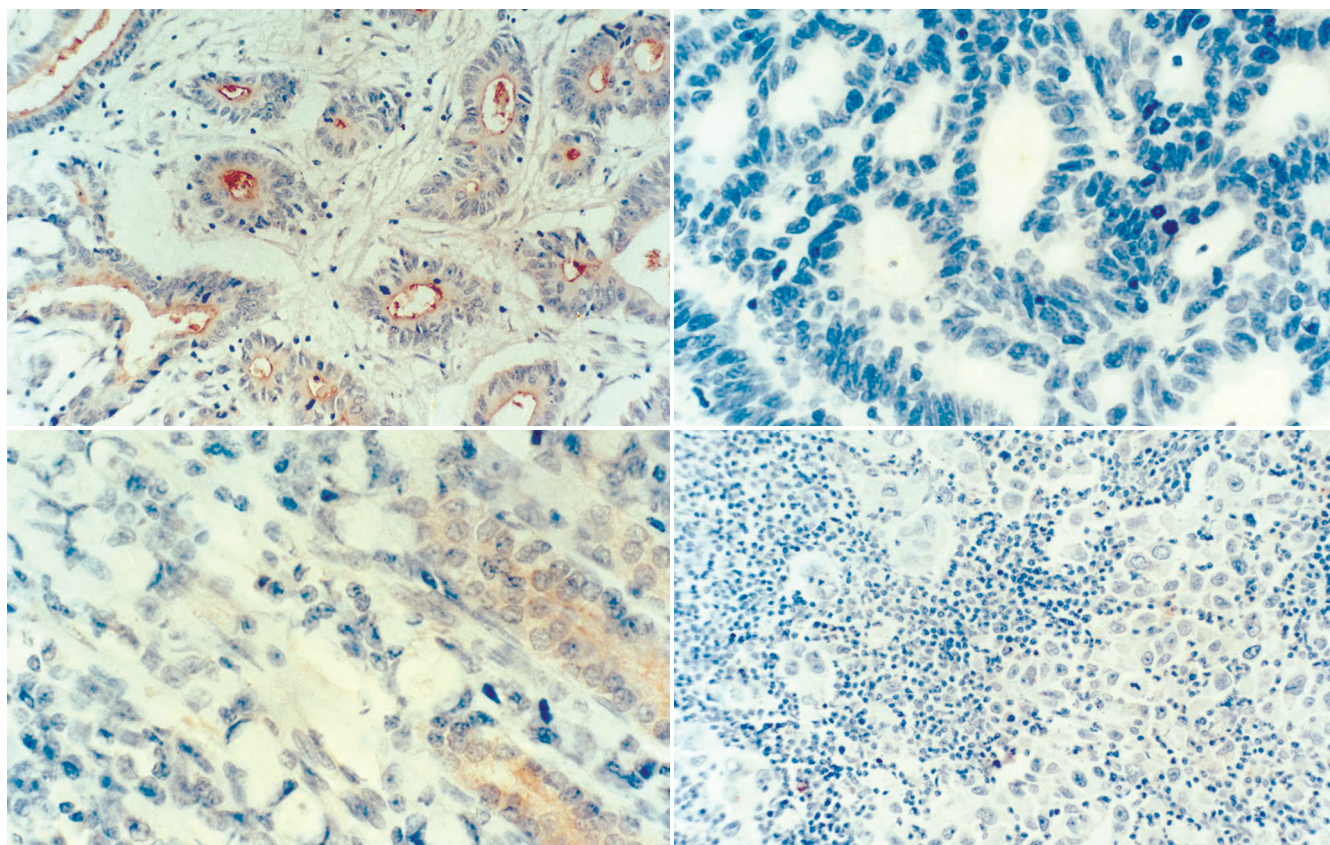


# 世界华人消化杂志

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 12 月 15 日 第 13 卷 第 23 期 (Volume 13 Number 23)



23 / 2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2003-01-15/2005-12-15

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
樊代明教授  
黄象谦教授  
黄志强教授  
刘耕陶教授  
刘锴教授  
裘法祖教授  
汤钊猷教授  
王宝恩教授  
危北海教授  
吴孟超教授  
吴咸中教授  
杨春波教授  
张金哲教授  
张学庸教授  
赵东海教授  
周殿元教授

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

陈士葆教授  
房殿春教授  
纪小龙教授  
王苑本教授  
吴云林教授  
徐克成教授  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 编委

蔡淦教授  
蔡威教授  
陈海龙教授  
陈红松副研究员  
陈家春教授  
陈立波副教授  
陈仕珠主任医师  
陈蔚文教授  
陈耀凯副教授  
陈祖林副教授  
程明亮教授

程英升副主任医师

崔云甫教授

戴冬秋教授

旦增副主任医师

董蕾教授

房静远教授

冯志华副教授

高春芳教授

高毅教授

谷俊朝副教授

郭新宁教授

韩天权教授

韩泽广研究员

郝俊鸣副主任医师

何振娟副主任医师

和水祥副教授

洪天配教授

侯晓华教授

胡以平教授

黄恒青副主任医师

冀振华副主任医师

江学良副主任医师

匡安仁教授

来茂德教授

兰林副教授

劳绍贤教授

冷希圣教授

李伯安教授

李朝品教授

李定国教授

李东辉副研究员

李恩民副教授

李国威教授

李靖副教授

李兰娟教授

李岩教授

李增山副教授

李兆申教授

李宗芳教授

梁萍教授

林菊生教授

林勇讲师

刘军讲师

刘莉讲师

刘连新教授

刘平教授

刘杞教授

刘银坤教授

刘正稳教授

龙致贤教授

卢绮萍主任医师

陆才德教授

吕宾主任医师

吕宁主任医师

吕毅教授

罗和生教授

马春红副教授

茅爱武主任医师

梅林教授

南极星副教授

聂青和副教授

宁琴教授

牛建昭教授

潘林娜教授

潘兴华副主任医师

潘秀珍教授

彭吉润副教授

彭淑牖教授

彭心宇教授

戚中田教授

钱会南副教授

钱建民教授

秦环龙副教授

秦仁义教授

邱赛红研究员

邱双健副教授

任建林副教授

邵成浩讲师

石统东副教授

石雪迎讲师

司富春教授

宋振顺教授

苏鲁主任医师

孙秀发教授

孙志伟副研究员

谭学瑞主任医师

唐承薇教授

屠红副研究员

王吉耀教授

王鲁副主任医师

王明荣教授

王庆国教授

王维教授

王小众教授

王兴鹏教授

王学浩教授

王振军教授

魏来教授

沃健儿副研究员

吴开春教授

吴梧桐教授

吴育连教授

向德兵讲师

邢金良讲师

徐存拴教授

徐德忠教授

徐列明教授

徐小元教授

许洪卫教授

许玲副教授

许文燮教授

严律南教授

杨刚毅副教授

杨建勇教授

杨希山教授

杨旭教导

杨云生教授

姚树坤教授

姚云清副教授

叶胜龙教授

伊力亚尔·夏合丁教授

于聪慧副主任医师

于皆平教授

于颖彦教授

余龙教授

喻荣彬副教授

袁耀宗教授

袁正宏研究员

岳茂兴教授

臧伟进教授

詹林盛研究员

张吉翔教授

张锦生教授

张青云研究员

张学教授

张亚力教授

张宗明教授

赵平讲师

赵新泰研究员

钟鸣研究员

周丁华副教授

周晓东研究员

周智副教授

周总光教授

庄贵华副教授

周士胜教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 12 月 15 日 第 13 卷 第 23 期 (总第151期)

## 述 评

- 2721 发展以抗乙肝病毒为目的RNA干扰的思路  
潘金水, 任建林, 王小众

## 基 础 研 究

- 2726 胃癌组织KAI1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白的表达意义  
孟丽辉, 辛彦, 吴东瑛, 张淑敏
- 2731 核糖体蛋白L5在胃癌中的表达及功能  
刘骥, 李纪鹏, 陈冬利, 张洪伟, 王为忠
- 2736 载脂蛋白B基因多态性及血脂水平与慢性丙型肝炎的相关性  
李雁, 刘正稳, 韩群英, 李晗
- 2742 实验性肝纤维化大鼠肝脏中TIMP-2基因及蛋白表达阻断研究  
聂青和, 张亚飞, 谢玉梅, 邵彬, 李军, 苟艳子, 周永兴
- 2748 胸腺肽 $\alpha$ 1对原发性肝癌围手术期免疫功能的影响  
徐青, 李鹏, 薛平, 朱卫平, 陈瑞新, 于秀
- 2752 慢性乙醇中毒所致大鼠肝损伤和肝细胞凋亡  
伏建峰, 史清海, 岳新华, 张东辉
- 2757 大肠癌中胃泌素、生长抑素mRNA的表达与细胞凋亡及Bcl-2、Bax的关系  
茆家定, 吴佩, 夏祥厚, 胡济群
- 2762 DNCB所致结肠炎小鼠血清中细胞因子的活性  
余万桂, 张恒文, 胡承明, 张道明, 梅林
- 2766 应激对大鼠结肠神经系统nNOS表达的影响  
李玉梅, 陆国明

## 文 献 综 述

- 2770 胃癌前病变中DNA甲基化状态与叶酸  
刘丽华, 张方信
- 2773 急性胰腺炎时炎症介质与细胞凋亡关系的研究进展  
张喜平, 林谦
- 2778 过继免疫疗法在慢性乙型肝炎治疗上的应用  
高新生, 林菊生
- 2783 纳米细菌研究 王利民, 沈文律, 张士莲

## 研 究 快 报

- 2788 Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达  
韩全利, 丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明
- 2791 P选择素L-EGF单抗对SCID小鼠胃癌转移抑制作用  
陈金联, 陈明祥, 陆金来, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陆允敏, 周同, 吴云林, 陈国强
- 2795 瘦素和TGF- $\alpha$ 在幽门螺杆菌感染慢性胃炎和胃溃疡患者胃黏膜内的表达及意义  
李点玲, 张桂英
- 2799 时间分辨荧光免疫法与电化学发光法检测结直肠肿瘤标志CEA的比较  
张青云, 孙丽, 张书耕, 王琼
- 2803 纳米细菌的免疫电镜检测 王利民, 沈文律, 周珍, 张士莲
- 2806 中西医结合治疗溃疡性结肠炎  
刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

## 临 床 经 验

- 2809 HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA和ALT的关系  
韩学吉, 许顺姬, 崔鹤松

## 病 例 报 告

- 2811 肾上腺副神经节瘤引起顽固性腹泻1例  
赵善超, 郑少斌, 毛向明, 谭万龙, 宋于刚



致 谢	2812 致谢世界华人消化杂志编委	
消 息	2725 2004年度中国科技论文统计结果 2730 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2735 首届北京地坛感染病学术会议 2741 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2747 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知 2751 《世界华人消化杂志》发表文章配发内容通知 2756 更正与说明专栏、技法与经验、专家门诊 2769 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2782 《现代消化及介入诊疗》杂志征稿、征订启事 2790 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2798 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2802 我国科技论文总数连续三年世界第五 2810 第一届全国临床营养支持学术会议通知	
封面故事	孟丽辉, 辛彦, 吴东瑛, 张淑敏. 胃癌组织KAI1和nm23-H <sub>1</sub> 蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2726-2730 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2726.asp	
国际会议	10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net  Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006  Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org  XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com  7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference	
<div><div><div>世界华人消化杂志</div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊)  创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-12-15 原刊名 新消化病学杂志</div></div><div><div>名誉总编辑 潘伯荣      社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁      英文编辑 张海宁 管鑫妍 中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍 电子编辑 张敏 张勇 李琪 本期审读 王瑾晖</div></div></div> <div><div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div><div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.  特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.  2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div></div> <div><div>ISSN 1009-3079      邮发代号      国外代号      国内定价      广告经营许可证 CN 14-1260/R      82-262      M 4481      每期24.00元 全年576.00元      1401004000050</div></div>		



# World Chinese Journal of Digestology

December 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 23

## EDITORIAL

To develop RNA interference for purpose of anti hepatitis B virus  
*Pan JS, Ren JL, Wang XZ* 2721

## BASIC RESEARCH

Clinicopathological significance of KAI 1 and nm23-H<sub>1</sub> expression in gastric cancer

*Meng LH, Xin Y, Wu DY, Zhang SM* 2726

Expression and functional study of ribosomal protein L5 in gastric cancer

*Liu J, Li JP, Chen DL, Zhang HW, Wang WZ* 2731

Correlations of chronic hepatitis C virus infection with Xba I polymorphism of apolipoprotein B gene and serum lipid metabolism

*Li Y, Liu ZW, Han QY, Li H* 2736

Antisense oligonucleotides-based inhibition of gene and protein expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on experimental liver fibrosis in rats

*Nie QH, Zhang YF, Xie YM, Shao B, Li J, Gou YZ, Zhou YX* 2742

Effects of thymosin  $\alpha$ 1 on immune function in perioperative patients with primary liver cancer

*Xu Q, Li P, Xue P, Zhu WP, Chen RX, Yu X* 2748

Liver injury and hepatocyte apoptosis induced by chronic alcoholic intoxication in rats

*Fu JF, Shi QH, Yue XH, Zhang DH* 2752

Relationship between expression of gastrin, somatostatin mRNA and cell apoptosis and Bcl-2, Bax in large intestinal carcinoma

*Mao JD, Wu P, Xia XH, Hu JQ* 2757

Activity of cytokines in dinitrochlorobenzene-induced colitis in mice

*Yu WG, Zhang HW, Hu CM, Zhang DM, Mei L* 2762

Effect of stress on expression of neuronal nitric oxide synthase in colonic nervous system in rats

*Li YM, Lu GM* 2766

## REVIEW

Relationship between status of DNA methylation and folic acid in gastric precancerous lesions

*Liu LH, Zhang FX* 2770

Advance in relationship between inflammatory mediators and apoptosis in acute pancreatitis

*Zhang XP, Lin Q* 2773

Application of adoptive immunotherapy in treatment of chronic hepatitis C

*Gao XS, Lin JS* 2778

Study on nanobacteria

*Wang LM, Shen WL, Zhang SL* 2783

## BRIEF REPORT

Expression of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit and its variants in drug-resistant gastric cancer cells

*Han QL, Ding J, Guo CC, Wang X, Qiao TD, Zhang XY, Fan DM* 2788

Inhibition of P-selectin L-EGF monoclonal antibody on metastasis of human gastric carcinoma in severe combined immunodeficient mice

*Chen JL, Chen MX, Lu JL, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Lu YM, Zhou T, Wu YL, Chen GQ* 2791

Expression and significance of leptin and transforming growth factor- $\alpha$  in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected patients with chronic gastritis and gastric ulcer

*Li DL, Zhang GY* 2795

Comparison between time-resolved fluorescence immunoassay and electro-chemiluminescence immunoassay for detection of serum carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma

*Zhang QY, Sun L, Zhang SG, Wang Q* 2799

Detection of nanobacteria by immune electronic microscopy

*Wang LM, Shen WL, Zhou Z, Zhang SL* 2803

Experimental research on treatment of ulcerative colitis with integrative traditional Chinese and Western medicine

*Liu JJ, Zheng CQ, Pan LL, Wen Y, Hu GZ* 2806

## CLINICAL PRACTICE

Relationship between HBV-DNA and ALT in serum of patients with HBeAg negative chronic Hepatitis B

*Han Xj, Xu SJ, Cui HS* 2809

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

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology SemiMonthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date December 15, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

# 发展以抗乙肝病毒为目的 RNA 干扰的思路

潘金水, 任建林, 王小众

潘金水, 福建医科大学2003级硕士班, 厦门大学附属中山医院消化内科 福建省厦门市 361004  
任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004  
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  
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. jianlinr@msn.com  
收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-31

## 摘要

RNA干扰的重要作用之一就是治疗应用, 如进行抗病毒治疗等. 体内RNA干扰存在干扰片段稳定性差、转运效率低等不足之处. 随着研究的深入, 学者们对上述问题提出了各种解决方案. 本文对这些解决方案进行了初步的总结.

**关键词:** 抗乙肝病毒; RNA干扰; 静默机制; 干扰片段

潘金水, 任建林, 王小众. 发展以抗乙肝病毒为目的RNA干扰的思路  
2005;13(23):2721-2725  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2721.asp>

## 0 引言

自从1990年后发现RNA干扰(RNA interference, RNAi)这一现象以来, RNAi已被广泛应用于基因功能、抗病毒治疗和信号转导系统上下游分子相互关系的研究. 乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)可导致急、慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌等一系列严重甚至可能危及生命的后果. 虽然普及乙肝疫苗以来, 病毒携带者及急性慢性肝炎患者数量已有明显下降, 但目前对于已携带有HBV的患者并无治疗良策, 因现有的抗病毒药物疗效欠佳<sup>[1-5]</sup>, 且未能清除HBV转录本并可导致耐药突变. RNAi是指由特定双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)引发同源mRNA降解的转录后基因静默机制, 是一种古老的保护机体免受病毒入侵的机制. 由于RNAi作用机制的特殊性, 已有多组体外试验显示出RNAi在抗HBV方面的优越性<sup>[6-8]</sup>. 但是RNAi同样也存在一些局限之处, 主要有: (1)干扰片段(small interfering RNA, siRNA)与靶mRNA的序列必须精确配对, 否则将导致干扰效应的明显下降; (2) siRNA转运入细胞的效率较低; (3) siRNA在体内稳定性差, 极易被体内的细胞RNA酶降解<sup>[9-12]</sup>. 本文结合目前研究成果试就上述问题的解决方案进行初步的探讨.

## 1 优选靶位点准确设计siRNA

目前将HBV分为8个基因型, 即A, B, C, D, E, F, G和H

型. 我国存在A, B, C, D等4个基因型, 北方城市以基因C型流行为主, 由北方至南方, 基因B型感染率逐渐增高, 深圳基因B型和C型感染率比例相当, 少数民族地区基因D型有较高的感染率, 西藏则以D型为主<sup>[13]</sup>. 已知不同基因型及同一基因型内部HBV基因组核苷酸序列存在变异现象, 但位点变异的机率并不均等. 董菁 *et al*<sup>[14]</sup>研究表明可将HBV基因组分为高度可变区及高度保守区. 因此, 设计siRNA时选择区域流行率较高的基因型的高度保守区作为靶位点, 将使siRNA适应性更广. 此外, 针对HBV四个开放读码框设计的siRNA干扰效应并不相同, Zhang *et al*<sup>[15]</sup>发现针对S区的siRNA干扰效应更为显著. 据推测可能为针对S区的siRNA除抑制HBsAg合成外, 同时具有影响HBV DNA聚合酶合成的 " 额外效应 " 所致. 但Konishi *et al*<sup>[16]</sup>的观察与此有所不同: 针对多聚腺苷酸尾的siRNA干扰效应最强, 其次为前C区, 再次为S区. 可以推测, 针对某一特定开放读码框并根据干扰位点选择原则<sup>[16]</sup>设计的干扰片段并不一定具有相同的干扰效应. 这可能与mRNA具有二级结构, 并且某些序列与蛋白质结合有关, 因而mRNA上的某些序列可能位于其空间结构的内侧, 不易于为RNA诱导的静默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合所致. 以往多数的siRNA设计程序主要是根据GC含量来选择靶位, Heale *et al*<sup>[17]</sup>认为这种方法易于造成假阴性, 建立在对靶mRNA二级结构分析基础上的可及性预测(accessibility prediction), 更易于筛选出理想的靶位点, 并认为siRNA二聚体端热力学特性是影响干扰活性的主要因素. Nam *et al*<sup>[18]</sup>对microRNA前体结构进行分析, 建立一个概率模型, 有助于优选干扰位点及优化siRNA设计. 因此, 有必要对开放读码框内符合干扰位点选择原则的各靶位点进行筛选, 选择其中干扰效应最强的靶位点设计siRNA. 值得注意的是, 已为人们所熟知的HBV在抗病毒药物的化学压力下出现耐药突变的现象, 在RNAi中同样存在. 由于HBV准种以及HBV自身变异能力的存在, 可能使原来有效的siRNA出现干扰效力下降的情况<sup>[19]</sup>.

## 2 提高siRNA转运入细胞的效率

真核细胞不易摄取外源性裸露核酸, 因而导致转染效率低下. 这可能是在长期的生物进化过程中真核生物形成的一种抵抗外界致畸、致突变因素入侵的防御本领. 在秀丽隐杆线虫中siRNA可以通过RNA-依赖的

RNA聚合酶活性而发生扩增<sup>[20]</sup>,然而并未在真核细胞中发现这一现象.在植物及果蝇中存在一种称为Dicer的核酸内切酶,可以将长双链RNA降解成长度为21-23 bp的siRNA<sup>[21-22]</sup>.Brown *et al*<sup>[23]</sup>发现传播疟疾的斯氏按蚊可出现遗传性RNAi效应.尚未在哺乳动物细胞中发现前述现象的存在.因此,在哺乳动物体内进行RNAi试验,siRNA必须在体外合成后导入细胞内,或由导入细胞内可表达特定siRNA的表达质粒产生.所以,有必要提高siRNA转运入细胞的效率.可能的解决途径如下:

2.1 改变给药途径 唾液中含有丰富的RNA酶,因此siRNA仅能经胃肠道外途径给药.虽然有不少数量的试验证实小鼠模型体内RNAi法抗HBV效果显著<sup>[7,24-25]</sup>,但是这些试验都有一个引人注目的特点,就是均采用流体转染法(hydrodynamic transfection)<sup>[26-28]</sup>.Yang *et al*<sup>[29]</sup>采用高压流体注射法.将可编码HBV DNA的质粒溶解于相当于小鼠体质量8%的平衡盐溶液在5-8 s内经鼠尾静脉注入,发现HBV DNA的复制受到明显的抑制.流体转染法有利于肝脏摄取外源性核酸,但在临床上则不易采用,因为在短时间内注入如此大量的液体,将导致循环超负荷,几乎必然导致急性心力衰竭.因为血浆中存在RNA酶,siRNA在血浆中极不稳定,且浓度较低时不易为肝脏所摄取,所以静脉滴注法亦不能采用.而肝脏动脉灌注法则可能有一定的应用价值,siRNA在肝脏局部可达到较高的血药浓度,易于被肝脏摄取.但是肝脏动脉灌注作为一种有创的介入方法,不利于反复采用,因此需提高siRNA在血浆中的稳定性,有助于延长给药间隔时间.

2.2 应用病毒载体表达所需siRNA 已有多种载体被用于体内转运siRNA,包括质粒<sup>[7]</sup>、逆转录病毒<sup>[30-31]</sup>、腺病毒<sup>[32-33]</sup>、腺相关病毒<sup>[34-35]</sup>、慢病毒属<sup>[36]</sup>等等.应用病毒载体转运siRNA易于到达靶器官,并且具有干扰效应长的优点.Uprichard *et al*<sup>[37]</sup>向转基因小鼠导入可表达针对HBV siRNA的重组腺病毒,可将HBV复制抑制至几乎测不出的水平,并且这一效应可长达26 d.向小鼠中脑神经元注射入腺相关病毒转运的siRNA,发现邻近部位的酪氨酸羟化酶表达受抑制长达数周<sup>[38]</sup>.Banerjee *et al*<sup>[39]</sup>应用慢病毒载体将抗HIV-1 rev蛋白的siRNA转入CD34<sup>+</sup>造血祖细胞.转导后的造血祖细胞能在体外分化成巨噬细胞,并能在患有严重免疫缺陷病的小鼠体内分化成具有抗HIV-1活性的T淋巴细胞.虽然应用病毒载体干扰效果多数较理想,但还是有些不足之处,如需进行病毒重组、可能引起插入突变<sup>[40]</sup>,特别是逆转录病毒<sup>[41]</sup>,如果是应用于治疗目的更需慎重考虑<sup>[42]</sup>.

2.3 提高siRNA的定向转运能力 在siRNA末端偶联上脂溶性物质可能会促进细胞对其摄取.如在siRNA的5'

-端连接上胆固醇、石胆酸、十二烷酸或长链烷基后能增加肝细胞膜对siRNA的通透性<sup>[43]</sup>.Soutschek *et al*<sup>[44]</sup>发现经胆固醇修饰后的siRNA能抑制小鼠载脂蛋白B基因表达apoB,并降低血浆中apoB水平以及降低总胆固醇水平.聚乙烯亚胺<sup>[45]</sup>、atelocollagen<sup>[46]</sup>与siRNA结合后也能增强其稳定性并促进siRNA在体内的运输.不少研究也显示出类脂介导的siRNA转运技术也有较高的应用价值<sup>[47-49]</sup>.Lorenz *et al*<sup>[43]</sup>利用亚磷酸键在siRNA5'-端共价结合上亲脂性的胆固醇、石胆酸、十二烷酸衍生物,经修饰后的siRNA能抑制*LacZ*活性.Massaro *et al*<sup>[50]</sup>发现肺泡表面活性物质能作为一种载体有效地将siRNA转运至小鼠的肺泡.

2.4 构建长时程RNAi模型 由于siRNA易被体内的RNA酶降解,不易于到达特定靶器官,且反复给药受客观条件限制,于是构建长时程RNAi模型便成为一个优先考虑的方法.长时程RNAi主要的思路是利用各种方法将可表达siRNA的基因元件整合到细胞基因组中,其中转座子是较常应用的方法.现已有数个研究显示出长时程RNAi的可行性与优越性.Heggestad *et al*<sup>[51]</sup>利用哺乳动物Tc1样"睡美人转座子"(transposon sleeping beauty)把siRNA表达盒整合至细胞基因组中,发现绿色荧光蛋白的表达受到明显抑制;针对内源性核纤层蛋白A基因进行RNAi也取得长时程而显著的效果(相应蛋白表达下降95%以上).L<sub>1</sub>是一个非长末端重复的逆转录转座子,约占人类基因组容量的17%<sup>[52]</sup>.Yang *et al*<sup>[53]</sup>利用L<sub>1</sub>逆转录转座子作为载体携带siRNA表达盒插入真核细胞基因组内,发现对绿色荧光蛋白表达的抑制率达87%,这一效应长达3 mo以上,并且受细胞传代影响不明显.应用L<sub>1</sub>逆转录转座子的优点有<sup>[53]</sup>:(1)L<sub>1</sub>蛋白无明显的免疫原性,即使是意外地引起基因组中外源性启动子的表达;(2)逆转录病毒介导的整合常同时整合具有强启动子效应的长重复末端;L<sub>1</sub>在整合过程中则常常丢失其内在的启动子,不致有激活宿主基因表达之虞;(3)即使仅有单拷贝RNAi表达盒发生整合亦足以引起强有力的干扰效应.逆转录病毒倾向于多拷贝整合,质粒易于发生串联重复整合,这些情况都可能激发非特异的干扰素表达,导致siRNA的降解;(4)不必进行病毒重组.有些其他的转座子也可以应用.最近,Ding *et al*<sup>[54]</sup>发现从飞蛾身上提取出的PB转座子(piggyBac transposon)可作为一种基因载体,携带外源基因片段快捷插入哺乳动物基因中并保持活性,引发基因突变,籍此了解某类基因的特定功能.可以预测,PB转座子将成为一个构建长时程RNAi模型的有力工具.Gupta *et al*<sup>[55]</sup>通过置换U6启动子的天然增强子,建立蜕皮素诱导的RNAi系统.当加入蜕皮素后,p53基因的表达即呈现出剂量、时间依赖性抑制.这是一个有益的尝试,有利于进行"按需调节"的RNAi.



### 3 提高siRNA在体内的稳定性

血浆中存在的核酸酶可导致siRNA的降解<sup>[56-57]</sup>, 从而直接限制了RNAi在机体内的应用. 必须有效地解决这一问题才能将RNAi应用于治疗目的. 目前提高siRNA在体内稳定性的方法主要有以下几种:

**3.1 siRNA骨架的修饰** 对核酸骨架进行修饰是个值得考虑的方向<sup>[58-59]</sup>, 主要是对核酸链中磷酸基团的化学修饰. 以其他元素取代磷酸基中的氧, 如以硫置换氧形成磷硫酰<sup>[59]</sup>、硼(-BH<sub>3</sub>)置换氧<sup>[60]</sup>等. 有的研究认为以硫置换氧并不影响siRNA的活性, 但如整个骨架中磷酸基的氧均为硫所取代则可能有一定的细胞毒性<sup>[61]</sup>. El-men *et al*<sup>[62]</sup>合成核酸锁定链(locked nucleic acid, LNA), 即一种高亲和力的RNA样核苷酸类似物. LNA能与siRNA形成较稳定的二聚体结构, 延长siRNA在血浆中的半衰期而不影响干扰效应.

**3.2 碱基的化学修饰** 对siRNA内的碱基进行化学修饰<sup>[42,63-64]</sup>有几个优点: (1)增加对热力学和核酸酶的稳定; (2)延长siRNA在循环中的半衰期; (3)改善siRNA的生物分布和药代动力学特性, 并有利于转运siRNA至特定细胞内; (4)增强与靶mRNA的亲合力. 但是, 通常情况下野生型siRNA的碱基被取代可能造成干扰效应下降. 如在HeLa细胞株中, 尿嘧啶被N-甲基-尿嘧啶取代后造成siRNA活性丧失, 2, 6-二氨基嘌呤取代腺嘌呤后亦可出现类似表现<sup>[58]</sup>.

**3.3 核糖的化学修饰** 核糖的化学修饰主要发生在2'-羟基、4'-氧上. 2'-羟基的修饰方法有以亚胺基(-NH<sub>2</sub>)、氟、羟甲基取代羟基等. 氟取代羟基后能增强培养基中siRNA的稳定性, 并能抑制质粒表达荧光素酶<sup>[65]</sup>. Allerson *et al*<sup>[66]</sup>亦发现2'-羟基被羟甲基或氟取代后siRNA的稳定性和活性均有增加. 4'-氧被硫取代后能增强对核酸酶的抵抗力, 而且如果硫取代发生在有意义链的末端效果则更为显著<sup>[67]</sup>. Morrissey *et al*<sup>[68]</sup>对siRNA二聚体的有意义链内嘧啶核苷酸的2'-羟基以氟取代, 嘌呤核苷酸进行脱氧; 对反义链内的嘧啶核苷酸同样予以氟取代, 而嘌呤核苷酸则以羟甲基取代2'-羟基, 3'-端则接上单个磷硫酰. 经过上述处理后, siRNA在血浆中的半衰期明显延长, 并且干扰效应有显著增强, 同时siRNA的应用剂量能降至临床上相对可行的水平.

总之, 近年来, 各领域的学者们对RNAi机制进行了深入的研究, 扩展了其体内外应用范围. 尽管目前还存在前述这些尚未解决的问题, 限制了RNAi的治疗应用. 我们相信随着各种技术的完善, 这些不足之处能得到妥善解决, RNAi有望进入临床应用, 为战胜疾病如HBV等提供一个全新的有力武器. 综合目前的研究成果, 构建可诱导的siRNA表达盒, 以转座子为中介整合入细胞基因组中应该是一个发展治疗目的RNAi的首选方案.

值得一提的是以往多数学者认为RNAi是高度精确的, 即使仅有一个碱基错配亦能使其效应明显下降. 但近来研究证实RNAi还存在所谓的“脱靶现象”, 指siRNA能造成非完全同源mRNA降解的现象<sup>[69-70]</sup>. 这种现象可能是由于siRNA与靶mRNA内的某些核苷酸摆动配对造成的, 如G/U错配<sup>[69]</sup>. 因此, RNAi有时可能意外地造成其他靶mRNA非特异性降解, 进行治疗试验时须警惕这一现象的存在. 计算机模型分析显示, 21 nt的siRNA有助于提高干扰的特异性<sup>[71]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341: 1256-1263
- 2 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61-68
- 3 Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, Farrell G, Sherman M, Willems B, Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut* 2000; 46: 562-568
- 4 Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129
- 5 Chan HL, Leung NW, Hui AY, Wong VW, Liew CT, Chim AM, Chan FK, Hung LC, Lee YT, Tam JS, Lam CW, Sung JJ. A randomized, controlled trial of combination therapy for chronic hepatitis B: comparing pegylated interferon-alpha2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann Intern Med* 2005; 142: 240-250
- 6 Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 2003; 38: 842-850
- 7 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
- 8 Ying C, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 482-484
- 9 Kitabwalla M, Ruprecht RM. RNA interference-a new weapon against HIV and beyond. *N Engl J Med* 2002; 347: 1364-1367
- 10 Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004; 328: 1245-1248
- 11 Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 2004; 351: 1772-1777
- 12 潘金水, 任建林, 董菁, 王小众. RNA干扰的机制及其抗肝炎病毒的应用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1322-1326
- 13 杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏. 乙型肝炎病毒基因分型的临床意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1670-1673
- 14 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 42-46
- 15 Zhang XN, Xiong W, Wang JD, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. siRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2967-2971
- 16 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888
- 17 Heale BS, Soifer HS, Bowers C, Rossi JJ. siRNA target site sec-

- ondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e30
- 18 Nam JW, Shin KR, Han J, Lee Y, Kim VN, Zhang BT. Human microRNA prediction through a probabilistic co-learning model of sequence and structure. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 3570-3581
  - 19 Wu HL, Huang LR, Huang CC, Lai HL, Liu CJ, Huang YT, Hsu YW, Lu CY, Chen DS, Chen PJ. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 2005; 128: 708-716
  - 20 Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 1998; 282: 430-431
  - 21 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
  - 22 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
  - 23 Brown AE, Bugeon L, Crisanti A, Catteruccia F. Stable and heritable gene silencing in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e85
  - 24 Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 2003; 8: 769-776
  - 25 Klein C, Bock CT, Wedemeyer H, Wustefeld T, Locarnini S, Dienes HP, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Inhibition of hepatitis B virus replication *in vivo* by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 2003; 125: 9-18
  - 26 Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6: 1258-1266
  - 27 Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735-1737
  - 28 Chang J, Sigal LJ, Lerro A, Taylor J. Replication of the human hepatitis delta virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences. *J Virol* 2001; 75: 3469-3473
  - 29 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13825-13830
  - 30 Chen J, Wall NR, Kocher K, Duclos N, Fabbro D, Neuberger D, Griffin JD, Shi Y, Gilliland DG. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFBetaR to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest* 2004; 113: 1784-1791
  - 31 Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 2002; 296: 1319-1321
  - 32 Li H, Fu X, Chen Y, Hong Y, Tan Y, Cao H, Wu M, Wang H. Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 2029-2041
  - 33 Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T. RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene* 2005; 348: 157-165
  - 34 Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Efficient gene transfer of HIV-1-specific short hairpin RNA into human lymphocytic cells using recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* 2004; 9: 396-402
  - 35 Pinkenburg O, Platz J, Beisswenger C, Vogelmeier C, Bals R. Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation by siRNA expressed by recombinant adeno-associated virus. *J Virol Methods* 2004; 120: 119-122
  - 36 Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003; 33: 401-406
  - 37 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 773-778
  - 38 Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 2003; 9: 1539-1544
  - 39 Banerjee A, Li MJ, Bauer G, Remling L, Lee NS, Rossi J, Akkina R. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 2003; 8: 62-71
  - 40 Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348: 255-256
  - 41 Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 2003; 299: 320
  - 42 Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 318-329
  - 43 Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 4975-4977
  - 44 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178
  - 45 Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*. *Gene Ther* 2005; 12: 461-466
  - 46 Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e109
  - 47 Sioud M, Sorensen DR. Systemic delivery of synthetic siRNAs. *Methods Mol Biol* 2004; 252: 515-522
  - 48 Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8676-8681
  - 49 Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3667-3677
  - 50 Massaro D, Massaro GD, Clerch LB. Noninvasive delivery of small inhibitory RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L1066-L1070
  - 51 Heggstad AD, Notterpek L, Fletcher BS. Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 643-650
  - 52 Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 2004; 303: 1626-1632
  - 53 Yang N, Zhang L, Kazazian HH Jr. L1 retrotransposon-mediated stable gene silencing. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e57
  - 54 Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 2005; 122: 473-483
  - 55 Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1927-1932
  - 56 Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic.

- Annu Rev Med* 2005; 56: 401-423
- 57 Paroo Z, Corey DR. Challenges for RNAi *in vivo*. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 390-394
  - 58 Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 2003; 9: 1034-1048
  - 59 Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13: 83-105
  - 60 Hall AH, Wan J, Shaughnessy EE, Ramsay Shaw B, Alexander KA. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 5991-6000
  - 61 Amarzguioui M, Hølen T, Babaie E, Prydz H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 589-595
  - 62 Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Orum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
  - 63 Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1628-1644
  - 64 Manoharan M. RNA interference and chemically modified siRNAs. *Nucleic Acids Res Suppl* 2003; : 115-116
  - 65 Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 2002; 169: 5196-5201
  - 66 Allerson CR, Sioufi N, Jarres R, Prakash TP, Naik N, Berdeja A, Wanders L, Griffey RH, Swayze EE, Bhat B. Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved *in vitro* potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. *J Med Chem* 2005; 48: 901-904
  - 67 Hoshika S, Minakawa N, Matsuda A. Synthesis and physical and physiological properties of 4'-thioRNA: application to post-modification of RNA aptamer toward NF-kappaB. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3815-3825
  - 68 Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockridge JA, Dickinson B, McSwiggen JA, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Polisky BA, Zinnen S. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 2005; 41: 1349-1356
  - 69 Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 44312-44319
  - 70 Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 635-637
  - 71 Qiu S, Adema CM, Lane T. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1834-1847

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2004年度中国科技论文统计结果

**本刊讯** 自1987年以来, 中国科学技术信息研究所一直承担着中国科技人员在国内外发表论文数量和影响的统计分析工作。2005年的科技论文与引文统计工作现已完成。

国际论文数据主要取自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), 今年新增加了对美国《医学索引》(MEDLINE)的统计分析。同时首次对SCI收录的社会科学论文进行了总体统计。

国内论文数据取自中国科学技术信息研究所研制的《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD), 该数据库2004年度收录的中国科技论文统计源期刊共1608种。

美国《医学索引》(Index Medicus/MEDLINE)创刊于1879年, 由美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)编辑出版, 收录世界70多个国家和地区, 40余种文字的4800种生物医学及相关学科期刊, 是当今世界较权威的生物医学文献检索系统, 收录文献反映了全球生物医学领域较高水平的研究成果。该系统有较为严格的选刊程序和标准, 我国大陆目前有75种期刊被该系统收录。2004年该系统共收录中国论文18962篇。

2004年SCI收录的中国大陆论文中, 国际合作产生的论文为11963篇, 占我国发表论文总数的20.8%, 所占比例比2003年减少了2.8个百分点; 我国作者为第一作者的国际合著论文6599篇, 合作伙伴涉及71个国家(地区); 其他国家作者为第一作者、我国作者参与工作的国际合著论文为5364篇, 合作伙伴涉及64个国家(地区)。

2004年我国科技人员在国内科技期刊上共发表论文309952篇, 比2003年增加35514篇, 增长12.9%; 海外作者在我国刊物上发表论文1472篇, 比2003年增加278篇。



# 胃癌组织 KAI 1 和 nm23-H<sub>1</sub> 蛋白的表达意义

孟丽辉, 辛彦, 吴东瑛, 张淑敏

孟丽辉, 辛彦, 吴东瑛, 张淑敏, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001

孟丽辉, 女, 1970-04-07生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2001年中国医科大学肿瘤学硕士生, 主要从事胃癌方面研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30371607

通讯作者: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室. yxin@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23256666-6351 传真: 024-22703576

收稿日期: 2005-05-22 接受日期: 2005-06-16

## Clinicopathological significance of KAI 1 and nm23-H<sub>1</sub> expression in gastric cancer

Li-Hui Meng, Yan Xin, Dong-Ying Wu, Shu-Min Zhang

Li-Hui Meng, Yan Xin, Dong-Ying Wu, Shu-Min Zhang, the Fourth Laboratory of the Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371607

Correspondence to: Professor Yan Xin, the Fourth Laboratory of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@mail.cmu.edu.cn

Received: 2005-05-22 Accepted: 2005-06-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of KAI 1 and nm23-H<sub>1</sub> protein in gastric cancer, and to explore the clinicopathological significance of KAI 1 protein in the progression of gastric cancer.

**METHODS:** Eighty-seven paraffin-embedded specimens of gastric cancer were investigated immunohistochemically by Envision method with rabbit anti-human KAI 1 polyclonal antibody and mouse anti-human nm23-H<sub>1</sub> monoclonal antibody. Statistical analysis was performed using chi-square test.

**RESULTS:** The positive rate of KAI 1 expression in gastric cancer with lymph node metastasis (60%, 39/65) was significantly lower than that without lymph node metastasis (95%, 21/22,  $P < 0.05$ ), but the rate was markedly higher in early-stage tissues of gastric cancer than that in late-stage ones (94%, 16/17 vs 63%, 44/70,  $P < 0.05$ ). The patients with KAI 1 positive tumor tended to have a longer survival time ( $P < 0.05$ ). The expression of nm23-H<sub>1</sub> was notably decreased in gastric cancer with lymph node metastasis in comparison with that without lymph node metastasis (18% vs

77%,  $P < 0.05$ ), but nm23-H<sub>1</sub> expression rate in early- and meta-phase gastric cancers was higher than that in late-phase gastric cancers (65% vs 26%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** KAI 1 and nm23-H<sub>1</sub> are both associated with invasive ability of gastric cancer. Furthermore, KAI 1 is correlated with prognosis of patients with gastric cancers. Combined detection of KAI 1 and nm23-H<sub>1</sub> may be helpful in predicting the prognosis and further directing the clinical therapy of gastric cancer.

**Key Words:** KAI 1; nm23-H<sub>1</sub>; Gastric cancer; Prognosis

Meng LH, Xin Y, Wu DY, Zhang SM. Clinicopathological significance of KAI 1 and nm23-H<sub>1</sub> expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2726-2730

## 摘要

**目的:** 观察胃癌组织中KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白的表达与临床病理生物学的关系, 探讨KAI 1蛋白在胃癌发生、发展中的作用。

**方法:** 应用兔抗人KAI 1多克隆抗体和鼠抗人nm23-H<sub>1</sub>单克隆抗体对87例手术切除胃癌标本以PV-9000免疫组化二步法进行染色, 用 $\chi^2$ 检验进行统计学分析。

**结果:** 伴有淋巴结转移的胃癌组织中KAI 1蛋白表达阳性率(60%, 39/65)明显低于无淋巴结转移的胃癌组织(95%, 21/22,  $P < 0.05$ ), 早中期胃癌组织中KAI 1蛋白表达阳性率(94%, 16/17)显著高于晚期胃癌组织(63%, 44/70,  $P < 0.05$ ), KAI 1蛋白高表达者其生存期亦较长( $P < 0.05$ ); 伴有淋巴结转移的胃癌组织中nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率明显低于无淋巴结转移的胃癌组织(18% vs 77%,  $P < 0.05$ ), 早中期胃癌组织中nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率明显高于晚期胃癌组织(65% vs 26%,  $P < 0.05$ )。

**结论:** KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白均与胃癌侵袭转移有关, 且KAI 1表达与胃癌患者预后密切相关, 将两种指标联合检测, 可作为正确判断胃癌患者预后, 指导临床治疗的分子生物学指标。

**关键词:** KAI 1; nm23-H<sub>1</sub>; 胃癌; 预后

孟丽辉, 辛彦, 吴东瑛, 张淑敏. 胃癌组织KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(23):2726-2730  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2726.asp>

## 0 引言

胃癌是我国死亡率最高的恶性肿瘤之一<sup>[1-7]</sup>,侵袭转移是肿瘤的最重要恶性特征,也是胃癌治疗失败导致死亡的主要原因。肿瘤转移是一个多步骤、连续的过程,受多种癌基因和抑癌基因的调控<sup>[8-12]</sup>。KAI 1是肿瘤转移抑制基因,属四跨膜超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)的成员, KAI 1/CD82对多种肿瘤的转移具有抑制作用, KAI 1对肿瘤转移的抑制作用可能源于其对细胞运动、转移和增生的影响<sup>[13-15]</sup>。nm23-H<sub>1</sub>的mRNA水平与癌细胞转移的关系更为密切,该基因编码一种具有二磷酸核苷激酶(NDPK)活性的蛋白质,通过影响微管聚合状态及G蛋白介导的信号传导通路而调节细胞代谢,从而对肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭及转移起重要作用<sup>[16-19]</sup>。我们对二种肿瘤转移抑制基因KAI 1/CD82和nm23-H<sub>1</sub>在胃癌组织中的表达进行比较研究,探讨其在胃癌侵袭转移中的作用及与胃癌生物学行为和预后的关系,为临床胃癌转移的有效防治提供科学的依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2002-07/2003-06辽宁省肿瘤医院、中国医科大学附属第一医院肿瘤科手术切除胃癌存档蜡块87例。男60例,女27例,年龄26-74(平均56)岁。早期5例,中期12例,晚期70例。有淋巴结转移65例,无淋巴结转移22例。全部病例均无临床辅助检查可见的其他脏器转移癌,均有5 a以上的跟踪随访。每例均选择癌组织、癌与正常组织交界处和淋巴结转移癌组织的常规石蜡包埋蜡块各一枚,制做成4 μm厚的连续切片供检测用。兔抗人KAI 1多克隆抗体(1:50)、鼠抗人nm23-H<sub>1</sub>mAB(1:100)分别购自Santa Cruz和北京中山生物技术有限公司, PV-9000免疫组化二步法检测试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

**1.2 方法** 采用PV-9000免疫组化二步法检测KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达。以中山公司赠送阳性切片为阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白免疫染色阳性信号为定位于细胞质,呈棕黄色颗粒。每个标本随机观察5个高倍视野,每个视野计数200个肿瘤细胞,取平均值。阳性细胞数<5%为阴性(-), 5-25%为弱阳性(+), 25-50%为中度阳性(++), >50%为强阳性(+++)。为便于结果分析处理,将(+)-(++)列为阳性组。

**统计学处理** 利用 $\chi^2$ 检验比较率的差异。 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃癌组织KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白的表达** KAI 1蛋白在胃黏膜上皮细胞的胞质中呈阳性表达,胃癌组

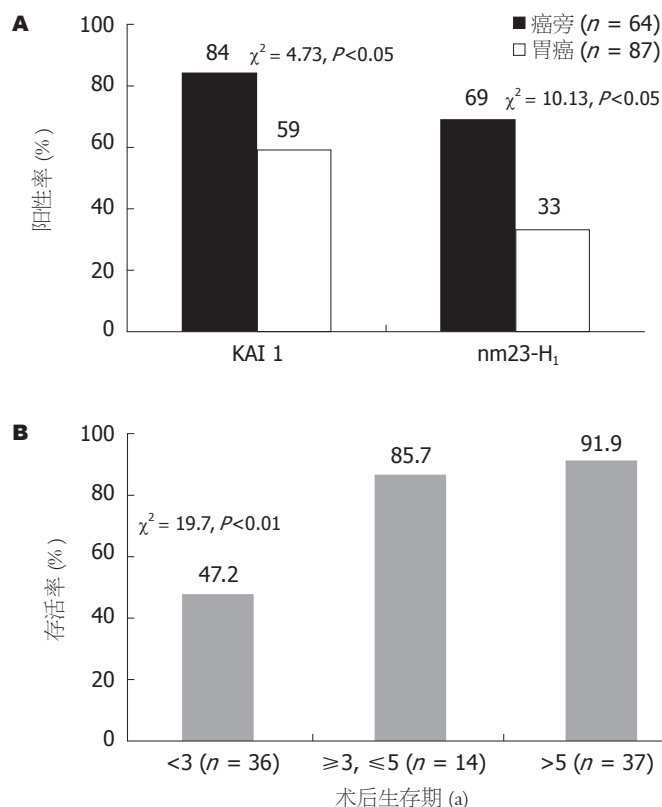


图1 A: KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>在胃癌及其癌旁黏膜中的表达; B: KAI 1蛋白表达与胃癌患者生存期的关系。

织KAI 1蛋白表达阳性率为69%(60/87),显著低于癌旁组织84%(54/64)( $P<0.05$ ); nm23-H<sub>1</sub>蛋白在胃癌组织中表达阳性率为33%(29/87),显著低于癌旁组织59%(38/64)( $P<0.05$ ,图1A)。

**2.2 KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达与胃癌病理的关系** 肠型胃癌KAI 1蛋白表达阳性率(85%)高于弥漫型胃癌(64%),但无统计学意义( $P>0.05$ )。伴有淋巴结转移的胃癌组织中KAI 1蛋白表达阳性率(60%)明显低于无淋巴结转移的胃癌组织(95%)( $P<0.05$ ),呈负相关;早中期胃癌组织中KAI 1蛋白表达阳性率(94%)明显高于晚期胃癌组织(63%)( $P<0.05$ )。肠型胃癌nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率(30%)低于弥漫型胃癌(34%),但两者无统计学意义( $P>0.05$ )。伴有淋巴结转移的胃癌组织中nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率(18%)明显低于无淋巴结转移的胃癌组织(77%)( $P<0.05$ ),呈负相关;早中期胃癌组织中nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率(65%)明显高于晚期胃癌组织(26%, $P<0.05$ ,表1)。KAI 1蛋白表达与胃癌患者生存期密切相关( $P<0.01$ ),KAI 1蛋白高表达者其生存期亦较长(图1B,图2,图3)。

**2.3 胃癌组织中KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达的关系** 在KAI 1蛋白表达阳性的60例胃癌组织中nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率为45%(27/60),27例KAI 1蛋白表达阴性的胃癌组织中nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达阳性率为7%(2/27),两者相比有显著差异( $P<0.05$ ,表2)。



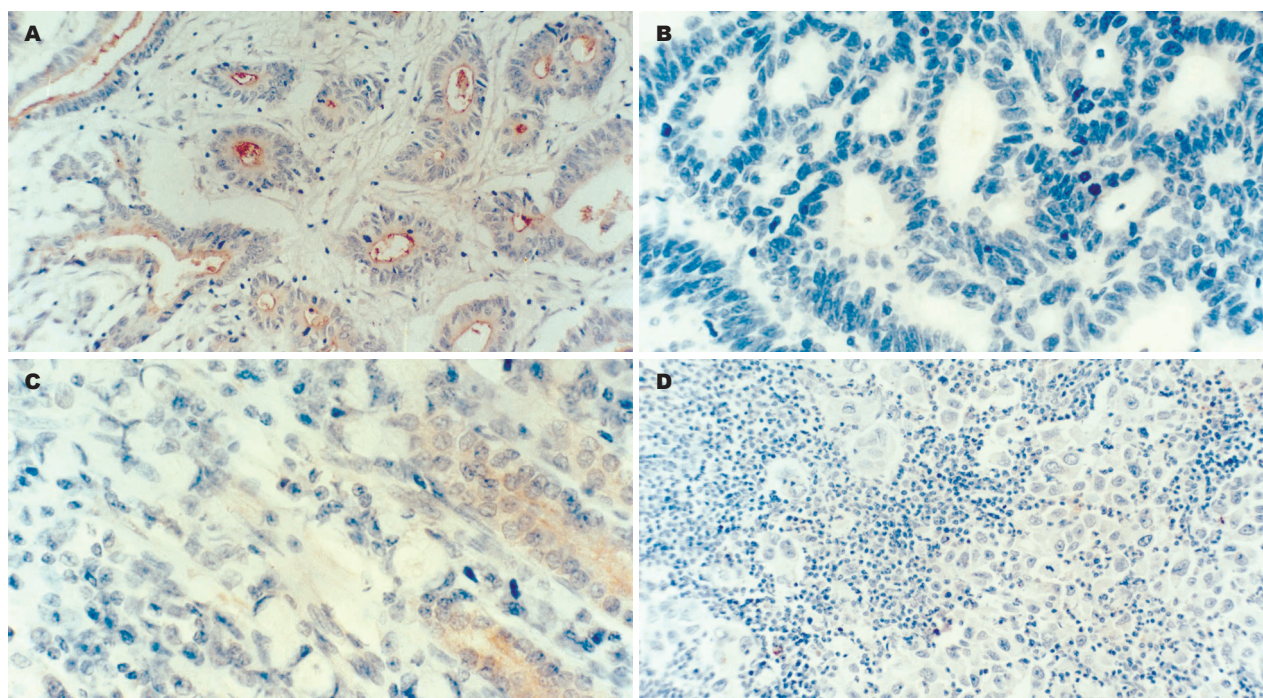


图 2 胃癌中KAI 1蛋白表达情况PV-9000二步法. A: 中高分化腺癌呈阳性表达; B: 低分化腺癌呈阴性表达; C: 黏液细胞癌呈阴性表达; D: 淋巴结转移癌呈阴性表达.

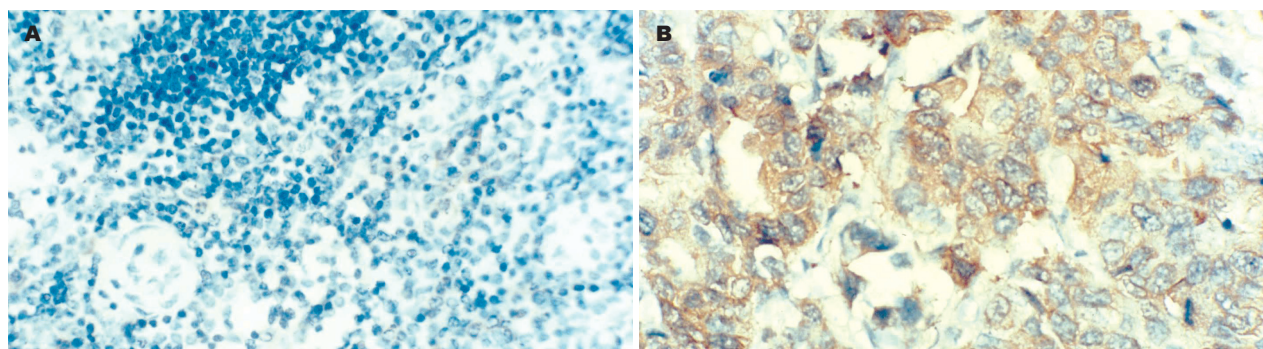


图 3 胃癌中nm23-H<sub>1</sub>表达情况 PV-9000二步法 (×400). A: 淋巴结转移癌灶呈阴性表达; B: 低分化腺癌呈阳性表达.

表 1 KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达与胃癌病理生物学的关系

病理生物学	n	KAI 1蛋白表达			nm23-H <sub>1</sub> 蛋白表达		
		-	+	阳性率 (%)	-	+	阳性率 (%)
Lauren分型							
肠型	20	3	17	85	14	6	30
弥漫型	67	24	43	64	44	23	34
淋巴结转移							
(+)	65	26	39	60	53	12	18
(-)	22	1	21	95 <sup>a</sup>	5	17	77 <sup>a</sup>
临床分期							
早期	5	0	5	100	1	4	80
中期	12	1	11	92	5	7	58
晚期	70	26	44	63 <sup>a</sup>	52	18	26 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05.

### 3 讨论

肿瘤侵袭转移是一系列复杂、多步骤的连续过程,KAI 1基因有直接的抑制肿瘤作用,在肿瘤的发生进展中的

表 2 KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达的关系

KAI 1表达	nm23-H <sub>1</sub> 表达		合计
	+	-	
+	27	33	60
-	2	25	27
合计	29	58	78

$$\chi^2 = 8.48, P < 0.01.$$

负调控作用已经在多个研究中报道<sup>[15,20-23]</sup>. 尽管KAI 1基因确切功能还不清楚,但目前一致认为KAI 1/CD82对肿瘤转移的抑制作用可能源于其对细胞运动、转移和增生的影响,这与其可调节细胞的黏附有关<sup>[24]</sup>. 我们发现,有淋巴结转移的胃癌组织KAI 1表达阳性率(60%)明显低于无淋巴结转移者(95%),胃癌组织中KAI 1表达阳性率(69%)明显低于癌旁组织(84%),提示KAI 1与胃癌淋巴结转移的发生、发展有关,KAI 1表



达的下调可能促使胃癌细胞获得了恶性转化和侵袭转移的潜能, 这个能力可促使癌细胞扩散以及扩散中的癌细胞在淋巴结内定居, 并有效地形成淋巴结转移。此外, 也可能KAI 1表达的下调削弱了癌细胞间的黏附能力, 从而促进了癌细胞的扩散。本研究还发现KAI 1表达与Lauren分型无明显相关( $P>0.05$ ), 而与临床病理分期呈正相关, 早中期胃癌患者的癌细胞中KAI 1表达的阳性率明显高于晚期患者( $P<0.05$ )。并且, 胃癌患者的生存期与KAI 1表达的阳性率也呈正相关( $P<0.01$ ), 这些结果表明KAI 1蛋白可作为一个客观判断胃癌患者预后的新的分子生物学指标。

人类的nm23基因定位于17号染色体长臂的着丝点附近, 有三种亚型即nm23-H<sub>1</sub>, nm23-H<sub>2</sub>, nm23-H<sub>3</sub>, 其中nm23-H<sub>1</sub>的mRNA水平与癌细胞转移的关系更为密切, Nakayama *et al*研究认为在进展期胃癌组织中nm23基因表达无一定规律, 且nm23低表达者预后差, 而Muller *et al*的研究结果显示nm23阳性表达与胃癌组织学类型分化程度、临床分期有关, 与淋巴结转移无关, 淋巴管血管受侵犯组nm23表达阳性率高于无侵犯组。并发现nm23表达阳性者预后较阴性表达者差。本结果显示nm23-H<sub>1</sub>的阳性表达与Lauren分型无明显相关( $P>0.05$ ), 而与有无淋巴结转移以及临床病理分期密切相关( $P<0.05$ ), 提示nm23基因表达缺失的胃癌具有更强的侵袭能力, 更容易发生淋巴结转移。

在研究KAI 1蛋白与nm23-H<sub>1</sub>表达的关系中发现, 经统计学处理二者有密切相关关系, KAI 1阳性表达病例nm23-H<sub>1</sub>蛋白上调。本结果显示KAI 1在胃癌的临床分期、病期进展中具有重要作用。nm23-H<sub>1</sub>表达同样与胃癌组织类型密切相关, 提示KAI 1与nm23-H<sub>1</sub>可能通过不同作用机制影响胃癌的生长方式, 而KAI 1异常表达可进一步促进病期进展。由于例数少, 他们在胃癌进展中的作用尚需扩大样本量进行深入的研究。KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白均与胃癌侵袭转移有关, 且KAI 1表达与胃癌患者预后密切相关, 将两种指标联合检测, 可作为正确判断胃癌患者预后, 指导临床治疗的分子生物学指标。我们对KAI 1蛋白在胃癌组织中表达的研究, 加深了对胃癌转移机制的理解, 结果为深入理解细胞黏附异常及其调控因素在胃癌发生、发展中的作用提供了新的研究资料。通过对胃癌组织中KAI 1、nm23-H<sub>1</sub>蛋白表达的比较研究, 解释了KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>在胃癌组织中的表达与肿瘤进展的关系, 发现联合应用KAI 1和nm23-H<sub>1</sub>蛋白检测可用于预测胃癌患者预后, 指导临床治疗。

#### 4 参考文献

- Zhang CW, Zou SC, Shi D, Zhao DJ. Clinical significance of preoperative regional intra-arterial infusion chemotherapy for advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3070-3072
- Cheng LY, Zhong SZ, Huang ZH. Sentinel lymph node concept in gastric cancer with solitary lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3053-3055
- Zhang HK, Zhang QM, Zhao TH, Li YY, Yi YF. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3044-3047
- Wang KJ, Wang RT, Zhang JZ. Identification of tumor markers using two-dimensional electrophoresis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2179-2183
- Lu XG, Zhan LB, Feng BA, Qu MY, Yu LH, Xie JH. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2140-2144
- Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1984-1988
- Zhang QX, Ding Y, Li Z, Le XP, Zhang W, Sun L, Shi HR. Comparison of nuclear matrix proteins between gastric cancer and normal gastric tissue. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1819-1821
- Sun XD, Liu XE, Wu JM, Cai XJ, Mou YP, Li JD. Expression and significance of angiopoietin-2 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1382-1385
- Yang XF, Yang L, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Pathobiological behavior and molecular mechanism of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the stomach: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 750-754
- Zhang C, Liu ZK. Gene therapy for gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2390-2394
- Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 53-59
- Han CB, Li F, Zhao YJ, Ma JM, Wu DY, Zhang YK, Xin Y. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 1 2S rRNA-tRNA(phe) and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1925-1929
- Gao AC, Lou W, Dong JT, Barrett JC, Danielpour D, Isaacs JT. Defining regulatory elements in the human KAI1 (CD 82) metastasis suppressor gene. *Prostate* 2003; 57: 256-260
- Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ, Lu CH, Chiou LC. KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1393-1398
- Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, Hung MJ, Lu CH. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 159: 1629-1634
- Almgren MA, Henriksson KC, Fujimoto J, Chang CL. Nucleoside diphosphate kinase A/nm23-H1 promotes metastasis of NB69-derived human neuroblastoma. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 387-394
- Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 31-40
- Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR, Slegers H. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 465-476
- Wu DH, Liu L, Chen LH, Ding YQ. KAI1 gene expression in colonic carcinoma and its clinical significances. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2245-2249
- AmirthaLakshmi S, Pushparaj V, Krishnamurthy V, Biswas J, Krishnakumar S, Shanmugam MP. Tetraspanin protein KAI1 expression in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 593-595
- Su JS, Arima K, Hasegawa M, Franco OE, Umeda Y, Yanagawa M, Sugimura Y, Kawamura J. Decreased expression of KAI1 metastasis suppressor gene is a recurrence predictor in primary pTa and pT1 urothelial bladder carcinoma. *Int J Urol* 2004; 11: 74-82
- Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK. Expression of a splice

- variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* 2003; 63: 7247-7255
- 23 Wu Q, Ji Y, Zhang MQ, Chen YQ, Chen F, Shi DL, Zheng ZH, Huang YJ, Su WJ. Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 237-249
- 24 Jee B, Jin K, Hahn JH, Song HG, Lee H. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway. *Exp Mol Med* 2003; 35: 30-37

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

**本刊讯** 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

### 1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应证和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

### 2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4 000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编: 518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, Email: kewe1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, Email: ssshqhqq66@163.com。

### 3 其他

本次会议可授予国家级继续教育 I 类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。

# 核糖体蛋白 L5 在胃癌中的表达及功能

刘 骥, 李纪鹏, 陈冬利, 张洪伟, 王为忠

刘骥, 李纪鹏, 陈冬利, 张洪伟, 王为忠, 中国人民解放军第四军医大学  
西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710032

刘骥, 男, 1978-06-23生, 江苏省泗阳人, 汉族, 第四军医大学2003级普通  
外科学硕士, 医师, 主要从事胃癌的基础研究工作。

通讯作者: 王为忠, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西  
京医院胃肠外科. weichang@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375265

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-10-19

## Expression and functional study of ribosomal protein L5 in gastric cancer

Ji Liu, Ji-Peng Li, Dong-Li Chen, Hong-Wei Zhang,  
Wei-Zhong Wang

Ji Liu, Ji-Peng Li, Dong-Li Chen, Hong-Wei Zhang, Wei-Zhong  
Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital of the  
Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province,  
China

Correspondence to: Wei-Zhong Wang, Department of Gastrointesti-  
nal Surgery, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University,  
Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. weichang@fmmu.edu.cn

Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-10-19

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of ribosomal protein  
L15 (RPL5) in gastric cancer as well as its effect on the  
proliferation of gastric cancer cells.

**METHODS:** The expression of RPL5 was detected in  
gastric cancer cell lines AGS, MKN45, SGC7901 and  
MGC803 by Western blot. The specific siRNA vector of  
RPL5 was constructed and then transfected into AGS  
cells. The expression of RPL5 in the transfectants was  
examined by Western blot. The growth of transfected  
cells was evaluated by MTT assay and flow cytometry.

**RESULTS:** The expression of RPL5 in gastric cancer  
cell lines AGS, MKN45, SGC7901 and MGC803 were  
all significantly higher than that in GES-1 and normal  
epithelial cells of gastric mucosa. The specific siRNA  
vectors of RPL5, named U6-RPL5A and U6-RPL5B,  
were successfully constructed and transfected into AGS  
cells. U6-RPL5A could inhibit the expression of RPL5  
significantly. The growth rate of U6-RPL5A transfected  
cells, named AGS-U6-RPL5A, was lower than the  
control cells, and the percentage of the cells that was  
in proliferation phase was decreased by about 5%.

