:401-409
- Zhou JL, Jin GH, Yi YL, Zhang JL, Huang XL. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1318-1322
- Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;268:699-722
- Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998;25:392-403
- Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 2003;185:589-595
- Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:275-295
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000;148:187-197

理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织TNF- α mRNA表达的影响

邱明义, 范 恒, 梅家俊, 沈关心, 刘松林, 赵映前

邱明义, 梅家俊, 刘松林, 赵映前, 湖北中医学院 湖北武汉市 430061
范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科
湖北武汉市 430022
沈关心, 华中科技大学同济医学院 湖北武汉市 430022
邱明义, 男, 1946-05-16 生, 湖北随州人, 汉族, 1970 年湖北中医学院本科毕业, 教授, 湖北中医学院博士生导师, 主要从事经方防治胃肠病的临床与基础研究。湖北省教委资助项目, No.99Z014
项目负责人: 邱明义, 430061, 湖北省武汉市, 湖北中医学院。
qiumingyi9256@163.com
电话: 027-68889256 传真: 027-68889082
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-30

Effect of Chinese herb compounds Lichangsifang on TNF- α mRNA expression of colon tissue in rats with ulcerative colitis

Ming-Yi Qiu, Heng Fan, Jia-Jun Mei, Guan-Xin Shen, Song-Lin Liu, Ying-Qian Zhao

Ming-Yi Qiu, Jia-Jun Mei, Song-Lin Liu, Ying-Qian Zhao, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Heng Fan, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Guan-Xin Shen, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by Hubei Provincial Department of Education, No. 99Z014
Correspondence to: Ming-Yi Qiu, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 1 Tanhualin, Wuchang 430061, Hubei Province, China.
qiumingyi9256@163.com
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-07-30

Abstract

AIM: To study the effect of Lichangsifang (LCSF) on TNF- α mRNA expression in rats with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Ninety-eight SD rats were randomly divided into seven groups, and every group had fourteen rats (seven rats were male, and seven, female), namely the normal control group, the pathologic control group, sulfasalazine (SASP) group, Wumeiwan (WMW) group, Baitouwengtang (BTWT) group, Senglingbaishuan (SLSS) group and Tongxieyaofang (TXYF) group. Except the normal control group, the other six animal model groups of UC were made through the integration of general immunity and local stimulation with DNCB and acetic acid. The six animal model groups of UC were treated by SASP, TXYF, WMW, BTWT, SLBSS and TXYF respectively. After these treatment, the changes of some immune indexes in the colon tissue such as the level of TNF- α mRNA expression were evaluated by *in situ* hybridization.

RESULTS: The level of TNF- α mRNA expression in pathologic groups was significantly higher than that in normal

controls ($P < 0.01$, $t = 4.128$ vs normal control). The TNF- α mRNA expression was decreased in WMW than those in other pathologic groups ($P < 0.01$, $t = 3.435$ or $P < 0.05$, $t = 2.593$). TNF- α mRNA expression was decreased in WMW group than those in BTWT group, SLBSS group and TXYF group ($P < 0.05$, $q = 2.581$ vs BTWT group, $q = 2.834$ vs SLBSS group, $q = 2.624$ vs TXYF group). There was no remarkable difference in the level of TNF- α mRNA expression among BTWT group, SLBSS group and TXYF group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: This model induced with DNCB and acetic acid is successful. It is obvious that the cytokines play important roles in pathogenesis of UC, especially proinflammatory cytokines TNF- α , which can promote inflammation. WMW is the most effective among the compounds, which have curative effects by adjusting immunity and inhibiting abnormal inflammatory reaction in the course of UC.

Qiu MY, Fan H, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Zhao YQ. Effect of Chinese herb compounds Lichangsifang on TNF- α mRNA expression of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):706-710

摘要

目的: 观察理肠四方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠组织细胞因子 TNF- α mRNA 的表达的影响, 比较四方疗效大小, 并分析其作用机制。

方法: 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型, 将 98 只健康 SD 大鼠(雌雄各半), 按雌雄随机分 7 组, 分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、模型组和正常组, 分别观察治疗后大鼠结肠黏膜 TNF- α mRNA 的表达变化, 并进行统计学比较。

结果: 造模后细胞因子 TNF- α mRNA 的表达升高(模型组与正常组平均吸光度比较 $P < 0.01$, $t = 4.128$ vs 正常组), 理肠四方各治疗组、SASP 组与模型组比较有显著意义($P < 0.01$, $q = 12.37$ vs 乌梅丸组, $q = 9.52$ vs 白头翁汤组, $q = 8.79$ vs 参苓白术散组, $q = 8.54$ vs 痛泻要方组, $q = 8.92$ vs SASP 组), 但除乌梅丸外, 理肠四方之间比较无明显差异。

结论: 经两两比较后, 乌梅丸疗效最好, 白头翁汤、参苓白术散、痛泻要方与 SASP 组疗效相当。表明理肠四方可下调促炎细胞因子 TNF- α , 从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常, 达到治疗的目的。

邱明义, 范恒, 梅家俊, 沈关心, 刘松林, 赵映前. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 TNF- α mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):706-710
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/706.asp>

0 引言

细胞因子与溃疡性结肠炎(UC)关系密切, 其中 TNF- α 是公认的以单核巨噬细胞产生为主的、能介导 UC 发病的细胞因子^[1-5]. 有人已进一步证实: TNF- α mRNA 的表达在活动期高于非活动期 UC^[6]. 我们用 UC 大鼠结肠 TNF- α mRNA 表达为观察指标, 以进一步了解中药理肠四方对 UC 细胞因子的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 理肠四方的药物组成及剂量如下: 乌梅丸: 乌梅 16 g, 细辛 6 g, 干姜 10 g, 黄连 16 g, 当归 4 g, 附子 6 g, 蜀椒 4 g, 桂枝 6 g, 生晒参 6 g, 黄檗 6 g; 白头翁汤: 白头翁 30 g, 黄柏 24 g, 黄连 10 g, 秦皮 24 g; 参苓白术散: 莲子肉 10 g, 薏苡仁 10 g, 缩砂仁 10 g, 桔梗 10 g, 白扁豆 15 g, 白茯苓 20 g, 生晒参 20 g, 甘草 20 g, 白术 20 g, 山药 20 g; 痛泻要方: 炒白术 30 g, 白芍 20 g, 陈皮 15 g, 防风 20 g. 柳氮磺胺吡啶(SASP)批号 200111002, 由上海三维制药有限公司生产(250 mg/片). 乌梅丸: 将生药中含挥发油的药物(当归、细辛、木香等)放入提油器中, 加蒸馏液(含挥发油), 用乙醚溶解, 再蒸发乙醚, 得挥发油(2 mL). 再将以上药液(包括药渣)倒入药罐中, 将其他不含挥发油的药物亦加入此药罐, 开始用武火, 煮沸后用文火, 保持沸腾 30 min, 搅拌后趁热过滤. 其药渣再加蒸馏水蒸煮一次, 煮沸时间 20 min, 过滤, 合并滤液, 在电炉上浓缩成 515 g/L, 再将蒸馏的植物油加入此药液中, 消毒后分两瓶装, 压盖备用. 白头翁汤、参苓白术散、痛泻要方等三方药物的制备均按以上方法配制成含生药浓度分别为 562 g/L、987 g/L、216 g/L 的水煎剂. 柳氮磺胺吡啶药物制备: 将 88 片 SASP 用研钵研细, 用 100 目筛筛过, 然后再研, 直至最后剩下 1-2 g 残渣, 仍放进研粉中, 将研粉配成 26 g/L 混悬液. TNF- α 原位杂交检测试剂盒、原位杂交专用盖玻片、DBA 显色试剂盒、poly-L-lysine(多聚赖氨酸)、DEPC、200 mL/L 甘油等均由武汉博士德生物工程有限公司提供. 健康 SD 大鼠 98 只(雌雄各半, 体质量 300 \pm 50 g)由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供.

1.2 方法 将 SD 健康大鼠 98 只(雌雄各半), 按雌雄随机分 7 组, 每组 14 只(雌雄各半), 1-6 组为造模组, 分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、SASP 组和模型组, 第 7 组为正常组, 各组体质量无显著性差异($P > 0.05$). 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型^[7-8]. 将大鼠颈背部用 100 g/L Na₂S 脱毛后, 以 20 g/L DNCB 丙酮液 0.25 mL (5 滴)滴背, 1 次/d, 连续 14 d, 在第

15 d 以直径 3 mm 导尿管经肛门插入结肠 8 cm 处, 注入 0.1% DNCB 乙醇 0.25 mL, 在第 16 d 同部位注入 80 mL/L 醋酸溶液 2 mL, 准确计时 10 s 后, 再用 5 mL 生理盐水冲洗. 再饲养 2 wk, 每天观察大鼠大便性状、饮食、毛发、活动状态等, 可以看到大鼠逐渐产生典型 UC 活动期症状, 30 d 后造模完成. 然后, 每组随机抽取大鼠 2 只, 处死后取其结肠, 进行病理检查确认结肠出现的充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化. 每组每只大鼠分别用乌梅丸液、白头翁汤液、参苓白术散液、痛泻要方液和 SASP 混悬液 3 mL 灌胃, 每天 1 次; 模型组、正常组: 每组每只大鼠均以蒸馏水各 3 mL 灌胃, 1 次/d, 以上均给药 15 d. 全部结肠标本均经 4% 甲醛固定, 石蜡包埋. TNF- α mRNA 的表达用原位杂交法(采用 TNF- α 的寡核苷酸探针经地高辛高效标记法)检测, 严格按试剂盒说明操作, 最后显微镜观察并拍照. 每组切片随机选取 5 张, 各随机选取 5 个视野, 用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统(版本 9.0)测量, 计算其平均吸光度和平均灰度.

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件处理统计数据资料, 数据用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 t 检验和 F 分析(q 检验).

2 结果

造模动物于 2 wk 左右出现黏液稀便, 且逐渐加重, 4 wk 左右症状更为严重, 可见脓血便、消瘦、体质量减轻、毛发无光泽、饮食明显减少、畏寒、懒动等. 经理肠四方、SASP 灌胃后, 其症状均有不同程度改善(表 1).

表 1 中药理肠四方对大鼠体质量和组织损伤积分的影响(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	体质量(g)	损伤积分
正常组	12	352.5 \pm 20.7 ^b	0 ^b
模型组	10	3307.8 \pm 15.3 ^d	5.5 \pm 0.45 ^d
SASP 组	9	3321.5 \pm 18.7 ^{ad}	3.8 \pm 0.39 ^a
乌梅丸组	11	3340.3 \pm 16.8 ^{bd}	1.8 \pm 0.34 ^{bf}
白头翁汤组	10	3331.4 \pm 13.8 ^{bd}	2.5 \pm 0.38 ^{bf}
参苓白术散组	9	3325.6 \pm 18.4 ^{ad}	1.9 \pm 0.35 ^{be}
痛泻要方组	10	3328.7 \pm 10.5 ^{ad}	3.7 \pm 0.47 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 正常组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs SASP 组.

2.1 根据炎症损伤程度进行评分^[9-12], 确有改善(表 1). 镜下正常组: 大鼠结肠黏膜完好, 无炎细胞浸润及溃疡形成, 黏膜上皮完整、连续, 腺体排列规则, 结构清楚, 分泌功能活跃, 黏膜、固有膜内血管、纤维等正常, 肌层无异常. 模型组: 大鼠结肠黏膜糜烂、溃疡, 大部分黏膜缺损, 有的形成深大溃疡, 黏膜腺体破坏, 残

存的黏膜充血、水肿、增生形成息肉样外观(假息肉),黏膜及黏膜下大量炎细胞浸润(淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞),有的细胞呈散在分布,处于增生状态(浆多、核大、染色质稀疏);黏膜层变薄、黏膜下固有层局部充血、水肿、纤维增生. SASP 组:大鼠结肠黏膜上皮部分缺损,腺体排列欠规则,黏膜下轻度充血,较多炎细胞浸润. 乌梅丸组:大鼠结肠黏膜上皮基本完整,腺体排列较规则,黏膜下无明显充血,少量炎细胞浸润. 白头翁汤组:大鼠结肠黏膜上皮基本完整,腺体排列规则,黏膜下充血不明显,可见炎性细胞浸润. 参苓白术散组:大鼠结肠黏膜上皮基本完整,腺体排列规则、黏膜充血不明显,可见少量炎性细胞浸润. 痛泻要方:大鼠结肠黏膜上皮欠完整,腺体排列欠规则,黏膜下充血明显. 可见炎性细胞浸润(图 1A-G).

2.2 TNF- α mRNA 的表达 杂交阳性信号为棕黄色颗粒分布于胞质,阳性物质主要位于巨噬细胞、淋巴细胞及纤维母细胞胞质内,呈颗粒状(图 2A-G). 模型组平均吸光度明显高于正常组($P < 0.01$),其平均灰度则明显低于正常组($P < 0.01$);而乌梅丸组平均吸光度低于模型组($P < 0.05$),其平均灰度则明显高于模型组($P < 0.01$);乌梅丸组平均光密度与白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组比较亦有所下降($P < 0.05$),其平均灰度则较之升高($P < 0.05$);而 SASP 组其平均吸光度、平均灰度则与该 3 组无明显差别($P > 0.05$, 表 2).

表2 中药理肠四方对大鼠结肠组织 TNF- α mRNA 的表达情况(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	平均吸光度	平均灰度
正常组	12	0.31 \pm 0.13 ^b	158.21 \pm 12.31 ^b
模型组	10	0.68 \pm 0.16	90.57 \pm 9.73
SASP 组	9	0.48 \pm 0.09	125.36 \pm 11.27
乌梅丸组	11	0.37 \pm 0.11 ^{ac}	140.48 \pm 13.34 ^{bd}
白头翁汤组	10	0.45 \pm 0.15 ^e	130.93 \pm 10.43 ^e
参苓白术散组	9	0.47 \pm 0.14 ^e	127.89 \pm 9.67 ^e
痛泻要方组	10	0.50 \pm 0.13 ^e	123.81 \pm 12.03 ^e

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SASP 组; ^e $P < 0.05$ vs 乌梅丸组.

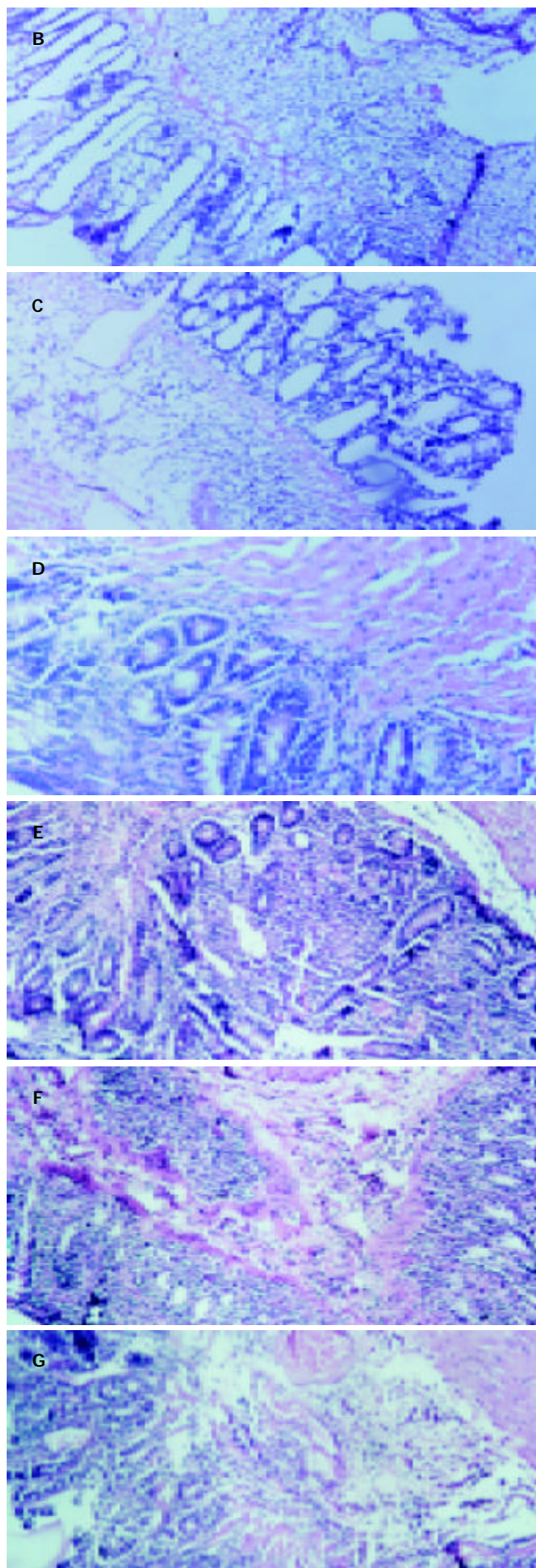
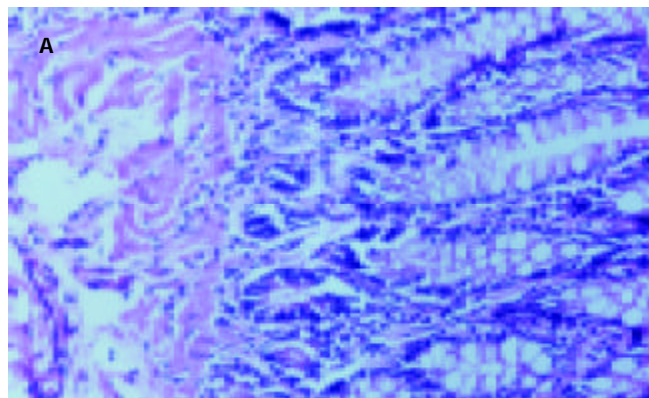


图1 UC 大鼠结肠病理切片 HE \times 200. A: 正常组; B: 模型组; C: SASP 组; D: 乌梅丸组; E: 白头翁汤组; F: 参苓白术散组; G: 痛泻要方组.

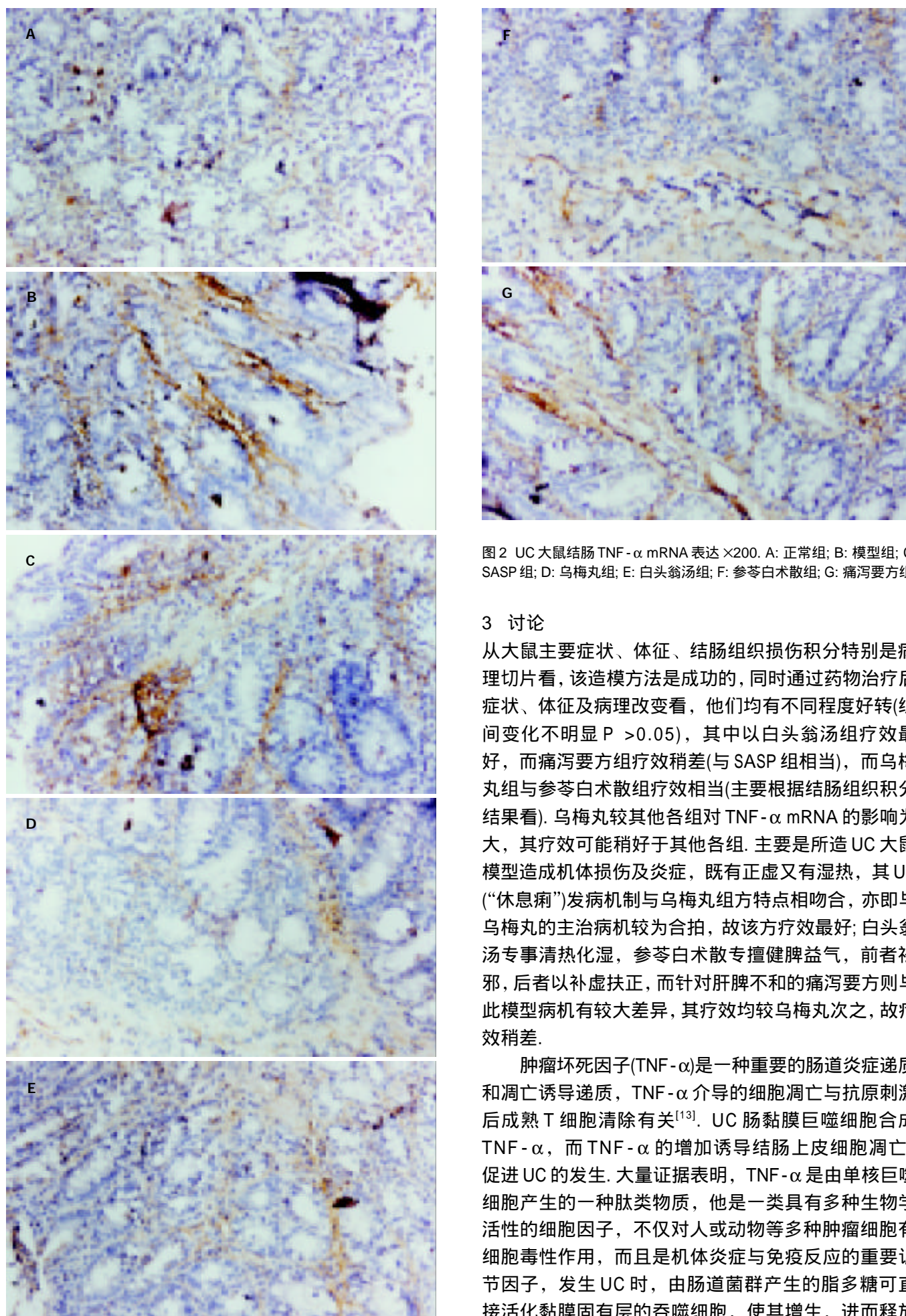


图2 UC大鼠结肠TNF- α mRNA表达 $\times 200$ 。A: 正常组; B: 模型组; C: SASP组; D: 乌梅丸组; E: 白头翁汤组; F: 参苓白术散组; G: 痛泻要方组。

3 讨论

从大鼠主要症状、体征、结肠组织损伤积分特别是病理切片看,该造模方法是成功的,同时通过药物治疗后症状、体征及病理改变看,他们均有不同程度好转(组间变化不明显 $P > 0.05$),其中以白头翁汤组疗效最好,而痛泻要方组疗效稍差(与SASP组相当),而乌梅丸组与参苓白术散组疗效相当(主要根据结肠组织积分结果看)。乌梅丸较其他各组对TNF- α mRNA的影响为大,其疗效可能稍好于其他各组。主要是所造UC大鼠模型造成机体损伤及炎症,既有正虚又有湿热,其UC(“休息痢”)发病机制与乌梅丸组方特点相吻合,亦即与乌梅丸的主治病机较为合拍,故该方疗效最好;白头翁汤专事清热化湿,参苓白术散专擅健脾益气,前者祛邪,后者以补虚扶正,而针对肝脾不和的痛泻要方则与此模型病机有较大差异,其疗效均较乌梅丸次之,故疗效稍差。

肿瘤坏死因子(TNF- α)是一种重要的肠道炎症递质和凋亡诱导递质,TNF- α 介导的细胞凋亡与抗原刺激后成熟T细胞清除有关^[13]。UC肠黏膜巨噬细胞合成TNF- α ,而TNF- α 的增加诱导结肠上皮细胞凋亡,促进UC的发生。大量证据表明,TNF- α 是由单核巨噬细胞产生的一种肽类物质,他是一类具有多种生物学活性的细胞因子,不仅对人或动物等多种肿瘤细胞有细胞毒性作用,而且是机体炎症与免疫反应的重要调节因子,发生UC时,由肠道菌群产生的脂多糖可直接活化黏膜固有层的吞噬细胞,使其增生,进而释放

包括 TNF- α 在内的一系列细胞因子, 破坏肠黏膜屏障, 同时血管系统也遭到破坏, 导致一系列 UC 典型的炎症病变. 另外, TNF- α 的分泌是可以调控的, 然而细胞因子调控和释放的确切机制仍不清楚, 是否的确与核因子(NF)- κ B 活化有关^[14], 尚需进一步研究.

4 参考文献

- 1 王青, 许琳. 溃疡性结肠炎的实验室检查和活动性评估. 世界华人消化杂志 2000;8:336-337
- 2 郭洁, 沈志祥, 谭诗云. 炎症性肠病的活动性指标. 世界华人消化杂志 2001;9:1431-1434
- 3 罗燕军, 于皆平. 炎症性肠病活动性的分子标志物. 世界华人消化杂志 2001;9:698-701
- 4 田力, 黄裕新, 闻勤生, 李艳梅, 赵海峰, 王庆莉. 电针治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的作用机制. 世界华人消化杂志 2002;10:916-921
- 5 吴兴桂, 王广伟, 侯宪典, 宋豫军, 齐保庆. 炎症性肠病患者血清 Fas, IL-6 的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:865-866
- 6 李琪佳, 宫恩聪, 刘叔平, 鄂文. 溃疡性结肠炎黏膜的白细胞亚群和肿瘤坏死因子- α 的表达. 临床与实验病理学杂志 2001;17:216-218
- 7 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构变化. 世界华人消化杂志 1999;7:381-383
- 8 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐凤. 鱼腥草治疗溃疡性结肠炎的实验研究. 世界华人消化杂志 1999;7:786-787
- 9 郑红斌, 胡鸿毅, 陆雄, 马贵同. 清肠栓防治大鼠溃疡性结肠炎作用的实验研究. 浙江中医学院学报 2001;25:47-51
- 10 Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:150-152
- 11 Padol I, Huang JQ, Hogaboam CM, Hunt RH. Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;12:257-265
- 12 Tjandra K, Le T, Swain MG. Experimental colitis attenuates development of toxin-induced cholangitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002;47:1216-1223
- 13 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000;164:3608-3615
- 14 甘华田, 欧阳钦, 贾道全, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B 活化与细胞因子基因表达. 中华内科杂志 2002;41:252-255

World Journal of Gastroenterology 影响因子

影响因子是国际通行的期刊评价指标之一, 是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因子越大, 期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数, 是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该刊被使用和重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《World Journal of Gastroenterology, WJG》2002 年影响因子为 2.532, 被引频次为 1 535. WJG 2002 年影响因子在国际胃肠病学和肝病领域内的 45 种期刊中排名第 13 位, 在 SCI 收录的所有 5876 种国际科学期刊中排名第 797 位. WJG 2001 年影响因子 1.445, 被引频次为 722; WJG 2000 年影响因子 0.993, 被引频次 327 次. 1998 年以来发表的全文电子版(ASP, PDF)已与 PubMed 中的文摘进行了链接, 全世界的读者在利用 PubMed 检索时即可免费阅读到 WJG 发表的全文, 使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播, 期刊的影响因子逐年上升, 国际影响逐年扩大.

抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B和一氧化氮合酶的影响

谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海锋

谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
袁海锋, 广西中医学院瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011
谭至柔, 女, 1968-08-06 生, 广东省台山市人, 汉族, 医学硕士, 主治医师。主要从事消化系统疾病的基础及临床研究。
项目负责人: 谭至柔, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院消化内科。zhirout@yahoo.com.cn
电话: 0771-5356501
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-11-13

Effects of antioxidant on NF- κ B and iNOS in rats with acute necrotizing pancreatitis

Zhi-Rou Tan, Guo-Du Tang, Hai-Xing Jiang, De-Hai Deng, Hai-Feng Yuan

Zhi-Rou Tan, Guo-Du Tang, Hai-Xing Jiang, De-Hai Deng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China
Hai-Feng Yuan, Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Province, China
Correspondence to: Zhi-Rou Tan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China. zhirout@yahoo.com.cn
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To observe the influence of antioxidant N-acetylcysteine (NAC) on nuclear factor- κ B (NF- κ B) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic tissue of rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP).

METHODS: A total of 95 Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into control group (group C, $n=25$), acute pancreatitis group (group A, $n=35$) and NAC intervention group (group N, $n=35$). In group A, SD rats were injected twice intraperitoneally with 8 g/L L-arginine (2×1.2 mg/g) in an interval of 1 hour for ANP. In group C, SD rats received the same amount of saline at the same time. In group N, 0.5 mol/L NAC (0.05 mg/g) was administered intraperitoneally 1 hour before the start of L-arginine injection. Animals were killed at 6, 12, 24, 36, and 48 hours after the first L-arginine injection. The concentration of NF- κ B and the activity of iNOS in rat's pancreatic tissue of each group were assayed.

RESULTS: The concentration of NF- κ B in pancreatic tissue in group N significantly decreased in earlier period than that in group A (10.4 ± 2.3 vs 89.7 ± 6.4 , 6.8 ± 3.2 vs 21.5 ± 3.5 , 7.9 ± 3.4 vs 32.5 ± 4.5 , 5.4 ± 2.7 vs 14.7 ± 5.2 , and 5.0 ± 3.7 vs 11.1 ± 2.3 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$). iNOS activity increased in group A, whereas it significantly decreased in group N (15.2 ± 4.0 vs 24.2 ± 3.8 , 28.3 ± 8.0 vs 36.8 ± 6.0 , 25.2 ± 3.8 vs

30.5 ± 3.5 , 21.2 ± 3.7 vs 28.7 ± 7.2 , and 18.8 ± 5.5 vs 28.2 ± 4.2 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$).

CONCLUSION: Antioxidants may decrease the activity of iNOS through the inhibition of NF- κ B activation.

Tan ZR, Tang GD, Jiang HX, Deng DH, Yuan HF. Effects of antioxidant on NF- κ B and iNOS in rats with acute necrotizing pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):711-713

摘要

目的: 探讨抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响。

方法: δ SD 大鼠 95 只, 随机分成正常对照组(C 组, 25 只)、急性胰腺炎组(A 组, 35 只)和 NAC 干预组(N 组, 35 只)。A 组分 2 次腹腔内注射 8 g/L 的 L-精氨酸(L-arginine, L-Arg) 1.2 mg/g 诱导急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)模型; C 组同法腹腔内注射等量生理盐水; N 组先提前 1h 腹腔内注射 0.5 mol/L 的 NAC 0.05 mg/g, 然后同 A 组方法诱导 ANP。在首次注射 L-Arg 后于 6, 12, 24, 36, 48 h 5 个时点分批处死大鼠, 检测胰腺 NF- κ B 及 iNOS 活性。

结果: N 组 NF- κ B 浓度在 ANP 早期比 A 组的明显降低(10.4 ± 2.3 vs 89.7 ± 6.4 , 6.8 ± 3.2 vs 21.5 ± 3.5 , 7.9 ± 3.4 vs 32.5 ± 4.5 , 5.4 ± 2.7 vs 14.7 ± 5.2 , 5.0 ± 3.7 vs 11.1 ± 2.3 , $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。A 组各时点 iNOS 明显升高, N 组各时点 iNOS 活性均较 A 组的明显下降(15.2 ± 4.0 vs 24.2 ± 3.8 , 28.3 ± 8.0 vs 36.8 ± 6.0 , 25.2 ± 3.8 vs 30.5 ± 3.5 , 21.2 ± 3.7 vs 28.7 ± 7.2 , 18.8 ± 5.5 vs 28.2 ± 4.2 , $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。

结论: 抗氧化剂可通过抑制 NF- κ B 的激活而抑制 iNOS 的表达。

谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海锋. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B 和一氧化氮合酶的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(3):711-713
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/711.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见急症之一^[1-8], 尤其是急性出血坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)临床表现危重, 病死率高^[9-10],

其发病机制极为复杂且尚未完全阐明^[11-13]. 最近的研究表明, 前炎症因子 iNOS 的过度表达参与加重 AP 时对胰腺组织的损害^[14-15]. iNOS 在正常生理条件下并不表达, 只有在炎症等病理条件下细胞受到刺激后方表达, 但 iNOS 的转录合成还受到转录因子复合体 NF- κ B 的调控^[16]; 抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对 NF- κ B 活性有抑制作用^[17]. 但 NAC 在 ANP 的发展中对大鼠胰腺组织 NF- κ B、iNOS 活性的影响, 国内外尚未见报道. 我们采用分 2 次腹腔内注射大剂量左旋精氨酸(L-arginine, L-Arg)法制备大鼠 ANP 模型, 观察 NAC 对大鼠胰腺组织 NF- κ B, iNOS 活性的影响及其意义.

1 材料和方法

1.1 材料 健康 δ SD 大鼠 95 只, 2-3 月龄, 体质量 250-300 g (广西医科大学动物中心提供). iNOS 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 大鼠转录因子检测试剂盒购自美国 Clontech 公司. L-Arg, NAC, 蛋白酶抑制物混合液, 胰蛋白酶抑制剂, 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 二硫苏糖醇(DTT)均购自美国 Sigma 公司.

1.2 方法 大鼠随机分成 3 组: 生理盐水对照组(C 组, 25 只), 急性胰腺炎组(A 组, 35 只), NAC 干预组(N 组, 35 只). 所有大鼠实验前均禁食 16 h, 自由饮水. A 组大鼠分 2 次腹腔内共注射 80 g/L L-Arg 溶液 2×1.2 mg/g, 中间间隔 1 h; C 组同法腹腔内注射等量的生理盐水. N 组则于 L-Arg 注射前 1 h, 预先腹腔内注射 0.5 mol/L 的 NAC 溶液 0.05 mg/g, 1 h 后按照 A 组同法腹腔内注射等量的 80 g/L L-Arg 溶液. 各组实验大鼠在注射 80 g/L L-Arg 或等量生理盐水后分别于 6, 12, 24, 36, 48 h 5 个时点分批处死; C 组每个时点处死 5 只大鼠, A 组和 N 组每个时点处死 7 只大鼠. 解剖大鼠, 取胰头部胰腺组织行组织病理学检查, A 组、N 组大鼠经大体病理及组织病理检查证实为 ANP. 将胰腺组织用滤纸吸干水分, 电子天平称取 200 mg 胰腺组织, 剪碎后加入 PBS 溶液至 2 mL, 匀浆机制成 100 g/L 的胰腺组织匀浆, 4 $^{\circ}$ C 低温离心, 取上清 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 采用 L-精氨酸比色法测定 iNOS 活性. 另切取胰腺组织 250-300 mg 以同等量冷 PBS 液中冲洗, 于 5 mL 冷 PBS 中充分剪碎, 经 150 目的滤网冰上研磨, 收集中层悬液、离心, 弃上清取细胞沉淀. 细胞沉淀于溶解缓冲液(HEPES 100 mmol/L, MgCl₂ 15 mmol/L, KCl 100 mmol/L, DTT 0.1 mol/L, 蛋白酶抑制物)中冰冻孵育 15 min, 离心、再悬浮, 用小 27 号针头反复吸喷以破碎细胞, 离心破碎的细胞液, 收集核沉淀物. 再于提取缓冲液(HEPES 20 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, NaCl 0.42 mol/L, EDTA 0.2 mmol/L, 甘油, DTT 0.1 mol/L, 蛋白酶抑制物)中悬浮粗制核沉淀物, 注射器反复吸喷以破碎细胞核, 离心核悬浮液, 收集上清液(细胞核提取物), 测量核提取物的蛋白浓度, 小整量分装、快速冷冻(-70 $^{\circ}$ C), 采用 ELISA 法测定 NF- κ B 浓度.

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包作统计学处理, 数据以 mean \pm SD 表示, 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 NAC 对 NF- κ B 的影响 经 NAC 预处理的大鼠胰腺腺泡细胞核内 NF- κ B 浓度显著下降(表 1).

表 1 大鼠胰腺腺泡细胞核内 NF- κ B 的变化 (mg/L, mean \pm SD)

分组	n	t / h				
		6	12	24	36	48
C	5	3.3 \pm 3.1	4.3 \pm 2.9	4.3 \pm 2.9	3.3 \pm 3.1	3.3 \pm 3.1
ANP	7	89.7 \pm 6.4 ^b	21.5 \pm 3.5 ^b	32.5 \pm 4.5 ^b	14.7 \pm 5.2 ^b	11.1 \pm 2.3 ^b
NAC	7	10.4 \pm 2.3 ^{ad}	6.8 \pm 3.2 ^d	7.9 \pm 3.4 ^d	5.4 \pm 2.7 ^d	5.0 \pm 3.7 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs C; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs ANP.

