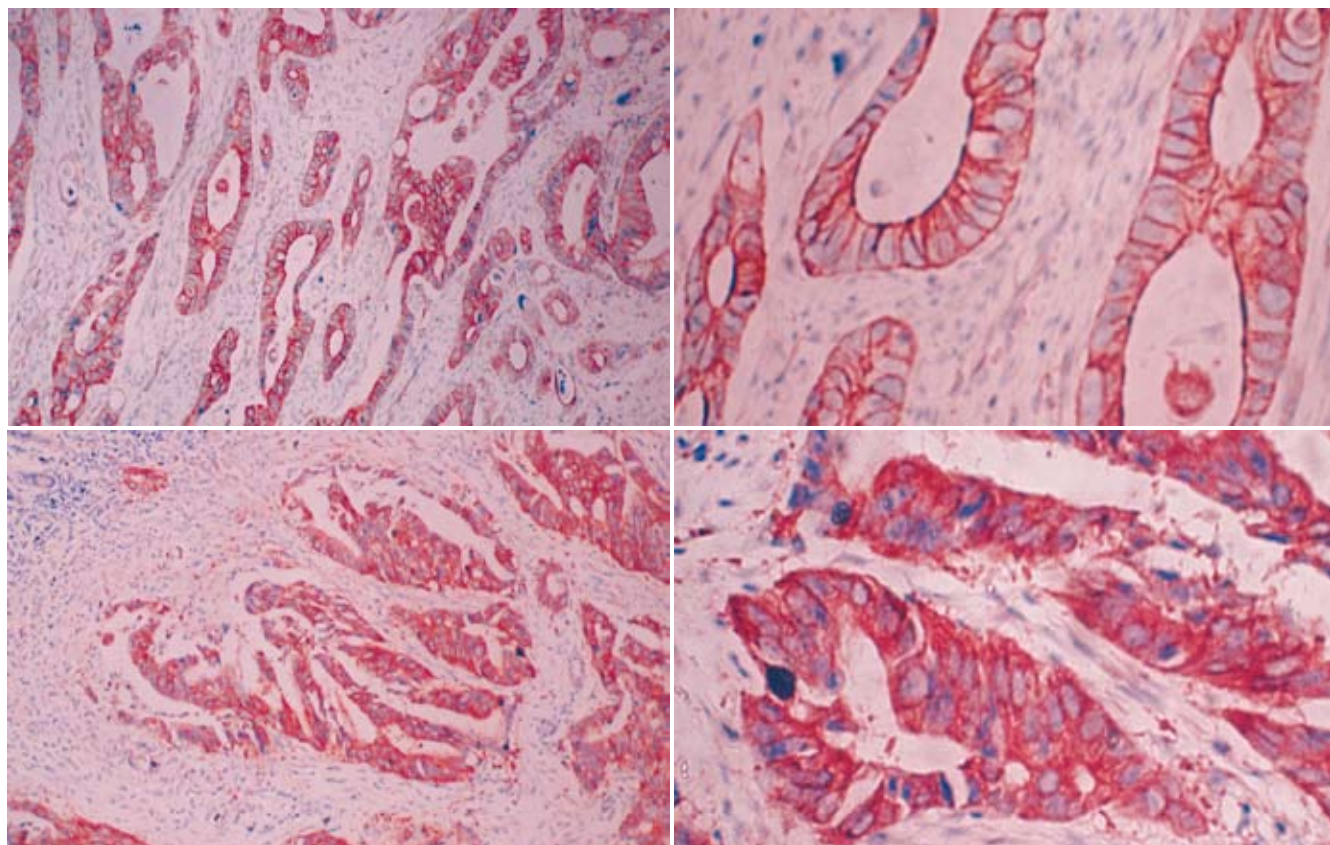


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 11 月 28 日 第 13 卷 第 22 期 (Volume 13 Number 22)



22 / 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 11 月 28 日 第 13 卷 第 22 期 (总第150期)

述 评

2637 重视应激性溃疡的规范化防治 李兆申

基础 研究

2640 J-HNP-1多肽的重组及体外抗菌作用研究

刘贤华, 白晓东, 仝青英, 张韶峰

2645 端粒酶逆转录酶肽-核酸病毒样颗粒疫苗的制备及免疫原性鉴定

郭红, 郝嘉, 吴超, 房殿春

2650 胰腺癌组织Survivin与Ki-67的表达及其意义

陈晓星, 倪金良, 郝波, 张国新, 施瑞华, 王学浩

2654 TGIF对胃癌细胞株SGC-7901的维甲酸信号通路的影响

丁莉利, 胡忠良, 郑长黎

2658 小鼠暴发性肝衰竭肝细胞凋亡形态学及其调控机制

王玉梅, 冯国和, 窦晓光, 刘德刚

2663 胆汁纳米细菌的培养

王利民, 沈文律, 张士莲, 曹立赢, 王宝强

文 献 综 述

2667 重症急性胰腺炎并发胰性脑病的发病机制

张喜平, 田华

2672 含缬酪肽蛋白与消化系统肿瘤

尹义梅, 穆建平, 张晓岚

研 究 快 报

2677 δ 氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞钙调素和突变型p53的表达变化

郑江华, 时德, 陈祖林, 梁平

2681 胃癌高低发区差异基因型幽门螺杆菌菌株对人胃上皮细胞系GES-1的损伤作用

何红梅, 宫月华, 袁媛

2685 N-去硫酸肝素对SCID小鼠胃癌血管生成和VEGF表达的影响

陈金联, 陆金来, 陈明祥, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陈国强, 耿建国

2689 体外培养的肝癌细胞株与正常肝细胞株蛋白质的差异表达

宋旭霞, 闫志勇, 王斌, 牟文凤, 钱冬萌, 丁守怡, 姚宗良

2693 愈肝胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用

高萍, 程留芳, 谢朝良

2697 冷冻保存后成人胰岛细胞与小肠黏膜下层的共培养

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱

2700 大鼠急性坏死性胰腺炎NF- κ B的变化及乌司他丁的调控作用

刘瑞林, 刘牧林, 马良龙, 吴薇

2704 中性粒细胞趋化因子在重症急性胰腺炎中的表达及临床意义

石建群, 周国雄, 黄介飞, 徐岷, 张弘, 魏群

临 床 经 验

2708 幽门螺杆菌根除对门脉高压性胃病患者预后的影响

凌安生, 朱励, 王龙, 陈金联, 朱金水

2711 原发性小肠淋巴瘤23例临床病理分析

毛永平, 杨云生, 王淑芳, 窦艳

2714 壶腹癌组织中P-gp、LRP的表达及其意义

金浩生, 周杰, 阚和平, 廖彩仙, 谭远飞

2717 胰腺癌组织中SKP2和P27蛋白表达及其相互关系

杨竹林, 黄生福, 王群伟, 苗雄鹰, 梁珊

致 谢	2720 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2639 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2649 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2662 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2666 更正与说明专栏 2671 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2676 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2680 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2684 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2692 加入台湾华艺CEPS中文电子期刊服务声明 2696 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 2707 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知
封面故事	金浩生, 周杰, 阚和平, 廖彩仙, 谭远飞. 壶腹癌组织中P-gp、LRP的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2714-2716 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2714.asp
国际会议	II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net 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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-11-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 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

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

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年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

November 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 22

EDITORIAL

Recognition of standardization prevention and cure of stress ulcer

Li ZS 2637

BASIC RESEARCH

Preliminary study on recombination of J-HNP-1 and its anti-bacterial effect *in vitro*

Liu XH, Bai XD, Tong QY, Zhang SF 2640

Construction of virus-like particle peptide-nucleic acid vaccine of human telomerase reverse transcriptase and identification of its immunogenicity

Guo H, Hao J, Wu C, Fang DC 2645

Expression of Survivin and Ki-67 protein in human pancreatic cancer tissues and their clinical significances

Chen XX, Ni JL, Hao B, Zhang GX, Shi RH, Wang XH 2650

Effects of TG-interacting factor on retinoic signaling pathway in gastric cancer cell line SGC-7901

Ding LL, Hu ZL, Zheng CL 2654

Morphology and regulatory mechanism of hepatocyte apoptosis in experimental fulminant hepatic failure

Wang YM, Feng GH, Dou XG, Liu DG 2658

Culture of nanobacteria from human gallbladder bile

Wang LM, Shen WL, Zhang SL, Cao LY, Wang BQ 2663

REVIEW

Pathogenesis of severe acute pancreatitis complicated by pancreatic encephalopathy

Zhang XP, Tian H 2667

Relationship between Valosin-containing protein and tumor in digestive system

Yin YM, Mu JP, Zhang XL 2672

BRIEF REPORT

Expression of calmodulin and mutant p53 in SW480 cells in response to delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy

Zheng JH, Shi D, Chen ZL, Liang P 2677

Damage effect of different genotype of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer

He HM, Gong YH, Yuan Y 2681

Effect of N-desulfated heparin on angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in mice with severe combined immunodeficiency

Chen JL, Lu JL, Chen MX, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Chen GQ, Geng JG 2685

Differential protein expression between *in vitro* cultured liver cancer cell line HepG2 and normal cell line L02

Song XX, Yan ZY, Wang B, Mu WF, Qian DM, Ding SY, Yao ZL 2689

Inhibitory effect of Yugan capsule on hepatitis B virus *in vitro*

Gao P, Cheng LF, Xie CL 2693

Co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa

Hou J, Xue WJ, Feng XS, Tian XH, Pang XL, Teng Y 2697

Effect of ulinastatin on nuclear factor- κ B expression in acute necrotic pancreatitis in rats

Liu RL, Liu ML, Ma LL, Wu W 2700

Clinical significance and expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in severe acute pancreatitis

Shi JQ, Zhou GX, Huang JF, Xu M, Zhang H, Wei Q 2704

CLINICAL PRACTICE

Effect of *Helicobacter pylori* eradication on prognosis of patients with portal hypertension gastric disease: an analysis of 106 cases

Ling AS, Zhu L, Wang L, Cheng JL, Zhu JS 2708

Clinicopathological features of primary small intestinal lymphoma: analysis of 23 cases

Mao YP, Yang YS, Wang SF, Dou Y 2711

Expression and clinical significance of P-glycoprotein and lung resistance related protein in carcinoma of ampulla

Jin HS, Zhou J, Kan HP, Liao CX, Tan YF 2714

Expression and correlations of s-phase kinase associated protein 2 and P27 protein in pancreatic cancer tissues: an analyses of 51 cases

Yang ZL, Huang SF, Wang QW, Miao XY, Liang S 2717

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 November 28, 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: wcjd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

重视应激性溃疡的规范化防治

李兆申

李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

李兆申, 男, 1956-10-13生, 汉族, 河北省晋宁县人. 第二军医大学附属长海医院内科教研室主任、教授、主任医师、博士生导师、国家重点学科消化内科学主任、全军消化内科专科中心主任、全军消化病研究重点实验室主任、第二军医大学胰腺疾病研究所所长; 兼任中华消化内镜学会副主任委员、全军医学科学技术委员会委员、全军消化病学会副主任委员; 担任《胰腺病学杂志》执行主编、《中国内科年鉴》副主编、《胃肠病学》、《国外医学-消化分册》、《第二军医大学学报》、《解放军医学杂志》、《中华消化内镜杂志》等多本杂志的编委. 多次获国家、军队及上海市科技进步奖、医疗成果奖, 并承担国家、军队及上海市多项研究课题.

“十五”全军医药科研基金重点项目, No. 01Z059

通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. zhsl@81890.net

电话: 021-25070552 传真: 021-55620081

收稿日期: 2005-07-05 接受日期: 2005-07-18

摘要

应激性溃疡(stress ulcer, SU)是一种在机体受到严重创伤、重症疾病及严重心理障碍等应激状态下发生的以急性胃黏膜糜烂、溃疡和出血为特征的严重并发症. 应激性溃疡出血(SUB)的预防效果直接影响原发病的预后, 因而预防SUB的发生尤为重要. 目前国内外对危重患者应采取何种措施预防SU已达成共识, 但对预防用药种类、方法、时机以及停药指征均有分歧. 本文简述了应激性溃疡的病因、预防指征、临床表现和诊断, 强调了抑制胃酸分泌在防治SU中的重要性.

关键词: 应激性溃疡; 病因; 预防; 治疗

李兆申. 重视应激性溃疡的规范化防治. 世界华人消化杂志 2005;13(22): 2637-2639

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2637.asp>

0 引言

应激性溃疡(SU)是一种在机体受到严重创伤、重症疾病及严重心理障碍等应激状态下发生的以急性胃黏膜糜烂、溃疡和出血为特征的严重并发症. 随着监护条件改善、对SU发病机制认识加深、预防措施的采取, SU的发病率有所降低, 但由于SU的原发病严重, 一旦发生大出血或穿孔, 其病死率较高, 应激性溃疡出血(SUB)的预防效果直接影响原发病的预后, 因而预防SUB的发生尤为重要. 在休克、创伤、烧伤、脑外伤、呼吸功能衰竭、肾功能衰竭以及严重感染等应激情况下, 患者在数小时到数天内即可出现急性胃黏膜糜烂和/或溃疡. 内镜检查显示其发生率可达100%, 但发生大出血者仅占2-10%. 多数胃黏膜病损可在7-14 d内消失; 如果糜烂等病变持续, 则可出现大出血. 目前国内外对危重患者应

采取措施预防SU已达成共识, 但对预防用药种类、方法、时机以及停药指征均有分歧. 因此, 近年来许多国家相关学会都制定了各自的应激性溃疡预防(SUP)指南, 实行较规范化的诊治^[1, 2], 我国也于2002年提出SU防治建议^[3].

1 应激性溃疡发生的病因(应激源)及预防指征

多种疾病均可导致SU的发生, 其中最常见的应激源有: (1)重型颅脑外伤; (2)严重烧伤; (3)严重创伤及各种困难、复杂的大手术术后; (4)全身严重感染; (5)多脏器功能障碍综合征; (6)休克、心、肺、脑复苏术后; (7)心脑血管意外; (8)严重心理应激, 如精神创伤、过度紧张等^[3].

由于重症监护医学的发展, SUB的发生率已明显降低, 应提醒注意的是SUP仅适宜于高危人群, 而非每一例住在重症监护室的患者. 根据ASHP^[2]SUP指南, 具有以下一项高危因素以上的患者应采取预防措施: (1)呼吸衰竭(机械通气超过48 h); (2)凝血机制障碍, 1 a内有消化性溃疡或上消化道出血史, GCS评分 ≤ 10 ; (3)烧伤面积 $> 35\%$; (4)器官移植, 部分肝切除术; (5)多发伤(创伤程度积分 ≥ 16); (6)肾功能不全, 肝功能衰竭; (7)脊髓损伤. 具有以下两项以上危险因素的患者应采取预防措施: 败血症, ICU住院时间 > 1 wk, 潜血持续天数 ≥ 6 , 应用大剂量皮质醇(剂量相当于250 mg/d以上氢化可的松).

2 应激性溃疡临床表现和诊断

SU常无明显的前驱症状(如胃痛、反酸等), 主要表现为上消化道出血(呕血或黑粪)与失血性休克症状. 对无显性出血的危重患者, 胃液或粪便潜血试验阳性、不明原因血红蛋白浓度降低 ≥ 20 g/L, 应考虑有应激性溃疡伴出血的可能. 发生穿孔时, 可出现急腹症症状与体征. SU多在原发病起病3-5 d内发生, 少数可延至2 wk. 内镜检查时可发现病变以胃体部多见, 食管、十二指肠及空肠较少, 病变形态以多发性糜烂、溃疡为主. 有应激病史、在原发病后2 wk内发生上消化道出血、穿孔等症状, 病情允许时应立即做内镜检查, 若有糜烂、溃疡等病变存在, SU诊断即可成立^[3].