**CONCLUSION:** RPL5 can inhibit the proliferation of  
gastric cancer cells, and further investigation of RPL5  
function will be helpful in the diagnosis and treatment  
of gastric cancer.

**Key Words:** Ribosomal protein; gastric cancer; siRNA

Liu J, Li JP, Chen DL, Zhang HW, Wang WZ. Expression and  
functional study of ribosomal protein L5 in gastric cancer. Shijie  
Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(23):2731-2735

## 摘要

**目的:** 探讨核糖体蛋白L5(ribosomal protein L5, RPL5)  
在胃癌细胞中的表达及对胃癌细胞生长的影响。

**方法:** Western blot检测RPL5在胃癌细胞系中的表达,  
构建RPL5特异性siRNA载体, 转染细胞, Western blot进  
行鉴定, MTT方法和流式细胞术检测转染细胞的生长  
变化。

**结果:** RPL5在胃癌细胞系AGS、MKN45、SGC7901、  
MGC803中的表达均明显强于在GES-1和正常胃黏膜  
上皮中的表达。成功构建RPL5特异性siRNA载体U6-  
RPL5A和U6-RPL5B, 转染AGS细胞, 进行稳定筛选, 发  
现U6-RPL5A能显著抑制RPL5的表达, 其相应的细胞  
系AGS-U6-RPL5A的生长速度减慢。细胞周期检测结  
果显示AGS-U6-RPL5A细胞中处于增殖期的细胞减少  
了约5%。

**结论:** 对RPL5功能的进一步深入研究可能会有助于胃  
癌的诊断和治疗。

**关键词:** 核糖体蛋白; 胃癌; siRNA

刘骥, 李纪鹏, 陈冬利, 张洪伟, 王为忠. 核糖体蛋白L5在胃癌中的表达及功  
能. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2731-2735

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2731.asp>

## 0 引言

核糖体既是蛋白质生物合成的场所, 也是一个功能单  
位。核糖体蛋白(ribosomal protein, RP)除组成核糖体,  
参与蛋白质的合成之外, 还具有其他功能, 尤其近年来  
发现的许多核糖体的体外功能, 对重新认识和评估核  
糖体的作用具有重要的意义<sup>[1-5]</sup>。我们在前期的基因芯  
片的研究中发现, 核糖体蛋白RPL5在胃癌组织中的表



达明显高于癌旁组织,提示RPL5可能在胃癌的发生、发展中发挥作用。我们将在先前工作的基础上进一步探讨RPL5在胃癌中所起的作用和可能分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本和细胞株 正常胃黏膜组织的胃镜标本分别来源于2例胃镜下胃黏膜表现正常的患者,病理检查亦表明为正常胃黏膜上皮组织。标本取出后立即置于液氮中,后于-70℃保存。永生化正常胃上皮细胞系GES-1、胃癌细胞系AGS、MKN45、SGC7901、MGC803均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 mU6pro载体为美国密西根大学Turner教授惠赠。RPL5单克隆抗体和ECL试剂购自Santa Cruz公司,β-actin单克隆抗体、MTT和DMSO均购自Sigma公司。羊抗鼠二抗购自北京中山生物技术有限公司,NC膜购自Hybond公司。小量质粒抽提试剂盒为Promega公司产品,Lipofectamin 2000为Invitrogen公司产品,G418为Gibco公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒构建和细胞转染 以mU6pro为载体,根据siRNA设计原则设计两对RPL5特异性siRNA寡核苷酸。第一对正向寡核苷酸L1: 5'-tttgtgcatcatcatggagttaacataactccatgatg-atgcactttt-3',反向寡核苷酸L2: 5'-ctagaaaaagtgcatcatcattggagttatgttaactccatgatgatgca-3'。第二对正向寡核苷酸L3: 5'-tttgcaatgggtcttaattgtccacaggaacattaagaccattgctttt-3',反向寡核苷酸L4: 5'-ctagaaaaagcaatgggtcttaattgtcctgtggaacattaagaccattg-3'。正反向寡核苷酸体外退火,退火后的双链siRNA与用Bbs I和Xba I酶切后的mU6pro载体片段于16℃连接过夜。连接产物转化*E.coli* DH5α感受态细胞,挑取单克隆并且提取质粒,以Hind III和Xba I酶切鉴定重组质粒。收集酶切鉴定正确的重组质粒,送上海生工公司进行测序。采用Invitrogen公司Lipofectamin 2000并按其说明书方法进行。细胞转染时将AGS细胞接种于6孔板,待细胞生长融合达80%后进行细胞转染,每孔分别加入4 μL Lipofectamin 2000和2 μg质粒,因为对于mU6pro表达载体,由于其不含有筛选标签,稳定转染时同时共转染pcDNA3.1A。转染后2 d加G418进行抗性筛选,浓度为500 mg/L,筛选时间为6 wk。挑取10个克隆进行鉴定。

1.2.2 细胞生长曲线绘制 采用MTT法进行。取对数生长期细胞按每孔 $2 \times 10^3$ 接种于96孔板,分AGS、AGS-mU6pro和AGS-U6-RPL5A三组,每组3个复孔,置于细胞培养箱中常规培养。在第1, 3, 5, 7 d,每天每种细胞各取出3孔进行MTT计数,每孔加入20 μL MTT贮存液(5 g/L),继续培养4 h。将培养上清置换成200 μL

DMSO,ELISA仪读取吸光度,检测波长为490 nm。仅含培养液的孔作为空白对照,仅用DMSO处理组为阴性对照。

1.2.3 细胞周期测定 收获对数生长期的细胞,胰酶消化后用冷PBS洗涤2次,离心弃上清,加入0.5 mL的PBS混悬细胞,再加入1 mL无水乙醇固定,4℃过夜。离心弃上清,冷PBS洗涤2次,经碘化丙啶染色后,流式细胞仪进行细胞周期检测。重复三次,取一典型测定结果为代表。

1.2.4 Western blot 以80 μg蛋白为加样量进行SDS-PAGE电泳,然后转移至hybond-NC膜,以TTBS对膜进行漂洗,室温封闭2 h,加入一抗,4℃孵育过夜。TTBS洗膜,加入相应二抗室温孵育1 h,最后用ECL试剂进行蛋白条带显色。以β-actin作为内参照。利用BioRad公司的Quantity One软件进行条带的定量。

统计学处理 采用Student-Newman-Keuls检验进行数据差异分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

## 2 结果

2.1 RPL5在胃黏膜组织和胃癌细胞系中的表达 为了研究RPL5在胃癌的表达,我们以两例正常胃黏膜组织和人永生化正常细胞系GES-1作为对照,对胃癌细胞系AGS、MKN45、SGC7901、MGC803进行Western blot检测,比较RPL5的含量。在各细胞总蛋白上样量相同的条件下(β-actin条带的亮度基本相同),RPL5在肿瘤细胞系中高表达,在GES-1和两例正常胃黏膜上皮组织中的表达均较弱(图1)。用Quantity One软件定量分析的结果表明,RPL5在胃癌细胞系中的表达均强于GES-1和正常胃黏膜上皮。RPL5蛋白的分子量为23 ku。在进一步的实验中,我们选用了RPL5表达较高的AGS细胞作为研究对象。

2.2 RPL5特异性siRNA的构建及对细胞内RPL5的抑制作用 将退火后的两对寡核苷酸分别克隆入mU6pro载体,命名为U6-RPL5A和U6-RPL5B,用Hind III和Xba I双酶切鉴定,释放出大小为380 bp的片段(包括U6启动子和克隆入的寡核苷酸),表明载体构建成功(图2),测序结果也与预期一致。空载体对照mU6pro酶切释放出1 100 bp的片段(包括U6启动子和EGFP基因序列)。

将U6-RPL5A和U6-RPL5B分别以10:1的比例与pcDNA3.1A混和,共同转染AGS细胞,2 d后用500 mg/L的G418筛选,分别挑取10个单克隆,用Western blot鉴定RPL5的表达。U6-RPL5A和U6-RPL5B转染后阳性单克隆的鉴定结果显示,AGS-U6-RPL5A中RPL5的表达明显低于AGS-mU6pro的表达,而AGS-U6-RPL5B中RPL5的表达与AGS-mU6pro差异不明显(图3)。这一结果表明U6-RPL5A更能有效抑制RPL5的表达,且我们成功获得了RPL5低表达的细胞系。

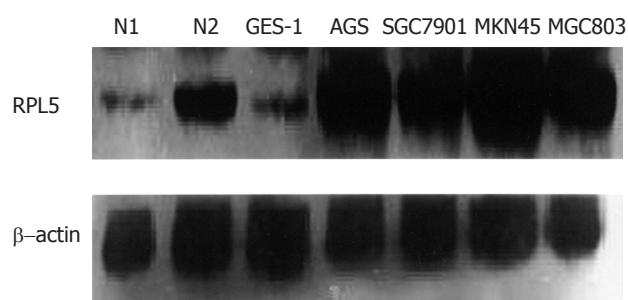


图 1 Western blot检测RPL5在胃黏膜组织和胃癌细胞系中的表达. N1: 胃黏膜组织1; N2: 胃黏膜组织2; GES-1: 永生化胃黏膜上皮细胞; AGS、SGC7901、MKN45以及MGC803: 胃癌细胞系.

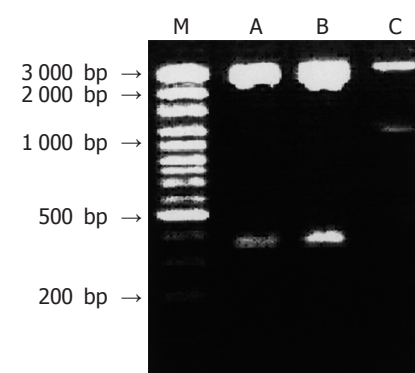


图 2 RPL5 siRNA载体的鉴定 (*Hind* III和*Xba* I酶切的电泳结果). M: DNA分子量标准; A: 构建的U6-RPL5A; B: U6-RPL5B; C: 载体及空载体mU6pro.

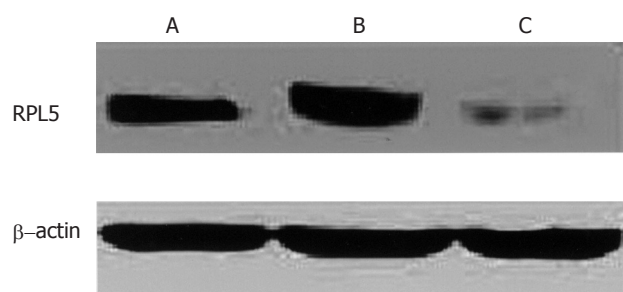


图 3 Western blot检测转染细胞中RPL5的表达. A: AGS-mU6pro; B: AGS-U6-RPL5B; C: AGS-U6-RPL5A.

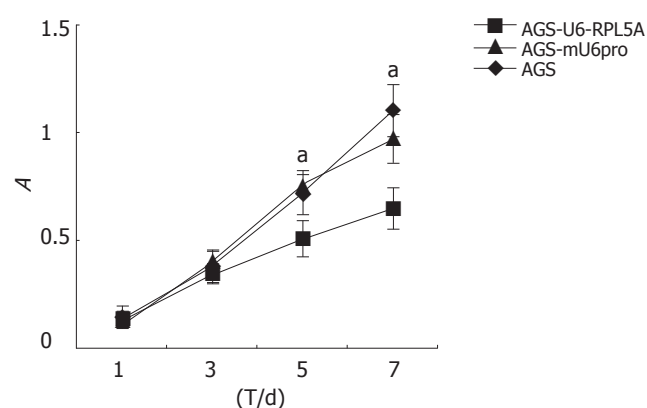


图 4 MTT法检测转染细胞的生长曲线. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , AGS-U6-RPL5A vs AGS-mU6pro, AGS.

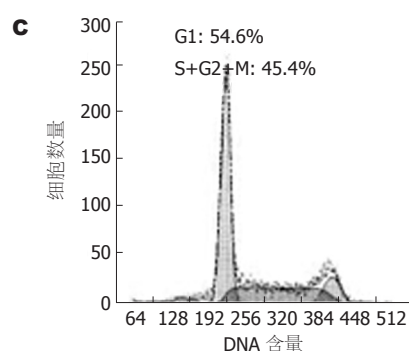
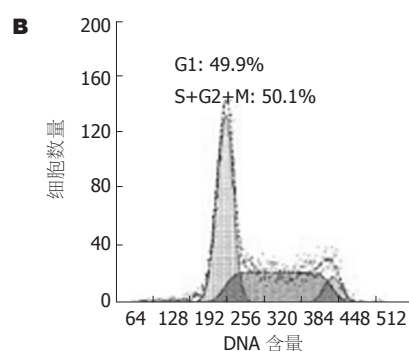
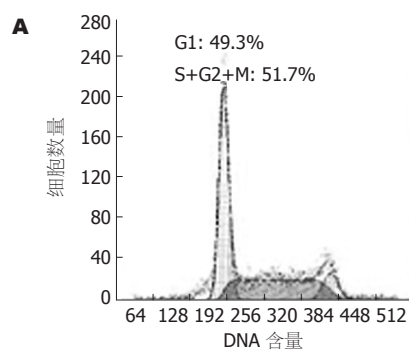


图 5 流式细胞术检测转染细胞的细胞周期分布. A: AGS; B: AGS-mU6pro; C: AGS-U6-RPL5A.

2.3 RPL5特异性siRNA对胃癌细胞的生长抑制作用  
我们用MTT方法检测了转染细胞的生长速度,发现RPL5的表达下调可使细胞的生长速度明显减慢,表现为AGS-U6-RPL5A细胞在第5, 7 d的吸光度值(A)均明显低于AGS和AGS-mU6pro( $P < 0.05$ , 图4). 进一步进行细胞周期的分析,结果表明AGS-U6-RPL5A处于S+G2+M增殖期的细胞数明显低于AGS和AGS-mU6pro,其比例约减少5%(图5).

### 3 讨论

翻译调节和核糖体组装是细胞内重要的生理过程,与细胞的生长和细胞周期进展密切相关. 这一生理过程在肿瘤细胞中常常出现异常,结果导致蛋白合成速率的增加,细胞生长速度和细胞周期进展加快. 核糖体蛋白的异常表达是肿瘤细胞翻译调节和核糖体组装异常的重要表现之一<sup>[6-11]</sup>.

核糖体蛋白与肿瘤的关系的直接证据来源于

Amsterdam *et al*<sup>[12]</sup>对斑马鱼的研究. 他们筛选产生了12种易发生肿瘤的斑马鱼, 发现其中有11种斑马鱼有不同核糖体蛋白的突变, 证实这些核糖体蛋白的突变导致了斑马鱼肿瘤的发生. 因而他们认为斑马鱼中的核糖体蛋白是肿瘤相关基因.

而在人类肿瘤中, Pogue-Geile *et al*<sup>[13,14]</sup>首先发现RPS3在大肠癌中的表达上调. 随后越来越多的研究表明, 人类核糖体蛋白的高表达与肿瘤密切相关<sup>[15-20]</sup>, 特别是近年来由于基因芯片和消减杂交技术等高通量技术的大量应用, 鉴定了多个在肿瘤中高表达的核糖体蛋白. 例如: 在化学致癌剂诱导的口腔癌中, RPS2的表达上调<sup>[21]</sup>; 在乳腺癌中, RPL7<sup>[22]</sup>、RPL19<sup>[23]</sup>和RPL8是高表达的; RPL19和RPS12<sup>[24]</sup>在头颈部肿瘤中的表达是升高的; RPS19在子宫平滑肌瘤和头颈部肿瘤<sup>[25]</sup>中的表达上调; RPL17a在大肠癌中的表达升高<sup>[26,27]</sup>. 另外, RPS2和RPL10a在多种肿瘤中也有较高表达<sup>[28]</sup>. Wang *et al*<sup>[29]</sup>在克隆了RPL15全长的基础上研究了RPL15在食道癌上的表达, 发现RPL15在食道癌中的表达是升高的. 而我们的先前的基因芯片的研究发现, RPL5在胃癌组织中的表达明显强于癌旁组织, 本研究进一步发现, RPL5在多株胃癌细胞系中的表达均明显强于胃黏膜上皮组织和永生化胃黏膜上皮细胞系GES-1, 表明RPL5很可能是胃癌细胞中一个上调的蛋白, 他可能在胃癌的诊断方面有一定的作用. 进一步的临床标本研究将有助于阐明RPL5在胃癌患者中的表达频率、强度以及分布.

Gardner-Thorpe *et al*<sup>[30]</sup>探讨了核糖体蛋白用于肿瘤治疗的可能, 他们将核糖体蛋白P2的反义核酸转染PaCa-2和BxPC-3细胞系, 结果发现核糖体蛋白P2的反义核酸能显著抑制肿瘤细胞系PaCa-2和BxPC-3生长, 其抑制率分别为63%和65%. 而我们的研究也表明, 用siRNA技术干预RPL5的表达可以显著抑制胃癌细胞系AGS的生长. 这两项类似的结果表明干预肿瘤细胞中核糖体蛋白的表达可能可以用于肿瘤的治疗. RPL5可能有希望成为胃癌治疗的一个新的靶分子. RPL5的siRNA抑制胃癌细胞生长的机制目前不清, 可能与胃癌细胞周期的阻滞或凋亡的诱导有关系, 尚需进一步的实验来探讨.

Amsterdam *et al*<sup>[12]</sup>发现斑马鱼中核糖体蛋白的突变与肿瘤的发生密切相关, 但是在人类中尚未发现肿瘤中有突变的核糖体蛋白存在, 因此, RPL5在胃癌中存在突变的可能性不大, 这一点还需要我们进一步用实验进行证实.

#### 4 参考文献

- Ogle JM, Carter AP, Ramakrishnan V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 259-266
- Rodnina MV, Daviter T, Gromadski K, Wintermeyer W. Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie* 2002; 84: 745-754
- Wahl MC, Moller W. Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3: 93-106
- Stoneley M, Willis AE. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 2004; 23: 3200-3207
- Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 2002; 108: 557-572
- Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 3138-3144
- Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 179-192
- Holland EC. Regulation of translation and cancer. *Cell Cycle* 2004; 3: 452-455
- Berven LA, Crouch MF. Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 447-451
- Kowalczyk P, Woszczynski M, Ostrowski J. Increased expression of ribosomal protein S2 in liver tumors, posthepactomized livers, and proliferating hepatocytes *in vitro*. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 615-624
- Woo MS, Ohta Y, Rabinovitz I, Stossel TP, Blenis J. Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 3025-3035
- Amsterdam A, Sadler KC, Lai K, Farrington S, Bronson RT, Lees JA, Hopkins N. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* 2004; 2: E139
- Pogue-Geile K, Geiser JR, Shu M, Miller C, Wool IG, Meisler AI, Pipas JM. Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 3842-3849
- Pipas JM, Pogue-Geile K, Finley GG, Cartwright CA, Meisler AI. Gene structure and expression in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 1993; 330: 67-75
- Barnard GF, Staniunas RJ, Bao S, Mafune K, Steele GD Jr, Gollan JL, Chen LB. Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 3067-3072
- Zhou J, Callapina M, Goodall GJ, Brune B. Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* 2004; 64: 9041-9048
- Chiao PJ, Shin DM, Sacks PG, Hong WK, Tainsky MA. Elevated expression of the ribosomal protein S2 gene in human tumors. *Mol Carcinog* 1992; 5: 219-231
- Denis MG, Chadeneau C, Lecabellec MT, LeMoullac B, LeMevel B, Meflah K, Lustenberger P. Over-expression of the S13 ribosomal protein in actively growing cells. *Int J Cancer* 1993; 55: 275-280
- Ropolo M, Geroldi A, Rossi O, Degan P, Zupo S, Poggi A, Frosina G. Expression of the *Drosophila melanogaster* S3 ribosomal/repair protein in T24 human bladder cells. *Anticancer Res* 2004; 24: 3811-3818
- Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF Jr, Weber MJ, Lannigan DA. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 3108-3116
- Shin DM, Chiao PJ, Sacks PG, Shin HJ, Hong WK, Hittelman WN, Tainsky MA. Activation of ribosomal protein S2 gene expression in a hamster model of chemically induced oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 163-166
- Zhu Y, Lin H, Li Z, Wang M, Luo J. Modulation of expression of ribosomal protein L7a (rpL7a) by ethanol in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 69: 29-38
- Henry JL, Coggin DL, King CR. High-level expression of the



- ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2. *Cancer Res* 1993; 53: 1403-1408
- 24 Cheng Q, Lau WM, Chew SH, Ho TH, Tay SK, Hui KM. Identification of molecular markers for the early detection of human squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer* 2002; 86: 274-281
- 25 Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 3045-3050
- 26 Wang Y, Cheong D, Chan S, Hooi SC. Ribosomal protein L7a gene is up-regulated but not fused to the tyrosine kinase receptor as chimeric trk oncogene in human colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 16: 757-762
- 27 Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA, Nakayama J. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 567-574
- 28 Koga M, Shichijo S, Yamada A, Ashihara J, Sawamizu H, Kusukawa J, Itoh K. Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens* 2003; 61: 136-145
- 29 Wang Q, Yang C, Zhou J, Wang X, Wu M, Liu Z. Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. *Gene* 2001; 263: 205-209
- 30 Gardner-Thorpe J, Ito H, Ashley SW, Whang EE. Ribosomal protein P2: a potential molecular target for antisense therapy of human malignancies. *Anticancer Res* 2003; 23: 4549-4560

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 首届北京地坛感染病学术会议

**本刊讯** 为庆祝建院60周年, 北京地坛医院决定于2006-03-02/04在北京召开全国性的“首届北京地坛感染病学术会议”, 预计全国的同行500人参加这次重要的会议。会议邀请了40余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演。

### 1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病, 抗生素的合理使用, 也包括新发/复燃的传染病。论文全文和摘要请发到电子信箱: [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn); 或[hy@genetherapy.com.cn](mailto:hy@genetherapy.com.cn)。

### 2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有: 白雪帆, 陈智, 陈志海, 成军, 段钟平, 窦晓光, 范小玲, 高志良, 郭利民, 侯金林, 贾继东, 郎振为, 李长青, 李兰娟, 李太生, 李兴旺, 刘沛, 刘庄, 伦文辉, 毛羽, 缪晓辉, 穆毅, 宁琴, 牛俊奇, 任红, 施光峰, 斯崇文, 谭德明, 唐红, 唐小平, 万谟彬, 王风水, 王福生, 王贵强, 王磊, 王玲, 王宇明, 王宪波, 魏红山, 魏来, 翁心华, 谢青, 谢雯, 谢尧, 邢卉春, 徐道振, 杨东亮, 杨钧, 袁正宏, 赵红心, 庄辉。

### 3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授。地址: 北京市东城区安外大街地坛公园13号; 邮编: 100011; 电话: 010-64481639; 传真: 010-64481639; Email: [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)。

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会。

# 载脂蛋白 B 基因多态性及血脂水平与慢性丙型肝炎的相关性

李雁, 刘正稳, 韩群英, 李晗

李雁, 刘正稳, 韩群英, 李晗, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科  
陕西省西安市 710061

李雁, 女, 1980-01-30生, 陕西省西安市人, 汉族, 2003年西安交通大学医学院临床医学专业本科毕业, 同年入母校攻读传染病学硕士学位, 主要从事病毒性传染病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30170842

通讯作者: 刘正稳, 710061, 陕西省西安市健康路1号, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科。Liuzhengwen@medmail.com.cn

电话: 029-85324066 传真: 029-85226360

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-26

## Correlations of chronic hepatitis C virus infection with *Xba* I polymorphism of apolipoprotein B gene and serum lipid metabolism

Yan Li, Zheng-Wen Liu, Qun-Ying Han, Han Li

Yan Li, Zheng-Wen Liu, Qun-Ying Han, Han Li, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30170842

Correspondence to: Dr. Zheng-Wen Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, 1 Jiankang Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. Liuzhengwen@medmail.com.cn

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-26

### Abstract

**AIM:** To investigate the *Xba* I locus polymorphisms of apolipoprotein B (Apo B) gene and their internal correlations with chronic hepatitis C virus infection and serum lipid metabolism.

**METHODS:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to analyze the genotype of the Apo B gene in 77 patients and 62 controls, according to the design of case control study. Meanwhile, the blood samples were analyzed for hepatic function and serum lipid by automatic biochemistry analyzer.

**RESULTS:** The frequencies of  $X^+X^-$  and  $X^-X^-$  of *Xba* I locus polymorphism were different between the patients and the controls and the frequency of  $X^+$  allele in the patients was lower than that in the controls (0.071 vs 0.121,  $P = 0.136$ ), but no statistical significance was found. The frequency of  $X^+$  allele in patients with HCV

RNA  $\geq 80\ 000$  copies/L was significantly lower than that with HCV RNA  $< 80\ 000$  copies/L (0.048 vs 0.179,  $P = 0.035$ ). Furthermore, the levels of Apo B in the patients of  $X^+X^-$  genotype were significantly higher than those in the patients of  $X^-X^-$  genotype ( $P = 0.019$ ). The serum levels of low density lipoprotein (LDL) and Apo B were negatively correlated with serum HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C ( $r = -0.460$ ,  $P = 0.016$ ;  $r = -0.538$ ,  $P = 0.005$ , respectively), and the correlation with serum alanine aminotransferase (ALT) levels was not found.

**CONCLUSION:** The *Xba* I locus polymorphism of Apo B gene is not correlated with susceptibility of Chinese people to HCV, but it may affect the HCV viral load in patients with chronic hepatitis C. The variation of  $X^+$  allele may affect serum Apo B levels in patients with chronic HCV infection. The serum levels of LDL and Apo B are closely correlated with serum HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C.

**Key Words:** Chronic hepatitis C; Apolipoprotein B gene; Polymorphism; Serum lipid

Li Y, Liu ZW, Han QY, Li H. Correlations of chronic hepatitis C virus infection with *Xba* I polymorphism of apolipoprotein B gene and serum lipid metabolism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2736-2741

### 摘要

**目的:** 探讨载脂蛋白B(Apo B)基因*Xba* I位点多态性和血脂水平与慢性丙型肝炎之间的关系。

**方法:** 通过病例对照研究设计, 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术观察77例慢性丙型肝炎患者和62例健康对照者的Apo B基因*Xba* I位点的多态性, 采用全自动生化分析仪进行肝功能、血脂水平的分析比较。

**结果:** 慢性丙型肝炎组和对照组Apo B基因*Xba* I位点 $X^+X^-$ ,  $X^-X^-$ 基因型构成不等, 慢性丙型肝炎组 $X^+$ 等位基因频率低于对照组(0.071 vs 0.121,  $P = 0.136$ ), 且病例组中肝硬化组 $X^+$ 等位基因频率低于慢性肝炎组, 但未显示统计学的显著差异。病例组中不同病毒载量组间

Apo B基因Xba I位点基因型分布存在显著差异, HCV RNA  $\geq 80\ 000$  copies/L组X<sup>+</sup>等位基因频率低于HCV RNA  $< 80\ 000$  copies/L组(0.048 vs 0.179,  $P = 0.035$ ). 病例组中X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>基因型的血清胆固醇(CHO)水平、低密度脂蛋白(LDL)水平及Apo B水平均高于X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>组, 而且Apo B水平的差异具统计学显著性( $P = 0.019$ ); 血清高密度脂蛋白(HDL)水平低于X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>组, 但无统计学差异. 慢性丙型肝炎患者血清Apo B水平和LDL水平与血清HCV RNA水平之间均呈直线负相关关系(分别为 $r = -0.538$ ,  $P = 0.005$ ;  $r = -0.460$ ,  $P = 0.016$ ), 但与谷丙转氨酶(ALT)水平无相关性.

**结论:** Apo B基因Xba I位点的多态性与我国人群对HCV的易感性没有直接联系, 但与慢性丙型肝炎患者的病毒载量有关. X<sup>+</sup>等位基因频率可影响慢性丙型肝炎患者Apo B水平. 慢性丙型肝炎患者血清LDL水平和Apo B水平与血清HCV RNA水平显著相关.

**关键词:** 慢性丙型肝炎; 载脂蛋白B基因; 多态性; 血脂

李雁, 刘正稳, 韩群英, 李晗. 载脂蛋白B基因多态性及血脂水平与慢性丙型肝炎的相关性. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2736-2741  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2736.asp>

## 0 引言

丙型肝炎是丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种常见传染病. 我国目前一般人群的感染率达3.2%, 是丙型肝炎的高流行区<sup>[1]</sup>. HCV感染不仅可引起急、慢性肝炎, 而且与肝纤维化和肝细胞癌的发生及发展密切相关<sup>[2]</sup>, 严重危害人民的生命健康. 近年来发现HCV感染与脂蛋白转运系统有密切的联系<sup>[3,5,10,12]</sup>. 大量研究证实低密度脂蛋白受体(LDL-R)可能是HCV感染靶细胞的重要受体分子<sup>[11-14]</sup>. 载脂蛋白B既是低密度脂蛋白(LDL)的主要载脂蛋白, 又是细胞表面LDL-R的配体, 因此在HCV感染肝细胞的过程中扮演着重要的角色<sup>[4,6,17,18]</sup>. 单采浆血浆分离置换法被认为是安全清除载脂蛋白B的一种快速而有效的方法, 国外一些研究<sup>[19-21]</sup>发现, 此法能有效降低HCV患者体内的病毒负荷. 目前, 载脂蛋白B基因结构已充分阐明, 研究证实其具有多个多态性位点, 有些位点的多态性与血脂变化及LDL受体结合相关, Xba I位点就是其中具代表性的一个<sup>[22-24]</sup>, 一些研究证实其与冠心病、胆结石病的易感性有关<sup>[27-30]</sup>, 但其与慢性丙型肝炎的关系尚未见报道. 我们采用病例对照研究设计, 应用聚合酶链式反应(PCR)和限制性片段长度多态性(RFLP)技术, 探索载脂蛋白B基因Xba I位点多态性及血脂成分与慢性丙型肝炎之间的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者77例, 来自2002-10/2004-04

在西安交通大学第一医院就诊的患者, 其中男性46例, 女性31例, 平均年龄 $43.6 \pm 14.1$ 岁. 所有患者均排除合并有肾功能损害者以及合并其他慢性肝脏疾病(甲型、乙型、戊型病毒性肝炎, 药物性肝炎, 酒精性肝炎, 自身免疫性肝炎, Wilson's病)和可引起脂代谢性紊乱的其他疾病(包括糖尿病, 获得性免疫缺陷综合征及甲状腺功能亢进). 按照2000年病毒性肝炎防治方案的临床分类和诊断标准, 慢性丙型肝炎65例, HCV相关肝硬化12例. 健康对照者62例, 来自西安市健康献血员及本院健康工作人员, 其中男性37例, 女性25例, 平均年龄 $40.0 \pm 9.8$ 岁.

研究对象均为中国汉族人, 且均为随机选择, 无血缘关系. 经统计学分析, 病例组与对照组性别、年龄均无显著性差异.

### 1.2 方法

1.2.1 基因组DNA抽提 采用美国Geture公司生产、深圳晶美试剂公司提供的人全血DNA提取试剂盒.

1.2.2 基因多态性检测 均采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析. 按文献[31]的报道由上海宝信生物公司合成引物, 其上游引物序列为5'-GGAGACTATTTCAGAAGCTAA-3', 下游引物序列为5'-GAAGAGCCTGAAGACTGACT-3'. 预计扩增片段全长为710 bp. 扩增条件: 95 °C预变性3 min后进入下述循环周期: 95 °C变性30 s, 56.5 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s. 35个循环后72 °C保温7 min结束反应. 以20 g/L的琼脂糖凝胶(含0.5 g/L溴乙锭)水平电泳检测PCR产物. 扩增产物为Apo B基因第26外显子包含Xba I酶切位点的多态性片段, 长度为710 bp. 取PCR扩增产物15  $\mu$ L加入Xba I酶(立陶宛MBI公司生产、深圳晶美试剂公司提供)15 U, 37 °C消化过夜后, 以20 g/L的琼脂糖凝胶(含0.5 g/L溴乙锭)120 V稳压电压分离酶切产物40 min, 以DL2000 Marker为标准分子量, 在紫外灯下检视各区带并分析结果. 仅出现一条710 bp片段为X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>基因型; 出现433 bp和277 bp两条片段为X<sup>+</sup>X<sup>+</sup>基因型; 出现710 bp、433 bp和277 bp三条片段为X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>基因型.

1.2.3 肝功及血脂成分的测定 肝功能、血脂用全自动生物化学分析仪(日本日立株式会社, 7170A)检测. 检查项目有谷丙转氨酶(ALT), 胆固醇(CHO), 高密度脂蛋白(HDL), 低密度脂蛋白(LDL), 载脂蛋白B(Apo B).

1.2.4 血清HCV RNA水平的检测 采用深圳达安基因有限公司提供的定量试剂盒及实时定量PCR扩增仪检测血清HCV RNA水平.

**统计学处理** 用SPSS11.0统计学软件分析处理. 计量资料用(mean  $\pm$  SD)表示, 采用 $t$ 检验; 计数资料用 $\chi^2$ 检验.



## 2 结果

**2.1 PCR-RFLP结果分析** PCR扩增产物全长710 bp, 与预计长度相符. 将酶切产物进行限制性片段长度多态性分析, 结果显示有两种带型: 仅出现一条710 bp片段为X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>基因型; 出现710 bp、433 bp和277 bp三条片段为X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>基因型(图1, 2).

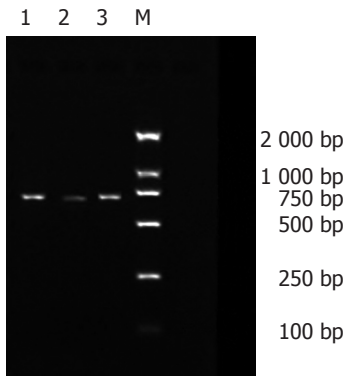


图1 酶切前电泳图. 1, 2, 3: 全长710 bp的PCR扩增产物; M: 标准分子量.

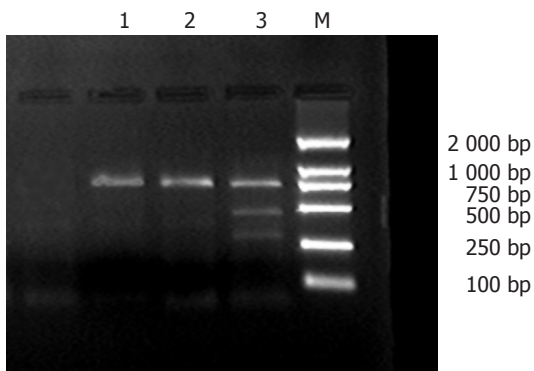


图2 酶切后电泳图. 1, 2: X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>型, 仅为一条710 bp片段; 3: X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>型, 出现710 bp, 433 bp, 277 bp三条片段; M: 标准分子量.

### 2.2 病例组和对照组基因型分布及基因频率的比较

表2 病例组各亚组与对照组基因型分布及基因频率的比较

	<i>n</i>	X <sup>-</sup> X <sup>-</sup> (%)	X <sup>+</sup> X <sup>-</sup> (%)	X <sup>+</sup> X <sup>+</sup> (%)	X <sup>+</sup> (%)	X <sup>-</sup> (%)
慢性肝炎组	65	55 (84.6)	10 (15.4)	0 (0)	7.7	92.3
肝硬化组	12	11 (91.7)	1 (8.3)	0 (0)	4.2	95.8
对照组	62	47 (75.8)	15 (24.2)	0 (0)	12.1	87.9

$\chi^2 = 2.548, P = 0.280$ .

表3 病例组中各种基因型间血脂水平比较 (mean  $\pm$  SD)

	<i>n</i>	CHO (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	APO B (mg/L)
X <sup>-</sup> X <sup>-</sup>	30	4.30 $\pm$ 1.02	1.10 $\pm$ 0.38	1.83 $\pm$ 0.62	0.55 $\pm$ 0.23
X <sup>+</sup> X <sup>-</sup>	3	4.40 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.90 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	0.89 $\pm$ 0.23 <sup>d</sup>
X <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	0	—	—	—	—

<sup>a</sup> $P = 0.850$ , <sup>b</sup> $P = 0.540$ , <sup>c</sup> $P = 0.622$ , <sup>d</sup> $P = 0.019$  vs X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>组.

表1 病例组与对照组基因型分布及基因频率的比较

	<i>n</i>	X <sup>-</sup> X <sup>-</sup> (%)	X <sup>+</sup> X <sup>-</sup> (%)	X <sup>+</sup> X <sup>+</sup> (%)	X <sup>+</sup> (%)	X <sup>-</sup> (%)
病例组	77	66 (85.7)	11 (14.3)	0 (0)	7.1%	92.9%
对照组	62	47 (75.8)	15 (24.2)	0 (0)	12.1%	87.9%

两组基因型比较  $\chi^2 = 2.217, P = 0.136$ .

国汉族人(包括病例及对照)基因型均以X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>基因型占优势, X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>杂合子少见, 未见X<sup>+</sup>X<sup>+</sup>基因型. 少见的等位基因X<sup>+</sup>频率在病例组低于对照组, 分别为0.071, 0.121, 但经 $\chi^2$ 检验无统计学显著性( $P = 0.136$ , 表1).

**2.3 病例组各亚组与对照组基因型分布及基因频率的比较** 慢性肝炎组的等位基因X<sup>+</sup>频率明显低于健康对照组, 以肝硬化组为最明显, 但经 $\chi^2$ 检验无显著性( $P = 0.280$ , 表2).

**2.4 病例组中各基因型间血脂水平比较** 对病例组X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>和X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>基因型间的血脂水平进行比较, X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>组的CHO, LDL, APO B水平均高于X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>组, 经 $t$ 检验仅Apo B有统计学意义( $P = 0.019$ ); X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>组的HDL水平低于X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>组, 但无统计学显著性(表3).

**2.5 Apo B基因Xba I酶切位点基因型与慢性丙型肝炎患者病毒载量的相关性** 按照血清中HCV RNA的水平, 以HCV RNA  $< 80\,000$  copies/L为阴性, 将慢性丙型肝炎患者分为HCV RNA阳性组和HCV RNA阴性组, 比较两组间基因型分布的差异性. 连续性校正 $\chi^2$ 检验显示, 两组之间差异显著(表4).

**2.6 慢性丙型肝炎患者血清Apo B水平与血清HCV RNA水平和ALT水平相关性** 相关性分析显示, 慢性丙型肝炎患者血清Apo B水平与血清HCV RNA水平之间呈直线负相关关系( $R = -0.538, P = 0.005$ ), 但与ALT水平无相关性( $R = 0.224, P = 0.210$ ).

**2.7 慢性丙型肝炎患者血清LDL水平与血清HCV RNA**

表4 Apo B 基因Xba I酶切位点基因型与慢性丙型肝炎患者病毒载量的相关性

	<i>n</i>	X <sup>-</sup> X <sup>-</sup>	X <sup>+</sup> X <sup>-</sup>	X <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	X <sup>+</sup> (%)	X <sup>-</sup> (%)
病例组	77	66	11	0	7.1	92.9
HCV RNA < 80 000 copies/L组	14	9	5	0	17.9	82.1
HCV RNA ≥ 80 000 copies/L组	63	57	6	0	4.8	95.2

$\chi^2 = 4.456, P = 0.035$ .

水平和ALT水平相关性 相关性分析显示, 慢性丙型肝炎患者血清LDL水平与血清HCV RNA水平之间呈直线负相关关系( $R = -0.460, P = 0.016$ ), 但与ALT水平无相关性( $R = -0.007, P = 0.968$ ).

### 3 讨论

HCV感染具有宿主特异性, 对其体外研究造成了很大障碍, 其致病机制尚不清楚. 目前认为, 阻断HCV感染靶细胞的关键问题是搞清楚宿主细胞表面的HCV受体或辅助受体. 近年来在对感染细胞和机体的大量研究<sup>[12,15,16]</sup>证实, LDL-R即使不是唯一的, 也是重要的HCV感染靶细胞的受体分子, 并且HCV内化过程是由HCV-LDL/HCV-VLDL复合物通过LDL-R进行的.

载脂蛋白B100 既是LDL的主要载脂蛋白, 又是细胞表面LDL-R的专一性配体, 许多研究均证实它与HCV感染密切相关. 在丙型肝炎患者的血清中, HCV可与LDL或VLDL相结合而存在<sup>[6-9]</sup>, 而且用抗Apo B抗体可以从感染血清中沉淀出HCV<sup>[4]</sup>. Andre *et al*<sup>[6]</sup>证实纯化的HCV病毒颗粒富含甘油三酯, 且至少含有Apo B, HCV RNA和核心蛋白三种成分; 进一步研究发现抗Apo B抗体和抗Apo E抗体可以阻断病毒颗粒进入细胞, 反之上调LDL-R可以促进病毒颗粒的细胞内化作用. Petit *et al*<sup>[18]</sup>报道HCV感染者血清Apo B水平显著低于正常人, 而且Apo B水平与肝脏脂肪变性和HCV病毒载量呈现负相关关系. 这些研究充分证明, 载脂蛋白B是HCV感染靶细胞所依赖的重要的内源性蛋白质之一.

载脂蛋白B100基因结构现已充分阐明, 人类Apo B100基因定位于第二号染色体短臂末端, 全长43 kb, 包含29个外显子和28个内含子. 在已知的基因中, Apo B100基因具有最明显的多态性. 某些位点的多态性与血脂变化及LDL受体结合相关, Xba I位点就是研究较多的一个. Xba I酶切位点的多态性是由于2 488位密码子第三个碱基突变(ACC→ACT), 产生一个Xba I酶切位点, 但并未改变所编码的氨基酸序列. 以往的研究虽然对Xba I位点的多态性是否是缺血性心脏病或冠心病的易感因素存在争议<sup>[25,26,32,33]</sup>, 却一致认为Xba I酶切位点多态性可明显影响血脂水平<sup>[24-29]</sup>. 纯合子X<sup>+</sup>X<sup>+</sup>基因型血浆中TC、LDL、Apo B100水平最高, 杂合子X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>

次之, 纯合子X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>最低<sup>[25,28,29,33]</sup>. 体外动力学研究发现, X<sup>+</sup>X<sup>+</sup>基因型的LDL与其受体结合力及经受体介导的清除率均低于具X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>基因型的LDL<sup>[22]</sup>.

本研究结果显示, 中国汉族人(包括病例及对照)Apo B基因型均以X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>基因型占优势, X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>杂合子少见, 未见X<sup>+</sup>X<sup>+</sup>基因型; 对照组X<sup>+</sup>等位基因频率略高于以往国内文献报道<sup>[23,29]</sup>, 明显低于白种人<sup>[26,33]</sup>, 提示X<sup>+</sup>等位基因的频率存在明显的种族特异性. 本研究发现, 丙型肝炎患者的X<sup>+</sup>等位基因频率低于健康对照组, 以肝硬化组为著, 但无统计学意义, 其原因可能是: (1)该位点的多态性与人群对HCV的易感性没有必然的联系; (2)与统计样本量相对较少有关. 在不同病毒载量的慢性丙肝患者组之间, Apo B基因Xba I位点基因型分布存在显著差异. HCV RNA ≥ 80 000 copies/L组X<sup>+</sup>等位基因频率低于HCV RNA < 80 000 copies/L组, 提示由于杂合子X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>基因型的LDL与其受体结合力及经受体介导的清除率均低于纯合子X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>基因型, 可能影响了HCV感染靶细胞的效率, 因而导致其血清中病毒血症水平较低. 我们比较了病例组各种基因型间的血脂水平, 发现X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>组的CHO, LDL, APO B水平均高于X<sup>-</sup>X<sup>-</sup>组, 仅APO B有统计学意义( $P = 0.019$ ). 这一结果与以往的国内外研究结果相符<sup>[25,28,29,33]</sup>. 虽然Xba I位点的变异并未改变所编码的氨基酸序列, 但可通过减弱LDL与其受体的结合, 降低LDL的分解代谢率而使血浆CHO, LDL, APO B水平升高.

我们还发现, 慢性丙型肝炎患者血清Apo B水平、血清LDL水平与血清HCV RNA水平之间均呈显著负相关关系. 这与相关文献报道<sup>[17,18]</sup>一致, 其机制可能为血清中Apo B、LDL通过与LDL-R的结合而竞争性的抑制了HCV病毒颗粒的细胞内化作用, 因而随着血清Apo B水平、血清LDL水平的升高而血清病毒载量趋于下降. 本研究中我们未发现血清Apo B水平、血清LDL水平与ALT水平的相关性, 其原因可能是: (1)转氨酶的影响因素较多; (2)血清Apo B水平、血清LDL水平对病毒载量的影响远远超过其对肝损伤的影响, 而肝脏的损伤程度还与宿主的免疫反应密切相关, 二者之间并不是平行发展的.

总之, 我们观察到Apo B基因Xba I位点的多态性、血清Apo B水平、血清LDL水平均可显著影响慢性丙

型肝炎患者的血清HCV RNA水平. 尚需扩大样本量进行证实及更深入的研究. 如载脂蛋白B的基因多态性和丙型肝炎临床病程、预后有无关系? 载脂蛋白B仅仅是作为HCV的运输和结构蛋白存在而影响血清HCV水平, 还是有其他的影响机制? 单采浆血浆分离置换法降低丙型肝炎患者病毒负荷的机制是什么? 弄清这些关系, 不仅对我们认识HCV与其受体作用的机制有重要意义, 而且有助于探索治疗HCV感染的新方法.

#### 4 参考文献

- 1 王豪. 丙型肝炎的流行病学与预防. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 366-367
- 2 Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003; 13: 57-68
- 3 张妮, 刘正稳. 瘦素及其与肝脏脂肪变性和慢性丙型肝炎的关系. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2003; 23: 185-187
- 4 Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181: 293-300
- 5 Thmssen R, Bonk S, Thiele A. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol* 1993; 182: 329-334
- 6 Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002; 76: 6919-6928
- 7 Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* 1996; 3: 11-17
- 8 Thomssen R, Bonk S. Virolytic action of lipoprotein lipase on hepatitis C virus in human sera. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191: 17-24
- 9 Kono Y, Hayashida K, Tanaka H, Ishibashi H, Harada M. High-density lipoprotein binding rate differs greatly between genotypes 1b and 2a/2b of hepatitis C virus. *J Med Virol* 2003; 70: 42-48
- 10 Polgreen PM, Fultz SL, Justice AC, Wagner JH, Diekema DJ, Rabeneck L, Weissman S, Stapleton JT. Association of hypocholesterolaemia with hepatitis C virus infection in HIV-infected people. *HIV Med* 2004; 5: 144-150
- 11 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 U S A* 1999; 96: 12766-12771
- 12 Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999; 57: 223-229
- 13 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
- 14 Monazahian M, Kippenberger S, Muller A, Seitz H, Bohme I, Grethe S, Thomssen R. Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus. *Med Microbiol Immunol* 2000; 188: 177-184
- 15 Meyer K, Basu A, Ray R. Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology* 2000; 276: 214-226
- 16 Lambot M, Fretier S, Op De Beeck A, Quatannens B, Lestavel S, Clavey V, Dubuisson J. Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *J Biol Chem* 2002; 277: 20625-20630
- 17 Enjoji M, Nakamuta M, Kinukawa N, Sugimoto R, Noguchi K, Tsuruta S, Iwao M, Kotoh K, Iwamoto H, Nawata H. Beta-lipoproteins influence the serum level of hepatitis C virus. *Med Sci Monit* 2000; 6: 841-844
- 18 Petit JM, Benichou M, Duvillard L, Jooste V, Bour JB, Minello A, Verges B, Brun JM, Gamber P, Hillon P. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1150-1154
- 19 Marson P, Boschetto R, De Silvestro G, Martini S, Gabelli C, Buoro S, Giordano R, Palu G. Changes in HCV viremia following LDL apheresis in a HCV positive patient with familial hypercholesterolemia. *Int J Artif Organs* 1999; 22: 640-644
- 20 Schettler V, Monazahian M, Wieland E, Ramadori G, Grunewald RW, Thomssen R, Muller GA. Reduction of hepatitis C virus load by H.E.L.P.LDL apheresis. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 154-155
- 21 Schettler V, Monazahian M, Wieland E, Thomssen R, Muller GA. Effect of heparin-induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation (HELP) apheresis on hepatitis C plasma virus load. *Ther Apher* 2001; 5: 384-386
- 22 Series J, Cameron I, Caslake M, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J. The Xba1 polymorphism of the apolipoprotein B gene influences the degradation of low density lipoprotein *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1003: 183-188
- 23 王绿娅, 顾云, 吴桂贤, 王薇, 刘静, 潘晓冬, 吴兆苏. 北京健康人群载脂蛋白B基因多态性及对血脂水平的影响. 中国病理生理杂志 1997; 13: 487-492
- 24 Tahri-Daizadeh N, Tregouet DA, Nicaud V, Poirier O, Cambien F, Tiret L. Exploration of multilocus effects in a highly polymorphic gene, the apolipoprotein (APOB) gene, in relation to plasma apoB levels. *Ann Hum Genet* 2004; 68: 405-418
- 25 Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Tybjaerg-Hansen A. Polymorphism in APOB associated with increased low-density lipoprotein levels in both genders in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5797-5803
- 26 Turner PR, Talmud PJ, Visvikis S, Ehnholm C, Tiret L. DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 221-234
- 27 Peacock R, Dunning A, Hamsten A, Tornvall P, Humphries S, Talmud P. Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: a study of young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. *Atherosclerosis* 1992; 92: 151-164
- 28 Han T, Jiang Z, Suo G, Zhang S. Apolipoprotein B-100 gene Xba I polymorphism and cholesterol gallstone disease. *Clin Genet* 2000; 57: 304-308
- 29 Tan YF, Yang S, Yu RB, Shen C, Ding WL, Zhou WM, Gong WD, Yao CL. Relationship among the XhaI and EcoRI locus polymorphisms of apolipoprotein B gene, serum lipid metabolism and gallstone disease. *Zhonghua YiXue ZaZhi* 2003; 83: 844-847
- 30 Singh MK, Pandey UB, Ghoshal UC, Srivenu I, Kapoor VK, Choudhuri G, Mittal B. Apolipoprotein B-100 XbaI gene polymorphism in gallbladder cancer. *Hum Genet* 2004; 114: 280-283
- 31 Boerwinkle E, Lee SS, Butler R, Schumaker VN, Chan L. Rapid typing of apolipoprotein B DNA polymorphisms by DNA amplification. Association between Ag epitopes of human apolipoprotein B-100, a signal peptide insertion/deletion polymorphism, and a 3' flanking DNA variable number of tandem repeats polymorphism of the apolipoprotein B gene. *Atherosclerosis* 1990; 81: 225-232
- 32 Scartezini M, Zago MA, Chautard-Freire-Maia EA, Pazin-Filho A, Marin-Neto JA, Hotta JK, Nascimento AJ, Dos-Santos JE. The X-X-/E+E+ genotype of the XbaI/EcoRI polymorphisms



- of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 369-375
- 33 Islam MS, Raitakari OT, Juonala M, Kahonen M, Hutri-Kahonen N, Collings A, Aalto-Setälä K, Kontula K, Marniemi

J, Viikari JS, Lehtimäki T. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV SstI and apolipoprotein B XbaI polymorphisms and their association with carotid artery intima-media thickness in the Finnish population. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* 2005; 180: 79-86

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于2003-04-15开通。WJG包括: 1995-2005年第1-48期及特刊。世界华人消化杂志包括: 1993-2005年第1-24期及特刊。

### 1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者)。高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数。高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文。一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大。投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式。

### 2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

### 3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护。

世界华人消化杂志 2004年5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠。

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. [yuemx@ns.cetin.net.cn](mailto:yuemx@ns.cetin.net.cn)

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会。方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会。并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案。结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的ICU全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全。创造了反应速度第一; 技术装备第一。使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高。载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求。航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念。载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护。结论: 对返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务。

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护。世界华人消化杂志 2004年5月;12(5):1009-1014。功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF。

### 4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 301, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接。

### 5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页。

# 实验性肝纤维化大鼠肝脏中 TIMP-2 基因及蛋白表达阻断研究

聂青和, 张亚飞, 谢玉梅, 邵彬, 李军, 苟艳子, 周永兴

聂青和, 张亚飞, 谢玉梅, 邵彬, 李军, 苟艳子, 周永兴, 第四军医大学唐都医院传染科/全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
聂青和, 男, 汉族, 1961年生, 医学博士、博士后, 主要从事传染病学临床与实验研究, 以第一作者发表论文及综述150余篇, 主编学术专著3部, 现任《中国实用内科杂志》、《世界华人消化杂志》、《胃肠病学和肝病学杂志》、《肝脏》、《中国感染控制杂志》、《寄生虫病与感染性疾病》等8家学术专业杂志编委,《实用肝脏病杂志》副主编,《中华传染病杂志》、《中华消化杂志》特邀审稿人。

陕西省科技攻关项目(社发攻关), No.2003K10G63

通讯作者: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科、全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com  
电话: 029-84777852 传真: 029-83537377

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-11-04

## Antisense oligonucleotides-based inhibition of gene and protein expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on experimental liver fibrosis in rats

Qing-He Nie, Ya-Fei Zhang, Yu-Mei Xie, Bin Shao, Jun Li, Yan-Zi Gou, Yong-Xing Zhou

Qing-He Nie, Ya-Fei Zhang, Yu-Mei Xie, Bin Shao, Jun Li, Yan-Zi Gou, Yong-Xing Zhou, Chinese PLA Centre of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Supported by the Key Science and Technology Project of Shaanxi Province, No. 2003K10G63

Correspondence to: Dr. Qing-He Nie, Chinese PLA Centre of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. nieqinghe@hotmail.com

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-11-04

## Abstract

**AIM:** To investigate the inhibitory effect of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) targeted antisense oligonucleotide (asON) on the progress of experimental liver fibrosis in rats.

**METHODS:** Twenty-two rats were divided into asON treatment ( $n = 6$ ), model ( $n = 6$ ), and normal control group ( $n = 10$ ). The liver fibrosis model was induced by human serum albumin (HSA). During modeling, the rats were treated with antisense oligonucleotides via tail vein. The level of TIMP-2 expression was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), *in situ* hybridization, immunohistochemical staining and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The effect of asON

on liver fibrosis was analyzed by histopathological examination, immunohistochemical staining of collagen I and IV, and special staining of collagen fiber as well as electron microscopy.

**RESULTS:** The pathological grading was notably improved in asON group than that in model group ( $u = 2.071$ ,  $P < 0.05$ ). The serum and tissue expression of TIMP-2 were lower in asON group than those in model group ( $T = 55$ ,  $P < 0.05$ ;  $t = 3.332$ ,  $P < 0.05$ ), but higher than those in the control ( $T = 55$ ,  $P < 0.05$ ;  $t = 5.550$ ,  $P < 0.05$ ). Image quantitative analysis for immunohistochemical staining of collagen IV showed that the value was significant decreased in asON group as compared with that in model group ( $t = 2.310$ ,  $P < 0.05$ ), but still higher than that in the control ( $t = 3.623$ ,  $P < 0.05$ ); The value for collagen I was also decreased in asON group as compared with that in model group ( $t = 2.845$ ,  $P < 0.05$ ). Less collagen deposition was found in the hepatic sinusoid of asON group, which was not significantly different from that of model group.

**CONCLUSION:** TIMP-2 targeted asON can inhibit the progress of experimental liver fibrosis in rats.

**Key Words:** Antisense oligonucleotide; Tissue inhibitor of metalloproteinase-2; Liver fibrosis; Rats

Nie QH, Zhang YF, Xie YM, Shao B, Li J, Gou YZ, Zhou YX. Antisense oligonucleotides-based inhibition of gene and protein expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on experimental liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2742-2747

## 摘要

**目的:** 探讨以TIMP-2为靶基因, 应用反义寡核苷酸(asON)技术抑制其在肝组织中的表达对大鼠肝纤维化发展的影响。

**方法:** 22只大鼠分为治疗组( $n = 6$ )、模型组( $n = 6$ )和正常对照组( $n = 10$ )。以人血白蛋白免疫攻击方法制备免疫诱导型肝纤维化大鼠模型。模型制备过程中, 治疗组大鼠以尾静脉注射方式给予针对TIMP-2的硫代反义寡核苷酸。RT-PCR、原位杂交、免疫组化、ELISA等方法检测TIMP-2的转录以及表达水平。用病理学检查以及I、IV型胶原的免疫组化结果分析肝纤维化发

展程度. 通过胶原纤维特殊染色及电镜等观察asON对大鼠肝纤维化的影响.

**结果:** 治疗组病理学分级状况优于模型组( $u = 2.071$ ,  $P < 0.05$ ). 治疗组血清TIMP-2低于模型组( $T = 55$ ,  $P < 0.05$ ), 高于正常对照组( $T = 55$ ,  $P < 0.05$ ). 治疗组肝组织TIMP-2 mRNA表达弱于模型组( $t = 3.332$ ,  $P < 0.05$ ), 高于正常对照组( $t = 5.550$ ,  $P < 0.05$ ). IV型胶原免疫组化图像定量分析结果显示, 治疗组与模型组有显著差异( $t = 2.310$ ,  $P < 0.05$ ), 其表达较低, 但仍高于正常对照组( $t = 3.623$ ,  $P < 0.05$ ). 治疗组I型胶原免疫组化图像扫描结果与模型组相比, 其数值亦较低( $t = 2.845$ ,  $P < 0.05$ ). 治疗组肝窦基底膜胶原沉积较轻, 与模型组无明显差异.

**结论:** 抑制TIMP-2在肝组织中的表达可以减缓大鼠肝纤维化发展.

**关键词:** 反义寡核苷酸; 金属蛋白酶组织抑制因子-2; 肝纤维化; 大鼠

聂青和, 张亚飞, 谢玉梅, 邵彬, 李军, 苟艳子, 周永兴. 实验性肝纤维化大鼠肝脏中TIMP-2基因及蛋白表达阻断研究. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2742-2747

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2742.asp>

## 0 引言

肝纤维化是肝组织受损伤后细胞外基质(ECM), 尤其是I、III、IV型胶原过度增生沉积和降解减少造成的病理性结果<sup>[1,2]</sup>. 近年来, 随着对其发生机制的深入研究, 特别是对ECM合成与降解分子生物学的了解, 许多学者针对ECM的代谢, 尤其是胶原合成与降解上的不同环节, 提出了多种治疗措施<sup>[3]</sup>. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组能降解ECM的蛋白分解酶, 其活性与其特异性抑制因子——金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)在组织中的表达密切相关<sup>[4,5]</sup>. 正常状态下, TIMPs与MMPs处于动态平衡, 调节肝内ECM的生成和降解<sup>[6]</sup>. 在病理状态下, 肝星状细胞(HSC)活化, TIMPs表达增加, 其与组织中活性MMPs以1:1摩尔比结合, 形成复合体, 从而抑制其降解ECM的能力<sup>[7]</sup>. 目前已发现的4种TIMP中, TIMP-1和TIMP-2在肝组织中表达, 被认为与肝纤维化密切相关<sup>[8,9]</sup>. 我们前期应用反义寡核苷酸(asON)技术, 以TIMP-1为靶基因, 研究TIMP-1在肝组织中的抑制性表达对肝纤维化发展的影响, 证实了TIMP-1在纤维化肝组织中表达的抑制可以减缓甚至逆转肝纤维化的发展<sup>[10]</sup>. TIMP-1和TIMP-2对MMPs的抑制活性, 因MMPs种类的不同, 其敏感性存在显著差异<sup>[11]</sup>, TIMP-2与TIMP-1相比, 不具备对MMP-1等I、II、III型胶原酶的抑制能力, 但其

为MMP-2(IV型胶原酶)的主要抑制因子<sup>[12]</sup>. 肝纤维化时, 肝内胶原蛋白主要为I、III型胶原, 其中I型胶原的增生最为明显, IV型胶原的增生沉积并不占主要地位<sup>[13,14]</sup>. 但研究证实, 肝纤维化时, IV型胶原的过度沉积可使肝窦毛细血管化, 肝血流和结构改变, 从而加剧肝脏病变<sup>[15]</sup>. 因此, 在肝纤维化组织中抑制TIMP-2的表达, 间接增强MMP-2的活性, 改变IV型胶原在肝脏中的沉积, 亦有可能减缓肝纤维化的发展.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 反义寡核苷酸的设计与合成 根据大鼠TIMP-2的全基因cDNA序列设计<sup>[16]</sup>. 针对TIMP-2基因组的调控序列、结构蛋白、编码区序列等分析, 设计2组不同的反义寡核苷酸, 序列如下:

DNA Seq1 5'-GCAAACGTTACGTCTACATC-3'

Seq2 5'-GATCAGCTCTTGAGGACGAA-3'

20-聚硫代磷酸脱氧核苷的化学合成在美国ABI公司391A PCRMATE EP DNA合成仪上自动进行, 硫代修饰asON采用TETD/乙氰法, 高效薄层色谱法纯化<sup>[17]</sup>, 纯化后纯度>99%, 由北京军事医学科学院二所王升启研究员协助完成.

1.1.2 动物实验 Wistar大鼠, ♀, 体质量150-180 g, 22只, 购自第四军医大学动物中心. 随机将22只大鼠分为3组: 治疗组和模型组, 每组6只, 正常对照组10只. 参照王宝恩 *et al*<sup>[18]</sup>应用的人血白蛋白免疫攻击方法制备免疫诱导型肝纤维化大鼠模型. 在尾静脉攻击剂量维持期间, 治疗组大鼠于每次尾静脉注射白蛋白24 h后给予硫代反义寡核苷酸(20 μg/g, 尾静脉注射, 共20次); 模型组6只大鼠于每次尾静脉注射白蛋白24 h后尾静脉注射等量无菌生理盐水; 10只同等条件下饲养的Wistar大鼠为正常对照组.

1.1.3 血清标本的制备 治疗组自维持剂量攻击的第2 wk始, 于每周第二次给予硫代反义寡核苷酸前, 采血0.5 mL, 离心后取血清, -70℃保存, 共9次. 其他2组大鼠在同样时间同样方式采血. 所有大鼠处死时亦取血清标本. 血清标本全部采集完成后统一检测.

1.1.4 肝组织标本的采集 尾静脉攻击结束1 wk后, 所有大鼠麻醉后活杀, 取肝脏标本, 统一备检.