2.2 NAC 对 iNOS 活性的影响 C 组各时点胰腺组织匀浆 iNOS 活性均未能检出. 以 NAC 预处理, 使大鼠胰腺组织匀浆 iNOS 活性显著下降(表 2).

表 2 大鼠胰腺组织 iNOS 活性(μ kat/g, mean \pm SD, $n = 7$)

分组	t / h				
	6	12	24	36	48
ANP	24.2 \pm 3.8	36.8 \pm 6.0	30.5 \pm 3.5	28.7 \pm 7.2	28.2 \pm 4.2
NAC	15.2 \pm 4.0 ^b	28.3 \pm 8.0 ^a	25.2 \pm 3.8 ^a	21.2 \pm 3.7 ^a	18.8 \pm 5.5 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs ANP.

3 讨论

在实验性 AP 的发生早期有 NF- κ B 的激活, 在实验性 AP 模型的发生中起着重要的作用^[18-19]. NF- κ B 是最近发现的极重要的基因转录调控因子, 它是一种具有多向转录调节作用的核蛋白. NF- κ B 几乎存在于所有细胞中; 但通常情况下, NF- κ B 与抑制性抗核因子 - κ B (IkB) 共价结合成复合物, 以无活性形式存在于细胞质内. NF- κ B 的活化可诱导前炎症因子 iNOS 的过度表达, iNOS 的大量表达参与 AP 的发生、发展, 加重了 AP 时对胰腺组织的损害^[14-15]. 我们发现 ANP 大鼠细胞核内 NF- κ B 浓度在 6 h 即有明显升高, 6 h 后呈现急剧下降, 12 h 降至较低水平, 24 h 有所回升并呈现第二峰值, 以后时点呈缓慢下降趋势, 支持 AP 早期有 NF- κ B 的激活. 使用 NAC 后 NF- κ B 的活性明显降低, 提示 NAC 可抑制 NF- κ B 的活性. 其作用机制尚不十分明确, 推测可能是: NAC 是一含巯基(-SH)物质, 是体内游离巯基的重要组成部分之一. NAC 进入体内迅速脱去乙酰基变为左旋半胱氨酸, 捕捉未配对电子, 阻止急性胰腺炎胰腺缺血再灌注时中性粒细胞氧自由基的瞬间爆发. 同时 NAC 可直接作用于过氧化氢(H₂O₂)生成 H₂O 和 O₂, 还可清除超氧阴离子、羟自由基^[20]. 此外, NAC 为小分子物质,

进入细胞后可为谷胱甘肽(GSH)的合成提供原料. GSH对稳定细胞膜及细胞器膜, 稳定细胞内酶和蛋白质的功能具有重要作用; 能解除病理状态下蛋白质分子二硫键交联, 利用巯基灭活活性氧. NAC可能通过其抗氧化和细胞保护作用, 抑制NF- κ B的激活^[21].

我们发现经NAC预处理的大鼠胰腺组织iNOS的含量显著下降, 可能是NAC通过抑制NF- κ B激活, 从而抑制了胰腺组织iNOS表达的结果. iNOS在正常生理条件下并不表达, 只有在炎症等病理条件下细胞受到多种刺激物如脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素、白介素-1(IL-1)等刺激诱导下, 启动定位于第17对常染色体上的II型iNOS基因转录合成^[22-23]; 但iNOS的转录合成还受到NF- κ B的调控^[24-25]; iNOS表达的调控主要发生在转录水平, iNOS基因的启动子区域含有多个转录因子的结合位点包括NF- κ B^[26-27], 要诱导iNOS的表达, 必须有NF- κ B的激活^[28-29]. 本研究发现, C组各时点胰腺腺泡核内NF- κ B浓度无明显升高, 各时点胰腺组织匀浆iNOS活性均未能检出; A组NF- κ B浓度急剧升高后, iNOS活性也明显升高. 应用抗氧化剂NAC后, NF- κ B浓度明显下降, iNOS的活性也降低, 与文献[17, 30]报道基本一致; 提示NAC通过抑制NF- κ B的激活而有效抑制iNOS的表达, 因此, 抗氧化剂可能成为急性胰腺炎治疗中具有应用前景的一类药物.

4 参考文献

- Liu TH, Kwong KL, Tamm EP, Gill BS, Brown SD, Mercer DW. Acute pancreatitis in intensive care unit patients: value of clinical and radiologic prognosticators at predicting clinical course and outcome. *Crit Care Med* 2003;31:1026-1030
- Slavin J, Ghaneh P, Sutton R, Hartley M, Rowlands P, Garvey C, Hughes M, Neoptolemos J. Management of necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7:476-481
- Halonen KI, Pettila V, Leppaniemi AK, Kempainen EA, Puolakkainen PA, Haapiainen RK. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2002;30:1274-1279
- Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Effects of time interval for hemofiltration on the prognosis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:373-376
- Zhang WZ, Han TQ, Tang YQ, Zhang SD. Rapid detection of sepsis complicating acute necrotizing pancreatitis using polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol* 2001;7:289-292
- Chen QP. Enteral nutrition and acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7:185-192
- Bhansali SK, Shah SC, Desai SB, Sunawala JD. Infected necrosis complicating acute pancreatitis: experience with 131 cases. *Indian J Gastroenterol* 2003;22:7-10
- 金世龙, 侯庆福, 顾红光, 王仁云, 廖维健. 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎120例. *世界华人消化杂志* 2003;11:494-496
- 夏时海, 全金梅, 乔爱军, 张伟龙, 任万英, 郭萍, 赵晓晏. 生长抑素衍生物善宁加倍剂量治疗重症急性胰腺炎的疗效研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1157-1161
- Wang H, Li WQ, Zhou W, Li N, Li JS. Clinical effects of continuous high volume hemofiltration on severe acute pancreatitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:2096-2099
- Zhou ZG, Chen YD, Sun W, Chen Z. Pancreatic microcirculatory impairment in experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2002; 8:933-936
- 李永渝, 高占峰. 急性胰腺炎与核因子- κ B. *世界华人消化杂志* 2001;9:420-421
- 王彩花, 钱可大, 朱永良, 唐训球. 急性胰腺炎患者TNF和IL-6变化的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1434
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Centorrino T, Ciccolo A, Van de Loo FA, Britti D, Caputi AP, Thiemermann C. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein. *Shock* 2002; 17:416-422
- Ayub K, Serracino Inglott F, Williamson RC, Mathie RT. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion. *Br J Surg* 2001;88:1189-1193
- Ma L, Qian S, Liang X, Wang L, Woodward JE, Giannoukakis N, Robbins PD, Bertera S, Trucco M, Fung JJ, Lu L. Prevention of diabetes in NOD mice by administration of dendritic cells deficient in nuclear transcription factor-kappaB activity. *Diabetes* 2003;52:1976-1985
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Ciccolo A, Centorrino T, De-Sarro A, Caputi AP. Protective effects of N-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *FASEB J* 2001;15:1187-1200
- Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandolfi SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1197-1208
- Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001;96:56-67
- 黄新莉, 凌亦凌. N-乙酰半胱氨酸对肺损伤的抗氧化治疗作用. *国外医学·呼吸分册* 2001;21:64-65
- Li J, Quan N, Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine normalizes lipopolysaccharide-induced nuclear factor kappaB activation and proinflammatory cytokine production during early rehabilitation of protein malnourished mice. *J Nutr* 2002; 132:3286-3292
- Pearse DD, Chatzipanteli K, Marcillo AE, Bunge MB, Dietrich WD. Comparison of iNOS inhibition by antisense and pharmacological inhibitors after spinal cord injury. *J Neuropathol Experimental Neurol* 2003;62:1096
- Marsden PA, Heng HH, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS₂) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 1994; 19:183-185
- Azevedo Martins AK, Lortz S, Lenzen S, Curi R, Eizirik DL, Tiedge M. Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 2003; 52:93-101
- Korhonen R, Korpela R, Moilanen E. Signalling mechanisms involved in the induction of inducible nitric oxide synthase by Lactobacillus rhamnosus GG, endotoxin, and lipoteichoic acid. *Inflammation* 2002;26:207-214
- Tran VV, Chen G, Newgard CB, Hohmeier HE. Discrete and complementary mechanisms of protection of beta-cells against cytokine-induced and oxidative damage achieved by bcl-2 overexpression and a cytokine selection strategy. *Diabetes* 2003;52:1423-1432
- Lo AH, Liang YC, Lin Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 2002;23:983-991
- Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, Eizirik DL. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes* 2001;50:2219-2224
- Zhang H, Snead C, Catravas JD. Nitric oxide differentially regulates induction of type II nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells versus macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:529-535
- 刘清行, 金惠铭, 吴朝辉, 陈愉, 刘凯. 抗氧化剂和NF κ B对大鼠肺微血管内皮细胞iNOS表达的影响. *中国病理生理杂志* 2000; 16:20-23

铁剂诱发大鼠肝纤维化的组织学变化

徐光福, 葛桂玲, 李澎涛, 田德禄, 姜良铎, 杨晋祥

徐光福, 田德禄, 姜良铎, 杨晋祥, 北京中医药大学附属东直门医院消化内科 北京市 100700
葛桂玲, 北京中医药大学中心电镜室 北京市 100029
李澎涛, 北京中医药大学基础医学院 北京市 100029
徐光福, 男, 1962-08-02 生, 山东省淄博市人, 汉族, 1982 年武汉冶金科技大学医学院学士, 1989 年华西医科大学硕士, 2001 年上海中医药大学肝病研究所博士, 现为东直门医院消化内科出站博士后, 副主任医师, 从事中医药防治慢性肝病、逆转肝纤维化和肝硬化的临床和实验研究, 主要研究领域为细胞外基质、基质金属蛋白酶及其抑制物家族。
项目负责人: 徐光福, 100700, 北京市, 北京中医药大学附属东直门医院消化内科. guangfuxu@hotmail.com
电话: 010-84290755
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-10-07

Changes of hepatic fibrosis induced by iron overload in SD rats

Guang-Fu Xu, Gui-Ling Ge, Peng-Tao Li, De-Lu Tian, Liang-Duo Jiang, Jin-Xiang Yang

Guang-Fu Xu, De-Lu Tian, Liang-Duo Jiang, Jin-Xiang Yang, Dongzhimen Hospital of Beijing TCM University, Beijing 100700, China
Gui-Ling Ge, Electron Microscopy Research Center of Beijing TCM University, Beijing 100029, China
Peng-Tao Li, Basic Medicine College, Beijing TCM University, Beijing 100029, China
Correspondence to: Dr. Guang-Fu Xu, Department of Digestive Diseases, Dongzhimen Hospital, Beijing TCM University, Beijing 100700, China. guangfuxu@hotmail.com
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-10-07

Abstract

AIM: To study the histological changes of hepatic fibrosis induced by diet iron overload in SD rats.

METHODS: After living on an iron overload in diet for 63 days, the male SD rats were decollated and the livers were harvested to examine the liver indexes, morphology of hepatocytes, hepatic stellate cells (HSC), sinusoidal endothelial cells, sinusoid, peri-sinusoid, and distribution of collagen type III and laminin were also observed.

RESULTS: On model rats there were coagulation necrosis of hepatocytes, activated HSC, sinusoidal endothelial cells with less fenestrae, sinusoidal capillarization and light peri-sinusoid fibrosis, thickened basement of central vein, more collagen types I and II and laminin than those in normal controls.

CONCLUSION: Iron overload in diet for some time can injure hepatocytes, activate HSC, decrease the fenestrae of sinusoidal endothelial cell, and result in sinusoidal capillarization and peri-sinusoid fibrosis. It may be better to establish an ALD model with iron overload in diet.

Xu GF, Ge GL, Li PT, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Changes of hepatic fibrosis induced by iron overload in SD rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):714-718

摘要

目的: 探讨饮食中铁过载诱导肝组织纤维化形成的组织学变化。

方法: 采用 ♂ SD 大鼠, 在饮食中适量添加铁, 共饲喂 9 wk, 然后处死动物, 收取肝组织, 分别在石蜡切片和透射电镜下观察肝组织损害、肝窦毛细血管化和窦周纤维化形成以及 I、IV 型胶原和 Laminin 的分布情况。

结果: 铁剂组大鼠可见肝细胞凝固坏死, 星状细胞活化, 肝窦毛细血管化和轻微窦周纤维化, I 型胶原和 laminin 含量增多, 中央静脉基底膜增厚。

结论: 饮食中铁过载持续一定时间可损害肝细胞, 激活肝星状细胞, 减少窦内皮细胞的窗孔, 导致肝窦毛细血管化和窦周肝纤维化, 故酒精性肝病造模可考虑配合使用。

徐光福, 葛桂玲, 李澎涛, 田德禄, 姜良铎, 杨晋祥. 铁剂诱发大鼠肝纤维化的组织学变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):714-718

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/714.asp>

0 引言

酒精性肝病模型大致可分成酒精灌胃和 Tsukamoto-French 模型两种, 前者需要每天灌胃数次, 对动物损害较大, 操作不熟练易造成意外死亡; 各单位对每天应该给予的酒精量尚未得出一致意见, 主要问题是酒精量小不易成模, 酒精量大动物容易死亡, 导致造模失败, 而且常需要在酒精之外添加辅助材料如吡啶或者玉米油、羧基铁之类才能较易成模, 不如纯酒精造成者更有说服力, 但操作简便、成本较低是其优点. Tsukamoto-French 模型需要一次手术和附加设备, 除此之外仅需酒精即可, 不需添加辅助材料, 优势明显但价格昂贵, 国内尚未广泛采用. 铁过载可以促进脂质过氧化, 导致氧化应激, 破坏生物膜完整性并妨碍线粒体呼吸链电子传递, 造成细胞器质性损害和 ATP 下降, 并可以活化肝星状细胞, 甚至造成严重的肝纤维化和肝硬化. 轻微铁过载对肝脏的影响尚未见详细报道, 我们的酒精性肝病模型采用了添加羧基铁的办法, 为了阐明其在酒精性肝病模型形成中的作用, 我们探讨适量铁过载诱发肝纤维化的组织学变化如下。

1 材料和方法

1.1 材料 北京维通利华公司 SD ♂ 大鼠, 体质量 130-

150 g. 羰基铁(carbonyl iron)购自美国Sigma公司; 多克隆一抗 type I, IV collagen 和 laminin 均购自美国抗体诊断公司(antibody diagnostic inc, ADI), 由上海长岛抗体诊断试剂公司经销. PV-6001 Kits 为美国 PowerVision 公司产品, 显色剂 ZLI-9030, 防脱片剂 ZLI9001, 均购自北京中山公司.

1.2 方法 动物设正常组 6 只, 铁剂组 6 只. 采用正常饲料喂养, 辅以混合试剂灌胃的方法, 羰基铁 35 mg/kg, 麦芽糊精和黄原胶适量, 每周灌 5 d, 休 2 d, 自由进食、水, 共 9 wk. 第 9 wk 末由下腔静脉放血处死动物, 自肝边缘垂直向内剪取 3-5 mm 宽的右叶组织, 取靠近边缘横切 1 mm³ 以 30 g/L 戊二醛固定液固定作透射电镜标本, 再横切 3-5 mm³ 组织以 100 g/L 甲醛固定, 按常规制作光镜切片, 厚 4 μ m, 作 HE, Masson 三色染色及免疫组化染色, 用美国 3Y 公司产品 MIS-2000 图像分析系统进行光镜观察、拍照并使用自带软件作图像分析半定量. 按常规制作透射电镜切片, 厚 80 nm, 在 80KV JEM-1200EX 电子显微镜下观察超微结构并照相.

统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件对数据进行方差分析.

2 结果

2.1 电镜 正常肝细胞核清晰, 圆形, 染色质疏密均匀, 胞内无铁质沉积, 线粒体正常大小, 嵴清楚, 粗面内质网围绕胞核排列, 可见大量糖原. 狄氏间隙星状细胞不明显, 内皮细胞有多数筛孔, 外部未见明显基底膜和胶原原纤维, 由肝细胞的微绒毛紧密接触. 铁剂组肝细胞核发生皱缩变形, 线粒体普遍肿胀, 无嵴, 粗面内质网数量减少, 结构紊乱, 可见铁颗粒沉积于肝细胞内, 肝细胞微绒毛增粗变短或者断裂. 肝星状细胞核清晰、深染, 染色质较粗大靠近核周边, 在细胞附近可见大量胶原原纤维. 血窦内皮细胞多数胞质疏松、水肿, 胞质中易见致密状包含体, 其形态为类圆形、数个至十余个不等, 由单层膜包绕, 筛孔减少或消失, 外周被清晰完整的基底膜包绕, 基底膜外尚可见胶原原纤维(图 1-3).

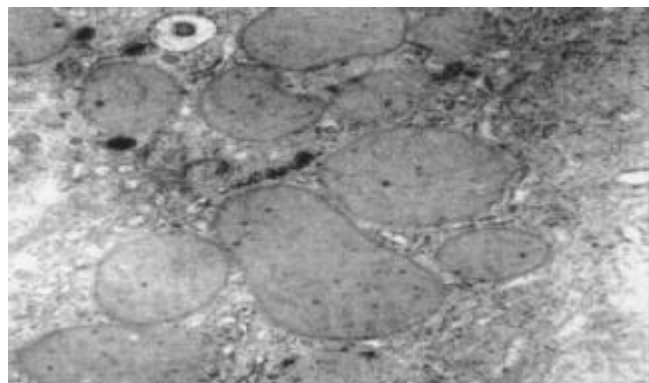


图 1 肝细胞内线粒体肿胀、嵴丢失、铁颗粒沉积和紊乱的内质网. $\times 10\ 000$ 倍.

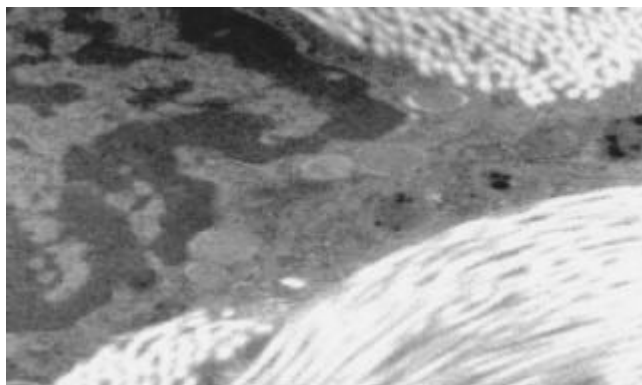


图 2 活化 HSC, 可见铁颗粒沉积、肿胀无嵴线粒体和细胞周围大量胶原原纤维. $\times 8\ 000$ 倍.

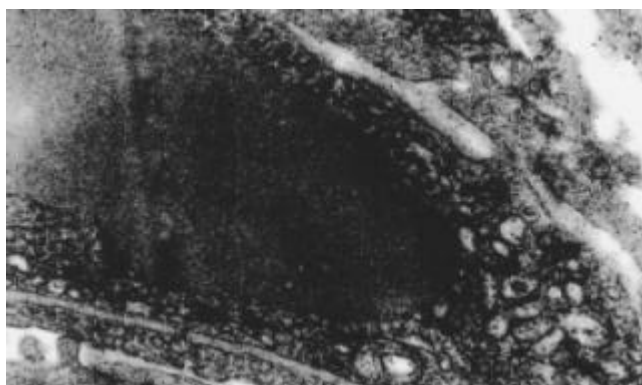


图 3 肝窦内皮细胞内部可见颗粒物, 细胞外基底膜连续清晰. $\times 6\ 000$ 倍.

2.2 光镜 HE 染色 正常肝组织肝索排列清晰、整齐, 肝细胞含多数糖元, 并呈现异型性. 中央静脉基底膜不可见, 汇管区结构正常. 铁剂组可见汇管区略微增宽, 管道的基膜增厚. 肝索结构基本保留, 但肝细胞结构不清, 细胞皱缩, 少量凝固坏死和炎细胞浸润, 间质细胞增生活跃(图 4, 5).

2.3 HE - Masson 复合染色 正常组肝组织结构同前所见, 中央静脉基底膜仅见轻微染色, 肝细胞周围阳性染色基本不可见. 铁剂组中央静脉基底膜明显增厚, 并与轻微窦周纤维化的纤维互相连续, 肝细胞凝固坏死和部分脂肪变性, 但肝索结构基本保留(图 6, 7).

2.4 免疫组化染色 正常肝组织有一定量 I 型胶原存在, 但分布不均匀, 靠近肝腺泡 III 区较少, 而靠近肝腺泡 I 区较明显. 铁剂组则明显增多而两个区域无明显差别(图 8, 9). IV 型胶原在正常组有一定含量, 分布无明显差异, 铁剂组略为增多, 但无显著性差异(图 10, 11). Laminin 在正常组染色很弱, 铁剂组则明显增多, 且分布均匀(图 12, 13, 表 1).

表 1 大鼠肝组织 I, IV 型胶原和 Laminin 的比较($\times 1\ 000$)

分组	I 型胶原	IV 型胶原	Laminin
正常组	287.4 \pm 22.4	342.1 \pm 21.6	226.3 \pm 0.01
铁剂组	370.1 \pm 21.0 ^a	375.7 \pm 6.1	18.8 \pm 21.5 ^a

^aP < 0.05 vs 正常组.

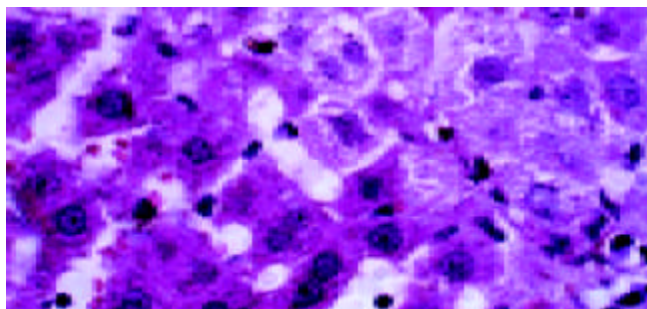


图4 正常肝组织, 肝细胞轮廓丰满, 排列整齐. HE 染色, $\times 400$ 倍.

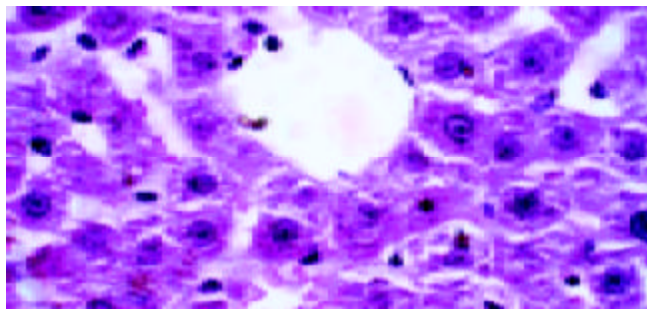


图5 铁剂组肝组织, 肝细胞皱缩但排列尚整齐. HE 染色, $\times 400$ 倍.

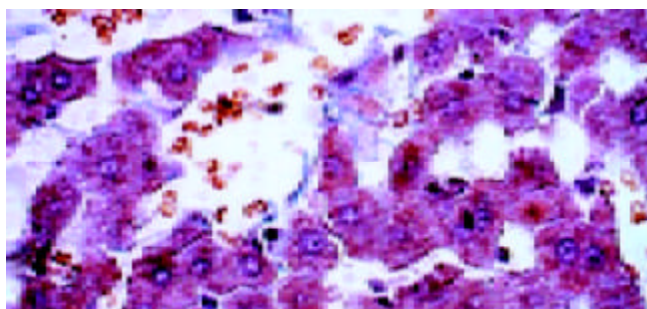


图6 正常肝组织, 中央静脉基底膜仅见轻微染色, 肝窦之间基本无阳性染色, 肝细胞排列整齐. Masson-HE 复合染色, $\times 400$ 倍.

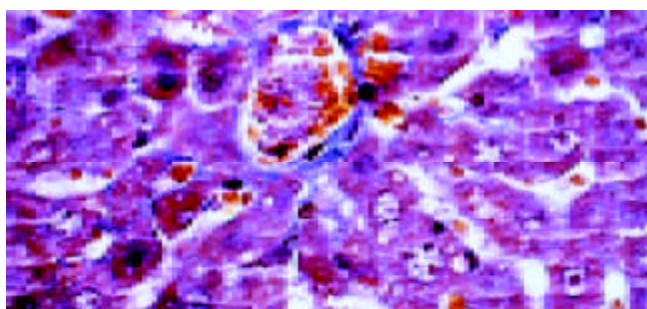


图7 铁剂组肝组织, 中央基底膜阳性染色明显增厚, 并与肝窦间相连, 肝细胞脂肪变性, 但排列尚整齐.



图8 正常肝组织 I 型胶原免疫组化染色, 肝腺泡三区较少. Envision 二步法, $\times 200$ 倍.



图9 铁剂组肝组织 I 型胶原染色, 分布均匀. Envision 二步法, $\times 200$ 倍.

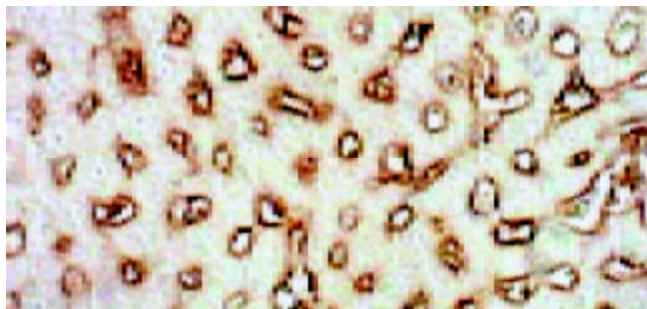


图10 正常组IV型胶原免疫组化染色, 分布均匀. Envision 二步法, $\times 200$ 倍.



图11 铁剂组肝组织IV型胶原免疫组化染色, 分布均匀. Envision 二步法, $\times 200$ 倍.

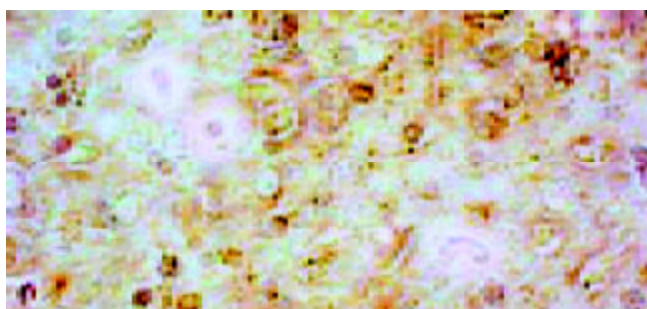


图12 正常组肝组织层粘蛋白免疫组化染色很轻微, Envision 二步法, $\times 200$ 倍.

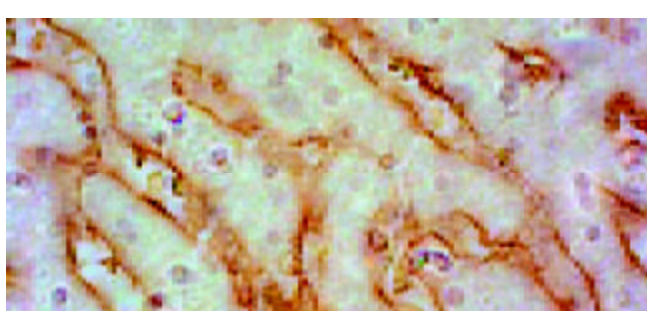


图13 铁剂组肝组织层粘蛋白免疫组化染色明显增多, 分布均匀, $\times 400$ 倍.

3 讨论

缺铁导致的贫血、免疫功能和注意力低下、经常性头痛和末梢神经障碍等, 在上世纪得到全球高度重视. 已经证明改善膳食结构、使用铁强化食品等可以改善缺铁状态. 以前人们认为身体内储存的铁无害, 然而近年研究发现并非如此. 人类可由于大量食用铁强化食品、使用铁制炊具、超量服用抗坏血酸, 饮用柠檬酸, 嗜酒、输血、胰岛素抵抗^[1-3]等而导致体内铁过多. 人体流行病学调查和动物实验都显示铁过多与心脏病、肿瘤、糖尿病、关节炎、骨质疏松症、肝硬化等有关^[4-6].

铁过载造成肝脏损害的经典例子是遗传性血色病 (genetic hemochromatosis). 近年有学者研究铁过载造成肝纤维化的机制, 如 Bridle et al^[7]报道铁离子沉积本身可以引起炎症反应, 并可以检测到细胞因子如白介素 10、CD3、TGF- β 1、TNF- α 、 γ -干扰素、CD68、CD45RO 等的变化. 遗传性血色病基因的杂合子表现出更容易受到铁过载的不良影响, 并会不同程度的加重其他疾病的病情. 已经有研究报道^[8-9]该基因表达与其他疾病的关系. 机体没有该基因, 仅仅饮食中铁过载造成肝脏损害的机制和后果尚不很清楚; 另外铁的作用位点意见不尽一致, 如 Kim et al^[10]报道肝硬化患者铁在肝细胞的沉积含量与门静脉周围感染或者碎屑样坏死的严重程度没有关系. Grizzi et al^[11]发现铁过载可以严重损害肝脏实质和非实质细胞, 并且是主要的肝纤维化促进因子之一. Raynard et al^[12]认为肝脏铁过载在酒精性肝病中是独立的致纤维化因素. Karbownik et al^[13]认为铁可以诱导肝脏微粒体膜的过氧化损害, 有利于癌症发生. Angelucci et al^[14]报道丙型肝炎伴随的铁过载是独立的肝纤维化促进因子. Gardi et al^[15]更证明铁可以在不影响血清因子和不借助脂质过氧化的情况下, 促进胶原合成. 铁还可以促进 HSC 分泌活化的 MMP-2, 如所周知, MMP-2 活化是 HSC 活化的标志, 这更证明了铁是一个 HSC 活化并分泌胶原的启动促进因子. Chitturi et al^[16]认为铁过载可能参与胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝炎的发病, 减少铁含量可能有助于治疗. Huang et al^[17]认为大多数酒精性脂肪肝病均与铁过载有关, 且血清铁和血清层粘蛋白含量关系密切. Parkes et al^[18]报道铁过载导致肝细胞损伤后, 受损肝细胞释放 TGF- β 可能是导致 HSC 发生纤维增生表现的原因. 但其他学者报道^[19-20]氧化应激基因和乙醛结合物仅见于充满铁的间质细胞, HSC 活化和纤维化的发生是因为铁在间质细胞的积聚引起, 线粒体中去铁敏-螯合物池积聚和线粒体氧化代谢机制受损、ATP 下降, 而附近的肝细胞则幸免. Arezzini et al^[21]报道单独接受铁添加的小鼠表现为轻度肝纤维化, 但铁促进亚毒性剂量 CCl₄ 所造成的肝硬化. Brittenham^[22]报道铁和酒精可从受损肝细胞、库普弗细胞、HSC 和细胞外基质等方面互相加重并促进肝纤维化, 而且对细胞器的氧化应激损害可能已经影响到信号传导水平. Fiorelli et al^[23]认为非转铁蛋白结合铁在诱

导脂质过氧化方面较抗氧化剂屏障功能下降更加重要, 即使在细胞还原剂 NADPH 存在的情况下, 非转铁蛋白结合铁亦可以参与自由基反应. DeFeo et al^[24]也发现非转铁蛋白结合铁在肝硬化患者较非肝硬化患者要高得多, 证实铁在酒精性肝硬化形成中具有特殊作用. 早有学者证实铁过载可以导致沙土鼠肝脏线粒体不可逆性损伤, 而铁螯合剂口服^[25]对人类铁过载初步显示有较好防治效果, 也反证铁过载的致病作用.

上述研究结果的不尽一致说明该领域需要更多的资料. 二价铁离子可导致线粒体膜脂质过氧化损伤, 使其呼吸链障碍, ATP 产生减少, 线粒体肿胀, 嵴丢失等. 三价铁离子诱发肝细胞微粒体膜硬化和脂质过氧化, 并降低膜的流动性, 细胞可发生过氧化损伤甚至癌变. 铁可催化超氧化物阴离子的羟化反应, 自由基产生增多导致氧化应激, 损害生物膜和蛋白质, 还可能损害 DNA, 增加发生肿瘤、动脉硬化和心力衰竭的危险, 或至少损害心血管系统. 微粒体脂质过氧化可产生丙二醛, 10 种微粒体蛋白质可与丙二醛形成加合物, 并导致细胞损伤、铁质沉着症、肝细胞坏死、ALT 上升、肝组织羟脯氨酸含量上升等, 甚至会损害红细胞. 我们的观察发现铁剂可对大鼠肝细胞造成损害, 表现为线粒体肿胀、嵴消失, 细胞核皱缩变形, 粗面内质网紊乱断裂等, 进一步证明铁对肝细胞的直接毒性作用. 铁颗粒在肝细胞内的沉积和病变同时发生是直接证据. HE 染色切片显示肝细胞呈凝固变性、坏死等也提供佐证. 肝细胞损伤机制可能与脂质过氧化和氧化应激有关, 后二者可引起肝细胞脂质代谢紊乱, 部分肝细胞的脂肪变性可能通过此种机制而形成. 本实验还发现 HSC 活化并分泌大量胶原原纤维非常明显, 但 HSC 内部铁颗粒较少, 线粒体肿胀、嵴丢失同样存在, 铁可能直接激活 HSC, 同时肝细胞损伤所释放的细胞因子也可以导致 HSC 活化, 我们倾向于这两种机制同时存在. 另外观察到肝窦内皮细胞的内含物囊泡较多, 据报道这也是一个内皮细胞活化的征象, 象征着肝窦毛细血管化.

国外学者发现酒精可增加铁的摄入和沉积, 组织化学染色显示酒精摄入导致三价铁在小叶中心集聚. 铁和酒精可协同引起脂质过氧化和纤维化, 铁过载可单独引起, 随后酒精可加强之, 二者可共同增加肝细胞损害和纤维化进程. 但也有学者认为饮酒与铁吸收增多无关. 晚近有学者报道铁沉积诱发的脂质过氧化发生在肝窦内皮细胞, 特别是 1 区的窦内皮细胞多见; 而脂肪变性所诱发者则作用于肝腺泡三区肝细胞, 其促进纤维化形成机制与铁过载所引起者不同, 说明铁过载是一个单独的肝纤维化诱发因素. 有学者证实铁染色积分是相对独立的酒精性肝病肝纤维化诱发因素. 嗜酒者血清中存在一种非转铁蛋白结合的铁, 饮酒量越多则含量越高, 并且肝硬化也越重, 说明饮酒能增加铁的摄入是确实的. 因此考虑在酒精性肝病模型制造中添加铁, 有其合理方面.

铁能通过肝脏细胞的脂质过氧化和氧化应激途径诱

发 HSC 活化, 而脂质过氧化和氧化应激是肝纤维化的诱发因素. 本实验透射电镜观察到铁剂组肝HSC细胞核染色质变粗深染, 细胞体丰满, 细胞外堆积大量胶原纤维, 显示 HSC 已经活化并强化了合成分泌功能. HE 染色显示间质细胞核深染可能与此有关, Masson-HE 染色发现中央静脉基底膜增厚并与肝细胞周围窦周纤维化相连接等, 与此吻合. 正常肝组织 I 型胶原有一定含量, 但肝腺泡 III 区很少, 铁剂组则明显增多, 说明铁过载可增加肝腺泡 III 区的 I 型胶原含量, 这可能作为主要成分参与了窦周纤维化的形成. 通常认为 IV 型胶原和 laminin 是构成肝窦基底膜的主要成分^[26-27], 我们观察到正常基底膜 IV 型胶原有一定含量, 铁剂组略有增多, 但无统计学差异, 说明轻微铁过载对基底膜 IV 型胶原代谢影响不大, 这一点与混合酒精灌胃饮料所引起者不同, 虽然该饮料含有铁, 但在致病机制方面有差别, 铁不能代替该饮料(全文另发). laminin 正常时染色较弱, 结果与大多数学者报道一致, 说明正常的肝窦基底膜以 IV 型胶原为主组成, 但电镜下不可见; 铁剂组 laminin 含量明显增多, 提示本模型肝窦基底膜形成可能主要归因于 laminin 增多所致. 肝窦毛细血管瘤化包括肝窦内皮的失窗孔和基底膜形成两大变化, 我们观察证实此点, 说明轻微铁过载本身可诱发酒精性肝病特征性病理变化如窦周纤维化和肝窦毛细血管瘤化, 而细胞组织的坏死并不严重, 仅有个别肝细胞点状凝固坏死发生, 肝小叶结构得以较完整保留, 这对明铁在酒精性肝病形成中有特殊作用. 接受单纯饮食中铁过载的动物整体表现如精神状态、体质量增加速度等未发现与正常动物有差异, 说明轻微铁过载在临床上可能不易察觉. 我们的结论是: 饮食中轻微铁过载可以损伤肝细胞, 激活 HSC, 并引起肝纤维化和肝窦毛细血管瘤化; 在酒精性肝病模型制造中添加铁过载因素有其合理性, 可能会缩短造模时间, 但肝损害加重是否影响动物生命安全, 导致造模失败则有待观察, 合适的剂量可能是关键所在. 此外, 铁诱发肝纤维化的机制值得进一步探讨.