3 维持胃内高pH是防治SUB的关键

通常认为应激状态下三大因素对溃疡致病起主要作用: (1)黏膜缺血; (2)黏膜屏障受损; (3)胃酸分泌升高.

机体因急性强烈应激而引发的攻击因子增强和防御因子削弱,致使平衡被破坏而导致SU,许多攻击因子导致胃黏膜损伤的程度取决于胃液的酸度,这是制酸剂防治SU的依据。病灶处血栓形成对SUB的止血起关键作用。胃蛋白酶对血栓溶解起主要作用,而胃酸直接溶栓的作用相对较小。血小板的黏附和聚集对血栓形成起重要作用。胃蛋白酶的活性呈pH依赖性。胃蛋白酶原向胃蛋白酶的转化也呈pH依赖性,pH为5时开始转化,pH5-3时自我催化,而pH为2时最理想。胃蛋白酶在pH为1-4时才有活性,pH>3.5时活性很低,pH为4-6时失活,pH>6时被破坏。凝血机制及血小板聚集也呈高度的pH依赖性,pH<5.4不能止血。血小板在pH>6时才能聚集,血小板聚集的最佳pH为7-8,只有24 h内大部分时间胃液维持pH>6才能控制活动性上消化道出血。因此,对高危人群预防SU应控制胃液pH \geq 4,若治疗SUB,应控制胃液pH \geq 6,才能有较理想的防治效果。美国最新一项研究^[4]表明:在501名急诊科医师中,认为预防SU需维持胃内pH3以上者占1.7%,3.5以上者占5.6%,4以上者占39.6%,5以上者占38.6%,6以上者占14.5%。

4 应激性溃疡预防

H₂受体拮抗剂(H₂RA)预防SUB效果与硫糖铝相似,质子泵抑制剂(PPIs)则优于前两者^[5-10]。PPIs抑酸作用更强,几乎完全抑制酸分泌,持续用药无耐受性,作用持久、递增,3-5 d达稳态,胃内pH维持平稳。但危重患者中应用PPIs预防SUB时有两个缺点,一为PPIs鼻饲给药时将在酸性胃液内失活,其次,PPIs经吸收后必须在活化的壁细胞分泌小管的酸性环境中才能转化为活性形式,而危重患者大多予以禁食,因此壁细胞多处于静息状态,PPIs的抑酸能力将降低。另外,危重患者多伴中性粒细胞功能减退,奥美拉唑可损伤中性粒细胞的趋化性及噬菌功能而使其杀菌功能降低^[11],所以危重患者应用奥美拉唑可能加重感染。

因此,预防SUB时,由于H₂RA抑酸效果肯定及相对安全,以及PPIs较昂贵,大多数医生更愿意选用H₂RA。在美国,绝大多数急诊科医师首选制酸剂预防SU,其中H₂RA占63.9%,PPIs占19.0%,较前显著升高,而硫糖铝使用率较前明显下降,最常用的药物依次为法莫替丁38%,雷尼替丁22.7%,泮托拉唑13.9%,硫糖铝12.2%^[5]。而药物治疗SUB时应首选PPIs^[12]。有研究^[13]表明兰索拉唑较西咪替丁有更好的性价比。

H₂RA提高胃液pH及抑制胃蛋白酶的分泌和活性呈剂量依赖性。预防SU需根据原发病严重程度、SU发病率大小调整药物剂量或种类,一般来说对拟作重大手术的患者,估计术后有并发SU可能者,可在围手术前1 wk内应用口服抑酸药或抗酸药,以提高胃内pH

值。常用的药物有:奥美拉唑20 mg,每天1次;组胺受体阻滞剂:法莫替丁20 mg,每天2次;雷尼替丁150 mg,每天2次;西咪替丁400 mg,每天2次。而对严重创伤、高危人群的预防应在疾病发生后即静脉输注PPIs,使胃内pH迅速上升至4以上,如奥美拉唑(40mg,每天2次)。现很少应用抗酸药预防SU,包括氢氧化铝、碳酸氢钠等,其剂量应根据胃内pH调整,维持pH>4,黏膜保护剂硫糖铝、铝碳酸镁、前列腺素E等用药时间不少于2 wk^[3]。大多数作者赞成用药期间应常规监测pH,但尚无资料证实根据pH调整用药剂量比用标准剂量能更有效地预防SUB。我国《应激性溃疡防治建议》尚未明确预防SU停药指征,美国急诊科医师多以患者可耐受肠道营养、临床症状开始好转或转入普通病房为指征^[4]。

5 应激性溃疡出血的治疗

一旦发现呕血或黑便等消化道出血症状,提示SU预防失败,应立即采取各种止血措施及治疗SU。除积极治疗原发病和输血补液、维持正常的血液循环外,应迅速给予PPIs针剂(如奥美拉唑,首剂80 mg静脉注射,8 mg/h输注维持),有条件者立即行紧急胃镜检查,以明确诊断,并行内镜下止血治疗。经药物和内镜介入治疗,仍不能有效止血者,应考虑外科手术治疗^[14]。另外,对合并细菌感染者,为防止菌群移位,应加强黏膜保护剂和抗生素的应用;对合并凝血机制障碍的患者,可输注血小板悬液、凝血酶原复合物等,以及其他促进凝血的药物^[3]。

6 参考文献

- 1 Tryba M, Cook D. Current guidelines on stress ulcer prophylaxis. *Drugs* 1997; 54: 581-596
- 2 ASHP Therapeutic Guidelines on Stress Ulcer Prophylaxis. ASHP Commission on Therapeutics and approved by the ASHP Board of Directors on November 14, 1998. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56: 347-379
- 3 中华医学杂志编辑委员会. 应激性溃疡防治建议. *中华医学杂志* 2002; 82: 1000-1001
- 4 Daley RJ, Rebuck JA, Welage LS, Rogers FB. Prevention of stress ulceration: current trends in critical care. *Crit Care Med* 2004; 32: 2008-2013
- 5 Cook DJ, Reeve BK, Guyatt GH, Heyland DK, Griffith LE, Buckingham L, Tryba M. Stress ulcer prophylaxis in critically ill patients. Resolving discordant meta-analyses. *JAMA* 1996; 275: 308-314
- 6 Levy MJ, Seelig CB, Robinson NJ, Ranney JE. Comparison of omeprazole and ranitidine for stress ulcer prophylaxis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1255-1259
- 7 Lasky MR, Metzler MH, Phillips JO. A prospective study of omeprazole suspension to prevent clinically significant gastrointestinal bleeding from stress ulcers in mechanically ventilated trauma patients. *J Trauma* 1998; 44: 527-533
- 8 Messori A, Trippoli S, Vaiani M, Gorini M, Corrado A. Bleeding and pneumonia in intensive care patients given ranitidine and sucralfate for prevention of stress ulcer: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2000; 321: 1103-1106
- 9 Yildizdas D, Yapicioglu H, Yilmaz HL. Occurrence of ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated pediatric

- intensive care patients during stress ulcer prophylaxis with sucralfate, ranitidine, and omeprazole. *J Crit Care* 2002; 17: 240-245
- 10 Faisy C, Guerot E, Diehl JL, Iftimovici E, Fagon JY. Clinically significant gastrointestinal bleeding in critically ill patients with and without stress-ulcer prophylaxis. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1306-1313
- 11 Zedtwitz-Liebenstein K, Wenisch C, Patruta S, Parschalk B, Daxböck F, Graninger W. Omeprazole treatment diminishes intra- and extracellular neutrophil reactive oxygen production and bactericidal activity. *Crit Care Med* 2002; 30: 1118-1122
- 12 Barkun A, Bardou M, Marshall JK. Consensus recommendations for managing patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann Intern Med* 2003; 139: 843-857
- 13 Schupp KN, Schrand LM, Mutnick AH. A cost-effectiveness analysis of stress ulcer prophylaxis. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 631-635
- 14 中华内科杂志编委会. 急性非静脉曲张性上消化道出血诊治指南. *中华内科杂志* 2005; 44: 73-76

电编 李琪 编辑 王瑾晖 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 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

本刊讯 世界华人消化杂志主要报道食管癌、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。

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志2003年发表文章594篇, 地区分布25个, 机构分布191个, 基金论文比31%, 总被引频次5249次, 影响因子2.924, 即年指标0.529, 引用期刊数260种, 被引半衰期3.06。中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的10个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志获得2001年和2003年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览2004年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有51种, 统计到的文献数量共计9435301篇次, 涉及期刊39893种次。参加核心期刊评审的学科专家达1873位。经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近1万2千种中文期刊中评选出1800种核心期刊。世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

世界华人消化杂志2006年由北京报刊发行局发行, 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。(世界胃肠病学杂志社 2005-06-29)

J-HNP-1 多肽的重组及体外抗菌作用研究

刘贤华, 白晓东, 全青英, 张韶峰

刘贤华, 全青英, 张韶峰, 中国人民武装警察部队总医院科训科中心实验室 北京市 100039

白晓东, 中国人民武装警察部队总医院烧伤整形外科 北京市 100039

刘贤华, 女, 1971-04-19生, 湖北省洪湖市人, 汉族, 1999年重庆市第三军医大学预防医学系本科毕业, 2005年重庆市第三军医大学硕士研究生毕业, 实验师, 主要从事创伤后感染预防和治疗的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30100197

通讯作者: 刘贤华, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 北京市武警总医院科训科中心实验室. liuxianhua99student@sina.com

电话: 010-88276752 传真: 010-68211327

收稿日期: 2005-07-25 接受日期: 2005-08-26

Preliminary study on recombination of J-HNP-1 and its antibacterial effect *in vitro*

Xian-Hua Liu, Xiao-Dong Bai, Qing-Yin Tong, Shao-Feng Zhang

Xian-Hua Liu, Qing-Yin Tong, Shao-Feng Zhang, Central Laboratory, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China

Xiao-Dong Bai, Department of Burn and Plastic Surgery, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30100197

Correspondence to: Dr. Xian-Hua Liu, Central Laboratory, General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China. liuxianhua99student@sina.com

Received: 2005-07-25 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To construct the recombinant of J chain and human neutrophil peptide-1 (HNP-1) gene, and to express it in the mammalian cell system.

METHODS: The J chain and HNP-1 cDNA were amplified from the different plasmids by polymerase chain reaction (PCR), respectively, then the two kinds of cDNA fragments were recombined to obtain J-HNP-1 gene by recombinant PCR. After the J-HNP-1 cDNA fragment was inserted into the mammalian express vector pcDNA3.1(-)/Myc-HisC, the recombinant vector was transfected to the COS-7 cells by lipid transfection. The expression of J-HNP-1 mRNA and protein were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot, respectively. The antibacterial activities of cellular soluble protein and culture supernatant were examined *in vitro*.

RESULTS: The lengths of amplified J chain and HNP-1

were 489 bp and 297 bp, respectively. A band of 786 bp was amplified from COS-7 cells transfected by the recombinant plasmid. Western blot analysis revealed that the lysate of COS-7 cells transfected by rpcDNA3.1(-)/Myc-His /J-HNP-1 had a strong band with molecular weight of about 24 ku. After transfection, the soluble protein and supernatant of the COS-7 cells had significant antibacterial activity, and the diameters of their bacterial inhibition ring were 34 and 43 mm, respectively.

CONCLUSION: The J-HNP-1 recombinant is successfully constructed and expressed *in vitro*, and it has a favorable antibacterial effect.

Key Words: Recombinant PCR; Antimicrobial peptide; J chain; Human neutrophil peptide-1

Liu XH, Bai XD, Tong QY, Zhang SF. Preliminary study on recombination of J-HNP-1 and its antibacterial effect *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(22):2640-2644

摘要

目的: 将 α -防御素-1(HNP-1)基因与J链基因进行重组使其成为一种新的杀菌肽分子J-HNP-1, 并将其构建于能有效表达和分泌活性J-HNP-1杀菌肽的哺乳动物细胞表达系统。

方法: 应用PCR技术从不同的质粒中获得J链基因和HNP-1基因, 然后应用重组PCR技术将这两个不同的基因连接在一起而成为J-HNP-1基因。将此基因克隆入哺乳动物细胞表达载体pcDNA3.1(-)/Myc-HisC中。用脂质体转染法将此重组子导入COS-7细胞, 分别从mRNA和蛋白质水平采用RT-PCR和Western blot分析J-HNP-1的表达情况, 并体外检测细胞可溶性蛋白及培养上清的抗菌活性。

结果: 获得的J链基因和HNP-1基因大小分别为489和297 bp。采用RT-PCR法从被转染的细胞中扩增出一条约786 bp的片段, 其大小与预测相符; 采用Western blot印迹法, 用抗His抗体检测到细胞可溶性蛋白及培养上清在约 M_r 24 000处有强反应条带显示; 抗菌活性检测显示, 经rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1转染的COS-7细胞的可溶性蛋白和培养上清均有明显的抗菌活性, 抑菌圈的直径分别为34和43 mm。

结论: 重组J-HNP-1基因构建到哺乳动物细胞表达系

统, 并体外表达, 具有抑菌作用。

关键词: 重组PCR; 抗菌肽; J链; α -防御素-1

刘贤华, 白晓东, 全青英, 张韶峰. J-HNP-1多肽的重组及体外抗菌作用研究. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2640-2644

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2640.asp>

0 引言

肠源性感染的致病菌主要是条件致病菌, 其中多为耐药菌. 其感染常见于严重创伤、烧伤^[1-3]、移植术后^[4]、腹部外科感染性疾病^[5]、成人免疫缺陷综合征^[6]、恶性肿瘤^[7]等重症患者. 目前尚无良好的预防手段. 黏膜上皮细胞膜上具备多聚IgA受体(pIgR). 连有J链的IgA分子通过J链与pIgR结合后, 将IgA分子转运入黏膜细胞内. 我们将HNP-1(属 α -防御素)与J链cDNA连接, 然后在哺乳动物细胞系统中表达, 并初步检测其产物体外抗菌活性, 为进一步研究其细胞内杀菌功能提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 哺乳动物细胞表达载体pcDNA3.1(-)/Myc-HisC购自Invitrogen公司; pCH-J质粒由挪威奥斯陆大学Johansen教授赠送; 人防御素真核表达质粒pBabeNeo-HNP-1由华西医科大学赠送; 金黄色葡萄球菌标准菌株6538、COS-7细胞由北京军事医学科学院提供. RT-PCR Kit, PCR产物克隆试剂盒购自北京天象邦定生物科技有限公司; 兔抗多聚组氨酸抗体(即His抗体)购自北京华美生物公司; 脂质体转染试剂购自北京天为时代; 根据J链序列设计引物并在所设计的引物的上游插入BamH I酶切位点, 下游引入4个与甘氨酸相对应的氨基酸序列. J链上游引物(P1): 5'-gga tcc atg aag aac cat ttg ctt-3'; J链下游引物(P2): 5'-acc acc acc acc gtc agg ata gca ggc atc-3'. 根据HNP-1序列设计引物并在所设计的引物的上游引入4个与甘氨酸相对应的氨基酸序列, 下游插入BamH I酶切位点. HNP-1的上游引物(P3): 5'-ggg ggt ggt ggt atg agg acc ctc gcc atc-3'; 下游引物(P4): 5'-gga tcc gca gca gaa tgc cca gag-3'. 根据预测rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1 DNA序列设计PCR引物: P5: 5'-atg aag aac cat ttg ctt ttc tgg g-3'; P6: 5'-gca gca gaa tgc cca gag tc-3'. 以上引物均由北京军事医学科学院合成.