### 1.2 方法

1.2.1 病理学观察 常规HE染色观察肝组织学改变. 病理组织学判定标准按照王宝恩 *et al*<sup>[19]</sup>的标准, 根据病理切片中胶原纤维增生程度, 将肝纤维化、肝硬化分为6级. 无胶原纤维增生的正常肝组织为0级. 每张切片随机选取5个视野, 分别记录病理分级, 并取其平均值(4舍5入)作为该肝组织切片的病理分级. Von Gieson、



表1 TIMP-2、 $\beta$ -actin引物序列

引物	核苷酸序列	产物位置 (bp)
TIMP-2 正义链	5'-GTTTTGCAATGCAGATGTAG-3'	540
反义链	5'-ATGTCGAGAACTCCTGCTT-3'	
$\beta$ -actin 正义链	5'-ACCCCTGAGGAAAGG-3'	120
反义链	5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	

表2 MMP-2引物序列

引物	核苷酸序列	产物位置 (bp)
MMP-2 正义链	5'-TTCTTCAAGGACCGGTTTATTGG-3'	330
反义链	5'-CTTCTTCACTTCATTGTATCTCCA-3'	

Masson胶原纤维特殊染色观察肝组织胶原沉积情况。

1.2.2 血清TIMP-2的检测 利用双夹心ELISA方法定量测定血清中TIMP-2<sup>[20]</sup>。TIMP-2单克隆抗体购于美国Maxim生物技术公司, 产品编号为MAB-0283。应用ELISA读数仪(ELx800, Bio-Tek Instruments, INC. USA)在450 nm波长处测吸光度。

1.2.3 RT-PCR法检测肝组织TIMP-2 mRNA的表达 用Promega公司生产的Total RNA Isolation System提取肝组织总RNA。PCR反应体系内含cDNA 2  $\mu$ L、10 $\times$  buffer 2  $\mu$ L、4 $\times$ dNTP(2 mmol/L)2  $\mu$ L, TIMP-2、 $\beta$ -actin引物(10 mmol/L)各2  $\mu$ L, Taq酶16.67 nkat, 超重水补至20  $\mu$ L。治疗组、模型组及正常对照组共22份标本各取1  $\mu$ g总RNA抽提物加入此反应体系, 反应参数为: 97 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸50 s, 30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。取PCR扩增产物10  $\mu$ L加入20 g/L的琼脂糖凝胶孔中, 在TAE缓冲液, 电压50 V电泳1 h, 溴化乙锭显色后成像定量分析, 用TIMP-2/ $\beta$ -actin比值表示TIMP-2表达水平。各组各取一份标本(治疗组、模型组均取自肝纤维化等级为IV的大鼠肝组织标本, 正常对照组随机), 在检测TIMP-2 mRNA的同时检测MMP-2 mRNA的表达(TIMP-2和MMP-2引物序列<sup>[21]</sup>见表1, 2)。

1.2.4 原位杂交法检测TIMP-2 mRNA TIMP-2 cDNA探针及原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。应用我们既往开展的地高辛标记探针原位杂交法进行操作<sup>[22]</sup>, 结果经计算机图像灰度扫描数字转换后, 进行统计学处理。

1.2.5 TIMP-2相关抗原、I、IV型胶原的免疫组化 所用试剂盒分别购自福州迈新生物技术开发公司和武汉博士德生物工程有限公司, 操作按试剂盒说明书进行。TIMP-2相关抗原、I型胶原免疫组化结果经计算机图像灰度扫描数字转换后, 进行统计学处理。IV型胶原免疫组化染色每个标本制作3张切片, 随机选择5个不同视野, 测定标准测量窗口中肝窦壁阳性区域的面积比。

表3 实验动物肝纤维化病理学级别分布

组别	n	肝纤维化病理学分级						
		0	I	II	III	IV	V	VI
正常对照组	10	10	0	0	0	0	0	0
治疗组	6	0	0	0	2	2	1	1
模型组	6	0	0	0	0	1	2	3

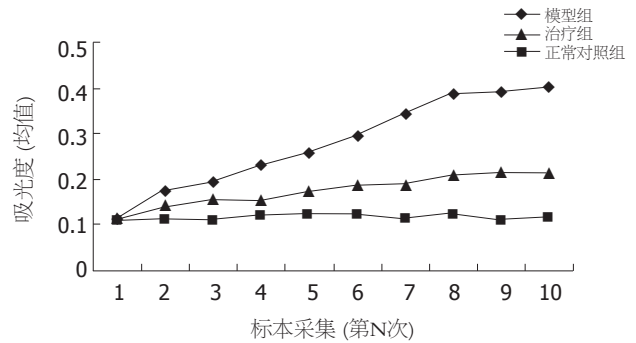


图1 血清TIMP-2检测结果。

1.2.6 肝组织羟脯氨酸测定 肝组织经脱脂、脱水、干燥后, 于6 mol/L HCl 121 $^{\circ}$ C水解3 h, 再用对二甲氨基苯甲醛显色法测定<sup>[23]</sup>。肝组织总蛋白中羟脯氨酸含量以“mg Hyp/g”表示。

1.2.7 电镜观察 常规制备肝组织电镜标本, 送本校电镜室透射电镜(日本Jeol公司JEM-100SX型)观察。

**统计学处理** 对肝纤维化病理学分级和血清TIMP-2检测结果应用Wilcoxon秩和检验和Wilcoxon符号秩检验进行分析, 其他实验结果应用两样本 $t$ 检验进行分析。上述检验方法均采用SPSS 10.0统计软件处理。

## 2 结果

2.1 肝纤维化病理学分级 治疗组病理学分级状况优于模型组(Wilcoxon秩和检验,  $u = 2.071$ ,  $P < 0.05$ )(表3)。Von Gieson、Masson胶原纤维特殊染色可见治疗组纤维间隔较纤细。

2.2 血清TIMP-2的检测 理论上, ELISA读数仪读数(吸光度)与TIMP-2蛋白量成比例关系, 能较好的反映血清TIMP-2水平<sup>[24]</sup>。血清TIMP-2检测结果显示, 治疗组低于模型组(Wilcoxon符号秩检验,  $T = 55$ ,  $P < 0.05$ ), 高于正常对照组( $T = 55$ ,  $P < 0.05$ )(图1)。

2.3 肝组织TIMP-2 mRNA RT-PCR结果 治疗组TIMP-2 mRNA表达弱于模型组( $t = 3.332$ ,  $P < 0.05$ ), 高于正常对照组( $t = 5.550$ ,  $P < 0.05$ ), 表明以TIMP-2为靶基因的asON确可在一定程度上抑制TIMP-2 mRNA的转录水平(表4)。MMP-2 mRNA RT-PCR结果显示治疗组与模型组没有显著差异, 图2显示各实验组各取一份标本所做RT-PCR结果。

2.4 TIMP-2的原位杂交和免疫组化图像扫描结果 治疗组图像扫描结果均低于模型组( $P < 0.05$ ), 且免疫组化图

表 4 大鼠肝脏中TIMP-2基因表达

组别	<i>n</i>	TIMP-2
正常对照组	10	0.36 ± 0.08
治疗组	6	0.69 ± 0.16
模型组	6	1.06 ± 0.22

表 5 I、IV型胶原的免疫组化图像分析结果

组别	<i>n</i>	I型胶原灰度扫描结果	IV型胶原阳性面积比
正常对照组	10	57.7 ± 18.04	4.26 ± 1.13
治疗组	6	319.5 ± 76.62	6.47 ± 1.26
模型组	6	499.9 ± 134.88	8.26 ± 1.42

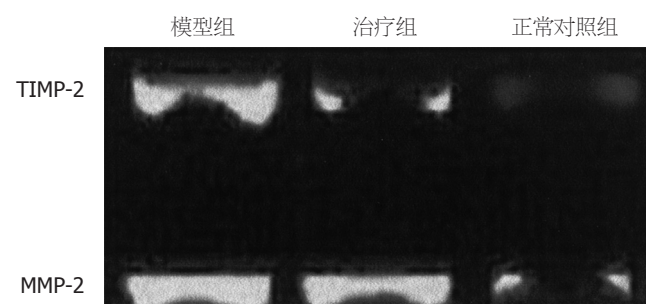


图 2 TIMP-2 mRNA和MMP-2 mRNA表达的电泳图.

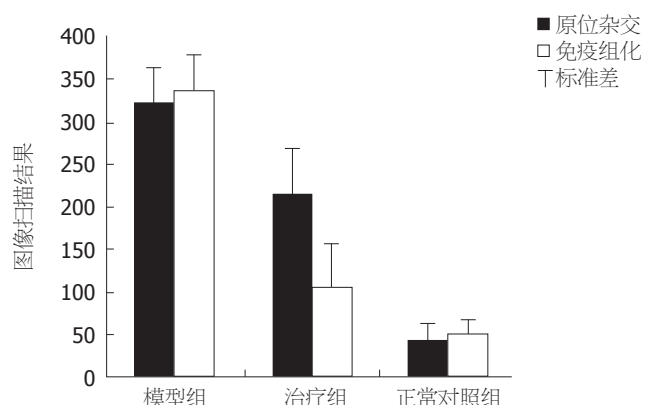


图 3 TIMP-2的原位杂交和免疫组化图像扫描结果.

像扫描结果差异性更为显著(免疫组化 $t = 8.391$  vs 原位杂交 $t = 3.803$ )(图3).

2.5 I、IV型胶原的免疫组化结果 IV型胶原免疫组化图像定量分析结果显示, 治疗组与模型组有显著差异( $t = 2.310, P < 0.05$ ), 其表达较低, 但仍高于正常对照组( $t = 3.623, P < 0.05$ ). 治疗组 I 型胶原免疫组化图像扫描结果与模型组相比, 其数值亦较低( $t = 2.845, P < 0.05$ )(表5).

2.6 电镜观察结果 治疗组肝窦基底膜胶原沉积较轻, “失窗口”现象较弱, 但仍可观察到活化的肝星状细胞(图4, 图5), 与模型组无明显差异.

### 3 讨论

肝纤维化是肝细胞坏死或损伤后常见的反应, 可由多种因素引起, 包括肝脏感染(病毒, 细菌, 真菌, 寄生

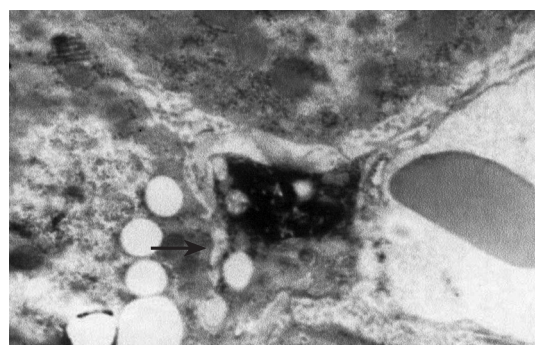


图 4 治疗组肝窦周围可观察到激活的肝星状细胞 (箭头处), 但肝窦基底膜胶原沉积较弱 (×7.5 k).

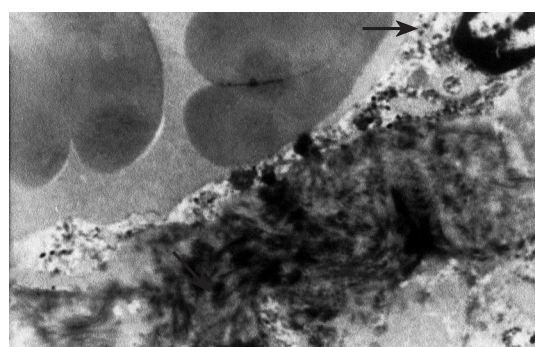


图 5 模型组肝窦内皮细胞周围有大量胶原沉积 (图右上箭头示窦内皮细胞), 肝窦毛细管化 (×6 k).

虫)、酒精中毒、药物性肝炎以及一些先天性疾病等, 其中, 病毒性肝炎是国内肝纤维化最主要的原因, 其发病机制复杂, 常迁延不愈, 若不经治疗, 最终可发展至肝硬化、肝衰竭甚至肝癌, 严重危害人类健康<sup>[25,26]</sup>. 研究认为, 病毒性肝炎引起的纤维化是机体对病毒感染引起的广泛性肝脏炎症的修复反应, 其中, 病毒感染是病因, 纤维化是病理基础, 由此, 临床上将对病毒性肝炎的治疗分为两种策略: 抗病毒治疗和阻止肝纤维化的发展. 在抗病毒治疗方面, 经多年的努力, 已有多种药物应用于临床, 但因病毒变异等因素, 其治疗效果总是不尽人意<sup>[27]</sup>. 因此, 研究肝纤维化发生的具体机制, 并进而针对性地进行治疗, 阻止其发展, 对提高病毒性肝炎治疗效果有着极为重要的意义.

根据核苷酸杂交原理, 寡核苷酸可特异性地结合基因组DNA/RNA, 从而在基因水平上干扰致病蛋白质的产生过程, 这一寡核苷酸被称为反义寡核苷酸(asON). asON具有特异、高效、易人工合成等优势, 通过适当修饰, 可增强透膜性、稳定性及生物利用度, 从而使其作为药用成为可能<sup>[28,29]</sup>. 目前已有17种反义寡核苷酸药物进入临床试验, 其中一种用于治疗巨细胞病毒性视网膜炎和艾滋患者并发巨细胞视网膜炎的反义寡核苷酸药物Vitravene已上市, 临床应用也已取得较好效果<sup>[30]</sup>. 在肝纤维化方面, 以TGF- $\beta$ 1为靶基因的反义寡核苷酸药物也已被证实有较好的抑制肝纤维化发



展的作用<sup>[31,32]</sup>。我们前期利用硫代修饰asON特异性阻断TIMP-1的基因和蛋白表达,证实TIMP-1在纤维化肝组织中表达的抑制亦可减缓甚至逆转肝纤维化的发展<sup>[10,17]</sup>。

TIMP-2是肝内IV型胶原酶MMP-2的主要抑制因子,TIMP-2/MMP-2系统对IV型胶原的增生沉积和降解起着重要的调节作用<sup>[33]</sup>。在肝纤维化组织中,IV型胶原并不是肝脏内沉积胶原的主要成分,但其主要表达于肝窦基底膜,其过度沉积增生可导致肝窦毛细血管化(hepatic sinusoid capillarization),影响肝内外物质交换,加重肝功能损害<sup>[34]</sup>。因此,抑制肝组织中TIMP-2的表达,间接增强MMP-2的活力,有助于分解过多沉积在肝窦基底膜内的IV型胶原,改善肝细胞与血液间的物质交换,降低肝细胞功能的损害。实验结果表明,我们所设计的针对TIMP-2基因的反义寡核苷酸可有效的抑制TIMP-2 mRNA的转录及相关蛋白在肝组织内的表达,IV型胶原免疫组化染色结果也显示抑制TIMP-2的表达可增强MMP-2对IV型胶原的降解。电镜观察显示虽治疗组肝星状细胞活化与模型组无显著差异,但其肝窦基底膜处胶原沉积较弱,肝窦失窗口现象也较弱,这一结果表明治疗组肝窦功能受损较弱,肝细胞物质交换尚可,肝功能受损程度也较轻。肝组织I型胶原及羟脯氨酸含量的检测结果亦显示治疗组纤维化程度低于模型组。

我们对MMP-2 mRNA的检测结果显示,TIMP-2转录水平的降低对MMP-2 mRNA的转录没有明显影响,说明在肝脏纤维化过程中,MMP-2的表达可能并不存在TIMP-2的正反馈调整。此外,我们在实验中观察到,治疗组大鼠肝纤维化组织中TIMP-2蛋白表达的抑制程度较其mRNA转录水平的抑制程度更为明显,其原因尚需进一步探讨。

电镜观察显示虽治疗组肝星状细胞活化与模型组无显著差异,但其肝窦基底膜处胶原沉积较弱,肝窦失窗口现象也较弱,这一结果表明治疗组肝窦功能受损较弱,肝细胞物质交换尚可,肝功能受损程度也较轻。

总之,针对TIMP-2设计的硫代反义寡核苷酸对实验性免疫性肝纤维化大鼠模型有一定抗肝纤维化作用,但较针对TIMP-1设计的硫代反义寡核苷酸为弱,若单独应用,可能效果不甚明显。但我们认为,其抗纤维化机制与阻断TIMP-1表达的抗纤维化机制并不重复。因此,我们认为在选用TIMP-1为基因治疗的靶基因时,同时设计针对TIMP-2的反义寡核苷酸,联合应用,应能提高抗肝纤维化的疗效。

#### 4 参考文献

- 1 聂青和. 肝纤维化的逆转策略及研究现状. 世界华人消化杂志 2005;13:1165-1174
- 2 Nakamuta M, Kotoh K, Enjoji M, Nawata H. Effects of fibril- or fixed-collagen on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 production in the human hepatocyte cell line HLE. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2264-2268
- 3 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1657-1661
- 4 Abraham D, Ponticos M, Nagase H. Connective tissue remodeling: cross-talk between endothelins and matrix metalloproteinases. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 369-379
- 5 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 351-372
- 6 Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver of patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1997; 26: 1213-1219
- 7 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 86-90
- 8 聂青和. 丙型肝炎病毒慢性感染与肝癌相关性研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2395-2400
- 9 Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003; 327: 143-147
- 10 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 363-369
- 11 Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-283
- 12 Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M. Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication (Review). *Oncol Rep* 2002; 9: 607-611
- 13 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 14 Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 3-15
- 15 陆雄, 刘平. 肝纤维化过程中一个重要的病理改变——肝窦毛细血管化. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 53-54
- 16 Santoro M, Battaglia C, Zhang L, Carlomagno F, Martelli ML, Salvatore D, Fusco A. Cloning of the rat tissue inhibitor of metalloproteinases type 2 (TIMP-2) gene: analysis of its expression in normal and transformed thyroid cells. *Exp Cell Res* 1994; 213: 398-403
- 17 聂青和, 周永兴, 谢玉梅, 程勇前. 硫代反义寡核苷酸对肝纤维化大鼠TIMP-1基因及蛋白表达的抑制作用. 中华传染病杂志 2001; 19: 208-211
- 18 王宝恩, 王志富, 殷蔚萸, 黄受方, 李建军. 实验性免疫性肝纤维化模型的研究. 中华医学杂志 1989; 69: 503-505
- 19 王宝恩, 王惠吉, 朱家璇, 刘尔瑜. 中药复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察. 肝脏病杂志 1993; 1: 69-72
- 20 Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 624-630
- 21 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 黄长形, 康文臻, 张岩, 郝春秋, 王九平, 朱晓慧. 中药双甲五灵冲剂对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中TIMPs蛋白及基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 199-203
- 22 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 程勇前, 康文臻. 地高辛素标记探针原位杂交技术检测肝硬变组织中TIMPs mRNA. 世界华人消化杂志 2001; 9: 251-254
- 23 Sakaida I, Hironaka K, Uchida K, Suzuki C, Kayano K, Okita K. Fibrosis accelerates the development of enzyme-altered lesions in the rat liver. *Hepatology* 1998; 28: 1247-1252
- 24 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Meth-



- odologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 282-287
- 25 Tsukuma H, Tanaka H, Ajiki W, Oshima A. Liver cancer and its prevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6: 244-250
- 26 聂青和. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗进展回顾. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 148-150
- 27 谢玉梅, 聂青和. 肝纤维化治疗的新热点-TIMPs. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 601-605
- 28 罗红, 聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前. 抑制TIMP-1的硫代反义寡核苷酸在肝纤维化大鼠体内生物学分布及药代动力学研究. *肝脏* 2002; 7: 237-239
- 29 袁国刚, 毛建平. 反义寡核苷酸递送方法研究进展. *中国生物工程杂志* 2004; 24: 11-18
- 30 Crooke ST. Antisense strategies. *Curr Mol Med* 2004; 4: 465-487
- 31 Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003; 37: 1067-1078
- 32 聂青和, 高巍. 转化生长因子 $\beta$ 1在肝纤维化研究及应用中的意义. *肝脏* 2004; 9: 203-204
- 33 Nie QH, Zhou YX, Xie YM. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 81: 805-807
- 34 Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B, Ericzon BG, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1275-1289

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知

**本刊讯** 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于2006-04-21/25在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛, 主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题, 包括不同术式的选择及手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题。为活跃学术论坛, 促进消化道肿瘤外科治疗的发展, 特向广大普外科工作者征稿。

### 1 会议具体内容

论坛的具体内容包括: (1) 肝移植手术适应证及相关问题(黄洁夫主讲); (2) 肝胆系统肿瘤手术的选择(郑树森主讲); (3) 消化系统肿瘤的综合治疗(樊代明主讲); (4) 胰腺肿瘤外科治疗进展(赵玉沛主讲); (5) 胃癌的根治性手术(詹文华主讲); (6) 腹腔镜下的胃癌根治术(余佩武主讲); (7) 胃癌腹膜转移的外科治疗(朱正纲主讲); (8) 低位直肠癌的保肛手术(汪建平主讲); (9) 腹腔镜下的结直肠癌手术(郑民华主讲); (10) 规范的TME手术及相关问题(顾晋主讲); (11) 胃癌外科治疗的新进展(叶再元主讲)。

### 2 征文要求

内容应与消化道肿瘤(以胃肠道为主)外科治疗有关。采用word文档格式, 字数3 500字符左右, 摘要500字左右(宋体、小四号)。

### 3 文章投送形式

分两种: (1) 电子邮件投稿: 将征文以附件形式提交, 注明“消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛”征文, 文件名为会议名称加第一作者姓名; 电子信箱: zhwckw@21cn.com. (2) 邮寄: 打印稿用A4纸(附软盘), 软盘请注明研讨题目、作者。

### 4 联系地址及截稿

截稿日期: 2006-01-31(以当地邮戳为准)。联系地址: 广州市中山二路58号(510080)中山大学附属第一医院《中华胃肠外科杂志》编辑部一室, 电话: 020-87335945。

## 胸腺肽 $\alpha 1$ 对原发性肝癌围手术期免疫功能的影响

徐青, 李鹏, 薛平, 朱卫平, 陈瑞新, 于秀

徐青, 李鹏, 南通大学附属医院普外科 江苏省南通市 226001  
薛平, 南通大学附属海安医院普外科 江苏省南通海安市 226600  
朱卫平, 南通市虹桥医院普外科 江苏省南通市 226001  
陈瑞新, 于秀, 南通大学附属医院肝胆胰研究室 江苏省南通市 226001  
徐青, 男, 1965-03-04生, 江苏省泰兴市人, 汉族, 1998年苏州医学院博士, 副教授, 主要从事肝胆胰肿瘤综合治疗的研究。  
江苏省卫生厅科研基金资助项目, No. H9327  
通讯作者: 徐青, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院普外科, xuching\_surg@sina.com  
传真: 0513-5110966  
收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

### Effects of thymosin $\alpha 1$ on immune function in perioperative patients with primary liver cancer

Qing Xu, Peng Li, Ping Xue, Wei-Ping Zhu, Rui-Xin Chen, Xiu Yu

Qing Xu, Peng Li, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China  
Ping Xue, Department of General Surgery, the Affiliated Hai'an Hospital of Nantong University, Nantong Hai'an 226600, Jiangsu Province, China  
Wei-Ping Zhu, Department of General Surgery, Nantong Hong Qiao Hospital, Nantong 226000, Jiangsu Province, China  
Rui-Xin Chen, Xiu Yu, Research Center of Liver, Gall and Pancreas, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China  
Supported by the Scientific Foundation from Health Office of Jiangsu Province, No. H9327  
Correspondence to: Dr. Qing Xu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. xuching\_surg@sina.com  
Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-09-30

### Abstract

**AIM:** To investigate the immune state of patients with primary hepatic carcinoma (PHC) liver cancer after treatment with thymosin  $\alpha 1$  during perioperative period.

**METHODS:** One hundred and three patients with PHC were divided into two groups. The patients in group A ( $n = 35$ ) received hepatectomy plus thymosin  $\alpha 1$  treatment and the patients in group B ( $n = 68$ ) underwent hepatectomy only. Twenty normal blood donors were used as controls. Before and 7, 14, and 21 d after treatment, the changes of serum CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> were measured by flow cytometry. MTT colometric assay was performed to detect the activity of interleukin-2 (IL-2).

**RESULTS:** Before hepatectomy and thymosin  $\alpha 1$  treatment, serum CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> and IL-2 were markedly lower in group A than that in the controls ( $F = 8.2$ ,  $P = 0.005$ ), while after treatment, serum CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> were significantly increased ( $F = 8.4$ ,  $P = 0.004$ ). Seven days after hepatectomy, serum CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> were elevated ( $F = 4.7$ ,  $P = 0.005$  or  $F = 3.5$ ,  $P = 0.04$ ), and 14 d after hepatectomy, the level of serum IL-2 was increased ( $F = 3.6$ ,  $P = 0.03$ ). For group B, serum CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> were notably reduced 7 d after hepatectomy ( $F = 5.4$ ,  $P = 0.006$  or  $F = 3.6$ ,  $P = 0.02$ ). The levels of serum CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> were still lower ( $F = 5.0$ ,  $P = 0.007$ ) at 14 d than those before operation, but the levels of CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> restored to some extent. At 21 d, serum CD8<sup>+</sup> level still didn't restore ( $F = 6.3$ ,  $P = 0.000$ ). The levels of serum CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> were all lower in group B than those in group A ( $F = 7.2$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** The immunosuppression exists in patients with PHC, and it can be aggravated in early stage after hepatectomy. However, the immunosuppression can be alleviated by thymosin  $\alpha 1$  treatment during perioperative period.

**Key Words:** Thymosin  $\alpha 1$ ; Lymphocyte subsets; Interleukin-2; Hepatic carcinoma; Perioperative period

Xu Q, Li P, Xue P, Zhu WP, Chen RX, Yu X. Effects of thymosin  $\alpha 1$  on the immune function in perioperative patients with primary liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2748-2751

### 摘要

**目的:** 研究胸腺肽 $\alpha 1$ 对原发性肝癌患者围手术期免疫功能的影响。

**方法:** 103例确诊为原发性肝癌患者分为2组, A组采用胸腺肽 $\alpha 1$ +手术治疗( $n = 35$ ), B组仅手术治疗( $n = 68$ )。胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗前后及手术前、手术后7, 14, 21 d用流式细胞仪检测CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>的变化, MTT比色法测定IL-2活性。

**结果:** A组CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>

及IL-2均明显低于正常对照组 ( $F = 8.2, P = 0.005$ ); 术前经胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗后 $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 较治疗前增高( $F = 8.4, P = 0.004$ ); 术后7 d  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 较术前增高( $F = 4.7, P = 0.005$ 或 $F = 3.5, P = 0.04$ ), 术后14 d IL-2也增高( $F = 3.6, P = 0.03$ ). B组术后7 d,  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 较术前明显降低( $F = 5.4, P = 0.006$ 或 $F = 3.6, P = 0.02$ ), 术后14 d,  $CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ 仍然低于术前( $F = 5.0, P = 0.007$ ), 其他指标有所恢复; 术后21 d,  $CD_8^+$ 仍未恢复至术前水平( $F = 6.3, P = 0.000$ ); B组术后7 d,  $CD_3^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 均明显低于A组( $F = 7.2, P = 0.001$ ).

**结论:** 肝癌患者存在免疫抑制, 术后早期免疫抑制程度加重, 围手术期胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗可有效改善肝癌围手术期免疫抑制状况.

**关键词:** 胸腺肽 $\alpha 1$ ; T淋巴细胞亚群; IL-2; 肝癌; 围手术期

徐青, 李鹏, 薛平, 朱卫平, 陈瑞新, 于秀. 胸腺肽 $\alpha 1$ 对原发性肝癌围手术期免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2748-2751  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2748.asp>

## 0 引言

原发性肝癌(简称肝癌)患者存在严重的免疫抑制现象<sup>[1]</sup>. 我们发现, 肝癌患者围手术期免疫抑制程度加重, 尤其是术后1 wk左右免疫抑制现象尤为严重<sup>[2]</sup>, 免疫调节治疗对预防术后复发及减轻肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)后免疫抑制有良好效果<sup>[3]</sup>, 但围手术期免疫调节治疗一直未引起足够重视. 为此, 我们自1999-01开始, 对35例肝癌患者使用胸腺肽 $\alpha 1$ 进行围手术期免疫治疗, 以探讨胸腺肽 $\alpha 1$ 对肝癌围手术期免疫功能影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 手术治疗经病理确诊为原发性肝癌, A组胸腺肽 $\alpha 1$ +手术治疗组, 35例; B组手术治疗组, 68例; 健康义务献血人员20例为正常对照(表1).

**1.2 方法** A组术前4 d每天sc胸腺肽 $\alpha 1$ (美国赛生公司)1.6 mg, 术后1 wk每2 d sc胸腺肽 $\alpha 1$ (1.6 mg), 2 wk后每周2次皮下注射胸腺肽 $\alpha 1$ (1.6 mg)共3 wk. B组病例常规术前准备后进行手术治疗, 手术前后不进行免疫治疗. A组于胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗前, 术前、术后7, 14, 21 d, B组于术前、术后7, 14, 21 d分别用流式细胞仪检测外周血 $CD_3^+$ ,  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ .  $CD_3^+$ ,  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ 荧光抗体均购自美国BD公司, MTT比色法检测IL-2. 手术切缘 $\geq 2$  cm为根治性切除,  $< 2$  cm为姑息性切除, A组根治性切除24例(68.6%), 姑息性切除11例(31.4%), B组根治性切除43例(63.2%), 姑息性

表1 原发性肝癌患者临床和病理资料

项目	A组	B组
男	28	55
女	7	13
平均年龄(岁)	47	44
HBsAg(+)	29	57
肝硬化: 有	34	64
无	1	4
Child分级: A级	28	56
B级	7	12
AFP ( $\mu\text{g/L}$ ): $< 20$	21	38
$\geq 20$	14	30
肿瘤: 单个	33	61
$\geq 2$ 个	2	7
肿瘤大小(mm): $< 50$	19	40
$\geq 50$	16	28
肿瘤包膜: 完整	11	25
不完整	24	43
门静脉癌栓: 有	8	14
无	27	54
Edmondson分级: I, II	7	18
III, IV	28	50

切除25例(36.8%). 手术方式包括局部切除57例, 左外叶切除10例, 左半肝切除7例, 右半肝切除6例, 右三叶切除术3例, 第VIII肝段切除2例. 门静脉癌栓同时行取栓术.

**统计学处理** 数据均用SPSS(10.0)软件处理, 结果采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 用方差分析进行统计学处理,  $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 胸腺肽 $\alpha 1$ 对术前肝癌患者免疫功能的影响** 术前A组经胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗后 $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 较治疗前增高, 肝癌患者在治疗前 $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ , IL-2均明显低于正常对照组(表2).

**2.2 AB组患者手术前后免疫指标的变化** A组经胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗后, 术后7 d  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 较术前增高, 术后14 d IL-2也增高(表3). B组术后7 d  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 较术前明显降低, 术后14 d  $CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ 仍然低于术前, 其他指标有所恢复, 术后21 d  $CD_8^+$ 仍未恢复至术前水平. B组术后7 d  $CD_3^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 均明显低于A组( $P < 0.01$ ).

## 3 讨论

肝癌术后复发是患者死亡主要原因, 复发多在术后1-2



表2 胸腺肽 $\alpha 1$ 对术前肝癌患者免疫功能的影响 (mean  $\pm$  SD)

免疫指标	A组治疗前	A组治疗后	正常对照
CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> (%)	60.5 $\pm$ 7.5	64.2 $\pm$ 9.0	69.1 $\pm$ 7.6
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	30.5 $\pm$ 8.1	35.5 $\pm$ 7.5	47.0 $\pm$ 6.9
CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> (%)	42.2 $\pm$ 7.5	33.8 $\pm$ 8.2	26.4 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	0.8 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>28</sub> <sup>+</sup> (%)	8.5 $\pm$ 2.2	10.2 $\pm$ 2.0	18.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
CD <sub>16</sub> <sup>+</sup> CD <sub>56</sub> <sup>+</sup> (%)	14.8 $\pm$ 3.1	21.0 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	27.5 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>
IL-2 (kU/L)	40.2 $\pm$ 4.3	49.8 $\pm$ 3.5	81.5 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组治疗前.

a内<sup>[4]</sup>, 术后化疗结合免疫治疗预防肝癌复发为大部分学者所肯定<sup>[5]</sup>. 周伟平<sup>et al</sup><sup>[6]</sup>报道TACE+LAK+白细胞介素-2联合治疗有效降低肝癌术后复发率, 化疗结合 $\alpha$ -干扰素治疗能预防复发或延迟复发时间, 但对肝癌围手术期免疫治疗长期以来未引起足够重视. 我们发现肝癌患者存在严重免疫抑制, 手术治疗、麻醉、输血等因素均可进一步损害患者免疫功能, 表现为术后7 d CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>, CD<sub>16</sub><sup>+</sup>CD<sub>56</sub><sup>+</sup>较术前下降, 出现较术前更为严重的免疫抑制期, 在以往的研究中我们称之为免疫极度抑制期<sup>[2]</sup>, 此后由于肿瘤切除, 免疫抑制虽有不同程度恢复但仍不满意. 临床研究发现, 肝癌患者术后免疫功能愈低, 恢复愈慢, 术后复发愈早, 复发率愈高, 提高或加快免疫功能的恢复有利于降低复发率<sup>[6]</sup>. 围手术期成为一个综合治疗空白区, 此期间循环中残存的肿瘤或肝内残留肿瘤细胞极易逃逸肿瘤免疫监视成为转移和复发的主要因素. 许多研究表明, 恶性肿瘤患者外周血中存在微转移癌细胞, 骆成玉<sup>et al</sup><sup>[7]</sup>在研究大肠癌微转移癌细胞中发现许多大肠癌患者本身在术前就存在循环中微转移癌细胞, 术中解剖对组织的牵拉或挤压等可导致癌细胞种植与转移. Capurro <sup>et al</sup><sup>[8]</sup>在研究肝癌外周血GPC-3 mRNA表达时也发现高表达GPC-3 mRNA与肝癌微转移的发生有密切关系, 并指出肝癌患者外周血中存在微转移癌细胞. 在肝癌免疫中起重要作用的效应细胞是T细胞,

CD<sub>8</sub><sup>+</sup>按CD<sub>28</sub><sup>+</sup>表达与否分为CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>细胞毒T细胞和CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>-</sup>抑制性T细胞, 细胞毒T细胞在抗肿瘤效应中起关键作用, 该细胞与肿瘤直接接触, 通过分泌穿孔素和释放颗粒酶和淋巴毒素直接杀伤肿瘤细胞或通过高表达FasI与靶细胞表面Fas结合而诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[9]</sup>. 该效应在荷瘤早期、肿瘤缓解期或清除手术后残余肿瘤细胞中发挥重要作用. 本组资料显示, 未经免疫治疗患者术前CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞已处于低水平, 术后CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>与CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞同时下降, 此时机体免疫功能受到抑制, 残余肿瘤细胞或微转移癌细胞易于逃逸免疫攻击, 出现扩散与转移, 因此, 围手术期综合治疗及免疫治疗应该是预防复发的重要内容之一.

T $\alpha 1$ 是氨基酸乙酰化的28个氨基酸组成的多肽, 除作为免疫增强剂外, 还具有直接抗癌毒和抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>, T $\alpha 1$ 通过对CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>16</sub><sup>+</sup>CD<sub>56</sub><sup>+</sup> NK细胞刺激, 增强NK细胞的杀伤活性, 促使致敏淋巴细胞分泌IL-2,  $\alpha$ 及 $\gamma$ -干扰素, 增强致敏淋巴细胞IL-2R的表达<sup>[11]</sup>, 还可促进T细胞表面抗原Thy1、2, Ly1、2、3表达, 增强T细胞介导同种或自身淋巴细胞反应能力, 增强机体免疫应答功能<sup>[12]</sup>. 因此, 具有免疫调节和抑制肿瘤细胞增殖作用. 本研究中我们发现T $\alpha 1$ 可使术前肝癌患者CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>比例恢复, CD<sub>16</sub><sup>+</sup>CD<sub>56</sub><sup>+</sup> (NK细胞)增多. 术后继续使用T $\alpha 1$ 可有效消除术后7 d左右的免疫极度抑制期, 表现为A组经胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗后, 术后7 d CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>CD<sub>28</sub><sup>+</sup>, CD<sub>16</sub><sup>+</sup>CD<sub>56</sub><sup>+</sup>较

表3 AB组患者手术前后免疫指标的变化 (mean  $\pm$  SD)

指标	A组				B组			
	术前	术后7 d	术后14 d	术后21 d	术前	术后7 d	术后14 d	术后21 d
CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> (%)	60.5 $\pm$ 7.5	64.1 $\pm$ 8.0	63.6 $\pm$ 8.2	79.3 $\pm$ 8.1	54.3 $\pm$ 8.4	30.6 $\pm$ 8.4	39.4 $\pm$ 9.6	44.2 $\pm$ 8.8
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	30.5 $\pm$ 8.1	48.0 $\pm$ 7.9	40.5 $\pm$ 6.3	44.6 $\pm$ 7.1	28.8 $\pm$ 7.6	16.1 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	29.1 $\pm$ 8.4	36.0 $\pm$ 7.4
CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> (%)	42.2 $\pm$ 7.5	34.5 $\pm$ 8.5	33.7 $\pm$ 7.7	32.4 $\pm$ 7.0	44.1 $\pm$ 6.6	21.4 $\pm$ 5.0 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	23.5 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup>
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	0.8 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>28</sub> <sup>+</sup> (%)	8.5 $\pm$ 2.2	16.7 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	19.0 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	16.7 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	8.6 $\pm$ 2.2	3.94 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	4.8 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	9.8 $\pm$ 2.1
CD <sub>16</sub> <sup>+</sup> CD <sub>56</sub> <sup>+</sup> (%)	14.8 $\pm$ 3.1	23.5 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	24.7 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	29.1 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	11.3 $\pm$ 2.1	6.1 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	16.6 $\pm$ 2.6	19.6 $\pm$ 3.0
IL-2 (kU/L)	40.2 $\pm$ 4.3	45.7 $\pm$ 4.0	70.2 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	87.5 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	38.6 $\pm$ 4.2	30.5 $\pm$ 3.9	31.8 $\pm$ 4.2	59.3 $\pm$ 4.2

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 术前.

术前增高, 术后14 d IL-2也增高, A组术后7 d  $CD_3^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ,  $CD_8^+CD_{28}^+$ ,  $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 均明显高于B组. 在此后的使用中治疗组(A组)肝癌患者免疫指标恢复较未治疗组(B组)满意, 这不仅有利于减少术后感染等并发症, 也为术后TACE及其他免疫治疗提供了良好的条件.

**致谢:** 南通大学公共卫生学院统计学教研室沈毅帮助数据处理及统计.

#### 4 参考文献

- 1 Di Maio M, De Maio E, Perrone F, Pignata S, Daniele B. Hepatocellular carcinoma: systemic treatments. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S109-S114
- 2 徐青, 陈玉泉, 陈瑞新, 沈洪薰, 丁同明. 低剂量CTX、5-Fu对肝癌患者免疫状态的影响. *肝胆胰外科杂志* 1997; 9: 150-151
- 3 张文俊, 李兆申, 许国铭, 金震东, 邹多武, 邹晓平, 叶萍. 肝动脉插管化疗栓塞联合胸腺素 $\alpha 1$ 治疗原发性肝癌. *中华肝胆外科杂志* 2002; 8: 417-419
- 4 周信达. 肝癌复发转移防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 260-261
- 5 Uchino J, Une Y, Kawata A, Wakisaka Y, Hosokawa M. Postoperative chemoimmunotherapy for the treatment of liver cancer. *Semin Surg Oncol* 1993; 9: 332-336
- 6 周伟平, 吴孟超, 陈汉, 姚小平, 钱光相, 扬甲梅, 屠振兴, 崔贞福. 肝癌切除加免疫化疗对术后复发的影响. *中华外科杂志* 1995; 33: 35-37
- 7 骆成玉, 李世拥. 大肠癌患者外周血中癌细胞检测的临床意义. *中华实验外科杂志* 1999; 16: 199-200
- 8 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
- 9 Binah O. Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1147-1161
- 10 Beppler G. Thymosin alpha-1 as adjunct for conventional therapy of malignant tumors: a review. *Cancer Invest* 1994; 12: 491-496
- 11 Leichtling KD, Serrate SA, Sztein MB. Thymosin alpha 1 modulates the expression of high affinity interleukin-2 receptors on normal human lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1990; 12: 19-29
- 12 Stefanini GF, Foschi FG, Castelli E, Marsigli L, Biselli M, Mucci F, Bernardi M, Van Thiel DH, Gasbarrini G. Alpha-1-thymosin and transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma patients: a preliminary experience. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 209-215

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 《世界华人消化杂志》发表文章配发内容通知

**本刊讯** 从2006年开始,《世界华人消化杂志》将对述评、食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、基础研究、临床研究、前沿综述、研究快报、临床经验等主要栏目, 每篇文章配发以下内容, 请广大作者投稿前将以下内容补上.

(1)背景资料: 简要、精确概括此文的相关背景, 使读者更广泛的了解文章的相关知识, 更深入的理解文章的意义. (2)研发前沿: 简要介绍此文章研究领域中的研究热点、重点. (3)相关报道: 为了方便读者对您文章有更深入的理解, 或得到更系统、详实的相关知识, 请您提供与您文章有关的其他发表的研究报道的文章出处、链接等, 以方便读者进行更广泛的阅读. (4)创新盘点: 总结、提炼此文章与其他相关、或类似文章、报道的不同点以及创新之处, 以方便读者比较, 并有重点的阅读您的文章. (5)应用要点: 总结此文章在实际应用中的价值, 或对应用的指导、改进作用, 以及在将来应用中的前景. (6)名词解释: 将文章中出现的, 对文章的理解有重要意义, 而大部分读者可能不太熟悉, 或理解的不是很全面、准确, 或者这些词在此文中的意思异于他处的名词给予简单、直白、明了的解释说明. (7)同行评价: 编辑部将同行评议时审稿专家的意见中最能概括文章特点、价值、意义的词语、句子进行概括总结, 使读者可以对文章有个比较客观的认识. 以上各项表达用通俗易懂的1-3句话描述. (世界胃肠病学杂志社 2005-10-10)

# 慢性乙醇中毒所致大鼠肝损伤和肝细胞凋亡

伏建峰, 史清海, 岳新华, 张东辉

伏建峰, 史清海, 兰州军区乌鲁木齐总医院检验科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

岳新华, 兰州军区乌鲁木齐总医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

张东辉, 兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

伏建峰, 男, 1967生, 云南昆明人, 汉族, 2003年新疆医科大学硕士, 副主任技师, 主要从事临床生化研究.

通讯作者: 伏建峰, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市友好北路41号, 兰州军区乌鲁木齐总医院检验科. gs29xy@msn.com

电话: 0991-4992101-352

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

## Liver injury and hepatocyte apoptosis induced by chronic alcoholic intoxication in rats

Jian-Feng Fu, Qing-Hai Shi, Xin-Hua Yue, Dong-Hui Zhang

Jian-Feng Fu, Qing-Hai Shi, Department of Clinical Laboratory, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xin-Hua Yue, Department of Pathology, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Dong-Hui Zhang, Laboratory For Animal Science, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Jian-Feng Fu, Department of Clinical Laboratory, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, 41 Youhao North Road, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. gs29xy@msn.com

Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-09-30

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of hepatocyte apoptosis in the pathogenesis of alcohol-induced liver diseases (ALD) in rats.

**METHODS:** The rat model of liver injury was induced by combination of drinking and gastric irrigation of ethanol. The morphological changes of the liver were observed by routine HE staining under light microscope. The hepatocyte apoptosis was examined by TUNEL, and the levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were detected by the rate method.

**RESULTS:** At the end of the 5<sup>th</sup> week, the light and moderate steatosis appeared in ethanol-treated rat livers, the proportion of fatty degeneration was 40% (8/20); At the end of the 10<sup>th</sup> week, the proportion

was increased to 85% (17/20), and the morphological changes of alcoholic hepatitis (AH) were found in 45% (9/20) rats. The serum levels of ALT and AST (nkat/L) in ethanol-treated rats were significantly higher than those of the controls (5 wk:  $1\ 017 \pm 267$  vs  $550 \pm 133$ ,  $P < 0.05$ ; 10 wk:  $1\ 350 \pm 333$  vs  $967 \pm 150$ ,  $P < 0.05$ ; 10 wk:  $1\ 500 \pm 267$  vs  $767 \pm 250$ ,  $P < 0.05$ ; 2 wk:  $167 \pm 533$  vs  $850 \pm 183$ ,  $P < 0.05$ ), and ALT and AST levels at 10 wk were also higher than those at 5 wk ( $P < 0.05$ ). The TUNEL indexes (%) at 5 and 10 wk were  $0.33 \pm 0.49\%$  and  $2.03 \pm 1.61\%$  respectively ( $P < 0.05$ ), and the index at 10 wk was significantly different from that of the controls ( $0.10 \pm 0.21\%$ ,  $P < 0.05$ ). Furthermore, the TUNEL index of alcoholic hepatitis was significantly higher than that of alcoholic fatty liver ( $3.24 \pm 1.50\%$  vs  $1.12 \pm 0.63\%$ ,  $P < 0.05$ ). Both show the significant difference.

**CONCLUSION:** Chronic and excessive ethanol consumption can cause liver injury in rats. The amount and time of daily ethanol intake is closely related with the degrees of liver injury. Hepatocyte apoptosis may play an important role in the pathogenesis of ALD.

**Key Words:** Alcohol; Liver injury; Apoptosis; TUNEL

Fu JF, Shi QH, Yue XH, Zhang DH. Liver injury and hepatocyte apoptosis induced by chronic alcoholic intoxication in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2752-2756

## 摘要

**目的:** 研究肝细胞凋亡在实验性大鼠乙醇性肝病(ALD)发生、发展中的作用.

**方法:** 给大鼠饮用220 g/L的乙醇, 并结合540 g/L乙醇分次、少量灌胃的方法建立大鼠肝损伤模型; 常规HE染色, 光镜观察大鼠病理学形态改变, 用TUNEL法检测肝细胞凋亡, 速率法检测血清ALT, AST水平.

**结果:** 灌乙醇5 wk大鼠肝脏出现轻到中度脂肪变性, 脂滴为以大泡型为主的混合脂滴, 脂变率为40% (8/20); 10 wk, 85% (17/20)大鼠发生肝脂肪变, 45% (9/20)大鼠出现乙醇性肝炎的病理变化. 5, 10 wk大鼠血清ALT, AST均较同期对照组有显著升高 (5 wk:  $1\ 017 \pm 267$  vs  $550 \pm 133$ ,  $P < 0.05$ ; 1 wk:  $1\ 350 \pm 333$  vs  $967 \pm 150$ ,  $P < 0.05$ ; 10 wk:  $1\ 500 \pm 267$  vs  $767 \pm 250$ ,  $P < 0.05$ ; 2 wk:  $167 \pm 533$  vs  $850 \pm 183$ ,  $P < 0.05$ ), 且10 wk ALT和AST水平较5 wk也显著升高 ( $P < 0.05$ ). 乙醇性肝炎的TUNEL指数显著高于脂肪性肝病 ( $3.24 \pm 1.50\%$  vs  $1.12 \pm 0.63\%$ ,  $P < 0.05$ ). 以上结果均具有显著性差异.



$\pm 533$  vs  $850 \pm 183$ ,  $P < 0.05$ ); 灌乙醇10 wk血清ALT, AST较5 wk升高( $P < 0.05$ ), 有统计学意义. 5, 10 wk大鼠TUNEL指数分别为 $0.33 \pm 0.49\%$ 、 $2.03 \pm 1.61\%$ , 与同期对照组相比, 5 wk无显著差异, 10 wk有显著性差异( $P < 0.05$ ); 灌乙醇10 wk TUNEL指数较5 wk高, 有显著性差异( $P < 0.05$ ). 按病理损伤程度, 将实验组分成乙醇性肝炎(AH)组和乙醇性脂肪肝(AFL)组, 结果显示AH组TUNEL指数也较AFL组高( $3.24 \pm 1.50\%$  vs  $1.12 \pm 0.63\%$ ,  $P < 0.05$ ), 差异显著.

**结论:** 过量饮用乙醇可以引起中毒性肝脏疾病, 饮用乙醇及持续时间与肝损伤的发生有密切关系. 细胞凋亡在乙醇诱发肝损伤时可能起着重要作用.

**关键词:** 乙醇; 肝损伤; 凋亡; TUNEL

伏建峰, 史清海, 岳新华, 张东辉. 慢性乙醇中毒所致大鼠肝损伤和肝细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2752-2756  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2752.asp>

## 0 引言

乙醇性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是因长期过量饮酒引起的中毒性肝脏疾病, 主要有3种, 即: 乙醇性脂肪肝 (alcoholic fatty liver, AFL)、乙醇性肝炎 (alcoholic hepatitis, AH)和乙醇性肝硬化(alcoholic liver cirrhosis, ALC), 三者可单独出现, 也可同时并存或先后移行<sup>[1]</sup>, 重度乙醇中毒造成的肝损伤往往威胁到患者的生命<sup>[2]</sup>. 西方国家ALD发病率较高, 酗酒者患肝硬化是正常人的6.8倍, 在美国城市25-64岁人群中, 乙醇性肝硬化的死亡率居第三位<sup>[3]</sup>. 北京协和医院1982-1991报告ALD的病死率为1.1%, 1996年报告达9.1%<sup>[4]</sup>. 随着乙醇饮品消耗量的增多, ALD的发病率也随之上升. 关于ALD的发病机制, 目前尚未完全阐明. 过去只注意研究乙醇本身或其代谢产物对肝细胞的直接毒性作用以及营养失调、肝脏代谢异常及脂质过氧化等变化在ALD发病学中的作用<sup>[5]</sup>. 近年来, 发现免疫反应和细胞基因异常调控及凋亡机制参与ALD的病理损伤过程, 认为细胞凋亡是造成ALD的主要因素<sup>[6]</sup>.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雌性Wistar大鼠60只, 质量90-110 g, 本院动物实验科提供. 原位细胞凋亡检测试剂盒 (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling, TUNEL), 为德国Boehringer Mannheim公司产品. 浓缩缓冲液、DAB溶液和浓缩过氧化氢溶液, 购自北京中山生物技术有限公司. 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、血清总胆红素 (T BiLi) 检测试剂购自上海张江生物技术有限公司.

**1.2 方法** 雌性Wistar大鼠60只正常喂养1 wk后, 随机分为2组, 对照组10只/笼, 共20只; 实验组10只/笼, 共40只. 造模方法为: 先给大鼠随意饮用50 g/L的乙醇3 d, 第4天换成100 g/L, 以后每隔1 wk增加20 g/L直至180 g/L, 然后在每周增加10 g/L直至终浓度为220 g/L; 从饮用220 g/L的乙醇开始, 以540 g/L乙醇1.5 mL每日分3次灌胃至5 wk末; 以540 g/L乙醇1.2 mL每日分3次灌胃至10 wk末. 对照组饮用自来水, 灌胃时采用生理盐水, 灌胃方法及时间同上. 于开始灌胃5 wk末、10 wk末分别处死实验组各20只及对照组各10只, 腔静脉取血, 剖腹取肝脏. 细胞凋亡检测采用TUNEL法, 操作按说明书进行. TUNEL阳性计数选择标记效果较好的区域, 在400×视野中计数阳性细胞数, 阳性细胞数除以肝细胞总数作为细胞凋亡指数 (TUNEL指数), 每例计数5个视野, 取均值以百分数表示,  $< 1.5\%$ 属于低凋亡指数,  $\geq 1.5\%$ 属于高凋亡指数.

**统计学处理** 采用SPSS11.0统计分析软件, 数据以mean $\pm$ SD表示, 各组间比较采用两样本均数的 $t$ 检验.

## 2 结果

灌乙醇前实验组大鼠烦躁易激怒, 好斗; 灌乙醇5 wk后大鼠行动不稳, 步态蹒跚, 嗜睡, 鼠毛较乱, 晦暗无光泽, 进食量平均约为对照组的2/3, 灌乙醇10 wk后以上症状进一步加重, 对照组未见异常. 试验组大鼠体质量比同期对照组轻, 差异显著; 试验组大鼠肝质量较同期对照组有所升高, 经统计学分析无显著性差异 (表1).

**2.1 HE染色观察** 灌乙醇5 wk 40% (8/20) 大鼠发生脂肪肝变性, 脂滴为以大泡型为主的混合脂滴, 少数大鼠肝脂变程度较为严重 (图1A); 灌乙醇10 wk, 肝损伤进一步加重, 脂变率上升达85% (17/20), 45% (9/20)大鼠出现乙醇性肝炎的病理变化: 肝细胞脂肪变性, 伴有不同程度炎性细胞的浸润和点状坏死 (图1B). 试验组大鼠ALT, AST均比同期对照组高, 差异显著; 灌乙醇10 wk ALT, AST较灌乙醇5 wk升高, 有显著性差异, T BiLi在各组中变化不大, 无显著性差异 (表1).

**2.2 乙醇诱发肝损伤时大鼠肝细胞凋亡指数的变化** TUNEL阳性表达为胞核棕色或棕褐色 (图1C), 灌乙醇 5 wk及10 wk肝细胞试验组大鼠TUNEL指数均比同期对照组高, 灌乙醇5 wk差异不显著, 灌乙醇10 wk有显著性差异; 灌乙醇10 wk TUNEL指数比灌乙醇5 wk高, 差异显著 (表1). 将实验组 (灌乙醇5 wk, 灌乙醇10 wk)按肝组织损伤程度分为AFL组和AH组, 比较二者的TUNEL指数及血清ALT, AST水平, 结果AH组TUNEL指数较AFL组升高, 有显著性差异; AH组的血清ALT, AST水平均较AFL组高, 差异显著, 提示AH损伤较AFL更为严重 (表2).

表1 乙醇诱发肝损伤时大鼠体质量、肝质量和肝功能的变化

t/wk	分组	n	体质量 (g)	肝质量 (g)	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	T BiLi (μmol/L)	TUNEL指数 (%)
5	对照	10	214.7 ± 14.2	8.8 ± 0.8	550 ± 133	967 ± 150	6.4 ± 2.4	0.00
	实验	20	198.5 ± 10.4 <sup>a</sup>	9.0 ± 0.9	1 017 ± 267 <sup>a</sup>	1 350 ± 333 <sup>a</sup>	6.8 ± 2.2	0.33 ± 0.49
10	对照	10	248.2 ± 18.2	9.3 ± 0.9	767 ± 250	850 ± 183	6.5 ± 2.2	0.10 ± 0.21
	实验	20	227.3 ± 10.8 <sup>a</sup>	9.7 ± 1.1	1 500 ± 267 <sup>c</sup>	2 167 ± 533 <sup>c</sup>	6.5 ± 2.3	2.03 ± 1.61 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs 5 wk.

表2 AFL组与AH组TUNEL指数及血清ALT, AST水平的比较

分组	n	TUNEL指数 (%)	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)
AFL	16	1.12 ± 0.63	1 234 ± 183	1 467 ± 317
AH	9	3.24 ± 1.50 <sup>a</sup>	1 600 ± 167 <sup>a</sup>	2 600 ± 450 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs AFL.

### 3 讨论

建立乙醇性肝损伤的动物模型可模仿人体ALD的病理变化,在ALD的研究中具有重要的作用. Tsudamoto-French大鼠ALD模型是国外通用的ALD动物模型,该模型的肝脏病变基本上接近人类ALD病理变化,但是由于价格昂贵,在国内尚未得到应用<sup>[7-9]</sup>. 国内有人采用乙醇灌胃法,我们重复的结果显示大鼠的死亡率很高,实验难以进行. 我们采用给大鼠饮用220 g/L乙醇,并结合540 g/L乙醇分次,少量灌胃的方法成功地复制出了大鼠ALD的部分病变. 我们认为制备ALD动物模型时,必须保持动物血液中高乙醇含量,使其肝脏长期处于持续高氧化代谢状态,才能造成乙醇肝损伤<sup>[10]</sup>. 此外,我们选择雌性大鼠进行实验,主要是因为雌性大鼠较雄性大鼠更易于发生乙醇性肝损伤<sup>[11]</sup>,从而缩短造模时间. 在本研究中,灌乙醇5 wk大鼠肝脏即可出现轻到中度脂肪变性,脂变率为40% (8/20),脂滴为以大泡型为主的混合脂滴,未见明显的气球样变性;血清ALT,

AST均有不同程度升高,与对照组比,有显著性差异,血清T BiLi水平变化不大;肝脏轻度肿大,与同期对照组比较无显著性差异,体质量较同期对照组轻. 灌乙醇10 wk,脂肪变性进一步加重,85%大鼠发生脂肪肝变,45%大鼠肝组织损伤更严重,出现AH的病理变化,血清ALT, AST升高更为显著,与同期对照组比有显著性差异. 上述变化表明,过量饮用乙醇可引起中毒性肝脏疾病,同时也表明饮用乙醇量及持续时间与肝损伤的发生有密切关系<sup>[12-16]</sup>.

关于ALD的发病机制,目前尚未完全阐明. 过去只注意研究乙醇本身或其代谢产物对肝细胞的直接毒性作用以及营养失调<sup>[17]</sup>,肝脏代谢异常及脂质过氧化等变化在ALD发病学中的作用<sup>[18,19]</sup>. 近年来,发现细胞凋亡机制参与ALD的病理损伤过程,认为细胞凋亡是造成ALD的主要因素. 细胞凋亡 (cell apoptosis) 或程序化细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程. 凋亡是正常细胞现象,但也可被许多外部因素激发,提示激活凋亡控制基因的机制可以不同. 肝细胞凋亡发生在肝发育和成人肝的肝细胞更新时,也发生在各种病毒、免疫、肿瘤和药物引起的肝脏疾病<sup>[20-23]</sup>. 检测凋亡细胞是利用细胞凋亡时产生特征性DNA片段,以TdT介导的dUTP缺口末端标记技术原位显示凋亡细胞的形态和分布. 实验中

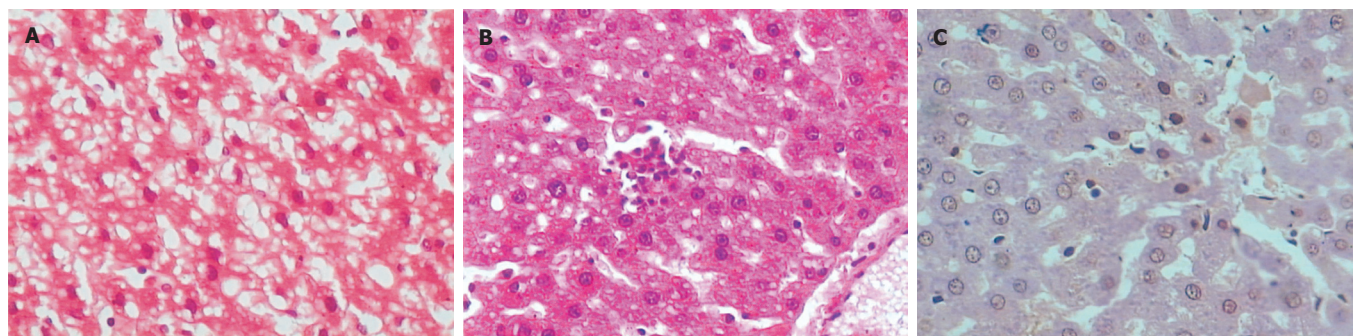


图1 大鼠肝脏组织学 (×200). A: 灌胃5 wk HE大量以大泡型为主的混合脂滴; B: 灌胃10 wk HE肝实质内有点状坏死区; C: 灌胃10 wk TUNEL染色显示凋亡细胞.



可见TUNEL阳性细胞核染成棕色, 与周围肝细胞比, 体积缩小、核固缩明显. 本研究中, 对照组、灌乙醇5 wk、灌乙醇10 wk肝细胞平均TUNEL指数(%)分别为 $0.10 \pm 0.21$ ,  $0.33 \pm 0.49$ ,  $2.03 \pm 1.61$ , 尤其灌乙醇10 wk, TUNEL指数 $>1.5\%$ , 属于高凋亡指数. 表明长期过量饮用乙醇的大鼠肝细胞凋亡指数明显高于正常大鼠, 提示乙醇诱发大鼠肝细胞凋亡与乙醇的作用时间和量均有关系. 我们同时比较了AFL组与AH组, AH组TUNEL指数为 $3.24 \pm 1.50\%$ , 也属高凋亡指数, 与文献[24]报道基本一致. AH组血清ALT为 $1\ 600 \pm 167$  nkat/L, AST为 $2\ 600 \pm 450$  nkat/L, 与AFL组比较, 差异显著, 表明AH肝组织损伤程度较AFL更为严重, 并且此种损伤伴有肝细胞高凋亡指数的出现, 进一步表明肝细胞凋亡在乙醇诱发肝损伤时可能起着极其重要的作用<sup>[25]</sup>. 关于在ALD中肝细胞发生凋亡的机制尚无统一认识, 目前认为与以下因素密切相关: 细胞色素P450IIE1 (cytochrome P450IIE1, CYP1IIE1) 的活化<sup>[26]</sup>; Fas及其配体的作用<sup>[27-29]</sup>; 肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )和受体(TNFR1)活性增高<sup>[30]</sup>等. 这将是今后研究的方向.

#### 4 参考文献

- 1 Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J* 2001; 15: 1335-1349
- 2 O'Keefe C, McCormick PA. Severe acute alcoholic hepatitis: an audit of medical treatment. *Ir Med J* 2002; 95: 108-109
- 3 Kerr WC, Fillmore KM, Marvy P. Beverage-specific alcohol consumption and cirrhosis mortality in a group of English-speaking beer-drinking countries. *Addiction* 2000; 95: 339-346
- 4 Kwon HJ, Kim YY, Choung SY. Amelioration effects of traditional Chinese medicine on alcohol-induced fatty liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5512-5516
- 5 Cardin R, D'Errico A, Fiorentino M, Cecchetto A, Naccarato R, Farinati F. Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease. *Alcohol* 2002; 37: 43-48
- 6 Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 1021-1029
- 7 Murohisa G, Kobayashi Y, Kawasaki T, Nakamura S, Nakamura H. Involvement of platelet-activating factor in hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats given endotoxin. *Liver* 2002; 22: 394-403
- 8 Masson S, Scotte M, Garnier S, Francois A, Hiron M, Teniere P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis* 2000; 5: 173-179
- 9 Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M, Thurman RG. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J Biol Chem* 2001; 276: 36664-36672
- 10 Abraham P, Wilfred G, Ramakrishna B. Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clin Chim Acta* 2002; 325: 117-125
- 11 Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, Rahemtulla A, Thomas P, Tipoe GL, Su GL, Dannenberg AJ. Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1348-G1356
- 12 Gordon H. Detection of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 297-302
- 13 Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 2000; 47: 167-175
- 14 McGregor AH, More LJ, Simpson KJ, Harrison DJ. Liver death and regeneration in paracetamol toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22: 221-227
- 15 Kanbagli O, Balkan J, Aykac-Toker G, Uysal M. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1482-1484
- 16 Naveau S, Giraud V, Ganne N, Perney P, Hastier P, Robin E, Pessione F, Chossegros P, Lahmek P, Fontaine H, Ribard D, Dao T, Filoche B, El Jammal G, Seyrig JA, Dramard JM, Chousterman M, Pillegand B. Patients with alcoholic liver disease hospitalized in gastroenterology. A national multicenter study. *Gastroenterol Clin Biol* 2001; 25: 131-136
- 17 Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition* 1999; 15: 583-589
- 18 Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM. Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology* 2003; 125: 854-867
- 19 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecy B, Mullauer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schult-Hermann R. Inherent increase of apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology* 1997; 25: 906-912
- 20 Papakyriakou P, Tzardi M, Valatas V, Kanavaros P, Karydi E, Notas G, Xidakis C, Kouroumalis E. Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease. *Apoptosis* 2002; 7: 133-141
- 21 Loguercio C, de Girolamo V, Cuomo A, Argenzio F, Iannotta C, Disalvo D, Grella A, del Vecchio Blanco C. Determination of plasma alpha-glutathione-S-transferases in chronic alcohol abusers: relationship with alcohol intake and liver involvement. *Alcohol Alcohol* 1998; 33: 366-372
- 22 Degoul F, Sutton A, Mansouri A, Cepanec C, Degott C, Fromenty B, Beaugrand M, Valla D, Pessayre D. Homozygosity for alanine in the mitochondrial targeting sequence of superoxide dismutase and risk for severe alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 1468-1474
- 23 Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M, Vidali M, Sartori M, Rigamonti C, Day CP, Albano E. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 38-45
- 24 Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34: 248-253
- 25 Ziol M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, Trinchet JC, Beaugrand M, Guillet JG, Guettier C. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34: 254-260
- 26 Nieto N, Greenwel P, Friedman SL, Zhang F, Dannenberg AJ, Cederbaum AI. Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 20136-20145
- 27 Jones RA, Johnson VL, Buck NR, Dobrota M, Hinton RH, Chow SC, Kass GE. Fas-mediated apoptosis in mouse hepatocytes involves the processing and activation of caspases. *Hepatology* 1998; 27: 1632-1642
- 28 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
- 29 Matsuki Y, Li L, Hsu HC, Yang PA, Zheng R, Edwards CK 3rd, Chaudry IH, Zhang HG, Mountz JD. Soluble Fas gene



therapy protects against Fas-mediated apoptosis of hepatocytes but not the lethal effects of Fas-induced TNF- $\alpha$  production by Kupffer cells. *Cell Death Differ* 2002; 9: 626-635  
30 Stejskal D, Ruzicka V, Fanfrdlova G, Kolar V, Bartek J. High

adiponectin and TNF- $\alpha$  levels in moderate drinkers suffering from liver steatosis: comparison with non drinkers suffering from similar hepatopathy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005; 149: 93-99

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 更正与说明专栏

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道，特设“更正与说明”固定专栏，包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目，不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明，而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此，我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》，给更正与说明栏目投稿。投稿者凭文章的编号，可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3 a。中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1 204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要。这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助，内容丰富、数据准确，体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向，可为相关领域大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路。(世界胃肠病学杂志社 2005-10-10)

## • 消息 •

### 技法与经验

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

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法 1.1 原理；1.2 适应证；1.3 器材准备；1.4 步骤；1.5 实例

2 结果

3 讨论 3.1 并发症；3.2 优点和缺点；3.3 经验与技巧

4 参考文献

## • 消息 •

### 专家门诊

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台，邀请本刊编委为专栏撰稿，每期1-3个专家门诊。写作格式如下：

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言；1 诊断；2 治疗；3 特色；4 门诊时间

# 大肠癌中胃泌素、生长抑素 mRNA 的表达与细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 的关系

茆家定, 吴佩, 夏祥厚, 胡济群

茆家定, 吴佩, 夏祥厚, 胡济群, 皖南医学院弋矶山医院普外科 安徽省芜湖市 241001

茆家定, 男, 1971-02-05生, 安徽省芜湖市人, 汉族, 2003年皖南医学院硕士研究生毕业, 讲师、主治医师, 主要从事胃肠激素与消化道肿瘤的研究。

安徽省自然科学基金资助项目, No. 03043704

安徽省教育厅自然科学基金资助项目, No. 2002Kj307

通讯作者: 吴佩, 241001, 安徽省芜湖市赭山西路93号, 皖南医学院弋矶山医院普外科. wp5708@sina.com

电话: 0553-5739343

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

## Relationship between expression of gastrin, somatostatin mRNA and cell apoptosis and Bcl-2, Bax in large intestinal carcinoma

Jia-Ding Mao, Pei Wu, Xiang-Hou Xia, Ji-Qun Hu

Jia-Ding Mao, Pei Wu, Xiang-Hou Xia, Ji-Qun Hu, Department of General Surgery, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Supported by Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 03043704, and Natural Science Foundation of Education Office of Anhui Province, No. 2002Kj307

Correspondence to: Professor Pei Wu, Department of General Surgery, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. wp5708@sina.com

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

## Abstract

**AIM:** To explore the correlations between the expression of somatostatin (SS), gastrin (GAS) mRNA and cell apoptosis index (AI) and Bcl-2, Bax in large intestinal cancer.