4 参考文献

- Guillygomarc'h A, Mendler MH, Moirand R, Laine F, Quentin V, David V, Brissot P, Deugnier Y. Venesection therapy of insulin resistance-associated hepatic iron overload. *J Hepatol* 2001;35:344-349
- Turlin B, Mendler MH, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol* 2001;116:263-270
- Chitturi S, George J. Interaction of iron, insulin resistance, and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5:18-25
- 周宏元, 毛福英, 彭开良, 柯文棋. 铁摄入过量对肝脏损害的研究概况. *海军医学杂志* 2001;22:358-362
- Schumann K. Safety aspects of iron in food. *Ann Nutr Metab* 2001;45:91-101
- Huang CW, Bai L. Iron overload and liver diseases. *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao* 2002;22:370-371
- Bridle KR, Crawford DH, Fletcher LM, Smith JL, Powell LW,

- Ramm GA. Evidence for a sub-morphological inflammatory process in the liver in haemochromatosis. *J Hepatol* 2003;38: 426-433
- Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003;124: 318-26
- Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol* 2003;30: 137-144
- Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Kim JH, Pasqualin D, Rubin R. Hepatic iron deposition on magnetic resonance imaging: correlation with inflammatory activity. *J Comput Assist Tomogr* 2002;26:988-993
- Grizzi F, Ceva-Grimaldi G, Franceschini B, Roncalli M, Chiriva-Internati M, Dioguardi N. Simultaneous staining of cytoplasmic iron and collagen matrix in human liver biopsy specimens. *Eur J Histochem* 2002;46:101-104
- Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, Naveau S. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2002;35:635-638
- Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Cabrera J, Burkhardt S, Osuna C, Lewinski A. Indole-3-propionic acid, a melatonin-related molecule, protects hepatic microsomal membranes from iron-induced oxidative damage: relevance to cancer reduction. *J Cell Biochem* 2001;81:507-513
- Angelucci E, Muretto P, Nicolucci A, Baronciani D, Erer B, Gaziev J, Ripalti M, Sodani P, Tomassoni S, Visani G, Lucarelli G. Effects of iron overload and hepatitis C virus positivity in determining progression of liver fibrosis in thalassemia following bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:17-21
- Gardi C, Arezzini B, Fortino V, Comporti M. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1139-1145
- Chitturi S, George J. Interaction of iron, insulin resistance, and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5: 18-25
- Huang CW, Bai L, Cai JJ, Guo W, Lan L. Relationship of serum iron and ferritin with the indicators for hepatic fibrosis. *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao* 2003;23:466-468
- Parkes JG, Templeton DM. Modulation of stellate cell proliferation and gene expression by rat hepatocytes: effect of toxic iron overload. *Toxicol Lett* 2003;144:225-233
- Pietrangolo A, Montosi G, Garuti C, Contri M, Giovannini F, Ceccarelli D, Masini A. Iron-induced oxidant stress in nonparenchymal liver cells: mitochondrial derangement and fibrosis in acutely iron-dosed gerbils and its prevention by silybin. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34:67-79
- Masini A, Ceccarelli D, Giovannini F, Montosi G, Garuti C, Pietrangolo A. Iron-induced oxidant stress leads to irreversible mitochondrial dysfunctions and fibrosis in the liver of chronic iron-dosed gerbils. The effect of silybin. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:175-182
- Arezzini B, Lunghi B, Lungarella G, Gardi C. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:486-495
- Brittenham GM. Iron chelators and iron toxicity. *Alcohol* 2003; 30:151-158
- Fiorelli G, De Feo TM, Duca L, Tavazzi D, Nava I, Fargion S, Cappellini MD. Red blood cell antioxidant and iron status in alcoholic and nonalcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 2002;32 (Suppl 1):21-27
- De Feo TM, Fargion S, Duca L, Cesana BM, Boncinelli L, Lozza P, Cappellini MD, Fiorelli G. Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1494-1499
- Merson L, Olivier N. Orally active iron chelators. *Blood Rev* 2002;16:127-134
- 肖文君, 王一平, 刘小菁, 黄明慧, 甘涛. 层粘连蛋白及其整合素受体在肝窦毛细血管瘤化时的协调表达. *中华内科杂志* 2001;40: 618-620
- 肖文君, 王一平, 刘小菁, 黄明慧, 甘涛. 整合素 α_6 在肝窦毛细血管瘤化中的表达. *中华肝病杂志* 2002;10:90-92

脾气虚证患者血浆和组织中 SS、Mot、CCK 的变化

任平, 黄熙, 张航向, 黄裕新, 杨喜忠, 赵保民

任平, 黄熙, 张航向, 杨喜忠, 中国人民解放军第四军医大学附属西京医院 陕西省西安市 710032
黄裕新, 赵保民, 中国人民解放军第四军医大学附属唐都医院 陕西省西安市 710038
任平, 女, 1962-11-28 生, 重庆市人, 汉族, 1984 湖南中医学院本科毕业, 1991 年第四军医大学硕士毕业, 副主任医师, 副教授, 主要从事中西医结合本质中药临床药理学研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30271648
国家中医药管理局资助课题, No. 02-03JP45
项目负责人: 任平, 710032, 陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军第四军医大学附属西京医院老年病一科。tcmwsh@fmmu.edu.cn
电话: 029-3375956
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-07

Changes of somatostatin, motilin and cholecystokinin in gastric antrum tissue and plasma in patients with spleen-asthenia

Ping Ren, Xi Huang, Hang-Xiang Zhang, Yu-Xin Huang, Xi-Zong Yang, Bao-Ming Zhao

Ping Ren, Xi Huang, Hang-Xiang Zhang, Xi-Zong Yang, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China
Yu-Xin Huang, Bao-Ming Zhao, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China
Supported by Natural Science Foundation of China and the Administrative Bureau Foundation of the Chinese Medicine and Pharmacology
Correspondence to: Dr. Ping Ren, The First Department of Geriatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China. tcmwsh@fmmu.edu.cn
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-10-07

Abstract

AIM: To explore the objective quantitative index of spleen-asthenia by investigating the effects of Sijunzhi decoction on the somatostatin, motilin and cholecystokinin in gastric antrum tissues and plasma in patients with spleen-asthenia.

METHODS: The levels of somatostatin (SS), motilin (Mot) and cholecystokinin (CCK) in gastric antrum tissues and plasma in patients with spleen-asthenia and stomach-heat were observed before and after treatment by RIA, respectively.

RESULTS: Compared with the stomach-heat and the spleen-asthenia treated by Sijunzhi decoction, patients with spleen-asthenia before the treatment had significantly higher level of motilin both in the tissues and plasma ("tissus" 109.4 ± 18.9 ng/g vs 219.8 ± 25.3 ng/g, and 183.0 ± 23.9 ng/g; plasma: 61.7 ± 10.6 ng/L vs 171.4 ± 30.8 ng/L, and 126.3 ± 24.6 ng/L) ($P < 0.01$); The SS contents in the tissues and plasma were increased "antrum" 224.3 ± 67.9 ng/g vs 80.2 ± 25.6 ng/g, and 114.2 ± 34.5 ng/g; plasma: 74.5 ± 17.2 ng/L vs 30.3 ± 11.8 ng/L, and 38.1 ± 12.7 ng/L ($P < 0.01$); The CCK levels in gastric antrum and plasma were also arisen (tissues: 34.1 ± 5.2 ng/g vs 21.6 ± 4.7 ng/g, and 29.8 ± 6.8 ng/g; plasma: 5.8 ± 0.4 ng/L vs 3.7 ± 0.6 ng/L, and $2.9 \pm$

0.8 ng/L) ($P < 0.01$). The contents of Mot, SS and CCK in patients with stomach-heat were not significantly changed ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The contents of Mot, SS and CCK may have important values in the clinical diagnosis and treatment for patients with spleen-asthenia.

Ren P, Huang X, Zhang HX, Huang YX, Yang XZ, Zhao BM. Changes of somatostatin, motilin and cholecystokinin in gastric antrum tissue and plasma in patients with spleen-asthenia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):719-722

摘要

目的: 通过观察四君子汤对脾气虚证患者血浆和胃窦黏膜组织中胃动素(Mot)、生长抑素(SS)、胆囊收缩素(CCK)的影响, 探讨脾气虚证临床辨证的客观定量指标。

方法: 用放射免疫分析法(RIA)动态观察服药前后脾气虚证和胃热炽盛患者血浆和胃窦黏膜组织中 Mot、SS 和 CCK 的变化。

结果: (a)脾气虚证患者组织及血浆中 Mot 水平服药前显著低于胃热炽盛组及服药后, (胃窦组织: 109.4 ± 18.9 ng/g vs 219.8 ± 25.3 ng/g 及 183.0 ± 23.9 ng/g; 血浆: 61.7 ± 10.6 ng/L vs 171.4 ± 30.8 ng/L 及 126.3 ± 24.6 ng/L) ($P < 0.01$); (b)脾气虚证患者组织和血浆中 SS 含量服药前显著高于胃热炽盛组及服药后, (胃窦黏膜: 224.3 ± 67.9 ng/g vs 80.2 ± 25.6 ng/g 及 114.2 ± 34.5 ng/g; 血浆: 74.5 ± 17.2 ng/L vs 30.3 ± 11.8 ng/L 及 38.1 ± 12.7 ng/L) ($P < 0.01$); (c)脾气虚证患者组织和血浆中 CCK 含量服药前显著高于胃热炽盛组及服药后, (胃窦黏膜组织: 34.1 ± 5.2 ng/g vs 21.6 ± 4.7 ng/g 及 29.8 ± 6.8 ng/g; 血浆: 5.8 ± 0.4 ng/L vs 3.7 ± 0.6 ng/L 及 2.9 ± 0.8 ng/L) ($P < 0.01$); (d)胃热炽盛组在服药后 Mot、SS 和 CCK 在血浆和组织中的含量变化不明显 ($P > 0.05$) (数字略)。

结论: Mot、SS 和 CCK 的浓度变化对脾气虚证的临床辨证施治可能有重要的参考价值。

任平, 黄熙, 张航向, 黄裕新, 杨喜忠, 赵保民. 脾气虚证患者血浆和组织中 SS、Mot、CCK 的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):719-722
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/719.asp>

0 引言

胃动素(Mot)、生长抑素(SS)、胆囊收缩素(CCK)是三种重要的调节胃肠运动生理功能的脑-肠肽, 可在中枢和外周的不同层面调节胃肠道的功能. 脾虚失健运时

可出现一系列消化系统运动功能的障碍;“脾主运化、脾在志为思、思伤脾”,表明中医脾和脑-肠肽在功能和分布上的众多相似,观察脾虚证患者脑-肠肽浓度的变化成为目前脾虚证本质研究的热点之一.有关脾虚证与 Mot、SS 的研究报道较多,但各家报道不尽一致^[1-19];CCK 与脾虚证的研究主要为即往我们对脾虚动物模型的观察结果^[21-23].为此本研究用 RIA 法测定脾气虚证患者血浆和胃窦黏膜组织中 Mot、SS、CCK 的浓度,并观察补脾益气经典古方四君子汤对他们的调正作用,拟探讨 Mot、SS 和 CCK 的浓度变化对脾气虚证临床辨证施治的意义.

1 材料和方法

1.1 观察对象 2000-04/2003-06 期间我校西京医院中医药研究中心和唐都医院消化内科门诊和住院的患者.采用辨病与辨证结合的分型原则,选择胃镜及西医诊断为慢性胃炎、浅表性胃炎、胃溃疡、胆汁反流性胃炎等而中医诊断为脾气虚、胃热炽盛证者,各证辨证符合“中医虚证辨证参考标准”^[24]及《中医诊断学》的诊断标准.其中辨证符合脾气虚者 32(男 24、女 18 例),年龄 31-63(平均 45 ± 7 岁);辨证符合胃热炽盛证者 30(男 16、女 14 例),年龄 33-61(平均 46 ± 6 岁).各组间性别、年龄比较无显著差异性.以上各组均除外糖尿病、肾病、肝病、恶性肿瘤、心血管疾病、呼衰、胰腺疾病所致的消化功能障碍患者.

1.2 中药方的组成、剂量和制备 四君子汤,红参:炒白术:茯苓:炙甘草为 2:2:2:1; 清胃散,生石膏:知母:栀子:黄芩:大黄为 2:1:1:1:1; 本院中药房提供;将药物于清水中浸泡 30 min,煮沸后,文火煎 30 min,再浓缩至 5 g/ml 浓度水煎液.

1.3 两组患者在经 6 d 洗脱后,分别在服四君子汤和清胃散水煎液(300 ml/d)的前 1 d 和连续服药后的第 20 d,取晨起空腹全血 5 ml,行胃镜检查过程中取胃窦黏膜组织 1-2 块.

1.3.1 血浆标本的收集 (1)试管编号后预先加入 10% EDTA-Na2 和抑肽酶各 75 ul,置于冰箱中 4 °C 预冷,抽取静脉血后混匀;(2)低温离心,1 500 转 \times 15 min;(2)将血浆样本按 0.5 ml/管分装于玻璃试管中,-20 °C 储存备测.组织样本的收集:塑料试管编号,留取后置入 1.5 ml 塑料炮弹管中,立即将炮弹管液氮冻存,后取出置于低温冰箱保存备测.

1.3.2 放射免疫法检测 按试剂盒说明书进行.¹²⁵I - 胃动素放免分析试剂盒:东亚免疫研究所(中国人民解放军总医院,北京),批号:0133;¹²⁵I - 生长抑素放免分析试剂盒:北京海科锐生物技术中心,批号:0104;¹²⁵I - 胆囊收缩素放免分析试剂盒:上海第二军医大学神经生物教研室.

2 结果

2.1 胃动素放免分析结果 服药前脾气虚组(Spleen-Asthenia, SA)血浆及组织中的 Mot 含量较胃热组(Stomach-Heat)显著降低($P < 0.01$),服四君子汤后,血浆及组织中的 Mot 含量明显升高,而胃热炽盛者服药前后 Mot 含量无显著变化($P > 0.05$),见表 1.

表 1 各组患者血浆及胃窦组织中胃动素含量比较

Group	n	gastric antrum		n	plasma	
		前	后		前	后
SA	31	109.4 \pm 18.9 ^a	183.0 \pm 23.9 ^d	32	61.7 \pm 10.6 ^a	126.3 \pm 24.6 ^d
SH	28	219.8 \pm 25.3	202.1 \pm 27.1	30	171.4 \pm 30.8	159.2 \pm 44.6 ^c

^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$ vs SH; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SA.

2.2 生长抑素放免分析结果 脾气虚组血浆及组织中的 SS 含量较胃热组显著升高($P < 0.01$);服四君子汤后,血浆及组织中的 SS 含量明显降低($P < 0.01$),而胃热炽盛者服药前后 SS 含量无显著变化($P > 0.05$),见表 2.

表 2 各组患者血浆及胃窦组织中生长抑素含量

Group	n	gastric antrum		n	plasma	
		前	后		前	后
SA	30	224.3 \pm 67.9 ^a	114.2 \pm 34.5 ^d	32	74.5 \pm 17.2 ^a	40.1 \pm 12.7 ^d
SH	26	80.2 \pm 25.6	85.4 \pm 19.7	30	30.3 \pm 11.8	32.73 \pm 12.4

^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$ vs SH; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SA.

2.3 CCK 放免分析结果 脾气虚组血浆及组织中的 CCK 含量较胃热组显著升高($P < 0.01$);脾气虚组服药后,血浆及组织中的 CCK 含量明显降低($P < 0.01$),而胃热炽盛者服药前后 CCK 含量无显著变化($P > 0.05$),见表 3.

表 3 各组患者血浆及胃窦组织中 CCK 含量

Group	n	gastric antrum		n	plasma	
		前	后		前	后
SA	32	34.1 \pm 5.2 ^a	29.8 \pm 6.8 ^c	32	5.8 \pm 0.4 ^a	8.3 \pm 0.7 ^d
SH	30	21.6 \pm 4.7	27.5 \pm 3.9	30	3.7 \pm 0.6	4.9 \pm 0.8

^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$ vs SH; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SA.

3 讨论

1993 年我们的临床研究发现^[1]:脾虚泄泻患者血浆和十二指肠降段黏膜组织中 Mot 含量显著低于非脾虚泄泻组.2000^[22,25]年我们观察了利血平致短期(利血平作用 7 d)和长期(利血平作用 14 d)脾虚大鼠模型血浆及胃窦、十二指肠球部和空肠组织的 Mot、SS 和 CCK 含量及其内分泌细胞变化,以及四君子汤的调正作用:(14 d 利血平

脾虚大鼠 Mot 的含量(血浆及组织)明显下降($P < 0.05$), 而 SS 和 CCK 在血浆及组织中的含量却升高($P < 0.01$). 本研究在上述研究基础上进一步观察了脾气虚证患者血浆和胃窦组织中 Mot、SS 和 CCK 含量的变化及四君子汤的调正作用, 表明: 比较胃热组, 脾虚证患者血浆和胃窦黏膜组织中的 Mot、SS 和 CCK 含量变化与 14 d 利血平脾虚大鼠 Mot、SS 和 CCK 在血浆及组织中的含量变化趋势一致; 四君子汤 20 d 作用后, 患者在自觉症状改善的同时, Mot、SS 和 CCK 三激素的含量较治疗前有显著变化。

有关这方面的研究, 其他学者也有大量的报道. 如: 毛炯 et al^[4]研究发现脾气虚、脾阴虚患者血浆 Mot 水平均显著增高, 且脾阴虚组显著低于脾气虚组; 贾波 et al^[5]采用大黄苦寒泻下法复制大鼠脾虚模型, 其血浆中胃动素含量明显降低($P < 0.01$); 马建伟 et al^[4]研究发现大鼠脾虚模型血浆、胃窦组织及结肠组织中 SS 含量显著升高, 经治疗后 SS 含量较自然恢复组明显减少, 提示 SS 含量升高可能是脾虚证的病理基础之一; 而智发朝 et al^[7]发现脾虚症患者胃窦黏膜 SS 含量明显降低, 血浆 SS 含量无明显变化; 张万岱 et al^[14-16]报道脾虚证大鼠胃窦黏膜、十二指肠中 SS 增多。

已知胃动素对胃肠运动和胃肠电活动都有强烈的影响: 对胃体、胃窦及幽门不同区域肌细胞均有明显收缩作用, 可促进胃排空, 刺激胃蛋白酶分泌, 使胃黏膜血流增加但不增加胃酸分泌, 可诱发胃强烈收缩和小肠明显的分节运动, 对胃肠内容起清扫作用. 此外胃动素还可影响胆囊收缩运动及刺激胃蛋白酶和胰液的分泌. SS 在体内生理作用主要是对神经传递、腺体分泌、平滑肌收缩和细胞增生的广泛抑制. 他抑制几乎所有已知内、外分泌, 如生长激素、胰岛素、CCK、Mot、甲状腺素、胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰多肽、胃酸、胰外分泌之重碳酸盐等; 抑制胃、肠、胆系收缩; 延长胃肠通过时间^[26-30]. CCK 主要作用方式为内分泌和腔分泌, 其浓度的升高可抑制胃肠电活动、胃酸分泌及胃排空, 中枢 CCK 浓度的升高可抑制食欲. CCK 在肠道运动中主要抑制近端十二指肠蠕动, 促进远端十二指肠和空肠蠕动, 使近端, 远端结肠收缩^[30-31].

由此我们推测: 脾气虚之“脾失健运”的病理生理基础与 Mot、SS 和 CCK 三激素在血浆和组织中的含量变化密切相关. Mot 不足, CCK 升高, 以及 SS 含量增加致抑制胃肠激素释放的作用加强, 均能较好地解释“脾失健运”患者出现的纳差、腹胀、早饱和大便异常等症状. 四君子汤对这三激素具有一定的调正作用. 故 Mot、SS 和 CCK 的浓度变化对脾气虚“脾失健运”的临床辨证施治可能有重要的参考价值. 只是有关这方面的工作值得进一步进行, 如增设健康对照组并规范阳性对照组、加大样本量、拓宽观察证型和疾病种类等。

4 参考文献

- Ren P, Shong GZ, Xiao T, Huang X, Zhang ZB, Hu JL, Shun AH, Li CL. Changs of motilin and PGE₂ in chronic diarrhea patience with spleen deficiency. *Acta Chin Med Pharmacol* 1993; 8:22-25
- Ren P, Shong GZ, Xia T, Huang X, Zhang ZB, Hu JL, Li CL, Miao JY. Relationship between diarrhea with spleen deficiency and motilitin of plasma and intestinal tissue. *Chin J Trad West Med* 1994;14(Suppl):25
- Ren P, Huang X, Jiang YP, Wen AD, Shong GZ. Effect of Sijunzi decoction on motilin and pharmacokinetic characteristics of tetramethylpyrazine in rat model of spleen deficiency syndrome. *Chin J Trad West Med* 1997;17:45-47
- Mao J, Wu YH, Situ JP, Yang WM. Relationship between Piyinxu and the level of Mot in plasma. *Chin J Tradit Western Med* 1994;14:653
- Ja B, Deng ZJ, Huang XS, Liang Y, Li XH, Hu P. Effects of different dispensing of Baizhu Fuling decoction on levels of gastrin, Motilin and vasoactive intestinal peptide in the rat of spleen deficiency. *J Tradit Chin Med* 2002;43:938-940
- Ma JW, Du G, Xu LM, Zhang ZL, Li LP, Jia GX. The study of somatostatin levels in plasma and tissues of rat model of spleen deficiency syndrome. *Liaoning Zhongyi Zazhi* 1992; 19:42
- Zhi FC, Zhang WD, Shong YG. Relationship between somatostatin and spleen deficiency syndrome. *Xin Xiaohuaxue Zazhi* 1993;1:49-50
- Zhang WD, Yao YL, Shong YG. Variation in content of gastrin and somatostatin in experimental model of spleen asthenia syndrome and its significance. *Chin J Trad West Med (Piwei)* 1998;6:223-225
- Ding YW, Zhao YH. The changes of motility, motilin and gastrin in patients with function dyspepsia. *GuangDong Med* 2000;21:97-98
- Yao YL, Shong YG, Zhang WD. Relationship between diarrhea with spleen deficiency syndrome and motilin. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:432-433
- Gu YC, Chen DZ, Wei LX, Guan XZ. The changes of plasma motilin concentration in patients with Piyinxuzheng. *Zhejiang J Tradit Chin Med* 1998;4:154-155
- Sun WF, Wang XC, Wei S, Xu W, Wang H, Lou XY, Zhang XY, Xiao DY. Effects of Shengjiang Tang on motilin and somatostatin in small intestine tissue of mice. *J Guangzhou Univer TCM* 1998;12:270-272
- Wang XQ, Zeng XP, Sheng HW, Wang XC, Yan J. In situ hybridization on somatostatin mRNA expression in gastric mucosa in "experimental spleen deficiency syndrome" rats. *Acta Anatomica Sinica* 1998;29:293-294
- Zeng JZ, Zhang WD, Zhang ZS, Zhou DY. Relationship between traditional Chinese medical types and chronic gastritis and the release patterns of gastrin and somatostatin. *Chin J Trad West Med (Piwei)* 1998;6:73-75
- Yao YL, Song YG, Zhang WD. Variations of G cells and D cells in experimental spleen asthenia and its significance. *Chin J Trad West Med (Piwei)* 1999;7:7-10
- Yao YL, Song YG, Zhang WD. Experimental study on the relationship between gastrin and somatostatin in body fluid and spleen asthenia syndrome. *Chin J Trad West Med (Piwei)* 2000;8:333-335
- Zhang HX, Ren P, Huang YX, Li Y, Huang X, Liu F. Alteration of D cells in gastric antrum in spleen-asthenia syndrome. *J Fourth Mil Med Univ* 2002;23:1486-1499
- Nie K, Wang RJ, Wang JH. Study on binding capacity of gastrin receptor in gastric parietal cells of rat model with spleen-deficiency syndrome and the regulative effect of radix astagali. *Chin J Trad West Med (Xiaohua)* 2002;10:157-159
- Qu RY, Meng Y. Relationship between colon motility of experimental spleen deficiency syndrome and gastroenteric

- peptide. *J Capital Univer Med Sci* 1999;20:109
- 20 Wei YM, Zong RQ, Yang XP. Change of plasma gastrin and motilin in rat model of spleen deficiency syndrome and effect of Sijunzi decoction on it. *Chin J Veter Sci* 2001;21:281-283
- 21 Liu F, Ren P, Li YC, Huang X. Relationship between spleen deficiency syndrome and cholecystokinin. *Chin J Trad West Med (Xiaohua)* 2002;10:262-264
- 22 Ren P, Huang X, Li YC, Liu F, Zhang L, Wang LL, Feng JH. Somatostatin, cholecystokinin and motilin levels in plasma and tissues in experimental Pixu rats. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:436-438
- 23 Liu F, Ren P, Li YC, Huang X. Relationship between spleen deficiency syndrome and cholecystokinin. *Chin J Trad West Med (Xiaohua)* 2002;10:262-264
- 24 Shen ZY, Wang WJ. The reference standard of Xuzheng bianzheng in traditional Chinese medicine. *Chin J Trad West Med* 1986;6:598
- 25 Ren P, Liu F, Huang X, Zhang L, Wang LL, Feng JH. Experimental study on changes of enteroendocrine cells of somatostatin, motilin and cholecystokinin in splenic asthenia rat model. *J Chengdu Univer TCD* 2001;24:35-38
- 26 Zhou L, Wang X. The Effects of Mot on contraction activity of smooth muscle cell in rat. *Acta Physiologica Sinica* 1994;48:165-167
- 27 Zhang ZY, Hou ZJ, Guo JY. Gut hormone and its clinical application. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:447-448
- 28 Pan XZ, Xue LM. The study actuality of gut Hormone. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:464-466
- 29 Huang XQ. Somatostatin-the gut hormone which function may be one of the most extensive in human body. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:93-96
- 30 Zhang DW, Chen XM, Zou SH. The clinical significance of plasma MOT and CCK levels in irritable bowel syndrome. *J Tongji Univer (Medical Science)* 2001;22:50-52
- 31 Zou BC, Wei MX. CCK and gut motility. *Guowaiyixue (Xiaohua)* 2002;22:112-115

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

主编: 您好!

自从离开中国之后, 好久没有联系了, 你曾经在电话中提及英文审稿的事情, 后来也没有消息. 看到世界胃肠病学杂志象您原来跟我说的这样发展, 我为此感到高兴. 我在国内时为一些杂志看英文, 对中国杂志有一种特殊的情结, 希望中国有更多的杂志能象 WJG 一样走向世界.

从中国科学技术大学来到哈佛大学之后, 工作越来越忙. 我现在做的是美国 NIH 资助的重大项目, 肿瘤血管新生抑制与肿瘤生长和转移研究. 整个项目有约 7 百万美元. 刚为一本影响因子 9 以上的杂志完成一篇综述的初稿, 同时又要写原著论文, 特别忙. 这里研究条件很好, 遗憾的是, 这不是自己的国家, 思乡之情难免, 计划工作几年后, 还是想回中国去. 写信是问一件事, 有一位在 HARVARD 做访问学者的博士有一篇论文想投贵刊, 不知是否可以通过网上投稿. 如果可以的话, 请告诉我详细信息以便与您或 WJG 联系. 谢谢. (任斌 Bin Ren, MD, Ph D Division of Cancer Biology and Angiogenesis Department of Pathology RN 290 BIDMC/Harvard Medical School 99 Brookline Ave, MA 02215 Boston, USA. bren@caregroup.harvard.edu).

影响 SARS 患者血特异性 IgG 抗体产生的因素

陆海英, 霍娜, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李杰, 李永华, 高晓明, 赵振东, 庄辉, 徐小元

陆海英, 霍娜, 徐小元, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034
王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 北京大学第一医院呼吸科 北京市 100034
李杰, 李永华, 高晓明, 赵振东, 庄辉, 北京大学医学部 北京市 100083
国家自然科学基金资助项目, No. 30340030
项目负责人: 徐小元, 100034, 北京市西城区西什库大街 8 号, 北京大学第一医院感染疾病科. yangpin@public3.bta.net.cn
电话: 010-66515315
收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-10-07

Influence of factors on production of IgG antibody in SARS patients

Hai-Ying Lu, Na Huo, Guang-Fa Wang, Hai-Chao Li, Li-Gong Nie, Cheng-Li Que, Jie Li, Yong-Hua Li, Xiao-Ming Gao, Zhen-Dong Zhao, Hui Zhuang, Xiao-Yuan Xu

Hai-Ying Lu, Na Huo, Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Disease, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Guang-Fa Wang, Hai-Chao Li, Li-Gong Nie, Cheng-Li Que, Department of Respiratory Disease, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Jie Li, Yong-Hua Li, Xiao-Ming Gao, Zhen-Dong Zhao, Hui Zhuang, Peking University Science Health Centre, Beijing 100083, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30340030
Correspondence to: Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Disease, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Road, Beijing 100034, China. yangpin@public3.bta.net.cn
Received: 2003-09-06 Accepted: 2003-10-07

Abstract

AIM: To study the affecting factors on the production of antibodies in SARS patients.

METHODS: In a total of 104 clinically diagnosed SARS patients, the relations among IgG antibody titer, patients age, duration and the dosage of corticosteroids therapy were investigated.

RESULTS: Eighty-three (79.8%) patients were positive for SARS-Cov antibody. The range of time for the occurrence of the antibody was 8 to 32 days; the percentage for the occurrence of the antibody in the periods of 0-7, 8-14, 22-28, 29-35, 36-42, 43-56 and 57-63 d were 0, 50% (21/42, 63.6%) 42/62, 73.3% (44/60), 88.1% (37/42), 81% (17/21), 92.6% (25/27) and 50% (2/4) respectively. The titer of antibody also increased from 0.14 ± 0.05 in 0-7 d to 0.69 ± 0.10 (43-56 d) and started to reduce after 8 wk. The positive percentage and titers of antibody grew when the dosage of corticosteroids was added. The positive percentage of antibody in severe patients and mild patients were 95.7% (22/23) and 75.3% (61/81) respectively, and the titers of antibody in the severe patients were higher than that of the mild patients ($P > 0.05$) and the same change was also found between 19-14 age group and 46-52 age group.

CONCLUSION: 79.8% of SARS patients are positive for SARS-Cov antibody. The positive percentage and the titer

of antibody grow gradually while the duration prolongs, but declines after 8 wk. It is positively related to the clinical condition, but not affected by the dosage of corticosteroids and the age of the patient.

Lu HY, Huo N, Wang GF, Li HC, Nie LG, Que CL, Li J, Li YH, Gao XM, Zhao ZD, Zhuang H, Xu XY. Influence of factors on production of IgG antibody in SARS patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):723-725

摘要

目的: 了解影响 SARS-Cov IgG 抗体产生的因素。

方法: 对临床诊断为 SARS 的 104 例患者的 269 份血清进行 SARS-Cov IgG 抗体的动态检测, 分析病程、病情、年龄及激素治疗与抗体产生的关系。

结果: 104 例 SARS 患者血清 SARS-Cov IgG 抗体总阳性率为 79.8% (83/104), 抗体最早出现时间在病日 8 d, 最晚 32 d 呈阳性反应。病程 0-7 d, 8-14 d, 22-28 d, 29-35 d, 36-42 d, 43-56 d 和 57-63 d 抗体的阳转率分别为 0 (0/7)、50% (21/42)、63.6% (42/62)、73.3% (44/60)、88.1% (37/42)、81% (17/21)、92.6% (25/27) 和 50% (2/4); 抗体的滴度从 0-7 d 的 0.14 ± 0.05 上升至 43-56 d 的 0.69 ± 0.10 ($P < 0.05$), 但 8 wk 后抗体滴度开始下降。重度 SARS 患者抗体总阳性例数比为 95.7% (22/23); 普通患者为 75.3% (61/81), $P > 0.05$, 其抗体阳转时间稍早于普通组 (分别为 19.1 ± 6.8 d 和 22.0 ± 8.4 d, $P = 0.886$), 滴度也稍高于普通组 (分别为 0.63 ± 0.28 和 0.50 ± 0.25 , $P = 0.276$)。抗体阳性患者平均年龄与阴性患者的相近 (分别为 31.4 ± 8.3 岁和 32.2 ± 9.5 岁), 在 19-35 岁和 46-53 岁年龄段的 SARS 患者在病程的 3 wk 和 4 wk 时抗体的滴度相近。大剂量糖皮质激素治疗组患者血清抗体阳性率及滴度高于小剂量组 ($P < 0.05$)。

结论: SARS 患者血清 SARS-Cov IgG 抗体总阳性率为 79.8%; 抗体阳性率及滴度随病程的延长而逐渐升高, 但 8 wk 后呈下降趋势; 血清 SARS-Cov IgG 抗体的产生可能不受年龄的影响, 而与病情的轻重有关, 大剂量激素治疗组患者的抗体滴度仍维持较高水平。

陆海英, 霍娜, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李杰, 李永华, 高晓明, 赵振东, 庄辉, 徐小元. 影响 SARS 患者血特异性 IgG 抗体产生的因素. 世界华人消化杂志 2004;12(3):723-725

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/723.asp>

0 引言

SARS 是一种急性呼吸道传染病, 病原体为一种新型的冠状病毒^[1-7], 临床以急性呼吸功能障碍为主要表

现,病情进展迅速,有一定的死亡率.发病机制目前未十分明确,机体感染SARS病毒后产生SARS-Cov抗体的时间及其对SARS临床诊断的作用还不很清楚,为此我们对临床诊断为SARS的104例患者血浆进行了SARS-Cov特异性IgG抗体的动态检测,以了解抗体产生的规律及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-04/06 我院收治SARS患者104例,诊断符合中国疾病预防控制中心2003-04-18公布的诊断标准.年龄12-53(31.5 ± 9.7 岁),男38例,女66例.按《北京市非典型肺炎病例的临床诊断标准(试行)》普通患者81例(77.9%),重度患者23例(22.1%),两组年龄分别为12-53(31.8 ± 9.1 岁)和24-49(34.7 ± 8.9 岁)($P > 0.05$);普通组男31例(38.3%),女50例(61.7%);重度组男9例(39.1%),女14例(60.8%),死亡1例为男性45岁;两组患者在性别上无显著性差异($P = 0.952$),女性高于男性与本病房收治的是以女性为主体的医护人员(65例)有关.使用甲泼尼龙:普通组每日1.5-6 mg/kg,重型组每日10-15 mg/kg,激素最大剂量冲击治疗3 d后减半量,然后每隔3-4 d按现剂量的1/4逐渐减量.200名无SARS接触史的健康志愿者为阴性对照组,年龄为17-56(36.7 ± 7.8 岁).

1.2 方法 患者入院后次日取血检测SARS-Cov IgG抗体滴度,以后每5-7 d复查一次抗体,每例患者检测抗体2-5次,共269人份血浆样本.200名无SARS接触史的健康志愿者的血清标本作为阴性对照.抗体检测试剂盒由北京华达公司提供.人肝素化血浆中SARS病毒抗体ELISA法检测在生物安全柜内进行.检测原理是包被在微孔板上的纯化SARS病毒全病毒裂解液抗原和血浆中SARS病毒抗体结合,然后加入辣根过氧化物酶标记的抗人IgG工作液,通过四甲基联苯胺显色来测定SARS冠状病毒抗体.每次实验设空白对照和阳性对照各一孔,阴性对照二孔.空白孔不加液体,阴阳性对照直接取50 μ L加入反应孔内,其余检测孔先加入样品稀释液100 μ L,再加入样品10 μ L,混匀后37 $^{\circ}$ C温育30 min.用洗板液清洗板孔,重复5次,拍干.除空白孔外每孔加入酶标工作液100 μ L,37 $^{\circ}$ C反应20 min.洗板后加入底物A, B液各50 μ L,37 $^{\circ}$ C避光温育10 min.显色完毕后,每孔加入终止液50 μ L终止反应,以空白孔调零,置酶标仪450 nm波长下测A值. A值大于或等于0.18为阳性.