1.2 方法

1.2.1 重组哺乳动物细胞表达载体rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1的构建 利用PCR方法以P1、P2为引物从原质粒pCH-J中扩增出J链片段. 利用PCR方法以P3、P4为引物从原质粒pBabeNeo-HNP-1中扩增出HNP-1片段. 利用重组PCR技术, 以J链扩增产物和

HNP-1扩增产物的混合物为模板, 以P1、P4位引物扩增获取J-HNP-1基因. 将此杂合基因J-HNP-1 DNA片段先与pGM-T Easy载体相连接, 再用限制性内切酶BamH I进行酶切以获取J-HNP-1 DNA片段. 将J-HNP-1 DNA片段插入真核表达质粒pcDNA3.1(-)/Myc-HisC的多克隆位点并紧邻报告基因Myc表位和6×His的上游, 从而构建成重组真核表达载体rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1. 用该重组质粒转化大肠杆菌TOP10, 并接种于含100 mg/L氨苄青霉素的LB培养基, 过夜培养后挑取阳性克隆, 提取质粒DNA, 随机挑取8个阳性克隆提取质粒DNA, 用限制性内切酶BamH I进行酶切鉴定. 并对阳性克隆质粒进行DNA测序. 由北京军事医学科学院应用Beckman CEQ2000自动测序仪进行DNA序列测定. 正向引物为T7, 反向引物为BGH-rev.

1.2.2 转染后COS-7培养细胞总RNA的提取及RT-PCR^[8] 基因脂质法^[9]转染入COS-7细胞, 以正常的COS-7细胞为空白对照和转染空质粒pcDNA3.1(-)/Myc-HisC的COS-7细胞为阴性对照. 转染后24 h换液后将细胞依次于浓度为100 mL/L, 0.2 mL/L, 0 mL/L胎牛血清的培养基中继续培养12 h, 培养过程均无抗生素. 转染细胞培养增殖36 h后, 分别收集实验组及对照组(转染pcDNA3.1(-)/Myc-HisC和正常的COS-7)培养细胞, 提取总RNA. 先进行逆转录, 再以P5、P6为引物进行PCR.

1.2.3 Western blot检测 于转染后36 h收集各组细胞及培养上清提取蛋白^[10], 用抗His抗体, 按常规Western blot方法检测.

1.2.4 细胞可溶性蛋白及培养上清的抗菌活性试验 将金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC6538接种于固体LB培养基上. 纸片扩散法检测. 设置LVF阳性对照组(左氧氟沙星纸片), COS-7细胞阴性对照组(包括细胞可溶性蛋白和培养上清)以及rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1转染COS-7细胞实验组(包括细胞可溶性蛋白和培养上清).

2 结果

2.1 重组哺乳动物细胞表达载体rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1的构建 从pCH-J质粒中扩增出J链, 产物大小为489 bp(图1); 从pBabeNeo-HNP-1质粒中扩增出HNP-1, 产物大小为297 bp(图2). 重组PCR产生了包含J链和HNP-1这两个不同基因的融合基因. 将此融合基因与pGM-T Easy载体通过连接与转化, 产生阳性克隆菌落. 挑菌, 培养, 提取质粒, BamH I酶切质粒pGM-T Easy/J-HNP-1, 获取J-HNP-1片段, 再次克隆入哺乳动物细胞表达载体pcDNA3.1(-)/Myc-HisC.

2.2 重组哺乳动物细胞表达载体rpcDNA3.1(-)/Myc-



图 1 J链PCR产物电泳图, 大小为489 bp. 1: DNA marker DL2000; 2, 3: J链PCR产物.

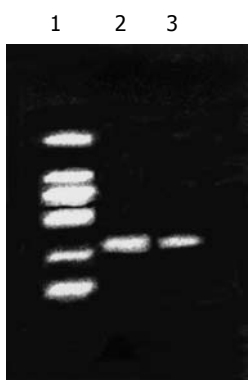


图 2 HNP-1 PCR产物电泳图, 大小为297 bp. 1: DNA marker DL2000; 2, 3: HNP-1 PCR产物.

HisC/J-HNP-1的筛选与鉴定 随机挑取8个阳性克隆提取质粒DNA, 用限制性内切酶*Bam*H I进行酶切鉴定(图3). 并对阳性克隆质粒进行DNA测序. 测序结果显示: 使用正向T7引物和反向BGH-rev引物对重组质粒*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*进行DNA序列测定, 插入片断为786 bp, 且有4个为正向插入. 并且在两个不同基因之间顺利插入了4个甘氨酸分子. 该结果表明: 所提质粒为*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*转化的阳性重组子(图4).

2.3 RT-PCR法检测J-HNP-1 mRNA的表达 用*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*中J-HNP-1插入子的特异性引物(P5, P6), 对经*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*转染并分别培养于含不同的胎牛血清(100 mL/L, 0.2 mL/L, 0 mL/L)的3种COS-7细胞的总RNA进行RT-PCR扩增, 结果均扩增出一条约786 bp大小的片段, 其长度与预测相符. 在相同RT-PCR扩增条件及加样量下, 同步转染空质粒*pcDNA3.1(-)/Myc-HisC*的COS-7细胞的总RNA无相应条带扩出(图5).

2.4 Western blot印迹检测J-HNP-1的表达 Western blot印迹检测结果表明: 经*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*转染的COS-7细胞可溶性蛋白及细胞的培养

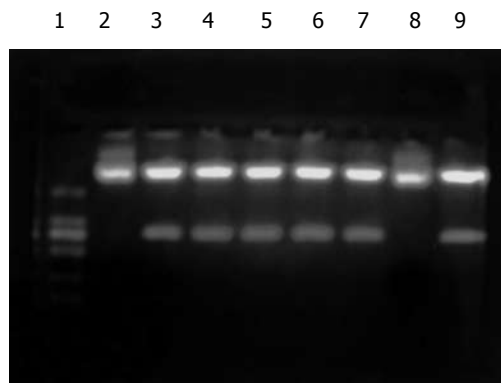


图 3 重组质粒*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*阳性克隆的酶切鉴定. 1: DNA marker DL2000; 2, 8: *rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1/Bam*H I 阴性克隆; 3-7, 9: *rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1/Bam*H I 阳性克隆.

上清在约24 kd处均有强反应条带显示. 对照组转染空质粒*pcDNA3.1(-)/Myc-HisC*的COS-7细胞和培养上清均未见相应条带显示(图6).

2.5 细胞可溶性蛋白及培养上清的抗菌活性检测 抗菌活性结果显示(图7), 在金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC 6538标准菌株的LB平板上, 阳性抗菌药LVF(5 μg/片)显示直径约为55 mm的抑菌圈; 转染*pcDNA3.1(-)/Myc-HisC*(即空质粒)的COS-7细胞的可溶性蛋白和培养上清未见抑菌圈显示; 而经*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*转染的COS-7细胞的可溶性蛋白和培养上清均呈现出明显的抑菌圈, 其直径分别为34 mm和43 mm. 该结果提示: 转染*rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1*的COS-7细胞表达和分泌的产物具有抗菌活性.

3 讨论

肠源性感染问题一直困扰着医学界, 人们尝试着各种途径去解决^[11-14]. 有研究分析腹部外科感染性疾病病原菌的构成比和药物敏感率的变化, 发现几乎所有菌种都是人体正常菌种, 条件致病菌和内源性细菌感染是腹部外科感染的特征^[15]. 74%的开腹外科患者感染并发症是肠道移位细菌引发^[16]. 肠道黏膜来源的条件病原微生物种类多, 包括需氧菌(如大肠杆菌、铜绿假单胞杆菌)、厌氧菌(如脆弱类杆菌)、真菌(如白色念珠菌). 在体内菌群失调的情况下, 条件致病菌首先在黏膜表面侵袭、局部定植, 然后尚有可能向体内其他部位播散, 通过直接或间接的方式, 引发全身炎症反应综合征. 研究表明各种病理情况导致免疫低下、黏膜组织缺血、缺氧, 进入肠上皮细胞的细菌数量明显增加^[17,18]. 其次, 由于耐药性以及免疫识别等问题, 上皮细胞内病原体能有效逃避体内免疫系统对其识别和杀灭. 再次, 由于各种原因例如细菌的变异, 抗生素的滥

GGA TCC ATG AAC CAT TTG CTT TTC TGG GGA GTC CTG GCG GTT TTT ATT AAG

BamH I

GCT GTT CAT GTG AAA GGT GGT GGT GGT GAACGT CGC TAT GGA ACC

甘氨酸分子

TGC ATC TAC CAG GGA TGC TGA GGA TCC(786 bp)

BamH I

图 4 重组质粒rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1中J-HNP-1插入子的DNA序列分析.

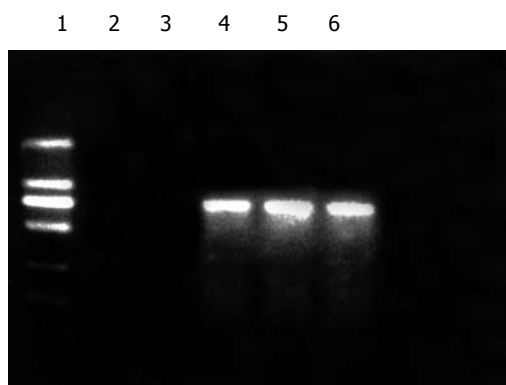


图 5 经rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1转染的COS-7细胞的PCR扩增产物. 1: DNA marker DL2000; 2: 正常COS-7; 3: pcDNA3.1(-)/Myc-HisC 转染; 4, 5, 6: 100 mL/L, 0.2 mL/L, 0 mL/L 胎牛血清培养.

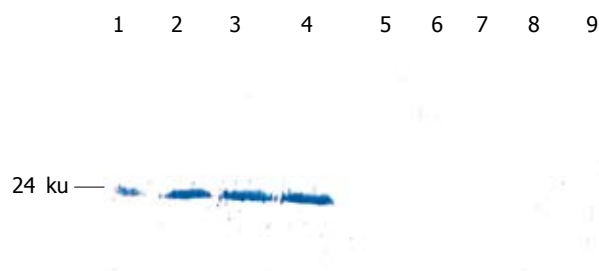


图 6 Western blot法分析转染rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1的COS-7细胞J-HNP-1的表达. 1, 2, 3, 4: rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1转染的COS-7细胞可溶性蛋白和培养上清; 5: 蛋白Marker; 6, 7, 8, 9: pcDNA3.1(-)/Myc-HisC(即空质粒)转染的COS-7细胞可溶性蛋白和培养上清.



图 7 经rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1转染的细胞可溶性蛋白及上清的抗菌活性试验. 1: 阳性抗菌药LVF; 2, 4: 转染pcDNA3.1(-)/Myc-HisC(即空质粒)的COS-7细胞的可溶性蛋白和培养上清; 3, 5: 经rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1转染的COS-7细胞的可溶性蛋白和培养上清.

用等等造成细菌对传统抗生素产生了耐药^[19-22]. 因此, 如何杀灭黏膜表面侵袭和黏膜细胞内的致病菌, 从源头上预防条件致病菌感染, 促使许多研究者尝试着各种途径去解决. 目前研究表明^[23,24], 内源性抗菌肽防御素(defensin)通过攻击靶细胞膜而杀菌, 具备同时杀灭真菌和细菌甚至HIV病毒的能力, 完全不同于传统抗生素, 不会产生耐药性.

防御素体内分布以中性粒细胞为主, 属胞内抗菌物质; HNP-1 (human neutrophil peptide-1)是人中性粒细胞的主要防御素分子, M_r 3 000-5 000, 主要存在于人中性粒细胞的溶酶体颗粒内, 是迄今发现的含量最多、活性最强的杀菌分子^[25]. HNP-1不但是哺乳动物中性粒细胞溶酶体颗粒内主要杀菌分子, 对革兰阳性和阴性菌、霉菌、厌氧菌、螺旋体、分枝杆菌以及包膜病毒如流感病毒、艾滋病毒等均有很强杀伤活性, 也是黏膜抗感染的重要防御成分^[26-28]. 因此将防御素用于临床感染性疾病的防治是国内外医学界感兴趣的课题. J链是一小分子多肽, 由黏膜和腺体细胞表达, 可调节IgA多聚体的形成. J链结合多聚IgA(pIgA)后抗原结合点的高效价, 适合于凝集细菌和病毒; 具有刺激补体旁路途径的潜力; 只有含J链的多聚体才显示出与多聚IgA受体(pIgAR)的高亲和性^[29]. 我们正是设想利用HNP-1具有的特点与J链的生物学特点, 将这两者进行优势互补. 中性粒细胞中的HNP-1仅能在该细胞内发挥杀菌作用, 对粒细胞以外的病原菌难以发挥作用; 而小肠黏膜分泌的其他天然防御素又由于其活性作用局限于细胞膜而对上皮细胞内的细菌难以发挥作用. 防御素主要存在于肠道、女性生殖道黏膜系统中, 而黏膜上皮细胞又有一个共同的特点, 即在细胞膜上具备pIgAR. 连有J链的IgA分子通过J链与pIgAR结合后, 将IgA分子转运入黏膜细胞内. 我们利用J链的生物学特点及HNP-1的抗菌优势以及黏膜上皮细胞的特点, 将J链与HNP-1融合, 使HNP-1分子的一端为J链, 另一端为防御素, 称之为pIgAR配体样杀菌肽. 希望这种外源性防御素借助于J链的作用被送入黏膜上皮细胞内, 使黏膜上皮获得象中性粒细胞一样的杀菌功能而杀灭细胞内移位菌. 从而有效地将HNP-1的杀菌功能拓展到上皮细胞内, 从而杀灭细胞内移位菌.

为了检测经翻译后表达出的蛋白质是否具有抗菌活性, 本试验应用纸片扩散法对同一样品的细胞可溶性蛋白和细胞培养上清进行抑菌试验, 其结果表明: 转染 $\text{rpcDNA3.1(-)/Myc-HisC/J-HNP-1}$ 重组质粒36 h的COS-7细胞的细胞可溶性蛋白和细胞培养上清对金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC6538菌有明显的抑制作用, 而且细胞培养上清的抗菌活性明显强于细胞可溶性蛋白. 可能原因分析: 在COS-7细胞中表达的是J-HNP-1的前体, 前体J-HNP-1需经翻译修饰后而分泌到细胞外才能成为成熟的J-HNP-1, 只有成熟的抗菌肽才表现其阳离子肽的特性而显示强抗菌活性; 由于在COS-7细胞中表达并分泌到胞外的是成熟的J-HNP-1, 成熟的J-HNP-1是一个含6个组氨酸的嵌合肽, 组氨酸为碱性氨基酸, 这就极大地增强了J-HNP-1/Myc-HisC嵌合肽的阳离子性, 从而显示其强抗菌活性. 推测根据是有研究报道^[30], 抗菌肽的抗菌机制是抗菌肽分子依靠其带正电荷的特点而吸附于微生物表面并插入微生物细胞膜而形成孔道. 本研究为防御素有效送入黏膜上皮细胞内发挥杀菌作用这一工作奠定了基础.