**METHODS:** The expression of GAS and SS genes were detected in 62 colorectal cancer patients by nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the apoptosis of the cells was detected by TUNEL method. The protein expression of Bcl-2, Bax, GAS, and SS were detected using immunohistochemical staining (S-P method).

**RESULTS:** The expression of GAS and SS mRNA and protein were basically consistent. The AI in SS high and moderate expression patients with large intestinal cancer was remarkably higher than that in SS low expression ones ( $q = 5.06, 3.95$ , both  $P < 0.01$ ), while it was just opposite in GAS positive patients ( $q = 6.66, 6.33$ ,  $P < 0.01$ ). The positive rates of Bax and Bcl-2 expression had significant difference between SS (or GAS)

high, moderate and low expression patients with large intestinal cancer (Bax:  $\chi^2 = 9.24, 6.91, P < 0.05$ ; Bcl-2:  $\chi^2 = 7.17, 13.83, P < 0.05$ ). The positive rate of Bax expression in SS high (80%, 8/10) and moderate (76.5%, 13/17) expression patients was notably higher than that in the low expression ones (40.0%, 14/35) ( $\chi^2 = 5.24, 6.09, P < 0.05$ ), but the rate of Bcl-2 expression was just opposite ( $\chi^2 = 4.71, 4.70, P < 0.05$ ). The positive rate of Bcl-2 expression in GAS high (90.9%, 10/11) and moderate (86.7%, 13/15) expression patients was markedly higher than that in the low expression ones (44.4%, 16/36) ( $\chi^2 = 5.60, 7.69, P < 0.05$ ), but the positive rate of Bax expression in GAS high expression patients (27.3%, 3/8) was obviously lower than that in the low expression ones (69.4%, 25/36) ( $\chi^2 = 4.59, P < 0.05$ ). Bax expression was not significantly different between moderate and low GAS positive patients. The value of GAS/SS was positively correlated with Bcl-2 expression ( $r = 0.34, P < 0.01$ ), but negatively with the AI value and Bax expression ( $r = -0.546, P < 0.01; r = -0.299, P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** GAS and SS play important roles in the regulation and control of cell apoptosis in large intestinal carcinoma, and the mechanism may be related to the aberrant expression of Bcl-2 and Bax.

**Key Words:** Large intestinal cancer; Gastrin; Somatostatin; Bcl-2; Bax

Mao JD, Wu P, Xia XH, Hu JQ. Relationship between expression of gastrin, somatostatin mRNA and cell apoptosis and Bcl-2, Bax in large intestinal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2757-2761

## 摘要

**目的:** 探讨大肠癌组织中胃泌素(GAS)、生长抑素(SS) mRNA及蛋白的表达与大肠癌细胞凋亡指数(AI)和 Bcl-2、Bax的相关性。

**方法:** 采用巢式RT-PCR方法检测62例大肠癌组织中 GAS、SS的基因表达, 用TUNEL法检测细胞凋亡情况, 大肠癌组织中GAS、SS、Bcl-2、Bax的蛋白表达采用

免疫组织化学S-P法。

**结果：**大肠癌组织中GAS、SS mRNA的表达与其蛋白表达基本一致。在大肠癌组织SS高表达组、中表达组的AI明显高于SS低表达组( $q = 5.06, q = 3.95$ , 均 $P < 0.01$ ); 而在GAS各表达组中的AI变化与此相反( $q = 6.66, q = 6.33$ , 均 $P < 0.01$ )。Bax、Bcl-2阳性表达率在SS和GAS低表达组、中表达组、高表达组三组间相比较存在着明显差别( $\chi^2 = 9.24, \chi^2 = 6.91; \chi^2 = 7.17, \chi^2 = 13.83$ , 均 $P < 0.05$ ), 其中Bax在SS高表达组(80%, 8/10)、中表达组(76.5%, 13/17)的阳性表达率明显高于低表达组(40.0%, 14/35)( $\chi^2 = 5.24, \chi^2 = 6.09$ , 均 $P < 0.05$ ); Bcl-2与其相反( $\chi^2 = 4.71, \chi^2 = 4.70$ , 均 $P < 0.05$ )。Bcl-2在GAS高表达组(90.9%, 10/11)、中表达组(86.7%, 13/15)的阳性表达率明显高于低表达组(44.4%, 16/36)( $\chi^2 = 5.60, \chi^2 = 7.69$ , 均 $P < 0.05$ ); Bax在GAS高表达组(27.3%, 3/8)的阳性表达率明显低于低表达组(69.4%, 25/36)( $\chi^2 = 4.59, P < 0.05$ ); 而Bax在GAS中表达组(46.7%, 7/15)的阳性表达率低于低表达组, 但其无明显差别。GAS/SS积分比值变化与Bcl-2呈正相关( $r = 0.34, P < 0.01$ ), 与AI、Bax呈负相关( $r = -0.546, P < 0.01; r = -0.299, P < 0.05$ )。

**结论：**GAS、SS对大肠癌细胞凋亡的调控可能与Bcl-2、Bax的异常表达有关。

**关键词：**大肠癌; 胃泌素; 生长抑素; Bcl-2; Bax

茆家定, 吴佩, 夏祥厚, 胡济群. 大肠癌中胃泌素、生长抑素mRNA的表达与细胞凋亡及Bcl-2、Bax的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2757-2761  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2757.asp>

## 0 引言

胃泌素(gastrin, GAS)、生长抑素(somatostatin, SS)分别通过其受体对胃肠道黏膜起着十分重要的生理调节作用, GAS、SS蛋白表达的异常与肿瘤发生有关, 近来研

究发现SS可抑制大肠癌细胞的增殖, 促进细胞的凋亡, 而GAS的作用与其相反<sup>[1-5]</sup>, 但其对大肠癌细胞凋亡的调控是通过何种机制来实现仍处于探索阶段. 我们采用巢式RT-PCR、免疫组织化学S-P法和分子生物学细胞原位凋亡检测技术中的TUNEL法, 检测大肠癌组织中GAS、SS、Bcl-2、Bax及细胞凋亡的表达情况, 探讨GAS、SS与凋亡指数(apoptosis, AI)及大肠癌细胞凋亡调控基因**bcl-2**、**bax**的相关性. 进一步了解GAS、SS是否通过对**bcl-2**、**bax**基因的影响来实现对大肠癌细胞凋亡的调控。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2003/2005大肠癌手术切除的新鲜标本62例, 手术前均未行化疗, 其中直肠癌41例, 结肠癌21例, 女性22例, 男性40例, 年龄28-77岁, 平均年龄 $50.9 \pm 7.8$ 岁; 大体类型为溃疡型38例, 隆起型21例, 浸润型3例; 组织学类型: 乳头状腺癌18例, 管状腺癌24例, 黏液腺癌7例, 印戒细胞癌7例和未分化癌6例; Dukes分期: A、B期34例, C、D期28例。

兔抗人胃泌素、生长抑素多克隆抗体, 鼠抗人Bcl-2、Bax单克隆抗体, 免疫组化试剂盒均由北京中山生物技术有限公司提供. 细胞凋亡检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供. 逆转录试剂盒、SK312 Trizol试剂、Taq DNA聚合酶, Marker, dNTP均由上海生工公司提供. GAS mRNA、SS mRNA扩增引物由上海生工公司合成(表1)。

### 1.2 方法

**1.2.1 巢式RT-PCR方法检测GAS、SS mRNA表达**  
(1)总RNA提取和cDNA合成: 取大肠癌组织标本各100 mg, 剪刀剪碎, 移入匀浆器, 加入1 mL Trizol试剂, 匀浆. 总RNA提取和cDNA合成具体步骤参照文献[6]报道. (2)cDNA的PCR扩增: 第一轮PCR: 总反应体系为25  $\mu$ L, cDNA 2.5  $\mu$ L, Taq DNA聚合酶1 U, 加入引物1、引物2, 94℃初始变性5 min后, 按表1所示条件在

表1 RT-PCR所用各引物的分子生物学特征

引物名称	引物序列	PCR条件	产物长度
GAS	1: 5' TATGTGCTGATCTTTGCACTGGCT3' (sense: 6 307-6 330)	94℃, 30 s	282 bp
	2: 5' CTCATCCTCAGCACTGCGGCGGCC3' (antisense: 6 718-6 695)	60℃, 45 s	
		72℃, 45 s	
GAS	3: 5' GAGCTACCCTGGCTGGAGCAGCAG3' (sense: 6 415-6 438)	94℃, 30 s	174 bp
	2: 5' CTCATCCTCAGCACTGCGGCGGCC3' (antisense: 6 718-6 695)	60℃, 45 s	
		72℃, 45 s	
SS	1: 5' ATGCTGTCCTGCCGCTCCAG3' (sense: 106-126)	94℃, 30 s	348 bp
	2: 5' ACAGGATGTGAAAGTCTTCCA3' (antisense: 1 330-1 310)	60℃, 45 s	
		72℃, 45 s	
SS	3: 5' GCTGCTGCCGCGGGGAAGCAG3' (sense: 223-243)	94℃, 30 s	231 bp
	2: 5' ACAGGATGTGAAAGTCTTCCA3' (antisense: 1 330-1 310)	60℃, 45 s	
		72℃, 45 s	



Perkin-Elmer 480扩增仪上进行30个循环扩增, 最后延伸6 min. 以5×缓冲液2.5 μL cDNA作为空白对照, 其它反应条件和参数不变. 第二轮PCR: 除引物更换为引物2、引物3外, 其它反应条件和参数不变. 各基因每轮扩增产物片段长度(表1). (3)PCR产物分析: 取6 μL扩增产物在50 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳. 取下聚丙烯酰胺凝胶, 100 mL/L乙醇, 50 g/L冰乙酸固定20 min. 蒸馏水冲洗, 2 g/L AgNO<sub>3</sub>染色30 min. 25 g/L碳酸钠, 0.16 g/L甲醛溶液显色, 100 g/L冰乙酸停止显像. 观察结果并对图像进行分析.

1.2.2 免疫组化(S-P法) 按照试剂盒要求检测62例大肠癌组织中GAS、SS、Bcl-2、Bax的表达情况, 以正常胰腺组织作SS阳性对照, 以正常胃窦黏膜作GAS阳性对照, 正常扁桃体组织作Bcl-2阳性对照, 以何杰金淋巴瘤组织作Bax阳性对照, 用0.01 mol/L PBS替代一抗作阴性对照.

1.2.3 组织细胞原位凋亡检测采用TUNEL法 具体步骤按试剂盒说明书操作, 阴性对照标记液中无TDT, 阳性对照反应液以1 mg/L Dnase处理10 min.

1.2.4 结果判断标准 SS、GAS主要定位于细胞质, 部分定位于细胞膜上, 先根据切片中的细胞质染色深浅打分: 细胞质无染色为1分, 浅黄色为2分, 棕黄色为3分, 棕褐色为4分; 再按切片中阳性细胞数占整个肿瘤细胞的百分数比例评分(取10个高倍视野, 每个高倍视野计数100个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 计算其平均数): <5%为1分, 5-10%为2分, 11-20%为3分, >21%为4分. GAS、SS反应半定量积分按其阳性细胞数量与染色深浅的二项积分的乘积数来表示, 按GAS、SS的反应强度的半定量积分的高低各分为三组: 1-3分为低表达组, 4-8分为中表达组, 9-16分为高表达组.

Bcl-2、Bax主要定位于细胞质, 参照Fromowitz方法对组织中棕黄色反应产物根据其染色强度, 阳性细胞数的百分比作半定量处理. 无着色计0分, 浅黄色计1分, 棕黄色计2分, 棕褐色计3分; 阳性细胞数占整个肿瘤细胞的百分数比例评分(取10个高倍视野, 每个高倍视野计数100个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 计算其平均数): ≤25%计1分, 26-50%计2分, 51-75%计3分, >75%计4分. 以上两项相加, ≤2分为阴性(-), 3分为阳性(+), 4分为中度阳性(++), ≥5分为强阳性(+++). TUNEL阳性物质定位于细胞核, 偶见散在于细胞质. 凋亡指数为每例标本检查20个高倍视野, 计算其中TUNEL阳性细胞与总的腺体细胞之比.

统计学处理 大肠癌组织中SS、GAS不同表达强度之间Bcl-2、Bax的比较采用 $\chi^2$ 检验, 而AI的比较采用 $q$ 检验和GAS、SS表达积分的比值变化与Bcl-2、Bax的相关性分析采用Spearman等级相关检验. 所有的数据均使用专业统计软件包SPSS10.0进行统计分析.

## 2 结果

2.1 大肠癌组织中GAS、SS mRNA的表达 GAS、SS mRNA逆转录巢式PCR扩增最终产物分别为174 bp、231 bp. 62例大肠癌组织中GAS、SS mRNA表达阳性率分别为54.8%(34/62)、51.6%(32/62), 与GAS、SS的蛋白表达基本一致.

2.2 大肠癌GAS、SS各组间AI的检测 在大肠癌组织GAS高表达组的细胞凋亡指数 $3.56 \pm 2.48\%$ 、GAS中表达组的细胞凋亡指数( $4.24 \pm 2.71\%$ )明显低于低表达组的细胞凋亡指数( $8.06 \pm 2.88\%$ ), 有显著性差异( $q_{高与低} = 6.66$ ,  $q_{中与低} = 6.33$ , 均 $P < 0.01$ ); 而AI在大肠癌组织SS不同表达强度之间的变化与其相反( $q_{高与低} = 5.06$ ,  $q_{中与低} = 3.95$ , 均 $P < 0.01$ ). 结果表明, AI随着大肠癌组织SS表达强度的增强而升高, 随着GAS表达积分的增加而降低(表2).

表2 大肠癌SS、GAS不同表达强度之间AI的比较 (mean ± SD)

SS和GAS表达强度	<i>n</i>	AI	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
SS				
低表达组	35	5.18 ± 3.40	7.90	<0.01
中表达组	17	7.69 ± 2.84 <sup>a</sup>		
高表达组	10	9.08 ± 1.63 <sup>a</sup>		
GAS				
低表达组	36	8.06 ± 2.88	16.72	<0.01
中表达组	15	4.24 ± 2.71 <sup>b</sup>		
高表达组	11	3.56 ± 2.48 <sup>b</sup>		

与低表达组比较, 经 $q$ 检验, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

表3 大肠癌SS、GAS表达强度与Bax、Bcl-2表达率的关系

SS和GAS表达强度	<i>n</i>	Bcl-2		Bax	
		+(%)	-	+(%)	-
SS					
高表达	10	4 (40.0) <sup>a</sup>	6	8 (80.0) <sup>a</sup>	2
中表达	17	8 (47.1) <sup>a</sup>	9	13 (76.5) <sup>a</sup>	4
低表达	35	27 (77.1)	8	14 (40.0)	21
GAS					
高表达	11	10 (90.9) <sup>b</sup>	1	3 (27.3) <sup>c</sup>	8
中表达	15	13 (86.7) <sup>b</sup>	2	7 (46.7)	8
低表达	36	16 (44.4)	20	25 (69.4)	11

与低表达组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> $P < 0.05$ .

2.3 大肠癌GAS、SS各组间Bcl-2、Bax表达的检测 Bcl-2、Bax阳性表达率在SS和GAS低表达组、中表达组、高表达组三组间相比较存在着明显差别( $\chi^2_{Bax(SS)} = 9.24$ ,  $\chi^2_{Bax(GAS)} = 6.91$ ;  $\chi^2_{Bcl-2(SS)} = 7.17$ ,  $\chi^2_{Bcl-2(GAS)} = 13.83$ , 均 $P < 0.05$ ), 其中Bax在SS高表达组(80%, 8/10)、中表达组(76.5%, 13/17)的阳性表达率明显高于低表达组(40.0%, 14/35)( $\chi^2_{高与低} = 5.24$ ,  $\chi^2_{中与低} = 6.09$ , 均 $P < 0.05$ ); Bcl-2与其相反( $\chi^2_{高与低} = 4.71$ ,  $\chi^2_{中与低} = 4.70$ , 均 $P < 0.05$ ). Bcl-2在

GAS高表达组(90.9%, 10/11)、中表达组(86.7%, 13/15)的阳性表达率明显高于低表达组(44.4%, 16/36)( $\chi^2_{\text{高与低}} = 5.60$ ,  $\chi^2_{\text{中与低}} = 7.69$ , 均 $P < 0.05$ ); Bax在GAS高表达组(27.3%, 3/8)的阳性表达率明显低于低表达组(69.4%, 25/36)( $\chi^2 = 4.59$ ,  $P < 0.05$ ); 而Bax在GAS中表达组(46.7%, 7/15)的阳性表达率低于低表达组, 但无明显差别( $P > 0.05$ )(表3). GAS/SS积分比值变化与Bcl-2呈正相关( $r = 0.34$ ,  $P < 0.01$ ), 与AI、Bax呈负相关( $r_{\text{AI}} = -0.546$ ,  $P < 0.01$ ;  $r_{\text{Bax}} = -0.299$ ,  $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

近来研究已证实许多组织生长受激素调节, 这些组织发生肿瘤仍然受激素控制, 胃肠激素广泛存在于人体组织中, 它的异常表达可导致组织细胞生长调节失控, 形成肿瘤<sup>[7-14]</sup>. GAS是一种胃肽, 对消化道黏膜有营养作用, 主要由消化道的G细胞分泌, GAS的异常表达可导致胃肠道细胞的生长失控, 形成肿瘤<sup>[15-19]</sup>. 有研究发现GAS高表达易发生大肠癌, 同时可促进大肠癌的生长<sup>[20,21]</sup>. 干扰GAS的作用可能成为大肠癌治疗新的靶点. 细胞凋亡是近年来肿瘤研究的热点, 它是一种凋亡相关基因共同调控的自身程序化死亡, 它不仅能保持机体处于稳定状态中, 而且对肿瘤的发生、发展及治疗等都起着重要作用. *bax/bcl-2*基因是*bcl-2*家族中一对正负调节基因, 近年来研究发现肿瘤细胞凋亡的调控不仅与*bax*、*bcl-2*基因蛋白表达异常有关, 而且与*bax/bcl-2*的半定量积分比值成负相关<sup>[22-27]</sup>. 大肠癌的发生与多种凋亡调控基因失衡有关. 近年来研究发现GAS、SS与大肠癌的细胞凋亡密切相关, GAS对某些消化道上皮及其来源肿瘤细胞的凋亡可能具有抑制作用<sup>[28,29]</sup>. Wang *et al*<sup>[30]</sup>研究发现, 外源性GAS可通过诱导*bcl-2*基因的蛋白表达增加, 来抑制MKN45细胞的凋亡; 但可被其受体拮抗剂丙谷胺所阻断. 董家鸿 *et al*<sup>[31]</sup>研究发现, GAS能促进胆管癌细胞*bcl-2*基因的表达, 而对*bax*基因的表达无影响, 认为胃泌素是*bcl-2*基因激活与过度表达的重要因素. Hartwich *et al*<sup>[32]</sup>研究发现, GAS抑制细胞凋亡可能是通过诱导凋亡抑制基因*bcl-2* mRNA的过度表达和抑制*bax*基因的表达而实现的. 可见, 目前国内外有关GAS对*bax*基因的影响意见仍不一致.

而SS是由D细胞分泌的一种环状多肽类激素, 广泛存在于人体的内分泌及外分泌系统中, 在人体内具有广泛的生物学效应, 主要表现抑制作用, 它对人体多种激素的分泌具有重要的调节作用. 大量研究表明SS及其类似物不仅能抑制内分泌肿瘤的增殖, 对消化系统实体性肿瘤亦存在抑制作用, 它可通过与特异性的G蛋白偶联型受体SSTR<sub>1</sub>-SSTR结合或通过抑制促肿瘤生长的生长因子和激素的合成与分泌而抑制肿瘤的发

生和肿瘤细胞的增殖, 促进其细胞的凋亡<sup>[33-36]</sup>. SS及其类似物可抑制肿瘤细胞的生长在多种肿瘤组织中已得到证实, 但其抑制肿瘤生长的具体分子机制仍不十分清楚. Sharma *et al*<sup>[37]</sup>在体外用SS类似物(SSAS)奥曲肽(octreotide)对乳腺癌CHO-K<sub>1</sub>细胞研究发现, 奥曲肽可通过快速时间依赖性诱导Wtp53表达和*bax*表达增加, 从而引起肿瘤细胞发生凋亡. 近来通过对腹膜巨噬细胞凋亡的研究还发现, SS可通过上调不依赖于p53蓄积的*bax*基因和NO来实现对凋亡的调控<sup>[38]</sup>. 这一点在急性胰腺炎腺泡细胞凋亡的研究中得到了进一步证实<sup>[39]</sup>. 可见SS和SSAS诱导细胞凋亡的基因调控途径可能与凋亡细胞的种类有关. 唐卓斌 *et al*<sup>[40]</sup>研究发现SS类似物奥曲肽不仅可使SGC-7901细胞中的*bax* mRNA和蛋白表达增加, 而且还可使*bcl-2*基因的mRNA和蛋白表达显著减少, 认为奥曲肽有可能通过上调*bax*基因和下调*bcl-2*基因的mRNA和蛋白表达, 诱导SCC-7901细胞凋亡, 这可能是奥曲肽抑制胃癌生长机制之一, 我们的研究与其一致. 这为SS类似物奥曲肽应用到临床治疗胃结肠癌提供了新的思路和实验依据.

我们实验研究结果发现大肠癌组织中GAS、SS mRNA的表达与其蛋白表达基本一致. 通过对大肠癌组织GAS、SS不同表达组中的凋亡指数以及*bax*、*bcl-2*基因表达结果的检测还发现: 在大肠癌组织中SS表达越强, 凋亡指数越高; *bax*基因的阳性表达率随着SS积分表达的增加而升高, 而*bcl-2*的表达随着SS表达的增强趋于下降. GAS表达水平愈高, AI越低, *bcl-2*基因的表达越强, 而*bax*基因表达与此相反. 实验提示, SS能促进大肠癌细胞凋亡, 抑制肿瘤的生长, SS对大肠癌细胞凋亡的调控可能是通过诱导*bax*基因的过度表达和下调*bcl-2*基因活性而实现的; 而GAS主要促进大肠癌细胞的增殖, 抑制细胞凋亡, 其机制可能与SS相反. 近年来研究发现大肠癌组织GAS/SS比值的变化能够反映大肠癌的部分生物学特性, 如大肠癌的发生、发展及其恶性表型、分化程度、临床分期以及估计预后情况等, 其GAS/SS积分比值的升高在肿瘤发生、发展上具有更重要的意义<sup>[1]</sup>. 本实验结果显示, 大肠癌组织GAS、SS的表达水平与细胞凋亡及其调控基因*bax*、*bcl-2*表达关系密切. GAS、SS的异常表达导致大肠癌细胞凋亡调控基因蛋白的表达异常, 特别是*bcl-2/bax*系统的失衡, 可能是大肠癌发生、发展的重要原因之一.

### 4 参考文献

- 1 吴佩, 涂久生, 芮景, 黄鹤, 黄文斌, 袁平. 大肠癌胃泌素、生长抑素表达与细胞增殖和凋亡的关系. 中华实验外科杂志 2003; 20: 947
- 2 Yu HG, Schrader H, Otte JM, Schmidt WE, Schmitz F. Rapid tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130Cas by gastrin in human colon cancer cells. *Biochem*



- Pharmacol 2004; 67: 135-146
- 3 Wu H, Rao GN, Dai B, Singh P. Autocrine gastrins in colon cancer cells Up-regulate cytochrome c oxidase Vb and down-regulate efflux of cytochrome c and activation of caspase-3. *J Biol Chem* 2000; 275: 32491-32498
- 4 唐卓斌, 刘为纹. 胃黏膜癌变过程中胃泌素、生长抑素蛋白表达及其意义. *中华消化杂志* 2001; 21: 693-694
- 5 孙明军, 姜若兰, 傅宝玉. 促胃液素对人结肠癌细胞株的生长调控及受体后信息传导. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 314-317
- 6 Mou DC, Cai SL, Peng JR, Wang Y, Chen HS, Pang XW, Leng XS, Chen WF. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2002; 86: 110-116
- 7 Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A, Wang TC. Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* 2000; 106: 533-539
- 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 Qu X, Xiao D, Weber HC. Human gastrin-releasing peptide receptor mediates sustained CREB phosphorylation and trans-activation in HuTu 80 duodenal cancer cells. *FEBS Lett* 2002; 527: 109-113
- 10 Wroblewski LE, Pritchard DM, Carter S, Varro A. Gastrin-stimulated gastric epithelial cell invasion: the role and mechanism of increased matrix metalloproteinase 9 expression. *Biochem J* 2002; 365: 873-879
- 11 Lachowicz-Ochedalska A, Rebas E, Kunert-Radek J, Winczyk K, Pawlikowski M. Effects of somatostatin and its analogues on tyrosine kinase activity in rodent tumors. *Biol Signals Recept* 2000; 9: 255-259
- 12 张丰深, 范亚川, 何振平. 消化道肿瘤内分泌治疗的研究进展. *临床消化病杂志* 2003; 15: 282-284
- 13 Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Starzynska T, Marlicz K, Hartwich A, Zuchowicz M, Darasz Z, Papiez D, Hahn EG. Gastric MALT-lymphoma, gastrin and cyclooxygenases. *Acta Gastroenterol Belg* 2002; 65: 17-23
- 14 Lippl F, Schusdziaara V, Huepkins K, Allescher HD. Inhibitory effect of nociceptin on somatostatin secretion of the isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 2002; 107: 37-42
- 15 Swatek J, Chibowski D. Endocrine cells in colorectal carcinomas. Immunohistochemical study. *Pol J Pathol* 2000; 51: 127-136
- 16 唐卓斌, 刘为纹. Hp+CAG患者胃黏膜上皮胃泌素及其受体基因转录和蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 724-725
- 17 唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹. 幽门螺杆菌感染对胃癌及其癌前病变组织中胃泌素和CCK-B受体表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 551-552
- 18 Larsson LI. Developmental biology of gastrin and somatostatin cells in the antropyloric mucosa of the stomach. *Microsc Res Tech* 2000; 48: 272-281
- 19 Kawashima K, Ishihara S, Karim Rumi MA, Moriyama N, Kazumori H, Suetsugu H, Sato H, Fukuda R, Adachi K, Shibata M, Onodera S, Chiba T, Kinoshita Y. Localization of calcitonin gene-related peptide receptors in rat gastric mucosa. *Peptides* 2002; 23: 955-966
- 20 Portela-Gomes GM, Albuquerque JP, Ferra MA. Serotonin and gastrin cells in rat gastrointestinal tract after thyroparathyroidectomy and induced hyperthyroidism. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 730-735
- 21 Cobb S, Wood T, Tessarollo L, Velasco M, Given R, Varro A, Tarasova N, Singh P. Deletion of functional gastrin gene markedly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 516-530
- 22 Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. BCL2 expression correlates with metastatic potential in pancreatic cancer cell lines. *Cancer* 2001; 92: 1122-1129
- 23 Lowe SL, Rubinchik S, Honda T, McDonnell TJ, Dong JY, Norris JS. Prostate-specific expression of Bax delivered by an adenoviral vector induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Gene Ther* 2001; 8: 1363-1371
- 24 Chan SL, Yu VC. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 119-128
- 25 Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 2004; 44: 257-267
- 26 Jo EH, Hong HD, Ahn NC, Jung JW, Yang SR, Park JS, Kim SH, Lee YS, Kang KS. Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 1715-1719
- 27 Nakamura H, Kumei Y, Morita S, Shimokawa H, Ohya K, Shinomiya K. Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and anti-apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector-averaged gravity condition. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 143-147
- 28 Hartwich A, Konturek SJ, Pierzchalski P, Zuchowicz M, Labza H, Konturek PC, Karczevska E, Bielanski W, Marlicz K, Starzynska T, Lawniczak M, Hahn EG. *Helicobacter pylori* infection, gastrin, cyclooxygenase-2, and apoptosis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16: 202-210
- 29 Kidd M, Tang LH, Modlin IM, Zhang T, Chin K, Holt PR, Moss SF. Gastrin-mediated alterations in gastric epithelial apoptosis and proliferation in a mastomys rodent model of gastric neoplasia. *Digestion* 2000; 62: 143-151
- 30 Wang HM, Cao XF, Huang SQ, Li YS, Yuan AH, Zhang QH, Zhang YL. Effect of external gastrin on apoptosis and expression of bcl-2 gene in gastric cancer cells. *Aizheng* 2002; 21: 171-173
- 31 董家鸿, 王曙光, 马宽生, 张丰深, 何振平. 胃泌素调节胆管癌细胞凋亡的初步研究. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 588-589
- 32 Hartwich J, Konturek SJ, Pierzchalski P, Zuchowicz M, Konturek PC, Bielanski W, Marlicz K, Starzynska T, Lawniczak M. Molecular basis of colorectal cancer - role of gastrin and cyclooxygenase-2. *Med Sci Monit* 2001; 7: 1171-1181
- 33 Zatelli MC, Piccin D, Tagliati F, Ambrosio MR, Margutti A, Padovani R, Scanarini M, Culler MD, degli Uberti EC. Somatostatin receptor subtype 1 selective activation in human growth hormone (GH)- and prolactin (PRL)-secreting pituitary adenomas: effects on cell viability, GH, and PRL secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2797-2802
- 34 Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C. Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 155-160
- 35 Faiss S, Pape UF, Bohmig M, Dorffel Y, Mansmann U, Golder W, Riecken EO, Wiedenmann B. Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alfa, and their combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors-the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2689-2696
- 36 Benali N, Ferjoux G, Puente E, Buscail L, Susini C. Somatostatin receptors. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1: 27-32
- 37 Sharma K, Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998; 76: 259-266
- 38 Kang BN, Jeong KS, Park SJ, Kim SJ, Kim TH, Kim HJ, Ryu SY. Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages. *Regul Pept* 2001; 101: 43-49
- 39 Yuan Y, Gong Z, Lou K, Tu S, Di Z, Xu J. Effects and mechanisms of somatostatin analogs on apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis in mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 683-688
- 40 唐卓斌, 刘为纹. 奥曲肽对SGC-7901细胞中Bcl-2, Bax基因的调控作用. *第三军医大学学报* 2002; 24: 232-234



# DNCB 所致结肠炎小鼠血清中细胞因子的活性

余万桂, 张恒文, 胡承明, 张道明, 梅 林

余万桂, 张恒文, 胡承明, 张道明, 长江大学医学院机能学部 湖北省荆州市 434000

梅林, 北京大学医学部生理与病理生理学系 北京市 100083

余万桂, 女, 1970-07-17生, 湖北省荆州市人, 汉族, 2001年华中科技大学生命科学与技术学院硕士, 副教授, 主要从事消化道神经免疫调节研究。

重庆市自然科学基金应用基础研究项目, No. 8108

通讯作者: 余万桂, 434000, 湖北省荆州市江汉路55号, 长江大学医学院机能学部. wanguiy@yahoo.com.cn

电话: 0716-8067988 传真: 0716-8067647

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

## Activity of cytokines in dinitrochlorobenzene-induced colitis in mice

Wan-Gui Yu, Heng-Wen Zhang, Cheng-Ming Hu, Dao-Ming Zhang, Lin Mei

Wan-Gui Yu, Heng-Wen Zhang, Cheng-Ming Hu, Dao-Ming Zhang, Department of Functional Science, College of Medical Science, Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China  
Lin Mei, Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

Correspondence to: Wan-Gui Yu, Department of Functional Science, College of Medical Science, Yangtze University, 55 Hanjiang Road, Jingzhou 434000, Hubei Province, China. wanguiy@yahoo.com.cn

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

## Abstract

**AIM:** To observe the changes of serum pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine activities in mice with experimental colitis.

**METHODS:** A total of 33 BALB/c mice were randomly divided into control ( $n = 15$ ) and experiment group ( $n = 18$ ). After sensitized by 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) smeared on the abdominal skin, the mice in the experiment group were challenged with DNCB enema, while those in the control group were treated with ethanol. The body weight, stool viscosity and hematochezia were observed and accumulated as disease active index (DAI) score; the colon pathological score was achieved by macropathology and HE staining of section prepared for microscopy. The activity of serum IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-4 and IL-10 was determined.

**RESULTS:** The percentage of diarrhea was 59% in the experiment mice 24 h after DNCB treatment, and serious weight loss was found, 20% mice died. Pathologically, the mice in the control group had normal histological structures and glands, and no ulcer was

found except for occasional light mucosal congestion. However, the decrease in the number of glands and disturbance of tissue structure were observed in the mice of experiment group. Moreover, erosion, hemorrhage, necrosis as well as deeper ulcers were easily seen. As compared with those in the control mice, the DAI ( $3.82 \pm 2.77$  vs  $1.25 \pm 1.65$ ,  $P < 0.05$ ), pathologic score ( $2.47 \pm 1.33$  vs  $0.38 \pm 0.72$ ,  $P < 0.05$ ) were significantly increased in the experiment mice. The activities of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 ( $112.9 \pm 8.3$  ng/L vs  $81.2 \pm 16.3$  ng/L,  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  ( $137.9 \pm 36.7$  ng/L vs  $110.3 \pm 22.4$  ng/L,  $P < 0.05$ ), and IL-6 ( $48.2 \pm 4.3$  ng/L vs  $36.1 \pm 7.2$  ng/L,  $P < 0.01$ ) were significantly increased, while the activities of anti-inflammatory cytokines such as IL-4 ( $96.7 \pm 16.5$  ng/L vs  $130.1 \pm 13.1$  ng/L,  $P < 0.01$ ) and IL-10 ( $107.3 \pm 31.2$  ng/L vs  $149.8 \pm 45.1$  ng/L,  $P < 0.01$ ) were markedly lowered.

**CONCLUSION:** The pathological progress of colitis induced by DNCB is possibly related with the increased activities of pro-inflammatory cytokines and decreased activities of anti-inflammatory cytokines.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Cytokines; 2, 4-dinitrochlorobenzene; Mice

Yu WG, Zhang HW, Hu CM, Zhang DM, Mei L. Activity of cytokines in dinitrochlorobenzene-induced colitis in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(23):2762-2765

## 摘要

**目的:** 观察在实验性结肠炎过程中, 小鼠体内促炎细胞因子和抗炎细胞因子活性的变化。

**方法:** BALB/c小鼠33只随机分为对照组( $n=15$ )和实验组( $n=18$ ), 小鼠先以DNCB涂腹液涂腹致敏, 然后实验组以DNCB灌肠液灌肠, 对照组以相应体积的乙醇灌肠。每日观察小鼠体质量和大便性状, 并采用疾病活动指数(DAI)对动物状态进行评分。所有小鼠处死后观察大体形态改变, 并自病变严重部位取组织标本, HE染色, 镜下观察结肠的病理学改变。各组小鼠断头取血, 分离出血清, 采用双抗体夹心ELISA法测定血清IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10的吸光度。

**结果:** 灌肠24 h后实验组小鼠腹泻百分率达59%, 体质

量明显减轻, 死亡20%。病理学检查对照组小鼠结肠无黏连, 黏膜轻度充血, 无溃疡形成, 镜下组织结构可见, 腺体排列基本整齐; 实验组小鼠腺体数目减少, 组织结构紊乱, 黏膜糜烂, 出血、坏死和大面积深层溃疡。与对照组相比, 实验组小鼠疾病活动指数( $3.82 \pm 2.77$  vs  $1.25 \pm 1.65$ ,  $P < 0.05$ ), 组织病理学评分( $2.47 \pm 1.33$  vs  $0.38 \pm 0.72$ ,  $P < 0.05$ )显著升高; 促炎细胞因子IL-1( $112.9 \pm 8.3$  ng/L vs  $81.2 \pm 16.3$  ng/L,  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  ( $137.9 \pm 36.7$  vs  $110.3 \pm 22.4$  ng/L,  $P < 0.05$ ), IL-6( $48.2 \pm 4.3$  ng/L vs  $36.1 \pm 7.2$  ng/L,  $P < 0.01$ )活性亦显著升高, 而抗炎细胞因子IL-4( $96.7 \pm 16.5$  ng/L vs  $130.1 \pm 13.1$  ng/L,  $P < 0.01$ )和IL-10( $107.3 \pm 31.2$  ng/L vs  $149.8 \pm 45.1$  ng/L,  $P < 0.01$ )活性显著降低。

**结论:** DNCB诱导的结肠炎与促炎细胞因子水平升高, 抗炎细胞因子水平降低有关。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 细胞因子; 2,4-二硝基氯苯; 小鼠

余万桂, 张恒文, 胡承明, 张道明, 梅林. DNCB所致结肠炎小鼠血清中细胞因子的活性. 世界华人消化杂志. 2005;13(23):2762-2765  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2762.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因不明的慢性非特异性胃肠道疾病。其发病率无论是在西方国家还是在我国均有逐年升高的趋势<sup>[1,2]</sup>。在对其病因和发病机制的研究中, 认为免疫因素与UC关系密切, 特别是促炎细胞因子和抗炎细胞因子的动态平衡对UC的发生、发展可能具有决定性作用<sup>[3]</sup>。二硝基氯苯(DNCB)是一种小分子化合物, 它可以作为半抗原与组织蛋白结合成完全抗原激发T细胞介导的免疫反应<sup>[4]</sup>。我们已经在国内首先建立了DNCB诱发的小鼠肠迟发过敏反应及结肠溃疡模型, 并发现T细胞释放的移动抑制因子在此肠炎中活性明显升高<sup>[5-7]</sup>。现检测此结肠炎过程中其他的促炎因子IL-1, TNF $\alpha$ 和IL-6, 以及某些抗炎因子IL-4和IL-10活性的改变, 以进一步探讨促炎因子和抗炎因子在溃疡性结肠炎发病中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂BALB/c小鼠(广州军区武汉陆军总医院动物中心提供), 7-9周龄, 体质量18-21 g。DNCB涂腹液制备: 称取DNCB(北京化学试剂公司)330 mg, 溶于丙酮: 橄榄油(1:1)混合液10 mL中, 成为终浓度33 g/L, 封好瓶口, 低温保存备用。DNCB灌肠液: 称取DNCB 40 mg溶于600 mL/L乙醇中, 配成浓度为4 g/L DNCB溶液, 封好瓶口, 低温保存备用。IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10的ELISA试剂盒购自北京邦定泰克生物有限公司。酶标仪(MK 3型, Labsystem Dragon公司); SHZ-82

型水浴箱(江苏省太仓医疗器械厂)。

**1.2 方法** BALB/c小鼠33只随机分为对照组(15只)和实验组(18只); 小鼠腹部剪毛约2.0 cm×1.5 cm, 以33 g/L DNCB涂腹液50  $\mu$ L涂腹, 1次/d, 连续4 d; d5开始灌肠, 将直径1 mm的硅胶管插入小鼠结肠, 插管尖端距肛门约3-3.5 cm<sup>[5]</sup>, 以4 g/L DNCB 2  $\mu$ L/g灌肠1次/d, 连续4 d, 对照组灌以相应体积的600 mL/L乙醇。每日观察小鼠体质量和大便性状。并采用疾病活动指数(DAI)<sup>[8]</sup>对动物状态进行评分: 体质量: 体质量不变为0分, 体质量比正常下降1-5%为1分, 6-10%为2分, 11-15%为3分, 大于15%为4分; 大便黏稠度: 正常为0分, 松散的大便为2分, 腹泻为4分; 大便出血: 正常为0分, 显性出血为2分。所有小鼠均于d9用颈椎脱臼法处死, 打开腹腔, 分离大肠, 沿肠系膜附着部纵行剪开肠壁, 观察大体形态改变。并自病变严重部位取组织标本, 置100 g/L甲醛液中固定, 常规石蜡切片(5  $\mu$ m), HE染色, 镜下观察结肠的病理学改变。大体形态评分的方法基本参考文献<sup>[8]</sup>并稍微改进: 结肠无黏连(结肠与其他组织剥离较易)、无溃疡、无炎症为0分; 结肠轻度黏连、局部充血为1分; 结肠重度黏连并发现1处溃疡(<1 cm)为2分; 1处以上溃疡(<1 cm)伴炎症为3分; 多处溃疡(>1cm)伴炎症为4分。镜下病理学评分的方法: 在高倍视野(200倍)下分组对每只小鼠的切片进行观察。正常结肠黏膜为0级, 隐窝缺损1/3为1级, 隐窝缺损2/3为2级, 固有层覆盖单层上皮伴轻度炎性细胞浸润为3级, 黏膜糜烂、溃疡伴显著的炎性细胞浸润为4级。各组小鼠断头取血分离血清, 采用双抗体夹心ELISA法测定血清IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-10的吸光度A, 波长450 nm。具体操作均按试剂盒说明进行。

**统计学处理** 数据用 mean $\pm$ SD表示, 各组间进行t检验,  $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 病理学检查** 灌肠24 h后实验组小鼠腹泻百分率达59%, 体质量明显减轻, 死亡20%。与对照组相比, 实验组小鼠疾病活动指数( $3.82 \pm 2.77$  vs  $1.25 \pm 1.65$ ,  $P < 0.05$ ), 组织病理学评分( $2.47 \pm 1.33$  vs  $0.38 \pm 0.72$ ,  $P < 0.05$ )显著升高, 与我们以前的报道相同<sup>[5,6]</sup>。灌肠d5处死小鼠, 打开腹腔, 对照组小鼠结肠无黏连, 黏膜轻度充血, 无溃疡形成, 镜下组织结构可见, 腺体排列基本整齐; 实验组小鼠可见较广泛的结肠黏连、近端肠腔扩张及少量白色渗出物, 结肠黏膜充血、坏死、多处溃疡形成, 镜下隐窝缺损明显, 组织结构紊乱, 黏膜糜烂, 出血、坏死和大面积深层溃疡。HE染色镜下可见实验组小鼠肠组织损伤的程度明显加重(图1)。

**2.2 炎症因子活性的变化** 实验组小鼠血清TNF $\alpha$ , IL-1和IL-6的活性显著高于对照组。而血清IL-4, IL-10显著



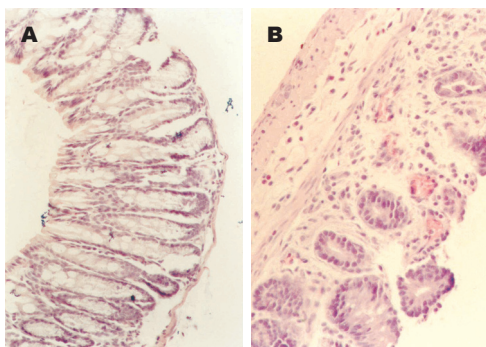


图1 DNCB诱导的小鼠结肠炎病理改变( $\times 100$ , HE染色). A: 对照组; B: 实验组. 腺体减少, 结构紊乱, 黏膜糜烂, 出血、坏死和溃疡.

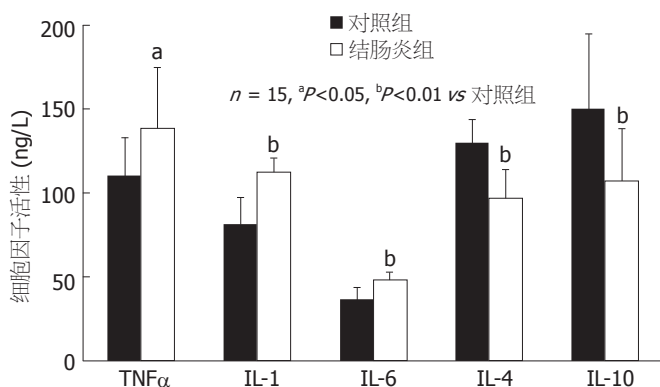


图2 结肠炎小鼠血清中炎症因子的活性.

地低于对照组(图2).

### 3 讨论

致敏原2, 4-二硝基氯苯(DNCB)能够诱发小鼠出现结肠溃疡. 由于DNCB是通过激活T细胞而诱导结肠炎, 所以在发病机制上与人类的UC有一定的相似性<sup>[5]</sup>. 在以T细胞激活为特征的肠炎中, IL-5<sup>[9]</sup>, TNF $\alpha$ <sup>[10-12]</sup>, IL-1, IL-6<sup>[12]</sup>和IL-16<sup>[13]</sup>等参与, 但这些都是从UC患者测得<sup>[9,11,13]</sup>, 而与DNCB肠炎有关的细胞因子仅见报道TNF $\alpha$ <sup>[10]</sup>, 并且不是小鼠. 我们观察到促炎细胞因子IL-1, IL-6和TNF $\alpha$ 活性升高, 而抗炎细胞因子IL-4和IL-10活性降低, 提示结肠炎的发病可能与促炎细胞因子活性升高而抗炎细胞因子活性降低有关. 在UC发生过程中, 免疫系统是引起肠道炎症与损伤的重要因素<sup>[14]</sup>, 细胞因子在调节肠道免疫中既有促进炎症发展又有抗炎作用, 促炎细胞因子IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ 和抗炎细胞因子IL-4, IL-10常处于动态平衡, 如果失去平衡, 则会导致肠炎发生<sup>[15]</sup>. IL-1是一种具有多种生物活性并能作用于体内多种组织和器官的细胞因子, 根据等电点不同, IL-1可分为IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ , 人体内IL-1活性主要由后者介导. IL-1的作用由IL-1受体拮抗剂(IL-1 $\alpha$ )控制, 体内外实验均证实IL-1 $\alpha$ 能抑制IL-1不同的生物学活性, 有研究发现IL-1和IL-1 $\alpha$ 之间的平衡决定IL-1对炎症过程的促进作用<sup>[16]</sup>, 在UC中IL-1可以产生对中性粒细胞等炎

症细胞的趋化作用, 吸引其进入肠道病变部位, 从而引起一系列病理改变, 如结肠上皮损伤、小血管炎、隐窝脓肿等, 最终造成UC的发病<sup>[17]</sup>. TNF $\alpha$ 引起肠道黏膜损伤的可能机制包括释放血小板活化因子、生成白三烯和氧自由基、诱导一氧化氮合酶, 从而产生大量一氧化氮引起细胞损伤; 同时TNF $\alpha$ 启动T、B淋巴细胞活化<sup>[18]</sup>. IL-1, TNF $\alpha$ 及IL-6均可在UC黏膜病变中存在, 特别是活化的IL-6与UC的免疫和临床表现有非常密切的关系.

抗炎细胞因子中最重要的是IL-4和IL-10, DNCB诱导的UC的小鼠血清中抗炎细胞因子IL-4, IL-10活性显著性降低. 大量研究资料证实IL-4能抑制单核巨噬细胞产生IL-1 $\beta$ 和TNF $\alpha$ , 下调活化的单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力, 而且存在剂量-效应关系<sup>[19]</sup>. IL-4和IL-10抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达, iNOS是一个静止的基因, 仅在免疫反应或炎症才被激活, iNOS活性增强, 产生过量的NO, 对肠黏膜有杀伤毒性及促进炎症的作用<sup>[20]</sup>. IL-4还能抑制前列腺素E2和IL-8的产生. 人IL-10能下调活化的单核细胞和巨噬细胞转录分泌IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ 和G-CSF. IL-10基因敲除小鼠可自发形成结肠炎. 本实验表明, DNCB诱导的结肠炎小鼠血清中促炎细胞因子IL-1, TNF $\alpha$ 和IL-6活性显著地高于对照组, 而抗炎细胞因子IL-4, IL-10活性与对照组比较具有显著性降低, 提示DNCB诱导的结肠炎发病过程可能与促炎细胞因子的水平升高、抗炎细胞因子水平降低有关, 即细胞因子网络平衡被破坏, 故综合运用细胞因子, 重新建立细胞因子网络平衡, 可能是治疗UC的一种有效途径<sup>[21-23]</sup>.

### 4 参考文献

- Russell MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med* 2000; 11: 191-196
- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 林平, 伍杨, 黄华, 梅林. 细胞因子与溃疡性结肠炎. 湖北民族学院学报(医学版) 2003; 20: 28-30
- Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 5-11
- Yu WG, Lin P, Pan H, Xiao L, Gong EC, Mei L. Pathophysiological significance of a reaction in mouse gastrointestinal tract associated with delayed-type hypersensitivity. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2254-2258
- 林平, 肖兰, 周婷, 杨菁菁, 潘慧, 金雨荪, 宫恩聪, 梅林. DNCB所致小鼠结肠炎与LMIF的关系. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1778-1782
- 周婷, 林平, 潘慧, 梅林. 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1782-1786
- 陈维雄, 陈金联, 陈尼维, 朱金水, 达炜. P选择素单抗对小鼠溃疡性结肠炎治疗的研究. 中华消化杂志 2001; 21: 629-631
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4<sup>+</sup> lamina propria(LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- $\gamma$ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270
- Mack DR, Lau AS, Sherman PM. Systemic tumor necrosis fac-



- tor- $\alpha$  production in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1738-1745
- 11 郭海建, 邓长生, 夏冰. 溃疡性结肠炎患者肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与T细胞亚群的变化及其相关性研究. *中国病理生理杂志* 2001; 17: 1252-1255
- 12 熊鹰, 陈如山, 王建平, 张永锋, 关宏. 结肠康泰对大鼠结肠炎组织内TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平的影响. *中国病理生理杂志* 2002; 1: 1137-1138
- 13 Seegert D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48: 326-332
- 14 Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305
- 15 Ardizzone S, Bianchi Porro G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs* 2005; 65: 2253-2286
- 16 Mittal RD, Bid HK, Ghoshal UC. IL-1 receptor antagonist(IL-1Ra) gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease in India. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 827-831
- 17 丁晓刚, 傅延龄. 黄芩汤有效成分配方抗大鼠实验性溃疡性结肠炎实验研究. *北京中医药大学学报* 2003; 26: 45-48
- 18 丁伟群, 林庚金, 徐三荣, 钱立平. 肿瘤坏死因子与溃疡性结肠炎. *中华消化杂志* 2001; 21: 499-450
- 19 Schreiber S, Heinig T, Panzer U, Reinking R, Bouchard A, Stahl PD, Raedler A. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 284-286
- 20 Linehan JD, Kolios G, Valatas V, Robertson DA, Westwick J. Immunomodulatory cytokines suppress epithelial nitric oxide production in inflammatory bowel disease by acting on mononuclear cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1560-1569
- 21 Barish CF. Alicaforsten therapy in inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1387-1391
- 22 Uhlig HH, Powrie F. The role of mucosal T lymphocytes in regulating intestinal inflammation. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 27: 167-180
- 23 Cave NJ. Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of companion animals. *N Z Vet J* 2003; 51: 262-274

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展, 由中华医学会肝病学分会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第5届全国肝脏疾病学术研讨会”定于2006-05在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座, 并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

### 1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展; (2) 病毒性肝炎的治疗策略; (3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗; (4) 丙型肝炎的抗病毒治疗; (5) 肝纤维化发病机制研究进展; (6) 肝纤维化的防治; (7) 肝硬化的规范化治疗; (8) 肝细胞癌的病因学研究进展; (9) 肝癌的发病机制研究进展; (10) 肝癌的早期诊断; (11) 肝癌的手术治疗及方案选择; (12) 肝癌的非手术治疗; (13) 肝癌的生物治疗; (14) 自身免疫性肝病的发病机制; (15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗; (16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗; (17) 生物人工肝的应用及进展; (18) 小儿自身免疫性肝病; (19) 肝肾综合征; (20) 肝功能衰竭; (21) 肝干细胞的研究进展及临床应用; (22) 脂肪肝及酒精性肝病; (23) 非酒精性脂肪性肝病。

### 2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份, 应包括目的、材料与方法、结果、讨论, 并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿, 恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不再受理。

### 3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址: zhgz@vip.163.com。征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准)。

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿, 参加会议。

## 应激对大鼠结肠神经系统 nNOS 表达的影响

李玉梅, 陆国明

李玉梅, 武警浙江省总队医院消化科 浙江省嘉兴市 314000  
陆国明, 嘉兴学院医学院组织胚胎学教研室 浙江省嘉兴市 314001  
李玉梅, 女, 1966-07-30生, 浙江省嘉兴市人, 汉族, 2002年第三军医大学  
硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的临床及基础研究。  
浙江省嘉兴市科技发展基金资助项目, No.20041041  
通讯作者: 李玉梅, 314000, 浙江省嘉兴市南湖路16号, 武警浙江省总队医  
院消化科. li.yumei@sohu.com  
电话: 0573-2852851-34537 传真: 0573-2852933  
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-11-12

### Effect of stress on expression of neuronal nitric oxide synthase in colonic nervous system in rats

Yu-Mei Li, Guo-Ming Lu

Yu-Mei Li, Department of Gastroenterology, Zhejiang Crops Hospital,  
Chinese People's Armed Police Forces, Jiaxing 314000, Zhejiang Pro-  
vince, China  
Guo-Ming Lu, Department of Histology and Embryology, Medical Col-  
lege of Jiaxing University, Jiaxing 314001, Zhejiang Province, China  
Supported by the Jiaxing Science and Technology Development  
Foundation of Zhejiang Province, No. 20041041  
Correspondence to: Dr. Yu-Mei Li, Department of Gastroenterology,  
Zhejiang Crops Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, 16  
Nanhu Road, Jiaxing 314000, Zhejiang Province,  
China. li.yumei@sohu.com  
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-11-12

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of stress on the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in colonic nervous system in rats.

**METHODS:** Thirty male SD rats were randomly divided into control group, stress group and NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) group. The rat model of water immersion-restraint stress (WRS) was established. The expression of nNOS in colonic submucous plexus and myenteric plexus in the rats was examined by immuno-histochemical staining and analyzed by computer image analysis system.

**RESULTS:** nNOS immune-positive substance was mostly expressed in the neurons of submucous plexus and myenteric plexus. In comparison with that in control group, the gray value of nNOS positive neurons in submucous plexus and myenteric plexus was significantly decreased ( $P = 0.02$  or  $P = 0.005$ ), and the density of nNOS positive neurons was increased markedly ( $P = 0.04$  or  $P = 0.01$ ) in stress group. Moreover, nNOS

expression in mucosal epithelial cells and lamina propria lymphocytes were also observed. In comparison with that in stress group, the gray value of nNOS positive neurons in submucous plexus and myenteric plexus was increased ( $P = 0.04$ ), and the density of nNOS positive neurons was decreased ( $P = 0.04$  or  $P = 0.03$ ) in L-NAME group. nNOS expression was not significantly different between the rats of L-NAME and control group ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** WRS can increase the expression of nNOS in colonic nervous system in rats, which suggests nitric oxide (NO) may play an important role in WRS-induced function disorder of colon.

**Key Words:** Stress; Colonic nervous system; Neuronal nitric oxide synthase; Immunohistochemistry

Li YM, Lu GM. Effect of stress on expression of neuronal nitric oxide synthase in colonic nervous system in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2766-2769

### 摘要

**目的:** 探讨应激对大鼠结肠神经系统nNOS表达的影响。

**方法:** SD大鼠30只随机分为对照组, 应激组和L-NAME组, 采用水浸-束缚应激(WRS)动物模型, 用免疫组织化学ABC法检测nNOS在大鼠结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛的表达, 应用计算机图像分析系统对其表达进行定量分析。

**结果:** 与对照组比较, 应激组黏膜下神经丛和肌间神经丛的nNOS阳性神经元的灰度值明显减少( $P = 0.02$ 或 $P = 0.005$ ), 阳性神经元细胞数的平均密度增加( $P = 0.04$ 或 $P = 0.01$ ), 表达增强, 且在黏膜上皮细胞、固有层淋巴细胞也有nNOS表达。L-NAME组黏膜下神经丛和肌间神经丛的nNOS阳性神经元的灰度值较应激组增加( $P = 0.04$ ), 平均密度下降( $P = 0.04$ 或 $P = 0.03$ ), 表达减弱, 而与对照组比较均无明显差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 应激可引起大鼠结肠神经系统nNOS表达增强, 提示一氧化氮(NO)在应激所致的结肠功能失调中可能起重要作用。

**关键词:** 应激; 肠神经系统; nNOS; 免疫组化

李玉梅, 陆国明. 应激对大鼠结肠神经系统nNOS表达的影响. 世界华人消

化杂志 2005;13(23):2766-2769

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2766.asp>

## 0 引言

肠道存在复杂的肠神经系统(enteric nervous system, ENS). ENS接受中枢神经系统的调控, 并通过各种神经介质调节肠道平滑肌的运动和腺体分泌, 维持其正常生理功能. 近年来发现应激参与肠道某些功能性疾病、自身免疫性疾病(如肠易激综合征, IBS)的发生、发展<sup>[1-3]</sup>. 一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种新型气体信号分子和神经递质, 可舒张胃肠平滑肌, 调节肠道血液循环, 参与细胞信号传递, 在肠道的生理及病理过程中具有重要的生物学功能<sup>[4-6]</sup>. 有关应激对神经型一氧化氮合酶(nNOS)在大鼠肠神经系统表达的影响尚未见相关报道. 我们采用水浸-束缚应激(water immersion-restraint stress, WRS)动物模型<sup>[7]</sup>, 应用免疫组织化学方法, 旨在探讨应激对大鼠结肠神经系统nNOS表达的影响, 并为IBS动物模型的制作提供新的思路.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 左旋硝基精氨酸甲酯(NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)购自美国Sigma公司, 使用前用生理盐水稀释(浓度为5 g/L); 兔抗鼠nNOS多克隆抗体(工作浓度为1:100)和免疫组织化学试剂盒(即用型SABC)均购自武汉博士德生物工程有限公司. 清洁级♂SD大鼠30只(浙江省实验动物中心提供), 体质量200-220 g, 随机分成对照组、应激组和L-NAME组, 每组10只. 实验前大鼠禁食24 h, 禁水1 h. L-NAME组大鼠在应激前30 min ip L-NAME 20 mg/kg, 对照组和应激组大鼠均于实验前30 min ip等体积生理盐水. 然后将应激组和L-NAME组大鼠束缚于鼠板上并垂直浸入20±1℃水浴中, 水面平大鼠胸骨剑突水平, 持续4 h. 对照组不施加应激.

**1.2 方法** 大鼠用10 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)颈后皮下注射麻醉. 剖腹后在距回肠末端3 cm处剪取长度为1.0 cm的结肠标本. 切开肠管后用生理盐水漂洗, 放入40 g/L多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋后制作4 μm切片, 用于HE染色和免疫组织化学分析. 免疫组织化学采用SABC法, 主要步骤包括: 石蜡切片脱蜡、梯度酒精脱水; 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>甲醇液室温孵育20 min灭活内源性过氧化物酶; 枸橼酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.0)中92-100℃抗原修复20 min, 冷却; 30 mL/L正常山羊血清37℃孵育20 min; 一抗工作液(兔抗鼠nNOS)冰箱内4℃孵育24 h; 生物素标记的羊抗鼠IgG 37℃孵育20 min; 链霉卵白素37℃孵育20 min; SABC室温孵育20 min; DAB显色, 黄色或棕黄色产物为阳性标记;

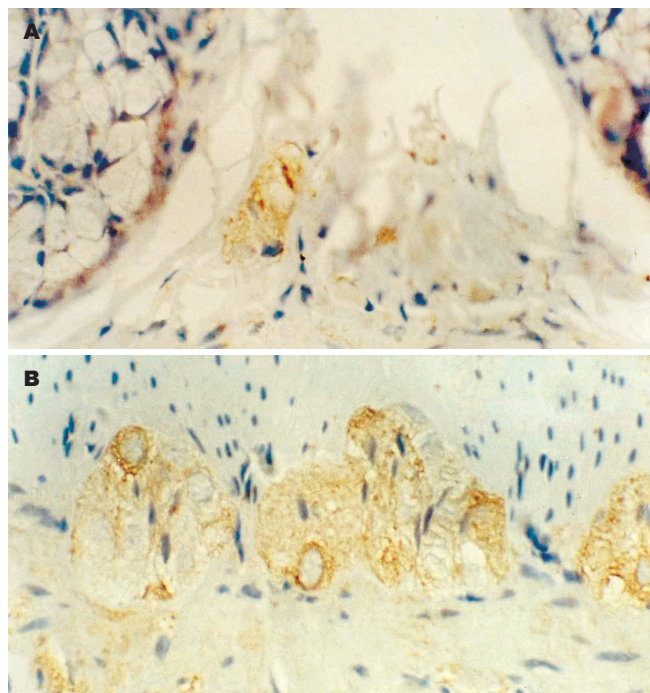


图1 对照组大鼠结肠神经系统nNOS表达(×400). A: 黏膜下神经丛; B: 肌间神经丛.

苏木素复染; 常规脱水、透明、封片; 光镜下观察. 以0.01 mol/L PBS(pH 7.4)代替一抗作为阴性对照. 每张切片随机连续选取不重叠的5个高倍视野(×400), 计数每个高倍视野内黏膜下神经丛和肌间神经丛的阳性神经元数, 取其平均值分别代表两种神经丛内阳性神经元的平均密度(阳性神经元细胞数/高倍视野); 并用Nikon Act-1图像分析仪和Image-Pro Plus 4.5图像分析软件测量阳性神经元的灰度值, 取平均值代表阳性神经元的灰度值以反映nNOS蛋白的相对含量.

**统计学处理** 所有数据均以均数±标准差(mean±SD)表示, 运用SPSS 10.0统计软件进行t检验,  $P<0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 病理组织学变化** 光镜下对照组、应激组和L-NAME组大鼠结肠组织结构完整, 均未见明显损伤性改变.