统计学方法 应用SPSS10.0软件进行多组和两组间的秩和检验及 χ^2 检验.

2 结果

2.1 抗体检测结果 无SARS接触史的健康志愿者200名的血浆抗SARS病毒抗体(IgG)检测结果均为阴性.104例临床诊断为SARS患者中SARS-Cov IgG抗体呈阳性反应

83例(79.8%),男、女分别为28例(33.7%)和55例(66.3%);抗体阴性21例中男占8例(38.1%),女13例(61.9%),两组在性别和年龄上无显著的统计学差异($P = 0.465$).抗体阳性患者年龄为12-53(31.4 ± 8.3 岁);阴性患者为19-50(32.2 ± 9.5 岁)(表1).

表1 SARS患者年龄与抗体滴度的关系(mean \pm SD, A)

年龄(岁)	n	重度	2 wk	3 wk	4 wk
19-35	24	8 (33.3%)	0.33 \pm 0.29	0.66 \pm 0.30	0.74 \pm 0.31
36-45	8	2 (25.0%)	0.30 \pm 0.16	0.42 \pm 0.24	0.46 \pm 0.22
46-52	7	3 (42.8%)	0.55 \pm 0.31	0.59 \pm 0.30	0.71 \pm 0.32

在83例抗体阳性的患者中,SARS-Cov IgG抗体呈阳性的时间为发病日后8-32(20.0 ± 7.7 d),血浆抗体总阳性率和滴度均随病程的延长而逐渐升高($P < 0.05$,表2),但8 wk后抗体滴度呈下降趋势.

表2 SARS患者SARS-Cov IgG抗体阳性率与病程的关系

分组	病程(d)	n	阳性	阳性率	A均值
1	0-7	7	0	0.0%	0.14 \pm 0.05
2	8-14	42	21	50.0%	0.33 \pm 0.32
3	15-21	66	42 ^a	63.6%	0.36 \pm 0.33 ^d
4	22-28	60	44 ^b	73.3%	0.48 \pm 0.38 ^{cd}
5	29-35	42	37 ^a	88.1%	0.64 \pm 0.34 ^b
6	36-42	21	17	81.0%	0.65 \pm 0.42 ^b
7	43-56	27	25	92.6%	0.69 \pm 0.10 ^b
8	57-63	4	2	50.0%	0.50 \pm 0.01

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 2组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 5, 6, 7组.

2.2 抗体与病情的关系 重度SARS患者23例,抗体阳性为22例(95.7%);普通患者81例,抗体阳性为61例(75.3%), $P > 0.05$.重度患者出现抗体阳转时间(19.1 ± 6.8 d)稍早于普通组(22.0 ± 8.4 d, $P = 0.886$),抗体阳转时的滴度(0.63 ± 0.28)也稍高于普通组(0.50 ± 0.25 , $P = 0.276$).重度患者病程2、3及4 wk血浆抗体滴度均稍高于普通组,但差异无显著性($P > 0.05$,表3).

表3 SARS患者血清抗体滴度与病情及病程的关系(mean \pm SD, A)

分组	n	病程 2 wk	病程 3 wk	病程 4 wk
普通组	24	0.33 \pm 0.21	0.55 \pm 0.29	0.69 \pm 0.29
重度组	15	0.41 \pm 0.30	0.74 \pm 0.39	0.75 \pm 0.29

2.3 抗体与甲泼尼龙治疗的关系 42例使用甲泼尼龙治疗的SARS患者中,大剂量组患者血浆抗体阳性例数大于小剂量组,抗体滴度在病程的3和4 wk的情况也类似($P < 0.05$,具体数值见表4).

表 4 SARS 患者血清抗体与甲泼尼龙治疗的关系

分组	激素量 mg/d	n	病程 2 wk		病程 3 wk		病程 4 wk	
			抗体阳性	抗体 A 值	抗体阳性	抗体 A 值	抗体阳性	抗体 A 值
1	80	6	3 (50.0%)	0.37 ± 0.24	3 (50.0%)	0.35 ± 0.20	3 (50.0%)	0.40 ± 0.21 ^{ad}
2	160-							
	320	16	7 (43.6%)	0.25 ± 0.21	11 (68.8%)	0.35 ± 0.23	12 (75.0%)	0.51 ± 0.21 ^b
3	400-							
	500	15	12 (80.0%)	0.36 ± 0.24	14 (93.3%)	0.50 ± 0.19	15 (100%)	0.61 ± 0.25 ^{ab}
4	800	5	4 (80.0%)	0.33 ± 0.24	5 (100%)	0.58 ± 0.20	5 (100%)	0.86 ± 0.19

^aP < 0.05 vs 2 组; ^bP < 0.01 vs 4 组; ^dP < 0.01 vs 3, 4 组

3 讨论

目前 SARS 病毒的检测可采用 PCR 法直接检测病毒 RNA, 或 IFA 和 ELISA 法检测患者血中抗 SARS 病毒 Ig 抗体. PCR 法有好的特异性, 但血清中抗体阳性率仅有 10%, 血浆为 20%, 因此阴性结果不能排除 SARS 病毒的感染, 而且可因样品的污染出现假阳性结果. IFA (荧光免疫法)可用于 SARS 病例血清中的 IgM 和 IgG 抗体的测定, 需要借助于荧光免疫显微镜进行测定. ELISA(酶联免疫黏附分析)用于 SARS 病例的血清中的 Ig 抗体的测定, 简便快速, 目前国内已有商品试剂盒投入使用. 中科院^[8]用 ELISA 对 64 例 SARS 患者血样进行了 IgM 和 IgG 抗体的检测, 结果发现临床确诊的 SARS 患者发病后 0-7 d、8-10 d、11-14 d 和大于或等于 15 d 血清 IgG 抗体的阳性率分别为 10%、42%、90%和 94%, 总阳性率为 70.3%; IgM 抗体的总阳性率为 51.6%, 而且各病程 IgM 抗体阳性率均比 IgG 抗体阳性率低. IgM 抗体阳性率低可能与方法学还不够完善等因素有关. 我们对 104 例 SARS 患者的临床资料与 SARS 患者 SARS-Cov 特异 IgG 抗体的情况进行了分析. 200 名无 SARS 接触史的健康志愿者血清 IgG 抗体均阴性, 表明本实验采用的检测试剂具有很好的特异性.

临床诊断 SARS 发病后 0-7 d、8-14 d、22-28 d、29-35 d、36-42 d、43-56 d 及 57-63 d 抗体的阳转率分别为 0、50%(21/42)、63.6%(42/62)、73.3%(44/60)、88.1%(37/42)、81%(17/21)、92.6%(25/27)和 50%(2/4); 抗体的滴度从 0-7 d 的 0.14 ± 0.05 上升至 43-56 d 的 0.69 ± 0.10, 表明 SARS-Cov IgG 抗体阳转率和滴度与病程成正相关, 但 56 d 后抗体阳性率和滴度呈下降趋势. SARS-Cov IgG 抗体阳性的最早时间为发病后的 8 d, 早于 WHO 所公布的时间(IFA 方法需发病后 10 d, ELISA 方法需 21 d), 但比中科院报告的抗体阳性率要低, 血清抗体出现阳转的时间要晚, 平均 20.0 ± 7.7 d, 有 1 例患者在 32 d 时才转呈阳性反应. 提示病程早期抗体阴性患者不能完全排除 SARS 的诊断, 对病程已满 5 wk 抗体阴性者, 如果没有明确的接触史, 则 SARS 可能性不很大, 此外还要考虑试剂盒的敏感性问题, 总之要结合临床及流行病学资料综合分析才能获得较确切的诊断, 有条件做 RT-PCR 检测 SARS-Cov RNA 更有助于 SARS 的诊断.

重度组 SARS 患者中抗体总阳性例数比(95.7%)高于

普通患者(75.3%), 抗体阳转时间早于普通组, 抗体阳转时的滴度均值也稍高于普通组. 以上结果提示 SARS-Cov IgG 抗体与病情有一定的关系. 抗体阳性患者平均年龄与阴性患者的相近, 由此推测年龄对抗体的产生影响不大. 本资料所显示的抗体阳性率要低于中科院报告的抗体阳性率, 这是否与我们所观察的 SARS 患者使用糖皮质激素治疗有关? 因为激素除了有非特异的抗炎作用外, 对机体的免疫功能也有一定的抑制作用. 但我们发现大剂量激素组患者抗体的阳性例数比和滴度均大于小剂量激素组患者, 可能的原因有: (1)激素对抗体的产生影响不大; (2)重度患者病毒载量高, 抗体基线水平高, 虽然大剂量激素治疗可能一定程度上影响了抗体的产生, 但抗体的总体水平还是高于普通患者.

致谢: 北京大学第一医院非典医疗队全体工作人员在工作中给予的合作. 北京大学第一医院图书馆苗鸿才等老师所提供的有关 SARS 文献和资料. 张庆林、丁洁院长, 赵明辉教授及谢因、王平处长对该研究的支持和指导.

4 参考文献

- Nie QH, Luo XD, Zhang JJ, Su Q. Current status of severe acute respiratory syndrome in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1635-1645
- Zhang JZ. Severe acute respiratory of syndrome and its lesions in digestive system. *World J Gastroenterol* 2003;9:1135-1136
- Nie QH, Luo XD, Hui WL. Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:1139-1143
- 聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征. *世界华人消化杂志* 2003;11:881-887
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319-1325
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarnier J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. SARS working group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escrich N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1967-1976
- 正确使用非典型肺炎 ELISA 检测试剂盒 <http://www.cashq.ac.cn/html/Dir/2003/04/26/1473.htm>

脾气虚证患者胃泌酸、胃肠运动和胃肠电活动的变化

任平, 黄熙, 张航向, 黄裕新, 杨喜忠, 赵保民, 赵艳玲

任平, 黄熙, 张航向, 杨喜忠, 赵艳玲, 中国人民解放军第四军医大学附属西京医院 陕西省西安市 710032
黄裕新, 赵保民, 中国人民解放军第四军医大学附属唐都医院 陕西省西安市 710038

任平, 女, 1962-11-28 生, 重庆市人, 汉族, 1984 湖南中医学院本科毕业, 1991 年第四军医大学硕士毕业, 副主任医师, 副教授, 主要从事中西医结合证本质中药临床药理学研究。

国家自然科学基金资助, No. 30271648

国家中医药管理局资助课题, No. 02-03JP45

项目负责人: 任平, 710032, 陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军第四军医大学附属西京医院老年病一科。Huangren@fmmu.edu.cn

电话: 029-3375956

收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-10-07

Significant changes of gastric acid secretion, gastroduodenal movement and electrogastrography in patients with spleen-asthenia

Ping Ren, Xi Huang, Hang-Xiang Zhang, Yu-Xin Huang, Xi-Zong Yang, Bao-Ming Zhao, Yan-Ling Zhao

Ping Ren, Xi Huang, Hang-Xiang Zhang, Xi-Zong Yang, Yan-Ling Zhao, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China

Yu-Xin Huang, Bao-Ming Zhao, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China

Supported by Natural Science Foundation of China and The Administrative Bureau Foundation of The Chinese Medicine and Pharmacology
Correspondence to: Dr. Ping Ren, The First Department of Geriatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China

Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-10-07

Abstract

AIM: To search for some objective indexes with high specificity and sensitivity to provide new clinical evidence for elucidating the essence of spleen-asthenia syndrome by investigating the gastric acid secretion, gastroduodenal movement and electrogastrography in patients with spleen-asthenia (SA).

METHODS: Patients with SA, stomach-heat (SH) and flaming-up of liver-fire (FULF) according to the theory of traditional Chinese medicine (TCM) were selected, in which breath hydrogen test (BHT) and electrogastrography were examined.

RESULTS: In comparison with clinical normal reference standard, the values of H_2/excess in patients with SA were lowered at 15 min, 30 min, and 45 min (13.16 ± 4.51 , 14.33 ± 4.18 ; $G_{45} \text{ min}, 15.57 \pm 4.89$ vs $20-60 \text{ ppm}$, $P < 0.01$), but the groups of SH and FULF were normal. The results of small bowel transit test (SBTT) after oral lactose BHT showed that the time in groups of SH was increased ($225.6 \pm 21.3 \text{ min}$ vs $75-150 \text{ min}$ and $60.4 \pm 34 \text{ min}$, $P < 0.01$), compared with clinical normal reference standard and the group of FULF. The electrogastrography amplitude and frequency of antrum, cavity, lesser curvature and duodenal bulb reduced

in the group of SA as compared with groups of SH and FULF ($P < 0.01$). There was not difference between SH and FULF groups.

CONCLUSION: In patients with SA, the function of gastric acid secretion is reduced, the small bowel transit time is increased and the amplitude and frequency of electrogastrography are reduced, which may be important objective indexes in the clinical diagnosis and treatment of spleen-asthenia.

Ren P, Huang X, Zhang HX, Huang YX, Yang XZ, Zhao BM, Zhao YL. Significant changes of gastric acid secretion, gastroduodenal movement and electrogastrography in patients with spleen-asthenia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):726-729

摘要

目的: 观察脾气虚患者胃泌酸功能、小肠传递时间和胃、十二指肠球部电活动, 探讨临床脾气虚证客观可靠、简便易行的辨证施治方法。

方法: 选择中医辨证符合脾气虚证、胃热证和肝火上炎证的患者, 分别进行口服镁盐呼气实验(OMBHT)、口服乳果糖呼气实验(SBTT)及胃电图检查。

结果: 脾气虚组患者OMBHT测定产氢量(H_2/excess)值各时间点均低于正常值(15 min, 13.16 ± 4.51 ; 30 min, 14.33 ± 4.18 ; 45 min, 15.57 ± 4.89 vs $20-60 \text{ ppm}$); 与正常参考值比较(75-150 min), 脾气虚组(SBTT $225.6 \pm 21.3 \text{ min}$)的测定值显著增大, 而肝火上炎组的SBTT为 60.4 ± 34.5 , 且与脾气虚组比较有显著差异($P < 0.01$); 胃肠电图检查显示: 脾气虚组胃窦、胃体、胃小弯和十二指肠球部的平均峰值幅度虽在正常范围内, 但较胃热组和肝火上炎组明显减低($P < 0.01$); 脾气虚组四个部位的主频值均明显低于正常值(胃窦 1.82 ± 0.57 、胃体 1.65 ± 0.36 、胃小弯 0.15 ± 0.03 和十二指肠球部 0.15 ± 0.05 , 正常 $2.4-3.7 \text{ cpm}$), 且与胃热和肝火上炎组比较显著减低($P < 0.05$), 尤其是胃小弯和十二指肠球部差距更为明显($P < 0.01$); 此外脾气虚组胃窦部的平均过零频率低于正常值(1.73 ± 0.49 vs $2.4-3.7 \text{ cpm}$), 其他部位的虽在正常值范围内, 但较胃热和肝火上炎组减低($P < 0.05$)。胃热和肝火上炎两组患者上述3项指标的检测值均无明显差异性。

结论: 脾气虚证患者“脾失健运”的客观表现之一为胃泌酸功能减低、小肠运动功能减退和胃电活动紊乱。

任平, 黄熙, 张航向, 黄裕新, 杨喜忠, 赵保民, 赵艳玲. 脾气虚证患者胃泌酸、胃肠运动和胃肠电活动的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):726-729

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/726.asp>

0 引言

脾虚证“脾失健运”时可出现一系列消化、吸收功能障碍的表现^[1-4]。小肠传递时间^[5]和胃电活动^[6-8]在食物的消化、吸收方面有重要作用,其功能的测定对胃酸相关性疾病的诊断、鉴别诊断及治疗过程的动态观察有重要参考价值。有关脾气虚证与胃泌酸功能的关系研究较少见报道。由此我们采用了口服镁盐和口服乳果糖呼氢实验^[9]、胃电图^[7-8]等无创、简便易行的方法,多指标合参地观察脾气虚证患者胃泌酸、胃肠运动和胃肠电活动的变化,以期对脾气虚证的临床辨证提供简便可行的客观指标。

1 材料和方法

1.1 观察对象 2000-04/2003-06期间我校西京医院中医药研究中心和唐都医院消化内科门诊和住院的患者。采用辨病与辨证相结合的分型原则,选择胃镜及西医诊断为慢性胃炎、浅表性胃炎、胃溃疡、胆汁反流性胃炎等而中医诊断为脾气虚、胃热炽盛证者,各证辨证符合“中医虚证辨证参考标准”^[10]及《中医诊断学》的诊断标准。其中辨证符合脾气虚者32(男24、女18)例,年龄31-63(平均 45 ± 7 岁);辨证符合胃热炽盛证者30(男16、女14例),年龄33-61(平均 46 ± 6 岁)。各组间性别、年龄比较无显著差异性。以上各组均除外糖尿病、肾病、肝病、恶性肿瘤、心血管疾病、呼吸、胰腺疾病所致的消化功能障碍患者。

1.2 方法

1.2.1 口服镁呼气氢试验(OMBHT)测定胃泌酸功能 采用Micro H₂型呼氢测定仪(micro medical limited, ENGLAND)。患者在检查前1d避免食用面食、粗纤维、奶类,禁食、禁烟12h,于第2d清晨空腹坐位检测,测定时用鼻夹子夹住受试者鼻子,口含微量氢气测定仪接口管慢慢呼吸,重复吸气后再重复呼气,直到仪器显示屏上的数值不再升高为止,约需1min,以ppm(parts per million)为单位(1ppm=1 μ mol/L)。空腹时测三次(15min、30min、45min),求其平均值;然后口服金属镁胶囊200mg(100-200目、中国医药公司上海试剂公司),测定3次(时间同空腹)的呼氢值,每次测得的值减去空腹平均值为实测值。临床检验所用正常参考值为20-60ppm;如小于20ppm,提示酸分泌过少,如大于60ppm提示酸分泌过多。

1.2.2 呼氢测定口盲传递时间 采用Micro H₂型呼氢测定仪。受试者在近期末服用任何抗菌药、影响肠蠕动及镇静安眠药,受试前一天禁食奶制品及豆制品,禁吸烟及剧烈运动,低纤维饮食,晚餐后至次晨检查前不再饮水进食。次日晨先测得空腹氢含量(fasting hydrogen, FH₂),检测方法同口服镁呼气氢试验。随即口服乳果糖10g(20ml乳果糖糖浆加80ml温开水混匀,西安第四制药厂),于服糖后3.5h内每隔15min检测一次,个别受试者可延长至4h。判断标准:口服乳果糖至连续

3次呼气氢增长大于5ppm,以其中首次增值的时间为小肠传递时间;如出现双峰者,以第二峰(结肠峰)为小肠传递时间;若为单峰则看最高峰值出现的时间;如空腹的平均值大于15ppm,为小肠细菌过度生长。正常值(临床检验所用参考值):75-150min。

1.2.3 胃肠电图的检测 采用WCDF-4D(合肥爱科医疗仪器有限公司)四导胃肠电分析仪。受试者提前2d忌饮酒、刺激性食物和胃药,禁食6h后记录20min胃肠电图。单极法四导测胃。电极测量点:中点(定位参考点)是剑突与脐连线中点;球部和十二指肠:中点右偏3-5cm,测十二指肠球部和幽门部位的信号;胃体部:中点左偏3-5cm再上1cm,测胃体信号;胃小弯:剑突与中点连线的上1/3或1/4处,测贲门至幽门间的信号;胃大弯近窦部:中点下1cm,测胃体与窦部间的信号。4个测试电极分别安装在上述测量点,即胃窦(antrum)、胃体(cavity)和十二指肠球部(duodenal bulb)在腹壁的体表投影部位;肢体电极放在手腕内侧。经微机处理系统计算出各导联平均峰值幅度(Ap),正常值:50-300 μ V,多数与受试者的胃肠运动是否亢进有关(说明书提供,下同);主频率(Ep),正常值2.4-3.7cpm,即慢波频率,表示平滑肌的电节律;平均过零频率(Fz),正常值2.4-3.7cpm,包括慢的全相出现的自动波和叠加在慢波上的快波,表示胃肠功能的节律;中心频率(Fc,正常值2.4-3.7cpm)和频谱倍率(24-28m);并将正常、过缓和过速的频率范围内的功率值和总功率值用直方图表示,反应节律紊乱指数。

统计学处理 所有数据均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,各组间以双侧t检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 口服镁呼气氢试验测定胃泌酸功能 与正常参考值比较,脾气虚组(spleen-asthenia, SA)患者OMBHT测定产氢量(H₂/excess)值各时间点均低于正常值,且较胃热组(stomach-heat, SH)和肝火上升(flaming-up of liver-fire, FULF)组明显降低(P<0.01),而胃热组(SH)和肝火上升(FULF)组各时间点的OMBHT产氢量均在正常范围内。见表1。

表1 各病例组患者OMBHT产氢量(mean \pm SD, ppm)

Group	n	15 min	30 min	45 min
SA	32	13.16 \pm 4.51	14.33 \pm 4.18	15.57 \pm 4.89
SH	31	34.21 \pm 6.86 ^a	37.25 \pm 8.27 ^a	39.24 \pm 6.17 ^a
FULF	31	22.35 \pm 5.17 ^{ab}	31.36 \pm 4.84 ^a	34.67 \pm 5.92 ^a
Normal		20-60		

^aP<0.01, vs SA; ^bP>0.05 vs SH.

正常值为临床检验所用参考值(余下均同)。

2.2 口服乳果糖呼气氢实验测定小肠传递时间 与正常参考值比较,脾气虚组(SBT为225.6 \pm 21.3min)的测定

值显著增大,表明小肠传递时间延长,而肝火上炎组的SBTT为 60.4 ± 34.5 ,表明小肠传递时间缩短,且与脾气虚组比较有显著差异($P < 0.01$),见表2.

表2 各组乳果糖呼气实验结果比较(mean \pm SD, min)

Group	n	SBTT
SA	32	225.6 \pm 21.3
SH	31	93.2 \pm 29.8 ^a
FULF	31	60.4 \pm 34.5 ^{ab}
Normal	75-150	

^a $P < 0.01$ vs SA; ^b $P > 0.05$ vs SH.

2.3 脾虚证与胃肠电活动 与正常参考值比较,脾气虚组胃窦、胃体、胃小弯和十二指肠球部的平均峰值虽在正常范围内,但较胃热组和肝火上炎组明显减低($P < 0.01$),后两组表现为胃肠运动亢进;脾气虚组四个部位的主频值均明显低于正常值,且与胃热和肝火上炎组比较有显著下降($P < 0.05$),尤其是胃小弯和十二指肠球部差距更为明显($P < 0.01$),表明脾气虚组胃和十二指肠球部的平滑肌电节律低下;此外脾气虚组胃窦部的平均过零频率低于正常值,其他部位的虽在正常值范围内,但较胃热和肝火上炎组减低($P < 0.05$),说明脾气虚组的胃窦功能节律紊乱.具体数据见表3.

表3 各组患者空腹胃电图结果(mean \pm SD)

Group	SA (n=32)	SH (n=31)	FULF (n=31)	Normal
Antrum	135 \pm 34.33	774 \pm 223.16 ^a	680 \pm 207.34 ^b	
Ap Cavity	108 \pm 27.30	355 \pm 97.88 ^a	259 \pm 73.22 ^b	50-300
(cpm)lesser curvature	33 \pm 68.44	656 \pm 173.36 ^a	560 \pm 170.46 ^b	
duodenal bulb	94 \pm 13.61	448 \pm 107.38 ^a	405 \pm 15.37 ^b	
Antrum	1.82 \pm 0.57	2.70 \pm 0.63	3.00 \pm 1.01 ^b	
Ep Cavity	1.65 \pm 0.36	2.70 \pm 0.78	3.15 \pm 0.93 ^b	2.4-3.7
(cpm) lesser curvature	0.15 \pm 0.03	2.55 \pm 0.61 ^a	2.85 \pm 0.81 ^b	
duodenal bulb	0.15 \pm 0.05	3.00 \pm 1.04 ^a	3.15 \pm 1.35 ^b	
Antrum	1.73 \pm 0.49	3.10 \pm 2.05 ^a	3.30 \pm 1.16 ^b	
Fz Cavity	2.48 \pm 0.71	3.23 \pm 1.47	2.93 \pm 1.37 ^b	2.4-3.7
(cpm) lesser curvature	2.40 \pm 0.53	3.00 \pm 1.04	3.23 \pm 1.71 ^b	
duodenal bulb	2.55 \pm 0.58	3.13 \pm 1.47	3.17 \pm 1.08 ^b	

^a $P < 0.01$, vs SA; ^b $P > 0.05$ vs SH.

3 讨论

目前,国内应用现代科学理论及技术对“脾气虚证”的本质进行了多方面的研究,涉及消化、神经、内

分泌、免疫及血液等多个系统^[11-21],总体上认为脾气虚证是以消化系统功能障碍为主的多系统功能紊乱的征候群^[3, 22].脾气虚证“脾失健运”时可出现一系列消化、吸收功能障碍的表现,如胃排空延迟^[23]、胃肠运动功能减弱^[24]、胃电活动紊乱、胃蛋白酶和唾液淀粉酶活性降低^[25]等.

近年来,口服镁呼气实验因其准确性高、重复性好、无需插管、无创伤、无副作用、操作简单而易被受试者接受,作为评价胃泌酸功能的指标已逐渐用于实验和临床^[26].其原理为口服金属镁与胃内的盐酸反应产生氢($Mg+2HCl=MgCl_2+H_2$),产生的 H_2 可经胃黏膜弥散入血而随呼吸排出体外,用微量氢气测定仪可测定;同时,当镁的量足够与受试者胃内全部胃酸反应时,产生的氢气体量与胃液内盐酸的量正相关.因此检测呼气中的氢气含量即可推算出胃酸的含量.国内有研究表明^[27-28]BHT试验结果与胃泌酸功能之间存在显著正相关, $H_2/excess$ 与基础胃酸分泌量(BAO)呈显著正相关($r=0.88$),空腹时的基础呼气是由肠道细菌产生并存在个体差异,用基础呼气校正的实验结果,可靠性明显升高.本临床观察发现脾气虚组(SA)患者OMBHT测定产氢量($H_2/excess$)值各时间点均低于正常值,且较胃热组(SH)和肝火上炎(FULF)组明显降低($P < 0.01$),而胃热组(SH)和肝火上炎(FULF)组各时间点的OMBHT产氢量在正常范围内,表明脾气虚患者胃泌酸功能显著减低.

将摄入乳果糖到呼气中出现持续氢浓度增高的时间间隔称为小肠传递时间(small bowel transit time, SBTT).目前应用BHT测定SBTT的判断标准较多,我们经长期临床观察认为选取呼气氢增值大于5 ppm,且强调以连续3次升高值中的首次值为SBTT的止点,这较符合客观实际;另外,如果出现双峰,第一峰是由小肠细菌过度生长所至,即为小肠峰,而第二峰才真正反映了结肠峰.故本实验以此作为判断依据.我们发现:与正常参考值比较,脾虚组(SBTT为 225.6 ± 21.3 min)的测定值显著增大,表明小肠传递时间延长,而肝火上炎组的SBTT为 60.4 ± 34.5 ,表明小肠传递时间缩短,且与脾虚组比较有显著差异($P < 0.01$).国内有学者用X线标志物法观察脾气虚气滞患者的胃肠运动状况,发现其有明显的胃肠运动失调和蠕动减慢,并认为这可能与胃肠植物神经功能紊乱有关^[3, 29],与本研究有较好的一致性.有关脾气虚的临床诊断标准是患者多表现为腹泻或先便秘后腹泻.我们已往的脾虚动物模型(利血平制)研究发现:短期脾虚大鼠(7 d)有腹泻,而长期模型鼠(14 d)为便秘(3-7 d)^[30];在临床上也发现有部分严重脾虚尤其是脾虚老年患者常为便秘,推测脾气虚严重到一定程度时其胃肠运动功能障碍的临床症状为便秘,而小肠传递时间延长是其临床客观表现形式之一.

有研究发现^[26]脾虚患者无论空腹还是进食后胃电波幅均低于正常组,并且与唾液淀粉酶活性比值、D-木糖排泄率一致,三者合参对脾虚证的诊断阳性率达95.

1%, 提示此三项指标合参具有实际意义. 曲氏^[31]的实验表明, 脾气虚动物胃窦运动节律、振幅指数明显低于正常, 其结果导致“肌源性”胃机械运动明显减弱, 四君子汤可纠正. 本实验结果发现脾气虚证患者胃小弯、胃大弯近胃窦处、胃体及十二指肠球部的平滑肌电节律降低, 胃窦部功能节律紊乱, 胃肠运动较胃热和肝火上炎组减弱; 推测脾气虚证患者胃和十二指肠球部电节律紊乱、存在电-机械脱耦联现象.

综合分析本研究所观察的三个临床指标, 表明脾气虚证患者“脾失健运”的客观表现有胃泌酸功能减低、小肠传递时间延长和胃肠电-机械运动减低, 并存在电-机械脱耦联, 这与既往的相关研究报道有很高的一致性. 因此将呼氢试验(测定胃泌酸功能和小肠传递时间)、胃肠电图用于脾气虚证的临床研究, 对其客观诊断具有积极的作用.

4 参考文献

- Liang WJ, Zhang WD. The study advance at the function of digestion and absorption in spleen deficiency symptoms. *Chin J Trad West Med (Piwei)* 1999;7:191-192
- Wang XD. The discussion on the discord of the liver and the spleen. *Gansu J Trad Chin Med* 2002;15:3-5
- Zhang B, Zhang WD, Li LB, Zhang ZS, Zhou DY. The study at stomach motility of patience with spleen deficiency. *Chin J Trad West Med* 1994;14:346
- Zhou YQ, Lai TS, Li ZM. Effects of Zhishi Xiaopi pill on gastric kinetics and gastrointestinal hormones in patients with functional dyspepsia. *J Guangzhou Univer Trad Chin Med* 1999;16:305-308
- Yin W, Xiao Y, Huang C. Determination of food oral-colon transit time with breath hydrogen test. *Chin J Prev Med* 1998;32:306-308
- Huang KM, Xu GM, Zou DW, Li ZS, Yin N. Changes of 24-hour gastric motility and myoelectric activity in patients with functional dyspepsia. *Chin J Dig* 2001;21:537-539
- Zhang JP. Exploration on the relationship between typing of gastroduodenal disease and ECG. *J Shanxi College TCM* 2001;2:25-27
- Chen YM, Zhao S, Wan P, Wang J, Fan H, Luo HM, Long YL, Ma BD. Electrogastrography in patients with uremia. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:979-981
- Zhang LP, Sha ZF, Dong LF, Tu YP, Zhang TC. Clinical significance of lactulose hydrogen breath test for irritable bowel syndrome. *J Capital Univer Med Sci* 1999;20:262-263
- Shen ZY, Wang WJ. The Reference standard of xuzheng bianzheng in traditional Chinese medicine. *Chin J Trad West Med* 1986;6:598
- Guo H, Qu RY, Chang YB, Meng Y, Li LS, Wang W, Zeng WH, Qu BL. Changes of SP and VIP in ileum of experimental spleen deficiency rats. *J Capital Univer Med Sci* 2001;22:199-201
- Wang XQ, Zeng XP, Sheng HW, Wang XC, Yan J. In situ hybridization on somatostatin mRNA expression in gastric mucosa in “experimental spleen deficiency syndrome” rats. *Acta Anatomica Sinica* 1998;29:293-294
- Shen D, Shen L, Wang AL, Yang Y, Yang Y, Wei WY. Study on platelet aggregation function of patients with failure of spleen to control circulating blood syndrome. *Chin J Trad West Med (Xiaohua)* 2001;9:5-7
- Chen ZY, Yan MX, Xiang BK. Study on relationship between TCM syndrome type of irritable bowel syndrome and gut hormones. *Chin J Trad West Med* 2002;22:664-666
- Zhang HX, Ren P, Huang YX, Li Y, Huang X, Liu F. Alteration of D cells in gastric antrum in spleen-asthenia syndrome. *J Fourth Mil Med Univ* 2002;23:1486-1499
- Tao LD, Qin SA. Effect of Fuzheng Jianpi recipe on content of trace element and immune function in children with spleen deficiency anorexia. *Chin J Trad West Med* 2002;22:429-431
- Liu GZ, Wang XZ, Wang P, Lin J, Yang FD. Therapeutic and immunologic study of Jianpi Yishen decoction in patients with Pixu Diarrhoea. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:285-287
- Yao YL, Song YG, Zhang WD. Spleen asthenia syndrome; gastric mucosa; intestinal mucosa; immunohistochemistry. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:550
- Liu X, Zhi M, Lei L, Gong J, Nie DL, Chen SS, Dong L. Effects of Chinese herb complex Jianpiwan and Baohewan on gastrointestinal motility in rats. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:54-56
- Zhou B, Li QG, Ren CB. Determine the emptying function of dyscinesia indigestion of patients with PixuQizhi. *Chin J Trad West Med (Piwei)* 1997;5:84
- Ren P, Huang X, Li YC, Liu F, Zhang L, Wang LL, Feng JH. Somatostatin, cholecys, tokinin and motilin levels in plasma and tissues in experimental Pixu rats. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:436-438
- Ceng JX. The review and prospects for study the symptoms of traditional Chinese medicine. *Act Univ Chin Med Pharmacol Biejing* 1998;13:246
- Ren P, Huang X, Zhang L, Wang LL, Li YC, Chen JZ. Relationship between IMC, gut motility and motilin level in Pixu rats. *Shiji Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:516-519
- Ren P, Huang X, Zhang L, Wang LL, Liu F, Li YC. Effect of Sijunzi decoction on gastric emptying rate in rat model of spleen deficiency syndrome. *Chin J Trad West Med* 2000;20:599-601
- Li CQ, Wang JH. The relationship between the activity ratio of salivary, excretion rate of D-xylose, Electrogastrography and spleen deficiency syndrome. *Huna Zhongyi Xueyuan Xuebao* 1998;18:8-9
- Sack DA, Stephensen CB. Liberation of hydrogen from gastric acid following administration of oral magnesium. *Dig Dis Sci* 1998;30:1127-1133
- Li YQ, Xu CF, Zhao GN, Shun H. Breath H₂ test for gastric acid secretion. *J Fourth Milit Med Univer* 1993;14:150-152
- Li YQ, Xu CF, Zhao GN, Shun H. Oral Mg/breath H₂ test for gastric acid secretion. *J Fourth Milit Med Univ* 1994;15:40-42
- Tan RS, Xu FL, Zhang WD, Zeng XD, Luo R, Huang ZQ, Tang SJ, Chen WG, Shi CS. The preliminary observation of gastrointestinal X-rays in patients with spleen deficiency. *Xin Xiaohabing Zazhi* 1993;1(Suppl 1):43-44
- Liu F, Ren P, Li YC, Huang X. Relationship between spleen deficiency syndrome and cholecystokinin. *Chin J Trad West Med (Xiaohua)* 2002;10:262-264
- Qu RY, Qu BL, Zeng WH, Wang XQ, Yang J, Li LF. The study of electrogastrography in rat model with spleen deficiency syndrome. *Chin J Trad West Med* 1994;14:156-158

慢性功能性便秘肛直肠压力检测EMG生物反馈训练的疗效

杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 梁绛菱, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 刘付妍, 吴志荣

杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 梁绛菱, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 刘付妍, 吴志荣, 广东省廉江市人民医院消化内科 广东省廉江市 524400
杨柳明, 男, 1963-03-23 生, 黑龙江莫旗人, 汉族. 1987 年内蒙古医学院本科毕业, 1997 年哈尔滨医科大学硕士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的临床工作.
广东省卫生厅科学技术研究基金资助课题, No. 990112
项目负责人: 杨柳明, 524400, 广东省廉江市人民大道 160 号, 廉江市人民医院消化内科. zjylm68@163.net
电话: 0759-6607943 传真: 0759-6628166
收稿日期: 2002-01-16 接受日期: 2002-01-23

Effects of biofeedback training by EMG on patients with chronic functional constipation

Liu-Ming Yang, Ji-Bao Lin, Yan-Long Zhao, Jiang-Ling Liang, Hong Lin, Zhi Zhong, Rong-Wei Chen, Jun-Fang Xie, Fu-Yan Liu, Zhi-Rong Wu

Liu-Ming Yang, Ji-Bao Lin, Yan-Long Zhao, Jiang-Ling Liang, Hong Lin, Zhi Zhong, Rong-Wei Chen, Jun-Fang Xie, Fu-Yan Liu, Zhi-Rong Wu, Department of Gastroenterology, Lianjiang People's Hospital, Lianjiang 524400, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dr. Liu-Ming Yang, Department of Gastroenterology, Lianjiang People's Hospital, Lianjiang 524400, Guangdong Province, China. zjylm68@163.net
Received: 2002-01-16 Accepted: 2002-01-23

Abstract

AIM: To study characteristics of anorectal pressure, EMG activity and effect of biofeedback training system on patient with chronic functional constipation (CFC).