4 参考文献

- 王文奎, 袁克俭, 倪语星, 孙珍, 刘健, 陈小琳. 不同时期烧伤创面细菌生态学调查. 中华烧伤杂志 2001; 17: 80-82
- 孔繁林, 储从家, 管新龙, 罗次节. 临床分离菌的菌群分布和耐药性变迁. 中华医院感染学杂志 2003; 13: 272-274
- Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, Duinslaeger L, Cornelis P, Zizi M, Vanderkelen A. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1192-1202
- Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Muller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 2002; 74: 123-127
- 李恩全, 蔡胜利, 程若川. 腹部外科常见感染性疾病的病原菌及药敏试验研究. 中华普通外科杂志 1999; 14: 292-296
- Antinori S, Galimberti L, Magni C, Casella A, Vago L, Mainini F, Piazza M, Nebuloni M, Fasan M, Bonaccorso C, Vigevani GM, Cargnel A, Moroni M, Ridolfo A. *Cryptococcus neoformans* infection in a cohort of Italian AIDS patients: natural history, early prognostic parameters, and autopsy findings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 711-717
- 王中吉, 李纲, 陶莉, 江联萍, 何胜利, 章清. 恶性肿瘤患者的医院感染及其对策. 肿瘤防治杂志 2003; 10: 116-119
- C.W. 迪芬巴赫, G.S. 德维克特勒. PCR技术实验指南. 第1版. 北京: 科学出版社, 1998: 201-261
- 蔡绍晖, 杜军, 陈新年, 黄宁, 长瀨文彦, 长谷川高明, 王伯瑶. C端带Myc和多聚组氨酸双标记的重组人 β -防御素-2在COS-7细胞的转染表达. 生物医学工程学杂志 2003; 20: 255-259
- J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 888-897
- 白晓东, 刘贤华, 仝青英, 张韶峰. 肠道白色念珠菌易位体内机制的研究. 中华医院感染学杂志 2004; 14: 975-978
- 刘贤华, 白晓东, 栗永萍, 艾国平, 张韶峰. 带J链的 α -防御素-1的基因重组和表达载体的构建. 第三军医大学学报 2005; 27: 697-699
- Bai XD, Liu XH, Tong QY. Intestinal colonization with *Candida albicans* and mucosal immunity. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2124-2126
- 白晓东, 刘贤华, 仝青英. 烧伤后肠黏膜免疫组织细胞增殖分化的特征性研究. 中国临床康复 2004; 8: 2160-2161
- Johansen FE, Natvig Norderhaug I, Roe M, Sandlie I, Brandtzaeg P. Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1701-1708
- O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998; 42: 29-35
- Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999; 473: 11-30
- Wells CL, VandeWesterlo EM, Jechorek RP, Erlandsen SL. Effect of hypoxia on enterocyte endocytosis of enteric bacteria. *Crit Care Med* 1996; 24: 985-991
- 辛德利, 侯安存, 魏田力, 李靖, 马红秋. 肺炎支原体对大环内酯类抗生素耐药的分析. 中华儿科杂志 2005; 43: 212
- 童乐艳, 许淑珍. 肠球菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制的研究进展. 临床和实验医学杂志 2005; 4: 34-38
- 王德, 杨虹, 苏琪, 吴志成. 铜绿假单胞菌感染及抗生素耐药分析. 中国实验诊断学 2005; 9: 362-363
- 姚成, 余泽波, 肖永红. 肺炎链球菌对大环内酯类抗生素耐药机制研究. 中国临床药理学杂志 2004; 20: 266-269
- Mackewicz CE, Yuan J, Tran P, Diaz L, Mack E, Selsted ME, Levy JA. α -Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* 2003; 17: F23-F32
- Chang TL, Francois F, Mosoian A, Klotman ME. CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from α -defensin-1 HIV inhibition. *J Virol* 2003; 77: 6777-6784
- Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russell JP, DeBerardinis RJ, Ruchelli E, Bevins CL. Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 4038-4045
- 黄宁, 唐彬, 吴琦, 王伯瑶. 防御素基因转导人气管上皮细胞的实验研究. 生物医学工程学杂志 2000; 17: 295-297
- Cole AM, Lehrer RI. Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1463-1473
- 王永杰, 齐名, 李保全, 邵海枫, 宗永兰, 武建国. 人中性粒细胞防御素单克隆抗体制备及初步应用. 临床检验杂志 2004; 22: 14-16
- 胡正强, 江咏梅, 蔡美英. SIgA基础与临床研究进展. 免疫学杂志 2003; 19: 75-78
- Lohner K, Latal A, Lehrer RI, Ganz T. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 1997; 36: 1525-1531

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

端粒酶逆转录酶肽-核酸病毒样颗粒疫苗的制备及免疫原性鉴定

郭红, 郝嘉, 吴超, 房殿春

郭红, 房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038

郝嘉, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院心外科 重庆市 400037

吴超, 中国人民解放军第三军医大学临床微生物及免疫教研室 重庆市 400038

郭红, 女, 1971-11-22生, 湖南省湘潭市人, 汉族, 2001年第三军医大学硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事消化道肿瘤免疫防治方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30400208

通讯作者: 郭红, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩西南医院, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心. haoguo11@yahoo.com

电话: 023-66930172

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-10-11

Construction of virus-like particle peptide-nucleic acid vaccine of human telomerase reverse transcriptase and identification of its immunogenicity

Hong Guo, Jia Hao, Chao Wu, Dian-Chun Fang

Hong Guo, Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Jia Hao, Department of Heart Surgery, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Chao Wu, Department of Clinical Microbiology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30400208

Correspondence to: Hong Guo, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. haoguo11@yahoo.com

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-10-11

Abstract

AIM: To construct a novel virus-like particle peptide-nucleic acid vaccine (VPNV) of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), and to identify its immunogenicity and transfection activity.

METHODS: Cationic antigenic peptide $K_{18}P_9$ was synthesized and purified, then human GM-CSF and TERT gene were cloned into eukaryotic expression vector pTCAE. The peptide was combined with the nucleic acid vaccine to make VPNV, which were transfected into eukaryotic cells COS-7. The immunogenicity of hGM-CSF and hTERT were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting.

RESULTS: Restriction enzyme digestion and sequen-

ce analysis confirmed that hGM-CSF and hTERT were cloned into pTCAE and the nucleic acid vaccine of hTERT gene was constructed successfully. Under electronic microscopy, nucleic acid was packaged by peptide, forming into virus-like particle. Furthermore, the transfection activity of VPNV and the immunogenicity of hGM-CSF and hTERT could reach 78.5% as compared with the positive controls.

CONCLUSION: The VPNV is successfully constructed, and its immunogenicity is also identified.

Key Words: Human telomerase reverse transcriptase; Virus-like particle vaccine; Cytotoxic T-lymphocytes

Guo H, Hao J, Wu C, Fang DC. Construction of virus-like particle peptide-nucleic acid vaccine of human telomerase reverse transcriptase and identification of its immunogenicity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2645-2649

摘要

目的: 设计人端粒酶逆转录酶(hTERT)的新型病毒样颗粒疫苗, 并鉴定其表达蛋白的免疫原性和疫苗转染效率。

方法: 合成阳离子抗原肽 $K_{18}P_9$, 同时将人粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)和hTERT的克隆入真核双表达载体pTCAE中, 再将多肽和核酸疫苗结合于同一疫苗颗粒, 并将其转染入真核细胞内, ELISA法和免疫印迹法检测hGM-CSF和hTERT的免疫原性, 同时评价疫苗的转染效率。

结果: 酶切及测序结果证实已成功构建含hGM-CSF和hTERT的载体pTGH, 电镜等结果证实核酸被包装肽包裹形成病毒样颗粒, ELISA法和免疫印迹法证实疫苗在体外对真核细胞的转染效应以及hGM-CSF和hTERT的免疫原性, 与阳性对照DOTAP组比较, 疫苗转染效率约可达78.5%。

结论: 成功构建了具有免疫原性的hTERT肽-核酸病毒样颗粒疫苗。

关键词: 端粒酶逆转录酶; 病毒样颗粒疫苗; 细胞毒T淋巴细胞

郭红, 郝嘉, 吴超, 房殿春. 端粒酶逆转录酶肽-核酸病毒样颗粒疫苗的制

备及免疫原性鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2645-2649
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2645.asp>

0 引言

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)为人端粒酶催化亚单位,是癌细胞永生化的必要途径,在消化道恶性肿瘤中大多过度表达^[1-5],且具有高度保守性^[6-11],因此如以hTERT为靶标制备消化道肿瘤疫苗,将有望激发机体特异性抗肿瘤的免疫应答.利用肿瘤疫苗有效激活特异性细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),是实现肿瘤主动免疫治疗的关键所在^[12-17].目前高效的新型CTL肿瘤疫苗仍处于积极的研究和探索中.我们结合基因治疗领域富正电荷肽类DNA转运载体的进展,将正电荷包装肽与带负电荷质粒DNA结合,并同时采用hTERT全长抗原蛋白及其低亲和力表位异形肽p572Y^[18-20],以人粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony stimulating factor, hGM-CSF)为免疫佐剂^[21,22],制备并鉴定了新型的病毒样颗粒肽-核酸疫苗(virus-like particulate peptide-nucleic acid vaccine, VPNV),为进一步探索其抗肿瘤免疫作用奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 以AB431A型多肽合成仪(Pelin Elmer公司)按照标准Fmoc方案合成阳离子抗原肽(K)₁₈YLFFYRKSV(其N端含18个赖氨酸, C端为P572Y, K₁₈P₉),用ÄKTA explorer 100型中压液相色谱仪纯化, Delta 600型反向高压液相色谱仪鉴定纯度,纯度>95%; API 2000LC/MS/MS型质谱仪测定相对分子质量为3528.8. 纯化产物冻干, -70℃冻存储备. 以pcDNA3.1-GM-CSF为模板扩增人GM-CSF cDNA,并将其克隆入双表达真核载体pTCAE^[23]的*Bgl* II-*Eco* R I表达盒中,构建重组质粒pTG. 再将克隆有人端粒酶催化亚单位hTERT cDNA的质粒pGRN145(美国Geron公司惠赠)用*Eco* R I酶切后克隆入载体pET28a中,再行*Sal* I-*Bgl* II消化,并将含有hTERT的片段接入pTG的*Sal* I-*Bam* H I (*Bgl* II同尾酶)表达盒中,形成hGM-CSF和hTERT双表达的重组质粒,并命名为pTGH. 酶切鉴定pTGH并送公司测序. K₁₈P₉多肽分子中每个赖氨酸(K)的氨基(NH₄⁺)携带一个正电荷,故每个多肽K₁₈P₉分子携带18个正电荷;而DNA分子中每个脱氧核糖核酸的平均分子量为330 Da,含1个磷酸根(PO₄⁻),携带一个负电荷.因此,制备本疫苗时二者正负电荷的比值*r*反映了质粒与肽的用量关系为: $M_{肽}: M_{DNA} = r \times 3528.8/18 : 330/1$, 即 $M_{肽} = 0.594 \times r \times M_{DNA}$, 同时可通过DNA阻滞试验和DNase I保护试验获得最佳*r*值,以确定制备

疫苗时肽与质粒的最佳相对用量.

1.2 方法 参照文献[24]方案制备疫苗,将不同量的阳离子抗原肽和2 μg质粒DNA分别溶于50 μL的150 mmol/L的NaCl水溶液中,将肽溶液逐滴滴入混旋的DNA溶液中,5 μL/min,滴定完毕后产物继续混旋30 min,室温静置60 min,形成不同电荷比的多肽包裹的DNA聚合物.制备*r*值分别为0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0的不同阳离子肽-DNA聚合物,各取3 μL样品于8 g/L琼脂糖凝胶电泳加样后电泳,观察不同疫苗产物的泳动情况.取制备产物50 μL,与DNase I (Sigma)在1×工作液(10 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L MgCl₂), 37℃孵15 min.加入2 μL 0.5 mol/L的EDTA灭活,再加入等体积25 g/L胰酶溶液消化40 min,释放未降解的质粒DNA,经2次1:1酚氯仿抽提、乙醇沉淀后溶于水中.8 g/L琼脂糖凝胶电泳后,观察质粒留存情况.6孔培养板内将COS-7细胞单层培养至覆盖面积30%.更换培养液为2 mL无血清培养基,加入100 μL制备好的疫苗,同时用DOTAP法将5 μg质粒pTGH转入另组细胞,孵育4 h,更换完全培养基培养48 h,收获细胞.用ELISA检测hGM-CSF的表达水平,由此分析疫苗体外转染效应的高低.用常规Western方案,以兔抗人hTERT抗体,以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG为二抗,经二氨基联苯胺(3, 3-diaminobenzidine, DAB)化学显色,检测hTERT的表达.将新鲜制备的疫苗15 μL滴于200目铜网的碳膜上,室温5 min.吸水纸吸干,晾干30 s.以20 g/L磷酸钨盐溶液负染30 s,吸水纸吸干,晾干30 s.80 KV透射电镜观察.

2 结果

我们按照标准Fmoc方案合成阳离子双功能线性肽K₁₈P₉,其中由18个多聚赖氨酸构成的K18可形成一个正电荷富集的DNA结合区,而P9则为人端粒酶逆转录酶(hTERT)的隐性表位异形肽P572Y(YLFFYRKSV).多肽经中压液相色谱纯化,高压液相色谱鉴定,其纯度达到国际多肽试验标准;相对分子质量以质谱鉴定,经质谱算法测定*M*为3528,与理论计算值基本相符,证实合成纯化产物为目标多肽K₁₈P₉(图1).PCR扩增人GM-CSF,产物大小与预期453 bp相符(泳道1),并经*Bgl* II和*Eco* R I消化后克隆于双表达载体pTCAE相应位点,产生重组质粒pTG. hTERT经*Sal* I和*Bgl* II酶切,回收片段为3453 bp,与预期相符(泳道4),将其克隆入pTG的*Sal* I和*Bam* H I (*Bgl* II的同尾酶)之间,产生重组质粒pTGH. pTG和pTGH经*Bgl* II和*Eco* R I酶切鉴定(泳道3、2),pTG所得片段大小与hGM-CSF一致,pTGH所得片段分别为6398 bp, 3453 bp(泳道4)、726 bp和453 bp(泳道1),与预期一致. pTGH中hGM-CSF和

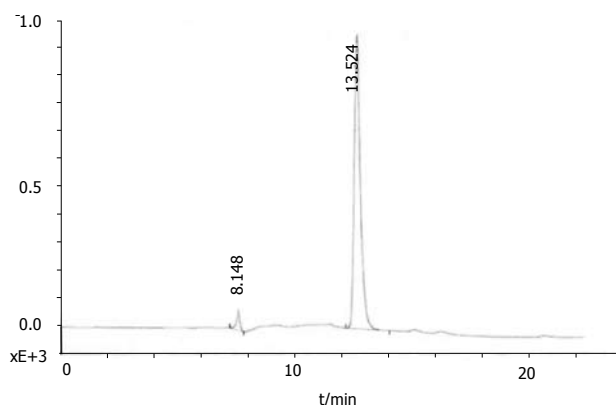
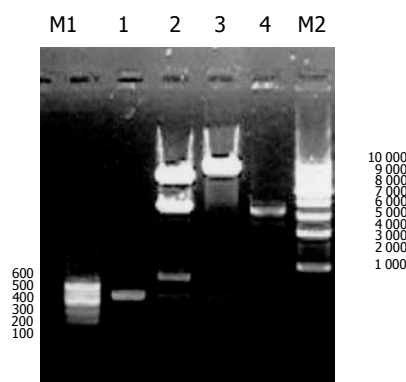
图 1 $K_{18}P_9$ 的高压液相色谱鉴定.

图 2 质粒pTGH的鉴定.

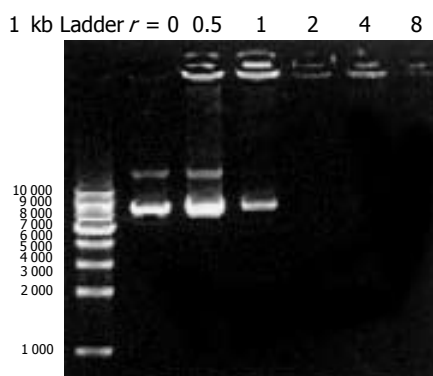


图 3 DNA凝胶阻滞分析.