**2.2 结肠nNOS的表达** 对照组大鼠nNOS免疫阳性产物主要见于结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛的神经元, 定位于细胞质(图1). 应激组nNOS免疫阳性产物除在上述结构表达外, 黏膜上皮细胞、固有层淋巴细胞也有表达(图2). L-NAME组nNOS免疫阳性产物主要见于结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛的神经元(图3).

**2.3 图像分析结果** 结肠黏膜下神经丛nNOS阳性神经元灰度值和平均密度的变化: 应激组nNOS阳性神经元灰度值较对照组明显减少( $P<0.05$ ), 阳性神经元的平均密度高于对照组( $P<0.05$ ), 即nNOS表达增强. 与应激组相比, L-NAME组黏膜下神经丛的nNOS阳性神经元



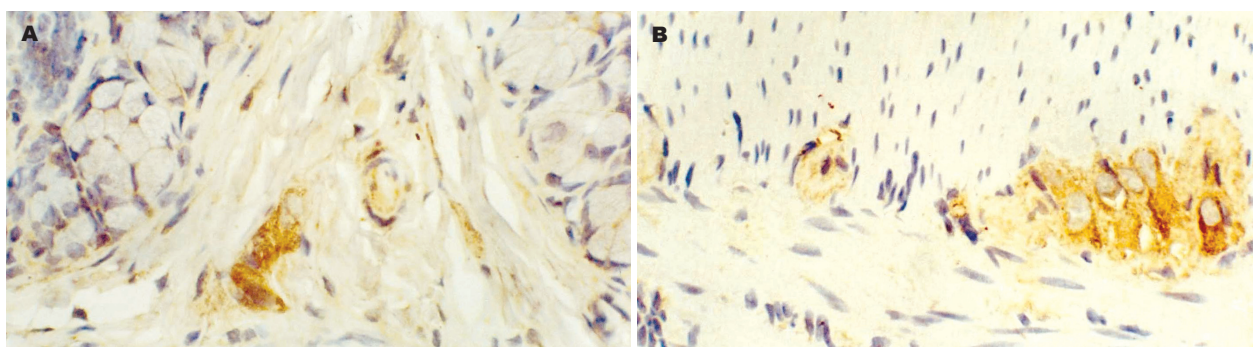


图2 应激组大鼠结肠神经系统nNOS表达( $\times 400$ ). A: 黏膜下神经丛; B: 肌间神经丛.

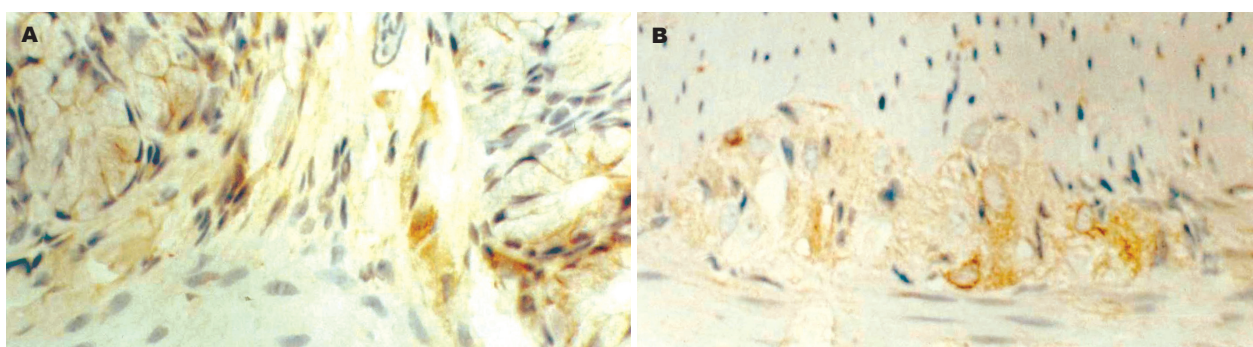


图3 L-NAME组大鼠结肠神经系统nNOS表达( $\times 400$ ). A: 黏膜下神经丛; B: 肌间神经丛.

灰度值增加( $P<0.05$ ), 平均密度降低( $P<0.05$ ), 即nNOS表达减弱. 结肠肌间神经丛nNOS阳性神经元灰度值和平均密度的变化: 应激组肌间神经丛的nNOS阳性神经元灰度值较对照组显著减少( $P<0.01$ ), 平均密度高于对照组( $P<0.05$ ), 即nNOS表达明显增强. 与应激组相比, L-NAME组肌间神经丛的nNOS阳性神经元灰度值增加( $P<0.05$ ), 平均密度降低( $P<0.05$ ), 即nNOS表达明显减弱(表1).

表1 大鼠结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛nNOS阳性神经元的灰度值和平均密度( $n=10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	黏膜下神经丛		肌间神经丛	
	灰度值	平均密度	灰度值	平均密度
对照组	178.18 $\pm$ 3.29	1.56 $\pm$ 0.34	173.96 $\pm$ 4.12	7.12 $\pm$ 1.56
应激组	174.34 $\pm$ 4.84 <sup>a</sup>	2.08 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	166.36 $\pm$ 5.25 <sup>b</sup>	8.92 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>
L-NAME组	178.05 $\pm$ 5.07 <sup>c</sup>	1.64 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	172.12 $\pm$ 4.13 <sup>c</sup>	7.18 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 应激组.

### 3 讨论

NO是近年来发现的一种小分子气体信号分子和重要的神经递质. 内源性NO以L-精氨酸(L-Arg)为底物, 在NADPH、 $O_2$ 和原卟啉IX等因子辅助下, 由一氧化氮合酶(NOS)作用下产生. NO具有高度脂溶性, 合成后以扩散方式到达靶细胞, 与细胞中可溶性鸟苷酸环化酶(SGC)结合, 通过改变SGC的空间构型提高酶活性, 使细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)生成增多, 激活依赖cGMP蛋

白激酶的钙泵, 从而参与细胞间信息传递<sup>[8,9]</sup>. NOS是NO合成过程中唯一的限速酶, 其活性依赖于NADPH、 $Ca^{2+}$ 和钙调蛋白, 可被左旋精氨酸结构类似物(如L-NAME)竞争性抑制<sup>[10,11]</sup>. NOS包括三种亚型: 神经型NOS(neuronal NOS, nNOS)、内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS)和诱导型NOS(inducible NOS, iNOS). 前两者合称为结构型NOS(constitutive NOS, cNOS). 酶细胞化学方法研究发现<sup>[12-14]</sup>, NOS广泛分布于哺乳动物的肠道组织, 但此方法不能区分cNOS与iNOS. 我们采用免疫组化方法显示, nNOS主要分布于大鼠结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛神经元, 定位于细胞质. 上述结果为揭示nNOS在大鼠肠道中的分布规律提供了形态学资料, 并进一步证实NO是结肠重要的信号分子和神经递质.

结肠的神经支配较为复杂, 其运动形式也比小肠复杂且多变<sup>[15,16]</sup>. 结肠肌间神经丛包括初级、二级及三级神经丛. 初级神经丛与二级神经丛相连形成网络, 其神经纤维穿入环行肌, 并直接支配环行肌的运动, 而纵行肌则由三级肌间丛支配. 肌间神经丛部分神经纤维伸至肠黏膜后形成感觉末梢. 而黏膜下神经丛的神经元不仅支配肠黏膜和黏膜肌层, 有些神经元还伸至肌间神经丛. 因此, 我们推测, 在生理状态下, 黏膜下神经丛内NO主要与结肠黏膜肌的收缩、腺体分泌和黏膜感觉有关, 而肌间神经丛NO主要参与了对结肠环行肌运动的调节.

研究表明, 应激通过神经体液调节, 常导致胃肠

功能失调, 表现为胃肠运动、分泌和消化转运时间的改变<sup>[17-19]</sup>。然而, 应激引起或加重结肠功能紊乱的发病机制尚不清楚。有关NO与胃肠动力学的研究显示, 胃肠组织均可在cNOS催化下产生NO, 参与对肠道平滑肌收缩的非胆碱能非肾上腺素能(nonadrenergic noncholinergic, NANC)神经调节: NO含量减少时, 胃肠运动加快; 反之, 胃肠运动减慢<sup>[20]</sup>。本研究显示, 水浸-束缚应激后黏膜下神经丛和肌间神经丛内nNOS阳性神经元的表达增强, 而预先用NOS抑制剂L-NAME处理可逆转nNOS的表达结果。我们推测, 水浸-束缚应激状态下, 大鼠结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛的神经元nNOS表达增强, 由nNOS催化L-Arg生成的NO含量增加, 扩散至周围靶细胞后, 不仅抑制平滑肌的收缩, 导致结肠运动减弱, 而且抑制了结肠黏膜肌的收缩、腺体分泌和黏膜感觉。

不同的应激往往产生不同的胃肠运动效应<sup>[21-25]</sup>。激怒、恐惧、痛性刺激和高强度训练可使健康人的胃排空延迟, 结肠运动增强; 动物经束缚制动、电刺激和强迫游泳等急性应激后, 也可产生胃肠排空延迟。近年来研究发现应激可诱发、加重IBS的症状<sup>[26-28]</sup>, 导致结肠动力增强(腹泻型IBS)或减弱(便秘型IBS), 但至今尚无一种成熟的IBS动物模型, 因此有关IBS发病机制的基础研究较少。本研究结果显示WRS后肠神经系统nNOS表达增强, 提示应激状态下抑制性神经递质NO产生增加, 参与了对肠道平滑肌活动的抑制, 但未引起结肠组织学变化。因此, 我们认为WRS可作为研究IBS肠道动力异常的较为理想的动物模型。

#### 4 参考文献

- Verleye M, Gillardin JM. Effects of etifoxine on stress-induced hyperthermia, freezing behavior and colonic motor activation in rats. *Physiol Behav* 2004; 82: 891-897
- Locke GR 3rd, Weaver AL, Melton LJ 3rd, Talley NJ. Psychosocial factors are linked to functional gastrointestinal disorders: a population based nested case-control study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 350-357
- Murray CD, Flynn J, Ratcliffe L, Jacyna MR, Kamm MA, Emmanuel AV. Effect of acute physical and psychological stress on gut autonomic innervation in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 127: 1695-1703
- 穆标, 王邦茂, 刘之武, 黄乃霞, 刘文天. 一氧化氮能神经调节异常在腹泻型肠易激综合征患者中的作用. *中华消化杂志* 2002; 22: 88-91
- Fritz E, Hammer J, Schmidt B, Eherer AJ, Hammer HF. Stimulation of the nitric oxide-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate pathway by sildenafil: effect on rectal muscle tone, distensibility, and perception in health and in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2253-2260
- Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 903-913
- Nishioka T, Iyota K, Nakayama T, Suemaru S, Numata Y, Hashimoto K. Effects of ether-laparotomy and water immersion-restraint stress on CRH concentration in the hypothalamus, extrahypothalamic tissues and peripheral blood. *Endocr J* 1993; 40: 213-220
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-237
- Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999; 31: 577-596
- Aiko S, Fuseler J, Grisham MB. Effects of nitric oxide synthase inhibition or sulfasalazine on the spontaneous colitis observed in HLA-B27 transgenic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 722-727
- Vardareli E, Dundar E, Angin K, Saricam T, Inal M. Effects of intrarectal and intraperitoneal N(G)-nitro-L-arginine methyl ester treatment in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid induced colitis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2003; 55: 271-276
- Nichols K, Staines W, Krantis A. Nitric oxide synthase distribution in the rat intestine: a histochemical analysis. *Gastroenterology* 1993; 105: 1651-1661
- Wilhelm M, Batori Z, Pasztor I, Gabriel R. NADPH-diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. *Eur J Morphol* 1998; 36: 143-152
- Bagyanszki M, Roman V, Fekete E. Quantitative distribution of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. *Histochem J* 2000; 32: 679-684
- Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"-the enteric nervous system. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: S4-6
- Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 176-182
- Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Monnikes I. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 2001; 19: 201-211
- Tache Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 137-142
- Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 332-339
- De Winter BY, Boeckstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of adrenergic and nitrergic blockade on experimental ileus in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 464-468
- Cao SG, Wu WC, Han Z, Wang MY. Effects of psychological stress on small intestinal motility and expression of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide in plasma and small intestine in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 737-740
- Nakade Y, Tsuchida D, Fukuda H, Iwa M, Pappas TN, Takahashi T. Restraint stress delays solid gastric emptying via a central CRF and peripheral sympathetic neuron in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R427-R432
- Verleye M, Gillardin JM. Effects of etifoxine on stress-induced hyperthermia, freezing behavior and colonic motor activation in rats. *Physiol Behav* 2004; 82: 891-897
- Barreau F, Cartier C, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 2004; 127: 524-534
- Tabosa A, Yamamura Y, Forno ER, Mello LE. A comparative study of the effects of electroacupuncture and moxibustion in the gastrointestinal motility of the rat. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 602-610
- Quigley EM. Disturbances of motility and visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: biological markers or epiphenomenon. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 221-233
- Delvaux M. Alterations of sensori-motor functions of the digestive tract in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 747-771
- Ehlert U, Nater UM, Bohmelt A. High and low unstimulated salivary cortisol levels correspond to different symptoms of functional gastrointestinal disorders. *J Psychosom Res* 2005; 59: 7-10



# 胃癌前病变中 DNA 甲基化状态与叶酸

刘丽华, 张方信

刘丽华, 张方信, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730050  
甘肃省中青年科学技术基金资助项目, No.YS031-A21-023  
通讯作者: 刘丽华, 730050, 甘肃省兰州市小西湖西街98号, 兰州军区兰州总医院消化科. LLH487726@163.com  
收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-11-12

## 摘要

DNA甲基化异常是胃癌发生的重要机制之一, 为了能尽早发现并纠正DNA甲基化异常, 阻止胃癌的发生, 胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态的研究日益受到重视. 众多研究表明, 胃黏膜癌前病变中多种基因中存在甲基化异常, 而且基因的甲基化异常程度与年龄、性别有关, 还与胃黏膜上皮细胞是否存在活动性炎症、肠化及幽门螺杆菌感染有关. 叶酸缺乏可导致DNA甲基化的紊乱和DNA修复机制效率的减弱, 叶酸摄入量不足患胃癌的相对危险度增高; 胃黏膜癌前病变患者体内叶酸不足, 黏膜细胞总基因组DNA甲基化水平下降; 经叶酸治疗后, 体内叶酸升高, 黏膜细胞总基因组DNA甲基化水平上升, 异型增生、肠上皮化生明显改善. 因此, 叶酸缺乏与胃黏膜癌前病变的发生、发展有关, 及时纠正叶酸不足, 可逆转胃黏膜的病理改变, 减少胃癌的发生.

**关键词:** 胃癌前病变; DNA甲基化; 叶酸

刘丽华, 张方信. 胃癌前病变中DNA甲基化状态与叶酸. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2770-2772  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2770.asp>

## 0 引言

DNA甲基化 (DNA methylation) 是哺乳动物DNA复制后调节方式之一, 也是脊椎动物DNA唯一的自然化学修饰方式. DNA甲基化的生物学功能是影响蛋白质和DNA的特异性结合作用, 在基因表达调控中起重要作用. 肿瘤中DNA甲基化状态的研究颇多, 对肿瘤组织中甲基化异常现象的解释是: (1)致癌物与DNA相互作用形成加合物阻碍了酶活性甲基化作用, 使DNA甲基丢失; (2)致癌物又可激发DNA的再甲基化作用, 使一些未受致癌物影响的CpG(胞嘧啶-鸟嘌呤)序列出现新的甲基化; (3)甲基转移酶活性增高, 导致抑癌基因启动子区域高甲基化, 抑制抑癌基因的表达, 导致肿瘤的发生. 为了能尽早发现并纠正DNA甲基化异常, 阻止胃癌的发生, 胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态的研究日益受到重视. 胃黏膜是人体中较早与各种有害物质直接接触的部位, 而且黏膜上皮细胞对损害因素的反应快而强烈. 因此, 研究胃癌前病变如萎缩、肠化、中-重度不典型增生、息肉等组织细胞中

DNA甲基化状态的变化, 也许可以找到肿瘤发生的早期原因, 可为胃黏膜癌前病变的逆转和胃癌的防治找到措施. 但就在胃黏膜癌前病变中DNA的甲基化状态目前尚不十分清楚. 人们发现叶酸等维生素缺乏可引起DNA甲基化异常. 叶酸是甲基基团的最终来源之一, 在维持DNA甲基化中起着重要的作用<sup>[1]</sup>. 我们就近年来对于胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态、蛋白表达及与叶酸的相关性的研究情况进行简要概述.

## 1 胃癌前病变中DNA甲基化状态及蛋白表达

近年来的研究发现, 胃黏膜癌前病变中p16、hMLh1、E-cadherin、COX-2、DAP-kinase、GSTP1、MGMT、p14、THBS1、TIMP3、RASSF1A等多种基因中存在CpG岛的甲基化异常. Jang *et al*<sup>[2]</sup>研究发现胃癌组织周围的非肿瘤组织中黏膜存在腺体萎缩和慢性炎症时, 检测发现该部位黏膜细胞中p16基因启动子区域呈高甲基化和p16蛋白的低表达, 并认为前者可能是胃黏膜癌前病变中很早发生且非常普遍的现象, 根据其严重程度对判断胃黏膜癌前病变的预后以及预测其发生癌变的危险程度具有积极意义. Rocco *et al*<sup>[3]</sup>研究发现在胃黏膜癌前病变的肠化细胞中和弥漫性生长的胃癌细胞中p16蛋白过度表达, 同样地, 在分化低的胃癌细胞中p16蛋白的表达低, 这可能反映出细胞增殖分裂中选择正确分裂增殖的压力增大, 而发生异型增殖, 同时这样的细胞具有了一定的侵袭性. 因此, 认为p16蛋白的表达高低与胃黏膜癌前病变中细胞的分化程度呈正相关. To *et al*<sup>[4]</sup>在对胃黏膜肠化细胞中肿瘤相关基因的启动子区域甲基化状态的研究中发现: (1)DAP-kinase、p14、p15和p16基因的启动子区域高甲基化非常普遍; (2)E-cadherin和hMLH1基因的启动子区域高甲基化也时常发生; (3)GSTP1基因的启动子区域不存在高甲基化. 因此, 认为肿瘤相关基因的甲基化异常是胃黏膜上皮细胞肠化并向癌变发生、发展过程中普遍存在的现象. 为找到在胃癌发生、发展过程中始终存在基因CpG岛的甲基化异常, Kang *et al*<sup>[5]</sup>进行了79例胃息肉、57例胃黏膜肠化、74例慢性胃炎、80例原发性胃癌的研究, 结果发现: (1)只在胃癌中存在GSTP1和RASSF1A基因甲基化异常; (2)在胃炎、黏膜肠化和息肉中显示COX-2、hMLH1和p16基因低甲基化状态, 而在慢性胃炎中这些基因呈现明显的甲基化异常; (3)MGMT基因在胃黏膜的四种损伤中均呈现相似的较低(8.8-21.3%)的甲基化异常; (4)APC和E-cadherin基因在胃黏膜的四种损伤中



均呈现程度相似的较高比例 (53-85%) 的甲基化异常; (5) DAP-kinase、p14、THBS1和TIMP3基因在胃癌发生、发展的过程中其甲基化异常程度呈现逐渐明显的趋势. 通过上述结果, 作者提出在胃癌发生、发展的过程中基因的甲基化异常始终存在且呈逐渐加重的趋势, 基因甲基化异常累积的结果导致了肿瘤的发生.

不仅胃黏膜病变中存在DNA甲基化异常, 蛋白表达异常, 而且研究发现这种异常与年龄、性别有关. Waki *et al*<sup>[6]</sup>研究了胃黏膜癌前病变中E-cadherin、hMLH1、p16基因的甲基化状态, 发现22岁以下的尸解测试者胃黏膜癌前病变的细胞中E-cadherin、hMLH1、p16基因启动子区域未被甲基化, 而45岁以上的尸解测试者胃黏膜癌前病变的细胞中E-cadherin、p16基因启动子区域被甲基化修饰的分别占86%和29%. 手术切除后的胃癌旁组织癌前病变细胞中E-cadherin基因被甲基化修饰的占47-67%, hMLH1占47-67%, p16占22-44%. 在尸解测试者中无论年龄大小均未发现hMLH1被甲基化修饰, 而手术切除后的胃癌旁组织癌前病变细胞中能检测到被甲基化修饰, 说明测定hMLH1甲基化状态可用于胃黏膜癌前病变严重程度的判断, 以及是否已是早癌的判断. Kang *et al*<sup>[7]</sup>对慢性胃炎胃黏膜上皮细胞中COX-2、DAP-kinase、E-cadherin、GSTP1、MGMT、hMLH1、p14、p16、THBS1、TIMP3和RASSF1A 11个基因进行研究, 发现基因CpG岛的甲基化异常与患者的年龄、性别有关, 还与胃黏膜上皮细胞是否存在肠化、活动性炎症有关. 随着年龄的增加, 基因的甲基化异常程度增加, 尤其在男性患者, 以及合并有胃黏膜上皮细胞有肠化和活动性炎症的情况下, 这类现象更为严重. Tamura *et al*<sup>[8]</sup>对慢性胃炎、胃癌和癌旁组织细胞中APC、DAP-kinase、DCC、E-cadherin、GSTP1、hMLH1、p16、PTEN、RASSF1A、RUNX3和TSLC1基因的甲基化状态进行研究, 除RUNX3和TSLC1基因外, 其他的基因启动子区域的甲基化异常在慢性胃炎和肿瘤组织中有明显的差异. 因而, 认为RUNX3和TSLC1基因甲基化异常始于胃黏膜上皮细胞中, 且随着患者年龄的增加而加重, 最终导致该基因的表达缺失, 使黏膜上皮细胞发生癌变. RUNX3和TSLC1基因表达在正常胃黏膜上皮细胞中存在, 而在胃癌和癌旁组织细胞中均缺失, 因此, 认为临床上可通过检测RUNX3和TSLC1基因是否表达来作为胃癌的一种分子生物学诊断方法. 还提出通过检测hMLH1和p16基因的甲基化状态可预知胃癌的转移侵袭能力的大小.

胃黏膜癌前病变中蛋白表达异常还与幽门螺杆菌感染有关. Shirin *et al*<sup>[9]</sup>研究发现合并幽门螺杆菌感染的慢性胃炎中p16基因蛋白呈过度表达, 并促使胃黏膜上皮细胞的凋亡.

因此, DNA的甲基化异常存在于非肿瘤细胞中, 存在于细胞的衰老过程中, 存在于胃癌发生、发展的早期阶段, 而且非常常见<sup>[10,11]</sup>.

## 2 叶酸与胃癌前病变中DNA甲基化异常的相关性

叶酸为B族维生素, 主要存在于蔬菜和水果, 人体自身不能合成叶酸, 必须从膳食获取, 若蔬菜和水果摄入不足, 极易造成叶酸缺乏. 人们最初认识叶酸与疾病的关系是因为缺乏叶酸能引起巨幼细胞性贫血, 随后发现, 叶酸缺乏还可以引起先天性缺陷和心血管系统疾病. 最近研究表明, 在人体细胞中, 为消除因体内、外各种因素导致的DNA损伤, 修复机制必不可少, 叶酸缺乏导致DNA甲基化的紊乱和DNA修复机制效率减弱. 体内、外实验都证实, 叶酸缺乏还可致DNA低甲基化和染色体损害<sup>[12]</sup>. 如叶酸缺乏可导致P53编码区域的低甲基化, 相反, 补充叶酸又可恢复这个区域的甲基化状态<sup>[13]</sup>, 因此, 认为叶酸缺乏将给人体健康带来潜在的危险, 可能与人类肿瘤的发生有关.

那么, 叶酸是如何维护基因甲基化状态和蛋白表达的呢? 叶酸通过提供或接受一碳单位在许多生化反应中发挥其辅助因子的作用, 以5-甲基-THF形式存在的叶酸在蛋白质转变为S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 中起重要作用. SAM是DNA甲基化作用的直接甲基提供者. 亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 在S-腺苷甲硫氨酸形成过程中起关键作用, 该基因有两个常见多态即C677T和A1298C, 前者位于催化区而后者位于活化调节区. 已有许多分子流行病学研究探讨MTHFR基因多态与肿瘤发病风险的关系. Ma *et al*<sup>[14]</sup>报道一个随访了12 a的研究, 其中含有202例结肠癌和326例正常对照, 结果发现C677T变异显著降低, 结肠癌的发病风险同样显著降低. 而C677T变异显著降低受到叶酸摄入量的影响. 他们提出, 叶酸充足时, MTHFR基因型变异降低, 肿瘤发病风险也降低, 是因为在这种情况下既有足够的甲基供体保证正常甲基化, 又由于MTHFR活性降低而抑制了5-甲基四氢叶酸通路, 使DNA正常合成和修复得以加强. 然而, 当叶酸摄入不足时变异基因型携带者可能既有DNA甲基化异常又有DNA合成/修复异常, 从而导致细胞癌变风险增加. Mayne *et al*<sup>[15]</sup>在美国进行的一项关于饮食营养素摄入与食管癌及胃癌发病风险的研究中发现, 叶酸摄入量最低的人群患食管腺癌、食管鳞癌、贲门癌及胃癌的相对危险度比叶酸摄入量最高的人群分别高出2.08倍、1.72倍、1.37倍和1.49倍. Fang *et al*<sup>[16,17]</sup>研究发现, 人胃癌灶总基因组DNA甲基化水平降低, 也发现低甲基化的胃癌患者, 血浆叶酸水平较低, 这证实叶酸维持的甲基化作用的降低, 是人胃癌发生的机制之一.

为进一步明确人胃癌发生中维生素含量和DNA甲基化水平与模式的变化及维生素对癌前疾病的干预作用, 房静远 *et al*<sup>[18]</sup>(1) 以微量生化法检测了56例慢性萎缩性胃炎(CAG)、6例胃溃疡和27例胃癌及45例健康成人的血浆叶酸及部分检测了供应病灶的动脉和所属静脉血中叶酸及胃手术标本不同部位和活检胃黏膜细胞内叶酸的变化. (2)分别采用甲基化酶孵育、<sup>3</sup>H-SAM掺入法

及Southern blot法观察了慢性胃炎、胃癌患者总基因组DNA、c-myc、c-Ha-ras癌基因的DNA甲基化水平的改变等。(3)分别以叶酸对中重度慢性胃炎行临床干预。结果表明,胃癌患者血浆、胃黏膜细胞的叶酸水平明显低于正常人;其总基因组DNA甲基化水平下降,癌区和癌旁区的c-myc、c-Ha-ras癌基因片段DNA甲基化水平下降,且甲基化水平降低情况与血浆叶酸降低有关。慢性胃炎经叶酸干预半年后,血及胃黏膜组织和细胞内相应的叶酸升高及总基因组DNA甲基化水平上升,异型增生、肠上皮化生改善明显。朱舜时<sup>et al</sup><sup>[19,20]</sup>就叶酸对胃癌和其他胃肠道癌发生的干预作用进行了7 a随访,证实叶酸对胃肠道癌的发生有干预作用,叶酸可治疗萎缩性胃炎,改善胃黏膜病理。他认为补充叶酸可以影响胃黏膜基因调控,减轻损伤,抑制增殖,使萎缩、肠化及异型增生明显改善,从而阻断胃癌癌前病变的进展。

总之,叶酸在基因甲基化修饰和保持基因组稳定性方面具有重要作用。因此,对于癌症发生的高危人群在明确其DNA甲基化情况的前提下,补充叶酸是一种明智的选择,对于胃癌前病变采用叶酸治疗,不仅有使萎缩、肠化及异型增生改善的作用,更有可能预防胃癌的发生。由于这方面的研究工作较少,尤其叶酸缺乏如何导致DNA甲基化异常?补充叶酸治疗后DNA甲基化状态是否得到改善?哪些基因的甲基化状态更易受到叶酸缺乏的影响?能否在其中选择一种基因,通过检测其甲基化状态和血液中叶酸水平作为临床诊断、治疗、预后判断的依据?等等,有许多理论有待完善,因此,深入的研究DNA甲基化、叶酸与癌前病变的关系对于逆转癌前病变,预防肿瘤的发生有重要意义。

### 3 参考文献

- 1 Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 998-1003
- 2 Jang TJ, Kim DI, Shin YM, Chang HK, Yang CH. p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. *Int J Cancer* 2001; 93: 629-34
- 3 Rocco A, Schandl L, Nardone G, Tulassay Z, Staibano S, Malfertheiner P, Ebert MP. Loss of expression of tumor suppressor P16(INK4) protein in human primary gastric cancer is related to the grade of differentiation. *Dig Dis* 2002; 20: 102-105
- 4 To KF, Leung WK, Lee TL, Yu J, Tong JH, Chan MW, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 623-628
- 5 Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556
- 6 Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 2002; 161: 399-403
- 7 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
- 8 Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumor-related genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Histol Histopathol* 2004; 19: 221-228
- 9 Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in H pylori-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter* 2003; 8: 66-71
- 10 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- 11 Lee JH, Park SJ, Abraham SC, Seo JS, Nam jH, Choi C, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene* 2004; 23: 4646-4654
- 12 Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001; 475: 57-67
- 13 Kim YI, Pogribny IP, Salomon RN, Choi SW, Smith DE, James SJ, Mason JB. Exon-specific DNA hypomethylation of P53 gene of rat colon induced by dimethylhydrazine. Modulation by dietary folate. *Am J Pathol* 1996; 149: 1129-1137
- 14 Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102
- 15 Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Blot WJ, Fraumeni JF. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1055-1062
- 16 Fang JY, Zhu S, Xiao S, Shi Y, Jiang S, Zhou X, Qian L. Alterations of level of total genomic DNA methylation and pattern of c-myc, c-Ha-ras oncogene methylation in human gastric cancerogenesis. *Chin Med J* 1996; 109: 787-791
- 17 Fang JY, Xiao SD, Zhu SS, Yuao JM, Qiu DK, Jiang SJ. Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *J Gastroenterol* 1997; 32: 171-175
- 18 房静远, 朱舜时, 萧树冬, 李蓉蓉, 施尧, 江绍基, 周怡和, 夏德凰, 金冠球, 谢宇野. 叶酸阻断胃癌机理的初步研究. *中华医学杂志* 1997; 77: 546-548
- 19 朱舜时, Joel Mason, 施尧, 胡运彪, 李蓉蓉, 汪敏, 周怡和, 金冠球, 谢宇野, 郭桂泉, 夏德凰, 钱珍华, 宋海连, 屠伯强, 张丽冬, Robert Russell, 萧树东. 叶酸对胃癌和其他胃肠道癌发生的干预作用—临床试验七年随访. *胃肠病学* 2002; 7: 73-78
- 20 朱舜时, 夏书军, 陈晓宇, 汪敏, 彭延申, 施尧. 叶酸治疗萎缩性胃炎并干预胃癌生成的分子生物学机制. *胃肠病学* 2002; 7: 86-89



# 急性胰腺炎时炎症介质与细胞凋亡关系的研究进展

张喜平, 林 谦

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006  
林谦, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053  
浙江省中医药卫生科技计划项目, NO.2003C130、2004C142  
杭州市重大科技发展计划项目, NO.2003123B19  
杭州市医药卫生重点项目, NO.2004Z006  
浙江省医药卫生科技计划项目, NO.2003B134  
杭州市科技计划项目, NO.2005224  
杭州市医药卫生科技项目, NO.2003A004  
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.  
zxp99688@vip.163.com  
电话: 0571-87065701  
收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-31

## 摘要

细胞凋亡是急性胰腺炎时的一个重要病理特征, 可在多脏器中出现, 直接关系着病情的进展变化. 它主要由凋亡相关基因控制, 但也受炎症介质的影响. 我们就急性胰腺炎时主要的炎症介质(如一氧化氮、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、转化生长因子 $\beta$ 1、白细胞介素10、核转录因子- $\kappa$ B等) 在参与细胞凋亡作用的方面作一综述.

**关键词:** 急性胰腺炎; 急性脑损伤; 发病机制

张喜平, 林谦. 急性胰腺炎时炎症介质与细胞凋亡关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2773-2777  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2773.asp>

## 0 引言

凋亡(apoptosis)是一种主动的、由内在基因调控的不同于坏死的细胞死亡形式. 细胞凋亡在生命过程中具有重要的生物学意义, 它严格控制着细胞死亡和增殖的平衡. 其形态学表现过程为有完整的细胞膜、细胞体积缩小、胞核固缩、凋亡小体形成, 但线粒体和酶原颗粒完整. 因此, 凋亡与坏死的最大本质区别是前者不引起或很少引起炎症反应.

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见急腹症之一, 根据病情轻重分为急性轻症胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)和重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP); 又根据病理类型可分为急性水肿性胰腺炎(acute edematous pancreatitis, AEP)和急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP). AP多数为自限性疾病, 约15-20%患者的病情可能恶化, 并出现局部并发症或器官衰竭, 最终发展成为SAP. SAP的最终结果总是局部和全身性炎症反应, 这与炎症介质的过度生成有关<sup>[1]</sup>. 目前认为MAP之所以发展成为SAP是由于异常激活的胰酶在造成胰腺损伤的同时, 激活了胰腺内及胰腺外的炎症细胞释放炎症介质, 从而形成

SIRS和MOF<sup>[2]</sup>. 以往认为急性胰腺炎中细胞的死亡方式是坏死, 近年来发现急性胰腺炎与胰腺腺体细胞凋亡有关<sup>[3-5]</sup>, 细胞凋亡参与了急性胰腺炎的发病<sup>[6, 7]</sup>. 胰腺腺泡细胞的不同死亡方式即细胞凋亡、细胞坏死与胰腺炎的病情轻重有关, 胰腺腺泡细胞凋亡可能是胰腺炎发生后对机体较为有利的一种反应<sup>[8-10]</sup>. 同时, 很多研究发现在SAP引起的全身并发症中, 胰腺外脏器如肝脏、小肠、肾脏、肺、心脏、胸腺等也存在着细胞凋亡, 并且其程度与脏器损伤程度密切相关<sup>[11-16]</sup>. 细胞凋亡主要受基因调控, 但在众多研究中也发现AP时细胞损伤释放的一些无机小分子、细胞因子、炎症介质及毒性物质作用均会影响细胞的凋亡. 这些细胞活性分子及一些应激因素参与细胞的凋亡过程, 在引导细胞凋亡的基因调控方面具有重要的意义, 起到间接调控作用, 也是急性胰腺炎时细胞凋亡的重要参与者, 其作用不容忽视. 我们就AP时主要的炎症介质在参与细胞凋亡作用方面作一综述.

## 1 一氧化氮(nitric oxide, NO)

NO是一种无机小分子化合物, 在人体正常功能调节和许多疾病的发生中起着十分重要的作用, 具有复杂的生物学活性. 催化NO产生的NO合酶广泛存在于哺乳动物的组织和细胞中, 有两种形式: 原生型(cNOS)和诱导型(iNOS). NO对机体的作用具有两面性<sup>[17]</sup>, cNOS催化生成的小剂量NO常有细胞保护作用, 而iNOS激活生成的大量NO与许多疾病的发生相关<sup>[18]</sup>. 从诱导出现ANP后5 min, 就开始持续产生大量的NO, 通过产生过氧化的硝酸盐或其毒性中间产物损伤组织细胞, 加重了胰腺的损伤<sup>[19]</sup>. 此外, 过量NO促进了ANP所致的肺损伤<sup>[20]</sup>, 其诱发产生大量的细胞因子又加重对肾脏的损伤<sup>[21, 22]</sup>. 同时, 小剂量NO具有保护作用, Werner *et al*<sup>[23]</sup>证实小剂量的NO可改善AP时的微循环障碍, 保护内皮细胞, 维持血管壁的完整性, 增加毛细血管血流, 间接或直接保护胰腺细胞, 提供外源性NO可明显减轻实验性急性胰腺炎的损伤程度, 而阻断内源性NO则显著加重许多损伤因子所致的胰腺损伤<sup>[24]</sup>.

Fehsel *et al*<sup>[25]</sup>通过实验发现外源性NO或由细胞因子、细菌毒素诱导iNOS生成后再合成释放的内源性NO均能有效地诱导胸腺细胞凋亡, 并提出NO能诱导其他多种类型细胞凋亡, 从此人们开始关注NO与细胞凋亡的关系. 许多研究发现急性胰腺炎时血清NO水平



均有不同程度的下降,其下降程度跟病情呈正相关,低水平的NO往往预示着炎症程度重、预后差. Kaneto *et al*<sup>[26]</sup>对大鼠胰腺分离出的胰岛B细胞进行研究,发现高浓度NO会出现细胞凋亡. 用升高血清NO的方法常能减轻AP的炎症反应,提高实验对象的生存率. 刘牧林 *et al*<sup>[27]</sup>应用外源性NO生成剂及NO抑制剂对ANP小鼠进行实验性治疗,结果发现应用外源性NO生成剂组NO含量较高,平均生存时间长,而用NO抑制剂组NO降低更明显,血清TNF值升高,病理坏死严重,平均生存时间缩短,因此认为NO参与AP的病情调控演变,并且有一定的治疗作用,推测这可能跟NO促进部分胰腺腺泡细胞凋亡,限制了炎症反应的扩大有关. NO能通过一系列途径诱导胰腺细胞凋亡<sup>[28]</sup>,主要有: (1)通过sGC-cGMP途径调节细胞凋亡,使胰腺微循环改善; (2)通过活性氧中间物(ROI)途径诱导细胞凋亡,抑制中性粒细胞(PMN)在胰腺内积聚; (3)通过破坏能量代谢途径导致细胞凋亡,使感染得以控制; (4)通过基因调控途径调节细胞凋亡与p53表达.

## 2 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$ 是由活化的单核/巨噬细胞分泌的细胞因子,具有多种生物学活性,与胰腺炎症程度密切相关. SAP患者血清TNF- $\alpha$ 较MAP患者高,且两者均较正常对照组明显增高,而治疗后两者均明显下降<sup>[29]</sup>. TNF- $\alpha$ 与细胞凋亡的关系密切相关. Bhatia *et al*<sup>[30]</sup>在AP大鼠血清和胰腺组织中测到TNF- $\alpha$ 的表达,认为TNF- $\alpha$ 通过诱导胰腺腺泡细胞凋亡,降低AP的严重程度. Yasuda *et al*<sup>[31]</sup>在AP小鼠胰腺组织上测到TNF- $\alpha$  mRNA的表达,认为TNF- $\alpha$ 可通过诱导胰腺腺泡细胞凋亡减少消化酶的产生,改善预后,因此起防御作用. 常华 *et al*<sup>[32]</sup>对AP胰腺细胞凋亡与TNF- $\alpha$ 之间的关系进行了研究,发现胰腺炎组大鼠术后1 h凋亡细胞进行性增多,6 h后减少,6 h凋亡指数显著高于3 h、12 h, TNF- $\alpha$ 浓度3 h、6 h较1 h明显降低,12 h较6 h明显升高,认为诱导胰腺细胞凋亡是TNF- $\alpha$ 参与AP发病机制的一个重要因素,这种作用与TNF- $\alpha$ 自身的浓度有关. 张永宏 *et al*<sup>[33]</sup>认为血清TNF- $\alpha$ 对细胞凋亡调控表现出双面性,即低浓度的TNF- $\alpha$ 能诱导细胞凋亡,促进炎症愈合;而高浓度的TNF- $\alpha$ 则导致胰腺腺泡细胞坏死. Malka *et al*<sup>[34]</sup>通过观察不同浓度TNF- $\alpha$ 处理的AR4-2J细胞时发现, TNF- $\alpha$ 在 $>10 \mu\text{g/L}$ 时,才能诱导AR4-2J细胞的凋亡,在 $100 \mu\text{g/L}$ 时,诱导凋亡达到最大程度(40%),在 $10\text{--}100 \mu\text{g/L}$ 范围内其诱导凋亡效应呈时间-剂量依赖性. 胰腺腺泡细胞膜上存在着TNF- $\alpha$ 受体,单核巨噬细胞被激活释放低浓度的TNF- $\alpha$ ,与其受体细胞结合诱导细胞凋亡;大量的TNF- $\alpha$ 进一步激发一系列级联反应,诱导IL-1、IL-6、IL-8等的表达<sup>[33]</sup>,使细胞因子过度激活引起胰腺

细胞坏死,最终导致胰腺及胰腺外组织的损伤,而在敲除TNF- $\alpha$ 受体的AP动物中观察不到胰腺细胞凋亡<sup>[16]</sup>. Kimura *et al*<sup>[9]</sup>在蛙皮素诱导的胰腺炎大鼠模型中应用TNF- $\alpha$ 拮抗剂,能抑制胰腺细胞凋亡. TNF- $\alpha$ 亦参与AP时其他脏器的凋亡过程. 张刚 *et al*<sup>[35-37]</sup>在ANP引起的肺损伤中发现肺内TNF- $\alpha$ 基因转录表达过度上调,而肺内细胞凋亡指数与TNF- $\alpha$  mRNA水平呈负相关,过度表达的TNF- $\alpha$ 可能使肺内的中性粒细胞凋亡延迟,因而认为TNF- $\alpha$ 的过度生成是中性粒细胞延迟凋亡的部分原因. TNF- $\alpha$ 引起细胞凋亡的机制可能通过激活T细胞表面的FasL配体, FasL配体再与胰腺细胞膜上的TNF- $\alpha$ 受体结合促使细胞凋亡. Satoh *et al*<sup>[38]</sup>认为TNF- $\alpha$ 也可通过激活富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2途径,引起细胞支架的结构破坏,并可通过蛋白激酶C介导的不同机制触发细胞的死亡信号,达到凋亡的目的.

## 3 转化生长因子 $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)

TGF- $\beta$ 1是一种调节细胞增殖、分化及细胞间基质表达的一类多功能细胞生长因子,与纤维化关系最为密切. 同时,又可抑制肝细胞、胃肠道上皮细胞等多种细胞的增殖,跟细胞凋亡密切相关,是一种正性细胞凋亡触发因子. 在AP大鼠模型中发现,巨噬细胞诱导产生的TGF- $\beta$ 1是使AP时肝细胞发生凋亡的重要因素<sup>[39,40]</sup>. Takeyama *et al*<sup>[41]</sup>研究SAP大鼠时发现肝细胞有凋亡发生, SAP并发的腹水具有诱导肝细胞凋亡的作用,肝细胞凋亡和肝细胞损伤可以被IL-1转化酶抑制剂所缓解,中和转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )可以部分的阻止凋亡的发生,研究人员认为在SAP时肝细胞凋亡的发生与腹水中的TGF- $\beta$ 有关. 在雨蛙肽诱导的AP大鼠模型中发现TGF- $\beta$ 1以促进腺泡细胞凋亡的方式来清除受损的腺泡细胞,能减轻AP的炎症反应. 用抑制TGF- $\beta$ 的方法不仅能减轻其导致的胰腺纤维化,同时也能保护胰腺细胞过多凋亡引起的慢性损伤,说明TGF- $\beta$ 1又有促进胰腺腺泡细胞凋亡的作用<sup>[42]</sup>. TIEG(TGF- $\beta$ 诱导的早期基因)是一种TGF- $\beta$ 调控的锌指编码基因,存在于正常人胰腺外分泌导管细胞和腺细胞群,与胰腺炎的凋亡有关<sup>[43]</sup>. 研究发现,经TGF- $\beta$ 处理的胰腺外分泌细胞可见TIEG表达上调且细胞凋亡率增加<sup>[44]</sup>,说明TGF- $\beta$ 诱导细胞凋亡的可能机制是诱导TIEG的表达增加. 另外,有学者<sup>[45]</sup>提出TGF- $\beta$ 1虽能诱导胰腺细胞的凋亡,但并不是诱导胰腺细胞凋亡的主要因素,因为在对SAP大鼠的研究中发现TGF- $\beta$ 1有明显的表达,但其表达的规律与Bax基因蛋白表达的规律不一致. 这可能跟胰腺细胞凋亡的多因素、多途径有关.

## 4 白细胞介素10 (interleukin-10, IL-10)

IL-10是以抑制Th1细胞克隆细胞因子合成为特点的多

效免疫调节因子, 主要由Th2细胞产生, 通过抑制NO和TNF的产生及氧自由基的释放, 降低多核粒细胞, 单核粒细胞和巨噬细胞的功能, 起到抗炎性作用. IL-10与急性胰腺炎有密切关系, 内源性或外源性IL-10可以抑制单核细胞和巨噬细胞的活性, 从而抑制这些细胞释放促炎因子, 调节全身免疫反应及炎症反应, 对胰腺具有保护作用. Rongione *et al*<sup>[46]</sup>在用蛙皮素诱导AP的大鼠中发现, 注射IL-10后, 血浆淀粉酶浓度明显下降, 胰腺组织水肿、炎症浸润减轻、空泡形成减少, 而且血浆中检测不到TNF- $\alpha$ , 说明IL-10在发生AP时能减轻胰腺炎症的严重程度. 近年来发现, 这种保护作用可能与促进细胞凋亡相关. 谷俊朝 *et al*<sup>[47]</sup>发现AP大鼠早期给予IL-10治疗组肝组织中Bcl-2表达增强, Bax表达降低, 肝细胞凋亡减少, 因而说明IL-10可能通过改变凋亡调控基因的表达, 达到促进细胞凋亡的目的. 张宏杰 *et al*<sup>[48]</sup>将SAP模型大鼠分成IL-10预防组(术前1 h腹腔注射IL-10 150 kU, 之后每2 h给一次)、IL-10治疗组(术后1 h腹腔注射IL-10 150 kU, 之后每2 h给一次)、对照组, 发现用IL-10干预的SAP大鼠坏死程度较对照组明显减轻, 血淀粉酶、脂肪酶、iNOS也较对照组明显降低, 且干预组高表达TGF- $\beta$ 1, 凋亡率显著增加. 因此, 认为IL-10不仅诱导机体大量合成TGF- $\beta$ 1, 降低iNOS的产生来阻断SAP的发展, 而且也通过胰腺细胞的凋亡来减少其坏死, 控制炎症程度. IL-10促使细胞凋亡的机制目前还不甚清楚, 可能与改变凋亡基因的表达, 提高局部TGF- $\beta$ 1的浓度及抑制炎症介质的释放有关.

## 5 核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B最初从B淋巴细胞核中提取而出, 是一类主要参与炎症分子表达调控的转录因子<sup>[49,50]</sup>. 他是能与某些基因启动因子及增强子区的 $\kappa$ B序列结合的蛋白质, 他能启动或增强基因的转录<sup>[51-54]</sup>. 随后发现它存在于多种细胞中, 参与多种生理、病理过程的调控, 是一种多向性、多效性调控因子, 在机体的炎症反应、凋亡调控等方面发挥重要作用. 近年来, NF- $\kappa$ B在AP发病机制中的作用成为一个新的研究热点. 有动物实验研究表明, AP时应用NF- $\kappa$ B抑制剂能抑制炎症因子的表达和释放, 可以使胰腺细胞凋亡增加, 坏死细胞减少, 减轻动物SAP模型的病情及降低实验组动物组死亡率<sup>[55-57]</sup>. 裴红红 *et al*<sup>[58, 59]</sup>通过大鼠的动物实验发现NF- $\kappa$ B参与了水肿性和坏死性胰腺炎的发病, 水肿型胰腺炎较坏死性胰腺炎NF- $\kappa$ B表达强度明显减弱, 认为可能是由于水肿型胰腺炎时存在着细胞凋亡的保护机制所引起. 因此, NF- $\kappa$ B有一定的抗凋亡作用.

NF- $\kappa$ B参与抗凋亡作用的途径有: (1)通过调控多种基因转录及蛋白表达, 包括黏附因子、细胞因子等. Satoh *et al*<sup>[60]</sup>发现SAP发生后, NF- $\kappa$ B活化显著增加,

NF- $\kappa$ B活化有时间依赖性, 随着时间增加而活化增强, NF- $\kappa$ B的异常活化可促进前炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6)等炎症基因的转录, 而TNF- $\alpha$ 、IL-1作为细胞外刺激信号又可激活NF- $\kappa$ B的表达, 进一步放大炎症反应. SAP时肝脏NF- $\kappa$ B的活化促进了细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达, 进而导致多形核粒细胞在肝组织中聚集, 从而引起肝损伤<sup>[61]</sup>. NF- $\kappa$ B诱导产生的黏附因子及细胞因子, 不仅抑制了腺泡细胞的凋亡, 促进炎症的扩大, 也引起了胰腺外的损伤. (2)通过诱导TNF- $\alpha$ 抑制胰腺细胞的凋亡. 腺泡细胞膜上存在TNF- $\alpha$ 受体, TNF- $\alpha$ 与其结合后能诱导NF- $\kappa$ B激活再次产生、释放TNF- $\alpha$ <sup>[62]</sup>, 损伤组织. TNF- $\alpha$ 能抑制凋亡蛋白酶caspase- $\delta$ 的活化, NF- $\kappa$ B通过操纵caspase- $\delta$ 的活化抑制胰腺细胞的凋亡<sup>[63]</sup>. (3)与凋亡调控基因有关. Haddad *et al*<sup>[64]</sup>发现在肺泡II型上皮细胞凋亡过程中NF- $\kappa$ B能上调Bcl-2的表达, 同时还能下调Bax, 参与抗凋亡过程. Wang *et al*<sup>[65]</sup>证实NF- $\kappa$ B能通过激活Bcl-2家族中的A1/BFI-1在抗凋亡中发挥作用. 因此, NF- $\kappa$ B主要通过上调Bcl-2、Bcl-XL基因启动抗凋亡作用, 同时也抑制P53、Bax基因表达抑制诱导的凋亡作用<sup>[66]</sup>.

## 6 其他

血小板活化因子(PAF)是由胰腺细胞或导管细胞产生的, 具有活化中性粒细胞功能, 并使之通过释放过氧化氢、一氧化氮等物质诱导细胞坏死或细胞凋亡而导致细胞死亡. 用PAF的拮抗剂(BN52021)治疗用蛙皮素诱导的鼠胰腺炎, 既减少了细胞凋亡, 也减少了细胞坏死<sup>[67]</sup>. 黏附分子也与凋亡有关. ANP时细胞黏附分子的异常表达, 致使上皮细胞与细胞基质间连接破坏, 从而参与了肠黏膜上皮细胞凋亡, 增加了肠黏膜上皮细胞凋亡<sup>[68]</sup>. IL-1在急性胰腺炎的发病过程中起重要作用, 其浓度与死亡率呈正相关<sup>[69]</sup>. Fink *et al*<sup>[70]</sup>用雨蛙素诱导大鼠胰腺炎, 通过注射抗血清去除中性粒细胞和巨噬细胞降低胰腺组织中的IL-1 $\beta$ , 结果IL-6水平明显降低, 胰腺组织损伤明显减轻. 另有实验证据表明白细胞介素-1 $\beta$ 转化酶抑制剂有显著地减轻急性胰腺炎大鼠的病情并能提高其生存率的作用, Rau *et al*<sup>[71]</sup>发现这种作用跟限制腺泡细胞的坏死程度相关, 但机制尚不清楚, 可能与凋亡有一定的联系. IL-6也是AP时一种重要的炎症介质, 在SAP大鼠模型中能发现其水平明显升高<sup>[72]</sup>. 余少鸿 *et al*<sup>[73]</sup>用大黄素治疗SAP大鼠, 发现大黄素能明显抑制TNF- $\alpha$ 、IL-6的释放, 诱导受损胰腺细胞的凋亡, 从而改善SAP的病情发展. 但IL-6与腺泡细胞凋亡的具体关系尚不清楚, 有待进一步研究. IL-8、白三烯、磷脂酶A<sub>2</sub>、血栓素A<sub>2</sub>等也是AP时重要的炎症介质, 对其发展变化及转归也起重要作用<sup>[74]</sup>, 但在参与细胞凋亡方面意义尚不明确.



总之,细胞凋亡是一个复杂的生物学表现,其调控虽受凋亡相关基因主导,但却受各种诱导因素的影响。值得注意的是,AP时细胞凋亡并不是由某种影响因素单独发挥主要作用,而是各因素综合作用的结果,它们之间的关系更是一个网络式的结构。目前各方面报道均表明,AP时应用各种方法来诱导细胞凋亡能控制SAP病情的发展,有利于治疗,但尚处于研究起步阶段。研究AP时炎症介质与细胞凋亡的关系有利于我们了解AP的发病过程,并能为科学地寻找有效的治疗方法提供思路,从而提高临床上SAP的治疗水平。

## 7 参考文献

- Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83
- 王自法, 潘承恩, 刘绍诰. 急性胰腺炎中炎症介质的作用. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 170-171
- Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1996; 271: C982-C993
- Gukovskaya AS, Perkins P, Zaninovic V, Sandoval D, Rutherford R, Fitzsimmons T, Pandol SJ, Poucell-Hatton S. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology* 1996; 110: 875-884
- Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: C1295-C1304
- 袁耀宗, 龚自华, 楼恺嫔, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 生长抑素及 Octreotide 对急性胰腺炎胰腺细胞凋亡的作用机制. *中国危重病急救医学* 2000; 12: 402-405
- 吴泽建, 张阳德, 雷正明, 余少鸿. 细胞凋亡在大鼠急性胰腺炎发病机制的探讨. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 13-15
- Fujimoto K, Hosotani R, Doi R, Wada M, Lee JU, Koshiba T, Miyamoto Y, Imamura M. Role of neutrophils in cerulein-induced pancreatitis in rats: possible involvement of apoptosis. *Digestion* 1997; 58: 421-430
- Kimura K, Shimosegawa T, Abe R, Masamune A, Satoh A, Takasu A, Koizumi M, Toyota T. Low doses of lipopolysaccharide upregulate acinar cell apoptosis in cerulein pancreatitis. *Pancreas* 1998; 17: 120-126
- 尚东, 关凤林, 杨佩满, 辛毅, 陈海龙, 刘忠. 胰腺腺泡细胞凋亡在大鼠急性胰腺炎病程中的作用及凋亡调控基因的表达. *肝胆胰外科杂志* 2001; 13: 152-155
- Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor-beta1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 641-649
- 许利剑, 杨春, 苗毅. 细胞凋亡在实验性急性胰腺炎大鼠肠粘膜屏障功能障碍中的作用. *河北医学* 2002; 8: 577-580
- 张姐. 在实验性重症急性胰腺炎中肾小管的凋亡细胞死亡. *国外医学·外科学分册* 1999; 26: 311
- 刘学民, 刘青光, 潘承恩, 徐高峰, 张涛, 黄建勇, 张梅. 血管内皮凋亡对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的影响. *第四军医大学学报* 2003; 24: 1677-1679
- 陈维, 刘训良. 重症急性胰腺炎大鼠心肌损害、心肌Bcl-2和Bax基因表达变化及山莨菪碱保护作用. *江苏医药杂志* 2003; 29: 424-426
- Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y. Thymic atrophy caused by thymocyte apoptosis in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 1998; 78: 97-102
- Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456
- 张在兴, 孙家邦. 一氧化氮生物学作用的两面性与急性胰腺炎. *首都医科大学学报* 2001; 22: 282-284
- 赵敏, 陈瑞芬, 周以健, 王兴翠. 内源性一氧化氮在急性出血坏死性胰腺炎发病中的作用. *首都医科大学学报* 2003; 24: 243-246
- 程石, 赵军, 何三光, 宋茂民, 李志宏, 张越巍. 一氧化氮在急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤中的作用. *中华外科杂志* 2003; 41: 336-339
- 任晓葆, 何振平, 文亮. 一氧化氮在急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰肾损伤中的作用. *第三军医大学学报* 2001; 23: 1081-1083
- Tome LA, Yu L, de Castro I, Campos SB, Seguro AC. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1139-1145
- Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 1998; 43: 401-407
- 张在兴, 孙家邦, 李非, 张淑文, 崔叶青, 孙海晨, 刘爽. 内源性一氧化氮对大鼠急性坏死性胰腺炎的胰腺保护作用. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 606-608
- Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 1995; 155: 2858-2865
- Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Kamada T, Taniguchi N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1995; 44: 733-738
- 刘牧林, 郑士友, 方先业. 一氧化氮治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究. *蚌埠医学院学报* 2001; 26: 95-96
- 成雨. 一氧化氮诱导细胞凋亡在急性胰腺炎中的作用. *国外医学·外科学分册* 2002; 29: 343-346
- 陈垦, 梁坚, 汤斌叶文桃, 王婉梅, 祝斌. 急性胰腺炎患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 含量测定. *上海免疫学杂志* 2000; 20: 169-171
- Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML, Saluja AK. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 476-483
- Yasuda H, Kataoka K, Ichimura H, Mitsuyoshi M, Iida T, Kita M, Imanishi J. Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 637-644
- 常华, 严际慎, 王平瑜, 闫俊岭. 大鼠急性胰腺炎胰腺细胞凋亡与外周血浆 TNF- $\alpha$  的关系. *肝胆胰外科杂志* 2002; 14: 215-216
- 张永宏, 周力, 黄立敏. 细胞凋亡和肿瘤坏死因子在大鼠急性胰腺炎发病中的作用. *贵州医药* 2004; 28: 1081-1083
- Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, Dagorn JC, Iovanna JL. Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein activation. *Gastroenterology* 2000; 119: 816-828
- 张刚, 修瑞龄, 刘洲, 杨训, 童文森, 张肇达, 乔安忆. 实验性急性胰腺炎肺内细胞凋亡状况及其意义的初步探讨. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 10-13
- 张刚, 张肇达, 修瑞龄. TNF- $\alpha$  基因表达及细胞凋亡与急性胰腺炎并发肺损伤的关系. *中华外科杂志* 2000; 38: 671
- 张刚, 修瑞龄, 杨训, 刘洲, 张肇达, 刘续宝. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  基因表达、细胞凋亡与急性胰腺炎肺损伤关系的实验研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 22-25
- Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR Jr, Shimosegawa T, Pandol SJ. Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* 2005; 129: 639-651
- Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor-beta1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 641-649
- 李海燕, 陈瑞芬, 刘国贞, 王珏, 王兴翠. 实验性急性出血坏死性胰腺炎肝转化生长因子 $\beta$ 1 与肝细胞凋亡. *中国病理生理杂志* 2004;



- 20: 1256-1260
- 41 Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 55-64
  - 42 Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, Asaumi H, Watanabe S, Yamaguchi T, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Lab Invest* 2004; 84: 1610-1618
  - 43 Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4907-4912
  - 44 Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC, Urrutia R. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 2365-2374
  - 45 徐高峰, 刘青光, 刘学民, 张涛. 大鼠重症急性胰腺炎胰腺细胞凋亡的研究. 第四军医大学学报 2003; 24: 908-910
  - 46 Rongione AJ, kusske AM, kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 960-967
  - 47 谷俊朝, 王宇, 张忠涛, 薛建国, 李建设, 周延忠. 外源性白介素-10对急性出血坏死性胰腺炎大鼠肝脏Bcl-2、Bax表达和肝细胞凋亡的影响. 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 260-262
  - 48 张宏杰, 王选. 白细胞介素10对重症急性胰腺炎的保护作用研究. 山西医科大学学报 2004; 35: 327-330
  - 49 李永渝, 高占峰. 急性胰腺炎与核因子- $\kappa$ B. 世界华人消化杂志 2001; 9: 420-421
  - 50 Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF- $\kappa$ B pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 2001; 77: 79-85
  - 51 Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- $\kappa$ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001; 108: 203-213
  - 52 Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 978-991
  - 53 Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- $\kappa$ B transactivation: the role of NF- $\kappa$ B association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 142-152
  - 54 Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- $\kappa$ B activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H872-H879
  - 55 Dunn JA, Li C, Ha T, Kao RL, Browder W. Therapeutic modification of nuclear factor kappa B binding activity and tumor necrosis factor-alpha gene expression during acute biliary pancreatitis. *Am Surg* 1997; 63: 1036-1043
  - 56 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappa B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998; 275: G1402-G1414
  - 57 白雪巍, 孙备. 重症急性胰腺炎与核转录因子. 哈尔滨医科大学学报 2004; 38: 488-489
  - 58 裴红红, 杨正安, 秦兆寅, 封英群. 大鼠急性坏死性胰腺炎时核因子 $\kappa$ B表达的意义. 中华普通外科杂志 2002; 17: 752
  - 59 裴红红, 杨正安, 秦兆寅, 封英群. 核因子- $\kappa$ B在两种实验性胰腺炎时表达的意义. 中国急救医学 2002; 22: 72-73
  - 60 Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, Kimura K, Masamune A, Koizumi M, Toyota T. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut* 1999; 44: 253-258
  - 61 石力, 田伏洲, 黄大熔. 急性胰腺炎大鼠肝脏NF- $\kappa$ B对ICAM-1表达的调控及其意义. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1505-1507
  - 62 Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce, release and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 1853-1862
  - 63 Weber CK, Adler G. From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis. *Pancreatology* 2001; 1: 356-362
  - 64 Haddad JJ, Land SC. The differential expression of apoptosis factors in the alveolar epithelium is redox sensitive and requires NF-kappaB (RelA)-selective targeting. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 257-267
  - 65 Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5923-5929
  - 66 郑吉顺. 核转录因子与腺泡细胞的死亡方式研究进展. 胃肠病学和肝病杂志 2002; 11: 284-287
  - 67 Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ, Poucell-Hatton S. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1081-1091
  - 68 王兴鹏, 王冰娴, 吴恺, 徐选福. 细胞凋亡在急性坏死性胰腺炎早期肠黏膜上皮细胞死亡中的作用. 中华消化杂志 2001; 21: 267-270
  - 69 Norman JG, Fink G, Franz M, Guffey J, Carter G, Davison B, Sexton C, Glaccum M. Active interleukin-1 receptor required for maximal progression of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1996; 223: 163-169
  - 70 Fink GW, Norman JG. Intrapaneatic interleukin-1beta gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis. *J Surg Res* 1996; 63: 369-373
  - 71 Rau B, Paszkowski A, Lillich S, Baumgart K, Moller P, Beger HG. Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis. *Lab Invest* 2001; 81: 1001-1013
  - 72 余少鸿, 雷正明, 张培明, 高俊勇. 重症急性胰腺炎急性期细胞因子及胰腺腺泡细胞凋亡的动态变化. 重庆医学 2002; 31: 970-972
  - 73 余少鸿, 雷正明, 张培明, 陈永兵. 大黄素对大鼠重症胰腺炎TNF- $\alpha$ 、IL-6及胰腺腺泡细胞凋亡的影响. 中国中西医结合外科杂志 2003; 9: 209-211
  - 74 朱维铭, 黎介寿. 急性重症胰腺炎与促炎细胞因子和炎症介质的关系. 医学研究生学报 2000; 13: 106-109

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

# 过继免疫疗法在慢性乙型肝炎治疗上的应用

高新生, 林菊生

高新生, 林菊生, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 林菊生, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. jsln@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83662578

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

## 摘要

国内外的研究都表明, 宿主对HBV各种抗原产生不同程度的免疫耐受, 目前治疗乙肝的药物疗效均有限. 过继免疫疗法因其有希望从源头上解决免疫耐受的问题, 故在慢性乙肝治疗上有很好的应用前景. 我们就过继免疫在乙肝治疗中的研究及其临床应用前景进行了回顾和展望.

**关键词:** 过继免疫; 骨髓移植; 树突状细胞; 疗法; 慢性乙型肝炎

高新生, 林菊生. 过继免疫疗法在慢性乙型肝炎治疗上的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2778-2782

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2778.asp>

## 0 引言

目前, 多数学者认为HBV感染慢性化的主要机制是宿主对HBV各种抗原产生不同程度的特异性免疫无应答, 即免疫耐受. HBV可以经胎盘传染胎儿, 胎儿免疫系统尚未发育成熟, 体内HBV特异性T细胞因阴性选择而导致克隆清除. 多数实验结果表明成人感染HBV的免疫耐受主要机制为个体免疫系统不健全. 如Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>细胞失衡, HBV感染免疫细胞等. 总体来说, 乙肝慢性化与个体特异性免疫功能减弱有关. 过继免疫治疗(adoptive immunotherapy)是将体外激活的免疫活性细胞或细胞因子进行免疫性转移, 输给肿瘤或感染病毒的宿主, 使他们在体内产生协同作用, 由免疫活性细胞杀伤、溶解肿瘤或病毒感染的细胞, 直接或间接地介导机体的抗肿瘤或抗病毒效应. 过继免疫疗法因为可以借正常个体的免疫功能来协助或纠正有免疫功能障碍的患者, 故在慢性乙肝治疗上有较好的应用前景. 我们将对此进行综述.