METHODS: Anorectal manometry was carried out in 144 cases of CFC by a monitor system (liquid-phase type) and Biolab dynamics parameter before and after the biofeedback training. 20 healthy individuals were taken as control.

RESULTS: Compared with controls, CFC patients showed slightly lower anal quiescent pressure ($P > 0.05$), lower anorectal sphincteric squeezing pressure (15.7 ± 1.4 vs 12.7 ± 1.4) ($P < 0.01$), higher rectal defecation volume thresholds and higher rectal maximum tolerable volume thresholds (12 ± 6.2 vs 14.9 ± 6.6 ; 29.3 ± 6.8 vs 36.0 ± 7.3) ($P < 0.01$; $P < 0.01$); EMG assessments showed that 100% patients with CFC had the contradictory movement between the pelvic floor muscle (PFM) and abdominal anterior oblique muscle (AAOM). The movement extent of the PFM rose from 5.3 ± 2.8 to 10.2 ± 2.8 under quiet state ($P < 0.01$), and AAOM reduced from 34.4 ± 5.2 to 30.8 ± 4.9 ($P < 0.01$); All the abnormalities significantly improved with Orion PC/12 m EMG biofeedback training therapy. After biofeedback training therapy, symptoms of CFC patients were improved with efficient rate of 84.03%; With increase of the treatment

time and shortenning of the interval and assistant training, the curative efficacy rose and the recurrence rate reduced (78.8% vs 91.7% ; 69.2% vs 92.8%) ($P < 0.05$; $P < 0.05$).

CONCLUSION: CFC patients have abnormal anorectal pressure, sensation threshold and unusual anus electric activities. Biofeedback training therapy can improve the above-mentioned indexes and is effective in 84.03% of the patients. The relatively intensive long-time training can improve the curative rate in a short period, and family assistant training can reduce the recurrence rate of the disease.

Yang LM, Lin JB, Zhao YL, Liang JL, Lin H, Zhong Z, Chen RW, Xie JF, Liu FY, Wu ZR. Effects of biofeedback training by EMG on patients with chronic functional constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):730-733

摘要

目的: 探讨慢性功能性便秘(CFC)患者肛直肠压力及肌电(EMG)活动特点; 同时观察生物反馈训练系统对CFC患者的疗效及对上述指标的影响。

方法: 用BioLab动力学参数监测系统(液态式), 多道胃肠功能检查仪对144例CFC患者检测, 并用OrionPC/12 m EMG生物反馈治疗仪进行肌电评估和训练, 20名健康者作对照。

结果: 与健康对照组相比, CFC患者肛管静息压(AQP)稍下降($P > 0.05$)、最大缩榨压(MSP)从 15.7 ± 1.4 下降到 12.7 ± 1.4 ($P < 0.01$), 直肠感知阈值(RVST)和最大耐受量(MTV)均从 12 ± 6.2 和 29.3 ± 6.8 增高到 14.9 ± 6.6 和 36.0 ± 7.3 ($P < 0.01$; $P < 0.01$); EMG评估CFC患者盆底肌与腹前斜肌有矛盾运动 100%, 盆底肌静息状态下运动幅值从 5.3 ± 2.8 升高到 10.2 ± 2.8 ($P < 0.01$)和腹前斜肌运动幅值从 34.4 ± 5.2 降低到 30.8 ± 4.9 ($P < 0.01$); OrionPC/4EMG生物反馈训练治疗后最大缩榨压(MSP)从 12.7 ± 1.4 上升到 19.9 ± 1.8 ($P < 0.01$), 直肠感知阈值(RVST)和最大耐受量(MTV)均从 14.9 ± 6.6 和 36.0 ± 7.3 降低到 11.5 ± 4.9 和 30.9 ± 6.4 ($P < 0.01$; $P < 0.01$); EMG评估CFC患者盆底肌与腹前斜肌矛盾运动 100% 被纠正, 盆底肌静息状态下运动幅值从 10.2 ± 2.8 下降到 5.4 ± 1.6 ($P < 0.01$)和腹前斜肌运动幅值从 30.8 ± 4.9 增高到 38.2 ± 5.4 ($P < 0.01$), 生物反馈治疗CFC患者临床症状改善总有效率为 84.03%, 增加疗程的频次可使疗效从 78.8% 增加到 91.7% ($P < 0.05$)、缩短治疗间隔可使疗效从 69.2% 增高到 92.8% ($P < 0.05$), 辅助家庭训练可以提高疗效和降低复发率。

结论: CFC 患者存在肛门直肠动力、感知觉及肌电活动异常, OrionPC/12 mEMG生物反馈系统可以改善上述异常表现, 对 84.0% 的 CFC 患者具有良好的疗效, 较长时间的强化训练可望提高近期疗效, 辅助家庭训练可降低复发率。

杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 梁绛菱, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 刘付妍, 吴志荣. 慢性功能性便秘肛直肠压力检测 EMG 生物反馈训练的疗效. 世界华人消化杂志 2004;12(3):730-733

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/730.asp>

0 引言

肛直肠运动性疾患导致的排便异常主要表现为慢性功能性便秘(chronic functional constipation, CFC)和功能性排便失禁(functional incontinence, FIC), 其发病机制还不十分清楚, 也无有效的治疗方法, 严重影响 CFC 患者的生活质量. 国外学者采用生物反馈训练技术对慢性便秘、尿失禁、便失禁、肠套叠等治疗取得了较好的疗效^[1-17]. 我院自 1999 年起, 用 Bio Lab 动力学参数监测系统以及 Sand Hill 胃肠道监测系统 Orion PC/12mEMG 生物反馈治疗仪, 对 CFC 患者进行直肠肛管压力检测和肌电图评估, 尔后进行选择性肌电图指导下生物反馈治疗, 旨在探索 CFC 患者可能的发病机制和有效的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料 CFC 患者 189 例, 男 117 例, 女 72 例, 年龄 19-77(平均 59 岁). 均有持续 1 a 以上的粪便排出困难或排出不畅, 符合 1990 年我国“便秘诊断研讨会”制定的标准: (1)大便量少, 质硬, 排便困难; (2)排便困难合并一些特殊症状如长期用力排便, 直肠胀感, 排便不全感; (3) 7 d 内排便次数少于 2-3 次. 本组患者在不用泻药时, 每月排便 1-4 次. 所有患者均经电子结肠镜检查, 排除结直肠肛门器质性疾病. 用美国 Sand Hill 公司提供的 Bio Lab 动力学参数监测系统(液态式), 多道胃肠功能检查仪, 采用 8 通道异平面测压管, 各通道之间相隔 1 cm. 于测压管前端系有橡胶气囊, 长 5 cm, 使用前后在体外确定有无漏气. 用 Sand Hill 胃肠道监测系统 Orion PC/12mEMG 生物反馈治疗仪, 利用纵形的插入式肛管电极, 与粘贴式三导腹前斜肌体表电极构成电流回路, 连接 Orion PC/12mEMG 生物反馈治疗仪. 用 Bio Lab 动力学参数监测系统对所有患者分别行直肠肛管压力检测. 肛管静息压, 最大缩榨压, 肛直肠感知试验(通过直肠感知阈和最大耐受量来评估). 肛管静息压(anal quiescent pressure, AQP): 临床常用的是 Aqrnkorfer 系统, 即: 在恒压下毛细导管持续注水, 毛细管另一端分别与测压管和压力传感器相接. 肛管平滑肌收缩, 使腔内压升高, 经测压管和传感器记录下来, 因毛细管压力很小, 不干扰腔内压的测定, 又由于连续灌注, 保持测压器开口不被阻塞, 通过 8 点平面的压力变化, 从而记录结肠, 直肠和肛门压力变化(机定正常值是 8.0 kPa). 最大缩榨压(maximum squeeze pressure, MSP): 当受检

查者最大强度收缩肛门时(提肛运动), 由于腹肌及直肠肌的收缩, 使直肠和肛管内压增加, 增加的幅值即为最大缩榨压. 可以此试验检测肛门外括约肌和耻骨直肠肌的肌力, 评估 ESA 的功能及收缩力度(机定正常值是 16 kPa). 肛直肠感知试验(anarectal sensation, AS): 他包括直肠感知阈值(rectal volume at sensory threshold, RVST)和最大耐受量(maximal tolerable rectal volume, MTV), 具体方法是通过置于直肠内的气囊逐渐充气法, 由 20 mL 充气量开始, 逐渐增加为 30, 40, 50 mL 等, 当受检查者感到直肠被扩张时的最小充气量即为感知阈值(机定正常值是 10-15 mL); 继续增加充气量, 当出现最大便意或胀痛时的充气量即为 MTV(机定正常值是 250 mL). 用 Sand Hill 胃肠道监测系统 - Orion pc/12mEMG 生物反馈治疗仪对以上患者进行直肠电和盆底肌描记分析, 评估肌电活动情况. 我们用纵行的插入肛管电极, 与腹前斜肌的体表电极构成电流回路, 描记各个便秘患者的腹前斜肌, 直肠, 盆底肌的肌电变化, 并可用于生物反馈治疗中的监测(单位为微伏简写 uV). 用以上仪器分别为每个患者行肌电图指导下的行物反馈治疗. 根据肌电变化, 为患者选择适当的生物反馈课程, 训练指导患者识别自己的异常和正常的肌电信号, 并进行自我训练, 标准是 8 次为一疗程, 间隔 1 wk, 2-3 个疗程结束. 治疗前后的功能评估可分为主观(症状和粪便情况记录)、客观检查两大类. 症状记录包括每周自发排便次数, 药物辅助排便次数及灌肠排便次数, 也可将患者的满意程度作为一种主观评估方法. 客观检查中常用的有肛门直肠测压、肌电图等, 并由医护研究人员进行治疗后随访. ←显效: 经生物反馈治疗 8 次内, 全部停用或基本停用泻药, 能基本正常排便者; ↑有效: 治疗 10-16 次, 基本停用泻药, 能基本正常排便者; →无效: 治疗 16~20 次以上, 仍不能摆脱泻药且便秘无改善者.

统计学处理 全部数据输入计算机, 用 SSPS 医学应用软件进行统计学处理, 连两组计量资料用 t 检验, 治疗前后计量资料用配对 t 检验, 两组计数资料百分数进行 χ^2 检验, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 直肠肛门运动功能及肌电图 CFC 患者与正常组相比肛管静息压稍降低($P < 0.01$), 最大缩榨压明显降低, 有显著差别 $P < 0.01$; 但直肠感知阈及最大耐受量具有显著差别($P < 0.01$, 表 1). CFC 患者肌电图显示盆底肌与腹前斜肌有矛盾运动 100%(正常无矛盾运动); 其运动幅值(uV)盆底肌静息状态下高于正常组($P < 0.01$), 收缩状态下稍高于正常($P < 0.01$), 腹前斜肌运动幅值低于正常($P < 0.01$).

2.2 OrionPC/12mEMG 生物反馈系统对 CFC 的疗效 206 例接受 OrionPC/12mEMG 生物反馈系统检查及评估, 确定 CFC 患者 189 例, 完成一个以上疗程生物反馈治疗的病例 144 例并对其进行疗效统计. 临床症状

显效 101 例, 有效 20 例, 无效 23 例, 总有效率达 84.0%; 与治疗前相比, 肛管静息压稍有上升($P > 0.01$), 最大缩榨压明显增高($P < 0.01$), 直肠感知阈及最大耐受量均显著下降($P < 0.01$, 见表 1); CFC 患者肌电图显示盆底肌与腹前斜肌矛盾运动 100% 被纠正; 与治疗前相比, 盆底肌静息状态运动幅值显著下降($P < 0.01$), 收缩状态下增高($P < 0.01$), 腹前斜肌运动幅值亦明显增高($P < 0.01$, 见表 2)。随着 OrionPC/12mEMG 生物反馈系统治疗疗程的增加, 其疗效亦随之增加, 3 个疗程治疗效果达 91.8% ($P < 0.05$, 见表 3)。在每一疗程的治疗中, 以 1 次/d 的治疗间隔疗效最佳, 达 92.8% ($P < 0.05$, 见表 4)。42 例 CFC 患者随访 6 mo 及 12 mo, 坚持进行家庭训练的 22 例 CFC 患者 6 mo 及 12 mo 均无复发, 而未坚持行家庭训练的 20 例 CFC 患者 6mo 复发 4 例(20%), 12 mo 时复发 10 例。

表 1 OrionPC/12mEMG 生物反馈系统对 CFC 患者直肠肛管运动功能的影响(mean±SD)

分组	n	AQP (KP)	MSP (KP)	AS (ML)	
				RVST	MTV
便秘组	60				
治疗前		7.0±0.7	2.0±6.9 ^b	14.9±6.6 ^{bd}	36.0±7.3 ^{bd}
治疗后		7.2±0.6	19.9±1.8 ^d	11.5±4.9 ^d	30.9±6.4 ^d
正常组	20	7.0±0.7	19.9±1.8 ^d	11.5±4.9 ^d	30.9±6.4 ^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 治疗组。

表 2 CFC 患者盆底肌和腹前斜肌运动幅度检查结果(mean±SD)

分组	n	盆底肌运动静息状态		腹前斜肌运动幅值
		静息状态	收缩状态	
便秘组	60			
治疗前		10.2±2.8 ^{bd}	30.8±4.9 ^d	29.6±4.8 ^b
治疗后		5.4±1.6 ^d	42.6±5.8 ^d	38.2±5.4 ^d
正常组	20	5.3±1.4 ^b	32.4±5.2	34.6±4.4 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 治疗组。

表 3 OrionPC/12mEMG 生物反馈系统治疗效果与疗程频次的关系

疗程频次	n	显效	有效	无效	总有效率(%)
1 个疗程	66	42	10	14	78.79 ^b
2 个疗程	42	30	6	6	85.70 ^b
3 个疗程	36	29	4	3	91.67 ^b
合计	144	101	20	23	84.03

^b $P < 0.05$ vs 疗程频次的总有效率。

表 4 OrionPC/12mEMG 生物反馈系统治疗效果与治疗间隔的关系

治疗间隔	n	显效	有效	无效	总有效率(%)
1 次/d	69	53	11	5	92.75 ^a
隔日 1 次	36	27	3	6	83.33 ^a
3 d/次	39	21	6	12	69.23 ^a
合计	144	101	20	23	84.03

^a $P < 0.05$ vs 治疗间隔总有效率。

3 讨论

尽管慢性功能性便秘(CFC)的发病机制尚未完全阐明, 但结直肠肛管的运动功能变化被认为与其发病有关^[18]。其中结肠动力异常导致便秘的发生及机制已经基本确定^[19-20]; 肛直肠运动功能主要是维持自制和排便, 其运动障碍可导致排便异常, 引起国内外学者的重视。直肠肛管压力检测, 特发性便秘肛管内括约肌静息压下降, 最大收缩压(亦称缩榨压 MSP)降低, 直肠对容量刺激反应性降低^[21]。本组 CFC 患者 MSP, 直肠感知阈和最大耐受量与健康对照相比均具有显著差异; 同时 CFC 患者 EMG 评估显示盆底肌和腹前斜肌 100% 存在矛盾运动, 其运动幅值(除外盆底肌收缩状态外)与健康对照组相比具有显著差异。本组 CFC 患者肛管静息压低于健康对照组, 但差异无显著性, 与国内学者的检测结果相一致^[22-25]。本研究提示, 肛直肠动力及感觉因素均参与了 CFC 的发病; 与排便动作相关的盆底肌和腹前斜肌两组肌肉群的协调性和收缩强度也是 CFC 发生的重要条件。

Orion PC/4EMG 生物反馈系统对 CFC 患者的治疗效果, 总有效率达 84.03%, 与内外的报道的结果近似。Orion PC/4EMG 生物反馈系统对 CFC 患者训练治疗后在肛直肠压力和感知性方面主要有以下变化: (1)最大缩榨压明显升高; (2)直肠感知阈和最大耐受量明显下降; (3)盆底肌和腹前斜肌存在的矛盾运动 100% 被纠正, 其运动幅值盆底肌静息状态显著下降、收缩状态下显著升高, 腹前斜肌运动幅值也显著升高。上述这些客观指标的变化及改善进一步证明了肛管直肠动力因素参与了 CFC 的发生, 同时也为对 CFC 患者评估找到了较客观的指标。国外学者认为, 依靠肌电图的生物反馈治疗结直肠、肛门动力异常的排便障碍具有很高的成功率和很低的复发率, 而且比其他疗法经济^[26]。为了探索出一套适合的生物反馈训练治疗 CFC 的有效方法, 本组资料显示: 提高疗效可能与以下因素有关: (1)疗程频次: 争取尽可能多的疗程次数, 最少两个以上的疗程才能评价其临床意义; (2)治疗间隔: 以 1 d/次训练为佳, 这样可以起到强化记忆和熟练动作的效果; (3)家庭训练: 强调家庭训练, 是一重要的辅助措施, 特别是远期疗效与此有明显的相关性。

总之, 生物反馈训练治疗 CFC 患者在国内是一项较新的技术, 与药物及手术治疗相比, 有明显的优势。无痛苦、非创伤和无药物不良反应。至今尚物因应用生物反馈治疗而造成并发症和死亡的报道。近年国内学者对肛痉挛、小儿便秘及便秘等应用生物反馈技术也取得了一定的疗效^[27-34]。我们初步的训练治疗结果, 亦是十分令人鼓舞, 更确切的疗效评估还有待于今后更多本资料的积累。面对众多 CFC 患者的临床需求而目前又无有效的治疗办法的客观现实, 探究和推广这项有效无痛苦的生物反馈训练治疗技术, 其前景是非常诱人的。

4 参考文献

- 1 Ferrara A, De-Jesus S, Gallagher JT, Williamson PR, Larach SW, Pappas D, Mills J, Sepulveda JA. Time-related decay of the benefits of biofeedback therapy. *Tech Coloproctol* 2001;5:131-135
- 2 McGrath ML, Mellon MW, Murphy L. Empirically supported treatments in pediatric psychology: constipation and encopresis. *J Pediatr Psychol* 2000;25:225-254
- 3 Chin-Peuckert L, Salle JL. A modified biofeedback program for children with detrusor-sphincter dyssynergia: 5-year experience. *J Urol* 2001;166:1470-1475
- 4 Wiesel PH, Dorta G, Cuypers P, Herranz M, Kreis ME, Schnegg JF, Jornod P. Patient satisfaction after biofeedback for constipation and pelvic floor dyssynergia. *Swiss Med Wkly* 2001; 131:152-156
- 5 Fucini C, Ronchi O, Elbetti C. Electromyography of the pelvic floor musculature in the assessment of obstructed defecation symptoms. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1168-1175
- 6 Emmanuel AV, Kamm MA. Response to a behavioural treatment, biofeedback, in constipated patients is associated with improved gut transit and autonomic innervation. *Gut* 2001;49:214-219
- 7 van-Ginkel R, Buller HA, Boeckxstaens GE, van-Der-Plas RN, Taminiau JA, Benninga MA. The effect of anorectal manometry on the outcome of treatment in severe childhood constipation: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2001;108:E9
- 8 Rao SS. Dyssynergic defecation. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:97-114
- 9 Rotholtz NA, Wexner SD. Surgical treatment of constipation and fecal incontinence. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30: 131-166
- 10 Brown SR, Donati D, Seow-Choen F, Ho YH. Biofeedback avoids surgery in patients with slow-transit constipation: report of four cases. *Dis Colon Rectum* 2001;44:737-739
- 11 Choi JS, Hwang YH, Salum MR, Weiss EG, Pikarsky AJ, Nogueras JJ, Wexner SD. Outcome and management of patients with large rectoanal intussusception. *Am J Gastroenterol* 2001;96:740-744
- 12 Roy AJ, Emmanuel AV, Storrie JB, Bowers J, Kamm MA. Behavioural treatment (biofeedback) for constipation following hysterectomy. *Br J Surg* 2000;87:100-105
- 13 Werner SD. Identification of patients likely to benefit from biofeedback for outlet obstruction constipation. *Br J Surg* 1999; 86:1484
- 14 Wong PW, Kadakia S. How to deal with chronic constipation. A stepwise method of establishing and treating the source of the problem. *Postgrad Med* 1999;106:199-200
- 15 Heymen S, Wexner SD, Vickers D, Nogueras JJ, Weiss EG, Pikarsky AJ. Prospective, randomized trial comparing four biofeedback techniques for patients with constipation. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1388-1393
- 16 Griffiths P, Dunn S, Evans A, Smith D, Bradnam M. Portable biofeedback apparatus for treatment of anal sphincter dystonia in childhood soiling and constipation. *J Med Eng Technol* 1999;23:96-101
- 17 McKee RF, McEnroe L, Anderson JH, Finlay IG. Identification of patients likely to benefit from biofeedback for outlet obstruction constipation. *Br J Surg* 1999;86:355-359
- 18 Reynolds JC, Ouyang A, Lee CA. Chronic severe constipation. Prospective motility studies in 25 consecutive patients. *Gastroenterology* 1987;92:414-420
- 19 Kamm MA, Lennard-Jones JE, Thompson DG. Dynamic scanning defines a colonic defect in severe idiopathic constipation. *Gut* 1988;29:1085-1092
- 20 Chaussade S, Khyari A, Roche H. Determination of total and segmental colonic transit time in constipated patients with a new simplified method. *Dig Dis Sci* 1989;34: 1168-1172
- 21 Bassotti G, Chiarioni G. Anorectal manometric abnormalities and colonic propulsive impairment in patients with severe chronic idiopathic constipation. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 1558-1564
- 22 邹多武, 许国铭, 李兆申. 慢性特发性便秘患者肛门直肠测压表现及西沙比利的疗效研究. *中华消化杂志* 1998;18:268-270
- 23 丁元伟, 凌奇荷, 赵英恒. 功能性便秘患者肛管、直肠动力学变化及西沙比利影响的研究. *中华消化杂志* 1999;19:200-201
- 24 李爱萍, 程留芳, 郭荣斌, 杨德利. 肛门直肠运动协调性障碍与慢性特发性便秘的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):22
- 25 莫平. 生物反馈训练治疗便秘的现状与展望. *国外医学·物理医学与康复学分册* 2000;20:51-55
- 26 Wexner SD, Cheape JD, Jorge JM. Prospective Assessment of biofeedback for treatment of paradoxical puborectalis contraction. *Dis Colon Rectum* 1992;35:145
- 27 黄显凯, 张胜本, 张连阳. 特发性便秘 197 例临床分析. *大肠肛门病外科杂志* 1998;4:69-71
- 28 Rao SC, Pate RS, Gu CH. How useful are manometric tests of anorectal function in the management of defecation disorders. *American J Gastroenterol* 1997;92:469-475
- 29 牛虹. 生物反馈法治疗盆底痉挛综合征: 附 6 例报告. *中国肛肠病杂志* 1998;18:18-19
- 30 丁曙晴, 丁义江, 余苏萍. 盆底失弛缓综合征 70 例临床分析. *江苏医药* 2001;27:515-516
- 31 李玉兰. 7 例小儿便失禁的生物反馈疗法及护理. *天津护理* 2000; 8:67-68
- 32 李侠, 尹燕兰, 徐华. 小儿便秘及其生物反馈治疗. *空军总医院学报* 2000;16:50-51
- 33 李萍, 师松年. 直肠肛管纵切心型吻合术治疗先天性巨结肠远期疗效观察. *河南外科学杂志* 2001;7:255-256
- 34 王军, 齐清会, 董作亮. 生物反馈治疗功能性便秘. *中国肛肠病杂志* 2001;21:25-26

胰腺癌扩大切除术后经动脉化疗泵区域灌注化疗 30 例

吕平, 刘芳, 王春友, 熊炯炘, 陈立波, 万赤丹, 高金波, 润晓勤

吕平, 王春友, 熊炯炘, 陈立波, 万赤丹, 高金波, 润晓勤, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022
刘芳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 CT 室 湖北省武汉市 430022

吕平, 男, 1968-06-30 生, 广西桂平市人, 汉族, 1991 年同济医科大学学士, 1999 年同济医科大学博士, 主治医师, 主要从事胰腺疾病临床与基础研究。
项目负责人: 吕平, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心。luliu@public.wh.hb.cn
电话: 027-85726273 传真: 027-85726830
收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-10-18

Regional perfusion chemotherapy via arterial chemotherapy pump after extended resection for pancreatic cancer

Ping Lü, Fang Liu, Chun-You Wang, Jiong-Xing Xiong, Li-Bo Chen, Chi-Dan Wan, Jing-Bo Gao, Xiao-Qing Run

Ping Lü, Chun-You Wang, Jiong-Xing Xiong, Li-Bo Chen, Chi-Dan Wan, Jing-Bo Gao, Xiao-Qing Run, Center for Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Fang Liu, CT Unit, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Ping Lü, Center for Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. luliu@public.wh.hb.cn
Received: 2003-09-06 Accepted: 2003-10-18

Abstract

AIM: To improve the survival rate of pancreatic cancer patients after extended pancreatectomy.

METHODS: The clinical data of pancreatic cancer patients were reviewed after extended pancreatectomy, without adjuvant therapy (control group, $n=27$) or with 5-fluorouracil (5-FU) regional perfusion via arterial chemotherapy pump (5-FU group, $n=30$), and the prognosis of the two groups were compared.

RESULTS: The survival rate in 5-FU group (median survival time=16 months) was significantly better than that in control group (median survival time=12 months) ($P<0.05$, Kaplan-Meier survival analysis, Log rank test); The 2-, 3-year cumulative survival rates in 5-FU group were 37% and 26% respectively, significantly better than those in the control group (15% and 5% respectively) ($P<0.05$, χ^2 test); The cumulative rate of death by hepatic metastasis alone in 5-FU group was significantly lower than that in control group ($P<0.05$, Log rank test); The WHO grade toxicities of 5-FU group generally were WHO I and II, and no WHO IV toxic events were observed.

CONCLUSION: 5-FU regional perfusion chemotherapy via arterial chemotherapy pump after extended resection for pancreatic cancer can reduce the hepatic metastasis with

relatively mild toxicities and increase the survival rate of the patients.

Lü P, Liu F, Wang CY, Xiong JX, Chen LB, Wan CD, Gao JB, Run XQ. Regional perfusion chemotherapy via arterial chemotherapy pump after extended resection for pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):734-737

摘要

目的: 探讨进一步提高胰腺癌扩大切除术患者生存率的方法。

方法: 回顾性分析胰腺癌扩大切除术后患者中未行辅助治疗(对照组, $n=27$)或经动脉化疗泵行 5-氟尿嘧啶(5-FU)区域灌注(5-FU 组, $n=30$)两组患者的临床资料并比较其预后。

结果: 5-FU 组(中位生存期 16 mo)生存率显著高于对照组(中位生存期 12 mo)($P<0.05$, Kaplan-Meier 生存分析, Log rank 检验); 5-FU 组 2 a 及 3 a 累积生存率分别为 37% 和 26%, 均显著高于对照组(分别为 15% 和 5%)($P<0.05$, χ^2 检验); 5-FU 组肝转移累积死亡率明显低于对照组($P<0.05$, Log rank 检验); 5-FU 组 WHO 化疗毒副反应分级多为 WHO I, II 级, 未出现 WHO IV 级毒副反应。

结论: 胰腺癌扩大切除术后经动脉化疗泵行 5-FU 区域灌注化疗能明显减少肝脏转移且毒副反应较轻, 可进一步提高患者生存率。

吕平, 刘芳, 王春友, 熊炯炘, 陈立波, 万赤丹, 高金波, 润晓勤. 胰腺癌扩大切除术后经动脉化疗泵区域灌注化疗 30 例. 世界华人消化杂志 2004;12(3): 734-737

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/734.asp>

0 引言

近年来胰腺癌发病率国内外都明显增加^[1-4], 5 a 生存率仅为 5.0%^[4-7]. 局部复发和肝转移仍是胰腺癌术后死亡的常见原因^[8-14]. 目前有少数国外研究表明胰腺癌切除术后采用介入方法行腹腔动脉灌注 5-FU^[15]或经肝动脉和门静脉双途径灌注 5-FU^[16]能抑制肝脏转移并显著提高患者的生存率. 而国内尚未见报道. 近年我科有关胰腺癌扩大切除术后经动脉化疗泵行区域灌注化疗的结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 1995-12/2001-06 本中心获扩大切除并存活胰腺癌患者中有 30 例术后经动脉化疗泵行 5-FU 区域灌注化疗(5-FU 组), 另 27 例术后未行辅助治疗的患

者作为对照组. 回顾分析至2002-12. 两组无显著性差异 ($P > 0.05$), 具有可比性(表 1).

表 1 两组胰腺癌患者一般资料

	对照组	5-FU 组	t 或 χ^2 值
n	27	30	
年龄(岁)	55.4 ± 13.9	58.8 ± 11.5	-1.000
性别(男/女)	16/11	15/15	0.491
胰腺切除方式, n (%)			0.334
全切	2 (7.4)	2 (6.7)	
胰头切除	21 (77.8)	25 (83.3)	
体尾切除	4 (14.8)	3 (10.0)	
肿瘤大小(cm), n(%)			1.019
0-2.0	2 (7.4)	4 (13.3)	
2.1-4.0	16 (59.3)	19 (63.3)	
4.1-6.0	9 (33.3)	7 (23.3)	
淋巴结受累, n (%)			0.929
N0	3 (11.1)	6 (20.0)	
N1	14 (51.9)	13 (43.3)	
N2	10 (37.0)	11 (36.7)	
浸润超过后腹膜, n(%)	19 (70.4)	20 (66.7)	0.090
门静脉切除, n(%)	14 (51.9)	12 (40.0)	0.805
联合脏器切除, n(%)	4 (14.8)	5 (16.7)	0.037
输全血量(mL)	607 ± 204	587 ± 196	0.392

N0= 无淋巴结受累; N1= 第 1 站淋巴结受累; N2= 第 2 站淋巴结受累. 年龄、输血量采用 t 检验, 其余采用 χ^2 检验. $P > 0.05$.

1.2 方法 5-FU 组关腹前经胃十二指肠动脉断端将化疗泵导管插入腹腔干部位并固定, 化疗泵体固定于切口旁皮下. 5-FU 600 mg/m² 经泵缓慢推入, 1 次/wk, 并根据患者化疗反应作相应处理. 定期复查血常规, 肝功能, 肾功能, 电解质, 血肿瘤标志物及免疫功能指标等; 肝脏、残留胰腺或胰床 B 超及 CT; 胸部 X 片等. 观察 5-FU 组毒副反应、中位生存期及生存率、死因分析.

统计学处理 所有数据应用 SPSS10.0 统计软件在电脑上进行分析. 分别采用 t 检验和 χ^2 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 方法.

2 结果

2.1 Kaplan-Meier 生存分析 5-FU 组中位生存期 16 mo, 生存率显著高于对照组中位生存期 12 mo ($P < 0.05$, Log rank=3.98). 5-FU 组 1, 2, 3 及 4 a 累积生存率分别为 63%, 37%, 26% 及 7%, 而对照组为 48%, 15%, 5% 及 5%; 5-FU 组 2 a 及 3 a 累积生存率均显著高于对照组 ($P < 0.05$, χ^2 值分别为 3.998 及 4.541), 而 1 a 及 4 a 累积生存率两组间无显著性差异 ($P > 0.05$, χ^2 值分别为 1.331 及 0.247, 见图 1).

2.2 死因分析 将患者死亡原因分为 3 类: 肝脏转移、局部复发合并肝转移、局部复发. 5-FU 组肝转移累积死亡率明显低于对照组 ($P < 0.05$, Log rank=3.87, 图 2), 而后两类累积死亡率两组间无显著性差异 ($P > 0.05$, Log rank 值分别为 1.50 及 0.11).

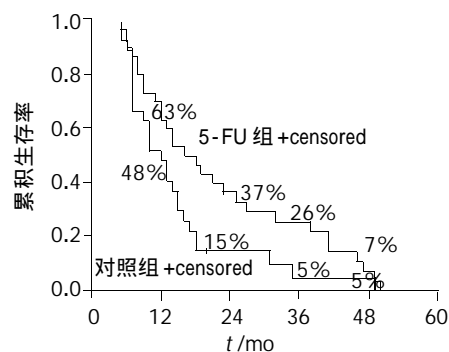


图 1 胰腺癌术后生存函数曲线.

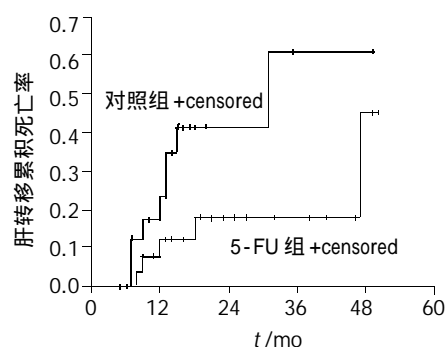


图 2 肝转移死亡函数曲线.

2.3 5-FU 组毒副反应 仅 1 例患者出现化疗泵导管相关并发症, 本组患者的平均化疗次数为 10(2-24 次), 全组共行化疗 299 次. 其中出现 WHO I, II 和 III 级毒副反应的化疗次数分别占 43%, 23% 和 6%, 未出现 WHO IV 级毒副反应.

3 讨论

胰腺癌预后差的一个重要原因是术后复发转移, 其中局部复发和肝脏转移是造成患者术后死亡的常见原因^[8-14]. 病理学证实, 胰腺癌不仅沿区域淋巴结转移, 而且向胰周结缔组织扩散^[17]. 胰周神经侵犯的发生率就高达 53.5-100%, 且胰周神经有癌细胞残留的患者较无癌细胞残留患者的生存期明显缩短^[18]. 由于现代影像学技术的进展, 对胰腺癌可切除性术前判断准确性提高^[19-23]. 同时外科手术技术日臻完善(如血管切除吻合技术等), 胰腺癌手术切除率提高, 手术死亡率及术后并发症减少^[24-26]. 为减少术后局部复发, 国内外学者均进行了积极的探索. 1973 年由 Fortner 首先报道了胰头癌的区域性切除(regional pancreaticoduodenectomy), 此后日本学者在追求根治切除以希望改善患者生存方面做了大量工作, 开展了胰腺癌扩大切除, 包括广泛清除淋巴结, 腹膜后结缔组织, 受累肠系膜上静脉-门静脉的切除和全胰

切除或联合脏器切除^[27-29]. Ishikawa et al 采用胰腺癌扩大切除以减少局部复发使患者 5a 生存率由 8% 提高到 24%^[28]. Ohta et al 将哨兵淋巴结(sentinel lymph node)的概念引入胰腺癌, 他们对哨兵淋巴结有转移的患者采用扩大淋巴结清扫的方式, 改善了患者的愈后^[30]. 我们的专业小组对常规 Whipple 胰十二指肠切除方法进行了改进, 在保证安全的前提下提高了切除率^[31]. 但肝脏转移使患者的实际生存率得不到显著的提高. 为解决这一问题, Ishikawa et al 在胰腺癌术后患者中通过肝动脉与门静脉双途径行肝脏灌注化疗, 通过减少肝脏转移使患者的 5 a 生存率由 24% 进一步提高到 40%^[28]. 德国学者 Beger et al 在胰腺癌术后患者中采用 Seldinger's 技术经腹腔干区域化疗, 这一方法使术后肝脏转移率从大于 60% 降至 17%, 中位生存期由 10.5 mo 延长到 23 mo^[15]. 我们的小组在胰腺癌患者中开展了术后经动脉化疗泵区域灌注化疗, 患者容易接受. 除 1 例患者出现化疗泵导管相关并发症外, 其余患者在化疗期间未出现与化疗泵有关的严重并发症. 由于是经动脉区域灌注化疗, 患者的毒副反应较轻, 多为 WHO I, II 级, 一般为胃肠道反应、轻至中度的肝功能受损及骨髓抑制, 经对症处理或暂停化疗均能缓解, 未出现 WHO IV 级毒副反应. 该方法方便经济, 术后经动脉化疗泵行区域灌注化疗期间, 多数患者无须住院, 每次化疗时间短, 可在社区医疗机构接受化疗. Kaplan-Meier 生存分析显示, 5-FU 组生存率显著高于对照组($P < 0.05$), 5-FU 组 2 及 3 a 累积生存率均显著高于对照组($P < 0.05$). 死因分析显示, 5-FU 组肝转移累积死亡率明显低于对照组($P < 0.05$), Beger et al^[15]的研究结果表明胰腺癌切除术后采用介入方法经动脉区域化疗在控制局部复发方面效果并不理想, 但能明显减少肝脏转移的发生率, 这与我们的结果类似.