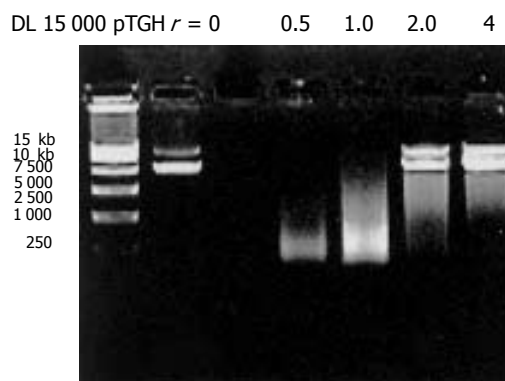
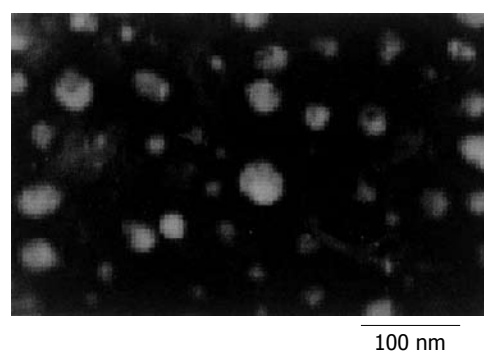


图 4 DNase I 保护试验.

hTERT测序分别与Genebank中人GM-CSF和TERT序列一致(数据未列出), 证实pTGH构建成功. 采用DNA阻滞试验分析不同量多肽与DNA发生完全阻滞质粒泳动所需的最小 r 值(图3), 当 $r < 2$ 时, 阳离子肽-核酸疫苗的泳动被部分阻滞, 随着 r 值的逐渐增大, 泳动的聚合物数量迅速减少, 滞留在加样孔中的疫苗的DNA量相应增多. $r > 2$ 时, 聚合物被完全阻滞, 提示质粒DNA被充分包装所需的最小 r 值为2. 以DNase I 保护试验分析聚合物中多肽有效保护质粒DNA, 避免受DNase酶降解所需的最小 r 值(图4), 当 $r = 0$ 时, 游离的DNA被DNA酶完全降解; 当 $r = 0.5$ 和 1.0 时, 质粒DNA不能被阳离子肽有效保护; 但随着 r 值的增大被DNase I 酶解的片段有所增大, 保护效应逐渐增加, 在 $r \geq 2.0$ 时出现了完全保护的DNA条带, 因此确定DNA有效保护所需最小 r 值为2.

2.1 细胞转染与表达分析 为鉴定肽-DNA聚合物在体外对哺乳细胞的转染效应以及双表达质粒编码hGM-CSF和hTERT表达后的免疫原性, 分别以 r 值为0, 1, 2, 4, 8的疫苗转染COS-7, 以DOTAP法转染裸质粒pTGH作为阳性对照, 通过ELISA法检测转染细胞上清中的GM-CSF的表达量, 从而评价其转染效应; 同时采用Western杂交分析hTERT表达的有效性. 结果发现当 $r = 4$ 时, 可见有较高水平的GM-CSF表达, 即此时转染效率最高, 与阳性对照DOTAP组比较, 疫苗转染效率

图 5 $r = 4$ 时VPNV透射电镜照片.

约为其78.5%, 当 r 为2或8时, GM-CSF表达水平明显下降. 本实验证实了双表达质粒编码的GM-CSF基因和hTERT基因均能在真核细胞内有效表达, 有望诱导较理想的免疫应答.

2.2 疫苗颗粒透射电镜分析 VPNV能否通过细胞核膜是基因表达的关键环节. 以 $r = 2.0$ 时制备疫苗, 质粒DNA被阳离子肽充分包裹, 能有效抵抗DNA酶的降解, 这时才具备基因转染的能力, 但电镜下直径较大, 致使其转染效率较低, 因此相应细胞上清中的GM-CSF水平也较低; 当 $r = 4.0$ 时, 形成的病毒样颗粒呈大小均一的近圆形颗粒, 且直径较小, 约10-40 nm, 绝大多数颗粒直径小于25 nm, 如图5显示. 当 $r = 8$ 时, 因过多的多肽包裹DNA, 使颗粒的直径更小而致密.

3 讨论

阳离子肽类DNA转运载体(cationic peptides DNA delivery systems)是基因治疗领域中一类倍受关注的技术^[23-28],他由一些富含正电荷氨基酸的多肽组成,可通过电性中和作用与富含负电荷的质粒DNA发生聚合并压缩,可将直径约数百纳米且松散的质粒DNA缩聚成几十纳米的致密颗粒,从而易于被真核细胞摄入,并可保证DNA不被核酸酶降解,以达到基因转染的目的。我们以端粒酶逆转录酶hTERT为靶标,合成其隐性表位异形肽P572Y加多聚赖氨酸的多肽,并制备含有编码hTERT和hGM-CSF基因的双表达真核质粒,使二者结合形成一种新型的病毒样颗粒肽-核酸疫苗VPNV。当二者正负电荷的比值 $r \geq 2$ 后,在DNA阻滞试验中阳离子抗原肽一方面中和了DNA的电荷;另一方面,使DNA分子在电场中泳动的阻力增加,从而有效包装质粒DNA;同时也保护质粒DNA免受DNase I的破坏。有关阳离子肽类DNA转运载体的研究表明,阳离子肽与质粒DNA的结合,取决于多肽内含赖氨酸等碱性氨基酸的数目、多肽长度及其在溶液中的构象等因素,还与所在溶液的离子强度有关^[29,30]。VPNV经负染后裸质粒可见结构松散的闭环质粒分子,缠绕折叠呈不规则形,骨架疏松呈灰黑色高密度影,此因质粒分子内部附着较多染料钨盐所致;随着多肽/核酸比例增加,二者形成的聚合物就越致密,最终形成直径约几十纳米的致密圆形颗粒,结构致密呈低密度影(灰白色),其周围则为高密度影(灰黑色),此因多肽和质粒聚缩成内部空隙少的致密颗粒,无法附着钨盐,而周围的碳膜上却吸附了相对较多的钨盐故呈高密度影。这种因电性中和作用而形成的致密颗粒,将有利于被抗原递呈细胞摄入加工^[31]。结合DNA阻滞实验、电镜以及体外转染效应试验的结果分析:当 $r = 2$ 时,多肽可完全中和质粒的负电荷,并形成聚合物,此时才具备基因转染的能力,但此时聚合物较松散,直径较大(电镜);当 $r = 4.0$ 时,VPNV较易于被细胞摄入,进入胞内的VPNV在溶酶体中被蛋白酶降解,可释放出质粒DNA,部分DNA可转移入胞质和胞核内,进而被转录和翻译,由此出现较高的转染效率,相应细胞上清中也可检测到较高水平的GM-CSF;当 $r = 8.0$ 时,颗粒更致密,但这样的颗粒进入胞内后,其中的质粒可能反而不易释放处理,进而阻碍了GM-CSF的表达,使得细胞上清中的GM-CSF水平降低。基于上述结果,决定了在下一步的疫苗制备中采用 $r = 4.0$,以保证该疫苗在体内具备一定的转染活性。本研究为下一步研究体内诱发特异性CTL应答奠定了基础,该疫苗将有望激发机体特异性抗肿瘤的免疫应答。

4 参考文献

- 1 Yang SM, Fang DC, Luo YH, Lu R, Battle PD, Liu WW. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 876-882
- 2 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 鲁荣, 门荣甫, 刘为纹. 大肠癌组织端粒酶活性的检测及其意义. *中华内科杂志* 1998; 37: 742-744
- 3 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 鲁荣, 刘为纹. 原发性肝癌端粒酶活性的检测及临床意义. *免疫学杂志* 1997; 13: 193-195
- 4 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 杨金亮, 刘为纹. 不同病变胃黏膜端粒酶活性及其亚单位的检测. *癌症* 2001; 20: 23-27
- 5 陈陵, 杨仕明, 蔡永国, 房殿春, 李晶晶, 罗元辉. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 528-533
- 6 Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* 2002; 21: 674-679
- 7 Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 828-839
- 8 Frolkis M, Fischer MB, Wang Z, Lebkowski JS, Chiu CP, Majumdar AS. Dendritic cells reconstituted with human telomerase gene induce potent cytotoxic T-cell response against different types of tumors. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 239-249
- 9 Amarnath SM, Dyer CE, Ramesh A, Iwuagwu O, Drew PJ, Greenman J. In vitro quantification of the cytotoxic T lymphocyte response against human telomerase reverse transcriptase in breast cancer. *Int J Oncol* 2004; 25: 211-217
- 10 Verra NC, Jorritsma A, Weijer K, Ruizendaal JJ, Voordouw A, Weder P, Hooijberg E, Schumacher TN, Haanen JB, Spits H, Luiten RM. Human telomerase reverse transcriptase-transduced human cytotoxic T cells suppress the growth of human melanoma in immunodeficient mice. *Cancer Res* 2004; 64: 2153-2161
- 11 Gordan JD, Vonderheide RH. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy* 2002; 4: 317-327
- 12 Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 2004; 113: 1515-1525
- 13 Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 630-641
- 14 Boyd D, Hung CF, Wu TC. DNA vaccines for cancer. *IDrugs* 2003; 6: 1155-1164
- 15 Odunsi K, Lele S, Savalgi R. Vaccine therapy for cancer: fact or fiction? *Surg Technol Int* 2004; 13: 39-47
- 16 Radvanyi L. Discovery and immunologic validation of new antigens for therapeutic cancer vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133: 179-197
- 17 Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2415-2432
- 18 Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaec-Grisicelli A, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2004; 113: 425-433
- 19 Scardino A, Gross DA, Alves P, Schultze JL, Graff-Dubois S, Faure O, Tourdot S, Chouaib S, Nadler LM, Lemonnier FA, Vonderheide RH, Cardoso AA, Kosmatopoulos K. HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* 2002; 168: 5900-5906
- 20 Hernandez J, Schoeder K, Blondelle SE, Pons FG, Lone YC, Simora A, Langlade-Demoyen P, Wilson DB, Zanetti M. Antigenicity and immunogenicity of peptide analogues of a low affinity peptide of the human telomerase reverse transcriptase

- tumor antigen. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2331-2341
- 21 Chang DZ, Lomazow W, Joy Somberg C, Stan R, Perales MA. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: an adjuvant for cancer vaccines. *Hematology* 2004; 9: 207-215
- 22 Ullenhag GJ, Frodin JE, Mosolits S, Kiaii S, Hassan M, Bonnet MC, Moingeon P, Mellstedt H, Rabbani H. Immunization of colorectal carcinoma patients with a recombinant canarypox virus expressing the tumor antigen Ep-CAM/KSA (ALVAC-KSA) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor induced a tumor-specific cellular immune response. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2447-2456
- 23 Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol* 1997; 71: 169-178
- 24 Liu G, Molas M, Grossmann GA, Pasumarthi M, Perales JC, Cooper MJ, Hanson RW. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J Biol Chem* 2001; 276: 34379-34387
- 25 Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 33-37
- 26 Cho YW, Kim JD, Park K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 721-734
- 27 Thomas M, Klibanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62: 27-34
- 28 Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 2001; 229: 1-21
- 29 Vaysse L, Arveiler B. Transfection using synthetic peptides: comparison of three DNA-compacting peptides and effect of centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1474: 244-250
- 30 Ewert K, Slack NL, Ahmad A, Evans HM, Lin AJ, Samuel CE, Safinya CR. Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level. *Curr Med Chem* 2004; 11: 133-149
- 31 Sheng KC, Pietersz GA, Wright MD, Apostolopoulos V. Dendritic cells: activation and maturation-applications for cancer immunotherapy. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1783-1800

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 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004 年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”。该书于2004年7月由北京大学出版社出版。

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种。本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究。

胰腺癌组织 Survivin 与 Ki-67 的表达及其意义

陈晓星, 倪金良, 郝波, 张国新, 施瑞华, 王学浩

陈晓星, 倪金良, 郝波, 张国新, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

王学浩, 南京医科大学第一附属医院肝胆外科 江苏省南京市 210029

陈晓星, 男, 1959-09-03生, 江苏省南京市人, 汉族, 1989年上海第二医科大学硕士研究生毕业, 主任医师, 主要从事胆胰疾病的基础和内镜诊治的研究。

通讯作者: 陈晓星, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科, chenxiao@public1.ptt.js.cn

电话: 025-83718836-6255

收稿日期: 2005-08-06 接受日期: 2005-08-26

Expression of Survivin and Ki-67 protein in human pancreatic cancer tissues and their clinical significances

Xiao-Xing Chen, Jin-Liang Ni, Bo Hao, Guo-Xin Zhang, Rui-Hua Shi, Xue-Hao Wang

Xiao-Xing Chen, Jin-Liang Ni, Bo Hao, Guo-Xin Zhang, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Xue-Hao Wang, Department of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Xing Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. chenxiao@public1.ptt.js.cn

Received: 2005-08-06 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To investigate the expression of an apoptosis inhibiting protein Survivin and a proliferation marker, Ki-67 in human pancreatic cancer tissues and their clinical significances.

METHODS: The expression levels of Survivin and Ki-67 protein were detected by immunohistochemical assay in human pancreatic cancer ($n = 86$) and their corresponding non-cancerous tissues ($n = 78$), and the clinicopathological features were comparatively analyzed.

RESULTS: Survivin protein wasn't expressed in tissues adjacent to either human pancreatic carcinomas or benign islet cell tumors, and the rate of Survivin expression in pancreatic carcinomas was 87.9%, which was significantly higher than that in islet carcinomas (12.7%) or benign islet tumors (5.2%) ($P < 0.05$). The level of Survivin expression was correlated with the differentiated level and lymph node metastasis of human pancreatic carcinoma. Ki-67 protein was mainly expressed

in human pancreatic carcinomas with a rate of 94.4%, and it was correlated with the differentiated level of pancreatic carcinoma ($P < 0.05$). The expression of Survivin and Ki-67 were highly correlated in human pancreatic carcinoma ($r = 0.87$).

CONCLUSION: Survivin and Ki-67 were over-expressed in human pancreatic carcinoma and were related to the pathological features. Survivin may be a marker to reflect the bad prognosis of pancreatic carcinoma.

Key Words: Survivin; Ki-67; Pancreatic carcinoma

Chen XX, Ni JL, Hao B, Zhang GX, Shi RH, Wang XH. Expression of Survivin and Ki-67 protein in human pancreatic cancer tissues and their clinical significances. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(22):2650-2653

摘要

目的: 探讨Survivin和Ki-67在胰腺癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系。

方法: 采用免疫组织化学技术检测各期胰腺癌86例及癌旁组织78例中Survivin和Ki-67的表达水平, 并结合病理特征进行分析。

结果: 胰腺癌旁组织或良性肿瘤旁组织不表达Survivin蛋白。胰腺癌组织Survivin阳性表达率为87.9%, 显著高于胰岛细胞癌(12.7%)或胰岛细胞瘤(5.2%)($P < 0.01$), 而且Survivin表达程度与肿瘤分化程度、淋巴结转移相关($P < 0.05$)。Ki-67蛋白在胰腺癌组织中阳性表达率为94.4%, 显著高于胰岛细胞癌或胰岛细胞瘤组($P < 0.01$), 并与胰腺癌组织分化程度相关($P < 0.05$)。两种蛋白表达有高度相关性($r = 0.87$)。

结论: Survivin和Ki-67在胰腺癌组织中过表达, 并且与胰腺癌病理特征密切相关。Survivin可能是反应胰腺癌预后不良的指标。

关键词: Survivin; Ki-67; 胰腺癌

陈晓星, 倪金良, 郝波, 张国新, 施瑞华, 王学浩. 胰腺癌组织Survivin与Ki-67的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2650-2653
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2650.asp>

0 引言

Survivin是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的最小成员^[1], 可

通过与微管蛋白结合, 以及抑制细胞色素C自线粒体的释放, 干扰凋亡效应蛋白caspase-9的激活或直接与caspase-3及caspase-7结合而使凋亡级联终止, 从而抑制细胞凋亡; 还可能促进血管内皮生长因子的表达, 与肿瘤的发生及肿瘤的某些恶性表型有关^[2]. Ki-67基因表达Ki-67核蛋白, 存在于增殖细胞的各期之中, 常用来标记正常或肿瘤细胞群的增殖细胞. Ki-67所代表的增殖指数与某些肿瘤的病程和预后密切相关. Survivin和Ki-67与胰腺癌的临床特征及生物学行为的关系研究较少, 我们的研究如下.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌石蜡切片86例, 男38例, 女48例, 中位年龄54.6岁, 包括导管细胞癌64例, 胰岛细胞癌8例, 胰岛细胞瘤14例, 另有癌旁或瘤旁组织78例. 胰腺导管细胞癌组高分化25例, 中分化17例, 低分化22例; 肿瘤位于胰头部41例, 胰体尾部23例; 淋巴结转移33例, 无淋巴结转移31例. 术前均未行放疗、化疗及免疫治疗等. 抗人Survivin多抗购自Santa-Cruze公司; 抗人Ki-67多抗购自长岛公司; HRP标记通用型二抗、DAB显色液为长岛公司产品; 枸橼酸盐缓冲液、PBS缓冲液为迈新公司产品.