## 1 骨髓移植(BMT)疗法

既往临床观察表明, 一些合并HBV感染的血液病患者接受乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)阳性供者骨髓后, 在造血和免疫功能重建的同时, 其体内的HBV也被清除. 近年来, 随着研究者对这一现象的认识逐渐深入, 有关研究报道不断增多<sup>[1-3]</sup>. Shouval *et al*<sup>[4]</sup>研究发现: 用重组的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)免疫供者小鼠, 然后将其骨髓移植给

免疫抑制的受者小鼠, 受者体内可检测到抗-HBs, 提示供者对乙型肝炎的免疫功能已转移到受者体内. Lau *et al*<sup>[5]</sup>报道21例合并HBV感染的患者, 其中5例接受抗-HBs/抗-HBc阳性的骨髓移植, 2例产生持续的HBsAg阴转和抗-HBs阳转, 这2例患者移植前HBsAg和HBV DNA均为阴性, 且均为成年人; 1例发生一过性阴转. 而2例未发生阴转者均为儿童, 且病毒为高复制, 其中1例患者与供者HLA抗原有两个位点不一致, 另1例接受经疫苗免疫产生抗-HBs的供者骨髓. 另16例接受抗-HBs阴性供者骨髓的患者, 无一例发生阴转, 说明过继免疫在HBV的清除中起重要作用, 但也可能存在其他因素的影响, 如病毒复制的水平, 获得免疫的方式等. 随后Lau *et al*<sup>[6]</sup>又观察了13例接受抗-HBs阳性供者的骨髓, 其中抗-HBs/抗-HBc阳性6例, 抗-HBc阳性7例, 4例HBsAg阴转, 抗-HBs转阳, 且全部都是接受抗-HBs/抗-HBc阳性骨髓的患者; 而7例接受仅抗-HBs阳性的患者无一例阴转, 故有人认为疫苗免疫对于HBV的清除是不足的, 而且发生清除的时间一般在BMT后3-6 mo. Lau *et al*<sup>[7]</sup>研究受体体内淋巴细胞后, 发现了受体体内T淋巴细胞来源于供体, 并且是针对核心C抗原, 而不是针对表面抗原, 这证明了上述现象发生的机制. 对于合并HBV感染的需移植者, 接受BMT后, 常需要大剂量的免疫抑制剂治疗, 这很可能诱发肝炎的活动, 甚至发生重型肝炎. Caselitz *et al*<sup>[8]</sup>研究认为在合并HBV感染的移植患者中, 由于肝衰竭引起死亡的可能性至少部分与HBV的再活动有关. Chen *et al*<sup>[9]</sup>报告了43例接受BMT的HBV感染者, 其中32例接受异基因BMT, 11例接受自体BMT. 随访1-11 a, 接受异基因BMT的患者有26(81.3%)例发生肝功能损害, 5例发展为暴发型肝炎; 在接受自体BMT的患者有4(36.4%)例发生肝功能损害, 无一例发生暴发型肝炎, 提示自身移植的安全性较高. Lau *et al*<sup>[5]</sup>报道4例接受抗-HBs阳性供者的骨髓发生HBV清除的患者中, 虽然均出现不同程度的肝损害, 但没有出现暴发型肝炎, 原因可能与细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的非细胞毒性作用机制有关. 反之, 乙肝抗体阳性的患者接受乙肝病毒携带者骨髓移植, 则有发生暴发型肝炎的报道<sup>[10]</sup>.

不少研究者<sup>[11-13]</sup>发现: 骨髓移植致死性并发症中, 肝损害, 特别是在HBV阳性患者中, 是主要诱发因素. 如何防止和减少HBV感染者接受BMT后发生肝脏损害, 是目前需要解决的一个问题. Daily *et al*<sup>[14]</sup>报道, 应用丙种球蛋白肌注能起到预防作用. 最近, Lau *et al*<sup>[5]</sup>报道应用泛昔洛韦降低合并乙型肝炎的血液病患者的病毒水平, 可减少



肝脏损害的发生率. 拉米夫定在防止骨髓移植肝损害及乙肝复发上, 作用最为肯定<sup>[15-18]</sup>.

上述研究表明, 接受BMT后的HBsAg阴转率明显高于自发的转换率或应用干扰素后的阴转率, 在目前尚缺乏有效清除HBV治疗手段的情况下, BMT过继免疫给我们提供了一种治疗慢性乙肝的思路.

## 2 外周淋巴细胞输注 (PBLs) 疗法

**2.1 LAK细胞疗法** 1970年后Morgan *et al*<sup>[19]</sup>发现白细胞介素-2(IL-2)对T淋巴细胞具有扩增和激活作用. 1982年Rosenberg *et al*<sup>[20]</sup>发现: 正常人和肿瘤患者的外周血单核细胞在含IL-2的培养基中, 经2-3 d时间培养后出现显著的杀伤活性, 后将这种细胞称为淋巴因子激活的杀伤细胞即LAK细胞. 1987年开始用于慢性乙肝的治疗, 到目前已有18 a的历史. 总结其治疗经验后发现: 临床上有反复轻度肝功能受损, ALT轻度升高, HBeAg阳性或HBV-DNA阳性, 但滴度较低的患者效果较佳. 其HBeAg阴转率近期为44%, 远期为58%; DNA则分别为57%和70%. 应用LAK细胞治疗效果, 受个体免疫状态的影响, 免疫低下者效果差. 由于LAK细胞治疗中需要使用大量IL-2, 而IL-2可引起毛细血管渗透性增加综合征. 一般不良反应有发热, 恶心, 乏力, 肌肉酸痛, 严重的有败血症. 目前研究的方向是寻找更有效果的LAK前体细胞(脐血, 骨髓, TIL细胞等); 改善LAK细胞诱导方法(加入抗CD3, IL-7等); 改变LAK细胞的输注途径(通过肝动脉导管). 这些研究或多或少的提高了LAK细胞的疗效, 减轻了其治疗的副作用.

**2.2 树突状细胞(DC)疗法** 树突状细胞(dendritic cells, DCs), 顾名思义为一种边缘有树枝状突起的大细胞, 在体内含量极少, 但却发挥着非常重要的作用, 是机体识别外来抗原(病原体)和自身变异抗原(肿瘤抗原等)的最重要的抗原递呈细胞. 越来越多的证据表明由DC激活的细胞免疫, 特别是CTL介导的免疫反应, 通过杀伤感染的肝细胞和释放抗病毒的细胞因子来清除HBV. 尽管血中存在高浓度的病毒抗原, 慢性乙肝患者没有启动有效的免疫反应. 作为起核心作用的DC细胞可能与慢性乙肝患者对病毒抗原的这种弱反应有关. 现已有研究表明包括HBV在内的多种病毒感染中, 均存在抗原递呈功能缺陷<sup>[21-23]</sup>. Wong *et al*<sup>[24]</sup>还发现在乙肝相关性肝癌患者体内, 树突状细胞也存在缺陷, 这种减弱的抗原呈递功能可通过肿瘤抗原致敏增强. Akbar *et al*<sup>[25]</sup>通过用HBV转基因鼠模型研究HBV感染后机体免疫耐受状态与DC等免疫细胞功能的关系, 发现这种状态并不是因为淋巴细胞功能缺陷, 而是由于抗原递呈功能缺陷, 特别是DC功能缺陷引起. Yan *et al*<sup>[26]</sup>研究经过干扰素治疗的慢性乙肝患者体内树突状细胞亚类数量变化, 发现对干扰素治疗有效果的患者体内树突状细胞特别是髓系树突状细胞明显升高, 也间接证明了树突状细胞在乙肝病毒清除中的关键作用. 因此, 诱导成熟的DC细胞进行免疫过继治疗, 可能会取得对

慢性乙肝患者重建细胞免疫的作用. DC用于抗病毒的免疫治疗的基本方法是: 体外用细胞因子诱导扩增DC, 并用病毒抗原冲击致敏, 再将致敏的DC回输到体内, 诱导出特异性的CTL, 从而发挥抗病毒作用. 为了能保持高水平而持久的抗病毒免疫应答, 可用病毒抗原多肽基因修饰DC, 使之持续表达基因产物. 因此, 寻找更有效的基因载体, 转染DC就成为目前的主要研究方向. 目前用重组腺病毒以及腺相关病毒作为载体, 转染细胞因子如GM-CSF, IL-12, IL-7以及乙肝抗原(S, C, E)等基因入DC, 诱导出的特异性CTL, 据初步研究<sup>[27-29]</sup>, 杀伤作用提高显著. 据初步临床实验<sup>[30]</sup>, 树突状细胞疫苗应用于人体是安全有效的. Gao *et al*<sup>[31]</sup>研究树突状细胞和血清HBV-DNA水平和肝脏炎症程度关系, 发现DC2数量和病毒数正相关, 而DC细胞数量和肝脏炎症积分无明显相关性, 这表明树突状细胞可能通过激活CTL, 针对的是乙肝病毒, 因而不会加重肝脏细胞损伤. Chen *et al*<sup>[32]</sup>用表面抗原致敏的树突状细胞治疗19例慢性乙肝患者, 10名(52.6%)患者E抗原转为阴性; 2例联合拉米夫定的患者获得完全应答. 初步疗效表明与干扰素相当, 并发现合用拉米夫定效果更佳. Furukawa *et al*<sup>[33]</sup>发现用表面抗原致敏的树突状细胞疫苗, 防止慢性乙肝患者肝移植术后复发, 取得较好效果. 现已取得一些进展, 但抗乙肝病毒治疗方面没有开展大范围的研究, 能否用于清除HBV, 尚待进一步研究.

**2.3 CIK细胞疗法** CIK细胞全称为多种细胞因子诱导的杀伤细胞, 1991年美国斯坦福大学医学院骨髓移植中心首先报道了这种高增殖力和高细胞毒性的细胞因子激活的杀伤细胞的培养方法. 1994年Lu *et al*<sup>[34]</sup>报道了体外大量增值CIK细胞的方法后, 在全世界范围内引起了普遍的关注. 国内外很多学者对其细胞来源, 免疫学特性, 抗病毒抗肿瘤的杀伤效能都作了深入的研究和阐述. Tong *et al*<sup>[35]</sup>在体外试验中比较了CIK细胞和LAK细胞的杀伤作用: CIK细胞最强毒力在培养第10-28 d, 可杀伤2.5-3.5个对数级的肿瘤细胞, 而LAK细胞仅杀伤0.5-1.5个对数级细胞. 由于CIK细胞具有非MHC限制性, 高增殖活性, 高细胞毒力, 细胞来源丰富等优点, 目前已经开始试用于治疗慢性乙型肝炎. 体外试验发现, 加入纯化HBsAg共培养后, 可以诱导CIK细胞产生特异性杀伤作用. 已有研究表明<sup>[36]</sup>, 慢性乙肝患者CIK细胞同样存在缺陷. 因此怎样加强其杀伤活性为目前研究重点. 目前通过转染CIK细胞以及与树突状细胞共培养, 实验证明能够大大增强其杀伤活性<sup>[37,38]</sup>. Gao *et al*<sup>[39]</sup>对16名慢性乙肝患者用CIK治疗52 wk, 取得较好效果, 完成治疗的14名患者中, DNA转阴, HBeAg/anti-HBe血清转换, 及肝功能恢复正常的各占42.86%(6/14). 但CIK细胞用于临床治疗慢性乙型肝炎的经验和报道仍然很少, 其清除病毒的机制和效果尚需更多的研究来阐明. 其他淋巴细胞, 如自然杀伤细胞即NK细胞<sup>[40]</sup>, 趋化因子活化的杀伤细胞即CHAK细胞, 初步研究表现出了较好的应用前景. Maghazachi *et al*<sup>[41]</sup>通过研究



CHAK细胞体外常规生物学活性发现: CHAK细胞是一类不同于PBMC细胞及LAK细胞的新型免疫杀伤细胞, 虽然在诱生初期并不比LAK细胞强, 但随着培养时间延长, CHAK细胞逐渐显示出更强的杀伤活性, 且杀伤功能维持时间较LAK细胞久。

### 3 其他过继免疫疗法

**3.1 造血干细胞移植** 由于HBV不仅能感染患者的骨髓基质细胞, 而且还感染患者的外周血淋巴细胞, 且骨髓移植风险较高; 因此, 有研究者将目光投向了造血干细胞。Ilan *et al*<sup>[42]</sup>观察了12例接受HBsAg阳性供者的造血干细胞移植的患者, 其中HBsAg阳性8例, 阴性4例。随访13.2 mo(中位数), 8例HBsAg阳性患者中有1例死于肝衰竭, 1例ALT升高; 4例阴性患者无一例发生HBV感染。因此认为, 造血干细胞移植可能会减少HBV感染, 且HBsAg阳性并不是造血干细胞移植的反指征, 除非HBV处于高复制水平。Chiba *et al*<sup>[43]</sup>报告一例慢性乙肝患者因急性淋巴细胞白血病而接受外周血干细胞移植, 供体为单纯乙肝表面抗体阳性。结果获得彻底痊愈。因患者应用拉米夫定, 并认为拉米夫定可能起协同作用。

**3.2 肝移植过继免疫** 其在动物实验中也显示出了良好的前景: Li *et al*<sup>[44]</sup>对28只小鼠实施原位肝移植, 对21只小鼠实施骨髓移植作为对照。供体小鼠均为乙肝表面抗原疫苗注射后并出现抗-HBs, 阳性, 结果接受肝移植的小鼠有23只(82%)出现了抗-HBs, 并持续了2-9 wk。而接受骨髓移植的21只小鼠有19只(90%)出现了抗-HBs, 并持续了2-12 wk。Dahmen *et al*<sup>[45]</sup>亦有类似报道: 对34只小鼠实施原位肝移植, 供体为抗-HBs小鼠。结果29只(85%)出现了抗-HBs并持续了2-10 wk, 且受体和供体最大滴度无明显差异。上述研究显示出了肝移植可能作为过继免疫的一个手段, 其机制及能否临床应用有待进一步研究。

### 4 展望

随着对乙型肝炎慢性化和免疫耐受机制的揭示, 免疫调节疗法在慢性乙肝治疗中将发挥越来越重要的作用。骨髓移植是一种彻底的免疫重建, 最有希望达到完全清除HBV的目的。但骨髓移植死亡率高, 花费大, 限制了其在临床上的应用。因此, 深入探讨其过继免疫的作用机制, 改进移植方法, 有望使这一方法应用到慢性乙肝的治疗中。外周淋巴细胞输注疗法, 是比较安全, 操作较为方便, 已经应用于临床<sup>[46]</sup>, 并取得较好效果的免疫过继疗法。因为慢性乙肝免疫耐受机制可能与多种淋巴细胞功能缺陷相关, 从多方面不同角度着手, 如: 积极改善培养方法<sup>[47]</sup>, 混合淋巴细胞(LAK, CIK, DC等)培养及输注<sup>[48-50]</sup>, 以及联合抗病毒药物, 导入某些免疫佐剂<sup>[51-53]</sup>及抗原片段等<sup>[54-56]</sup>, 理论上能增加过继免疫疗效, 上述体外试验也表明能取得更好效果。但应用于人体的有效性尚需进一步较大规模临床试验加以证明。怎样增强外周血淋巴细胞活性, 如

导入某种基因片段等, 联合应用生物反应及免疫调节剂, 可能为今后研究方向。因慢性乙肝患者个体免疫缺陷不尽相同, 针对个体免疫缺陷的病因有针对性的辨证应用, 能否指导临床应用有待进一步研究。

### 5 参考文献

- 1 Ilan Y, Nagler A, Zeira E, Adler R, Slavin S, Shouval D. Maintenance of immune memory to the hepatitis B envelope protein following adoptive transfer of immunity in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 633-638
- 2 Liang R, Lau GK, Kwong YL. Chemotherapy and bone marrow transplantation for cancer patients who are also chronic hepatitis B carriers: a review of the problem. *J Clin Oncol* 1999; 17: 394-398
- 3 Favre C, Menconi MC, Nardi M, Casazza G, Oliveri F, Macchia P, Bonino F, Brunetto MR. Horse antilymphocytic globulin in hepatitis B exacerbation after bone marrow transplantation adoptive immunity transfer. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 1057-1059
- 4 Shouval D, Adler R, Ilan Y. Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus in mice by bone marrow transplantation from immune donors. *Hepatology* 1993; 17: 955-959
- 5 Lau GK, Lok AS, Liang RH, Lai CL, Chiu EK, Lau YL, Lam SK. Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology* 1997; 25: 1497-1501
- 6 Lau GK, Liang R, Lee CK, Yuen ST, Hou J, Lim WL, Williams R. Clearance of persistent hepatitis B virus infection in Chinese bone marrow transplant recipients whose donors were anti-hepatitis B core- and anti-hepatitis B surface antibody-positive. *J Infect Dis* 1998; 178: 1585-1591
- 7 Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, Nanji A, Yuen ST, Williams R, Naoumov NV. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614-624
- 8 Caselitz M, Link H, Hein R, Maschek H, Boker K, Poliwoda H, Manns MP. Hepatitis B associated liver failure following bone marrow transplantation. *J Hepatol* 1997; 27: 572-577
- 9 Chen PM, Chiou TJ, Fan FS, Liu JM, Hsieh RK, Yen CC, Wang WS, Liu JH. Fulminant hepatitis is significantly increased in hepatitis B carriers after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 1425-1433
- 10 Iwai K, Tashima M, Itoh M, Okazaki T, Yamamoto K, Ohno H, Marusawa H, Ueda Y, Nakamura T, Chiba T, Uchiyama T. Fulminant hepatitis B following bone marrow transplantation in an HBsAg-negative, HBsAb-positive recipient; reactivation of dormant virus during the immunosuppressive period. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 105-108
- 11 El-Sayed MH, El-Haddad A, Fahmy OA, Salama II, Mahmoud HK. Liver disease is a major cause of mortality following allogeneic bone-marrow transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1347-1354
- 12 Ozdogan O, Ratip S, Ahdab YA, Dane F, Ahdab HA, Imeryuz N, Tozun N. Causes and risk factors for liver injury following bone marrow transplantation. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 421-426
- 13 Kikuchi A, Kagimoto S, Kishimoto H, Yamamoto K, Hanada R. Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in a patient with myelodysplastic syndrome (MDS) infected by hepatitis B virus (HBV) precore mutant: favorable outcome with slow tapering of immunosuppressive agents. *Leukemia* 2002; 16: 2333-2335
- 14 Daily J, Werner B, Soiffer R, Fingerth J. IGIV: a potential role for hepatitis B prophylaxis in the bone marrow peritransplant period. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 739-742
- 15 Myers RP, Swain MG, Urbanski SJ, Lee SS. Reactivation of

- hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in a bone marrow transplant recipient following lamivudine withdrawal. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 599-603
- 16 Hashino S, Takahata M, Nozawa A, Izumiyama K, Chiba K, Suzuki S, Hige S, Asaka M. Successful allogeneic bone marrow transplantation from an HBV-positive donor into an HBV-positive recipient using lamivudine. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 269-271
  - 17 Hashino S, Nozawa A, Izumiyama K, Yonezumi M, Chiba K, Kondo T, Suzuki S, Hige S, Asaka M. Lamivudine treatment for reverse seroconversion of hepatitis B 4 years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 361-363
  - 18 Iannitto E, Minardi V, Calvaruso G, Mule A, Ammatuna E, Di Trapani R, Ferraro D, Abbadessa V, Craxi A, Di Stefano R. Hepatitis B virus reactivation and alemtuzumab therapy. *Eur J Haematol* 2005; 74: 254-258
  - 19 Morgan EL, Weigle WO. The immune response in aged C57BL/6 mice. II. Characterization and reversal of a defect in the ability of aged spleen cells to respond to the adjuvant properties of Fc fragments. *J Immunol* 1982; 129: 36-39
  - 20 Rosenberg SA, Eberlein TJ, Grimm EA, Lotze MT, Mazumder A, Rosenstein M. Development of long-term cell lines and lymphoid clones reactive against murine and human tumors: a new approach to the adoptive immunotherapy of cancer. *Surgery* 1982; 92: 328-336
  - 21 Duan XZ, Zhuang H, Wang M, Li HW, Liu JC, Wang FS. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 234-242
  - 22 Zheng BJ, Zhou J, Qu D, Siu KL, Lam TW, Lo HY, Lee SS, Wen YM. Selective functional deficit in dendritic cell-T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 217-224
  - 23 Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 35-42
  - 24 Wong YQ, Qiu SJ, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Fan J, Sun RX, Zhao Y. Changes in the immune function of dendritic cells (DC) derived from HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) patient's peripheral blood monocytes (PBMC) pulsed with tumor antigen. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 339-342
  - 25 Akbar SM, Onji M, Inaba K, Yamamura K, Ohta Y. Low responsiveness of hepatitis B virus-transgenic mice in antibody response to T-cell-dependent antigen: defect in antigen-presenting activity of dendritic cells. *Immunology* 1993; 78: 468-475
  - 26 Yan T, Wang HF, Ji W, Zhang AM, Zhang Z, Zhang H, Wang FS. Clinical profiles of circulating dendritic cell subsets in chronically HBV-infected patients with interferon-alpha treatment. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1177-1181
  - 27 Ding CL, Yao K, Zhang TT, Zhou F, Xu L, Xu JY. Generation of cytotoxic T cell against HBcAg using retrovirally transduced dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1512-1515
  - 28 Cong M, Wang P, Yan ZY, Tang SZ, Wang BE, Jia JD, Liu Y, You H. Recombinant adeno-associated virus carrying hepatitis B virus C gene (rAAV-HBV-C) effectively pulses dendritic cells (DC) without affecting their maturity. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 17-19
  - 29 Furumoto K, Mori A, Yamasaki S, Inoue N, Yang W, Nakau M, Yasuda S, Arai S, Imamura M. Interleukin-12-gene transduction makes DCs from tumor-bearing mice an effective inducer of tumor-specific immunity in a peritoneal dissemination model. *Immunol Lett* 2002; 83: 13-20
  - 30 Fazle Akbar SM, Furukawa S, Onji M, Murata Y, Niya T, Kanno S, Murakami H, Horiike N. Safety and efficacy of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in human volunteers. *Hepatol Res* 2004; 29: 136-141
  - 31 Gao B, Chen HS, Zhao GM, Zhu L, Ji Y, Fei R, Dai CY, Xu J, Zhu LM, Wei L. Relationship between the quantities of peripheral dendritic cells and of serum HBV DNA and the inflammatory reaction levels in the liver. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 414-416
  - 32 Chen M, Li YG, Zhang DZ, Wang ZY, Zeng WQ, Shi XF, Guo Y, Guo SH, Ren H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1806-1808
  - 33 Furukawa S, Akbar SM, Hasebe A, Horiike N, Onji M. Induction and maintenance of anti-HBs in immunosuppressed murine hepatitis B virus carriers by a novel vaccination approach: implications for use in hepatitis B virus-infected subjects with liver transplantation. *J Gastroenterol* 2004; 39: 851-858
  - 34 Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1994; 153: 1687-1696
  - 35 Tong CR, Hong B, Qiu JY, Chen Z, Lu DP. Significance of cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analysis in evaluating antichronic myeloid leukemia efficacy of different immune effector cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 134: 21-24
  - 36 Huang J, Cheng ZY. Dynamic observation of cytokine induced killer cells in peripheral blood from patients with chronic hepatitis B. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2003; 19: 554-556
  - 37 Li HF, Yang YH, Shi YJ, Wang YQ, Zhu P. Cytokine-induced killer cells showing multidrug resistance and remaining cytotoxic activity to tumor cells after transfected with *mdr1* cDNA. *Chin Med J* 2004; 117: 1348-1352
  - 38 Zhang S, Wang Q, Li WF, Wang HY, Zhang HJ. Enhanced antitumor immunity by murine cytokine activated T lymphocytes after cocultured with bone marrow derived dendritic cells pulsed with whole tumor lysates. *Leuk Res* 2004; 28: 1085-1088
  - 39 Gao Y, Wei L, Chen HS, Sun J, Wang SX, Wang Y. Autologous adoptive immunotherapy without destruction of infected cells during the treatment of chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 391-393
  - 40 Margalit M, Shibolet O, Klein A, Elinav E, Alper R, Thalenfeld B, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma by transplantation of *ex-vivo* immune-modulated NKT lymphocytes. *Int J Cancer* 2005; 115: 443-449
  - 41 Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 315-319
  - 42 Ilan Y, Nagler A, Shouval D, Ackerstein A, Or R, Kapelushnik J, Adler R, Slavin S. Development of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in bone marrow transplant recipient following treatment with peripheral blood lymphocytes from immunized donors. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 299-302
  - 43 Chiba T, Yokosuka O, Goto S, Fukai K, Imazeki F, Shishido H, Narita M, Saisho H. Successful clearance of hepatitis B virus after allogeneic stem cell transplantation: beneficial combination of adoptive immunity transfer and lamivudine. *Eur J Haematol* 2003; 71: 220-223
  - 44 Li J, Dahmen U, Dirsch OR, Gu Y, Polywka S, Fiedler M, Doebl L, Roggendorf M, Broelsch CE. The potential role of bone marrow transplantation in augmenting donor-derived immunity to hepatitis B after rat liver transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8: 397-404
  - 45 Dahmen U, Li J, Dirsch O, Gu YL, Polywka S, Doebl L, Shen K, Broelsch CE. Adoptive transfer of donor-derived immunity by liver transplantation: a potential avenue to prevent hepatitis B virus reinfection. *J Viral Hepat* 2003; 10: 31-36
  - 46 Li YG, Chen M, Zhang DZ, Wang ZY, Zeng WQ, Shi XF, Guo Y, Guo SH, Ren H. Clinical research on the treatment effect of autologous dendritic cell vaccine on the patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 206-208
  - 47 Li Y, Huang SL, Wu YF, Wei J, Bao R, Zhou DH. Expansion of CIK/NK cells from cord blood by using different combinations of stem cell factor, FLT3 ligand and interleukin 2, 7, 15 *in vitro*. *Zhongguo Shiyan Xueyexue Zazhi* 2004; 12: 350-354
  - 48 Chen BA, Li M, Sun ZY, Li CP, Gao C, Sun YY, Wang J, Fu

- Q, Chen J. Effect of dendritic cells co-cultured with cytokine induced killer cells on cytotoxicity against drug resistant K562 cells. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2005; 26: 355-358
- 49 Zhang HH, He Y, Zhao H, Piao WH, Liu MC, Xi HL, Yu M, Wang GQ. The effect of stimulation of dendritic cell on HBV-epitopic cytotoxic T-lymphocyte. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1171-1176
- 50 Liu SR, Zhang Y, Xie Q, Li ZL, Yu ZY, Kong XP. Effect of HBsAg pulsed dendritic cells on the functions of cytokine-induced killer cells. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2005; 21: 634-636
- 51 Yang YH, Li HF, Shi YJ, Wang YQ, Zhang Y, Wang YJ, Zhu P. CIK cells acquired multidrug resistance and maintained cytotoxic activity to tumor cells after mdrl gene transfection. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2003; 24: 617-620
- 52 Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf IG. Human cytokine-induced killer cells have enhanced *in vitro* cytolytic activity via non-viral interleukin-2 gene transfer. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2: 12
- 53 Lee CG, Choi SY, Park SH, Park KS, Ryu SH, Sung YC. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met as a novel adjuvant for DNA vaccine. *Vaccine* 2005; 23: 4703-4710
- 54 Wongkajornsilp A, Sangsuriyong S, Hongeng S, Waikakul S, Asavamongkolkul A, Huabprasert S. Effective osteosarcoma cytotoxicity using cytokine-induced killer cells pre-inoculated with tumor RNA-pulsed dendritic cells. *J Orthop Res* 2005; 23: 1460-1466
- 55 Furukawa S, Akbar SM, Hasebe A, Horiike N, Onji M. Production of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells from immunosuppressed murine hepatitis B virus carrier: evaluation of immunogenicity of antigen-pulsed dendritic cells *in vivo*. *Immunobiology* 2004; 209: 551-557
- 56 Qiu SJ, Lu L, Qiao C, Wang L, Wang Z, Xiao X, Qian S, Fung JJ, Ye SL, Bonham CA. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transduced by adenoviral vectors encoding HBsAg: comparison to protein immunization. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 429-438

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 《现代消化及介入诊疗》杂志征稿、征订启事

**本刊讯** 《现代消化及介入诊疗》(Modern Digestion & Intervention)是国家科技部批准、广东省卫生厅主管、广东省医学会主办、南方医科大学南方医院消化病研究所承办向国内外公开发行的学术性医学期刊。

本刊宗旨是贯彻邓小平理论和“三个代表”思想,报道现代消化病与介入诊疗学的理论研究和临床经验,展示科技成果,加强学术交流,促进科技繁荣。遵循“三主三结合”原则:(1)以临床应用为主,基础理论与临床实践相结合;(2)以普及新技术新业务为主,普及与提高相结合;(3)以现代医学为主,中医与西医相结合,及时传递最新学术信息,刊载优秀论文、专题笔谈和专家读片,突出科学性、先进性和实用性,推动消化病与介入诊疗工作的开展与提高,为人类健康服务。本刊开设栏目有述评、专家论坛、论著(基础与临床)、短篇论著、综述、临床交流、诊疗技术、讲座、会议纪要、学术争鸣、病例分析与个案报道,欢迎投稿,欢迎订阅,请直接与编辑部联系。

本刊为大16开季刊,国内统一刊号:CN44-1580/R,国际标准刊号:ISSN1672-2159,广告经营许可证号:4400004001080,每期定价12元,全年48元。

地址:广州市广州大道北1838号南方医科大学南方医院消化编辑部(邮编:510515)

联系电话:(020)61641547 传真:(020)87280770 E-mail:jmdi@vip.163.com



# 纳米细菌研究

王利民, 沈文律, 张士莲

王利民, 唐山工人医院肝胆外科 河北省唐山市 063000  
沈文律, 汕头大学医学院附属第二医院 广东省汕头市 515041  
张士莲, 开滦矿务局医院 河北省唐山市 063000  
通讯作者: 王利民, 063000, 河北省唐山市文化路27号, 唐山工人医院肝胆外科, g\_lmwang@sina.com.cn  
电话: 0315-3722208 传真: 0315-3722104  
收稿日期: 2005-08-26 接受日期: 2005-11-04

## 摘要

纳米细菌(nanobacteria, Nb)是近年来才被发现的超微细菌. 纳米细菌体积小极其微小, 其最小直径仅50 nm, 大大低于理论上细菌体积的下限. 因此纳米细菌在被发现的初期, 其存在的真实性就受到许多学者的质疑, 并且由此引发了一场关于微生物最小体积的争论. 随着研究的不断深入, 纳米细菌的生物学特性不断地被揭示, 纳米细菌已经成为当前研究的一个热点问题. 在医学界, 纳米细菌被认为与肾结石、胆囊结石、动脉粥样硬化等病理性钙化疾病的发生有关系. 本文在复习大量文献的基础上, 针对纳米细菌的生物学特性以及纳米细菌与人类疾病等方面作一简单的回顾与总结.

**关键词:** 纳米细菌; 生物矿化; 细菌被膜; 胆囊结石; 肾结石

王利民, 沈文律, 张士莲. 纳米细菌研究. 世界华人消化杂志 2005;13(23): 2783-2787  
<http://www.wjgnet.com/1009-3097/13/2783.asp>

## 0 引言

芬兰科学家Ciftcioglu *et al*<sup>[1]</sup>进行哺乳动物细胞培养时发现细胞内存在一种原核微生物, 能通过100 nm的滤菌器, Kajander将其命名为纳米细菌 (nanobacteria). 纳米细菌广泛存在于自然界的矿物质中和生物体内, 能感染人类、牛、鹿和其它哺乳动物, 是一种人畜共患的致病原. 纳米细菌能感染人体任何组织和细胞, 分泌钙化的脂多糖生物膜, 具有较大的毒性, 能引起受感染细胞发生空泡样改变, 与人类多种疾病的发生密切相关<sup>[2-8]</sup>. 纳米细菌的发现及其生物学特性的揭示, 引起了众多国内外学者的关注<sup>[9-38]</sup>.

## 1 纳米细菌的发现

芬兰科学家Ciftcioglu *et al*<sup>[1]</sup>在其细胞培养过程中, 发现在胎牛血清中存在一种直径50-500 nm的微粒; 这种颗粒物对伽玛射线具有很强的耐受性; 针对包括支原体在内的所有已知微生物的特异性检测实验均为阴性; 这种颗粒物在血琼脂培养基以及支原体培养基中无法生长, 通常的细菌染色方法难以着色. 因此, Kajander判定这是一种新的微生物, 根据其体型微小并且栖息在血

液中的特点, 将其命名为Nanobacterium sanguineum, 简称Nanobacteria<sup>[39]</sup>, 中文译名纳米细菌, 并将菌种保存于德国微生物存储中心 (DSM No: 5819-5821, the German Collection of Micro-organisms, Braunschweig, Germany).

## 2 纳米细菌的生物学特性

2.1 纳米细菌——哺乳动物体内最小的细菌 细胞培养时所使用的血清通常采用过滤法达到无菌的目的, 通常采用直径0.1  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌. Kajander研究发现, 0.1  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤并不能有效地清除血清中的纳米细菌, 但是血清经过0.05  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤则能有效清除纳米细菌污染. 细胞培养条件下的纳米细菌经过0.2  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后约有3%的纳米细菌可以通过滤膜, 而在加压过滤的情况下, 约有50%的纳米细菌可以通过0.2  $\mu\text{m}$ 的滤膜. 刚刚经过过滤的纳米细菌在相差显微镜下无法发现, 但在不含血清添加剂的细胞培养液中培养24 h后, 即可以用相差显微镜观测到. 电子显微镜观察显示, 纳米细菌的平均直径为200 nm, 而子代纳米细菌的最小直径仅50 nm. 传统的观点认为, 只有当细胞直径在不低于140 nm时, 才能维持其最基本的新陈代谢<sup>[40,41]</sup>. Kajander认为, 纳米细菌可能是地球形成早期、在原始大气条件下的一种最原始的生命形式, 因此不能用衡量已经经过几十亿年进化的生命形式的观点去衡量这种古老的生命形式<sup>[42]</sup>, 并且推测, 纳米细菌遭受不良因素的侵害后可以形成许多的体形微小的碎片, 并将其释放到环境中, 每一个碎片都可能携带部分遗传信息, 在特定条件下, 这些"基本"颗粒聚集在一起形成群落, 当足够数量的"基本"颗粒提供完整的遗传信息时, 则可以形成新的纳米细菌.

2.2 纳米细菌缓慢的增殖周期 微生物学家通常是通过某种微生物进行培养, 进而了解该种微生物的特性. 然而, 并非每种微生物都是可以在实验室中进行培养的, 主要原因在于这些微生物的培养条件我们并不清楚, 其生存环境以及是否与其他微生物存在共生关系我们并不十分了解<sup>[43]</sup>. 纳米细菌就是一种对生长环境要求非常苛刻的微生物, 其新陈代谢率极为缓慢, 仅为普通细菌的1/10 000<sup>[44]</sup>. 研究发现, 纳米细菌主要利用环境中的氨基酸而不是葡萄糖来提供能量, 谷氨酰胺、天冬酰胺以及精氨酸均可被其利用. 在37  $^{\circ}\text{C}$ 有50-10 mL/L的二氧化碳及900-950 mL/L的空气存在的潮湿环境下, 并且在含有100 mL/L胎牛血清和适量谷氨酰胺的pH值7.4的细胞培养基中, 纳米细菌能够缓慢生长, 平均倍增时间为3 d,

而在无血清的细胞培养基中,其增殖速度变慢,细菌倍增时间可延长至5-6 d,在添加适量促纳米细菌生长因子BGF(一种杆菌培养上清的超滤液)或N3(纳米细菌培养上清的超滤液)的条件下,其增殖速度加快,倍增时间可缩短至0.6-1 d.在有促纳米细菌生长因子BGF存在的条件下,纳米细菌甚至可以在固体培养基中生长,并形成直径1 mm大小的细菌集落.

**2.3 纳米细菌独特的生物矿化现象** 当在含血清的培养基中培养的纳米细菌被转移至不含血清的培养基中继续培养时(DMEM或RPMI-1640),在1 a之内就可以观察到纳米细菌出现贴壁现象,在1 wk之内,就可以在纳米细菌的周围形成几微米厚的生物被膜(biofilm),并且紧紧贴附于培养瓶底部,而纳米细菌栖息其中<sup>[20]</sup>(这与在含血清培养基中培养的纳米细菌的形态明显不同),此时其大小接近于一个酵母细胞,2-3 wk以后,由于生物被膜的增厚,其直径已近似于一个红细胞的大小.用EDX法对这种生物被膜的化学组成进行分析,显示其钙磷的峰值与羟基磷灰石极其相似,电子显微镜观察以及傅立叶转换红外频谱(fourier transform IR spectroscopy, FTIR)分析显示其主要成分为碳酸羟基磷灰石(carbonate hydroxyapatite)<sup>[2]</sup>,而且,不论在有无血清作为添加剂的情况下,都可以见到这种被羟基磷灰石包绕的纳米细菌,这种情况甚至可以在处于分裂期的纳米细菌中见到.纳米细菌并不产生尿激酶和碱性磷酸酶,并且即便经过长达数周的培养,其培养基的pH值也不会出现明显的变化,一直稳定在7.4左右,这表明在纳米细菌细胞膜表面所生成的羟基磷灰石结晶是源自于生物大分子的,即生物矿化现象,而并非是由于pH值改变所导致的简单的物理结晶现象.

纳米细菌利用培养体系中的钙、磷合成羟基磷灰石作为其生物被膜的主要成分,这种生物矿化过程受到生长环境中某些因素的调控,从而使其呈现不同的外观,如羟基磷灰石形、细菌被膜形、沙粒形、结石形和类似肿瘤的外形.在含有新鲜血清的培养基中纳米细菌的生物矿化现象程度较轻微,这是由于血清中含有强效羟基磷灰石合成抑制因子,骨钙素<sup>[45]</sup>(osteocalcin)和胎球蛋白(fetuin)<sup>[46]</sup>,由于这些抑制蛋白的存在,所以在有血清存在的情况下,纳米细菌的生物矿化作用受到明显抑制.当血清浓度降低时,纳米细菌的生物矿化现象增强,在不含血清的培养体系中,生物矿化现象剧烈而迅速.尽管改良的Loeffler固体培养基中含有750 mL/L血清成分,但血清蛋白成分在灭菌过程中受到破坏,所以在此培养基中的纳米细菌的矿化作用并不受抑制,在此培养基中生长的纳米细菌其菌落直径可达1-5 mm.另外,当有乙二胺四乙酸(EDTA)存在时,纳米细菌的生物现象会受到明显的抑制.

由于矿化生物被膜的保护作用以及极其缓慢的新陈代谢率,使纳米细菌能够耐受各种不利的物理条件<sup>[47]</sup>和化学损伤因素<sup>[25]</sup>以及多种抗生素<sup>[48]</sup>的打击.

**2.4 纳米细菌的检测方法** 由于纳米细菌在标准微生物培养基中无法生长,并且即便是在最适宜其生长的细胞培养环境中,纳米细菌的生长也极为缓慢,其新陈代谢率仅为普通细菌的万分之一,这使得许多基于检测细菌新陈代谢的微生物学方法无法检测纳米细菌的存在.由于纳米细菌难以用传统的火焰法和乙醇法固定,并且大多数染料无法穿透其细胞壁,而且不能用普通显微镜对其进行观察,因此常规的细菌学染色法并不能检测到纳米细菌的存在.通过Kajander *et al*<sup>[43]</sup>的研究,发现70℃干烤10 min,可以将其有效固定;另外,用茜素红S、刚果红以及硝酸银染料可以使纳米细菌着色;而培养状态下的纳米细菌可以在放大400倍的相差显微镜下清晰地观察其生长情况;用DNA荧光染料(Dapi或Hoechst)按普通细菌DNA染色的条件对纳米细菌DNA进行染色均不成功,而当按照线粒体DNA以及病毒DNA染色条件,对纳米细菌DNA进行染色时,荧光显微镜下可以观察到特征性的荧光;用纳米细菌特异性抗体进行荧光染色也可以清晰地显示纳米细菌的存在;利用电子显微镜对经过负染的纳米细菌进行观察,可以清晰的显示80-350 nm大小、单独或聚集成簇的纳米细菌以及其表面的生物被膜(biofilm)结构;而用透射电镜对纳米细菌的超薄切片进行观察,可以清晰的显示其内部结构<sup>[2,21]</sup>.

**2.5 纳米细菌的核酸** 因为蛋白酶K、蛋白激酶、脂肪酶、淀粉酶以及超声波不能有效地破坏、裂解纳米细菌,所以不能采用标准的核酸抽提法<sup>[49]</sup>抽提纳米细菌的核酸.Kajander *et al*<sup>[43]</sup>用HCl对纳米细菌进行消化:室温时,将纳米细菌置于1 mol/L的HCl中数分钟后,其羟基磷灰石外壳便会消失,随后,纳米细菌的蛋白和核酸成分逐渐被释放到裂解液中.用HCl裂解法从纳米细菌中抽提的"核酸"成分的最大紫外吸收峰在270 nm处,而按常规方法抽提的普通细菌的核酸的最大紫外吸收峰在260 nm处<sup>[43]</sup>.由于用盐酸裂解法抽提的"核酸"产物在pH值高于2-3时发生凝聚现象,所以未能对其进行进一步分析.

经过实验,发现除用1 mol/L的HCl消化外,EDTA-SDS溶液二次煮沸消化、EDTA-EGTA-枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)消化、液氮研磨法以及木瓜蛋白酶—SDS消化,均能达到消化纳米细菌的目的.用后面几种方法消化纳米细菌后都可以获得白色纤维素样的抽提物,虽然这种物质在其抽提过程中表现出与DNA相似的沉淀、溶解特征,然而并不能被EB(溴苯乙啶)染色,而针对胞嘧啶及其修饰物的特异性探针检测均呈现非特异性结合,从而显示其并非核酸成分.

紫外光谱研究显示,这种假想的"核酸"与HCl裂解纳米细菌所得"核酸"具有相似的紫外吸收峰,其最大紫外吸收峰在269-270 nm,这与核酸中胸腺嘧啶(T, 269-270 nm)和胞嘧啶(C, 271-275 nm)含量高而腺嘌呤、鸟嘌呤(A、G, 250-260 nm)含量低的情况相吻合.而高效液



相色谱(HPLC)分析显示, 这种假想的“核酸”不能被蚁酸水解成单个的核苷酸。而在3 mol/L或5 mol/L的HCl中煮沸5 h, 再经葡聚糖凝胶G-50柱层析后, HPLC分析其水解产物表现出比较纯的核苷酸 (nucleobase) 的峰值, 其中两个峰值与methyldeoxyadenosine(甲基脱氧嘧啶)和7-deazaadenosine特征性的峰值相同<sup>[43]</sup>。

**2.6 纳米细菌的系统发生学分类** 用纳米细菌中提取的核酸作为PCR模板扩增16S rRNA基因。使用通用引物1492 RPL (GGCTCGAGCGGCCGCGCCGGTTAC CTTGTTACGACTT) 和细菌特异性引物8FPL(GCGGATCCGCGGCCGCTGC AGAGTTTGATCTGGCTCAG)进行PCR反应<sup>[38,50]</sup>。结果显示, 纳米细菌16S rRNA基因序列含有1 406个碱基, 其系统发生学分类显示, 纳米细菌属于Proteobacteria属的 $\alpha$ 2亚群。与其近缘的细菌大多栖息于土壤、温泉、哺乳动物细胞和植物体内。例如: Rhizobia (根瘤菌) 可以侵入植物的细胞中与宿主形成共生, 而Agrobacteria和Phyllobacteria可以导致宿主患病, Brucella (布鲁氏菌) 和Bartonella (巴尔通氏体菌) 能在哺乳动物的细胞内寄生, 从而造成人与动物患病, 纳米细菌可与这两种细菌产生交叉免疫反应。而与纳米细菌最为近源的细菌是Thiobacillus, 这种细菌生存在温泉中, 能导致温泉中的碳酸盐沉淀<sup>[51,52]</sup>。

### 3 纳米细菌的致病性

**3.1 纳米细菌的细胞毒作用** 纳米细菌对体外培养的细胞具有细胞毒性作用<sup>[53]</sup>。将成纤维细胞和纳米细菌共同培养时, 纳米细菌在十几分钟之内便开始吸附于细胞膜的特定区域, 并逐渐通过受体介导的胞饮作用被转移至细胞内部, 分布在包涵体富集的细胞核周围, 在溶酶体的消化作用下形成细胞核周围的空泡状结构, 纳米细菌在其中被缓慢降解, 细胞感染纳米细菌1-3 d后, 开始出现凋亡的形态特征。如果纳米细菌在含血清的培养基中经过数次传代培养, 其细胞毒性作用会明显减弱甚至消失。研究表明, 纳米细菌细胞毒性作用的发生机制, 与其在细胞内被降解释放出内毒素有关, 其细胞毒性与纳米细菌浓度和细胞在纳米细菌中暴露时间成正比。

Kari *et al*<sup>[54]</sup>用<sup>99m</sup>Tc标记纳米细菌后通过耳缘静脉注入到实验兔体内, 用SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) 观察纳米细菌在实验兔体内的分布。发现纳米细菌注入兔子静脉内10-12 min时, 在脾脏、心脏、肾脏及胃肠道中具有较高的放射活性; 45 h后, 在实验兔子尿液以及肝脏、肾脏、脾脏等组织中仍具有较高的放射活性。

由于800 mL/L的牛血清制品中存在纳米细菌感染<sup>[38]</sup>, 因此牛可能是纳米细菌的自然宿主。纳米细菌通过污染牛血液制品而对全世界范围内与细胞培养有关的科研工作和临床医疗安全造成不利影响。由于纳米细菌不仅体形微小能够侵入细胞内, 而且其新陈代谢极为缓慢

并且能够合成矿化的生物被膜, 具有极强的抵抗不利环境的特点, 因此纳米细菌一旦造成人和动物的感染, 则很难被机体的防御机制清除, 进而造成受感染者的生理机能紊乱。大约8%的正常人血液中存在纳米细菌抗原<sup>[38,55]</sup>, 现研究表明纳米细菌与肾结石、胆结石、前列腺炎、多囊肾、多囊肝、动脉粥样硬化等疾病有关<sup>[2-8,56]</sup>。

**3.2 纳米细菌与肾结石** 肾结石是一种泌尿系统常见疾病<sup>[57-65]</sup>; 肾绞痛发作时患者异常痛苦。肾结石患者可以并发泌尿系统感染、肾盂积水, 严重时 can 导致肾功能衰竭。肾结石的晶体成分包括草酸钙、磷酸钙、细菌、嘌呤、胱氨酸等, 其中绝大多数为草酸钙与磷灰石的复合物。部分肾结石的形成与细菌感染有关, 尿液中的细菌产生尿素酶、尿酸酶、碱性磷酸酶, 使尿液的pH值升高, 从而有利于肾结石的形成。但Grases *et al*<sup>[66]</sup>发现部分患者肾结石的形成并不是由尿液的pH值升高所致, 从而推测尿液中存在其他微生物的感染。Kajander *et al*<sup>[2]</sup>对30例肾结石患者进行纳米细菌培养, 均得到阳性结果, 在其后的动物实验中, 发现静注<sup>99m</sup>Tc标记的纳米细菌15 min后, 纳米细菌可在实验兔肾脏中聚集并排泄至尿液中<sup>[64]</sup>, 因此认为纳米细菌在体内可能诱导钙化和促进肾结石的形成, 其依据主要有以下几方面: (1)在人类的血液发现了纳米细菌; (2)纳米细菌作为有生命的微生物可从血液排泄到尿液中; (3)在人肾结石中发现了纳米细菌抗原; (4)纳米细菌攻击成纤维细胞, 发生细胞内、外钙化, 并具有细胞毒性作用。Ciftcioglu *et al*<sup>[67]</sup>对72例肾结石患者进行纳米细菌培养和单克隆抗体免疫荧光染色鉴定, 其中70例阳性(97.2%)。Garcia Cuerpo *et al*<sup>[68]</sup>应用培养的纳米细菌经皮做肾穿刺注射, 成功地建立了纳米细菌致肾结石的动物模型, 从而证实纳米细菌感染可以导致肾结石发生。

**3.3 纳米细菌与肾囊性病** 多囊肾是一种常染色体显性遗传病, 患者常常死于肾功能衰竭。Hjelle *et al*<sup>[4]</sup>在84.7%多囊肾患者的血清、囊液、囊壁及尿液中培养出纳米细菌, 并发现囊液中的内毒素主要由纳米细菌产生。纳米细菌在多囊肾的发生、发展中起着重要的作用, 其发病机制可能为: 纳米细菌依靠其周围的矿化外壳作为载体, 吸附尿液中的各种毒素, 并通过胞饮作用使细菌溶酶体破裂释放出毒素和自由基, 损害肾小管上皮细胞, 使其脱落至尿液中, 久之造成肾小管梗阻和肾组织不可复性损害, 形成肾囊肿。

**3.4 纳米细菌与动脉粥样硬化** 近年来, 有学者认为感染因素可能与动脉粥样硬化的发生有关, 有关动脉粥样硬化感染学说的研究受到广泛的关注。众所周知, 动脉硬化是一个脂质沉积于动脉壁局部和斑块形成的过程, 此过程由一种炎症反应介导。与炎症反应有关的感染物质有肺炎衣原体、幽门螺杆菌、巨细胞病毒和各种致病微生物。肺炎衣原体是与动脉粥样硬化因果关系研究中论据最多的病原微生物, 离体和体内实验研究表明肺炎衣原体致病机制可能是加速局部脂质沉积, 但这一学说无法



解释粥样斑块中存在大量钙化物的现象. 由于纳米细菌本身具有矿化能力, 一些学者认为其可能参与了动脉粥样斑块的形成. Miller *et al* [6] 从粥样斑块中培养出纳米细菌, 从而推断纳米细菌在动脉粥样斑块形成中起到重要的作用. Maniscalco *et al* [69] 对77例血清学检查纳米细菌阳性的冠状动脉硬化患者采用comET治疗4 mo, 57%患者冠脉狭窄程度明显改善, 14%患者冠脉狭窄中度改善, 约84%(16/19) 患者的心绞痛症状缓解, 从而认为此药物可能是通过杀灭粥样斑块中的纳米细菌达到治疗作用.

3.5 纳米细菌与胆结石 胆石病发病率高, 危害严重, 发病机制至今尚未完全明了<sup>[70-73]</sup>. 中南大学湘雅二医院Wen *et al* [74] 对75例胆道疾病患者的胆汁标本进行纳米细菌培养, 经免疫组织化学染色和电子显微镜观察证实, 胆道疾病患者胆汁纳米细菌感染阳性率为61.3%; 用ELISA法检测76例胆囊结石患者血清中纳米细菌抗原, 24例纳米细菌呈阳性, 阳性率为31.6%, 而338例正常人群血清中仅有27例呈阳性, 阳性率为8%, 两者比较差异显著<sup>[55]</sup>. 以上结果说明, 胆汁纳米细菌感染, 可能与胆囊结石的发生有关, 我们在这方面进行了进一步的研究, 动物实验显示, 注射纳米细菌的实验兔胆囊结石的发生率为83%(25/30), 而对照组动物胆囊结石的发生率仅为17%(5/30), 两组比较差异显著, 说明胆汁纳米细菌感染确实能引起兔胆囊结石的发生. 有必要对其成石机制进行深入研究.

#### 4 参考文献

- Ciftcioglu N, Kuronen I, Akerman K, Hiltunen E, Laukkanen J, Kajander EO. A new potential threat in antigen and antibody products: Nanobacteria. *Vaccines* 97, eds. Brown F, Burton D, Doherty P, Mekalanos J, and Norrby E. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1997; 99-103
- Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8274-8279
- Wainwright M. Nanobacteria and associated 'elementary bodies' in human disease and cancer. *Microbiology* 1999; 145: 2623-2624
- Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, Jones ML, Caughey RC, Brown R, Millikin PD, Darras FS. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2000; 57: 2360-2374
- Jelic TM, Malas AM, Groves SS, Jin B, Mellen PF, Osborne G, Roque R, Rosencrance JG, Chang HH. Nanobacteria-caused mitral valve calciphylaxis in a man with diabetic renal failure. *South Med J* 2004; 97: 194-198
- Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, Yagubyan M, Rodgers JC, Cockerill FR 3rd, Folk RL, Rzewuska-Lech E, Kumar V, Farell-Baril G, Lieske JC. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1115-H1124
- Hudelist G, Singer CF, Kubista E, Manavi M, Mueller R, Pischinger K, Czerwenka K. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization. *Histopathology* 2004; 45: 633-637
- Wen Y, Li YG, Yang ZL, Wang XJ, Wei H, Liu W, Miao XY, Wang QW, Huang SF, Yang J, Kajander EO, Ciftcioglu N. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J* 2005; 118: 421-424
- Puskas LG, Tiszlavicz L, Razga Z, Torday LL, Krenacs T, Papp JG. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. *Acta Biol Hung* 2005; 56: 233-245
- Sommer AP. Primordial proteins and HIV-Part II. *J Proteome Res* 2005; 4: 1022-1024
- Silay YS, Altundag K, Altundag O, Atik MA, Ozen M. Bisphosphonates may inhibit development of atherosclerosis formation through its bactericidal effect on nanobacteria. *Med Hypotheses* 2005; 64: 1239-1240
- Sommer AP, Pavlath AE. Primordial proteins and HIV. *J Proteome Res* 2005; 4: 633-636
- Sommer AP, Wickramasinghe NC. Functions and possible provenance of primordial proteins-Part II: microorganism aggregation in clouds triggered by climate change. *J Proteome Res* 2005; 4: 180-184
- Ciftcioglu N, Haddad RS, Golden DC, Morrison DR, McKay DS. A potential cause for kidney stone formation during space flights: enhanced growth of nanobacteria in microgravity. *Kidney Int* 2005; 67: 483-491
- Ciftcioglu N, McKay DS, Kajander EO. Association between nanobacteria and periodontal disease. *Circulation* 2003; 108: e58-e59
- Sommer AP, McKay DS, Ciftcioglu N, Oron U, Mester AR, Kajander EO. Living nanovesicles-chemical and physical survival strategies of primordial biosystems. *J Proteome Res* 2003; 2: 441-443
- Drancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, Coulange C, Ragni E, Alasia C, Dussol B, Berland Y, Raoult D. Attempted isolation of Nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 368-372
- Sommer AP, Hassinen HI, Kajander EO. Light-induced replication of nanobacteria: a preliminary report. *J Clin Laser Med Surg* 2002; 20: 241-244
- Morgan MB. Nanobacteria and calcinosis cutis. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 173-175
- Conte Visus A, Grases Freixedas F, Costa-Bauza A, Piza Reus P. Microinfections and kidney lithiasis. *Arch Esp Urol* 2001; 54: 855-860
- Schulz HN, Jorgensen BB. Big bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 105-137
- Sears DW, Kral TA. Martian "microfossils" in lunar meteorites? *Meteorit Planet Sci* 1998; 33: 791-794
- Tsuchiyama A. Meteoritics and mineralogy on possible ancient Martian life. *Biol Sci Space* 1996; 10: 262-270
- Dasch P, Kross J. My favorite Martians: NASA uncovers evidence of ancient life on Mars. *Ad Astra* 1996; 8: 27-29
- Olson WP. Dealing with the nanobacteria. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54: 364
- Olson WP. Dealing with the nanobacteria, if we must. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54: 359-360
- Olson WP. Opinion: Kajander's nanobacteria. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54: 150-151
- Vainshtein MB, Kudriashova EB. About nannobacteria. *Mikrobiologiya* 2000; 69: 163-174
- Kramer G, Klingler HC, Steiner GE. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr Opin Urol* 2000; 10: 35-38
- Hughes-Stamm SR, Cribb TH, Jones MK. Structure of the tegument and ectocommensal microorganisms of *Gyaliuchen nahaensis* (Digenea: Gyaliuchenidae), an inhabitant of herbivorous fish of the Great Barrier Reef, Australia. *J Parasitol* 1999; 85: 1047-1052
- Abbott A. Battle lines drawn between 'nanobacteria' researchers. *Nature* 1999; 401: 105
- Dorrell S. Nanobacteria linked to kidney disease. *Mol Med Today* 1999; 5: 373
- Psenner R, Loferer M. Nannobacteria: size limits and evidence.

- Science* 1997; 276: 1776-1777
- 34 Neelson KH. Nannobacteria: size limits and evidence. *Science* 1999; 276: 1776
  - 35 Maniloff J. Nannobacteria: size limits and evidence. *Science* 1997; 276: 1776
  - 36 Folk RL. In defense of nannobacteria. *Science* 1996; 274: 1288
  - 37 Sillitoe RH, Folk RL, Saric N. Bacteria as mediators of copper sulfide enrichment during weathering. *Science* 1996; 272: 1153-1155
  - 38 Barr SC, Linke RA, Janssen D, Guard CL, Smith MC, Daugherty CS, Scarlett JM. Detection of biofilm formation and nanobacteria under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats, and dogs. *Am J Vet Res* 2003; 64: 176-182
  - 39 Kajander EO. Culture and detection method for sterile-filterable autonomously replicating biological particles. *US patent No:5* 1992; 135, 851
  - 40 Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkel E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4420-4449
  - 41 Mushegian AR, Koonin EV. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10268-10273
  - 42 Kajander EO, Bjorklund M, Ciftcioglu N. Mineralization by nanobacteria. *Proc SPIE Int* 1998; 3441: 86-94
  - 43 Kajander EO, Kuronen I, Kari KA, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc SPIE Int* 1997; 3111: 420-428
  - 44 Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria as extremophiles. *Proc SPIE Int* 1999; 3755: 106-112
  - 45 Robey PG, Boskey AI. The biochemistry of bone. *San Diego: Academic press* 1996: 95-183
  - 46 Schinke T, Amendt C, Trindl A, Poschke O, Muller-Esterl W, Jahnke-Dechent W. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation *in vitro* and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem* 1996; 271: 20789-20796
  - 47 Bjorklund M, Ciftcioglu N, Kajander EO. Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. *Proc SPIE Int* 1998; 3441: 123-129
  - 48 Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, Hjelle JT, Kajander EO. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2077-2086
  - 49 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989
  - 50 Angert ER, Clements KD, Pace NR. The largest bacterium. *Nature* 1993; 362: 239-241
  - 51 Folk RL. SEM imaging of bacteria and nannobacteria in carbonate sediments and rocks. *J Sedim Petrol* 1993; 63: 990-999
  - 52 Folk RL. Interaction between bacteria, nannobacteria, and mineral precipitation in hot springs of central Italy. *Geo Phys Quarter* 1994; 48: 233-246
  - 53 Ciftcioglu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology* 1998; 4: 259-270
  - 54 Kari K, Akerman, Jyrki T, Kuikka, Ciftcioglu N, Jyrki P, Kim A, Bergstroem IK, Kajander EO. Radiolabeling and *in vivo* distribution of nanobacteria in rabbit. *Proc. SPIE Int* 1997; 3111: 436-442
  - 55 Wang XJ, Liu W, Yang ZL, Wei H, Wen Y, Li YG. The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2004; 25: 492-494
  - 56 Shoskes DA, Thomas KD, Gomez E. Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience. *J Urol* 2005; 173: 474-477
  - 57 Friedlander G. Phosphate transport and kidney stones. *Bull Acad Natl Med* 2005; 189: 309-316
  - 58 Santa Cruz F, Cabrera W, Barreto S, Mayor MM, Baez D. Kidney disease in Paraguay. *Kidney Int Suppl* 2005; 97: S120-S125
  - 59 Traba Villameytide ML. Porphyrins in renal calculi. *Actas Urol Esp* 2005; 29: 163-169
  - 60 Maloney ME, Springhart WP, Ekeruo WO, Young MD, Enemchukwu CU, Preminger GM. Ethnic background has minimal impact on the etiology of nephrolithiasis. *J Urol* 2005; 173: 2001-2004
  - 61 Dall'era JE, Kim F, Chandhoke PS. Gender Differences among Hispanics and Caucasians in symptomatic presentation of kidney and ureteral stones. *J Endourol* 2005; 19: 283-286
  - 62 Perez-Brayfield MR, Baseman A, Kirsch AJ. Adolescent urology. *Adolesc Med Clin* 2005; 16: 215-227
  - 63 Rieu P. Infective lithiasis. *Ann Urol* 2005; 39: 16-29
  - 64 Conort P, Dore B, Saussine C. Guidelines for the urological management of renal and ureteric stones in adults. *Prog Urol* 2004; 14: 1095-1102
  - 65 Knoll T, Wendt-Nordahl G, Trojan L, Wenke A, Roeder N, Alken P. Current aspects of stone therapy. *Aktuelle Urol* 2005; 36: 47-54
  - 66 Grases F, March JG, Conte A, Costa-Bauza A. New aspects on the composition, structure and origin of calcium oxalate monohydrate calculi. *Eur Urol* 1993; 24: 381-386
  - 67 Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 1999; 56: 1893-1898
  - 68 Garcia Cuerpo E, Olavi Kajander E, Ciftcioglu N, Lovaco Castellano F, Correa C, Gonzalez J, Mampaso F, Liano F, Garcia de Gabiola E, Escudero Barrilero A. Nanobacteria. An experimental neo-lithogenesis model. *Arch Esp Urol* 2000; 53: 291-303
  - 69 Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology* 2004; 11: 95-101
  - 70 Venneman NG, Buskens E, Besselink MG, Stads S, Go PM, Bosscha K, van Berge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Small gallstones are associated with increased risk of acute pancreatitis: potential benefits of prophylactic cholecystectomy? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2540-50
  - 71 Kratzer W, Haenle MM, Mason RA, von Tirpitz C, Kaechele V. Prevalence of cholelithiasis in patients with chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6170-6175
  - 72 Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 423-433
  - 73 Zuber-Jerger I, Kullmann F, Schneidewind A, Scholmerich J. Diagnosis and treatment of a patient with gallstone ileus. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 331-335
  - 74 Wen Y, Li YG, Yang ZL, Wang XJ, Wei H, Liu W, Tan AL, Miao XY, Wang QW, Huang SF, Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of cholecystolithiasis patients. *Zhonghua Waike Zazhi* 2003; 41: 267-270

# Ss-A/Ro 核蛋白 60 ku 亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达

韩全利, 丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明

韩全利, 空军总医院干部病房三区 北京市 100036

丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明, 第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032

通讯作者: 韩全利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院干部病房三区. hanquanli@21cn.com

电话: 010-66928132 传真: 010-66928132

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-10-10

## Expression of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit and its variants in drug-resistant gastric cancer cells

Quan-Li Han, Jie Ding, Chang-Cun Guo, Xin Wang, Tai-Dong Qiao, Xue-Yong Zhang, Dai-Ming Fan

Quan-Li Han, the Third Section of Gerontology Department, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing 100036, China  
Jie Ding, Chang-Cun Guo, Xin Wang, Tai-Dong Qiao, Xue-Yong Zhang, Dai-Ming Fan, Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Quan-Li Han, the Third Section of Gerontology Department, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. hanquanli@21cn.com

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-10-10

## Abstract

**AIM:** To clone the encoding gene of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit, and to detect the expression of Ss-A/Ro 60 ku subunit and its variants in the drug resistance gastric cancer cells.

**METHODS:** The encoding gene of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction. The expression of Ss-A/Ro 60 ku subunit and its variants in the gastric cancer cells were analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

**RESULTS:** The Ss-A/Ro 60 ku subunit was successfully cloned, and its two transcription variants, with a length of 52 and 41 bp, respectively, were found out. The expression of Ss-A/Ro 60 ku subunit and its two variants in the SGC7901/VCR cells was higher than that in the SGC7901 ones ( $P = 0.0001$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** The Ss-A/Ro 60 ku subunit and its

variants are multi-drug resistance-related molecules.