5-FU 是最常用于治疗胰腺癌的化疗药物, 其对增生细胞各期均有杀伤作用. 对进展期胰腺癌患者的药代动力学观察及相关研究发现^[32-36], 与全身化疗相比, 经动脉化疗泵灌注 5-FU 能明显提高胰腺区域的药物浓度, 这有利于化疗药物进入瘤体中心及克服胰腺癌细胞对化疗药物的耐药性. 区域化疗时外周静脉中化疗药物的浓度可保持在较低的水平, 可相对减轻化疗药物的毒性反应. 此外区域化疗时门静脉血中高浓度的化疗药物对于预防胰腺癌的肝转移也有一定的好处. 我们的临床资料从另一侧面印证了上述研究结果. 另外本中心业已开展胰腺癌扩大切除术后经动脉化疗泵行健择或健择联合 5-Fu 区域灌注化疗的临床研究, 以期进一步提高患者的长期生存率.

4 参考文献

- Sahmoun AE, D'Agostino RA Jr, Bell RA, Schwenke DC. International variation in pancreatic cancer mortality for the period 1955-1998. *Eur J Epidemiol* 2003;18:801-816
- Wang L, Yang GH, Lu XH, Huang ZJ, Li H. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol* 2003;9:1819-1823
- Ghaneh P, Slavin J, Sutton R, Hartley M, Neoptolemos JP. Adjuvant therapy in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:482-489
- 刘民培, 马景云, 潘伯荣, 马连生. 中国胰腺癌的研究. *世界华人消化杂志* 2001;9:1103-1109
- Penberthy DR, Rich TA, Adams RB. Postoperative adjuvant therapy for pancreatic cancer. *Semin Surg Oncol* 2003;21:256-260
- Richter A, Niedergethmann M, Sturm JW, Lorenz D, Post S, Trede M. Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World J Surg* 2003;27:324-329
- Ni QX, Zhang QH, Fu DL, Cao GH, Yao QY, Jin C, Yu XJ, Zhang N, Zhang YL. Curative resection of pancreatic head carcinoma in recent 30 years: report of 377 cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:126-128
- Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link KH. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J Surg* 2003;27:1075-1084
- Ishikawa O, Wada H, Ohigashi H, Doki Y, Yokoyama S, Noura S, Yamada T, Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai T, Matsunaga T, Takenaka A, Nakaizumi A. Postoperative cytology for drained fluid from the pancreatic bed after "curative" resection of pancreatic cancers: does it predict both the patient's prognosis and the site of cancer recurrence? *Ann Surg* 2003;238:103-110
- Pour PM, Bell RH, Batra SK. Neural invasion in the staging of pancreatic cancer. *Pancreas* 2003;26:322-325
- Chari ST, Yadav D, Smyrk TC, DiMagno EP, Miller LJ, Raimondo M, Clain JE, Norton IA, Pearson RK, Petersen BT, Wiersema MJ, Farnell MB, Sarr MG. Study of recurrence after surgical resection of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Gastroenterology* 2002;123:1500-1507
- Takahashi S, Hasebe T, Oda T, Sasaki S, Kinoshita T, Konishi M, Ueda T, Ochiai T, Ochiai A. Extra-tumor perineural invasion predicts postoperative development of peritoneal dissemination in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:1407-1412
- Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2239-2245
- Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16:1-16
- Beger HG, Gansauge F, Buchler MW, Link KH. Intraarterial adjuvant chemotherapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer: significant reduction in occurrence of liver metastasis. *World J Surg* 1999;23:946-949
- Ishikawa O, Ohigashi H, Sasaki Y, Furukawa H, Imaoka S. Extended pancreatectomy and liver perfusion chemotherapy for resectable adenocarcinoma of the pancreas. *Digestion* 1999;60(Suppl 1):135-138
- Hirai I, Kimura W, Ozawa K, Kudo S, Suto K, Kuzu H, Fuse A. Perineural invasion in pancreatic cancer. *Pancreas* 2002;24:15-25
- Magistrelli P, Antinori A, Crucitti A, La Greca A, Masetti R, Coppola R, Nuzzo G, Picciocchi A. Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 2000;74:36-40
- Wang ZQ, Li JS, Lu GM, Zhang XH, Chen ZQ, Meng K. Correlation of CT enhancement, tumor angiogenesis and pathologic grading of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2100-2104
- Catalano C, Laghi A, Fraioli F, Pediconi F, Napoli A, Danti M, Reitano I, Passariello R. Pancreatic carcinoma: the role of high-resolution multislice spiral CT in the diagnosis and assessment of resectability. *Eur Radiol* 2003;13:149-156
- 王春友, 孔祥泉, 冯贤松, 龙跃平. MR/MRCP/MRA 对胆胰管恶

- 性阻塞性疾病术前诊断及治疗抉择的评价. 中华普通外科杂志 2001;16:91-93
- 22 Ishiguchi T, Ota T, Naganawa S, Fukatsu H, Itoh S, Ishigaki T. CT and MR imaging of pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:923-927
 - 23 Hosten N, Lemke AJ, Wiedenmann B, Bohmig M, Rosewicz S. Combined imaging techniques for pancreatic cancer. *Lancet* 2000;356:909-910
 - 24 Liu SL, Friess H, Kleeff J, Ji ZL, Buchler MW. Surgical approaches for resection of pancreatic cancer: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:118-125
 - 25 Shankar A, Russell RC. Recent advances in the surgical treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:622-626
 - 26 Stanford P. Surgical approaches to pancreatic cancer. *Nurs Clin North Am* 2001;36:567-577
 - 27 Nakao A. Debate: extended resection for pancreatic cancer; the affirmative case. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:57-60
 - 28 Ishikawa O, Ohigashi H, Yamada T, Sasaki Y, Imaoka S, Nakaizumi A, Uehara H, Tanaka S, Takenaka A. Radical resection for pancreatic cancer. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:166-170
 - 29 Nakao A, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Harada A, Nomoto S, Ekmel T, Yamashita K, Hatsuno T. The role of extended radical operation for pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:949-952
 - 30 Ohta T, Kitagawa H, Kayahara M, Kinami S, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. Sentinel lymph node navigation surgery for pancreatic head cancers. *Oncol Rep* 2003;10:315-319
 - 31 王春友, 熊炳妍, 周峰, 吕平, 陈立波, 范骥. 49 例胰腺癌血管浸润的术前评估与手术切除方法探讨. 中华肝胆杂志 2003;9:661-663
 - 32 Shore S, Raraty MG, Ghaneh P, Neoptolemos JP. Chemotherapy for pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:1049-1069
 - 33 Hu YC, Komorowski RA, Graewin S, Hostetter G, Kallioniemi OP, Pitt HA, Ahrendt SA. Thymidylate synthase expression predicts the response to 5-fluorouracil-based adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:4165-4171
 - 34 Haller DG. Chemotherapy for advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56(4 Suppl):16-23
 - 35 Takechi T, Fujioka A, Matsushima E, Fukushima M. Enhancement of the antitumour activity of 5-fluorouracil (5-FU) by inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase activity (DPD) using 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP) in human tumour cells. *Eur J Cancer* 2002;38:1271-1277
 - 36 李占元, 吕斌, 吴清, 李鲁传. 胰腺癌区域化疗和全身化疗时 5-Fu 在门、体静脉血中的动态分布及差异. 中华外科杂志 2001;39:263-265

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2002年度世界华人消化杂志 影响因子 1.926, WJG 影响因子 2.579

本刊讯 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4 151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 国际论文比 0.03, 地区分布数 26, 基金和资助论文比例 0.27.

2002 年度 World Journal of Gastroenterology(WJG) 总被引频次 1633, 影响因子 2.579, 即年指标 0.691, 他引总引比 0.08, 引用刊数 66, 扩散因子 4.0, 被引半衰期 2.43, 地区分布数 24, 基金和资助论文比例 0.67, 国际论文比 0.14.

(世界胃肠病学杂志社 2003-12-27)

黄色肉芽肿性胆囊炎的超声表现及其病理学基础

张梅, 彭玉兰, 罗燕, 庄华, 杨志刚

张梅, 彭玉兰, 罗燕, 庄华, 四川大学华西医院超声诊断科
四川省成都市 610041
杨志刚, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041
张梅, 女, 1975-11-05 生, 四川省成都市人, 汉族. 1999 年华西医科大学本科毕业, 2003 年四川大学在读研究生, 住院医师.
项目负责人: 张梅, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院超声诊断科.
amayzhang66@163.com
电话: 028-85422303
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-11-13

Xanthogranulomatous cholecystitis: Sonographic, surgical and pathologic correlation

Mei Zhang, Yu-Lan Peng, Yan Luo, Hua Zhuang, Zhi-Gang Yang

Mei Zhang, Yu-Lan Peng, Yan Luo, Hua Zhuang, Department of Ultrasonic Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Zhi-Gang Yang, Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Mei Zhang, Department of Ultrasonic Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. amayzhang66@163.com
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To determine the sonographic features of xanthogranulomatous cholecystitis (XGC), which could improve imaging diagnosis.

METHODS: The sonographic features of 32 patients with surgically resected XGC were retrospectively evaluated on the basis of the surgical and pathological findings. The patients were 15 women and 17 men, aged from 21 to 88 (mean 55.3) years.

RESULTS: The gallbladder wall was thickened in all patients. Among the 32 cases, 15 (46.9%) were between 4 mm to 6 mm; 14 (43.8%) were between 7 mm to 10 mm; 3 (9.3%) were between 11 mm to 22 mm. On the membranous surface of the gallbladder wall, 20 (62.5%) were smooth, while 12 (37.5%) were uneven. Other manifestations included intramural hypoechoic nodule in 5 (15.6%), intramural cholelithiasis in 1 (3.1%), and cholelithiasis 30 (93.8%), respectively. Two patients (6.3%) had liver hypoechoic or iso-echoic mass resulted from the infiltration of XGC.

CONCLUSION: Sonographic manifestations present thickened gallbladder wall, with intramural hypoechoic nodules and/or cholelithiasis. Sonographic examination can reveal the surgical and pathological findings of the XGC.

Zhang M, Peng YL, Luo Y, Zhuang H, Yang ZG. Xanthogranulomatous cholecystitis: Sonographic, surgical and pathologic correlation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):738-740

摘要

目的: 明确黄色肉芽肿性胆囊炎的超声表现特征, 以提高影像诊断的正确性.

方法: 回顾性分析经手术病理证实的黄色肉芽肿性胆囊炎 32 例的超声表现. 男 17 例, 女 15 例, 年龄 21-88 (平均 55.3 岁).

结果: 所有患者均有胆囊壁增厚, 壁厚 4-6 mm 为 15 例 (46.9%), 7-10 mm 14 例 (43.8%), 11-22 mm 3 例 (9.3%). 内壁光滑 20 例 (62.5%), 内壁不光滑 12 例 (37.5%). 壁间低回声结节 5 例 (15.6%), 壁间结石 1 例 (3.1%). 合并胆石症 30 例 (93.8%), 其中单纯胆囊结石 22 例 (68.8%), 单纯胆总管结石 2 例 (6.3%), 胆囊结石合并胆总管结石 6 例 (18.8%). 浸润肝脏形成等回声或弱回声团块 2 例 (6.3%).

结论: 黄色肉芽肿性胆囊炎主要表现为胆囊壁不同程度增厚, 可有壁内低回声结节, 常伴有胆囊结石或胆管结石. 超声检查可反映黄色肉芽肿性胆囊炎的病理改变.

张梅, 彭玉兰, 罗燕, 庄华, 杨志刚. 黄色肉芽肿性胆囊炎的超声表现及其病理学基础. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):738-740

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/738.asp>

0 引言

黄色肉芽肿性胆囊炎 (xanthogranulomatous cholecystitis, XGC) 是一种以胆囊慢性炎症为基础, 伴胆囊肉芽肿、重度增生纤维化以及泡沫样组织细胞为特征的炎性病变^[1-3]. XGC 的临床及超声表现难以与胆囊炎胆石症鉴别^[4]. 当 XGC 的胆囊壁弥漫性明显增厚呈实性改变, 局部明显增厚形成瘤样肿块或伴有肝脏浸润时, 易误诊为胆囊癌^[5-20]. 为此, 我们对 32 例经手术病理证实的 XGC 进行回顾性分析, 着重探讨其超声表现特征及其病理学基础, 以提高该疾病的影像诊断准确性.

1 材料和方法

1.1 材料 我院 1997-06/2003-06 超声检查后经手术及病理证实的 XGC 32 例. 男 17 例, 女 15 例. 年龄 21-88 (平均 55.3 岁). 病程 4 d-30 a, 平均 31 mo. 有右上腹疼痛史 30 例, 无疼痛史 2 例, 分别因黄疸及体检就诊. 有多次胆囊炎急性发作史 21 例. 发热 2 例, 皮肤黄疸 11 例, 腹部包块 3 例.

1.2 方法 仪器为 TOSHIBA-240, RTFINO, HDI3500 型超声诊断仪, 探头频率 3.5 MHz. 常规检查胆囊及胆

道系统. 观察胆囊大小、壁厚、胆囊壁回声情况, 有无胆囊结石、胆管结石和胆道扩张, 胆囊与肝实质分界情况, 有无肝实质浸润灶以及上腹部淋巴结长大. 所有标本均纵行剖开, 40 g/l 甲醛液固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜观察.

2 结果

2.1 XGC 超声表现 所有患者均有胆囊壁增厚(图 1-3), 壁厚 4-6 mm 15 例(46.9%), 7-10 mm 14 例(43.8%), 11-22 mm 3 例(9.3%). 内壁不光滑 12 例(37.5%), 内壁光滑 20 例(62.5%). 壁间低回声结节 5 例(15.6%, 图 1), 壁间结石 1 例(3.1%, 图 2). 胆囊长大 12 例(37.5%), 胆囊缩小 6 例(18.8%), 胆囊正常大小 14 例(43.8%). 合并胆石症 30 例(93.8%), 其中单纯胆囊结石 22 例(68.8%, 图 3), 单纯胆总管结石 2 例(6.3%), 胆囊结石合并胆总管结石 6 例(18.8%). 胆囊与肝脏分界欠清 4 例(12.5%). 累及肝外胆管致胆道梗阻 2 例(6.3%). 伴上腹部包裹性积液 1 例. 门静脉旁可见长大的淋巴结 1 例(3.1%, 表 1). 超声疑诊为胆囊癌 5 例, 其中 1 例形成从囊壁突向囊腔的等回声团块, 大小约 30 mm×22 mm; 2 例可见与胆囊相连的胆囊旁肝实质内等回声或低回声团块, 直径 40 mm-60 mm, 团块边界清楚; 2 例胆囊缩小、胆囊壁明显增厚呈实性改变.

2.2 XGC 手术及病理 剖开切下的胆囊, 见胆囊壁不同程度地增厚、质硬, 部分水肿明显, 可见壁间黄绿色结节, 显微镜下见胆囊壁内大量泡沫样组织细胞、急性慢性炎症细胞、纤维母细胞、异物巨细胞等形成的特征性肉芽肿. 术中见单纯胆囊结石 22 例(图 3), 单纯胆总管结石 2 例, 胆囊结石合并胆总管结石 6 例. 多数病例黏膜平滑, 少数凹凸不平, 结石嵌顿处黏膜糜烂. 胆囊与周围组织不同程度的粘连或被网膜包裹. 胆囊壁部分坏疽 5 例, 胆囊穿孔伴上腹部包裹性积液 1 例, 胆囊胆总管内瘘 2 例, Mirizzi 综合征 1 例. 累及肝外胆管致慢性炎症 2 例. 累及肝脏致肝间质慢性炎细胞浸润、肝细胞脂肪变性 4 例. 2 例胆囊旁肝实质内形成浸润灶时可见纤维组织大量增生, 大量炎细胞浸润. 1 例门静脉旁见大小分别为 30 mm×20 mm 及 10 mm×5 mm 的淋巴结, 病理为淋巴结反应性增生改变. 所有病例均未见肿瘤细胞.



图 1 胆囊实变伴壁间弱回声结节(↓ 1), 与肝脏分界欠清(↓ 2).

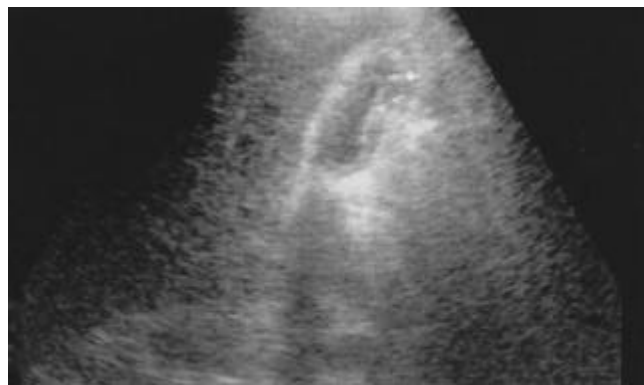


图 2 胆囊壁增厚伴壁间结石(←).

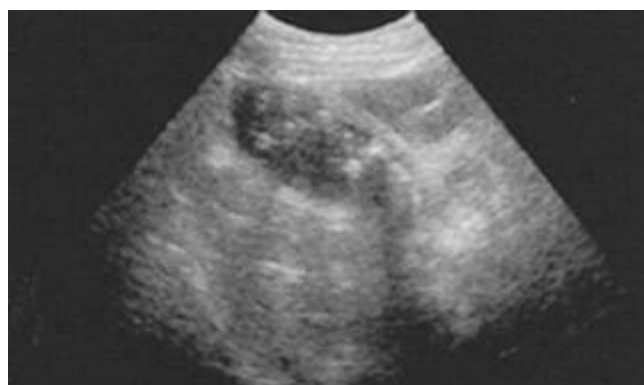


图 3 胆囊壁增厚伴多发胆囊结石.

表 1 黄色肉芽肿性胆囊炎 32 例的超声表现

观察指标	n (%)
胆囊 长大	12 (37.5%)
缩小	6 (18.8%)
内壁光滑	20 (62.5%)
内壁不光滑	12 (37.5%)
壁间低回声结节	5 (15.6%)
壁间结石	1 (3.1%)
胆石症 单纯胆囊结石	22 (68.8%)
单纯胆总管结石	2 (6.3%)
胆囊结石合并胆总管结石	6 (18.8%)
胆囊与肝脏分界清楚	28 (87.5%)
分界不清楚	4 (12.5%)
上腹部淋巴结 未见长大	31 (96.9%)
长大	1 (3.1%)

3 讨论

1970 年, Christensen 首次报道 7 例 XGC. 本病占同期胆囊切除术的 0.7-11.2%, 以 50-60 岁多见, 本组平均年龄为 55.3 岁. XGC 与胆囊结石或胆道结石密切相关, 文献[9]报道达 78-96%, 本组 30 例, 占 93.8%. XGC 的临床表现缺乏特异性, 常有反复发作的右上腹疼痛, 可伴有黄疸、发热, 偶能触及肿大的胆囊. XGC 的发病机制尚不十分清楚, 多数学者认为由急性炎症和梗阻综合因素引起^[1-3, 21-24]. 胆汁沿着破裂的 Rokitansky-Aschoff 窦

或黏膜溃疡病灶不断渗入至胆囊壁,组织细胞聚集,吞噬胆汁中的胆固醇,形成富含脂质的泡沫样组织细胞,随着病程发展,病灶扩大,纤维组织大量增生,形成炎性肉芽肿块,并与肝脏或临近器官粘连、浸润。有时影像学检查可将XGC误诊为胆囊癌,因此世界卫生组织(WHO)对胆道肿瘤组织学分类时也将XGC列入其中^[9]。

XGC病理上根据病变累及范围分为两型:(2)局限型:胆囊壁正常结构受到不同程度破坏,代之以结节性肉芽肿结构,胆囊壁增厚,壁间形成单一或多发病灶,直径3-30 mm的黄绿色结节;(2)弥漫型:病变浸润胆囊壁全层,并向外侵犯脂肪结缔组织及临近器官^[6, 14, 24]。本组病例均有胆囊壁的增厚,多数内壁光滑,部分胆囊壁内见低回声结节,病理为大量泡沫样组织细胞、急慢性炎症细胞、纤维母细胞、异物巨细胞等形成的特征性黄色肉芽肿。少数内壁凹凸不平,结石嵌顿处黏膜糜烂,镜下见病变主要位于胆囊壁内,被黏膜覆盖。XGC常伴胆囊结石或胆道结石,本组有30例,占93.8%。当病变累及肝外胆管时,超声表现为肝外胆管壁增厚、管腔狭窄,并致肝内胆管梗阻性扩张,与手术发现一致,病理为胆管慢性炎症。当肝脏受侵时,超声显示胆囊与肝脏分界欠清,还可形成与胆囊相连的肝实质内占位团块,手术发现为胆囊与周围组织不同程度粘连或被网膜包裹,病理证实为胆囊周围炎性反应和肝慢性炎细胞浸润。超声所见胆囊旁肝实质内占位团块,病理为肝脏浸润灶内纤维组织大量增生,大量炎细胞浸润。

本病被认为是一种少见、良性并有破坏性的胆囊炎性病变^[9-10, 15]。可伴发胆囊壁坏疽、胆囊穿孔、内瘘、Mirizzi综合征、胆管炎性狭窄致胆道梗阻。其并发症发生率高,本组11例,占34%,主要为胆囊壁坏疽性改变,其次为胆囊壁穿孔后内瘘的形成。据文献^[5, 9, 14]报道有10%的XGC合并胆囊癌,但本组无病例并发胆囊癌。XGC是否属于癌前病变有待进一步证实。因此,当超声发现持续性壁增厚的慢性胆囊炎时,应尽早手术,或针吸活检,以获得组织学证据。Maguruma et al 报告采用腔内超声也有利于XGC的诊断。

在临床诊断中,采用影像学方法可鉴别XGC与胆囊癌^[1, 3, 6, 11, 24]。当XGC的胆囊壁弥漫性明显增厚呈实性改变、局部明显增厚形成瘤样肿块或伴有肝脏浸润灶时,须与胆囊癌相鉴别。以下XGC的影像学表现特点有助于与胆囊癌鉴别:(1)胆囊壁增厚。抗炎治疗后胆囊壁持续增厚且病程较长时,提示XGC的可能;(2)超声示胆囊内壁光滑,本组20例,占62.5%,CT显示为黏膜线的连续,此点对XGC与胆囊癌的鉴别诊断很有帮助;(3)胆囊壁局限性病变者,超声示壁内低回声结节,本组5例,占15.6%,CT示胆囊壁间低密度结节区域占据增厚的胆囊壁较大区域时(有文献报道为超过60%),高度提示XGC;(4)绝大多数患者上腹部未见长大的淋巴结,本组31例,占96.9%。而胆囊癌生物学恶性度高,肿瘤细胞易沿淋巴引流扩散,常致门腔间隙、肝门以及腹腔动脉周围淋巴结长大。因此,有无上腹部淋巴结长大,也

有助于XGC与胆囊癌相鉴别。

4 参考文献

- 1 Chun KA, Ha HK, Yu ES, Shinn KS, Kim KW, Lee DH, Kang SW, Auh YH. Xanthogranulomatous cholecystitis: CT features with emphasis on differentiation from gallbladder carcinoma. *Radiology* 1997;203:93-97
- 2 Hsu C, Hurwitz JL, Schuss A, Katz DS. Radiology-pathology conference: Xanthogranulomatous cholecystitis. *Clin Imaging* 2003;27:421-425
- 3 Kim PN, Lee SH, Gong GY, Kim JG, Ha HK, Lee YJ, Lee MG, Auh YH. Xanthogranulomatous cholecystitis: radiologic findings with histologic correlation that focuses on intramural nodules. *Am J Roentgenol* 1999;172:949-953
- 4 曲利娟, 余英豪, 毕东军, 孙惠敏. 黄色肉芽肿性胆囊炎12例临床病理分析. *诊断病理学杂志* 2002;9:23-25
- 5 Ros PR, Goodman ZD. Xanthogranulomatous cholecystitis versus gallbladder carcinoma. *Radiology* 1997;203:10-12
- 6 Parra JA, Acinas O, Bueno J, Guezmes A, Fernandez MA, Farinas MC. Xanthogranulomatous cholecystitis: clinical, sonographic, and CT findings in 26 patients. *Am J Roentgenol* 2002;174:979-983
- 7 徐伟忠. 胆囊癌35例超声与手术病理对照. *新消化病学杂志* 1996;4:263
- 8 王绍文. 胆囊隆起样病变53例超声与病理对照. *新消化病学杂志* 1995;3:245-246
- 9 陈曼, 龚新环. 黄色肉芽肿性胆囊炎(附16例分析). *中国超声医学杂志* 1999;15:837-839
- 10 Enomoto T, Todoroki T, Koike N, Kawamoto T, Matsumoto H. Xanthogranulomatous cholecystitis mimicking stage IV gallbladder cancer. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1255-1258
- 11 Gore RM, Yaghami V, Newmark GM, Berlin JW, Miller FH. Imaging benign and malignant disease of the gallbladder. *Radiol Clin North Am* 2002;40:1307-1323
- 12 Levy AD, Murakata LA, Abbott RM, Rohrmann CA Jr. From the archives of the AFIP. Benign tumors and tumorlike lesions of the gallbladder and extrahepatic bile ducts: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2002;22:387-413
- 13 Levy AD, Murakata LA, Rohrmann CA Jr. Gallbladder carcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2001;21:295-314
- 14 张兆祥, 吴遵元, 石新兰, 徐弘. 黄色肉芽肿性胆囊炎. *中华肝胆外科杂志* 1999;5:223-225
- 15 Roels K, Bogaert J, Van Hoe L, Vanbeckevoort D, Delvaux S. Xanthogranulomatous cholecystitis associated with a xanthogranulomatous pseudotumour on the left diaphragm. *Eur Radiol* 1999;9:1139-1141
- 16 Yoshida J, Chijiwa K, Shimura H, Yamaguchi K, Kinukawa N, Honda H, Tanaka M. Xanthogranulomatous cholecystitis versus gallbladder cancer; clinical differentiating factors. *Am Surg* 1997;63:367-371
- 17 朱文莉, 陆维祺, 王炳生. 黄色肉芽肿性胆囊炎误诊为胆囊癌4例分析. *中国实用外科杂志* 2000;20:318
- 18 陆维祺, 朱文莉, 王炳生, 董赛雄, 何连齐, 刘厚宝, 姚礼庆. 胆囊癌诊治的若干体会. *中华普通外科杂志* 2000;15:325-327
- 19 Maeda T, Shimada M, Matsumata T, Adachi E, Taketomi A, Tashiro Y, Tsuneyoshi M, Sueishi K, Sugimachi K. Xanthogranulomatous cholecystitis masquerading as gallbladder carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1994;89:628-630
- 20 Howard TJ, Bennion RS, Thompson JE Jr. Xanthogranulomatous cholecystitis: a chronic inflammatory pseudotumor of the gallbladder. *Am Surg* 1991; 57:821-824
- 21 Casas D, Perez-Andres R, Jimenez JA, Mariscal A, Cuadras P, Salas M, Gomez-Plaza MC. Xanthogranulomatous cholecystitis: a radiological study of 12 cases and a review of the literature. *Abdom Imaging* 1996;21:456-460
- 22 Houston JP, Collins MC, Cameron I, Reed MW, Parsons MA, Roberts KM. Xanthogranulomatous cholecystitis. *Br J Surg* 1994;81:1030-1032
- 23 Moldavsky M, Hadary A, Turani H. Xanthogranulomatous cholecystitis. *Acta Cytol* 1998;42:1050-1051
- 24 Kim PN, Ha HK, Kim YH, Lee MG, Kim MH, Auh YH. US findings of Xanthogranulomatous cholecystitis. *Clin Radiol* 1998;53:290-292

良性与恶性胃溃疡患者红细胞免疫和T细胞亚群的变化及相关性分析

方 辉, 谭诗云, 罗和生, 沈志祥, 于皆平

方辉, 谭诗云, 罗和生, 沈志祥, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科
湖北省武汉市 430060

方辉, 男, 1977-12-07 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 2001 年武汉大学医学院
学士, 2001 年武汉大学医学院消化内科硕士生. 主要从事消化系统疾病与
免疫关系的研究.

项目负责人: 谭诗云, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路 238 号, 武汉大
学人民医院消化内科. tanshiyun@medmail.com.cn

电话: 027-88041919-2135

收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-07

Relationship between erythrocytic immunity and T-cell subsets in patients with benign and malignant gastric ulcers

Hui Fang, Shi-Yun Tan, He-Sheng Luo, Zhi-Xiang Shen,
Jie-Ping Yu

Hui Fang, Shi-Yun Tan, He-Sheng Luo, Zhi-Xiang Shen, Jie-Ping Yu,
Division of Gastroenterology, Wuhan University Renmin Hospital,
Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Shi-Yun Tan, Division of Gastroenterology,
Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province,
China. tanshiyun@medmail.com.cn

Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-07

Abstract

AIM: To investigate the variation and their relationship between erythrocytic immunity and T-cell subsets in patients with benign and malignant gastric ulcer (BGU and MGU) and to provide a basis for prevention and immune therapy.

METHODS: In 30 cases of BGU, 25 cases of MGU and 32 cases of normal control, RBC- C_{3b} RR, RBC-ICR and RBC-TRR were tested by immune adherence rosette method. T-cell subsets were tested by SAP assay.

RESULTS: RBC- C_{3b} RR and RBC-TRR remarkably declined in MGU group than those in BGU group and the control group ($P < 0.01$). The number fractions of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ ratio were significantly lower in MGU group as compared with BGU group and control subjects ($P < 0.05$). The value of RBC-ICR and the percentage of $CD8^+$ were the highest in MGU group. They were second in BGU group and the lowest in the control group ($P < 0.05$). The $CD4^+/CD8^+$ ratio was significantly correlated with the value of RBC- C_{3b} RR and RBC-TRR in the BGU and MGU groups ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Both erythrocytic immunity and T-cell subsets may play an important role in the occurrence and development of the BGU and MGU. Erythrocytic immunity may regulate the activity of immune cells including T-cell subsets via some mechanisms. Erythrocytic immunity and T-cell subsets may have the immune prevention functions in patients with BGU and MGU.

Fang H, Tan SY, Luo HS, Shen ZX, Yu JP. Relationship between erythrocytic immunity and T-cell subsets in patients with benign and malignant gastric ulcers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):741-743

摘要

目的: 探讨良性与恶性胃溃疡患者(BGU & MGU)RBC免疫功能和T细胞亚群的变化及其相关关系, 为其免疫防治提供理论依据.

方法: 应用免疫黏附法和SAP法对55例BGU & MGU患者RBC免疫活性(RBC- C_{3b} RR, RBC-ICR 和 RBC-TRR)和外周血T细胞亚群($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$)进行检测.

结果: 25 例 MGU 组 RBC- C_{3b} RR 和 RBC-TRR(16.0 ± 3.8 和 23.1 ± 5.8)明显下降, 显著低于 30 例 BGU 组(19.9 ± 4.3 和 34.6 ± 6.5)和 32 例正常对照组(25.4 ± 5.7 , 43.8 ± 6.7 , $P < 0.01$). $CD3^+$, $CD4^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 在 MGU 组(0.59 ± 0.05 , 0.33 ± 0.04 和 1.08 ± 0.15)显著低于 BGU 组(0.63 ± 0.05 , 0.37 ± 0.05 和 1.23 ± 0.21)和正常对照组(0.68 ± 0.06 , 0.42 ± 0.05 和 1.48 ± 0.23 , $P < 0.05$). RBC-ICR 和 $CD8^+$ 在 MGU 组最高(8.7 ± 3.1 和 0.32 ± 0.04), BGU 组(6.9 ± 2.6 和 0.31 ± 0.05)次之, 对照组(5.4 ± 2.0 和 0.27 ± 0.05)最低($P < 0.05$). BGU, MGU 组 RBC- C_{3b} RR 和 RBC-TRR 与 $CD4^+/CD8^+$ 呈明显正相关($P < 0.01$).

结论: RBC 免疫与 T 细胞亚群均参与了 BGU 与 MGU 的发生和发展. RBC 免疫可能通过某种机制调控了包括 T 细胞亚群在内的某些免疫细胞的活性, 从而共同发挥免疫防御作用.

方辉, 谭诗云, 罗和生, 沈志祥, 于皆平. 良性与恶性胃溃疡患者红细胞免疫和 T 细胞亚群的变化及相关性分析. 世界华人消化杂志 2004;12(3):741-743
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/741.asp>

0 引言

近年来, 良、恶性胃溃疡(BGU & MGU)与免疫关系的研究越来越引起人们的重视^[1-4]. 患者的细胞免疫功能显著降低, RBC 在肿瘤免疫方面发挥着重要作用^[5-9]. 然而, 有关 RBC 免疫与 BGU, MGU 关系的研究较少. 我们探讨 BGU 与 MGU 患者 RBC 免疫和 T 细胞亚群的变化及其相互间的关系, 为其免疫防治提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 武汉大学人民医院 BGU 30 例, 男 19 例, 女

11例, 年龄22-70(平均45岁); MGU 25例, 男15例, 女10例, 年龄25-76(平均49岁). 正常对照组32例, 其性别和年龄构成与疾病组无明显差异. 所有病例均经病理检查证实. 溃疡大小为0.5-3.0 cm, 数目为1个; 无手术、放疗、化疗及免疫治疗史; 无损害免疫功能的慢性病史, 如糖尿病、系统性红斑狼疮和其他恶性肿瘤史等; 近期无明确急性感染史. 补体致敏、未致敏的酵母冻干试剂和癌细胞冻干试剂(第二军医大学长海医院免疫室); 人外周血T细胞亚群SAP法检测试剂盒(北京中山生物技术有限公司).

1.2 方法 RBC C_{3b}受体花环试验(RBC-C_{3b}RR), RBC免疫复合物花环试验(RBC-ICR)和肿瘤RBC花环试验(RBC-TRR), 均参照郭峰法^[10]进行. T细胞亚群检测按照试剂盒说明书进行.

统计学处理 用mean±SD表示, 两样本均数比较采用t检验, 多个样本均数比较采用方差分析, 多个样本均数两两比较采用q检验; 两变量间的相关性采用直线相关分析.

2 结果

2.1 RBC-C_{3b}RR, RBC-ICR和RBC-TRR的变化 RBC-C_{3b}RR和RBC-TRR在BGU&MGU组显著低于对照组(P<0.01), MGU组较BGU组有明显降低(P<0.01). RBC-ICR在BGU&MGU组显著高于对照组(P<0.05), MGU组较BGU组有明显升高(P<0.05, 表1)

表1 胃溃疡患者RBC免疫功能(mean±SD, %)

分组	n	RBC-C _{3b} RR	RBC-ICR	RBC-TRR
对照组	32	25.4 ± 5.7	5.4 ± 2.0	43.8 ± 6.7
BGU	30	19.9 ± 4.3 ^{bd}	6.9 ± 2.6 ^{ac}	34.6 ± 6.5 ^{bd}
MGU	25	16.0 ± 3.8 ^b	8.7 ± 3.1 ^b	23.1 ± 5.8 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01, vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01, vs MGU.