1.2 方法 Survivin与Ki-67的免疫组化采用S-P一步法. 石蜡包埋切片厚度4 μm , 常规脱蜡, 梯度酒精水化, 枸橼酸盐缓冲液微波加热修复抗原, 封闭, 一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗涤, 二抗常温作用1 h, PBS洗涤, DAB显色液作用5 min后切片浸于自来水中终止反应, 苏木素复染细胞核, 中性树胶封片. Survivin一抗的工作浓度为1:200; Ki-67在胰岛细胞瘤和胰岛细胞癌的工作浓度为1:5, 在导管细胞癌的工作浓度为1:25. 阳性表达程度通过计数高倍视野下1 000个特定细胞的染色结果判定, 分析Survivin、Ki-67两种蛋白在64例胰腺癌组织中表达的相关性, 由SAS统计软件进行相关性分析.

2 结果

2.1 Survivin的表达 Survivin蛋白在癌旁及瘤旁组织无表达, 在胰岛细胞瘤、胰岛细胞癌和胰腺导管细胞癌的细胞质中表达, 表达率分别为5.2%, 12.7%, 87.9%(表1). 胰腺导管细胞癌Survivin的表达率显著高于胰岛细胞癌和胰岛细胞瘤($P<0.01$). 胰岛细胞癌和胰腺导管细胞癌中Survivin的表达率显著高于胰岛细胞瘤, ($P<0.05$, 图1).

2.2 Ki-67的表达 Ki-67阳性染色在细胞核部位. Ki-67在癌旁组织中无表达, 在胰岛细胞瘤中几乎不表达, 在胰岛细胞癌中的表达水平也较低, 为4.6%. Ki-67在胰腺导管细胞癌中的表达率为94.4%, 明显高于胰岛细胞

表1 胰腺导管细胞癌组织Survivin和Ki-67蛋白的表达 (%)

指标	<i>n</i>	Survivin	Ki-67
年龄	≥ 55	35	83.6
	< 55	29	89.4
性别	男	30	86.1
	女	34	88.5
分化程度	高	25	63.6
	中	17	71.2 ^a
	低	22	94.3
部位	胰头	41	88.2
	胰尾部	23	86.1
淋巴结转移	有	33	93.1 ^a
	无	31	78.6

^a $P<0.05$.

癌($P<0.01$, 表1, 图1). Ki-67的表达与Survivin的表达在胰腺导管细胞癌中呈正相关($r=0.87$).

2.3 Survivin、Ki-67与胰腺癌临床病理特征的关系 Survivin与Ki-67蛋白的表达与年龄、性别及癌组织的部位无关, ($P>0.05$). Survivin的表达与胰腺癌的分化程度呈相反的关系: 胰腺癌分化程度越高, Survivin的表达水平越低, 低分化组明显高于中分化组和高分化组($P<0.05$, 表1), 而中分化组与高分化组之间比较无差异. 胰岛细胞癌的Survivin表达水平高于胰岛细胞瘤. Ki-67在胰腺癌的表达也与分化程度有关: 分化程度越高则表达水平越低, 3组之间比较均有差异($P<0.05$). 分化程度良好的胰岛细胞瘤不表达Ki-67, 分化程度和恶性程度介于胰腺癌和胰岛细胞瘤的胰岛细胞癌呈现Ki-67低表达. Survivin在有淋巴结转移的胰腺导管细胞癌组织中表达高于无淋巴结转移者($P<0.05$); 而Ki-67则无此特征.

3 讨论

胰腺癌的发病率近年来有逐年增加的趋势. 凋亡的调节基因有bcl-2、P53和c-myc等, 而Survivin基因具有很强的抑制凋亡的作用, 因此在肿瘤的发生发展中具有重要意义^[3-7]. Survivin作用于凋亡的最后一个步骤, 他与激活的caspase-3和caspase-7结合, 阻断细胞的凋亡过程. 同时, Survivin还有调节细胞分裂和血管保护的作用. Satoh *et al*^[8]用免疫组化、RT-PCR等方法对胰腺癌细胞4株, 正常胰腺组织5例, 慢性胰腺炎12例, 胰腺癌组织26例, 导管内乳头状黏液瘤(IPMT)13例的16个病灶进行Survivin与胰腺癌关系的研究, 结果胰腺癌阳性率为76.9%, 非癌组织为阴性, IPTM为56.3%, 而且与凋亡指数(AI)呈负相关. 作者认为Survivin在胰腺癌发生的早期阶段即可能通过抑制癌细胞的凋亡而在肿瘤的发生和发展中起重要作用. Sarela *et al*^[9]研究发现52例胰腺癌中Survivin的阳性表达率为88%, P53为54%, bcl-2为12%, Survivin的表达与增殖和凋亡指数均有

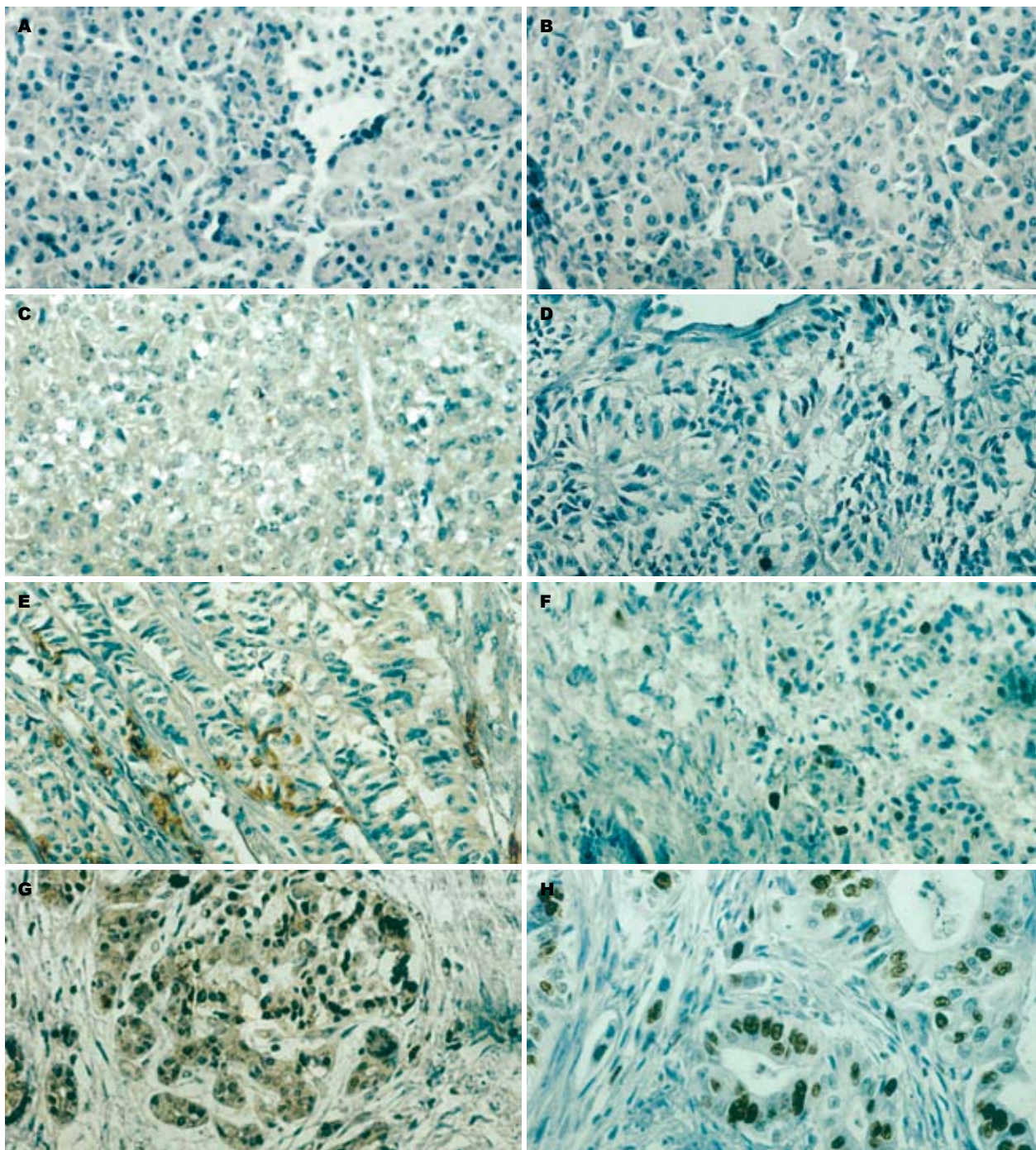


图1 胰腺组织Survivin、Ki-67的表达(SP×200)。A: 癌旁组织Survivin; B: 癌旁组织Ki-67; C: 胰岛细胞癌组织Survivin; D: 胰岛细胞癌组织Ki-67; E: 胰岛细胞癌组织Survivin; F: 胰岛细胞癌组织Ki-67; G: 胰腺导管细胞癌组织Survivin、Ki-67; H: 胰腺导管细胞癌组织Ki-67。

关。我们的结果表明,胰腺导管细胞癌组织中Survivin蛋白表达阳性率为87.9%,显著高于胰岛细胞癌和胰岛细胞瘤组($P<0.01$),而癌旁组织均阴性,与Sato *et al*^[8]和Sarela *et al*^[9]的研究类似。在胰腺导管癌组中Survivin表达程度与肿瘤分化程度、淋巴结转移相关($P<0.05$),即分化程度越低,Survivin表达水平越高,有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组,因为分化程度和淋巴结转移可能与预后相关,推测Survivin表达水平可能与预后有关。国内几组研究^[10-13]Survivin蛋白的表达与胰腺癌临床病理因素的关系结果不一,但Survivin在胰腺癌中

高表达是一致的。而Survivin表达与COX-2和bcl-2表达明显相关^[11,12],说明凋亡的途径有多条,而Survivin调节凋亡与其他凋亡调节因子有协同作用。Survivin在胰岛细胞癌和胰岛细胞瘤组呈低表达,可能反映了癌变早期细胞增殖旺盛、凋亡受抑制的状态。Ki-67在胰腺导管细胞癌中的表达率为94.4%,明显高于胰岛细胞癌($P<0.01$),而胰岛细胞瘤组织则无表达,表明Ki-67提示细胞增殖活跃。Ki-67可能更适于判断“癌或非癌”,而Survivin可能更适于了解组织不同的凋亡水平。Survivin与胰腺癌细胞凋亡的关系有待于进一步的

研究. Survivin与Ki-67在导管细胞癌中的表达有良好的相关性, 表明两种蛋白在调控癌细胞的增殖、有丝分裂等方面可能有某种联系. 然而, Survivin在细胞质中发挥作用, 而Ki-67作为核蛋白在细胞核发挥作用, 二者究竟存在怎样的联系, 有待于进一步的深入研究. Survivin, Ki-67都与导管细胞癌的分化程度呈负相关, 即癌细胞的分化程度越高则这两种蛋白的表达程度越低. Survivin与癌组织分化程度和淋巴结转移相关, 而Ki-67则无此特点, 表明Survivin可能更能够反映导管细胞癌的恶性程度以及患者的预后情况. 与Kami *et al*^[14]的结果一致, Survivin可能是胰腺癌预后的重要指标之一.

我们认为Survivin蛋白在胰腺癌中高度表达, 胰腺癌分化越低、伴有淋巴结转移则Survivin表达越强, 与Ki-67蛋白表达相一致, 表明Survivin的抗凋亡导致细胞过度增殖是胰腺癌的重要发病机制, 这也为针对Survivin作为靶基因的胰腺癌基因治疗提供了一个理论依据^[15,16].

4 参考文献

- 1 江石湖, 马天乐. 凋亡抑制基因的研究现状. 中华消化杂志 2002; 22: 709-710
- 2 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by Survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; 273: 11177-11182
- 3 Hilgers W, Rosty C, Hahn SA. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16: 17-35
- 4 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by Survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 5 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584
- 6 Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by Survivin targeting. *Am J Pathol* 2001; 158: 1757-1765
- 7 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
- 8 Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of Survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; 92: 271-278
- 9 Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillo PJ. Expression of Survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 886-892
- 10 梁智勇, 刘彤华, 罗玉凤, 关键, 魏拴增, 曹金伶, 高洁, 崔全才. 存活素在胰腺癌组织中的表达. 中华病理学杂志 2005; 34: 67-70
- 11 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 马福成, 王映梅. 胰腺癌组织Survivin和COX-2表达的相关性. 第四军医大学学报 2004; 25: 635-636
- 12 Qiao JG, Zhang YQ, Yin YC, Tan Z. Expression of Survivin in pancreatic cancer and its correlation to expression of Bcl-2. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2759-2761
- 13 李平, 李兆申, 张竝, 王雅杰, 倪灿荣, 许国铭, 薛春燕. Survivin在胰腺癌中的表达及其与临床病理指标的关系. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 483-484
- 14 Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Fujimoto K, Wada M, Miyatake S, Imamura M. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery* 2004; 136: 443-448
- 15 王亚利, 宋天保, 王西京, 王中卫, 宋淮, 郝小静. Survivin mRNA反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1872-1874
- 16 陆才德, 戴德坚, 孟化. Survivin-值得关注的抗癌治疗靶. 世界华人消化杂志 2005; 13: 701-705

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

TGIF 对胃癌细胞株 SGC-7901 的维甲酸信号通路的影响

丁莉利, 胡忠良, 郑长黎

丁莉利, 胡忠良, 郑长黎, 中南大学湘雅医学院病理学教研室 湖南省长沙市 410078

丁莉利, 女, 1975-09-12生, 湖南省益阳人, 病理学硕士, 主要从事胃肠肿瘤的研究。

通讯作者: 郑长黎, 410078, 湖南省长沙市湘雅路110号, 中南大学湘雅医学院病理学教研室, changlizheng1125@yahoo.com.cn

电话: 0731-2650406 传真: 0731-2650400

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-10-25

Effects of TG-interacting factor on retinoic signaling pathway in gastric cancer cell line SGC-7901

Li-Li Ding, Zhong-Liang Hu, Chang-Li Zheng

Li-Li Ding, Zhong-Liang Hu, Chang-Li Zheng, Department of Pathology, Xiangya Medical College of Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Correspondence to: Chang-Li Zheng, Department of Pathology, Xiangya Medical College of Central South University, 110 Xiangya Road, Changsha 410078, Hunan Province, China. Changlizheng1125@yahoo.com.cn

Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-10-25

Abstract

AIM: To investigate the influence of TG-interacting factor (TGIF) on the retinoid signaling pathway in gastric cancer cell line SGC-7901 *in vitro*.

METHODS: Gastric cell line SGC-7901 were stably transfected with plasmid PcDNA3.1-TGIF and the highly expressing clone of TGIF was selected by Western Blot. Then SGC-7901 cells were transiently transfected with TGIF oliganuleotides and the transfection efficiency were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). After treatment with 1 $\mu\text{mol/L}$ all trans-retinoic acid (ATRA), the proliferation of the cells was detected by MTT, and the apoptosis was measured by flow cytometry.