**Key Words:** Gastric cancer; Ss-A/Ro 60 ku subunit; Variant; Multi-drug resistance

Han QL, Ding J, Guo CC, Wang X, Qiao TD, Zhang XY, Fan DM. Expression of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit and its variants in drug-resistant gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2788-2790

## 摘要

**目的:** 克隆Ss-A/Ro 60 ku亚单位编码基因, 检测Ss-A/Ro 60 ku亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达情况。

**方法:** 应用RT-PCR克隆Ss-A/Ro 60 ku亚单位编码基因, 应用半定量RT-PCR检测Ss-A/Ro 60 ku亚单位及其变异体在胃癌细胞中的表达情况。

**结果:** 成功克隆了Ss-A/Ro 60 ku亚单位编码基因, 并发现了他的两种变异体, 长度分别为52 bp和41 bp。半定量RT-PCR结果显示, Ss-A/Ro 60 ku亚单位在SGC7901/VCR中的表达强度高于SGC7901细胞( $P = 0.0001$ ), Ss-A/Ro 60 ku亚单位的两种变异体在SGC7901/VCR中的表达强度也高于SGC7901细胞( $P = 0.001$ )。

**结论:** Ss-A/Ro 60 ku亚单位及其两种变异体为胃癌多药耐药相关分子。

**关键词:** 胃癌; Ss-A/Ro 60 ku亚单位; 变异体; 多药耐药

韩全利, 丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明. Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(23):2788-2790

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2788.asp>

## 0 引言

肿瘤细胞的多药耐药<sup>[1-2]</sup>严重影响了肿瘤化疗的效果, 虽然导致肿瘤多药耐药的众多机制被阐明, 但仍不能完全解释肿瘤的多药耐药, 鉴于此, 我们应用消减杂交及改良DDRT-PCR法对胃癌耐药细胞中的耐药相关分子进行了研究, 从耐药胃癌细胞中克隆了与耐药相关的多个已知分子和未知分子<sup>[3]</sup>, 其中Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit(Ro 60)是在耐长春新碱的胃癌细胞系SGC7901/VCR与SGC7901的差示比较中发现的在SGC7901/VCR中



高表达的基因,在克隆Ro 60编码基因的时候,我们发现了Ro 60编码基因的两种变异体Ro 60 V1及Ro 60 V2<sup>[4]</sup>,本课题对他们在胃癌耐药细胞中的表达情况进行了研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞SGC7901:引自军事医学科学院,由第四军医大学消化病研究所保存;人胃癌长春新碱耐药亚系SGC7901/VCR:由第四军医大学消化病研究所建立、保存;Hela细胞:由第四军医大学消化病研究所保存. RPMI 1640及胰蛋白酶购自Hyclone公司;胎牛血清购自浙江金华公司;细胞总RNA提取试剂盒购自华舜公司;M-MuLV反转录酶、Taq酶及DNA分子量标准购自MBI公司.

### 1.2 方法

1.2.1 Ro 60编码基因的克隆 利用RNA提取试剂盒提取胃癌细胞SGC7901/VCR的总RNA,以RT-PCR法克隆Ro 60编码基因,上游引物为:5'ATA ACG AGG GAG AGG AGA AAG G 3';下游引物为:5'GTG TCC ACC TGC ACT CCA TGT C 3',将PCR产物与pUCm-T载体连接后进行DNA序列测定.

1.2.2 Ro 60及其变异体在胃癌细胞中的表达分析 培养及收集SGC7901、SGC7901/VCR及Hela细胞,利用试剂盒提取的总RNA,用紫外分光光度计对提取的RNA进行定量,逆转录法制备cDNA,根据Ro 60编码基因及其变异体的序列,应用Premier Primer 5软件设计序列特异性引物,引物序列如下:Ro 60上游引物:5'-AAA CAC ACC TGC TGA TGT CTT C-3';下游引物:5'-GGG TAT TTT GCA AGG CTC TAT CAT C-3'. Ro 60 V1上游引物:5'-AAA CAC ACC TGC TGA TGT CTT C-3';下游引物:5'-GGG TAT TTT GCA AGG CTC TTT TAG G-3'. Ro 60 V2上游引物:5'-AAA CAC ACC TGC TGA TGT CTT C-3';下游引物:5'-GGT ATT TTG CAA GGA TCC AGA G-3'. GAPDH上游引物:5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3';下游引物:5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'. 进行PCR反应,以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,比较各扩增产物在各细胞间表达水平的强弱,应用图像分析仪对扩增条带做了扫描半定量.

**统计学处理** 应用SPSS 11.0统计软件,对各扩增条带的灰度值进行*t*检验.

## 2 结果

2.1 Ro 60编码基因的克隆及DNA测序分析 本研究成功地扩增了Ro 60编码基因.通过DNA序列测定,发现了Ro 60的三种cDNA克隆,其中一种克隆与Ro 60 cDNA序列完全一致,另外两种cDNA克隆分别于Ro 60 cDNA序列的第1 727和1 728核苷酸之间插入了长度为52 bp和41 bp的核苷酸序列,遂将其命名为Ro 60 V1、Ro 60 V2, Ro 60 V1插入的核苷酸序列为:ACACTGTAAAATAGTTTTCG

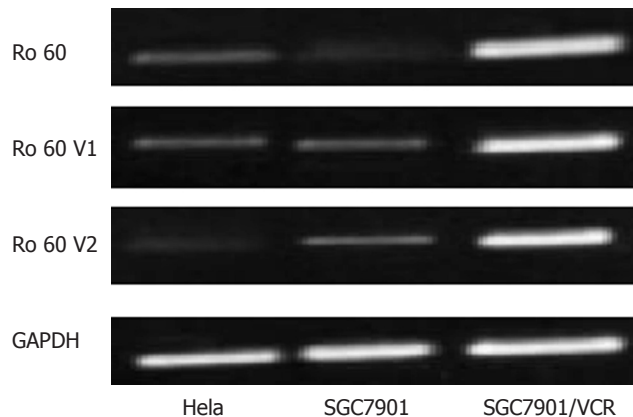


图1 Ro 60、Ro 60 V1及Ro 60 V2的半定量RT-PCR结果.

表1 Ro 60、V1及V2的半定量RT-PCR灰度扫描结果 (*n* = 4)

	Ro 60	Ro 60 V1	Ro 60 V2	GAPDH
SGC7901/VCR	174.7 ± 7.11	178.3 ± 6.73	171.2 ± 7.96	177.4 ± 8.36
SGC7901	75.3 ± 4.92 <sup>a</sup>	90.1 ± 4.39 <sup>a</sup>	91.2 ± 5.94 <sup>a</sup>	168.2 ± 7.69
Hela	96.5 ± 5.09 <sup>a</sup>	89.4 ± 4.96 <sup>a</sup>	74.2 ± 5.39 <sup>a</sup>	167.7 ± 7.98

<sup>a</sup>*P* < 0.01 vs SGC7901/VCR.

TTTGTTGAATAATACGTGTGTACCTAAAAGAG; Ro 60 V2插入的核苷酸序列为:GCATGTTGGATATGTGCGGC TTTGATACTGGAGCTCTGGAT.

2.2 Ro 60及其变异体在胃癌细胞中表达的半定量RT-PCR结果 半定量RT-PCR结果显示, Ro 60在SGC7901/VCR中的表达强度高于SGC7901细胞及Hela细胞(*P* < 0.01), Ro 60的两种变异体在SGC7901/VCR中的表达强度也高于SGC7901细胞及Hela细胞(*P* < 0.01)(图1, 表1).

## 3 讨论

胃癌细胞的多药耐药性是胃癌化疗失败的主要原因,我们以前的研究发现,在胃癌细胞的多药耐药中,除了有P-gp、MRP、GST等经典的耐药分子参与外,凋亡基因的改变、蛋白激酶C以及某些离子通道也参与了胃癌细胞多药耐药性的形成<sup>[5-7]</sup>.为了深入研究胃癌细胞MDR的发生机制,我们应用改良差示PCR技术比较了胃癌长春新碱耐药细胞SGC7901/VCR与药敏细胞SGC7901基因表达的差异,结果表明,与药敏细胞SGC7901相比, Ro 60在耐药细胞SGC7901/VCR中的表达明显上调,在研究Ro 60基因的同时,我们又发现了Ro 60基因的两种转录变异体.

Ro 60是从人T淋巴母细胞白血病细胞cDNA文库中首次克隆得到的<sup>[8]</sup>,人Ro 60基因定位于第一号染色体1q31区,全长cDNA为1 890 bp,编码525个氨基酸残基,分子量为60 ku<sup>[9]</sup>. Ro 60是多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、干燥综合征等疾病的自身抗原<sup>[10]</sup>. Ro 60是一种RNA结合蛋白,目前Ro 60的功能一直不是很清楚<sup>[11-13]</sup>.

为了解Ro 60及其转录变异体在耐药胃癌细胞中的表达情况,我们应用半定量RT-PCR对他们在胃癌细胞

中的表达进行了研究, 结果表明, Ro 60及其变异体Ro 60 V1、Ro 60 V2在SGC7901/VCR中的表达明显高于SGC7901细胞和Hela细胞. SGC7901细胞和Hela细胞一样, 他们都是对化疗药物敏感的肿瘤细胞, 而SGC7901/VCR细胞是SGC7901细胞在长春新碱(VCR)的诱导下培养出的耐药胃癌细胞, 经耐药谱检测, 其不但对长春新碱耐药, 而且对其他化学结构及作用机制不同的化疗药物也呈高度的耐药性, 这就表明, SGC7901/VCR细胞是一株多药耐药的胃癌细胞<sup>[14,15]</sup>. Ro 60及其变异体Ro 60 V1、Ro 60 V2在SGC7901/VCR细胞中高表达表明, 他们在胃癌多药耐药的机制中可能起着一定的作用, 是胃癌细胞多药耐药相关分子, 为进一步研究Ro 60及其两种转录变异体在肿瘤多药耐药中的功能提供了一定的实验基础.

#### 4 参考文献

- 1 Roepe PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 385-405
- 2 Deng L, Tatebe S, Lin-Lee YC, Ishikawa T, Kuo MT. MDR and MRP gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents. *Cancer Treat Res* 2002; 112: 49-66
- 3 Zhao Y, You H, Liu F, An H, Shi Y, Yu Q, Fan D. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 211-218
- 4 Wang X, Lan M, Shi YQ, Lu J, Zhong YX, Wu HP, Zai HH, Ding J, Wu KC, Pan BR, Jin JP, Fan DM. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 54-59
- 5 Zhao Y, Xiao B, Chen B, Qiao T, Fan D. Upregulation of drug sensitivity of multidrug-resistant SGC7901/VCR human gastric cancer cells by bax gene transduction. *Chin Med J* 2000; 113: 977-980
- 6 韩英, 时永全, 曹云新, 樊代明. 蛋白激酶C的激活剂及抑制剂对胃癌糖耐药细胞系P-糖蛋白功能及表达的影响. *中华消化杂志* 2001; 21: 349-352
- 7 时永全, 肖冰, 苗继延, 赵燕秋, 尤涵, 樊代明. 构建fas基因真核表达载体逆转胃癌耐药细胞MDR表型. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 309-312
- 8 Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1989; 83: 1284-1292
- 9 Chan EK, Tan EM, Ward DC, Matera AG. Human 60-kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen gene (SSA2) localized to 1q31 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 23: 298-300
- 10 von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358
- 11 O'Brien CA, Wolin SL. A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev* 1994; 8: 2891-2903
- 12 Chen X, Quinn AM, Wolin SL. Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2000; 14: 777-782
- 13 Shi H, O'Brien CA, Van Horn DJ, Wolin SL. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA* 1996; 2: 769-784
- 14 蔡学君, 张学庸, 樊代明. 胃癌耐药细胞株耐药谱的体外实验. *第四军医大学学报* 1994; 15: 86-88
- 15 Shi Y, Han Y, Wang X, Zhao Y, Ning X, Xiao B, Fan D. MGr1-Ag is associated with multidrug-resistant phenotype of gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 2002; 5: 154-159

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 页码160, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

## P 选择素 L-EGF 单抗对 SCID 小鼠胃癌转移抑制作用

陈金联, 陈明祥, 陆金来, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陆允敏, 周同, 吴云林, 陈国强

陈金联, 陈明祥, 陆金来, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陆允敏, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233  
周同, 吴云林, 上海交通大学附属瑞金医院 上海市 200025  
陈国强, 中国科学院上海实验动物中心 上海市 200031  
上海市卫生局面上基金资助课题, No. 034045  
通讯作者: 陈金联, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科, wqj\_021002@163.com  
电话: 021-64369181-8970  
收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-10-08

### Inhibition of P-selectin L-EGF monoclonal antibody on metastasis of human gastric carcinoma in severe combined immunodeficient mice

Jin-Lian Chen, Ming-Xiang Chen, Jin-Lai Lu,  
Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Yun-Min Lu,  
Tong Zhou, Yun-Lin Wu, Guo-Qiang Chen

Jin-Lian Chen, Ming-Xiang Chen, Jin-Lai Lu, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Yun-Min Lu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Shanghai Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China  
Tong Zhou, Yun-Lin Wu, the Affiliated Ruijin Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China  
Guo-Qiang Chen, Animal Center of Shanghai Laboratory, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China  
Supported by the Scientific Foundation of Shanghai Public Health Administration, No. 034045  
Correspondence to: Jin-Lian Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Shanghai Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. wqj\_021002@163.com  
Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-10-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the role of cell adhesion molecule P-selectin L-EGF monoclonal antibody (L-EGF Mab) in the inhibition of the metastasis of gastric cancer in severe combined immunodeficient (SCID) mice.

**METHODS:** Human gastric cancer cell line SGC-7901 was orthotopically implanted into SCID mice to establish metastatic model. At the 3<sup>rd</sup> day after implantation, the mice were intravenously injected with normal saline ( $n = 11$ ) or P-selectin L-EGF Mab ( $n = 9$ ). At the end of the 6<sup>th</sup> wk, pathological examinations were performed on the tissues from stomach and other possible invaded organs. Meanwhile, polymerase chain reaction was performed on the gastric cancer tissues.

**RESULTS:** The metastatic rate in the mice treated with

normal saline was 81.8% (9/11), and that in the mice treated with P-selectin L-EGF Mab was 11.1% (1/9). There was significant difference between them ( $P < 0.05$ ). The level of P-selectin mRNA expression in the gastric cancer with metastasis was markedly increased in comparison with that without metastasis, and P-selectin mRNA expression in the mice treated with P-selectin L-EGF Mab was significantly lower than that in the ones treated with normal saline (cycle threshold:  $20.54 \pm 2.20$  vs  $17.09 \pm 1.40$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** P-selectin adhesion molecule is related to tumor metastasis, and P-selectin L-EGF Mab can inhibit the metastasis by down-regulating the expression of P-selectin mRNA.

**Key Words:** P-selection L-EGF monoclonal antibody; Human gastric cancer; SCID mice; Metastasis

Chen JL, Chen MX, Lu JL, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Lu YM, Zhou T, Wu YL, Chen GQ. Inhibition of P-selectin L-EGF monoclonal antibody on metastasis of human gastric carcinoma in severe combined immunodeficient mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2791-2794

### 摘要

**目的:** 研究黏附分子P选择素L-EGF单抗在SCID小鼠胃癌转移中的治疗作用及其机制。

**方法:** 用SGC-7901人胃癌组织原位移植SCID小鼠建立转移模型。术后第3天开始, 动物分别静脉注射生理盐水(生理盐水组,  $n = 11$ )或P选择素L-EGF单克隆抗体(L-EGF单抗组,  $n = 9$ ), 6 wk末取部分胃癌组织、肿大淋巴结和可疑转移脏器作病理检查; 同时取部分胃癌组织作荧光定量PCR检测。

**结果:** 生理盐水组肿瘤转移率为81.8%(9/11), L-EGF单抗组转移率为11.1%(1/9), 两组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。荧光定量PCR测定显示, SCID小鼠伴有癌转移者其胃癌中P选择素mRNA表达较不伴癌转移者明显增强; L-EGF单抗组P选择素mRNA表达较生理盐水组低(Ct值:  $20.54 \pm 2.20$  vs  $17.09 \pm 1.40$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** P选择素与癌转移密切相关, 其L-EGF单抗具有抗转移作用; 其机制可能与阻断癌细胞与血管内皮的黏附以及抑制P选择素基因表达有关。

**关键词:** P选择素单克隆抗体; SCID小鼠; 胃癌; 转移



陈金联, 陈明祥, 陆金来, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陆允敏, 周同, 吴云林, 陈国强. P选择素L-EGF单抗对SCID小鼠胃癌转移抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2791-2794

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2791.asp>

## 0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 肿瘤转移为恶性肿瘤致死的关键因素. 肿瘤转移机制至今仍未完全明了. 近年研究表明, 细胞黏附分子在胃癌等肿瘤转移中起着十分重要的作用<sup>[1,2]</sup>. 我们已对胃癌组织进行P选择素表达研究, 发现P选择素在胃癌组织中表达与肿瘤转移和预后显著相关<sup>[3]</sup>. 最近我们用人胃癌组织原位移植SCID小鼠建立胃癌转移模型, 发现P选择素单克隆抗体对胃癌具有抗转移作用<sup>[4]</sup>.

近年P选择素的分子结构与功能关系已引起重视. 研究认为, P选择素的凝集素与表皮生长因子结构域的共同区域(L-EGF)可能是其黏附更有效的功能域. 最近应用RT-PCR方法从人血小板克隆出L-EGF基因, 并成功地制备P选择素L-EGF单克隆抗体, 体外实验表明其可特异性结合P选择素, 具有抗活化血小板与中性粒细胞黏附的功能<sup>[5]</sup>. 迄今为止, 国内外未见P选择素L-EGF单克隆抗体抗肿瘤转移的动物实验研究报道. 我们在建立人胃癌组织原位移植SCID小鼠胃癌转移模型的基础上, 用荧光定量PCR技术研究胃癌组织P选择素表达与肿瘤转移的关系, 观察P选择素L-EGF单抗对胃癌转移的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 逆转录酶、Taq DNA聚合酶、上下游引物和荧光标记探针由中山大学达安基因股份有限公司(广州)提供. 重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠, 健康, ♂, 6-7周龄, 体质量为20-25 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供.

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型 SCID小鼠30只, 随机分为试验组(20只)和正常对照组(10只). 试验组动物模型制作采用裸鼠皮下传代的SGC-7901人胃癌组织原位移植方法<sup>[4]</sup>. 动物麻醉后, 切开左上腹皮肤、腹壁和腹膜, 暴露胃壁, 在胃大弯中部用剪刀损伤胃浆膜约3 mm大小, 用0号丝线将人胃癌组织块(150 mg, 约5 mm×7 mm大小)缝在损伤处, 然后将胃送入腹腔, 腹壁、皮肤用丝线缝合.

1.2.2 动物实验方法 动物模型制作后, 动物随机分为生理盐水注射组(生理盐水组,  $n = 11$ )与P选择素L-EGF单克隆抗体注射组(L-EGF单抗组,  $n = 9$ ). 术后第3 d, L-EGF单抗组静脉内注射P选择素L-EGF单克隆抗体(上海交通大学附属瑞金医院), 每次100  $\mu$ g(以100  $\mu$ L生理盐水稀释), 2次/wk, 共3 wk; 生理盐水组注射生理盐水, 每次100  $\mu$ L, 2次/wk, 共3 wk. 此外, 正常对照组,  $n = 10$ , 不作胃癌组织原位移植与生理盐水或L-EGF单抗注射.

1.2.3 标本采集及病理学检查 动物均于术后第6周末处死,

取胃壁生长的肿瘤组织、肿大淋巴结和可疑转移脏器, 40 g/L福尔马林固定, 石蜡包埋, 制作病理切片, HE染色, 观察肿瘤转移情况. 同时取部分胃癌组织置液氮下保存.

1.2.4 TRIzol法抽提总RNA SCID小鼠胃癌组织总RNA提取按TRIzol法抽提. 组织块(约100 mg)置匀浆器, 加TRIzol(100 mg组织加TRIzol 2 mL), 冷冻匀浆, 置Eppendorf管, 15-30℃孵育5 min, 加入氯仿(0.2 mL氯仿/mL TRIzol), 15-30℃孵育2-3 min, 4℃ 12 000  $g$ 离心15 min, 取上清液至新的Eppendorf管, 加异丙醇(0.5 mL异丙醇/mL TRIzol), 15-30℃孵育样品10 min, 4℃ 12 000  $g$ 离心10 min, 弃上清液, 750 mL/L乙醇洗涤沉淀一次, 4℃ 7 500  $g$ 离心5 min, 弃乙醇, 空气或真空干燥5-10 min, 加DEPC处理水溶解RNA, -80℃保存备用.

1.2.5 鼠的P选择素荧光探针序 P selectin f: GCATACTCAT GGAATAACTCACG; P selectin r: GACGTCATTGAGGTG AGCG; P selectin probe: AGGCACTTACAGACTTAGT GGCCAT.

1.2.6 cDNA合成 取出RNA模板, 分别加入2  $\mu$ L已经标记好的消毒离心管中, RT-PCR试剂盒解冻, 依次加入稀释好的逆转录酶0.5  $\mu$ L、dNTPs 0.2  $\mu$ L、上、下游引物各0.2  $\mu$ L、DEPC水4.9  $\mu$ L、RT-buffer 2  $\mu$ L, 总体积10  $\mu$ L. 然后依次插入预先设置(37℃ 1 h、95℃ 3 min)加热模块, 逆转录cDNA完成, 放入-80℃冰箱备用.

1.2.7 荧光PCR 取出消毒好的96孔联体反应板, 分别加入cDNA模板, 取出实时荧光定量PCR试剂盒解冻, 依次加入Taq酶1  $\mu$ L、dNTPs 0.5  $\mu$ L、上、下游引物各0.5  $\mu$ L、荧光标记探针0.5  $\mu$ L、5×buffer 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 32  $\mu$ L、cDNA 5  $\mu$ L, 放入全自动实时荧光定量PCR仪(美国ABI 7000)板槽中. 扩增条件: (1)93℃ 2 min; (2)93℃ 30 s、55℃ 1 min共40个循环.

统计学处理  $\chi^2$ 精确法检验和 $t$ 检验.

## 2 结果

2.1 P选择素L-EGF单抗对小鼠胃癌转移的影响 人胃癌组织SGC-7901原位移植SCID小鼠后, 于第6周末处死. 经病理检查发现, 胃癌局部生长良好, 肿瘤向胃腔内不规则突出, 质硬脆; 光镜下观察见低分化腺癌组织, 浸润黏膜下层、黏膜层和肌层.

小鼠胃癌原位移植术后6 wk, 生理盐水组肿瘤转移率为81.8%(9/11), 分别为淋巴结转移9例(9/11), 肝脏6例(6/11), 肺脏和胰腺各为2例. 但经P选择素L-EGF单克隆抗体注射治疗的SCID小鼠胃癌原位移植术后6 wk, 则肿瘤的脏器和淋巴结转移被抑制. L-EGF单抗治疗组发现1例转移(1/9), 仅发现淋巴结转移, 未发现肝脏等脏器转移. 余8例未发现肿瘤转移. 经 $\chi^2$ 检验, 两组差异显著,  $P < 0.05$ . 此外, P选择素L-EGF单克隆抗体对胃癌原位移植肿瘤的生长未见影响.

2.2 P选择素mRNA在SCID小鼠胃癌组织中的表达 应用

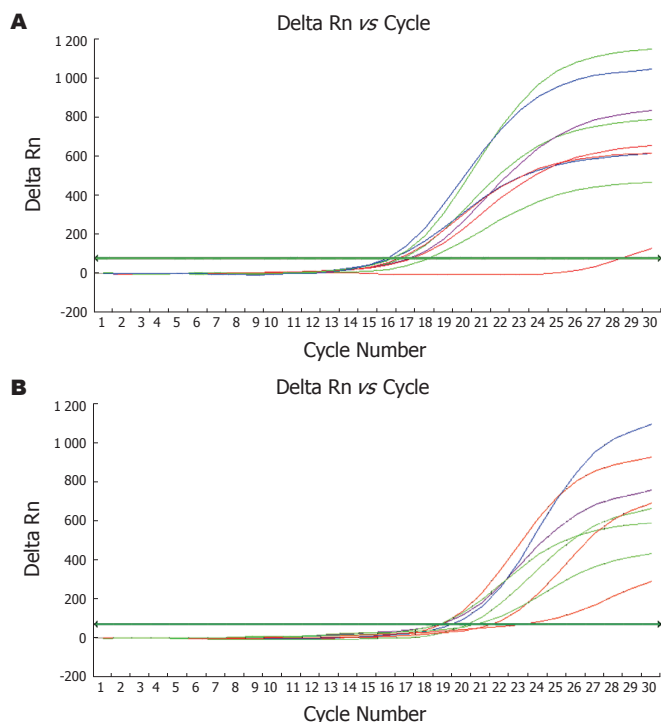


图1 生理盐水组、L-EGF单抗组SCID小鼠与正常小鼠胃组织P选择素mRNA表达。A: 生理盐水组与正常小鼠; B: L-EGF单抗组。

表1 各组动物胃组织P选择素mRNA检测结果 (Ct值, mean  $\pm$  SD)

组别	n	P选择素mRNA的Ct值
生理盐水组	11	17.09 $\pm$ 1.40
L-EGF单抗组	9	20.54 $\pm$ 2.20
正常对照组	10	28.38 $\pm$ 2.63

荧光定量PCR技术检测胃癌组织P选择素表达, 阈值循环圈数(Ct): 每个模板的Ct值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct值越小。结果发现, P选择素的表达明显不同。生理盐水组11例中有9例P选择素mRNA荧光定量PCR的Ct值较低, 表明这9例P选择素mRNA表达较强, 经病理学检查发现这9例均伴有淋巴结和(或)脏器的肿瘤转移; 2例不伴肿瘤转移者, P选择素mRNA荧光定量PCR的Ct值较高, 表明其P选择素mRNA表达水平较低。同时发现, L-EGF单抗组9例中有8例P选择素mRNA荧光定量PCR的Ct值较高, 表明这8例的P选择素mRNA表达较低; 1例P选择素mRNA表达与生理盐水组伴肿瘤转移者相近, 此例发现有淋巴结转移, 未发现肝脏等转移。此外, 10例正常小鼠胃标本P选择素mRNA荧光定量PCR的Ct值较高, 表明正常小鼠胃组织P选择素mRNA表达均较低。生理盐水组P选择素mRNA表达较正常小鼠胃组织P选择素mRNA表达明显增强, L-EGF单抗组P选择素mRNA表达较生理盐水组低, 各组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图1A, 表1)。

### 3 讨论

近年来研究表明, 肿瘤的浸润和转移是一个复杂的多环节过程, 其中肿瘤细胞与细胞外基质和血管内皮细胞相

互作用在肿瘤转移过程中起关键性的作用。已知细胞与细胞、细胞与细胞外基质的黏附作用是通过黏附分子介导的。近年来有关细胞黏附分子与肿瘤转移机制的研究已越来越被人们所重视。选择素是新近确定的一类黏附分子家族, 其重要成分之一的P选择素(GMP140/颗粒表面膜蛋白, 分子质量140 ku)主要分布于中等大小血管内皮细胞棒状小体(Weibel-Palade)及血小板 $\alpha$ 颗粒, 并随这些细胞活化而迅速表达于细胞膜表面或释放至血液中<sup>[6]</sup>。有关研究表明, P选择素通过介导肿瘤细胞与内皮细胞和血小板之间相互作用, 在肿瘤转移过程中可能起黏附介导作用<sup>[7-9]</sup>。

我们已对60例胃癌患者进行免疫组化研究, 结果发现黏附分子受体P选择素不仅在肿瘤血管内皮上表达, 而且在肿瘤细胞膜上表达, 淋巴结有癌转移者P选择素阳性表达率明显高于无淋巴结转移者, 且阳性表达者的平均存活期和5 a生存率明显低于阴性者<sup>[3]</sup>。最近研究发现P选择素单抗对胃癌具有抗转移作用<sup>[4]</sup>。Tozawa *et al*<sup>[10]</sup>的研究表明, 肾细胞癌Lewis X抗原的表达与组织病理学指标和预后显著相关。Ferroni *et al*<sup>[11]</sup>测定了181例结肠癌, 34例良性疾病和181例正常对照者的血浆可溶性P选择素水平, 结果发现, 血浆可溶性P选择素水平与肿瘤转移相关, 是预测肿瘤复发的一项独立的预后因子。研究表明, 选择素表达与肿瘤转移密切相关, 阳性表达者易浸润转移, 因此预后较差。

近年P选择素的分子结构与功能关系已引起重视。选择素分子含有凝集素样区、表皮生长因子样区(EGF样区)、补体蛋白重复序列区、疏水跨膜区和胞质短尾。一般认为, P选择素分子胞外区的凝集素结构域可能是P选择素识别配基并介导细胞间黏附的主要活性部位, 但还需要胞外区表皮生长因子结构域的稳定和调节, 增强其黏附亲和力与特异性。因此, P选择素的凝集素与表皮生长因子结构域的共同区域(L-EGF)可能是其黏附更有效的功能域。为进一步探讨P选择素在肿瘤转移过程中的作用及其抗黏附治疗意义, 最近应用RT-PCR方法从人血小板克隆出L-EGF基因, 并成功地制备P选择素L-EGF单克隆抗体, 体外实验表明其可特异性结合P选择素, 具有抗活化血小板与中性粒细胞黏附的功能。TNF $\alpha$ 诱导血管内皮细胞活化, 从而表达P选择素, 而P选择素L-EGF单克隆抗体可明显抑制活化内皮细胞与中性粒细胞黏附活化<sup>[5]</sup>。动物实验研究发现, P选择素L-EGF单克隆抗体通过抑制内皮细胞与中性粒细胞、树突状细胞等的黏附活化, 对肝、肾缺血再灌注损伤具有治疗作用<sup>[12]</sup>。

我们建立了人胃癌组织原位移植SCID小鼠胃癌转移模型, 进行了P选择素L-EGF单克隆抗体抗转移的动物实验研究。我们发现, 经注射P选择素L-EGF单抗后小鼠的肿瘤转移率显著低于生理盐水对照组, 分别为11.1%与81.8%, L-EGF单抗组未发现肝脏等脏器转移, 两组之间差别显著,  $P < 0.05$ 。结果表明, P选择素L-EGF单抗抑制了



肿瘤的转移. 表明P选择素L-EGF单抗抑制肿瘤转移作用较P选择素单抗进一步增强<sup>[4]</sup>. Dimitroff *et al*<sup>[13]</sup>的免疫组化研究发现, P选择素糖蛋白配体1(PSGL-1)主要表达于骨转移性前列腺肿瘤细胞表面, 表明PSGL-1与前列腺癌的肿瘤转移相关. Enns *et al*<sup>[14]</sup>研究结果表明, 选择素与配体sLe(a)相互作用在结肠癌肝转移中起重要作用. Murata *et al*<sup>[15]</sup>研究发现, 抑制选择素配体Lewis X表达可抑制结肠癌的转移. Ludwig *et al*<sup>[16]</sup>的研究表明, 内皮细胞P选择素表达在实验性黑色素瘤肺转移中起重要作用. 结果表明, 选择素通过介导内皮细胞、血小板与肿瘤细胞的黏附, 在肿瘤转移过程中起重要作用, 其单克隆抗体可抑制肿瘤的转移.

荧光定量PCR技术研究癌组织mRNA基因表达, 可实时定量分析, 因此可较好地研究P选择素mRNA基因表达与肿瘤转移中的关系. 结果发现, 正常对照鼠胃组织P选择素mRNA表达较低, SCID小鼠有癌转移者其胃癌组织中P选择素mRNA表达显著较不伴癌转移者强, 这可能由于在肿瘤转移过程中选择素基因受刺激和激活, 导致其转录水平上调, 后者通过促进癌组织中P选择素黏附分子的合成从而加强肿瘤的转移. 有关研究表明, TNF $\alpha$ 、脂多糖、凝血酶等可刺激诱导活化血小板和血管内皮细胞从细胞水平或基因转录水平表达P选择素. 肿瘤细胞可分泌血管渗透因子、IL-1等细胞因子, 后者可刺激内皮细胞棒状小体的释放和细胞膜选择素表达, 而促进肿瘤的转移<sup>[4]</sup>. 表明, 在肿瘤转移过程中, P选择素合成与释放增强, 从而P选择素表达增强. Borsig *et al*<sup>[17]</sup>研究发现, P选择素通过介导肿瘤细胞与血小板和白细胞的黏附作用, 在肿瘤转移中起重要作用. Ferroni *et al*<sup>[11]</sup>研究表明, 血浆P选择素水平与结肠癌肿瘤转移相关, 是一项独立的预后指标. 我们发现, P选择素L-EGF单抗组胃癌组织中P选择素mRNA表达显著减低. Sumariwalla *et al*<sup>[18]</sup>研究表明, P选择素糖蛋白配体1可抑制炎症细胞TNF $\alpha$ 的产生, 已知TNF $\alpha$ 可刺激血小板和血管内皮细胞P选择素的表达, 因此, P选择素糖蛋白配体1可能通过抑制炎症细胞TNF $\alpha$ 的产生, 从而抑制P选择素的表达. 表明, P选择素L-EGF单克隆抗体可能通过抑制选择素mRNA基因表达而进一步发挥抗转移作用.

总之, P选择素L-EGF单克隆抗体作用于P选择素分子的关键表位, 因此其抗黏附作用更强, 体内应用的副作用可能更少. 进一步研究P选择素L-EGF单克隆抗体的抗肿瘤转移作用及其机制, 将对胃癌和其他肿瘤的抗转移治疗具有重要意义.

#### 4 参考文献

- 1 Kawamura YI, Kawashima R, Fukunaga R, Hirai K, Toyama-Sorimachi N, Tokuhara M, Shimizu T, Dohi T. Introduction of Sd(a) carbohydrate antigen in gastrointestinal cancer cells eliminates selectin ligands and inhibits metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 6220-6227

- 2 Songun I, Litvinov SV, van de Velde CJ, Pals ST, Hermans J, van Krieken JH. Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 1767-1772
- 3 陈金联, 周同, 吴云林, 王瑞年, 魏子白, 翟祖康. P-选择素在胃癌中表达及其预后意义. *上海医学* 1996; 19: 249-252
- 4 Chen J, Zhang Y, Chu Y. Inhibition of human stomach cancer metastasis in vivo by anti-P-selectin monoclonal antibody. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1998; 78: 437-439
- 5 Zhou T, Song W, Wang F, Ni PH, Chen N, Zhang DQ, Yu QW. Cloning, expression of the lectin-EGF domain of P-selectin, and preparation of its monoclonal antibody. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wulixue Bao* 2003; 35: 172-176
- 6 Borsig L. Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them. *News Physiol Sci* 2004; 19: 16-21
- 7 Zipin A, Israeli-Amit M, Meshel T, Sagi-Assif O, Yron I, Lifshitz V, Bacharach E, Smorodinsky NI, Many A, Czernilofsky PA, Morton DL, Witz IP. Tumor-microenvironment interactions: the fucose-generating FX enzyme controls adhesive properties of colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6571-6578
- 8 Magnani JL. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Arch Biochem Biophys* 2004; 426: 122-131
- 9 Fuster MM, Brown JR, Wang L, Esko JD. A disaccharide precursor of sialyl Lewis X inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2775-2781
- 10 Tozawa K, Okamoto T, Kawai N, Hashimoto Y, Hayashi Y, Kohri K. Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathologic findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int* 2005; 67: 1391-1396
- 11 Ferroni P, Roselli M, Martini F, D'Alessandro R, Mariotti S, Basili S, Spila A, Aloe S, Palmirotta R, Maggini A, Del Monte G, Mancini R, Graziano F, Cosimelli M, Guadagni F. Prognostic value of soluble P-selectin levels in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 111: 404-408
- 12 Zhou T, Sun GZ, Zhang MJ, Chen JL, Zhang DQ, Hu QS, Chen YY, Chen N. Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia-reperfusion injury and anti-adhesive intervention with anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1005-1010
- 13 Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, Kim R, Nguyen V, Huang W, Pienta KJ, Kutok JL, Rubin MA. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65: 5750-5760
- 14 Enns A, Gassmann P, Schluter K, Korb T, Spiegel HU, Senninger N, Haier J. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 1049-1059
- 15 Murata K, Miyoshi E, Ihara S, Noura S, Kameyama M, Ishikawa O, Doki Y, Yamada T, Ohigashi H, Sasaki Y, Higashiyama M, Tarui T, Takada Y, Kannagi R, Taniguchi N, Imaoka S. Attachment of human colon cancer cells to vascular endothelium is enhanced by N-acetylglucosaminyltransferase V. *Oncology* 2004; 66: 492-501
- 16 Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandi C, Boehncke WH, Zollner TM, Kaufmann R, Gille J. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* 2004; 64: 2743-2750
- 17 Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2193-2198
- 18 Sumariwalla PF, Malfait AM, Feldmann M. P-selectin glycoprotein ligand 1 therapy ameliorates established collagen-induced arthritis in DBA/1 mice partly through the suppression of tumour necrosis factor. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 67-75



# 瘦素和 TGF- $\alpha$ 在幽门螺杆菌感染慢性胃炎和胃溃疡患者胃黏膜内的表达及意义

李点玲, 张桂英

李点玲, 广州市芳村区人民医院 广东省广州市 510370  
张桂英, 中南大学湘雅医院消化科 湖南省长沙市 410008  
通讯作者: 张桂英, 410008, 湖南省长沙市湘雅路88号, 中南大学湘雅医院. guiyingzhang@hotmail.com  
电话: 0731-4327106  
收稿日期: 2005-07-28 接受日期: 2005-08-31

## Expression and significance of leptin and transforming growth factor- $\alpha$ in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected patients with chronic gastritis and gastric ulcer

Dian-Ling Li, Gui-Ying Zhang

Dian-Ling Li, the People's Hospital of Fangcun District, Guangzhou 510370, Guangdong Province, China  
Gui-Ying Zhang, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China  
Correspondence to: Gui-Ying Zhang, Xiangya Hospital of Central South University, 88 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. guiyingzhang@hotmail.com  
Received: 2005-07-28 Accepted: 2005-08-31

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of leptin and transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) in the *H pylori* infected gastric mucosa, and to explore the correlation between leptin and TGF- $\alpha$ .

**METHODS:** Immunocytochemistry was used to detect the expression of leptin and TGF- $\alpha$  in the mucosal biopsies from the corpus ventriculi and the gastric antrum of patients with *H pylori*<sup>+</sup> and *H pylori*<sup>-</sup> chronic gastritis and gastric ulcer.

**RESULTS:** Leptin was weakly positive in the corpus ventriculi mucosa of normal person. The expression of leptin and TGF- $\alpha$  were significantly increased in the corpus ventriculi mucosa of *H pylori*<sup>+</sup> infected patients with gastritis and gastric ulcer as compared with that in the *H pylori*<sup>-</sup> patients (leptin: 73.33% vs 23.08%,  $P < 0.05$ ; 70.59% vs 25.00%,  $P < 0.05$ ; TGF- $\alpha$ : 73.33% vs 15.38%,  $P < 0.05$ ; 76.47% vs 25.00%,  $P < 0.05$ ). The expression of leptin had no significant difference in the gastric antral mucosa between the four groups ( $P > 0.05$ ). The expression of TGF- $\alpha$  was markedly higher in the gastric antral mucosa of patients with *H pylori*<sup>+</sup> chronic

gastritis than that in patients with *H pylori*<sup>-</sup> gastritis (53.33% vs 7.69%,  $P < 0.05$ ). The expression of leptin and TGF- $\alpha$  was positively correlated in the corpus ventriculi mucosa ( $r = 0.80$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The expression of leptin and TGF- $\alpha$  is positively correlated in the corpus ventriculi mucosa of *H pylori*<sup>+</sup> patients with chronic gastritis and gastric ulcer.

**Key Words:** Leptin; Transforming growth factor- $\alpha$ ; *Helicobacter pylori*; Chronic gastritis; Gastric ulcer

Li DL, Zhang GY. Expression and significance of leptin and transforming growth factor- $\alpha$  in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected patients with chronic gastritis and gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2795-2798

### 摘要

**目的:** 探讨瘦素和转化生长因子- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )在幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的胃黏膜表达之间的关系。

**方法:** 用免疫组织化学法检测*H pylori*阳性(*H pylori*<sup>+</sup>)和阴性(*H pylori*<sup>-</sup>)慢性胃炎和胃溃疡患者胃体和胃窦部活检标本。

**结果:** 瘦素在正常人的胃体黏膜内有弱阳性表达。瘦素和TGF- $\alpha$ 在*H pylori*<sup>+</sup>胃炎和胃溃疡患者胃体黏膜内的过表达率较*H pylori*<sup>-</sup>者明显增强(瘦素: 73.33% vs 23.08%,  $P < 0.05$ ; 70.59% vs 25.00%,  $P < 0.05$ ; TGF- $\alpha$ : 73.33% vs 15.38%,  $P < 0.05$ ; 76.47% vs 25.00%,  $P < 0.05$ )。瘦素在四组患者的胃窦部表达无差别( $P > 0.05$ )。TGF- $\alpha$ 在*H pylori*<sup>+</sup>胃炎患者胃窦部的表达较*H pylori*<sup>-</sup>胃炎患者显著增强(53.33% vs 7.69%,  $P < 0.05$ )。胃体部瘦素与TGF- $\alpha$ 的表达呈显著正相关( $r = 0.80$ ,  $P < 0.01$ )。胃窦部二者无相关关系。

**结论:** 胃体部瘦素与TGF- $\alpha$ 在幽门螺杆菌感染慢性胃炎和胃溃疡患者的表达呈显著正相关, 胃窦部二者无相关关系。

**关键词:** 瘦素; 转化生长因子- $\alpha$ ; 幽门螺杆菌; 慢性胃炎; 胃溃疡

李点玲, 张桂英. 瘦素和TGF- $\alpha$ 在幽门螺杆菌感染慢性胃炎和胃溃疡患者胃黏膜内的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2795-2798  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2795.asp>

### 0 引言

近年来发现瘦素及其受体存在于人和鼠的胃黏膜, 研究

表明<sup>[1]</sup>胃源性瘦素主要由主细胞和壁细胞分泌,而瘦素受体分布于整个胃黏膜,瘦素通过自分泌和旁分泌的方式与其特异的受体结合后发挥生理作用<sup>[2]</sup>。目前胃源性瘦素的作用尚不清楚。动物实验表明瘦素可调节胃的饱食感和肠道营养物质的吸收<sup>[3]</sup>,对各种有害因子所致胃黏膜的损伤有保护作用<sup>[4-6]</sup>。*H pylori*作为一种胃黏膜生物损伤因子,与瘦素有密切的联系。我们的目的为检测瘦素、TGF- $\alpha$ 在*H pylori*相关胃炎和胃溃疡患者胃黏膜内的表达,并探讨瘦素和TGF- $\alpha$ 在*H pylori*相关胃炎和胃溃疡发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病例选择及取材 入选标准: (1)年龄为18-70岁; (2)体重指数在18-35 kg/m<sup>2</sup>之间。排除标准: (1)糖尿病及空腹血糖异常者(>7.0 mmol/L); (2)胃癌患者或不能排除恶变者; (3)胃溃疡患者有严重并发症如幽门梗阻、活动性出血等; (4)合并其他严重疾病,如明显心、肺、肝、肾功能不全者; (5)有胃、十二指肠手术史者。经上述标准选择胃镜下诊断为慢性胃炎或胃黏膜大致正常的患者28例,自胃体大弯侧中段和距幽门3 cm内的胃窦小弯侧各取两块胃黏膜组织;胃镜下诊断为胃窦溃疡(活动期)患者33例,自溃疡病灶边缘和胃体大弯侧中段各取2块黏膜组织,以上用于瘦素和TGF- $\alpha$ 的免疫组化和HE染色。所有患者在距幽门3 cm内的胃窦小弯侧和胃体大弯侧各取一块黏膜组织用于快速尿素酶试验。

1.1.2 免疫组化的主要试剂 TGF- $\alpha$ 多克隆抗体的浓缩液及SP试剂盒,购自北京中山生物工程有限公司;瘦素多克隆抗体的浓缩液,购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.2 方法 活检胃黏膜组织用40 g/L中性甲醛溶液固定24 h,石蜡包埋,行4  $\mu$ m连续切片,采用SP法作免疫组化染色。其中瘦素一抗工作浓度为1:50, TGF- $\alpha$ 为1:25。阴性对照:以PBS代替一抗;阳性对照瘦素为脂肪组织, TGF- $\alpha$ 为胰腺癌组织。*H pylori*感染的诊断:所有病例均行快速尿素酶试验和HE染色,2种阳性者定为*H pylori*<sup>+</sup>,2种阴性者定为*H pylori*<sup>-</sup>。结果判断:参照文献[7]采用综合评分法,根据细胞着色深度及阳性细胞数分别记分为0-3分,着色程度以多数细胞着色程度为准。凡细胞质或腺腔内黏液浅棕色者为1分、棕色者为2分、深棕色者为3分、不着色为0分;整块切片中阳性细胞占有胃黏膜细胞的比例<30%为1分、30-70%为2分、>70%为3分、无细胞着色为0分。根据上述两项指标的积分为4级,0分为阴性(-)、2-3分为弱阳性(+)、4分为阳性(++)、5-6分为强阳性(+++)、4分以上为过表达。

**统计学处理** 我们采用计数资料,应用SPSS 11.0统计软件进行 $\chi^2$ 检验、秩和检验及Spearman等级相关分析。

## 2 结果

2.1 患者一般情况 61例*H pylori*<sup>+</sup>与*H pylori*<sup>-</sup>慢性胃炎和胃

表1 *H pylori*<sup>+</sup>、*H pylori*<sup>-</sup>的胃炎和胃溃疡患者的年龄、体重指数

组别	n		年龄 (a)		体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )	
	<i>H pylori</i> <sup>+</sup>	<i>H pylori</i> <sup>-</sup>	<i>H pylori</i> <sup>+</sup>	<i>H pylori</i> <sup>-</sup>	<i>H pylori</i> <sup>+</sup>	<i>H pylori</i> <sup>-</sup>
胃炎	15	13	45.33	45.77	22.04	22.74
胃溃疡	17	16	45.65	40.13	21.64	22.49
合计	32	29	45.53	42.62	21.83	22.60

表2 瘦素在四组患者胃黏膜上皮细胞表达的比较

组别	n	胃窦				胃体				阳性率 (%)		过表达率 (%)	
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	胃窦	胃体	胃窦	胃体
<i>H pylori</i> <sup>+</sup> 胃炎组	15	12	2	1	0	0	4	6	5	20.00	100.00 <sup>a</sup>	6.67	73.33 <sup>ab</sup>
<i>H pylori</i> <sup>-</sup> 胃炎组	13	10	2	1	0	1	9	3	0	23.08	92.31	7.69	23.08
<i>H pylori</i> <sup>+</sup> 溃疡组	17	12	3	1	1	0	5	6	6	29.41	100.00	11.76	70.59 <sup>c</sup>
<i>H pylori</i> <sup>-</sup> 溃疡组	16	13	1	2	0	2	10	3	1	18.75	87.50	12.50	25.00

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs *H pylori*<sup>-</sup>胃炎组; <sup>b</sup>*P*<0.05 vs *H pylori*<sup>-</sup>胃溃疡组; <sup>c</sup>*P*<0.01 vs 胃窦例数和。

溃疡患者纳入实验对象。患者的年龄和体重指数如表1所示。四组比较差异无显著性(年龄 $P=0.63$ , 体重指数 $P=0.66$ )。

2.2 瘦素和TGF- $\alpha$ 在胃黏膜上皮细胞的表达和分布 瘦素和TGF- $\alpha$ 的阳性细胞表达为细胞质内棕黄色颗粒。瘦素在正常人的胃体上皮腺体呈弱阳性表达,主要位于胃体的腺体细胞。TGF- $\alpha$ 在正常人胃体、胃窦上皮腺体都有弱阳性表达,表达部位主要在胃腺颈部、基底部。

2.3 瘦素和TGF- $\alpha$ 在慢性胃炎和胃溃疡患者胃黏膜上皮细胞表达 瘦素在*H pylori*<sup>+</sup>胃炎、*H pylori*<sup>-</sup>胃炎、*H pylori*<sup>+</sup>胃溃疡、*H pylori*<sup>-</sup>胃溃疡患者胃窦腺上皮的阳性( $P=0.89$ )和强阳性( $P=0.93$ )表达率比较差异无显著性;胃体腺上皮四组阳性表达率,*H pylori*<sup>+</sup>较*H pylori*<sup>-</sup>有增高的趋势,但四组比较差异无显著性( $P=0.28$ ),胃体腺上皮在*H pylori*<sup>+</sup>组强阳性表达率高于*H pylori*<sup>-</sup>组( $0.01<P<0.05$ );瘦素在胃体腺上皮的阳性和强阳性例数和的表达率均显著高于胃窦部( $P<0.01$ )(表2)。

TGF- $\alpha$ 在四组的胃窦腺上皮的阳性率,*H pylori*<sup>+</sup>胃炎和胃溃疡组分别较*H pylori*<sup>-</sup>组有增高趋势,但四组比较差异无显著性( $P=0.59$ );四组的胃体腺上皮的阳性表达率也无显著性差异( $P=0.28$ );四组胃窦腺上皮的强阳性率,*H pylori*<sup>+</sup>胃炎、*H pylori*<sup>+</sup>胃溃疡、*H pylori*<sup>-</sup>胃溃疡组显著高于*H pylori*<sup>-</sup>胃炎组( $P<0.05$ ),*H pylori*<sup>+</sup>和*H pylori*<sup>-</sup>胃溃疡两组比较差异无显著性( $P>0.05$ );四组胃体腺上皮强阳性表达率,*H pylori*<sup>+</sup>胃炎和胃溃疡组分别显著高于*H pylori*<sup>-</sup>组( $P<0.05$ );TGF- $\alpha$ 在胃体( $P=0.36$ )和胃窦( $P=0.28$ )例数和的阳性和强阳性表达率无显著差别(表3)。

2.4 运用Spearman法进行等级相关性分析 胃体腺上皮瘦素与TGF- $\alpha$ 二者的表达平行且呈正相关( $P<0.01$ ,  $r=0.79$ );胃窦腺上皮二者无相关关系( $P=0.28$ ,  $r=0.14$ )。

## 3 讨论

*H pylori*感染胃黏膜后可诱导局部一系列细胞因子表达,



表3 TGF- $\alpha$ 在四组患者胃黏膜上皮细胞表达的比较

组别	n	胃窦				胃体				阳性率 (%)		过表达率 (%)	
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	胃窦	胃体	胃窦	胃体
<i>H. pylori</i> <sup>+</sup> 胃炎组	15	2	5	3	5	1	3	6	5	86.67	93.33	53.33 <sup>a</sup>	73.33 <sup>a</sup>
<i>H. pylori</i> <sup>-</sup> 胃炎组	13	3	9	1	0	2	9	2	0	76.92	84.62	7.69	15.38
<i>H. pylori</i> <sup>+</sup> 溃疡组	17	1	6	5	5	0	4	7	6	94.12	100.00	58.82	76.47 <sup>c</sup>
<i>H. pylori</i> <sup>-</sup> 溃疡组	16	2	6	3	5	2	10	3	1	87.50	87.50	50.00	25.00

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs *H. pylori*<sup>-</sup>胃炎组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs *H. pylori*<sup>-</sup>胃溃疡组。

这些细胞因子构成一个复杂的炎症免疫调节网络,在*H. pylori*相关胃炎和胃溃疡的发病机制中发挥重要作用。瘦素作为一种新的细胞因子和胃肠激素,参与胃肠的炎症免疫反应,研究表明,瘦素在*H. pylori*感染相关疾病中起一定的作用,但作用机制及与其他细胞因子的相互作用还不明确。而TGF- $\alpha$ 是一种胃黏膜保护细胞因子,在*H. pylori*感染所致黏膜损伤和溃疡愈合过程中起重要作用。明确瘦素和TGF- $\alpha$ 在*H. pylori*相关胃炎和胃溃疡患者胃黏膜内的表达,对了解*H. pylori*的致病机制和胃源性瘦素的作用有重要意义。

本研究结果表明,瘦素在正常人的胃黏膜上皮呈弱阳性表达,位于胃体的腺体细胞,而在胃窦腺上皮细胞无阳性表达,与文献报道用免疫组化法检测的结果一致<sup>[6,8]</sup>。有研究<sup>[1]</sup>表明胃源性瘦素主要存在于胃黏膜的主细胞和壁细胞,少量存在于胃腺基底部的内分泌细胞。由于胃窦幽门腺只含少量壁细胞,而无主细胞分布,故瘦素在胃窦可能有少量分泌,但因含量较低而用免疫组织化学法不能检测到。若改用灵敏度高的其他方法,如用RT-PCR和Western印迹法,在人的胃窦黏膜上皮细胞则可检测到瘦素的mRNA和蛋白<sup>[1]</sup>。

*H. pylori*是导致慢性活动性胃炎的病原菌,可诱导免疫细胞包括中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞在黏膜局部浸润。我们的研究显示*H. pylori*<sup>+</sup>胃炎患者胃体上皮细胞瘦素表达水平较*H. pylori*<sup>-</sup>患者明显增强,其机制可能是*H. pylori*感染诱导的免疫细胞在胃黏膜局部产生和释放的炎性细胞因子可刺激胃黏膜上皮细胞从血中摄取瘦素,使炎症局部的上皮细胞分泌瘦素增多<sup>[2]</sup>,从而使瘦素在胃黏膜局部的表达增强。国外研究表明胃源性瘦素对胃黏膜的损伤有保护作用<sup>[4,9]</sup>,并有诱导胃黏膜细胞增殖而维持黏膜完整性的作用<sup>[10]</sup>,而*H. pylori*感染时瘦素高表达,推测胃源性瘦素可能参与了*H. pylori*感染所致黏膜损伤的修复和炎症愈合过程。

本研究提示瘦素在胃窦溃疡边缘组织与慢性胃炎胃窦部的表达无显著差别,而Konturek *et al*<sup>[11]</sup>应用动物模型研究发现胃底溃疡边缘组织的瘦素mRNA和蛋白表达水平显著增高,二者的研究结果不相符。这种差异可能与瘦素在胃黏膜组织的定位表达和实验方法有关。我们所选患者均为胃窦溃疡, Konturek *et al*<sup>[11]</sup>则选用胃底溃疡,研究<sup>[2,12]</sup>表明瘦素的免疫组化阳性细胞位于胃底和胃体的

胃底腺,而在胃窦幽门腺极少或不分布;另外我们采用免疫组化检测瘦素的含量变化,而Konturek *et al*<sup>[11]</sup>则用灵敏度高的RT-PCR和Western印迹法。有人推测胃源性瘦素对化学物质诱导的胃溃疡有促进其愈合作用<sup>[11]</sup>。人类胃溃疡的形成机制与动物模型的不同,且瘦素在胃黏膜的主要表达部位与胃溃疡好发部位不同,胃源性瘦素在人类胃溃疡发病中是否起作用有待进一步研究。

TGF- $\alpha$ 可在正常胃黏膜表达,说明在正常情况下TGF- $\alpha$ 对维持胃黏膜上皮的代谢和胃黏膜结构完整性起作用。国内外研究<sup>[11,13]</sup>及本研究都显示TGF- $\alpha$ 在*H. pylori*<sup>+</sup>胃炎患者胃黏膜上皮细胞的表达显著高于*H. pylori*<sup>-</sup>胃炎者,其机制可能是*H. pylori*感染引起胃黏膜的炎症反应,刺激淋巴细胞释放淋巴因子,诱导TGF- $\alpha$ 等肽类生长因子表达,参与炎症愈合过程并促进黏膜再生修复。

消化性溃疡的愈合是一个非常复杂的过程,包括上皮细胞的更新和凋亡、胃腺体的修复、血管生成和肉芽组织的形成。本研究结果显示胃溃疡患者溃疡边缘组织TGF- $\alpha$ 的表达较*H. pylori*<sup>-</sup>慢性胃炎显著增强,与国内外<sup>[11,14]</sup>的研究结果一致。TGF- $\alpha$ 的高表达可以促进多种细胞有丝分裂,促使溃疡边缘增生、分化的表皮细胞迁移至肉芽组织覆盖溃疡面,并伸入肉芽组织内重建溃疡瘢痕中的胃黏膜腺体,从而有利于溃疡的愈合<sup>[15]</sup>。

瘦素和细胞因子的相互调控关系,在不同疾病都有研究报道,但由于实验条件等各种因素的影响,瘦素与细胞因子的关系尚未达成共识。已有研究表明瘦素与TGF- $\alpha$ 在发病过程中具有相互协调作用<sup>[11]</sup>。本研究结果显示在*H. pylori*感染相关疾病中胃体上皮细胞的瘦素与TGF- $\alpha$ 蛋白表达水平呈显著正相关。但胃窦部二者的表达水平无相关关系,其原因可能与瘦素在胃黏膜的阳性表达部位和实验方法的敏感性有关。在*H. pylori*感染相关疾病中,胃黏膜分泌的瘦素与TGF- $\alpha$ 的相互作用有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- Cinti S, Matteis RD, Pico C, Ceresi E, Obrador A, Maffei C, Oliver J, Palou A. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 789-793
- Breider M, Miehke S, Glasow A, Orban Z, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E, Nettesheim O, Halm U, Haidan A, Bornstein SR. Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 954-961
- Marti A, Berraondo B, Martinez JA. Leptin: physiological actions. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 43-49
- Erkasap N, Uzuner K, Serteser M, Koken T, Aydin Y. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides* 2003; 24: 1181-1187
- Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Meixner H, Hahn EG, Konturek SJ. Enhanced expression of leptin following acute gastric injury in rat. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 587-595
- Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Jaworek J, Hahn EG. Role of leptin in the stomach and the pancreas. *J Physiol Paris* 2001; 95: 345-354
- 郭冬丽, 宁佩芳, 王兰, 袁媛. 胃癌及癌前状态MG7表达的动态观



- 察及分析. 中华流行病学杂志 2003; 6: 494-497
- 8 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
- 9 Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Kwiecien S, Ptak A, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Pawlik M, Konturek SJ, Hahn EG. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 583-602
- 10 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
- 11 Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Brzozowska I, Duda A, Meixner H, Hahn EG, Konturek SJ. Role of leptin in ulcer healing. *Eur J Pharmacol* 2001; 414: 87-97
- 12 Azuma T, Suto H, Ito Y, Ohtani M, Dojo M, Kuriyama M, Kato T. Gastric leptin and *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2001; 49: 324-329
- 13 任彦, 葛振华, 武一曼, 柯晓, 周凡, 王若愚. 幽门螺旋杆菌感染的慢性胃炎胃窦黏膜内NF- $\kappa$ B和TGF- $\alpha$ 表达及其意义. 中国组织化学与细胞化学杂志 2003; 2: 295-301
- 14 刘建平, 卜涛, 白建乐, 侯仙明, 李志更, 韩燕, 宗全和, 陈志强, 牛兵占. EGF、TGF- $\alpha$ 及EGFR在大鼠胃溃疡自愈过程中的表达及意义. 中国药理学通报 2003; 19: 1185-1188
- 15 Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y, Lee JD. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 8631-8634

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知

**本刊讯** 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

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

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

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

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

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。(世界胃肠病学杂志社 2005-09-15)

# 时间分辨荧光免疫法与电化学发光法检测结直肠肿瘤标志 CEA 的比较

张青云, 孙 丽, 张书耕, 王 琼

张青云, 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院检验科 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室 北京市 100036

孙丽, 锦州医学院生化教研室 辽宁省锦州市 121001

张书耕, 王琼, 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院检验科 北京市 100036

通讯作者: 张青云, 100036, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院检验科, 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室. qingyuzhang@btamail.net.cn

电话: 010-88115736

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-11-12

## Comparison between time-resolved fluorescence immunoassay and electro-chemiluminescence immunoassay for detection of serum carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma

Qing-Yun Zhang, Li Sun, Shu-Geng Zhang, Qiong Wang

Qing-Yun Zhang, Department of Medical Laboratory, Beijing Cancer Hospital, the School of Oncology, Pekjing University; Department of Immunology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China

Li Sun, Department of Biochemistry, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Shu-Geng Zhang, Qiong Wang, Department of Medical Laboratory, Beijing Cancer Hospital, the School of Oncology, Pekjing University, Beijing 100036, China

Correspondence to: Dr. Qing-Yun Zhang, Department of Medical Laboratory, Beijing Cancer Hospital, the School of Oncology, Pekjing University; Department of Immunology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China. qingyuzhang@btamail.net.cn

Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-11-12

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effect of time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) and electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA) for detecting the serum level of carcinoembryonic antigen (CEA) and their influence on the positive rate of serum CEA in patients with colorectal carcinoma.

**METHODS:** Serum CEA levels were detected with both TRFIA and ECLIA in 90 samples from patients with colorectal carcinoma ( $n = 30$ ), non-colorectal carcinoma ( $n = 30$ ), and the healthy controls ( $n = 30$ ). The data were analyzed with statistical software SPSS.

**RESULTS:** The level of CEA was significantly higher in the colorectal cancer group (TRFIA:  $44.12 \pm 95.27$   $\mu\text{g/L}$ , ECLIA:  $35.96 \pm 71.83$   $\mu\text{g/L}$ ) than that in the healthy

control group (TRFIA:  $1.04 \pm 0.55$   $\mu\text{g/L}$ , ECLIA:  $0.71 \pm 0.48$   $\mu\text{g/L}$ ) ( $P < 0.01$ ). The sensitivities of TRFIA and ECLIA were 60.0% and 66.7%; the specificities were 98.3% and 100%; the accuracies were 85.6% and 88.9%; the positive predictive rates were 94.7% and 95.2%; and the negative predictive rates were 83.1% and 85.7%, respectively. The results of ECLIA were better than those of the TRFIA, and they were well correlated ( $r = 0.9738$ ). There was no significant difference between the two methods ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** There is a good correlation between TRFIA and ECLIA for detection of the serum CEA level. They have high sensitivities and good stabilities, and are suitable for clinical detection of serum CEA.