2.2 外周血T细胞亚群的变化 CD3⁺, CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺在BGU&MGU组较对照组显著降低(P<0.01), MGU组较BGU组有明显降低(P<0.05). CD8⁺在BGU&MGU组较对照组显著升高(P<0.05), 两组间改变不明显(P>0.05, 表2).

表2 胃溃疡患者外周血T细胞亚群(mean±SD)

分组	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组	32	0.68 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.27 ± 0.05	1.48 ± 0.23
BGU	30	0.63 ± 0.05 ^{bc}	0.37 ± 0.05 ^{bc}	0.31 ± 0.05 ^a	1.23 ± 0.21 ^{bc}
MGU	25	0.59 ± 0.05 ^b	0.33 ± 0.04 ^b	0.32 ± 0.04 ^b	1.08 ± 0.15 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01, vs 对照组; ^cP<0.05, vs MGU

2.3 RBC免疫功能与T细胞亚群的相关性 BGU, MGU

组RBC-C_{3b}RR和RBC-TRR与CD4⁺/CD8⁺呈明显正相关(P<0.01, 表3).

表3 胃溃疡患者RBC-C_{3b}RR, RBC-TRR与CD4⁺/CD8⁺的相关性

分组	n	指标	相关系数()	P
BGU	30	C _{3b} RR	0.69	<0.01
		TRR	0.64	<0.01
MGU	25	C _{3b} RR	0.65	<0.01
		TRR	0.62	<0.01

3 讨论

RBC免疫功能紊乱, 将无法有效识别和清除肿瘤细胞^[11-15]. 我们发现, BGU组RBC-C_{3b}RR和RBC-TRR明显降低(P<0.01), RBC-ICR明显升高(P<0.05), 而MGU组此3项指标的改变更为显著(P<0.01), 且两组间也存在显著性差异(P<0.05). 结果表明BGU患者的RBC免疫功能有明显降低, 随着胃溃疡的恶变, RBC免疫功能降低更为显著. 分析其原因可能因为患者体内循环免疫复合物(CIC)大量堆积, 尤其是MGU, 机体分泌大量抗原物质, CIC堆积更为显著, RBC CR1被大量占据, 使CR1空位显著减少. 同时恶性细胞可通过释放免疫抑制因子, 来抑制RBC CR1活性. 这一方面导致RBC-C_{3b}RR下降, 另一方面, RBC黏附过多CIC, 于是形成大量RBC-免疫复合物, 从而引起RBC-ICR升高, 最后导致继发性RBC免疫功能紊乱^[16-19]. 由于机体对CIC的清除能力下降, CIC大量沉积于胃黏膜的血管壁上, 造成微循环的障碍. 而且CIC堆积和补体的激活(RBC CR1受体是补体激活系统的抑制剂)可引发胃黏膜一系列病理损害, 并使胃黏膜局部防御功能降低, 最终导致胃溃疡的发生和恶化.

外周血T细胞亚群的平衡是维持免疫系统内部环境稳定的一个中心环节^[20-26]. 本结果表明BGU组CD3⁺, CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺明显低于对照组(P<0.01), CD8⁺明显升高(P<0.05), 而MGU组改变更为显著(P<0.01). 两组间除CD8⁺改变不明显外(P>0.05), 其他指标均存在显著性差异(P<0.05). 这表明BGU患者的淋巴细胞免疫功能已开始降低, 而以MGU患者降低最显著. 因此, 如果发现BGU患者其淋巴细胞免疫功能显著低下, 应警惕其癌变可能. T细胞亚群变化的可能原因: (1)胃黏膜慢性病变导致组胺和前列腺素分泌增多, 二者除与胃酸分泌有关外, 还可抑制机体的免疫功能; (2)胃内局部病灶消耗大量T细胞; (3)免疫抑制因子抑制T细胞的增生分化^[27]; (4)CIC激活抑制性T细胞, 其分泌的细胞因子引起CD4⁺的降低和CD8⁺的升高, 导致CD4⁺/CD8⁺的显著降低, 最终造成T细胞免疫功能的紊乱.

RBC不仅本身具有重要的免疫功能, 还可能参与调控包括T细胞亚群在内的某些免疫细胞的活性^[28-30], RBC通过CR1, CR3, CD58(LFA-3), CD59及超氧化歧化酶(SOD)参与调节T淋巴细胞的免疫功能^[31]. 我们

发现两组 RBC-C_{3b}RR 和 RBC-TRR 与 CD4⁺/CD8⁺ 呈明显正相关($P < 0.01$), 可能原因: (1)RBC 和 T 细胞亚群同属于骨髓多能干细胞, 二者可能存在某种内在的联系或具有某些共同的免疫特性; (2)RBC 和 T 细胞亚群的免疫学特性可能受到某些共同的遗传因子的影响和控制; (3)RBC 膜的 SOD 通过清除氧自由基, 间接影响并提高了 T 细胞亚群的免疫功能; (4)T 细胞亚群分泌的细胞因子对 RBC 免疫功能起着重要的影响. 因此, RBC 和淋巴细胞共同组成了一个完整的免疫网络系统, 这符合 Jerne 的“免疫网络学说”.

总之, RBC 免疫和 T 细胞亚群均参与了胃溃疡的发生和发展, 他们之间也存在密切的相关性. 因此, 对胃溃疡患者的 RBC 免疫和 T 细胞亚群进行检测, 对病情的严重程度和预后评估有一定的意义.

4 参考文献

- 张晓岚, 姚希贤, 李永军, 王丽芳. 大剂量维生素 C 对肝硬变患者肝功能及细胞免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:649-652
- 高巍, 黄裕新, 陈洪, 赵宁侠, 孙大勇, 张洪新, 王庆莉. 电针对胃经 - 脑肠肽 - 免疫网络的调控机制. 世界华人消化杂志 2001;9:279-283
- 郭峰, 张乐之, 许育, 钱宝华. 肝脏疾病的红细胞免疫学研究. 世界华人消化杂志 2001;9:123-126
- Ko HS, Kim IS, Lee K, Kim SW, Kim CJ, Ryu WS. Characterization of binding and phagocytosis of oxidatively damaged erythrocyte to macrophage. *Korean J Intern Med* 2002;17:220-226
- Sepcic K, Berne S, Potrich C. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur J Biochem* 2003;270:1199-1210
- Zhao H, Zhuang F, Stoltz JF. Comparative studies of LFA-1/ICAM-1 interaction by micropipette and flow chamber. *Biorheology* 2003;40:179-187
- Chae JH, Kim CG. CP2 binding to the promoter is essential for the enhanced transcription of globing genes in erythroid cells. *Mol Cells* 2003;15:40-47
- Im H, Grass JA, Christensen HM, Perkins A, Bresnick EH. Histone deacetylase-dependent establishment and maintenance of broad low-level histone acetylation within a tissue-specific chromatin domain. *Biochemistry* 2002;41:15152-15160
- Van Mook WN, Fickers MM, Verschuere TA. Clinical and immunological evaluation of primary splenic irradiation in chronic lymphocytic leukemia: a study of 24 cases. *Ann Hematol* 2001;80:216-223
- 郭峰. 红细胞免疫及其调节功能的测定方法. 免疫学杂志 1990;6:60-62
- Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, Dobrovic A. Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood* 2001;97:3633-3639
- Wu P, Cao Y, Wu J. Effects of moxa-cone moxibustion at Guanyuan on erythrocytic immunity and its regulative function in tumor-bearing mice. *J Tradit Chin Med* 2001;21:68-71
- Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Immunol* 2001;15:208-73-79
- Bolan CD, Childs RW, Procter JL, Barrett AJ, Leitman SF. Massive immune haemolysis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO incompatibility. *Br J Haematol* 2002;116:500-501
- Geiger JN, Knudsen GT, Panek L, Pandit AK. mDyrk3 kinase is expressed selectively in late erythroid progenitor cells and attenuates colony-forming unit-erythroid development. *Blood* 2001;97:901-910
- 嵇武, 陈训如, 罗丁, 徐梅. 腹腔镜胆囊切除术与开腹胆囊切除术手术前后机体红细胞免疫功能的变化. 华人消化杂志 1998;6:652
- 郭峰, 赵书平, 叶芳耘, 张乐之. 肝病患者红细胞 cr-1 基因组密度多态性与红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力的相关性. 华人消化杂志 1998;6:841-843
- Tsuji M, Zavala F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of plasmodium. *Trends Parasitol* 2003;19:88-93
- 张辉, 任锡玲, 姚希贤. 慢性胃病 T 细胞亚群、一氧化氮、氨基己糖含量与 Hp 感染的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:127-129
- 荆洁线, 韩存芝, 赵先文, 郭晋纲, 王丽芳. 消化系癌血清微量元素与 T 细胞亚群相关性研究的价值. 世界华人消化杂志 1999;7:240-242
- 林谷珍, 王小众, 王平, 林峻, 杨发端. 脾虚泄泻患者健脾益肾汤治疗的疗效与免疫学研究. 世界华人消化杂志 1999;7:285-287
- 肖兰凤, 刘琥琥, 黄树林. 肝细胞癌患者偏移免疫治疗前后 T 细胞亚群分析. 世界华人消化杂志 1999;7:294
- 白德骄, 杨国梁, 袁宏银, 李雁, 王坤. 西咪替丁对围手术期胃肠癌患者 T 细胞亚群的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:147-149
- 王九平, 李新红, 朱勇, 王爱莲, 连建奇, 贾战生, 谢玉梅. 慢性乙型肝炎患者 T 细胞亚群, mL-2R, sIL-2R, IL-6, IL-8, TNF-alpha 变化及意义. 世界华人消化杂志 2000;8:763-766
- 张美稀, 章晓鹰, 金树根, 董惠芳, 陈建杰, 王灵台. 肝病患者外周血 CD28⁺T 细胞亚群变化. 世界华人消化杂志 2000;8:1432-1433
- 熊斌, 袁宏银, 胡卫东, 袁艇, 杨国梁. 大肠癌患者血清转化生长因子 beta1 水平与细胞免疫的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1194-1195
- 赵彩彦, 刘金星, 汤慧华, 冯忠军, 甄真, 张素环. 病毒性肝炎和原发性肝癌患者血清 IL-2 相关指标的意义. 华人消化杂志 1998;6:479-481
- McKenna KC, Tsuji M, Sarzotti M, Sacchi JB Jr, Witney AA, Azad AF. Gammadelta T cells are a component of early immunity against preerythrocytic malaria parasites. *Infect Immun* 2000;68:2224-2230
- Richards SJ, Morgan GJ, Hillmen P. Analysis of T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria provides direct evidence that thymic T-cell production declines with age. *Blood* 1999;94:2790-2799
- Ye Z, Haley S, Gee AP, Henslee-Downey PJ, Lamb LS Jr. In vitro interactions between gamma delta T cells, DC, and CD4⁺ T cells; implications for the immunotherapy of leukemia. *Cytotherapy* 2002;4:293-304
- Al-Fahim A, Cabre P, Kastrukoff L, Dorovini-Zis K, Oger J. Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased. *Cell Immunol* 1999;198:1-10

肠易激综合征患者睡眠质量特征

何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈 为

何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈为, 中山大学附属第一医院消化科
广东省广州市 510080
何剑琴, 女, 1977-03-16 生, 广东省深圳市人, 汉族, 2002 年中山大学毕业, 医学硕士, 主要从事消化临床研究
项目负责人: 胡品津, 510080, 广东省广州市中山二路 58 号, 中山大学附属第一医院消化科. pjhumd@vip.163.com
电话: 020-87755766-8172
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

Sleep quality in patients with irritable bowel syndrome

Jian-Qin He, Wei-An Wang, Pin-Jin Hu, Wei Chen

Jian-Qin He, Wei-An Wang, Pin-Jin Hu, Wei Chen, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510058, Guangdong Province, China
Correspondence to: Pin-Jin Hu, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510058, Guangdong Province, China. pjhumd@vip.163.com
Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

Abstract

AIM: To investigate the sleep quality in patients with irritable bowel syndrome (IBS) and its relationship with the patients' psychiatric symptoms.

METHODS: The quality of sleep and psychiatric symptoms in consecutive 41 patients with IBS according to Rome II criteria were measured by Pittsburgh sleep quality index (PSQI) and symptom checklist-90 (SCL-90), respectively. In the meantime, 37 matched health controls and 35 patients matched patients with peptic ulcer diseases as controls were also evaluated. The relationship between PSQI and psychiatric symptoms was investigated by regression analysis.

RESULTS: Compared with health controls, IBS patients had more psychiatric symptoms (40.2 ± 4.5 , $t = 2.63$, $P = 0.047$), and higher scores of depression (0.64 ± 0.24 , $t = 2.53$, $P = 0.020$) and anxiety (0.67 ± 0.30 , $t = 2.16$, $P = 0.016$). Among IBS patients, the quality of sleep and daily functions significantly decreased. PSQI and sleep disturbances as well as soporific using was markedly increased. The scores of obsessive-compulsive ($t = 2.60$, $P = 0.037$), and mental factor ($t = 2.71$, $P = 0.028$) were higher in IBS patients than that in patients with peptic ulcer diseases. Multiple regression analysis showed negative relationship between the quality of sleep and many psychiatric symptoms ($R > 0.195$, $P < 0.05$, respectively).

CONCLUSION: IBS patients have sleep disturbances associated psychiatric symptoms.

He JQ, Wang WA, Hu PJ, Chen W. Sleep quality in patients with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):744-747

摘要

目的: 探讨肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者的睡眠特征及其与精神症状的关系。

方法: 采用匹兹堡睡眠指数和症状自评量表-90自评量表对连续就诊的41例符合罗马II标准的肠易激综合征患者及同期连续就诊的35例消化性溃疡病患者和37例匹配的正常对照进行测评,并通过回归分析探讨睡眠障碍和精神症状之间的关系。

结果: 与正常相比, IBS患者精神症状明显增多(40.2 ± 4.5 , $t = 2.63$, $P = 0.047$), 抑郁(0.64 ± 0.24 , $t = 2.53$, $P = 0.020$)和焦虑(0.67 ± 0.30 , $t = 2.16$, $P = 0.016$)积分明显增高;在 IBS 患者中, 睡眠质量和日间功能显著下降, PSQI 和睡眠障碍以及安眠药用量显著增加. IBS患者的强迫症状($t = 2.60$, $P = 0.037$)和精神因素($t = 2.71$, $P = 0.028$)积分也明显高于消化性溃疡病患者. 多元回归分析显示睡眠质量和多种精神症状呈负相关($R > 0.195$, $P < 0.05$).

结论: IBS患者存在与精神症状相关的睡眠障碍。

何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈为. 肠易激综合征患者睡眠质量特征. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):744-747

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/744.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一组肠功能障碍性综合征, 无任何器质性或生化指标的异常^[1-6]. 临床流行病学和流行病学研究显示 IBS 患者常常有多种肠外症状^[3-4, 7-9]. 其中, 睡眠障碍是 IBS 患者常见的肠外症状^[7], 并且症状的恶化与睡眠异常有相关性^[10-14]. 尽管几组学者从不同角度探讨了睡眠质量和 IBS 的关系, 但还不能明确患者的睡眠质量才是真正的睡眠异常还是患者主观感觉的睡眠异常, 以及患者睡眠质量与心理症状之间的联系^[10-14]; 同时国内文献鲜见有关 IBS 患者睡眠质量特征研究. 我们采用国际公认反映睡眠主、客观质量的匹兹堡睡眠质量指数^[15-17]和评价非精神科患者精神症状的 90 项症状自评量表^[18-20]对患者进行测评如下.

1 材料和方法

1.1 材料 符合 IBS 罗马 II 诊断标准^[3]、在中山大学附属一院消化内科连续就诊的 IBS 患者(组 2) 41 例, 男 19 例, 女 22 例, 年龄 12-71(37.07 ± 14.48 岁). 经检查(大

便常规、腹部B超、钡剂和/或肠镜等检查,排除吸收不良综合征、血吸虫感染、胃肠道肿瘤、溃疡性结肠炎、Crohn病、肠道菌群失调、肝胆及内分泌疾病,无神经系统及精神疾病史,无药物和酒精滥用)确诊。同时和年龄、性别匹配的35例来自同期就诊的消化性溃疡(PU)患者(组3)和37名健康自愿者(组1)对照。

1.2 方法 采用汉化的匹兹堡睡眠质量指数(PSQI)(中国心理卫生杂志社.心理卫生评定量表手册,增订版.北京,1999)对患者的睡眠质量进行测评,该量表由23个条目构成,分为7个域,包括睡眠质量、入睡时间、睡眠时间、睡眠效率、睡眠障碍、安眠药物和日间功能,每个成分按0、1、2、3计分,各域分相加为PSQI总分,总分越高示睡眠质量越差;采用90项症状自评量表(SCL-90)(中国心理卫生杂志社.心理卫生评定量表手册,增订版.北京,1999)个体身心症状程度,记录其中的SCL-90总分、阳性项目数、痛苦水平和躯体化、强迫、人际敏感、抑郁、焦虑、敌对、恐怖、偏执、精神病性9个因子分。

统计学处理 用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示;多样本均数比较用ANOVA检验;多样本比率比较用 χ^2 检验;两样本均数比较用t检验;指标间的相互关系用直线相关分析和多元

逐步回归分析。以 $P < 0.05$ 作显著性差异的检验标准。均在SPSS 8.0软件包上进行。

2 结果

2.1 IBS患者心理症状 SCL-90症状自评量表测评结果显示,与正常人相比,IBS患者精神症状总积分(40.2 ± 4.5 , $t = 2.63$, $P = 0.047$)、阳性项目数(0.65 ± 0.31 , $t = 1.98$, $P = 0.001$)、痛苦水平(1.44 ± 0.57 , $t = 1.98$, $P = 0.001$)、抑郁(0.64 ± 0.24 , $t = 2.53$, $P = 0.020$)和焦虑(0.67 ± 0.30 , $t = 2.16$, $P = 0.016$)评分明显增高;IBS患者的强迫症状($t = 2.60$, $P = 0.037$)、抑郁($t = 1.92$, $P = 0.045$)和精神病性因素($t = 2.71$, $P = 0.028$)评分明显高于PU患者;而正常人和PU患者在痛苦水平上有显著差别($t = 1.96$, $P = 0.006$)。

2.2 IBS患者睡眠质量 与正常组相比,IBS组的睡眠质量($P = 0.000$)、睡眠障碍($P = 0.015$)、安眠药物($P = 0.035$)、日间功能($P = 0.007$)和PSQI($P = 0.000$)积分均明显增高,器质性胃肠病组的睡眠质量($P = 0.000$)、睡眠障碍($P = 0.000$)、安眠药物($P = 0.024$)、日间功能($P = 0.002$)和PSQI($P = 0.000$)也明显高于正常组,IBS组在睡眠质量各项平均分均比器质性胃肠病组高,但差异无显著性意义(表1)。

表1 IBS患者睡眠质量比较

睡眠指标	组1	组2	组3	$P_{1 \text{ vs } 2}$	$P_{2 \text{ vs } 3}$	$P_{1 \text{ vs } 3}$
睡眠质量	0.71 ± 0.46	1.46 ± 0.69	1.16 ± 0.54	0.000 ^a	0.061	0.000 ^a
入睡时间	1.14 ± 0.85	1.54 ± 0.99	1.27 ± 1.01	0.079	0.243	0.602
睡眠时间	1.11 ± 0.53	1.32 ± 0.71	1.27 ± 0.94	0.558	0.581	0.408
睡眠效率	1.06 ± 1.03	1.39 ± 1.10	1.37 ± 1.19	0.358	0.799	0.262
睡眠障碍	0.81 ± 0.37	1.41 ± 0.52	1.32 ± 0.56	0.015 ^a	0.077	0.000 ^a
安眠药物	0.00 ± 0.00	0.42 ± 0.75	0.37 ± 0.85	0.035 ^a	0.790	0.024 ^a
日间功能	0.46 ± 0.51	1.23 ± 0.90	1.17 ± 1.15	0.007 ^a	0.518	0.002 ^a
PSQI	4.74 ± 1.70	7.97 ± 3.54	7.83 ± 4.38	0.000 ^a	0.846	0.000 ^a

表2 IBS患者SCL-90与睡眠质量相关分析

	睡眠质量	入睡时间	睡眠时间	睡眠效率	睡眠障碍	安眠药物	日间功能	PSQI
总分	0.255 ^a	0.189	0.015	0.067	0.264 ^b	0.025	0.349 ^b	0.255 ^a
阳性项目数	0.255 ^a	0.189	0.015	0.066	0.265 ^b	0.024	0.349 ^b	0.255 ^a
痛苦水平	0.207 ^a	0.090	0.145	0.195	0.310 ^b	0.065	0.136	0.241 ^a
躯体化	0.275 ^b	0.170	0.061	0.135	0.282 ^b	0.134	0.339 ^b	0.310 ^b
强迫症状	0.222 ^b	0.214 ^a	0.047	0.109	0.245 ^a	0.007	0.344 ^b	0.241 ^a
人际敏感	0.152	0.130	-0.104	-0.086	0.161	-0.020	0.263 ^b	0.100
忧郁	0.195 ^a	0.175	0.021	0.036	0.220 ^a	0.007	0.291 ^b	0.215 ^a
焦虑	0.242 ^a	0.129	-0.045	-0.007	0.240 ^a	-0.015	0.345 ^b	0.200 ^a
敌对	0.214 ^a	0.010	-0.002	0.061	0.209 ^a	0.068	0.238 ^a	0.176
恐怖	0.121	0.069	-0.008	0.022	0.143	-0.054	0.266 ^b	0.121
偏执	0.064	0.051	-0.071	-0.125	0.026	-0.158	0.081	-0.031
精神病性	0.204	0.155	-0.006	0.026	0.191	-0.085	0.274 ^b	-0.031

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

归分析睡眠质量与入睡时间、睡眠效率、睡眠障碍、安眠药物、日间功能及PSQI呈显著正相关($P < 0.05$)。

2.3 IBS患者睡眠质量与心理症状的相关分析 睡眠质量与SCL-90的躯体化、强迫症状、焦虑、敌对、精神病性及其总分、阳性项目数呈负相关,表现为精神症状积分高者睡眠质量差;日间功能与SCL-90的躯体化、强迫症状、人际敏感、忧郁、焦虑、敌对、恐怖、精神病性及其总分、阳性项目数均有高度负相关;而PSQI与躯体化、强迫症状、忧郁、焦虑及总分、阳性项目数也呈负相关,见表2。

3 讨论

IBS是一种以肠功能紊乱为特征的心理生理疾病,除胃肠道症状外,还有许多肠外表现,包括心理症状(焦虑、抑郁等)和睡眠障碍^[8, 21-22]。本结果支持这一观点。对内、外正常刺激的反应过度是IBS患者的重要特征^[23],王伟岸 et al^[24]的研究表明,IBS患者的症状易受暗示而加重,用患者所担心的一些因素作“恶性视听刺激”复述给患者,可以明显提高患者对直肠气囊扩张的敏感度,而这些刺激对正常人则不具有上述作用,表明条件反射可影响该病患者内脏感觉的异常,即可能是一种对正常感觉的心理超敏反应。不少研究也从不同侧面论证了IBS患者存在疾病认知和症状感知异常^[25-26]。Elsenbruch et al^[13-14]采用睡眠质量指数调查表评价IBS患者主观的睡眠质量,并用多导睡眠检测仪评价客观的睡眠质量,发现IBS患者总的睡眠指数及其亚项均显著高于健康对照组,而多导睡眠监测指数无显著差异。这一结果提示IBS患者的睡眠异常也可能是一种知觉异常。尽管其内在原因仍不完全清楚,但根据Beck提出的情感障碍认知模式:人们对各种事件的期望和解释(即认知过程)可导致负性情绪,其中焦虑是个体对内外环境刺激(应激事件)产生的一种负性复合情感状态,而机体对应激事件的反应中出现最早、最敏感的主观体验是睡眠行为障碍^[27-29]。睡眠障碍在IBS患者中很常见符合这一理论^[10-14]。

我们采用患者自评的睡眠障碍量表对同期在同一门诊就诊的IBS患者、消化性溃疡病患者进行测评,发现与正常人相比,不论IBS患者还是消化性溃疡病患者的反映主观睡眠质量的睡眠质量降低,存在睡眠障碍,需要安眠药物增多;但患者自评的可反映患者睡眠质量客观指征的入睡时间和睡眠时间,乃至睡眠效率和正常人无明显的差异。更为有趣的是,IBS患者和器质性胃肠病患者有类似的睡眠障碍,上述睡眠质量评价指标间并无差异。这些至少从一个侧面说明IBS患者的睡眠障碍可能是对疾病本身的焦虑和警惕性增高所致,在很大程度上是主观的睡眠障碍,即睡眠感觉改变,而不是疾病特异的附带现象^[11, 14]。本研究进一步评价了IBS

患者的睡眠障碍和精神症状之间的关系,发现精神症状积分高者睡眠质量差;日间功能与SCL-90的躯体化、强迫症状、人际敏感、忧郁、焦虑、敌对、恐怖、精神病性及其总分、阳性项目数均有高度负相关;而PSQI与躯体化、强迫症状、忧郁、焦虑及总分、阳性项目数也呈负正相关。尽管本研究不能说明二者之间在IBS发病的因果关系,这些交互作用进一步说明IBS患者存在与精神症状相关的睡眠障碍,缓解IBS患者的精神症状可能改善患者的睡眠质量。

4 参考文献

- 1 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(Suppl2):43-47
- 2 Drossman DA, Creed FH, Olden KW, Svedlund J, Toner BB, Whitehead WE. Psychosocial aspects of functional gastrointestinal disorders. In: Drossman DA, Corazziari E, Tally NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Rome II. The functional gastrointestinal disorders. Diagnosis, Pathophysiology and treatment: a multinational consensus, 2nd ed. McLean, VA: Degnon Associates 2000:157-245
- 3 Zimmerman J. Extraintestinal symptoms in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel diseases: nature, severity, and relationship to gastrointestinal symptoms. *Dig Dis Sci* 2003;48:743-749
- 4 Maxton DG, Morris J, Whorwell PJ. More accurate diagnosis of irritable bowel syndrome by the use of 'non-colonic' symptomatology. *Gut* 1991;32:784-786
- 5 陈仕珠. 肠易激综合征发病机制研究进展. 华人消化杂志 1998; 6:1094-1096
- 6 詹丽杏, 李兆申. 肠易激综合征的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1177-1179
- 7 Leahy A, Epstein O. Non-pharmacological treatments in the irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2001;7:313-316
- 8 Weinryb RM, Osterberg E, Blomquist L, Hultcrantz R, Krakau I, Asberg M. Psychological factors in irritable bowel syndrome: a population-based study of patients, non-patients and controls. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:503-510
- 9 Somers SC, Lembo A. Irritable bowel syndrome: evaluation and treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32:507-529
- 10 Goldsmith G, Levin JS. Effect of sleep quality on symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993;38:1809-1814
- 11 Fass R, Fullerton S, Tung S, Mayer EA. Sleep disturbances in clinic patients with functional bowel disorders. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1195-2000
- 12 Heitkemper M, Charman AB, Shaver J, Lentz MJ, Jarrett ME. Self-report and polysomnographic measures of sleep in women with irritable bowel syndrome. *Nurs Res* 1998;47:270-277
- 13 Elsenbruch S, Harnish MJ, Orr WC. Subjective and objective sleep quality in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2447-2450
- 14 Elsenbruch S, Thompson JJ, Hamish MJ, Exton MS, Orr WC. Behavioral and physiological sleep characteristics in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002;97: 2306-2314
- 15 Backhaus J, Junghanns K, Broocks A, Riemann D, Hohagen F. Test-retest reliability and validity of the Pittsburgh Sleep Quality Index in primary insomnia. *J Psychosom Res* 2002;53: 737-740
- 16 Monk TH, Reynolds CF 3rd, Buysse DJ, DeGrazia JM, Kupfer DJ. The relationship between lifestyle regularity and subjective sleep quality. *Chronobiol Int* 2003;20:97-107
- 17 Sayar K, Arikian M, Yontem T. Sleep quality in chronic pain patients. *Can J Psychiatry* 2002;47:844-848

- 18 Holi MM, Marttunen M, Aalberg V. Comparison of the GHQ-36, the GHQ-12 and the SCL-90 as psychiatric screening instruments in the Finnish population. *Nord J Psychiatry* 2003; 57:233-238
- 19 Barker-Collo SL. Culture and validity of the symptom checklist-90-revised and profile of mood states in a new zealand student sample. *Cultur Divers Ethnic Minor Psychol* 2003;9: 185-196
- 20 Xia G, Qian M. The relationship of parenting style to self-reported mental health among two subcultures of Chinese. *J Adolesc* 2001;24:251-260
- 21 Garakani A, Win T, Virk S, Gupta S, Kaplan D, Masand PS. Comorbidity of irritable bowel syndrome in psychiatric patients: a review. *Am J Ther* 2003;10:61-67
- 22 Jarrett ME, Burr RL, Cain KC, Hertig V, Weisman P, Heitkemper MM. Anxiety and depression are related to autonomic nervous system function in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2003;48:386-394
- 23 Dickhaus B, Mayer EA, Firooz N, Stains J, Conde F, Olivas TI, Fass R, Chang L, Mayer M, Naliboff BD. Irritable bowel syndrome patients show enhanced modulation of visceral perception by auditory stress. *Am J Gastroenterol* 2003;98:135-143
- 24 王伟岸, 潘国宗, 钱家鸣. 心理因素对肠易激综合征内脏敏感性的影响. *中华医学杂志* 2002;81:308-311
- 25 Rutter CL, Rutter DR. Illness representation, coping and outcome in irritable bowel syndrome (IBS). *Br J Health Psychol* 2002;7(Pt 4):377-391
- 26 Crane C, Martin M. Perceived vulnerability to illness in individuals with irritable bowel syndrome. *J Psychosom Res* 2002; 53:1115-1122
- 27 Attree EA, Dancey CP, Keeling D, Wilson C. Cognitive function in people with chronic illness: inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Appl Neuropsychol* 2003;10:96-104
- 28 Abela JR, D' Alessandro DU. Beck's cognitive theory of depression: a test of the diathesis-stress and causal mediation components. *Br J Clin Psychol* 2002;41:111-128
- 29 Mazure CM, Maciejewski PK, Jacobs SC, Bruce ML. Stressful life events interacting with cognitive/personality styles to predict late-onset major depression. *Am J Geriatr Psychiatry* 2002; 10:297-304

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

国科技论文产出世界第五 医药卫生期刊竞争力强劲

健康报 记者张荔子 2003-12-10 报到: 这是一连串枯燥的数字, 却是大量科研人员辛勤一年的收获. 12月9日, 中国科学技术信息研究所在京发布的2002年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文产出由2001年全世界第六位上升为第五位, 在世界论文总数中首次超过5%. 论文数据统计取自3种在国际上颇具影响的检索工具:《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP). 2002年我国科技论文产出比2001年增长19.9%, 达77395篇, 占世界论文总数的5.37%. 排在前四位的国家依次是美国、日本、英国和德国. 我国国际论文被引用数和被引用次数也分别增长31.6%和33.3%, 其中临床医学国内论文数量和被引用次数居各学科第一, 基础医学论文在国内被引用次数排名第四. 临床医学和基础医学论文较以前都显示出更多的国际合作. 分类统计还排列出高等院校、科研机构、医疗机构各类机构论文产出和被引用情况前20位, 其中解放军总医院连续3年获国内科技论文被引用数量全国医疗机构第一名, 第四军医大学西京医院连续3年获国内科技论文数量全国医疗机构第一. 10位国际论文高产作者和高引用作者中有3位是来自上海第二医科大学的沈志祥、陈国强和牛超, 他们因在《血液》发表的论文被广泛引用而分别名列第三、六、九. 共有387种医药卫生类期刊进入今年的影响因子分类排序, 其中影响因子超过1的期刊有12种, 除《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》外, 其余10种均为“中华牌”期刊. 此外, 刚选出的第二届中国百种杰出学术期刊中, 19种医药卫生类期刊及其主编榜上有名. 纵观2002年中国科技论文各项统计, 可以看到中国科技论文数量和影响力水平继续保持上升趋势, 但中国与世界科技强国还有很大差距. 据《国际竞争力度报告》评价, 中国科技竞争力在49个被评价的国家和地区中处于中等偏下的水平. 据SCI统计, 中国论文平均被引用率低于世界平均水平.

RNAi 研究进展

任玥欣, 宋于刚, 陈学清

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军
消化疾病研究所 广东省广州市 510515
国家自然科学基金资助课题, No. 30300159
项目负责人: 任玥欣, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大
学南方医院全军消化疾病研究所. drrren@tom.com
电话: 020-61641544
收稿日期: 2003-08-26 接受日期: 2003-10-22

摘要

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因静默机制. RNAi是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达的监控机制. 目前已成功用于基因功能和信号转导系统上下游分子相互关系的研究,有可能为肿瘤基因治疗提供新策略.

任玥欣, 宋于刚, 陈学清. RNAi 研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(3):748-750

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/748.asp>

0 引言

RNAi (RNA interference)即 RNA 干扰, 是 1998 年由 Fire 首次发现并命名的转录后水平的基因静默, 是美国《Science》和《Nature》评出的 2002 年度最重要的科技成果之一, 正成为基因功能研究和基因治疗研究的热点. 1995 年, 康奈尔大学的 Guo 和 Kemphues et al^[1]利用反义 RNA(antisense RNA)技术特异性地阻断秀丽新小杆线虫(*C. elegans*)中的 par-1 基因的表达以期得到与对照组注射正义 RNA(sense RNA)相反的结果, 但最终的结果却令他们费解:二者同样阻断了 par-1 基因的表达途径. 直到 1998 年, Fire et al^[2]的研究证明, 在正义 RNA 也阻断了基因表达的试验中, 真正起作用的是双链 RNA. 这些双链 RNA 是体外转录正义 RNA 时生成的. 这种双链 RNA 对基因表达的阻断作用被称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi). 随后的研究发现, RNAi 现象在多种生物中存在, 如线虫, 果蝇, 斑马鱼, 真菌以及植物等. 生物体可利用 RNAi 来抵御病毒的感染, 阻断转座子的作用^[3].

到 1999 年 Tuschl et al^[4]报道在哺乳动物中也存在 RNAi, 只是导入的 RNA 是小干扰 RNA (siRNA); 2001 年 Bernstein et al 提出: 只有 22 核苷酸(nt, nucleotide)才能特异性地阻断 dsRNA, 同时他们还发现了体内一个分解 dsRNA 为 siRNA 的叫 Dicer 的酶^[5]. 近几年来 RNAi 的研究取得了很大进展, 他被《Science》杂志评为 2001 年的十大科学成就之一. 2002 年 RNAi 的研究又有了新的

突破, 发现他在基因表达调控中发挥重要作用, 他也名列 2002 年《Science》杂志评的十大科学成就之首.

1 RNAi 的机制

RNAi 的机制可能是细胞内双链 RNA 在 Dicer 酶的作用下, 可形成 -22 bp 大小的小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs), siRNAs 可进一步掺入多部分核酸酶(multicomponent nuclease, RISC)并使其激活, 从而精确降解与 siRNAs 序列相同的 mRNA, 完全抑制了该基因在细胞内的翻译和表达.

RNA 酶 III 是一种能切割双链 RNA 的酶, 参与 RNAi 反应的 Dicer 酶是 RNA 酶 III 家族的一个成员. Dicer 酶广泛存在于蠕虫、真菌、物及哺乳动物体内. 他的结构中包括一个螺旋酶结构域, 两个 RNA 酶 III 结构域, 一个双链 RNA 结合位点. 在 Dicer 酶的作用下, 双链 RNA 被裂解成 21-23 个核苷酸的 siRNA, 他启动了细胞内的 RNAi 反应^[6]. 因少量双链 RNA 即能阻断基因表达, 且此效应可传至子代细胞, 研究者们推测细胞内存在 RNAi 效应的扩增系统. 研究者们发现, 在真核细胞中也存在能以 RNA 为模板指导 RNA 合成的聚合酶(RNA-directed RNA polymerase, RdRP). 在 RdRP 的作用下, 进入细胞内的双链 RNA 通过类似于 PCR 的反应过程, 呈指数级的数量扩增. 双链 RNA 进入细胞后, 一方面在 Dicer 酶的作用下被裂解成小片段 siRNA, 另一方面在 RdRP 的作用下自身扩增后, 再被 Dicer 酶裂解成 siRNA. 小片段 siRNA 生成后与核酸酶形成复合物, 随后 mRNA 与小片段的正义链置换, 被 mRNA 替代. mRNA 的位置与最初正义链的位置相同, 从而被核酸酶在相同的位点降解. 更有意义的是 mRNA 的降解使核酸酶得以再生, 这样周而复始, mRNA 得以降解, 因此 RNAi 呈酶解动态^[6].