RESULTS: Before treatment with ATRA, the proliferation and apoptosis of SGC-7901 cells were not significantly different between PcDNA3.1-TGIF plasmids and TGIF oliganuleotides group. After treatment, the growth of TGIF transfected cells was more rapid than that of the cells transfected with empty vector and the parental cells (0.434 ± 0.035 vs 0.360 ± 0.014 , 0.386 ± 0.020 , $P < 0.05$), while the apoptotic rate was just changed from 1.14% to 1.39%, which was less than that of the two

latter cells. However, the growth of the cells transfected TGIF oliganuleotides was markedly slower than that of the cells transfected with mutant oliganuleotides and the parental cells (0.320 ± 0.044 vs 0.409 ± 0.041 , 0.388 ± 0.024 , $P < 0.05$), while the apoptotic rate was increased from 3.09% to 10.2%, which was greater than that of the two latter cells.

CONCLUSION: TGIF can resist the proliferation-inhibition and apoptosis-induction effect of ATRA in SGC-7901 cells, and it may play a role in inhibiting the retinoic signaling pathway in the cells.

Key Words: Gastric cancer; TG-interacting factor; Retinoid signaling pathway

Ding LL, Hu ZL, Zheng CL. Effects of TG-interacting factor on retinoic signaling pathway in gastric cancer cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2654-2657

摘要

目的: 探讨TG-相互作用因子(TGIF)对胃癌SGC-7901细胞株中维甲酸信号通路的影响。

方法: 在TGIF表达质粒稳定转染SGC-7901细胞后, 用Western blot鉴定高表达TGIF的阳性克隆。在TGIF反义寡核苷酸瞬时转染SGC-7901细胞株后, 用RT-PCR检测转染效率。再用1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA分别处理稳定转染组或瞬时转染组及其对照组细胞, MTT观察细胞增殖速度的变化, 流式细胞术观察细胞凋亡率的变化。

结果: 稳定转染TGIF表达质粒和瞬时转染TGIF反义寡核苷酸对SGC-7901细胞的增殖和凋亡没有明显影响。但在ATRA作用后, TGIF表达质粒转染组细胞的增殖速度比未转染组和空白质粒转染组细胞快(0.434 ± 0.035 vs 0.386 ± 0.020 , 0.360 ± 0.014 , $P < 0.05$), 而细胞的凋亡率的变化比未转染组和空白质粒转染组细胞小, 仅由1.14%增加至1.39%。TGIF反义寡核苷酸转染组细胞的增殖速度比未转染组和突变寡核苷酸转染组细胞慢(0.320 ± 0.044 vs 0.388 ± 0.024 , 0.409 ± 0.041 , $P < 0.05$), 而细胞凋亡率的变化比后两组大, 由3.09%上升至10.2%。

结论: TGIF能拮抗ATRA抑制SGC-7901细胞增殖和诱导其凋亡的作用, TGIF可能参与了对SGC-7901细胞的维甲酸信号通路的抑制。

关键词: 胃癌; TG - 相互作用因子; 维甲酸信号通路

丁莉利, 胡忠良, 郑长黎. TGIF对胃癌细胞株SGC-7901的维甲酸信号通路的影响. 世界华人消化杂志. 2005;13(22):2654-2657
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2654.asp>

0 引言

胃癌是一种严重危害人类生命健康的恶性肿瘤, 目前对胃癌的发病机制尚不十分清楚. TGIF是一种广泛表达的核内转录抑制因子, TGIF除参与多种生物的正常发育外, 还可能与多种肿瘤的发生发展有关^[1-3]. TGIF参与了对多条细胞信号传导通路的调节, 尤其是TGF- β 信号通路和维甲酸信号通路^[4,5]. 研究发现维甲酸信号通路的异常也与多种肿瘤的发生发展有关^[6-10]. 但TGIF能否通过维甲酸信号通路来影响胃癌的发生发展尚未见文献报道. 我们选用对全反式维甲酸(ATRA)敏感的胃癌细胞株SGC-7901^[11], 在用TGIF表达质粒稳定转染或TGIF反义寡核苷酸瞬时转染SGC-7901细胞后, 用ATRA处理细胞, 观察转染前后和ATRA处理前后细胞增殖速度和凋亡的变化, 以探讨TGIF对胃癌SGC-7901细胞株中维甲酸信号通路的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌SGC-7901细胞株购自中科院上海细胞库. 空白质粒PcDNA3.1和TGIF表达质粒PcDNA3.1-TGIF由美国国立卫生研究院遗传药理所Mouradian教授惠赠. 羊源性多克隆抗TGIF抗体购自Santa Cruz公司. TGIF反义寡核苷酸(TGIF ASDON)和突变寡核苷酸参照文献[12], 由上海生物工程技术服务有限公司合成, 均用硫代磷酸化法修饰. TGIF和 β -actin扩增引物(表1)由软件Primer Premier 5.0设计, 由上海生物工程技术服务有限公司合成. 阳离子脂质体Lipofectin购自Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自Promega公司, RPMI 1640培养基和超级小牛血清分别购自Invitrogen公司和杭州四季青公司, ATRA购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞接种于含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液中, 在50 mL/L CO₂、95%湿度、37℃培养箱连续培养, 细胞长满瓶底70-80%时传代, 实验用细胞均处于对数生长期. ATRA用无水乙醇配成浓度为10 mmol/L的贮存液, -20℃避光保存. 用药组将ATRA贮存液加入到培养液至终浓度分别为1 μ mol/L, 无水乙醇终浓度低于1 mL/L时对细胞的生长和分化无影响. ATRA避光操作.

1.2.2 TGIF基因转染和Western Blot检测 参照Life Technologies公司的试剂说明书进行, 用脂质体lipofectin将PcDNA3.1和PcDNA3.1-TGIF质粒分别转染

表1 TGIF和 β -actin的扩增引物序列

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

SGC-7901细胞株, 以未转染细胞作对照. 转染48 h后, 800 mg/L G418筛选至未转染组细胞大量死亡后, 逐渐降低G418的含量, 最后以200 mg/L G418维持筛选, 直至克隆形成. 用细胞裂解液裂解细胞后, 提取细胞总蛋白, 根据BCA试剂盒说明书测细胞总蛋白浓度, 各取80 μ g总蛋白行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转膜及免疫印迹. 50 g/L脱脂牛奶(PBS配制)封闭1 h, 羊抗人TGIF一抗(1:300)4℃过夜, 辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1:1000), 于水平摇床37℃孵育2 h, DAB显色.

1.2.3 TGIF ASDON转染和RT-PCR检测 转染前一天, 接种SGC-7901细胞至50 mL培养瓶中(5×10^5 个/瓶)贴壁培养18 h, 无血清培养基洗涤细胞两次, 转染按Lipofectin说明书进行. 实验共分三组, 即TGIF ASDON转染组、突变寡核苷酸转染组和未转染组. 转染6 h后, 弃转染液. 无血清培养基洗涤细胞二次, 各组细胞换用正常培养液或含ATRA的培养液继续培养. 按Trizol说明书提取细胞总蛋白, 琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的提取质量, 核酸分析仪检测RNA含量, 2 μ g总RNA按逆转录试剂盒说明书合成cDNA第一链. 再取2 μ g cDNA建立PCR反应体系, 进行PCR扩增. 紫外灯下观察结果并摄像.

1.2.4 MTT分析

1.2.4.1 消化对数生长期SGC-7901细胞、质粒PcDNA3.1和质粒PcDNA3.1-TGIF稳定转染的SGC-7901细胞并计数 接种于96孔板中(3×10^3 个/孔). 加盖, 50 mL/L CO₂、95%湿度、37℃培养箱中培养24 h后, 吸出培养基, 换用正常培养液或含ATRA的培养液200 μ L(4孔/组), 继续培养72 h. 分别加5 g/L的MTT 20 μ L于各孔中, 继续培养4 h, 倒尽板中的培养液, 各孔加150 μ L DMSO, 轻轻振荡后于酶标仪上(波长490 nm)测定各孔的A值.

1.2.4.2 消化对数生长期SGC-7901细胞并计数、接种于96孔板中(3×10^3 个/孔), 贴壁培养18 h, 无血清培养基洗涤细胞两次, 按Lipofectin说明书分别转染TGIF ASDON、TGIF突变寡核苷酸, 并以未转染细胞做对照. 转染6 h后, 弃转染液, 无血清培养基洗涤细胞二次, 换用正常培养液或含ATRA的培养液200 μ L(4孔/组), 继续培养72 h, 用同上方法测定各孔A值.

1.2.5 流式细胞术

1.2.5.1 消化对数生长期SGC-7901细胞、质粒

PcDNA3.1和质粒PcDNA3.1-TGIF稳定转染的SGC-7901细胞分别接种于50 mL培养瓶培养24 h后, 各组细胞换用正常培养液或含ATRA的培养液继续培养48 h(3瓶/组), 0.02% EDTA和0.25%胰酶消化并收集细胞, PBS洗涤2次, 750 mL/L乙醇4℃固定, 流式细胞仪测定各瓶细胞的DNA含量, Cell Quest软件分析细胞群体的凋亡百分率.

1.2.5.2 消化对数生长期SGC-7901细胞接种于50 mL培养瓶培养18 h后, 按1.2.4.2方法处理细胞(3瓶/组), 并用同上方法分析细胞群体的凋亡百分率.

统计学处理 数值用mean±SD表示, 采用SPSS 11.0统计包进行统计分析, 两组间均数比较使用*t*检验, 多组间均数比较使用方差分析, 组间均数两两比较使用LSD(least significant difference)法, 以*P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 稳定表达 TGIF蛋白的阳性克隆的鉴定Western blot的结果显示: PcDNA3.1-TGIF转染组细胞的TGIF蛋白表达水平明显高于未转染组细胞和PcDNA3.1转染组细胞(图1), 表明我们已建立了稳定表达TGIF的细胞系, 并将用其进行实验.

2.2 稳定转染TGIF对的SGC-7901细胞增殖和凋亡的影响(表2) 在无ATRA作用时, 未转染组、PcDNA3.1转染组和PcDNA3.1-TGIF转染组细胞的增殖速度无显著性差异(*P*>0.05); 经1 μmol/L ATRA作用后, 三组细胞的增殖速度均下降(*P*<0.05), 但PcDNA3.1-TGIF转染组细胞的增殖速度比未转染组和PcDNA3.1转染组细胞快(*P*<0.05). 在无ATRA作用时, 未转染组、PcDNA3.1转染组和PcDNA3.1-TGIF转染组细胞的凋亡率分别为0.95%、1.29%和1.14%; 经ATRA作用后, 未转染组和PcDNA3.1转染组细胞的凋亡率分别上升至3.29%和4.46%, 但PcDNA3.1-TGIF转染组细胞凋亡率仅为1.39%, PcDNA3.1-TGIF转染组细胞凋亡率的变化小于未转染组和PcDNA3.1转染组细胞. 稳定转染TGIF表达质粒能拮抗ATRA抑制SGC-7901细胞增殖和诱导其凋亡的作用.

2.3 TGIF ASDON转染对SGC-7901细胞TGIF mRNA的表达的影响 经RT-PCR分析发现SGC-7901细胞转染TGIF ASDON 24 h后, TGIF mRNA表达已明显减少, 低于未转染组和突变寡核苷酸转染组细胞(图2).

2.4 TGIF ASDON转染对SGC-7901细胞增殖和凋亡的影响(表3) 在无ATRA作用时, 未转染组、突变寡核苷酸转染组和TGIF ASDON转染组细胞的增殖速度无显著性差异(*P*>0.05); 经1 μmol/L ATRA作用后, 三组细胞的增殖速度均下降 (*P*<0.05), 但TGIF ASDON转染组

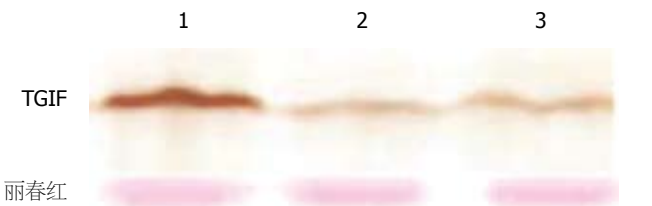


图 1 Western Blot分析TGIF表达. 1: PcDNA3.1-TGIF转染组; 2PcDNA3.1转染组; 3: 未转染组.

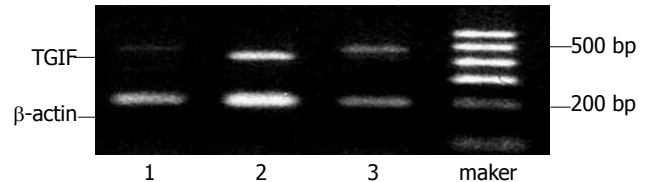


图 2 TGIF ASDON转染SGC-7901细胞24 h后RT-PCR分析. 1: TGIF ASDON转染组; 2: 突变寡核苷酸转染组; 3: 未转染组.

表 2 稳定转染TGIF对SGC-7901细胞增殖的影响

	0 μmol/L	1 μmol/L
未转染组	0.548 ± 0.045	0.386 ± 0.020 ^a
PcDNA3.1转染组	0.553 ± 0.048	0.360 ± 0.014 ^a
PcDNA3.1-TGIF转染组	0.530 ± 0.059	0.434 ± 0.035 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs 0 μmol/L组; ^c*P*<0.05 vs 未转染组.

表 3 TGIF ASDON转染对SGC-7901细胞增殖影响

	0 μmol/L	1 μmol/L
未转染组	0.609 ± 0.029	0.388 ± 0.024 ^a
突变寡核苷酸转染组	0.626 ± 0.059	0.409 ± 0.041 ^a
TGIF ASDON转染组	0.559 ± 0.014	0.320 ± 0.044 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs 0 μmol/L组; ^c*P*<0.05 vs 未转染组.

细胞的增殖速度比未转染组和突变寡核苷酸转染组细胞慢(*P*<0.05). 在无ATRA作用时, 未转染组、突变寡核苷酸转染组和TGIF ASDON转染组细胞的凋亡率分别为2.29%、3.22%和3.09%; 在ATRA作用后, 三组细胞的凋亡率均上升, 分别为6.35%、6.63%和10.2%, TGIF ASDON转染组细胞的凋亡率变化比未转染组和突变寡核苷酸转染组细胞大. 瞬时转染TGIF反义寡核苷酸能促进ATRA抑制SGC-7901细胞增殖和诱导其凋亡的作用.

3 讨论

TGIF基因定位于18p11, 由8162碱基组成, 其cDNA全长1562碱基, 共有3个外显子, 编码一种由272个氨基酸残基组成的分子质量约为30 ku的核蛋白, 该基因编码的蛋白能识别并结合于细胞核DNA启动子中的一段5'TGTCA3'序列, 故被命名为TG相互作用因子基因. TGIF与DNA结合的核心核苷酸序列5'TGTCA3'也

存在于多种维甲类受体RAR和RXR识别的启动子序列上, 并与这些RAR和RXR的识别位点比邻或重叠. 研究证实TGIF的同源结构域能与RXR竞争性结合于含有RXRE的启动子上, TGIF和RXR α 在CRBP II-RXRE上的结合位点存在部分重叠, 瞬时转染TGIF能抑制RXR α 介导的转录反应, 提示TGIF可能通过与RAR和/或RXR竞争性结合于靶基因启动子序列来抑制维甲酸信号通路的作用^[5].