**Key Words:** Time-resolved fluorescence immunoassay; Electro-chemiluminescence immunoassay; Carcinoembryonic antigen; Colorectal carcinoma

Zhang QY, Sun L, Zhang SG, Wang Q. Comparison between time-resolved fluorescence immunoassay and electro-chemiluminescence immunoassay for detection of serum carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2799-2802

## 摘要

**目的:** 对时间分辨荧光免疫法(TRFIA)与电化学发光免疫法(ECLIA)检测血清癌胚抗原CEA作比较分析, 了解两种方法的特点及这两种方法对结直肠癌检出率的影响。

**方法:** 分别采用TRFIA法及ECLIA法检测正常人、结直肠癌、非结直肠癌患者组共90例, 每组各30例临床送检标本血清CEA含量, 应用SPSS(Chicago, USA)软件进行统计学比较和分析。

**结果:** 结直肠癌组CEA值(TRFIA法:  $44.12 \pm 95.27$   $\mu\text{g/L}$ , ECLIA法:  $35.96 \pm 71.83$   $\mu\text{g/L}$ )明显高于正常组(TRFIA法:  $1.04 \pm 0.55$   $\mu\text{g/L}$ , ECLIA法:  $0.71 \pm 0.48$   $\mu\text{g/L}$ ) ( $P < 0.01$ )。TRFIA和ECLIA的灵敏度分别为60.0%、66.7%, 特异性98.3%、100%, 准确性85.6%、88.9%, 阳性预测值94.7%、95.2%及阴性预测值83.1%、85.7%。两种方法检测的灵敏度、特异性、准确性、阳性预测值及阴性预测值略有不同, 后者优于前者, 但两者无显著差异( $P > 0.05$ ), 相关性好( $r = 0.9738$ )。

**结论:** TRFIA法和ECLIA法具有良好的相关性, 并且具有灵

敏度高和稳定性好等优点,可应用于临床血清CEA检测。

**关键词:** 时间分辨荧光免疫分析; 电化学发光免疫分析; 癌胚抗原; 结直肠癌

张青云, 孙丽, 张书耕, 王琼. 时间分辨荧光免疫法与电化学发光法检测结直肠肿瘤标志CEA的比较. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2799-2802

http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2799.asp

## 0 引言

癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA)广泛分布于胚胎多种器官组织,出生后血内含量很低.他可在多种恶性肿瘤如结直肠癌、胰腺癌、胃癌、肺癌、宫颈癌等表达,其中结直肠癌阳性率最高.临床上CEA主要用于结直肠癌的诊断、判断肿瘤分期和病变程度、监测治疗和预报复发等<sup>[1-7]</sup>,因而通过检测血液中癌胚抗原的含量,对动态监测跟踪结直肠癌的病情变化和观察治疗效果有重要的临床价值.临床实验室用于检测CEA的方法主要有放射免疫分析(RIA)、酶联免疫分析(ELISA)、化学发光免疫分析(CLIA)等检测方法.近年来发展起来的时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)和电化学发光免疫分析(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)测量技术,具有灵敏度高、稳定性好和无放射性污染等优点<sup>[8-14]</sup>,超过了上述传统的检测方法.而检测方法的改进是提高血清学诊断阳性率的重要途径.因此我们采用TRFIA法与ECLIA法对比分析了临床送检的血清标本CEA的含量,并对检测结果进行了统计分析和比较,旨在进一步了解TRFIA法与ECLIA方法的特点及这两种方法对结直肠癌检出率的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 正常对照组30例为北京大学临床肿瘤学院体检及辅助检查排除各种恶性疾病的健康人员(男4例,女26例),年龄23-63岁,平均年龄35岁.肿瘤组60例:结直肠癌30例(男12例,女18例),年龄25-86岁,平均年龄60岁;非结直肠癌30例包括淋巴瘤、肝癌和乳腺癌术后(男5例,女25例),年龄30-74岁,平均年龄55岁,均为北京大学临床肿瘤学院门诊和住院患者,肿瘤手术后标本均经病理证实。

**1.2 方法** 空腹取血2 mL经4 000 r/min离心10 min,取血清备用.时间分辨荧光分析系统泰莱-I及其配套试剂由广州丰华公司提供,全自动电化学发光免疫分析系统Elecsys 2010及配套试剂由罗氏公司提供. TRFIA操作方法:试剂及微孔反应板室温平衡.将微孔反应板安装到支架上,揭去密封胶带,洗板2次,并在干净的吸水纸上拍干.向微孔中加入标准品(Std)及样品(Unk)25  $\mu$ L/孔.再依次加入分析缓冲液200  $\mu$ L/孔,为避免污染应弃掉第一管.加样时滴头应在微孔中部的上方,避免与小孔边缘或其中的试剂接触.微孔反应板置室温震荡温育3 h.取下反应板,用洗板机洗板6次(洗液加入量调节在能充满整个微

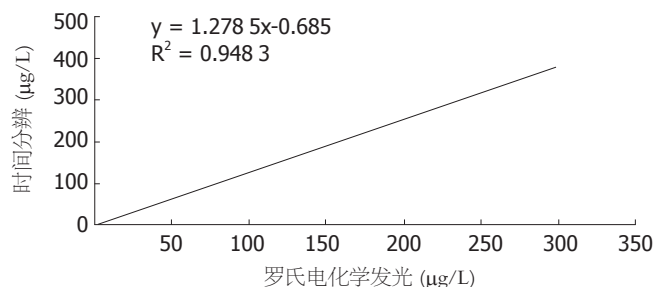


图1 CEA TRFIA和CEA ECLIA的相关关系。

表1 TRFIA和ECLIA对正常组、非结直肠癌组和结直肠癌组CEA的测定值

组别	n	CEA TRFIA			CEA ECLIA		
		$\mu$ g/L	阳性例	阳性率 (%)	$\mu$ g/L	阳性例	阳性率 (%)
正常组	30	1.04 $\pm$ 0.55	0	0	0.71 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	0	0
非结直肠癌组	30	1.65 $\pm$ 1.19	1	3.33	1.55 $\pm$ 1.04	0	0
结直肠癌组	30	44.1 $\pm$ 95.27 <sup>b</sup>	18	60.0	35.9 $\pm$ 71.83 <sup>b</sup>	20	66.7

<sup>b</sup>P<0.01 vs 正常组CEA TRFIA.

表2 TRFIA和ECLIA检测CEA对直肠癌诊断的评价 (%)

方法	灵敏度	特异性	准确性	阳性预测值	阴性预测值
CEA TRFIA	60.0	98.3	85.6	94.7	83.1
CEA ECLIA	66.7	100	88.9	95.2	85.7

孔,并防止溢出),并于干净的吸水纸上将微孔内残留的液体拍干,然后加入钨标记物工作液200  $\mu$ L/孔,室温震荡温育1 h,洗板6次,拍干后加入增强液200  $\mu$ L/孔(加入过程中避免碰到小孔边缘或其底部,以免产生污染).最后微孔反应板室温震荡5 min测定结果,数据分析由其自带的LOG-LOG\_B函数处理. ECLIA操作方法:加样10  $\mu$ L,其余操作由电化学发光免疫分析仪Elecsys 2010自动完成,两点定标.参考数值:95%健康人CEA $\leq$ 5.0  $\mu$ g/L.

**统计学处理** SPSS 11.0(Chicago, USA)统计软件,各组计量数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,敏感性、特异性、准确性、阳性预测值及阴性预测值比较用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

**2.1 CEA检测结果** 结直肠癌组CEA值(TRFIA法44.12  $\pm$  95.27  $\mu$ g/L, ECLIA法35.96  $\pm$  71.83  $\mu$ g/L)明显高于正常组(TRFIA法1.04  $\pm$  0.55  $\mu$ g/L, ECLIA法0.71  $\pm$  0.48  $\mu$ g/L),有显著性差异(P<0.01).以TRFIA和ECLIA的CEA $\leq$ 5.0  $\mu$ g/L为参考范围,分析非结直肠癌组和结直肠癌组,两种方法无显著差异(P>0.05).30例正常人TRFIA和ECLIA的CEA值分别为1.04  $\pm$  0.55  $\mu$ g/L和0.71  $\pm$  0.48  $\mu$ g/L,两者有显著差异(t=3.927, P=0.000<0.01)(表1).

**2.2 相关性分析** 90份受检者血清样品同时用两种方法测得CEA结果的相关性分析表明,其直线回归方程为y=1.278 5x-0.685, r=0.973 8, P<0.01.两者呈显著正相关(图1).

**2.3 比较CEA TRFIA和CEA ECLIA的灵敏度、特异性及准确性、阳性预测值及阴性预测值(表2).**



### 3 讨论

CEA是一种结构复杂的可溶性糖蛋白,分子量约为200 ku,是从结肠癌和胎儿肠中提取的一种肿瘤相关抗原,由内胚层细胞分化而来,在细胞质中形成,越过细胞膜进入体液,故可在多种体液中检测出。肝脏是其分解代谢的场所,血中半衰期为2 d,是消化系统恶性肿瘤诊断的可靠指标<sup>[15]</sup>,尤其是对结直肠癌的诊断意义最大,胃癌次之。人血清中CEA浓度的体外测定,对结直肠癌等恶性肿瘤的临床诊断、疗效监测及预后评估具有重要意义<sup>[16-20]</sup>。

以往对血液中肿瘤标记物CEA的检测主要依赖于放射免疫法和ELISA法,前者由于有放射性污染,对操作人员有危害,且不利于环境保护。ELISA法影响因素多,每次测定必须做标准曲线,否则结果不稳定,不适合单份标本的检测。近来发展的时间分辨荧光免疫法和电化学发光免疫法均是快速、简便、无污染的检测技术。我们运用这两种技术对30例结直肠患者、30例非结直肠患者及30例健康体检人员进行CEA检测及比较,结果显示,结直肠癌组CEA值(TRFIA法 $44.12 \pm 95.27$   $\mu\text{g/L}$ , ECLIA法 $35.96 \pm 71.83$   $\mu\text{g/L}$ )明显高于正常组(TRFIA法 $1.04 \pm 0.55$   $\mu\text{g/L}$ , ECLIA法 $0.71 \pm 0.48$   $\mu\text{g/L}$ ),有显著性差异( $P < 0.01$ )。本实验CEA TRFIA敏感性60.0%、特异性98.3%及阳性预测值94.7%,与Fernandes *et al*<sup>[21]</sup>应用该方法测得结直肠CEA结果相近似,分别为56%、95%、94%。而CEA ECLIA的阳性检出率66.7%,也与国内外文献<sup>[22,23]</sup>报道的阳性率为66.7%及68%基本相同。

TRFIA是一种新型的超微量检测技术。其基本原理是以三价稀土离子及其螯合物作为示踪剂标记抗体,当与相应的抗原结合时,抗原抗体复合物在增强液中解离,并在特定激发光激发下发出特定波长的荧光,利用时间分辨荧光免疫测定仪测定复合物中的稀土离子发射的荧光强度,从而确定待测抗原的量<sup>[24,25]</sup>。该方法具有信噪比高、重复性好,不受样品的自然荧光干扰等特点<sup>[26-28]</sup>。而ECLIA则是采用电促化学发光,使用非同位素金属三联吡啶钌作为标记物,由电极发光,在三丙胺的参与下发生的化学反应,并以顺磁性微粒为固相载体,从而大大提高了灵敏度,增加了线性范围<sup>[29-31]</sup>。目前关于这两种方法对比报道还较少,本实验中CEA TRFIA和CEA ECLIA的灵敏度分别为60.0%、66.7%,特异性98.3%、100%,准确性85.6%、88.9%,阳性预测值94.7%、95.2%及阴性预测值83.1%、85.7%。两种方法检测的灵敏度、特异性及准确性等略有不同,后者优于前者,但两者无显著差异( $P > 0.05$ ),相关性好,  $R = 0.9738$ 。说明TRFIA和ECLIA这两种方法均适于临床CEA检测。

另外本实验中CEA ECLIA正常值明显低于CEA TRFIA,两者有显著差异( $P < 0.01$ )。表明前者可能对低值的检测敏感性更高。而在灵敏度、特异性、准确性等检测指标,CEA ECLIA也优于CEA TRFIA。原因可能:(1)电化学发光免疫分析系统Elecsys 2010是全自动操作,可保

证各次实验条件一致;而时间分辨荧光分析系统泰莱-I则需多步手工操作,如加样、洗涤、温育、制作标准曲线等,人为误差较大。(2)时间分辨荧光免疫分析法CEA测定试剂盒是新研制出的国产试剂盒,与罗氏电化学发光CEA试剂盒可能存在一定差异。我们的综合实验结果说明TRFIA法和ECLIA法均能充分满足临床和科研试验的需求,尤其适用于临床常规和急诊检测,具有很好的应用前景。

### 4 参考文献

- Engaras B, Kewenter J, Nilsson O, Wedel H, Hafstrom L. CEA, CA 50 and CA 242 in patients surviving colorectal cancer without recurrent disease. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 43-48
- Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in colorectal cancer: Taiwan experience. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30: 12-16
- Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23: 338-351
- Schiemann U, Gunther S, Gross M, Henke G, Muller-Koch Y, Konig A, Muders M, Folwaczny C, Mussack T, Holinski-Feder E. Preoperative serum levels of the carcinoembryonic antigen in hereditary non-polyposis colorectal cancer compared to levels in sporadic colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 356-360
- Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C. CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumour Biol* 2004; 25: 228-234
- Marchena J, Acosta MA, Garcia-Anguiano F, Simpson H, Cruz F. Use of the preoperative levels of CEA in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1017-1020
- Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, Ezumi K, Kato H, Kawasaki T, Furukawa H, Kawakami H. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004; 207: 109-115
- 黄飏, 肖华龙, 朱利国, 谭成, 蔡刚明, 金坚. CA19-9时间分辨荧光免疫分析方法的建立及应用. *标记免疫分析与临床* 2001; 8: 25-27
- Deaver DR. A new non-isotopic detection system for immunoassays. *Nature* 1995; 377: 758-760
- Yan F, Zhou J, Lin J, Ju H, Hu X. Flow injection immunoassay for carcinoembryonic antigen combined with time-resolved fluorometric detection. *J Immunol Methods* 2005; 305: 120-127
- Yuan AS, Morris ML, Yin KC, Hsieh JY, Matuszewski BK. Development and implementation of an electrochemiluminescence immunoassay for the determination of an angiogenic polypeptide in dog and rat plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33: 719-724
- van Ingen HE, Chan DW, Hubl W, Miyachi H, Molina R, Pitzel L, Ruibal A, Rymer JC, Domke I. Analytical and clinical evaluation of an electrochemiluminescence immunoassay for the determination of CA 125. *Clin Chem* 1998; 44: 2530-2536
- Wu FB, Han SQ, Xu T, He YF. Sensitive time-resolved fluorimetric immunoassay for simultaneous detection of serum thyroid-stimulating hormone and total thyroxine with Eu and Sm as labels. *Anal Biochem* 2003; 314: 87-96
- Fiet J, Giton F, Auzeerie J, Galons H. Development of a new sensitive and specific time-resolved fluorimetric immunoassay (TR-FIA) of chlormadinone acetate in the serum of treated menopausal women. *Steroids* 2002; 67: 1045-1055
- Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002; 48: 1151-1159
- Wiratkapun S, Kraemer M, Seow-Choen F, Ho YH, Eu KW. High preoperative serum carcinoembryonic antigen predicts metastatic recurrence in potentially curative colonic cancer:

- results of a five-year study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 231-235
- 17 Wichmann MW, Muller C, Lau-Werner U, Strauss T, Lang RA, Hornung HM, Stieber P, Schildberg FW. The role of carcinoembryonic antigen for the detection of recurrent disease following curative resection of large-bowel cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 271-275
- 18 Sorbye H, Dahl O. Transient CEA increase at start of oxaliplatin combination therapy for metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol* 2004; 43: 495-498
- 19 Chen CC, Yang SH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Chang SC. Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res* 2005; 124: 169-174
- 20 Park IJ, Kim HC, Yu CS, Yoo JH, Kim JC. Cutoff values of preoperative s-CEA levels for predicting survivals after curative resection of colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 624-627
- 21 Fernandes LC, Kim SB, Matos D. Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging and prognosis of colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 645-648
- 22 Kim SB, Fernandes LC, Saad SS, Matos D. Assessment of the value of preoperative serum levels of CA 242 and CEA in the staging and postoperative survival of colorectal adenocarcinoma patients. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 182-187
- 23 张光彩, 赵玉兰, 尚征书, 孟献贞, 蒋玉敏. 消化道肿瘤患者 CA19-9、CA50、CEA联合检测的结果分析. *放射免疫学杂志* 1997; 10: 266-267
- 24 Gaillard O, Kapel N, Galli J, Delattre J, Meillet D. Time-resolved fluorometry: principles and applications in clinical biology. *Ann Biol Clin* 1994; 52: 751-755
- 25 Rasi S, Suvanto E, Vilpo LM, Vilpo JA. Time-resolved fluorimmunoassay of 5-methyl-2'-deoxycytidine employing europium-labeled antigen as tracer. *J Immunol Methods* 1989; 117: 33-38
- 26 Matsumoto K, Yuan J, Wang G, Kimura H. Simultaneous determination of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum by time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal Biochem* 1999; 276: 81-87
- 27 Ibrahim F, Giton F, Boudou P, Villette JM, Julien R, Galons H, Fiet J. Plasma 11beta-hydroxy-4-androstene-3,17-dione: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a biotinylated tracer with a radioimmunoassay using a tritiated tracer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 84: 563-568
- 28 Allicotti G, Borras E, Pinilla C. A time-resolved fluorescence immunoassay (DELFLIA) increases the sensitivity of antigen-driven cytokine detection. *J Immunoassay Immunochem* 2003; 24: 345-358
- 29 Erler K. Elecsys immunoassay systems using electrochemiluminescence detection. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110: 5-10
- 30 Obenauer-Kutner LJ, Jacobs SJ, Kolz K, Tobias LM, Bordens RW. A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for interferon alfa-2b in human serum. *J Immunol Methods* 1997; 206: 25-33
- 31 Guglielmo-Viret V, Attree O, Blanco-Gros V, Thullier P. Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of Clostridium botulinum type B neurotoxin. *J Immunol Methods* 2005; 301: 164-172

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 我国科技论文总数连续三年世界第五

**本刊讯** 2004年度中国科技论文统计结果于2005-12-06在北京揭晓, 与上一年度相比, 我国科技论文SCI论文数增长15.2%, 论文被引用篇数和次数分别增长4.4%和4.3%。更可喜的是, 在过去十年间, 我国论文被引用数已排在世界第14位, 与上一年同一数据相比, 位次提高了4位。

据介绍, 2004年度《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)共收录我国作者的论文111 356篇, 比上年增加93 352篇, 增长率为19.3%。我国科技论文占世界论文总数的6.3%, 较上年增加1.2%, 连续3年保持在世界第5位, 前4位国家是美国、日本、英国和德国。根据生物医学专家的建议, 今年在统计中新增加了美国《医学索引》(MEDLINE)检索系统, 该系统是当今较权威的生物医学文献检索系统, 我国大陆75种期刊被收录其中。

2004年度我国国内论文最多的学科仍是临床医学, 基础医学名列第六。国内被引用次数最多的学科也是临床医学, 基础医学名列第五。国际被引用论文篇数, 基础医学与临床医学名列第八和第九。由于综合大学并校, 高校论文产出前20位排名榜中已不见了医学院校, 但在MEDLINE收录的高等院校排名中, 仍可看到医学科技论文对综合大学论文排名的贡献。2004年排在SCI收录论文数第一的医疗机构是北京大学第一医院, 解放军总医院在国内论文被引用次数、国内论文数和国际国内论文总数三个统计项目中, 均名列医疗机构第一。

在同时公布的第四届中国百种杰出学术期刊中, 22种医药卫生类期刊榜上有名。[摘自《健康报(记者张荔子)》]

# 纳米细菌的免疫电镜检测

王利民, 沈文律, 周 珍, 张士莲

王利民, 唐山工人医院普通外科 河北省唐山市 063000  
沈文律, 汕头大学医学院附属第二医院 广东省汕头市 515041  
周珍, 华北煤炭医学院 河北省唐山市 063000  
张士莲, 开滦矿务局医院 河北省唐山市 063000  
通讯作者: 王利民, 063000, 河北省唐山市文化路27号, 唐山工人医院普通外科, g\_lmwang@sina.com.cn  
电话: 0315-3722208 传真: 0315-3722104  
收稿日期: 2005-08-06 接受日期: 2005-08-26

## Detection of nanobacteria by immune electronic microscopy

Li-Min Wang, Wen-Lv Shen, Zhen Zhou, Shi-Lian Zhang

Li-Min Wang, Department of General Surgery, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
Wen-Lv Shen, the Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515043, Guangdong Province, China  
Zhen Zhou, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
Shi-Lian Zhang, Hospital of Kailuan Mining Bureau, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
Correspondence to: Li-Min Wang, Department of General Surgery, Tangshan Worker's Hospital, 27 Wenhua Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. g\_lmwang@sina.com.cn  
Received: 2005-08-06 Accepted: 2005-08-26

## Abstract

**AIM:** To introduce an effective method of immunogold electron microscopy for the detection of nanobacteria.

**METHODS:** Nanobacteria were fixed in the 25 g/L glutaraldehyde, and then were embedded in resin. After they were cut into ultrathin slices by diamond knife, an indirect immunogold electronic microscopy staining was performed on the nanobacteria using the specific antibody of nanobacteria.

**RESULTS:** The nanobacteria were ball- or stick-like with a length of 80-350 nm under electron microscope. Nanobacteria were combined with the specific antibody. The adhesion of the immune colloidal gold granule was observed under the electronic microscopy.

**CONCLUSION:** The immune electronic microscopy can not only reveal the ultrastructure of nanobacteria, but also indicate its special antigenicity.

**Key Words:** Nanobacteria; Immune electron microscopy; Bacterial biofilm

Wang LM, Shen WL, Zhou Z, Zhang SL. Detection of nanobacteria

by immune electron microscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23):2803-2805

## 摘要

**目的:** 介绍一种有效鉴别纳米细菌的金标记免疫电镜方法。

**方法:** 纳米细菌经25 g/L戊二醛固定、树脂包埋后, 用钻石刀制成超薄切片, 用纳米细菌特异性抗体进行间接金标免疫电镜染色。

**结果:** 纳米细菌经负染后于透射电镜下观察, 呈球形或短棒状颗粒, 大小约为80-350 nm。纳米细菌可以和特异性抗体结合, 在电镜下表现为胶体金颗粒的附着。

**结论:** 采用免疫电镜的方法, 在较好地显示纳米细菌超微结构的同时, 又可以指示其独特的抗原性。

**关键词:** 纳米细菌; 免疫电镜; 细菌被膜

王利民, 沈文律, 周珍, 张士莲. 纳米细菌的免疫电镜检测. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2803-2805  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2803.asp>

## 0 引言

芬兰科学家Kajander *et al*<sup>[1]</sup>进行哺乳动物细胞培养时, 发现纳米细菌(nanobacteria, Nb)是迄今为止在人体内发现的最小的有细胞壁的细菌, 其直径80-500 nm, 呈球状或球杆状, 细胞壁厚, 无荚膜与鞭毛结构, 体积极小, 可通过0.1-0.4 μm的滤菌膜, 普通的细菌学检测方法很难发现。纳米细菌在pH 7.4和生理性钙、磷浓度中能形成羟磷灰石碳酸盐结晶, 产生坚硬的钙化外壳覆盖于菌体周围, 因此在高温、强酸等条件下仍能存活。纳米细菌不能用普通微生物培养基培养, 但在37℃、pH 7.4和50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下的细胞培养基中生长良好。纳米细菌感染, 可以引起肾结石的形成<sup>[2,3]</sup>以及动脉粥样硬化<sup>[4-6]</sup>, 并且与胆结石的发生有密切关系<sup>[7]</sup>, 因此纳米细菌的研究越来越受到医学界的重视。

纳米细菌极其微小, 普通的光学显微镜根本无法对其进行观察, 而高分辨的电子显微镜则能清晰的显示其结构。我们介绍一种检测纳米细菌的免疫电镜方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 透射电子显微镜: JEM 2010型, 日本, 工作电压80 kV; 扫描电子显微镜: KYKY 2800型, 中国; 冷冻



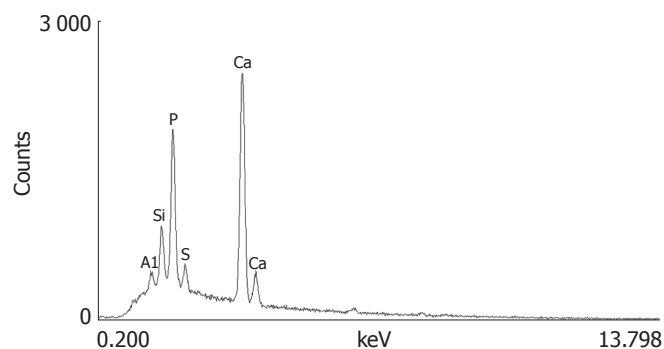


图1 纳米细菌能谱分析(第2代, 第4 wk), 工作电压20 kV.

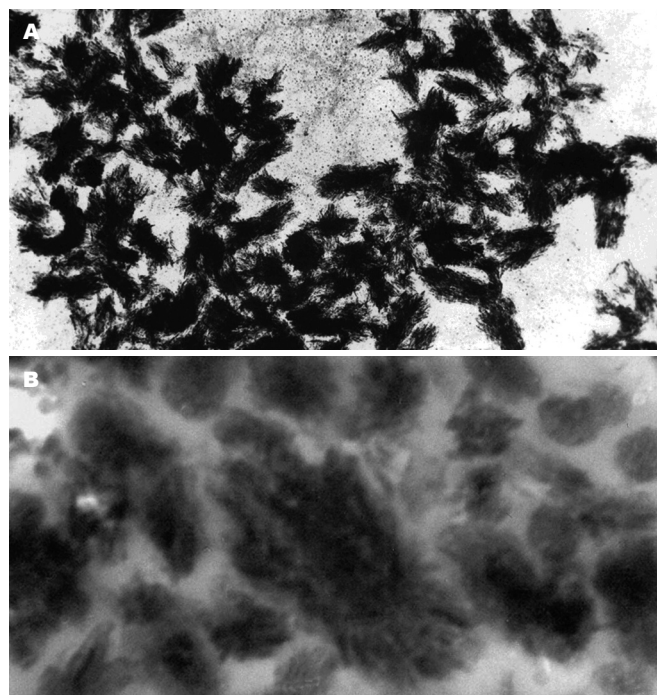


图2 透射电镜下观察纳米细菌. A: 负染( $\times 10\,000$ ); B: 超薄切片( $\times 30\,000$ ).

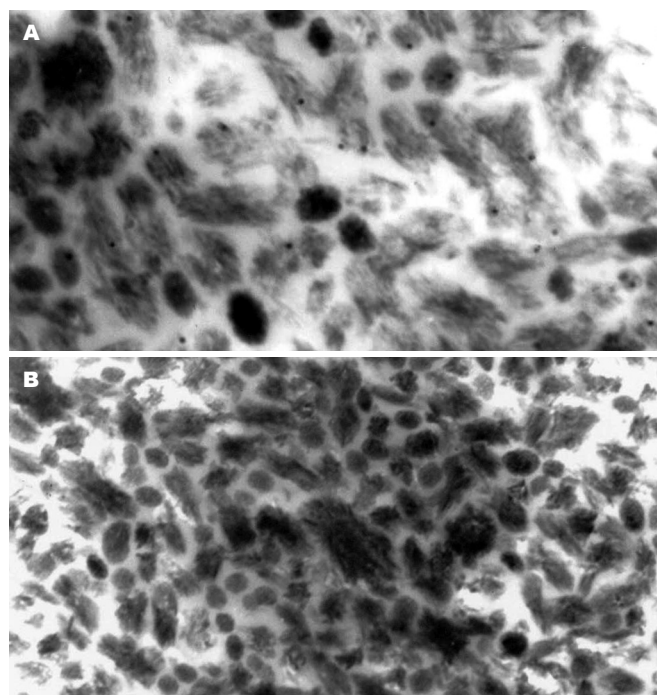


图3 纳米细菌的免疫电镜观察. A: 免疫电镜( $\times 10\,000$ ); B: 阴性对照( $\times 10\,000$ ).

离心机: Hettich UNIVERSAL 16R型, 德国; Mouse anti-nanobacteria mAb 8D10: Nanobac Oy, 芬兰; Colloidal gold-affinipure goat anti-mouse IgG: Jackson Immuno, 美国; 纳米细菌: Nanobac Oy, 芬兰.

**1.2 方法** 纳米细菌在细胞培养条件下培养4 wk, 取出培养瓶, 旋紧瓶口螺纹盖, 置于超声清洗仪器中, 超声处理5 min, 使贴附于培养瓶壁的纳米细菌脱落, 并使聚集成团的纳米细菌分散, 混匀, 吸取2 mL培养液, 12 000 g离心20 min, 弃上清液, PBS洗涤沉淀, 25 mL/L戊二醛4℃固定24 h, 双蒸水洗涤5 min $\times 3$ 次, 12 000 g离心后加入0.5 mL无水乙醇制成混悬液. 在配有VANTAGE DSI型能谱仪的KYKY 2800型扫描电镜上, 对其进行能谱分析, 工作电压20 kV.

上述经戊二醛固定的纳米细菌用双蒸水洗涤5 min $\times 3$ 次, 12 000 g离心后加入0.5 mL双蒸水制成混悬液. 将附有碳支持膜的200目铜网浮于上述悬液的液滴上5 min, 用滤纸小心吸除液体, 再置于10 mL/L磷钨酸悬液的液滴上90 s, 用滤纸小心吸除液体、晾干, 在JEM 2010透射电镜下观察, 工作电压80 kV.

胶体金标记抗体免疫电镜检测采用包埋后染色法, 上述标本离心后弃上清, 沉淀用10 mL/L四氧化锇后固定2 h, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 用钻石刀进行超薄切片, 切片置于200目有膜铜网上, 将铜网浮于100 mL/L FBS滴上, 室温40 min, 一抗(100 mg/L, mouse anti-nanobacteria mAb 8D10, Nanobac Oy)室温孵育60 min后4℃过夜, pH 7.4 PBS洗3 min $\times 3$ 次, pH 8.2 PBS洗5 min, 加1:20稀释的12 nm胶体金标记羊抗小鼠IgG, 室温孵育45 min, 双蒸水洗3 min $\times 3$ 次, 50 mL/L醋酸铀染色5 min, 双蒸水洗3 min $\times 3$ 次, 枸橼酸铅染色5 min, 双蒸水充分洗涤, 干燥后在JEM 100CX透射电镜下观察, PBS替代一抗作为阴性对照.

## 2 结果

能谱分析显示, 纳米细菌含有钙、磷、铝、硅、硫、铜、铁等元素, 其钙磷比值为1.58(图1), 与羟基磷灰石中钙磷比值相似.

纳米细菌经负染后于透射电镜下观察, 呈球形或短棒状颗粒, 大小约为80-350 nm, 聚集成簇状(图2A), 超薄切片显示其表面被覆针样的由羟基磷灰石构成的细菌被膜(biofilm)(图2B).

应用鼠抗纳米细菌的特异性单克隆抗体对其进行免疫学染色, 并用胶体金标记的二抗进行定位显示, 电镜结果显示胆汁中培养所得的纳米颗粒与纳米细菌抗体产生特异性结合(图3A). 而在以PBS代替8D10抗体的阴性对照中, 未观察到胶体金颗粒(图3B).

## 3 讨论

芬兰科学家Kajander发现了能导致细胞培养污染并杀死

培养细胞的纳米细菌. 迄今为止, 纳米细菌是已知能在人类和哺乳动物血液中共存的、最小的、能够进行自我增殖的细菌. 他们的大小以纳米计, 直径由50-500 nm, 因此, 只能在电子显微镜和其他高分辨率显微镜下<sup>[8]</sup>才能观察到他们. 纳米细菌是一种极其微小的细胞内生长的细菌, 当处于不利于生长的环境中时, 能形成一层含钙的磷酸盐外壳, 这层含钙的生物膜同样能使他们在对大多数微生物来说都难以生存的、有害的理化条件中存活下来, 并且能作为结晶的核心促进肾结石的形成. 纳米细菌有着与众不同的特征, 包括: 耐高温、可以通过直径0.1  $\mu\text{m}$ 的滤菌膜、改变外形、形成并且调节自身机能以适应周围各种环境因素的变化<sup>[1,9]</sup>.

尽管大量的研究显示, 在人类和部分哺乳动物体内确实存在着纳米细菌感染<sup>[2,4-7,10-15]</sup>, 但是也有一部分学者对纳米细菌的存在提出了质疑<sup>[16]</sup>. 争论的焦点在于, 纳米细菌体型过于微小, 以至于无法用现有的微生物学理论解释纳米细菌的许多特性, 而以往关于纳米细菌的报道, 大多是以电镜为主的形态学研究. 因此部分学者认为纳米细菌其实并不存在<sup>[17]</sup>. 我们利用免疫电镜的方法, 成功地在显示纳米细菌超微结构的同时, 将其独特的抗原性显示出来, 为进一步研究纳米细菌与人类疾病的关系提供了一种非常有价值的研究方法. 采用这种方法, 能非常容易的将纳米细菌与其他纳米级无机物鉴别开来. 我们期待着能有更多的学者研究纳米细菌感染对人类健康的影响.

#### 4 参考文献

- 1 Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8274-8279
- 2 Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 1999; 56: 1893-1898
- 3 Garcia Cuerpo E, Olavi Kajander E, Ciftcioglu N, Lovaco Castellano F, Correa C, Gonzalez J, Mampaso F, Liano F, Garcia de Gabiola E, Escudero Barrilero A. Nanobacteria. An experimental neo-lithogenesis model. *Arch Esp Urol* 2000; 53: 291-303
- 4 Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology* 2004; 11: 95-101
- 5 Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, Yagubyan M, Rodgers JC, Cockerill FR 3rd, Folk RL, Rzewuska-Lech E, Kumar V, Farell-Baril G, Lieske JC. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1115-H1124
- 6 Sommer AP, Oron U, Pretorius AM, McKay DS, Ciftcioglu N, Mester AR, Kajander EO, Whelan HT. A preliminary investigation into light-modulated replication of nanobacteria and heart disease. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 231-235
- 7 Wang XJ, Liu W, Yang ZL, Wei H, Wen Y, Li YG. The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2004; 25: 492-494
- 8 Kempe A, Schopf JW, Altermann W, Kudryavtsev AB, Heckl WM. Atomic force microscopy of Precambrian microscopic fossils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9117-9120
- 9 Kajander EO, Kuronen I, Åkerman K, Peltti A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on earth. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1997; 3111: 420-428
- 10 Lopez-Brea M, Selgas R. Nanobacteria as a cause of renal diseases and vascular calcifying pathology in renal patients ("endovascular lithiasis". *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 491-492
- 11 Conte Visus A, Grases Freixedas F, Costa-Bauza A, Piza Reus P. Microinfections and kidney lithiasis. *Arch Esp Urol* 2001; 54: 855-860
- 12 Li Y, Wen Y, Yang Z, Wei H, Liu W, Tan A, Wu X, Wang Q, Huang S, Kajander EO, Ciftcioglu N. Culture and identification of nanobacteria in bile. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002; 82: 1557-1560
- 13 Kajander EO, Ciftcioglu N, Aho K, Garcia-Cuerpo E. Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation. *Urol Res* 2003; 31: 47-54
- 14 Sedivy R, Battistutti WB. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. *APMIS* 2003; 111: 951-954
- 15 Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, Jones ML, Caughey RC, Brown R, Millikin PD, Darras FS. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2000; 57: 2360-2374
- 16 Maniloff J. Nannobacteria: size limits and evidence. *Science* 1997; 276: 1776
- 17 Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, Swaim W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11511-11515

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

# 中西医结合治疗溃疡性结肠炎

刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正, 中国医科大学第二临床学院 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 刘敬军, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学第二临床学院. shylijj@yahoo.com.cn

电话: 024-23281706 传真: 024-23280417

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-10-27

## Experimental research on treatment of ulcerative colitis with integrative traditional Chinese and Western medicine

Jing-Jun Liu, Chang-Qing Zheng, Li-Li Pan, Ying Wen, Gang-Zheng Hu

Jing-Jun Liu, Chang-Qing Zheng, Li-Li Pan, Ying Wen, Gang-Zheng Hu, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jing-Jun Liu, the Second Clinical College of China Medical University, 92 Bei'er Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. shylijj@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-10-27

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of the clyster treatment with integrated traditional Chinese and Western medicine on ulcerative colitis (UC), and to investigate its mechanism.

**METHODS:** The mouse model of UC was established, and then the rats were treated (clyster) with the combination of tin-like powder, dexamethasone, gentamicin, and berberine. Then the therapeutic effect was observed, and the mechanism of the treatment was analyzed.

**RESULTS:** The disease active index (DAI) and histopathologic score (HPS) of the low dose (DAI:  $5.10 \pm 4.07$ , HPS:  $8.00 \pm 6.38$ ), the moderate dose (DAI:  $0.80 \pm 1.87$ , HPS:  $1.30 \pm 1.49$ ), the high dose (DAI:  $1.00 \pm 1.94$ , HPS:  $0.90 \pm 1.45$ ), and the positive control group (DAI:  $5.30 \pm 4.37$ , HPS:  $8.00 \pm 5.12$ ) were markedly lower than those of the negative control group (DAI:  $8.60 \pm 1.26$ , HPS:  $13.20 \pm 1.69$ ) (all  $P < 0.05$ ). The DAI and HPS of the moderate dose group were markedly lower than those of the low dose group and the positive control group (all  $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between the moderate and high dose group ( $P > 0.05$ ). The levels of interleukin-4

(IL-4) of the low, moderate, and high dose group, and the positive control group were markedly lower than those of the negative control group ( $32.33 \pm 15.30$ ,  $25.79 \pm 6.33$ ,  $29.92 \pm 12.81$ ,  $28.45 \pm 9.30$  vs  $63.89 \pm 11.31$ , all  $P < 0.05$ ), but the levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were markedly higher than those of the negative control group ( $198.38 \pm 31.46$ ,  $187.49 \pm 13.04$ ,  $188.14 \pm 14.11$ ,  $207.64 \pm 41.44$  vs  $127.41 \pm 21.47$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The combination enema of tin-like powder, dexamethasone, gentamicin, and berberine has definite therapeutic effect on UC, which may be related with its regulation on IL-4 and IFN- $\gamma$  level.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Integrated traditional Chinese and Western medicine; Mice

Liu JJ, Zheng CQ, Pan LL, Wen Y, Hu GZ. Experimental research on treatment of ulcerative colitis with integrative traditional Chinese and Western medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(23): 2806-2808

## 摘要

**目的:** 探讨中西医结合灌肠治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的疗效及其作用机制。

**方法:** 建立小鼠UC动物模型后, 中西医结合灌肠治疗, 观察疗效并探讨其作用机制。

**结果:** 低、中、高剂量组及阳性对照组的疾病活动指数、病理组织学记分较阴性对照组有显著的统计学差异 ( $5.10 \pm 4.07$  和  $8.00 \pm 6.38$ ,  $0.80 \pm 1.87$  和  $1.30 \pm 1.49$ ,  $1.00 \pm 1.94$  和  $0.90 \pm 1.45$ ,  $5.30 \pm 4.37$  和  $8.00 \pm 5.12$ , vs  $8.60 \pm 1.26$  和  $13.20 \pm 1.69$ , 所有  $P < 0.05$ )。中剂量组的疾病活动指数、病理组织学记分较低剂量组、阳性对照组有显著的统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 而与高剂量组比较无显著的统计学差异 ( $P > 0.05$ )。低、中、高剂量组及阳性对照组的IL-4组织含量较阴性对照组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而IFN- $\gamma$ 含量明显升高 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 锡锡类散、地塞米松、庆大、黄连素结合灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效显著, 其治疗作用可能是通过调节细胞因子IL-4、IFN- $\gamma$ 来实现的。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 中西医结合; 小鼠

刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎. 世界



华人消化杂志 2005;13(23):2806-2808

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2806.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的非特异性炎症,病因及发病机制尚未完全清楚.本病急性爆发型死亡率较高,慢性持续型易癌变,目前该病已被世界卫生组织列为现代难治病症之一.在我国UC的发病率呈逐年上升趋势,因此寻找有效的治疗方法是亟待解决的问题.我科应用中西医结合灌肠治疗UC已有二十余年历史,并收到了较好疗效.为科学评价该疗法疗效、探讨其机理,我们对该疗法进行了实验研究,现报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 动物选用6-8 wk SPF级BALB/C♀小鼠,体质量约20-25 g,由中国医科大学附属第二临床学院动物实验中心提供.恶唑酮(OXZ)由Sigma公司提供.小鼠白介素-4 (interleukin-4, IL-4)定量试剂盒、小鼠干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )定量试剂盒均由上海森雄科技实业有限公司提供.地塞米松、庆大、2%黄连素、锡类散均由中国医科大学第二临床学院药剂科提供.

1.2 方法 UC模型的建立:取小鼠50只,实验前5 d 30 g/L恶唑酮无水乙醇溶液0.15 mL涂抹腹部皮肤暴露部位,范围2 cm×2 cm.实验前24 h,禁食不禁水,先用50 g/L水合氯醛0.15 mL腹腔注射使小鼠轻度麻醉,约25 min以后用套接了小号导尿管的1 mL注射器抽吸10 g/L恶唑酮500 g/L乙醇溶液0.15 mL,从肛门导尿管缓慢插入深度约3.5 cm,然后将药液缓慢注入,停20 s后抽出导尿管,再将小鼠倒悬约30 s后放入盒中.给药方法:将恶唑酮灌肠的50只小鼠随机分为5组,每组10只,即:阳性对照组、阴性对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,同时取未行恶唑酮灌肠小鼠10只设正常组(30 g/L恶唑酮无水乙醇溶液换成无水乙醇溶液涂抹腹部皮肤,10 g/L恶唑酮500 mL/L乙醇溶液换成500 mL/L乙醇溶液0.15 mL灌肠,余处置同其它组小鼠).实验第2天至第8天,全部小鼠2次/d灌肠,灌肠药物及每天药物总量分别如下:阳性对照组为柳氮磺吡啶15 mg、生理盐水0.5 mL;阴性对照组为生理盐水0.5 mL;低剂量组为庆大0.02万单位、黄连素0.25 mL、地塞米松0.012 5 mg、锡类散5 mg;中剂量组为庆大0.04万单位、黄连素0.5 mL、地塞米松0.025 mg、锡类散10 mg;高剂量组为庆大0.06万单位、黄连素0.75 mL、地塞米松0.037 5 mg、锡类散15 mg;正常组为生理盐水0.5 mL.实验第9天处死全部小鼠,留取结肠标本分别行病理切片检查及采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测IL-4、INF- $\gamma$ .观察指标:观察指标为疾病活动指数(DAI)、病理组织学记分,用参考文献[1]和[2]的评分标准.

**统计学处理** 所有计算均用 SPSS 10.0 统计软件来完成,数据用mean±SD表述,各组数据之间的比较采用t检验.

## 2 结果

2.1 一般状况改变 阴性对照组小鼠全部出现程度不同的精神萎靡、厌食、懒动等症状,体质量平均下降21.3%,全部小鼠出现稀便,其中4只小鼠便潜血阳性,4只小鼠便血.低剂量组8只小鼠出现程度不同的精神萎靡、厌食、懒动等症状,体质量平均下降10.9%,5只小鼠出现稀便,4只小鼠便潜血阳性,2只小鼠便血.中剂量组3只小鼠出现轻度的精神萎靡、厌食、懒动症状,体质量平均下降0.5%,无小鼠出现稀便,1只小鼠便潜血阳性.高剂量组2只小鼠出现轻度的精神萎靡、厌食、懒动症状,另有1只上述症状较重,1只小鼠体质量下降,无小鼠出现稀便,1只小鼠便潜血阳性.阳性对照组7只小鼠出现程度不同的精神萎靡、厌食、懒动等症状,体质量平均下降10.3%,5只小鼠出现稀便,2只小鼠便潜血阳性,3只小鼠便血.正常组小鼠一般状况无明显改变.各组DAI结果比较(表1).

表1 各组DAI结果与病理组织学记分比较

组别	n	DAI记分	病理组织学记分
低剂量组	10	5.10±4.07 <sup>a</sup>	8.00±6.38 <sup>a</sup>
中剂量组	10	0.80±1.87 <sup>abc</sup>	1.30±1.49 <sup>abc</sup>
高剂量组	10	1.00±1.94 <sup>a</sup>	0.90±1.45 <sup>a</sup>
阳性对照组	10	5.30±4.37 <sup>a</sup>	8.00±5.12 <sup>a</sup>
阴性对照组	10	8.60±1.26	13.20±1.69

<sup>a</sup>P<0.05 vs 阴性对照组; <sup>b</sup>P<0.05 vs 阳性对照组、低剂量组; <sup>c</sup>P>0.05 vs 高剂量组.

2.2 病理改变 阴性对照组小鼠末端结肠全部出现中、重度充血、水肿,散在糜烂、潜溃疡.低剂量组8只小鼠末端结肠出现轻、重不等的充血、水肿,其中6只小鼠出现糜烂,3只小鼠出现潜溃疡.中剂量组及高剂量组小鼠均有3只末端结肠出现轻、中度的充血、水肿,未出现溃疡.阳性对照组见5只小鼠末端结肠出现轻、重不等的充血、水肿,并可见糜烂、溃疡.光镜下阴性对照组小鼠末端结肠均出现水肿、溃疡及糜烂,其中1例溃疡达肌层,全部小鼠黏膜及黏膜下层见细胞浸润.低剂量组4只小鼠末端结肠出现溃疡、2只出现糜烂,黏膜及黏膜下层细胞浸润.阳性对照组见4只小鼠末端结肠出现溃疡,未出现糜烂,可见细胞浸润.中剂量组及高剂量组小鼠光镜下无溃疡、糜烂,黏膜及黏膜下层细胞浸润均较前面各组轻.正常组小鼠末端结肠大体及镜下均无明显改变.各组病理组织学记分比较(表1).各组IL-4、IFN- $\gamma$ 含量的比较(表2).

## 3 讨论

UC是一种慢性非特异性炎症<sup>[3,4]</sup>,目前主要采用氨基水杨酸制剂、糖皮质激素及免疫抑制剂对该病进行治疗,疗效多不满意,且长期应用有较多的副作用<sup>[5-10]</sup>.中医治疗有许多优势,如果中西医结合,能够相互取长补短、协同

表2 各组IL-4、IFN- $\gamma$ 含量的比较(mean  $\pm$  SD)

组别	IL-4 (ng/L)	IFN- $\gamma$ (ng/L)
低剂量组	32.33 $\pm$ 15.30 <sup>a</sup>	198.38 $\pm$ 31.46 <sup>a</sup>
中剂量组	25.79 $\pm$ 6.33 <sup>ac</sup>	187.49 $\pm$ 13.04 <sup>ac</sup>
高剂量组	29.92 $\pm$ 12.81 <sup>ac</sup>	188.14 $\pm$ 14.11 <sup>ac</sup>
阳性对照组	28.45 $\pm$ 9.30 <sup>a</sup>	207.64 $\pm$ 41.44 <sup>a</sup>
阴性对照组	63.89 $\pm$ 11.31	127.41 $\pm$ 21.47
正常组	23.69 $\pm$ 9.08	205.44 $\pm$ 39.86

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组; <sup>c</sup> $P > 0.05$  vs 低剂量组.

作用, 达到标本兼顾, 取得明显疗效.

锡类散主要成分有西牛黄、冰片、珍珠、青黛等, 其中西牛黄有息风、清热止痛作用; 冰片有消肿、防腐、止痛、止痒作用; 珍珠有良好的收敛生肌作用, 并兼清热解毒之功; 青黛有凉血、解毒之功效, 能降低毛细血管通透性, 对平滑肌有抑制作用. 地塞米松具有广泛的抗炎和免疫抑制作用, 它能增强血管的张力, 改善血管壁的通透性, 使炎性渗出物减少, 从而抑制肠壁的炎症反应, 使结肠的基底膜再生并使肠道结缔组织基质恢复正常. 庆大霉素、黄连素有控制肠道感染和消炎的作用. 诸药通过局部灌肠给药使药物直达病灶, 不仅有利于药物作用的发挥且能使药物作用时间延长. 由于联合用药、局部用药, 降低了各药用量及疗程, 从而减少副作用的发生. 本研究表明该疗法有效, 中等剂量组与低剂量组比较疗效明显提高, 而高剂量组较中等剂量组DAI及病例组织学记分无明显统计学差异( $P > 0.05$ ), 两者疗效相当.

已有很多证据表明CD4<sup>+</sup>T细胞在UC的发病机制中起着重要作用<sup>[11-14]</sup>. 根据细胞因子表达谱的不同将CD4<sup>+</sup>T细胞分为Th1细胞、Th2细胞. Th1细胞主要分泌IFN- $\gamma$ 、IL-2, Th2细胞主要分泌IL-4、IL-5, 通过分泌的细胞因子Th1细胞、Th2细胞相互调节对方的生长分化, 从而维持Th1细胞、Th2细胞之间的平衡, 这一平衡的破坏与炎症性肠病的发病密切相关. 恶唑酮所诱导的结肠炎由Th2细胞(主要分泌IL-4)所介导, 本研究阴性对照组较正常组IL-4升高( $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$ 降低( $P < 0.05$ ), 该结果与以往报道相符<sup>[15,16]</sup>; 而低剂量组、中剂量组、高剂量组及阳性对照组较阴性对照组IL-4降低( $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$ 升高( $P < 0.05$ ), 因而考虑本研究所应用的中西医结合灌肠是通过调节细胞因子IL-4及IFN- $\gamma$ 来改善Th1细胞、Th2细胞之间的平衡而发挥疗效的. 但是疗效明显优于低剂量组的

中剂量组和高剂量组的IL-4及IFN- $\gamma$ 的含量较前两组却无明显改善, 考虑其中可能还有其它细胞因子参与, 这有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702
- 2 Ekstrom CM. Oxazolone- induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5- aminosal cyclic acid. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 174-179
- 3 Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Erwin PJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 2000; 87: 1346-51
- 4 Mariani P, Bacheloni A, D'Alessandro M, Lomanto D. Effector Th-cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2029-2035
- 5 Prakash A, Markham A. Oral delayed-release mesalazine: a review of its use in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Drugs* 1999; 57:383-408
- 6 Sutherland LR, Roth DE, Beck PL. Alternatives to sulfasalazine: a meta-analysis of 5-ASA in the treatment of ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Dis* 1997; 34: 65-78
- 7 Hanauer SB, Robinon M, Pruitt R. Budesonide enema for the treatment of active, distal ulcerative colitis and proctitis; a dose-ranging study. U.S. Budesonide enema study group. *Gastroenterology* 1998; 115: 525-532
- 8 Pruitt R, Katz S, Bayless T. Repeated use of budesonide enema is safe and effective for the treatment of acute flares of distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996; 110: A995
- 9 Stack WA, Long RG, Hawkey CJ. Short-and long-term outcome of patients treated with cyclosporin for severe acute ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 973-978
- 10 Cohen RD, Stein R, Hanauer SB. Intravenous cyclosporin in ulcerative colitis: a five-year experience. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1587-1592
- 11 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 12 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
- 13 Hogaboam CM, Vallance BA, Kumar A, Addison CL, Graham FL, Gaudie J, Collins SM. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2766-2776
- 14 Adorini L, Sinigaglia F. Pathogenesis and immunotherapy of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997; 18: 209-211
- 15 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
- 16 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17: 629-638

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

# HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA和ALT的关系

韩学吉, 许顺姬, 崔鹤松

韩学吉, 许顺姬, 崔鹤松, 延边大学医学院附属医院感染科 检验科 吉林省延吉市 133000

通讯作者: 韩学吉, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医学院附属医院感染科, hxj65@hanmail.net

电话: 043-32276888

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

## 摘要

**目的:** 探讨HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA与ALT相互关系。

**方法:** 选择HBeAg阴性慢乙肝82例, 分为A群 (ALT为正常的1-2倍)及B群 (ALT>正常的2倍)采用Hitachi7600全自动生化分析仪检查肝功, 采用Abbott AxSYM System(美国)检查乙肝病毒学, 采用PCR定量法(Cobas Amplicor HBV Monitor test<sup>TM</sup>)检查血清HBV-DNA定量。

**结果:** 患者血清HBV-DNA中位数是 $2.7 \times 10^8$  (200- $4.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, A群HBV-DNA中位数是 $5.6 \times 10^7$  (200- $4.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, B群HBV-DNA中位数是 $1.0 \times 10^9$  (200- $1.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, B群比A群明显高 ( $P < 0.001$ )。另外, A群及B群各自的血清HBV-DNA值及ALT值间无明显相关性, 但总的82例患者血清HBV-DNA值及ALT值间有明显相关性 ( $r = 0.416, P < 0.001$ ), HBeAg阴性慢乙肝血清ALT上升之前血清HBV-DNA值上升。

**结论:** 定期复查HBV-DNA, 及时应用抗病毒药物可预防及避免急性恶化, 也可以减少肝硬化及肝癌的发生率。

**关键词:** 慢性乙型肝炎; HBeAg; HBV-DNA; ALT

韩学吉, 许顺姬, 崔鹤松, HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA和ALT的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2809-2810

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2809.asp>

## 0 引言

HBeAg阴性慢性乙型肝炎(慢乙肝)临床经过多样, 大部分伴有肝硬化, 时有引起急性恶化, 病死率及肝癌发生率比HBeAg阳性慢乙肝高<sup>[1]</sup>。所以在临床上判断对HBeAg阴性慢乙肝的治疗时机及治疗对象很重要。我们用荧光定量聚合酶链反应方法检测HBeAg阴性慢乙肝患者血清HBV-DNA和ALT水平, 并分析两者间相互关系。这对掌握HBeAg阴性慢乙肝的治疗时机及治疗对象具有重要临床意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003/2004年HBeAg阴性慢乙肝82例, 分为

A (ALT为正常的1-2倍)和B群 (ALT>正常的2倍)。排除酒精因素、抗-HCV(+). 诊断标准参考2000年病毒性肝炎防治方案<sup>[2]</sup>。

**1.2 方法** 肝功检查采用Hitachi7600全自动生化分析仪, 乙肝病毒学检查采用Abbott AxSYM System(美国), 血清定量检查采用PCR定量法(Cobas Amplicor HBV Monitor test<sup>TM</sup>)。

**统计学处理** 采用SPSS10.0处理系统, 各群间比较采用Whitney *U*分析、Chi-square分析、Spearman相关分析。

## 2 结果

两群间AST、ALT及ALB有差异, 但性别, 年龄, TB无差异 (表1)。血清HBV-DNA中位数是 $2.7 \times 10^8$  (200- $4.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, A群HBV-DNA中位数是 $5.6 \times 10^7$  (200- $4.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, B群HBV-DNA中位数是 $1.0 \times 10^9$  (200- $1.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, B群比A群明显高 ( $P < 0.001$ )。另外, A群及B群各自的血清HBV-DNA值及ALT值间无明显相关性, 但总的82例患者血清HBV-DNA值及ALT值间有明显相关性 ( $r = 0.416, P < 0.001$ )。

表1 各群患者的临床特性

分组	A群 (ALT 1-2倍)	B群 (ALT>2倍)	P值
n	52	30	
性别 (M/F)	38/14	23/7	0.720
年龄 (岁)	46 (10-61)	49 (18-62)	0.620
AST (0-666.8 nkat/L)	45 (23-103)	126 (56-947)	< 0.001
ALT (0-666.8 nkat/L)	56 (41-79)	150 (81-594)	< 0.001
TB (10 mg/L)	0.9 (0.4-10.8)	1.4 (0.4-16.9)	0.082
ALBumin (10 mg/L)	4.3 (2.3-5.3)	3.9 (1.8-5.5)	0.018

## 3 讨论

慢乙肝肝组织学检查结果及血清学检查结果间的相关性分析在临床上很重要, 已进行了研究, 血清AST、ALT值可以反映肝坏死及肝炎症的程度, 但不是绝对成比例的<sup>[3-5]</sup>。HBeAg阴性慢乙肝临床经过多样, 大部分伴有肝硬化, 时有引起急性恶化, 病死率及肝癌发生率比HBeAg阳性慢乙肝高<sup>[1]</sup>。所以在临床上判断对HBeAg阴性慢乙肝的治疗时机及治疗对象是很重要。美国对HBeAg阴性慢乙肝治疗标准定为HBV-DNA> $1.0 \times 10^5$  copies/L并且ALT值>正常值的2倍<sup>[6]</sup>。本研究结果表明共82例HBeAg阴性慢乙肝患者血清HBV-DNA中位数是 $2.7 \times 10^8$  (200- $4.7 \times 10^{10}$ ) copies/mL, A群HBV-DNA中位数



是 $5.6 \times 10^7 (200-4.7 \times 10^{10})$  copies/mL, B群HBV-DNA中位数是 $1.0 \times 10^9 (200-1.7 \times 10^{10})$  copies/mL, B群比A群明显高( $P < 0.001$ ), 均高于美国规定的治疗标准, ALT虽然不高但HBV-DNA明显高, 其中位数达 $5.6 \times 10^7 (200-4.7 \times 10^{10})$  copies/mL. Rehermann<sup>[7]</sup>认为HBeAg阴性慢乙肝不同于HBeAg阳性慢乙肝, 肝损伤与HBV增值引起的体内免疫反应有关. Zavaglia *et al*<sup>[8]</sup>研究指出, HBV-DNA值与门脉及门脉周围炎症度在HBeAg阳性慢乙肝中无相关性, 但在HBeAg阴性慢乙肝中有相关性. 这也可能与HBV增值引起的体内免疫反应有关. 提示, ALT虽然不高但HBV-DNA明显高的HBeAg阴性慢乙肝在临床上应给予抗病毒治疗. 另外, 本研究结果表明A群及B群各自的血清HBV-DNA值及ALT值间无明显相关性, 但总的82例患者血清HBV-DNA值及ALT值间有明显相关性( $r = 0.416$ ,  $P < 0.001$ ), HBeAg阴性慢乙肝血清ALT上升之前血清HBV-DNA值上升并引起急性恶化, 提示在临床上定期复查HBV-DNA, 及时应用抗病毒药物可以预防及避免急性恶化, 也可以减少肝硬化及肝癌的发生率.

#### 4 参考文献

- 1 Bonino F, Rosina F, Rizzetto M, Rizzi R, Chiaberge E, Tardanico R, Callea F, Verme G. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. *Gastroenterology* 1986; 90: 1268-1273
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 323-329
- 3 Stroffolini T, Sagnelli E, Rapicetta M, Felaco FM, Filippini P, Annella T, Petruzzello A, Chionne P, Sarrecchia B, Piccinino F. Hepatitis B virus DNA in chronic HBsAg carriers: correlation with HBeAg/anti-HBe status, anti-HD and liver histology. *Hepatogastroenterology* 1992; 39: 62-65
- 4 Dusheiko G, Paterson A. Hepatitis B core and surface antigen expression in HBeAg and HBV DNA positive chronic hepatitis B: correlation with clinical and histological parameters. *Liver* 1987; 7: 228-232
- 5 Ter Borg F, Ten Kate FJ, Cuypers HT, Leentvaar-Kuijpers A, Oosting J, Wertheim-van Dillen PM, Honkoop P, Rasch MC, deMan RA, van Hattum J, Chamuleau RA, Reesink HW, Jones EA. Relation between laboratory test results and histological hepatitis activity in individuals positive for hepatitis B surface antigen and antibodies to hepatitis B e antigen. *Lancet* 1998; 351: 1914-1918
- 6 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-1241
- 7 Rehermann B. Immune response in hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 21-38
- 8 Zavaglia C, Mondazzi L, Maggi G, Iamoni G, Gelosa F, Bellati G, Colloredo G, Bottelli R, Ideo G. Are alanine aminotransferase, hepatitis B virus DNA or IgM antibody to hepatitis B core antigen serum levels predictors of histological grading in chronic hepatitis B? *Liver* 1997; 17: 83-87

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第一届全国临床营养支持学术会议通知

经中华医学会外科学分会批准, “第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开. 本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办, 主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结. 现将征文要求通知如下:

### 1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号, 上海中山医院外科吴国豪收, 邮编: 200032; 同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn, 注明上海中山医院外科吴国豪收. 征文请自留底稿, 恕不退稿.

### 2 截稿日期

征文截止日期: 2006-03-15.

本次会议举行优秀论文评奖活动, 欢迎踊跃投稿. 会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分.

# 肾上腺副神经节瘤引起顽固性腹泻1例

赵善超, 郑少斌, 毛向明, 谭万龙, 宋于刚

赵善超, 郑少斌, 毛向明, 谭万龙, 南方医科大学附属南方医院泌尿外科  
广东省广州市 510515

宋于刚, 南方医科大学附属南方医院消化病研究所 广东省广州市  
510515

通讯作者: 郑少斌, 510515, 广东省广州市南方医科大学附属南方医院泌尿  
外科. zhaoshanchao@263.net

电话: 020-61641761 传真: 020-61641763

收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-31

## 摘要

1例顽固性腹泻患者, 经影像学初步诊断, 病理组织学确诊为肾上腺副神经节瘤, 为一罕见病例。

**关键词:** 副神经节瘤; 腹泻; 肾上腺

赵善超, 郑少斌, 毛向明, 谭万龙, 宋于刚. 肾上腺副神经节瘤引起顽固性腹泻1例. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2811

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2811.asp>

## 1 病例报告

患者, 女, 46岁, 因反复腹泻80 d, 四肢无力10 h急诊入院; 每日腹泻4-5次, 为黄色稀水样便。入院后查血钾低, 最低达1.5 mmol/L; 查血常规、尿常规正常, 多次查粪常规检偶有潜血(+)。胃镜检查示: 慢性萎缩性胃炎伴胆汁反流。肠镜检查示: 考虑感染性肠炎。肠镜病理诊断示: (乙状结肠)黏膜轻度炎症。胰腺外分泌功能试验未见明显异常。行菌落分析示菌群Ⅱ<sup>0</sup>失调。入院后经补钾、生态制剂、抗感染等对症、支持治疗后血钾升至正常, 四肢无力好转, 但腹泻仍无明显好转。进一步查腹部超声示右侧腹膜后

稍强回声光团; 腹部增强CT示: 右侧肾上腺区占位, 考虑为肾上腺良性肿瘤, 以肾上腺腺瘤可能性大。经各项检查及术前准备, 于2005-07-18在全麻下行腹腔镜下右肾上腺肿瘤切除术。术中见右肾上腺极上方肾上腺区有一圆形肿物, 直径约5 cm, 表面光滑。将肿物完整切除, 送病理检查。病理诊断: (右肾上腺)副神经节瘤伴神经节细胞及雪旺氏细胞分化。术后患者恢复顺利, 大便每天1次, 为成形软便; 术后3 d复查血钾正常。顺利出院后随访2 mo, 排便正常, 定期复查血钾正常。

## 2 讨论

副节瘤是起源于副神经节的非上皮性神经内分泌肿瘤, 临床上比较少见, 可以来源于肾上腺或肾上腺外, 大部分为良性肿瘤, 10%左右有恶性倾向<sup>[1]</sup>; 肾上腺副神经节瘤也称嗜铬细胞瘤, 可引起高血压、低血钾等临床表现, 但引起腹泻的极少, 一般认为与细胞分泌过多的血管活性肠肽及生长激素释放抑制因子有关; 治疗上主张积极手术切除肿瘤<sup>[2]</sup>。本例以顽固性腹泻伴低钾为主要表现, 其低钾考虑有腹泻丢失及肿瘤直接作用双重原因。经内科治疗效果不满意, 手术切除肿瘤后效果良好。

## 3 参考文献

- 1 Miller RB, Boon MS, Atkins JP, Lowry LD. Vagal paraganglioma: the Jefferson experience. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122: 482-487
- 2 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学. 第1版. 山东: 山东科学技术出版社, 2004: 1687-1688

电编 张敏 编辑 张海宁

## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授  
大连医科大学附属第一医院

马春红 副教授  
山东大学医学院免疫学研究所

陈红松 副研究员  
北京大学肝病研究所

聂青和 副教授  
中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科全军感染病治疗中心

程明亮 教授  
贵阳医学院附属医院

秦环龙 副教授  
上海交通大学附属第六人民医院

戴冬秋 教授  
沈阳中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

石雪迎 讲师  
北京大学医学部病理学系

房静远 教授  
上海第二医科大学附属仁济医院

谭学瑞 主任医师  
广东省汕头市长平路57号

江学良 副主任医师  
长海医院研究生公寓201房间

吴开春 教授  
中国人民解放军第四军医大学西京医院消化内科

纪小龙 教授  
武警总医院病理科

王小众 教授  
福建医科大学附属协和医院消化内科

李定国 教授  
上海第二医科大学附属新华医院

吴梧桐 教授  
中国药科大学生物制药学院

李靖 副教授  
重庆第三军医大学新桥医院肝胆外科

王振军 教授  
北京大学第一医院普外科

刘莉 讲师  
中国人民解放军第四军医大学药理教研室

周殿元 教授  
中国人民解放军第一军医大学南方医院消化内科

刘连新 教授  
哈尔滨医科大学附属第一医院普通外科

张锦生 教授  
上海复旦大学上海医学院病理学系

刘平 教授  
上海中医药大学

张万岱 教授  
中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

李增山 副教授  
中国人民解放军第四军医大学病理教研室