由于 mRNA 也以 21-23 nt 的特定间隔降解, 因此认为降解 dsRNA 与 mRNA 的核酸酶相同. 另一方面以 siRNA 作为引物, 以 mRNA 为模板, 在 RdRP 作用下合成出 mRNA 的互补链. 结果 mRNA 也变成了双链 RNA, 他在 Dicer 酶的作用下也被裂解成 siRNA. 这些新生成的 siRNA 也具有诱发 RNAi 的作用, 通过这个聚合酶链式反应, 细胞内的 siRNA 大大增加, 显著增加了对基因表达的抑制^[4-5]. RNAi 不同于其他基因阻断技术, 他是转录后水平的基因静默机制, 因此注射该基因的内含子或者启动子顺序的 dsRNA 都没有干涉效应. RNAi 具有较高的特异性, 能够非常特异地降解与之

序列相应的单个内源基因的 mRNA, 且抑制基因表达效率很高, 相对少量的 dsRNA 就可以使表型达到缺失突变体程度, 但 dsRNA 需要一个最小的长度才能产生有效的干扰效果. dsRNA 小片段如小于 21-23 nt (如 10-15 nt), 特异性将显著降低, 不能保证不与细胞内非靶向基因相互作用, 如远远大于 21-23 nt, 互补序列可能延伸, 超出抑制范围. RNAi 基因表达的效应可以突破细胞界限, 在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持, 并可传递给子一代^[6].

2 RNAi 在细胞中的研究和双链 RNA 的构建

2.1 Billy et al^[7]的研究表明: 在小鼠的胚胎细胞中也存在 RNAi. 将 727 个碱基对的双链 RNA 转入小鼠的畸胎瘤细胞, 诱发了细胞内的 RNAi 机制, 并抑制了报告基因的表达. 但大于 30 个核苷酸的双链 RNA 进入哺乳动物的成体细胞后, 会非特异的阻断基因的表达. 因为长的双链 RNA 进入哺乳动物成体细胞后, 细胞内的病毒防御机制被激活; 且 RNA 酶 L(RNase L)被激活, 产生非特异的 mRNA 降解. 而未分化的胚胎细胞中, 上述防御病毒的机制存在缺陷, 因而双链 RNA 能特异的阻断基因的表达. 但 Tuschl et al^[8]人的研究克服了这一障碍, 他们发现, 21 个核苷酸的双链 RNA 能够诱发哺乳动物细胞内的 RNAi 机制, 同时不会激活细胞内的干扰素. 他们合成了以荧光素酶的 mRNA 为靶分子的 21 个核苷酸的双链 RNA, 将他和荧光素酶的表达质粒用脂质体共转染到 NIH3T3, COS-7, HeLa S3, 293 细胞中, 报告基因的表达被抑制了 90%. 由于报告基因得到的结果不能完全说明细胞内的情况, 他们又合成了细胞内源性基因 laminA/C 为靶目标的双链 RNA, 这个双链 RNA 也特异的抑制了 laminA/C 的表达, 抑制率达到 90% 以上.

2.2 双链 RNA 的构建 双链 RNA 可先在体外构建好, 用脂质体转染细胞. 但有些细胞脂质体转化效果差, 转化到细胞内的双链 RNA 半衰期短. 而先在体外构建能表达双链 RNA 的载体, 再将载体转到细胞内合成出双链 RNA, 不但能增加有效转染细胞的种类, 而且在长期稳定表达载体的细胞株中, 双链 RNA 能够长期发挥阻断基因的作用. 构建双链 RNA 表达载体, 使用 RNA 多聚酶 III 指导 RNA 的合成. 因为 RNA 多聚酶 III 有明确的起始和终止序列, 当 RNA 多聚酶 III 遇到连续 5 个胸腺嘧啶时, 他指导的转录就会终止, 且转录产物在第二个尿嘧啶处被切下来, 因此合成的 RNA 无 polyA 尾. U6 启动子能被 RNA 多聚酶 III 识别, 合成出 RNA. Sui et al^[9]用 Bluescript 作为载体, RNA 多聚酶 III 可识别的 U6 作为启动子, 从绿色荧光蛋白(GFP)的基因上选择了一个 21 个核苷酸的片段(片段 1), 将其插入到 Bluescript 载体中. 然后合成出片段 1 的反向重复序列, 并在其后加了 5 个胸腺嘧啶, 称为片段 2. 他们将片段 2 接到 Bluescript 载体中片段 1 的后面, 将载体转移到细胞中后, 转录

出的 RNA 由于具有回文序列, 会形成一个发卡样结构, 从而得到了双链 RNA. 片段后面加了 5 个胸腺嘧啶, RNA 转录到这个位置时就会终止. 而且转录出的 RNA 形成发卡样结构后, 会在 3' 端形成 2 个突出的尿嘧啶, 这类似于天然的 siRNA, 因而有利于双链 RNA 诱发 RNAi. RNA 多聚酶 III 亦识别 H1-RNA 启动子. 在 H1-RNA 启动子后面接上能形成发卡样结构的反向互补序列, 将此载体转入细胞后也能在细胞内合成 dsRNA^[10]. T7 也可作为启动子合成 dsRNA. 将 PCR 产物用 NotI 酶切后自身连结, 回收正向片段和反向片段连结形成的具有反转重复序列的片段, 接到 pGEMTeasy 载体上, 就构建成了可以表达 dsRNA 的载体. 用此载体可先在体外合成 dsRNA, 或将其转入到细胞内合成 dsRNA. 在后一种情况下, 还须将能表达 T7RNA 多聚酶的载体也一起转入到细胞中, 以提供能识别 T7 启动子的 RNA 多聚酶^[11]. 腺病毒是体内转基因的常用载体. Xia et al^[12]用腺病毒做载体, 在体内和体外表达 dsRNA, 并成功的阻断了基因的表达.

3 RNAi 的应用

3.1 高通量研究基因功能 基因功能研究现在已经明确, 双链 RNAi 干扰(RNAi)技术不仅可抑制体外细胞中特定基因的表达, 而且也可抑制体内特定基因的表达. 在功能基因组研究中, 需要对特定基因进行功能丧失或降低突变, 以确定其功能. 21nt siRNA 的双链复合物在哺乳动物细胞中干扰成功为基因作用的研究提供了一种新的工具, 原来要花费 6mo-1 a 才能明确一个哺乳动物细胞基因如何关闭, 现在只需一个星期就能明确 10 个基因的关闭, 使工作进程大大加快. 可以预见, RNAi 作为一种快速静默基因的途径, 将会越来越多地用于哺乳动物基因研究. 将功能未知的基因的编码区(外显子)或启动子区, 以反向重复的方式由同一启动子控制表达. 这样在转基因个体内转录出的 RNA 可形成 dsRNA, 产生 RNA 干扰, 使目的基因静默, 从而进一步研究目的基因的功能. 根据所选用序列的不同, 可将其分为编码区 RNAi 和启动子区 RNAi^[13]. 线虫和果蝇的全部基因组序列已测试完毕, 发现大量未知功能的新基因, RNAi 将大大促进对这些新基因功能的研究^[14].

3.2 研究信号转导通路的新工具 由于 RNAi 能高效特异的阻断基因的表达, 他成为研究信号传导通路的良好工具. 在线虫体内, 胰岛素和受体结合后可以活化 Dsor1, 他是 Mek 的类似物, Dsor1 活化后可以激活 EekA, 他是 ERK 的类似物. 用以 Dsor1 为靶目标的 dsRNA 可以阻断 Dsor1 的表达, 虽然总的 ErkA 的表达不受影响, 但由于 Dsor1 的表达被抑制, 因而胰岛素刺激后 ErkA 不能活化^[15].

3.3 基因治疗的新方法 用 RNAi 特异性地抑制如艾滋病病毒基因、肝炎病毒基因、癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达, 使这类基因保持在静默或休眠状态,

从而有望用这种新的手段治疗各种病毒性疾病和恶性肿瘤等疑难病症。而肿瘤是多基因、多因素疾病,单个癌基因的抑制往往很难达到治疗效果。但 RNAi 技术能够同时抑制多个不同基因,而且抑制效果互不干扰。此外, RNAi 识别可以精确到一个核苷酸,对由野生型点突变形成的癌基因,如 ras, p53 等,能够产生准确有效的封闭效果,野生型基因则不受影响。实验证明, bcl-2, CDK-2, PLK-1 和 p53 等肿瘤相关基因的 RNAi, 能够使人类宫颈癌细胞(HeLa)增生速度减慢,恶性程度降低,凋亡加快。肝癌(Hep3B)、非小细胞肺癌(H1299)、头颈部鳞状细胞癌(C33-A)、骨肉瘤(U-2OS)及前列腺癌(LNCaP)^[16]、白血病^[14]等细胞系中的实验也发现类似效应。此外,将 RNAi 应用于 Wilson 病等先天遗传性疾病的体外实验也获得令人满意的结果^[17-25]。2002-09,科学家采用这项技术完全清除了生长在试管中的所有癌细胞,而未伤及正常细胞。随着这一研究结果近日的公布,另一个小组的研究人员正设计这一技术在世界上的第一次临床试验,将在一组艾滋病患者中进行。由于双链 RNA 干涉,通过使有害的基因“静默”而奏效,因而科学家认为,可用其来静默感染的病毒基因或已转为恶性的肿瘤细胞,从而使他们变得无害。

总之,科学家预言,一旦 RNAi 技术能用于临床治疗艾滋病、肝炎和恶性肿瘤,这将是病毒性、寄生虫病原性、突变基因和癌基因表达等所引起的疾病在基因治疗方面的一场新的革命。而基因的突变在胰腺癌的发病及发展中均占有重要地位,通过改变癌基因的表达,可以杀灭肿瘤或抑制肿瘤生长或增加癌细胞对化疗药物的敏感性, RNAi 将会是胰腺癌基因治疗的又一重要工具。

4 参考文献:

- Guo S, Kempthues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81:611-620
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 1999;13:3191-3197
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366
- Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 2000;127:4147-4156
- Billy E, Brondani V, Zhang HD, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14428-14433
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498
- Sui GH, Soohoo C, Affarel B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5515-5520
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. System for stable expression of short interfering RNAs in Mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
- Yang SH, Tutton S, Pierce E, Yoon K. Specific Double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:7807-7816
- Xia HB, Mao QW, Paulson HL, Davidson BL. Si-RNA mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:1006-1010
- Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 2000;24:180-183
- Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002;21:5716-5724
- Morris JC, Wang Z, Drew ME, Englund PT. Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *EMBO J* 2002;21:4429-4438
- Lin SL, Chuong CM, Ying SY. A Novel mRNA-cDNA interference phenomenon for silencing bcl-2 expression in human LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:639-644
- Oh WJ, Kim EK, Ko JH, Yoo SH, Hahn SH, Yoo OJ. Nuclear proteins that bind to metal response element a (MREa) in the Wilson disease gene promoter are Ku autoantigens and the Ku-80 subunit is necessary for basal transcription of the WD gene. *Eur J Biochem* 2002;269:2151-2161
- Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells. *Methods Mol Biol* 2004;257:255-266
- Celotto AM, Graveley BR. RNA interference of mRNA processing factors in *Drosophila* s2 cells. *Methods Mol Biol* 2004;257:245-254
- Tang G, Zamore PD. Biochemical dissection of RNA silencing in plants. *Methods Mol Biol* 2004;257:223-244
- Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004;32:936-948
- Hsieh AC, Bo R, Manola J, Vazquez F, Bare O, Khvorova A, Scaringe S, Sellers WR. A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res* 2004;32:893-901
- Caplen NJ, Mousses S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1002:56-62
- Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res* 2004;32:691-699
- Kwong SM, Skurray RA, Firth N. Staphylococcus aureus multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. *Mol Microbiol* 2004;51:497-509

• 临床经验 •

胃癌 MGMT 基因启动子 CpG 岛甲基化与蛋白表达缺失

齐 健, 朱尤庆, 杨 冬, 张友才, 张蔚英, 刘 军, 魏 芸

齐健, 朱尤庆, 杨冬, 张友才, 武汉大学中南医院消化内科
湖北省武汉市 430071
张蔚英, 刘军, 魏芸, 武汉大学医学院病毒所 湖北省武汉市 430071
2002 年湖北省科技攻关计划资助项目, No. 2002AA301C84
项目负责人: 朱尤庆, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路 169 号, 武汉大学中南医院消化内科. uqing_zhu@sina.com
电话: 027-87317915
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-10-22

摘要

目的: 探讨 6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶基因启动子甲基化状况在胃癌发生、发展中的作用。

方法: 用甲基特异性聚合酶扩增链式反应检测 20 例正常胃黏膜组织、38 例胃癌组织及癌旁正常组织 DNA 中 MGMT 基因启动子的甲基化状况, 用免疫组化方法检测 MGMT 蛋白的表达情况。

结果: 19.1%(9/47)的肿瘤组织和 10.6%(5/47)的癌旁正常组织存在 MGMT 基因启动子甲基化, 正常胃黏膜组织均不存在甲基化。免疫组化发现有 21.3%(10/47)的肿瘤组织 MGMT 蛋白失表达, 其中 7 例(70.0%)存在启动子甲基化。胃癌中 MGMT 基因启动子高甲基化与 MGMT 蛋白表达缺失存在显著联系($P < 0.001$)。

结论: 胃癌组织中存在一定程度的 MGMT 基因启动子高甲基化和 MGMT 蛋白表达缺失。胃癌发生过程中 MGMT 基因高甲基化可导致 MGMT 蛋白表达缺失, 可能是胃癌发生的重要途径之一。

齐健, 朱尤庆, 杨冬, 张友才, 张蔚英, 刘军, 魏芸. 胃癌 MGMT 基因启动子 CpG 岛甲基化与蛋白表达缺失. 世界华人消化杂志 2004;12(3):751-753
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/751.asp>

0 引言

6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)是一种普遍存在的 DNA 修复酶, 可将烷化剂使 DNA 鸟嘌呤 O^6 位发生烷基化而形成 O^6 -鸟嘌呤加合物从 DNA 上移除, 使细胞免受烷化剂的损伤, 并抑制随后的细胞反应, 使存在 DNA 损伤的细胞不再增生, 从而保持基因组的完整性^[1]。MGMT 基因启动子区域含有一个 CpG 岛, 若其 CpG 岛发生甲基化导致 MGMT 蛋白表达缺失或减少, 则烷化剂造成的损伤不能被及时修复, 在转录过程中会导致 G:C 配对转换为 A:T 配对(G→A 转换), 使细胞发生癌性转化^[2-6]。我们检测了正常胃黏膜组织 20 例、胃癌组织 47 例及癌旁正常组织 DNA 中 MGMT 基因启动子甲基化状况和蛋白表达情况, 分析他们之间是否存在

联系, 从而探讨 MGMT 基因启动子高甲基化在胃癌发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌组织 47 例及相应的癌旁正常组织来自武汉大学中南医院外科手术患者, 男 26 例, 女 21 例, 年龄 31-68(平均 54.8 岁)。癌旁组织为距肿瘤 5 cm 的正常组织, 经病理证实不存在不典型增生。正常胃黏膜组织 20 名来自门诊的健康志愿者。所有标本均取 2 份, 1 份立即放入 -70°C 冰箱保存, 1 份用甲醛固定、石蜡包埋后保存。所有患者术前均未接受过放化疗。

1.2 方法 以传统的酚-氯仿方法从上述各种组织中提取 DNA。按 James et al (Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:9821)^[7]描述的方法用亚硫酸氢钠可对 DNA 进行化学修饰, 并用 Wizard DNA 纯化试剂盒(promega 公司)纯化, 分别以 MGMT 基因甲基化和非甲基化引物进行扩增。甲基化的引物序列上游为 5'-TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC-3', 下游为 5'-GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G-3'; 非甲基化的引物序列上游为 5'-TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3', 下游为 5'-AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A-3'^[8]。反应条件为 95°C 预变性 360 s, 然后 94°C 45 s, 59°C 45 s, 72°C 60 s, 35 个循环后 72°C 延伸 600 s^[6, 8]。PCR 产物用 8 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色观察结果。组织标本用甲醛固定、石蜡包埋, 制成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片, 进行 HE 染色以确定其是否为肿瘤组织或正常组织及其病理类型和分期。免疫组化使用鼠抗 MGMT 单克隆抗体和 SP 试剂盒(北京中山公司)。以表达率大于 10% 为阳性结果。

统计学处理 用 SPSS 11.0 软件, Pearson χ^2 检验, Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

MSP 结果显示, 正常胃黏膜组织均未显示甲基化条带, 19.1%(9/47)的胃癌组织和 10.6%(5/47)的癌旁正常组织存在启动子甲基化。5 例甲基化的癌旁正常组织中有 1 例癌组织同时存在甲基化, 其余 4 例癌组织无甲基化(图 1)。统计学分析显示, 胃癌组织中 MGMT 基因启动子甲基化率与癌旁正常组织之间的差异无显著性($\chi^2 = 1.343$, $P = 0.247$), 而与正常胃黏膜(0/20)之间有差异($P = 0.049$)。

在 20 正常胃黏膜中 MGMT 蛋白在绝大多数实质细胞和间质细胞的胞核、胞质均有表达。10 例胃癌组织 MGMT 失表达, 其中 7 例存在 MGMT 启动子甲基化;

癌旁正常组织蛋白表达均为阳性,但有7例为弱阳性表达,其中4例存在甲基化(图2)。统计学分析显示胃癌组织 MGMT 蛋白表达缺失率 21.3%(10/47)与癌旁正常组织 (0/47)、正常胃黏膜组织(0/20)之间的差异均有显著性 ($P=0.001$, $P=0.027$)。并且 MGMT 启动子高甲基化与 MGMT 蛋白表达缺失存在显著联系(表 1, $\chi^2=17.249$, $P<0.001$)。

表 1 胃癌组织 MGMT 甲基化及蛋白表达情况

免疫组化	MSP		合计
	非甲基化	甲基化	
+	35	2	37
-	3	7	10
合计	38	9	47

$P<0.001$ 。

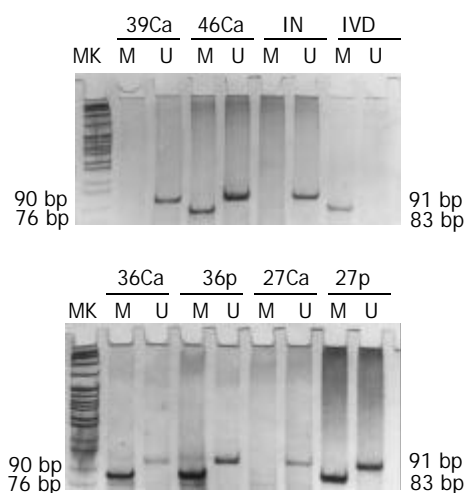


图 1 A: 癌组织(Ca)同时显示甲基化(M)和非甲基化条带(U), 正常胃黏膜(N)无甲基化条带, 体外甲基化的 DNA(IVD)作为阳性对照; B: 36 号癌组织和癌旁正常组织(P)都存在甲基化, 27 号只有癌旁正常组织存在甲基化。

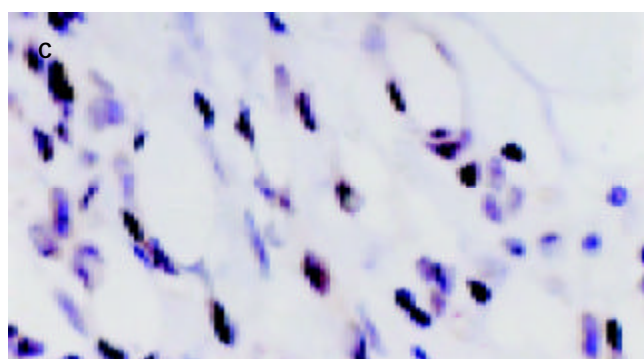
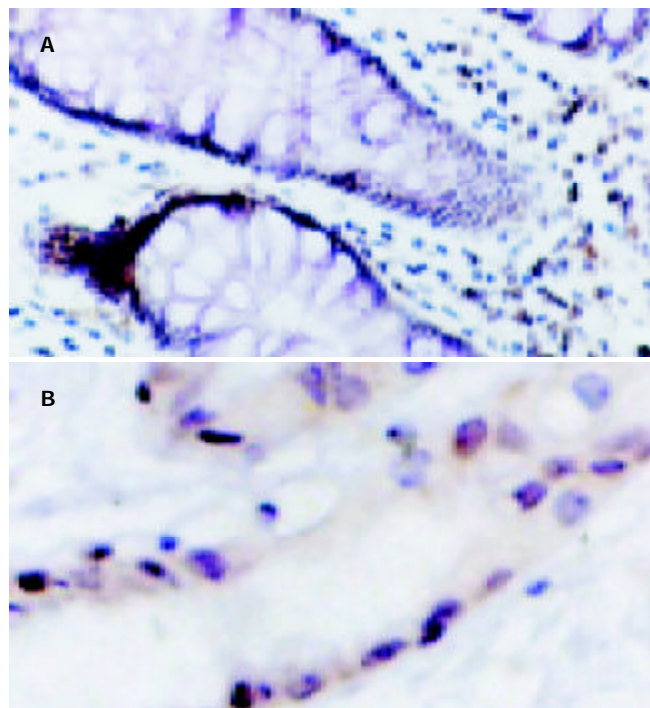


图 2 免疫组化检测组织标本中 MGMT 的表达。A: 正常胃黏膜组织 MGMT 强阳性表达; B: 甲基化的癌旁正常组织中 MGMT 表达减弱; C: 胃癌组织中 MGMT 表达缺失。

3 讨论

N-亚硝基化合物可能是引起胃癌的主要化学致癌物,可以在人胃中由其前体合成,最终活性形式烷基正离子可使 DNA 发生烷基化。鸟嘌呤 O⁶ 位甲基化可以影响碱基配对,且修复缓慢,因而对致突变和致癌十分重要。MGMT 是惟一能将 O⁶-鸟嘌呤加合物从 DNA 上移除的蛋白,若其表达减少或缺失,则不能有效地修复该损伤,使细胞失去了对烷化剂等突变原的保护性。人类基因组中约有 29 000 个 CpG 岛,几乎总是存在于基因启动子和(或)外显子周围,除了印记基因和女性失活的 X 染色体上的几个基因外, CpG 双核苷酸在正常情况下都是非甲基化的,而大多数 CpG 岛以外的 CpG 双核苷酸则是甲基化的^[9-10]。许多肿瘤抑制基因启动子区域的 CpG 岛在正常情况下是非甲基化的,而在肿瘤组织中被高度甲基化^[11-13]。本组中,有 19.1%(9/47)的胃癌组织存在 MGMT 基因启动子甲基化,而在正常胃黏膜组织中均未检测到甲基化,与国外文献[8, 14]报道相近。提示在胃癌中存在较高频率的 MGMT 基因启动子甲基化。启动子高甲基化能抑制基因转录,导致蛋白表达缺失或减少。我们同时用免疫组化方法检测了标本中 MGMT 蛋白的表达情况,结果显示: 47 例胃癌组织中有 10 例 MGMT 表达缺失,而癌旁正常组织和正常胃黏膜组织中均无 MGMT 表达缺失,表明 MGMT 在胃癌中表达缺失。9 例存在 MGMT 基因启动子甲基化的胃癌组织中有 7 例蛋白表达缺失,表明 MGMT 基因启动子高甲基化与 MGMT 蛋白表达缺失有显著联系。本研究中胃癌组织的甲基化率 19.1%(9/47)和相应的癌旁正常组织 10.6%(5/47)并无差异。由于 MSP 是一种敏感性非常高的检测方法,只要样本中有很微量的甲基化 DNA 就可以观察到甲基化条带。一种可能是在取组织时癌旁正常组织被癌细胞污染,若癌细胞存在甲基化,则被污染的癌旁正常组织也出现甲基化条带。另一种可能是这些癌旁正常组织细胞 DNA 中已存在一定程度的甲基化,但尚未引起细胞癌变,36 号癌组织和癌旁正常组织都存在甲基化,但都表达 MGMT 蛋白,癌旁组织甲基化条带更浓,与电泳点样量有关。本组中 5 例存在甲基化的癌旁正常组

织中有4例免疫组化表现为弱阳性,表明这些组织中MGMT蛋白表达减少,一个MGMT分子只能修复一处烷基化损伤,MGMT蛋白表达减少将使细胞的修复能力降低,提示MGMT基因甲基化改变可能很早就已经出现,可能是胃癌发生过程中的早期分子事件,其后续变化可能在胃癌的发生、发展过程中起重要作用。

启动子甲基化抑制基因转录的机制尚不清楚,但已有多项研究表明蛋白表达缺失或减少与基因启动子甲基化有关^[15-19]。我们的研究表明胃癌中存在一定程度的MGMT基因启动子高甲基化和MGMT蛋白表达缺失,MGMT基因表达缺失多由MGMT基因启动子高甲基化引起,可能是胃癌发生过程中的早期分子事件。胃癌在我国常见也是表现出高频率甲基化的肿瘤之一,p16^{INK4a}、p14^{ARF}、hMLH1、APC等基因在胃癌中均存在一定程度的甲基化^[14, 20-25],因此联合检测MGMT基因和其他肿瘤相关基因的甲基化状况,可能作为早期发现胃癌的分子标志物。

4 参考文献

- 1 Dolan ME, Schilsky RL. Silence is golden: gene hypermethylation and survival in large-cell lymphoma. *J Natl Cancer Institute* 2002;94:6-7
- 2 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1976-1980
- 3 Yue CM, Deng DJ, Bi MX, Guo LP, Lu SH. Expression of ECRG4, a novel esophageal cancer-related gene, downregulated by CpG island hypermethylation in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1174-1178
- 4 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21 (WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002;8:400-405
- 5 Esteller M, Kiskues RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation of the DNA repair Gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001;61: 4689-4692
- 6 Park TJ, Han SU, Cho YK, Paik WK, Kim YB, Lim IK. Methylation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survived in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:2760-2768
- 7 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 9821-9826
- 8 Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2002;86: 1886-4892
- 9 刘仲敏, 刘芝华, 吴旻. DNA高甲基化与抑癌基因. 世界华人消化杂志 2003;11:1420-1424
- 10 周永宁, 徐采朴, 房殿春. CpG岛甲基化与胃肠道肿瘤. 世界华人消化杂志 2003;11:65-71
- 11 Costello FJ, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38:285-303
- 12 Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Mol Genetics* 2001;10:687-692
- 13 朱卫国. DNA甲基化, 基因调控和癌症. 世界华人消化杂志 2002; 10:680-683
- 14 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-3229
- 15 Esteller M, Hamilton SR, Bugar PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59: 793-797
- 16 Oue N, Shigeishi H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Kuraoka K, Ito R, Yasui W. Promoter hypermethylation of MGMT is associated with protein loss in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2001; 93:805-809
- 17 Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001;7:131-135
- 18 Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- 19 Liao C, Zhao MJ, Zhao J, Song H, Pineau P, Marchio A, Dejean A, Tiollais P, Wang HY, Li TP. Mutation analysis of novel human liver-related putative tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:89-93
- 20 Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P. Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:423-426
- 21 Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2202-2206
- 22 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001;7:722-725
- 23 Deng DJ, Zhou J, Zhu BD, Ji JF, Harper JC, Powell SM. Silencing-specific methylation and single nucleotide polymorphism of hMLH1 promoter in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:26-29
- 24 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 25 张晓兵, 刘泽军. 胃癌DNA甲基化谱研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1454-1457

成人胰母细胞瘤并发多发良性肿瘤 1 例

冀振华, 白 钢, 夏念信, 白宏伟

冀振华, 白钢, 夏念信, 白宏伟, 中国人民解放军海军总医院肝胆外科
北京市 100037
项目负责人: 冀振华, 100037, 北京市海淀区阜成路6号, 中国人民解放军海
军总医院肝胆外科. zhhji@95777.com
电话: 010-66958512 传真: 010-68780086
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-18

摘要

目的: 归纳总结成人胰母细胞瘤的临床特征, 改善治疗效果.

方法: 通过对1例成人胰母细胞瘤并发多发良性肿瘤病例的
诊治过程进行分析并复习国外文献.

结果: 成人胰母细胞瘤好发于中青年, 黄疸、腹块及腹痛
常是患者就诊的首发症状, 手术及放化疗效果好.

结论: 在临床上应提高对此病的认识, 避免因误诊为胰腺
癌而放弃治疗.

冀振华, 白钢, 夏念信, 白宏伟. 成人胰母细胞瘤并发多发良性肿瘤 1 例. 世界华
人消化杂志 2004;12(3):754-755

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/754.asp>

1 病例报告

患者, 女, 46岁. 因上腹部胀痛不适, 偶伴恶心、呕
吐5a, 出现皮肤、巩膜黄染1mo于2003-03-17入我院.
患者于15岁及38岁时分别因右侧乳腺纤维瘤及右上臂
皮下脂肪瘤(直径5-7cm, 均为2个)行局部肿瘤切除
术, 术后无复发. 查体: 巩膜及皮肤轻度黄染, 余未见
异常. 血生化: 血糖7.8mmol/L, TBIL 95 μ mol/L, DBIL
75.7 μ mol/L, AKP 679 U/L, ALT 199 U/L, 谷氨酰
转氨酶855 U/L, 乳酸脱氢酶243 U/L. 血清CA-199 42.
99 U/mL, CA-125 7.26 U/mL, CA-153 11.91 U/mL,
AFP 小于15 ng/mL, CEA 15.06 ng/mL. 胸部CT: 前纵
隔低密度肿物, 其中有块高密度骨化影, 符合畸胎瘤
诊断. 腹部B超: 胰腺头部低回声包块, 边界欠清, 无包
膜, 主胰管内径1.0cm. 胆总管内径最宽1.9cm(图1). 胰
腺CT: 胰头部可见类圆形软组织密度影, CT值62.0 HU,
肿块与胰头分界不清, 胰管、肝内外胆管扩张(图2).
初步诊断: (1)胰头占位性病变: 胰腺癌可能性大, 不除
外胰岛细胞瘤等少见胰腺肿瘤可能; (2)前纵隔畸胎瘤. 于
2003-03-31行剖腹探查术. 术中见胰头部肿物, 质
硬, 可活动; 腹腔动脉及肠系膜动脉周围见肿大淋巴
结, 质软. 行胰十二指肠切除. 术后患者痊愈出院. 病理
报告: 胰腺头部肿瘤大小4.5cm \times 4.5cm \times 4cm, 瘤细胞
呈实性巢状生长, 其中混有散在内分泌细胞及软骨细
胞, 并见扩张的导管. 淋巴结未见肿瘤浸润. 免疫组化:

胰酶(+), AFP(+), CgA(-), Syn(-). 符合胰母细胞瘤
诊断.



图1 腹部B超.



图2 胰腺CT.

2 讨论

胰母细胞瘤在临床上极少见, 成人胰母细胞瘤更为罕
见, 尚未见有胰母细胞瘤与其他良性肿瘤并发的报道.
本病例并发多部位、多类型、不同时间发生良性肿瘤的
胰母细胞瘤病例提示: 胰母细胞瘤可能为一种基因缺陷
病, 患者因为基因的变异或缺陷而造成肿瘤好发. 本例
已进行基因方面的检测, 详细内容将另文报道.

我们报道的患者46岁发病, 为国内年龄最大者^[1-5],
尽管国外有报道最大年龄为68岁者^[6], 但大多数仍为
中青年患者. 性别上无差异. 胰母细胞瘤在临床上诊断较
难, 绝大部分病例在术前不能得到明确诊断, 常以胰腺
或上腹部占位性病变行剖腹探查术, 术后病理才证实
本病, 特别是易与胰腺癌相混淆. 相对来说胰母细胞瘤
的治疗效果较胰腺癌明显要好, 因此, 二者的鉴别诊
断非常重要. 国外报道对1例晚期小儿胰母细胞瘤进行
多次手术结合放化疗取得了良好的效果^[7]. 我们报道的

这例患者虽然肿瘤靠近血管,但也进行了根治性切除,腹腔内肿大的淋巴结均未见转移,目前情况良好,无复发转移迹象。

虽然成人胰母细胞瘤发现时肿瘤较大,但一般都能切除,如有肝脏局部转移可一并切除,当肝脏有较多转移灶时单纯手术效果不佳,可考虑行辅助放化疗。我们认为在临床上应提高对此病的认识,避免因误诊为胰腺癌而放弃治疗,积极手术治疗将给患者创造更多生存的机会。

3 参考文献

- 1 高毅,杨继震.胰母细胞瘤的病理与临床.华人消化杂志 1998;6:

64-65

- 2 王刚,许可勤,张冲,朱峰.成人胰母细胞瘤1例.中国肿瘤临床 1999;26: 346
- 3 梁燕,苏从治,王玫,王丽荣,时惠平.胰母细胞瘤1例.中国医学影像 1999;15:820
- 4 夏庆欣,庄竞,姬社青,姜红光,乔思杰.成人胰母细胞瘤1例报道及文献复习.临床与实验病理学杂志 2000;16:188-191
- 5 李胜,衣龙海,石学涛.胰母细胞瘤1例.中华外科杂志 2002;40: 440
- 6 Levey JM, Banner BF. Adult pancreatoblastoma: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1841-1844
- 7 Murakami T, Ueki K, Kawakami H, Gondo T, Kuga T, Esato K, Furukawa S. Pancreatoblastoma: case report and review of treatment in the literature. *Med Pediatr Oncol* 1996;27: 193-197

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编辑

经《World Journal of Gastroenterology, WJG》编委审稿后,非常优秀的论文可直接录用,通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改,符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版。排版后校样由责任编辑审读全文,无语法及拼写错误方可付印。WJG为了确保其出版的每篇论文的编辑质量,特制定了编辑要点。

1 题名

应简明扼要有特色,突出主题,不宜过长;应直入主题,避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语;不用定冠词The,一般不使用缩写字(常用缩写字例外)。具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>。

2 摘要

采用结构式摘要。目的部分应直入主题,如To investigate the,可简要交代背景或该课题目前开展情况;方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时,结论部分使用一般现在时。人称和语态使用应自然,避免使用“悬垂分词”。摘要的第一句不要重复文章题名,应增加变化,补充一些细节。具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>。

3 正文

(1) 短句子:提倡使用短句子,尽量避免一个句子使用多个从句。拼写正确,时态一致、准确。方法及结果部分一般使用过去时。讨论部分,引用文献叙述一般使用过去时,结论性语言使用一般现在时。要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应;应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意;使用分词短语作状语和定语时,一定要注意其语态的正确使用,以求其前后呼应;应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等;在编辑过程中,一定要核对各基本数据及其百分比。此外,还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数。(2) 数字:出现在句首的数字应写为:Sixteen cases..或A total number of 16 cases而不能写为:16 cases, 100 patients,等。(3) 缩略词:首次使用词语时,应先写出全称然后在括号内写出其缩写词。(4) 斜体:细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如*in vivo*, *in situ*, *et al*等及参考文献中的刊名应使用斜体。(5) 图表:不要重复使用,已用图表示的内容不再使用表格。表和图题的说明应与正文的文题一样,文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时,如The data are shown in Table 1. 图表置正文内,图表内注解首字母大写,其余小写。

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出。参考文献全体作者是否与首页一致,题名与首页是否一致,刊名与首页是否一致,年与首页是否一致,卷号与首页是否一致,起页-止页与首页是否一致,PMID号是否与首页一致。

5 其他 (1)注意字符间空格,文稿要隔行打印。(2)使用正式文体,不用口语体和非规范缩写词。如isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory)等。(3)要客观地叙述方法和结果,用词要质朴无华,避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语。(4)可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式。(5)正确使用冠词,对可数词应尽量使用复数形式。(6)应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组,避免使用长系列形容词或名词修饰名词。(7)尽量应用重要的事实开头,避免短语或从句开头。(8)涉及他人的工作或研究成果时,尽量列出其姓名,两名以上的作者一定要用“et al”。具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>。