但我们的实验结果显示稳定转染TGIF表达质粒的SGC-7901细胞的增殖速度与空白质粒转染组和未转染组细胞比较没有显著性差异, 三组细胞间的凋亡率也相差不大, 这表明高表达TGIF对SGC-7901细胞的增殖和凋亡无明显影响, 不能促进胃癌SGC-7901细胞的恶性生长, 并与文献报道一致^[13]. 转染TGIF ASDON的SGC-7901细胞的增殖速度与突变寡核苷酸转染组与未转染组细胞比较没有显著性差异, 三组细胞的凋亡率也相差不大, 说明反义TGIF不能逆转胃癌SGC-7901细胞的恶性生长特点, 这进一步证实TGIF对SGC-7901细胞的增殖和凋亡无明显影响, 因此TGIF可能不影响胃癌细胞的增殖和凋亡. 但这也有可能是由于体外培养细胞在缺乏维甲酸类配体的条件下, 维甲酸信号通路未激活, TGIF无法发挥其抑制维甲酸信号通路的作用.

我们的实验结果还显示ATRA能抑制SGC-7901细胞的增殖和诱导其凋亡. ATRA及其代谢产物9-cRA是维甲酸信号通路中维甲类受体RAR和RXR的配体, 因此ATRA能通过维甲酸信号通路抑制SGC-7901细胞的增殖和诱导其凋亡. 稳定转染PcDNA3.1-TGIF质粒能一定程度地拮抗ATRA抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用. 我们通过反义寡核苷酸转染实验还发现, TGIF ASDON能下调TGIF的表达, 促进ATRA抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用, 提高SGC-7901细胞对ATRA作用的敏感性, 这从相反的角度进一步证实TGIF能拮抗ATRA抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用. TGIF可能通过与RAR和/或RXR竞争性结合于启动子上的RARE和/或RXRE位点, 抑制SGC-7901细胞的维甲酸信号通路.

有文献报道在膀胱移行细胞癌中存在TGIF基因所在位点18p11的扩增^[1], 在多株食管癌细胞系中有TGIF基因的扩增^[2]. 体液中存在生理浓度的维甲酸, 他在生长、分化、发育、代谢、器官形成等生命过程中起重要作用, TGIF能阻断维甲酸信号通路, 因此TGIF有

可能通过抑制维甲酸信号通路, 促进肿瘤的发生发展. TGIF也有可能通过抑制维甲酸信号通路拮抗维甲酸类药物的抑增殖和促凋亡作用, 因此TGIF基因的扩增和高表达可能是肿瘤细胞对维甲酸类药物产生耐药性的原因之一. 而耐药性的产生是维甲酸类药物治疗肿瘤失败的重要原因, 严重影响病人的预后. 因此研究TGIF在维甲酸信号通路中的作用将有助于进一步了解肿瘤细胞对维甲酸类药物产生耐药性的原因.

4 参考文献

- 1 Voorter C, Joos S, Bringuier PP, Vallinga M, Poddighe P, Schalken J, du Manoir S, Ramaekers F, Lichter P, Hopman A. Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1995; 146: 1341-1354
- 2 Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2002; 23: 19-24
- 3 Lou LY, Herrera I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer* 2002; 87: 339-343
- 4 Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, Massague J. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 457-463
- 5 Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 1995; 270: 31178-31188
- 6 Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 3167-3215
- 7 Xu XC, Ro JY, Lee JS, Shin DM, Hong WK, Lotan R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, pre-malignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res* 1994; 54: 3580-3587
- 8 Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ, Pastorino U, Pilotti S, Kurie JM, Hong WK, Lotan R. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 624-629
- 9 Widschwendter M, Berger J, Daxenbichler G, Muller-Holzner E, Widschwendter A, Mayr A, Marth C, Zeimet AG. Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 4158-4161
- 10 Xu XC, Mitchell MF, Silva E, Jetten A, Lotan R. Decreased expression of retinoic acid receptors, transforming growth factor beta, involucrin, and cornifin in cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1503-1508
- 11 Wu Q, Chen Z, Su W. Growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid through arresting cell cycle progression. *Chin Med J* 2001; 114: 958-961
- 12 Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999; 97: 29-39
- 13 Hu ZL, Wen JF, Xiao DS, Zhen H, Fu CY. Effects of transforming growth interacting factor on biological behaviors of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 84-88

小鼠暴发性肝衰竭肝细胞凋亡形态学及其调控机制

王玉梅, 冯国和, 窦晓光, 刘德刚

王玉梅, 冯国和, 窦晓光, 中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

刘德刚, 鞍山市曙光医院医疗科 辽宁省鞍山市 114031

王玉梅, 女, 1970-02-26生, 山西省大同市人, 2002年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事病毒性肝炎发病机制的研究。

通讯作者: 王玉梅, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院感染科. wangym7002@yahoo.com

电话: 024-83956961 传真: 024-62124785

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

Morphology and regulatory mechanism of hepatocyte apoptosis in experimental fulminant hepatic failure

Yu-Mei Wang, Guo-He Feng, Xiao-Guang Dou, De-Gang Liu

Yu-Mei Wang, Guo-He Feng, Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

De-Gang Liu, Department of Medicare, Shuguang Hospital, Anshan 114031, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yu-Mei Wang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangym7002@yahoo.com

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To study the morphological changes and the regulation of nitric oxide (NO), Fas and Bcl-2 on hepatocyte apoptosis in mouse model of experimental fulminant hepatic failure (FHF).

METHODS: Mouse model of experimental FHF was established by combination of lipopolysaccharide (LPS) and D-galactosamin (D-GalN). The expression of Fas and Bcl-2 in the liver tissues was tested by immunohistochemistry. The level of serum NO and iNOS mRNA expression in liver were tested by nitrate reductase method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. The hepatocyte apoptosis was examined by TUNEL method. In addition, the changes of the above items were observed after pre-treatment with L-NMMA, an inhibitor of iNOS.

RESULTS: The level of serum NO and expression of iNOS mRNA in the liver tissues were increased at 2 h in model group, reaching the peak at 4 h. There was a little Fas expression at 2 h in model group. The expression of Fas was increased significantly at 8 and 12 h,

which was distinctly higher than that at 2 h (100% vs 20%, $P < 0.01$) and 4 h (100% vs 40%, $P < 0.05$). The expression of Bcl-2 started to increase at 2 h, reaching the peak at 4 h, which was markedly higher than that at 2 h (90% vs 60%, $P < 0.05$). The expression of Bcl-2 at 4 h was also significantly higher than that at 8 or 12 h (90% vs 20%, both $P < 0.01$). Typical features of hepatocyte apoptosis were observed at 8 h. The level of serum NO and liver iNOS mRNA expression were normal and the Fas, Bcl-2 expression did not change notably after L-NMMA administration in comparison with those in model group ($P > 0.05$). Typical hepatocyte apoptosis was also observed at 8 h after L-NMMA administration, and the pathological changes of the liver tissues were more severe.

CONCLUSION: Both expression of Fas and Bcl-2 are increased in FHF. Fas expression is consistent with hepatocyte apoptosis, while Bcl-2 expression is negatively correlated with hepatocyte apoptosis. Single administration of iNOS inhibitor can not protect hepatocytes against apoptosis and injury.

Key Words: Nitric oxide; Fas; Bcl-2; Fulminant hepatic failure

Wang YM, Feng GH, Dou XG, Liu DG. Morphology and regulatory mechanism of hepatocyte apoptosis in experimental fulminant hepatic failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2658-2662

摘要

目的: 研究在实验性暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)中肝细胞凋亡的形态学变化以及一氧化氮(nitric oxide, NO)、Fas和Bcl-2对肝细胞凋亡的调控作用。

方法: 脂多糖(LPS)和D-氨基半乳糖(D-GalN)联合应用制备FHF小鼠模型;采用免疫组化方法检测肝组织Fas及Bcl-2表达,分别采用硝酸还原酶法和RT-PCR法检测血清NO水平及肝组织iNOS mRNA表达;TUNEL法检测肝细胞凋亡;在用药后动态观察Fas及Bcl-2表达、血清NO水平及肝组织iNOS mRNA表达及肝细胞凋亡的变化,并对模型鼠给予iNOS的抑制剂L-NMMA,动态观察上述指标的变化。

结果: 在FHF模型小鼠中, 用药后2 h开始血清NO水平及iNOS mRNA的表达即升高, 于4 h达高峰; 用药后2 h开始Fas有少量表达, 至8 h和12 h表达均明显增多, 与2 h组比较差异显著(100% vs 20%, $P<0.01$), 与4 h组比较差异也比较显著(100% vs 40%, $P<0.05$). 模型组2 h Bcl-2有较多表达, 4 h表达最多, 4 h与2 h比较差异显著(90% vs 60%, $P<0.05$), 与8, 12h比较差异非常显著(90% vs 20%, 均 $P<0.01$). 8 h可出现典型的肝细胞凋亡表现. 与模型组各时间点比较, 给予iNOS的抑制剂L-NMMA后血清NO水平及iNOS mRNA的表达均为正常水平, Fas及Bcl-2表达均无显著差异($P>0.05$), 阻断后8 h亦可见典型的肝细胞凋亡表现, 阻断NO可使病变较模型组更为严重.

结论: 在FHF中, Fas及Bcl-2的表达均增加, Fas的表达与肝细胞凋亡相一致, 而Bcl-2的表达与肝细胞凋亡呈负相关. 单纯应用NO拮抗剂对肝细胞凋亡及肝损伤无保护作用.

关键词: 一氧化氮; Fas抗原; Bcl-2; 暴发性肝衰竭

王玉梅, 冯国和, 窦晓光, 刘德刚. 小鼠暴发性肝衰竭肝细胞凋亡形态学及其调控机制. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2658-2662
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2658.asp>

0 引言

细胞凋亡有赖于各种因素的调控, 如Fas系统、Bcl-2家族、一氧化氮(NO)等^[1-8], 而暴发性肝衰竭(FHF)又与肝细胞凋亡的发生密切相关^[9-13], 故研究以上各因素在FHF时对肝细胞凋亡的作用十分必要, 这将有助于进一步了解FHF时肝细胞凋亡的途径, 并对各因素的作用及影响因素进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 NO试剂盒购自南京建成生物公司, iNOS mRNA引物购自北京奥科生物公司, cDNA合成试剂盒购自宝生物工程有限公司(TaKaRa产品), LPS购自Sigma公司, D-GalN购自重庆医科大学, L-NMMA(Cayman公司产品)购自深圳晶美生物公司, TUNEL试剂盒、Bcl-2免疫组化试剂盒及Fas免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物公司, δ 昆明小鼠(中国医科大学附属二院动物实验室提供)100只, 清洁级, 体重20-25 g, 随机分成12组, 取4组(每组10只)给予LPS 10 μ g/kg皮内注射, D-GalN 800mg/kg *ip*(模型组), 另取4组(每组10只)除注射LPS和D-GalN外, 同时 ip NO合酶抑制剂L-NMMA 7 mg/鼠(抗NO组), 余4组动物(每组5只)注射同样体积的生理盐水(正常对照组), 对上述小鼠分别于注药后2, 4, 8, 12 h处死, 每个时间点为1组动物, 留取血清及肝脏标本, 将血清于-20℃冻存

待检, 肝组织一部分于40 g/L中性甲醛固定, 一部分于-80℃冻存待检. 注射LPS+D-GalN后 2, 4, 8, 12 h分别编号为T2, T4, T8, T12组, 注射生理盐水后2, 4, 8, 12 h分别编号为N2, N4, N8, N12组, 注射LPS+D-GalN+L-NMMA后2, 4, 8, 12 h分别编号为L2, L4, L8, L12组.

1.2 方法 NO水平采用硝酸还原酶法检测(试剂盒购自南京建成生物公司), 按试剂盒说明书进行, 于酶标仪550 nm处测定各管吸光度值, 计算公式如下: $NO(\mu\text{mol/L}) = (\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times 100 \mu\text{mol/L}$ 标准品浓度 \times 样品测试前稀释倍数. iNOS mRNA的相对含量的检测采用异硫氰酸胍-酚-氯仿方法, 提取肝组织内RNA, 采用TNF- α -2(antisense primer, 序列见后), 在30-65℃, 35 min条件下逆转录合成TNF- α mRNA cDNA后进行PCR反应, 引物序列如下: iNOS-1 5' -TCGGTGCAGTCTTTTCCTATGG-3'; iNOS-2 5' -TATTAGAGCGGCGGCATGGT-3' (产物长404 bp), 同时设内参照(产物长592 bp), 引物序列: β -actin-1 5' -TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3'; β -actin-2 5' -ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3'. PCR反应条件: 94℃变性3 min, 然后94℃ 30 s, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min进行30个循环, 72℃延伸5 min. 将PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 用Kodak 1D型凝胶成像分析系统分析检测各扩增带的产物含量, 用下列公式表示: iNOS mRNA的相对含量=iNOS mRNA密度/ β -actin密度 $\times 100$. Bcl-2免疫组化染色: 实验步骤按试剂盒说明书进行, 染色后细胞浆呈棕褐色染色的为阳性细胞, 细胞浆无棕褐色染色的为阴性细胞. Fas免疫组化染色: 实验步骤按试剂盒说明书进行, 染色后细胞浆呈棕褐色染色的为阳性细胞, 细胞浆无棕褐色染色的为阴性细胞. 缺口原位末端标记技术(TUNEL)按试剂盒说明书进行检测, 对石蜡包埋的肝组织切片进行缺口原位末端标记后DAB显色, 染色后细胞核呈棕褐色染色的为阳性细胞, 细胞核无棕褐色染色的为阴性细胞. TUNEL、Bcl-2免疫组化染色及Fas免疫组化染色阳性细胞计数分三级: 低倍(10 \times)镜1 cm²视野阳性细胞数小于1/3为(+), 1/3-2/3为(++), 大于2/3为(+++). 肝组织石蜡切片用HE染色于光镜下观察肝组织学变化.

统计学处理 采用mean \pm SD表示血清NO水平及iNOS mRNA相对含量, 使用SAS软件包作方差分析, 并进行两两比较, 采用 χ^2 检验进行Bcl-2免疫组化染色及Fas免疫组化染色阳性表达率及TUNEL法检测肝细胞凋亡的比较.

2 结果

模型组2 h组肝组织基本上无异常所见, 4 h组可见肝细胞细胞质疏松化, 呈气球样变, 并可见散在的嗜酸变

性, 8 h组可见点片状肝细胞坏死, 其中有较多的嗜酸变性和坏死, 12 h组则见肝细胞呈大片坏死, 核碎裂或溶解. 给予L-NMMA后肝组织HE染色结果表明, 8 h组可见较多的点片状肝细胞坏死, 嗜酸变性和坏死明显, 12 h组则见肝细胞坏死较模型组更为严重.

2.1 血清NO水平及肝组织iNOS mRNA表达的变化 NO在模型组2 h即升高, 4 h达高峰, 以后逐渐下降. 在模型组iNOS mRNA的表达于2 h即升高, 4, 8 h达高峰, 12 h基本降至正常, 与对照组2, 4, 8 h相比差异显著($P<0.01$). 模型组2, 4, 8 h iNOS mRNA的表达均较12 h显著增高($P<0.01$). 抗NO组各时间点NO水平及iNOS mRNA的表达均为正常水平, 与模型组相比, 抗NO组各时间点ALT, TBil水平无显著差异, 但较模型组有所升高(表1).

表1 鼠血清NO水平及肝组织iNOS mRNA表达的变化 (mean ± SD)

分组	NO (μmol/L)	iNOS mRNA 相对含量
T2	136.20 ± 34.15 ^b	0.68 ± 0.56 ^{ba}
T4	256.35 ± 80.21 ^b	0.88 ± 0.10 ^{ba}
T8	183.44 ± 31.82 ^b	0.83 ± 0.08 ^{ba}
T12	73.24 ± 7.16 ^a	0.38 ± 0.09
L2	26.13 ± 7.32	0.29 ± 0.10
L4	20.65 ± 5.47	0.29 ± 0.09
L8	24.30 ± 9.26	0.29 ± 0.10
L12	20.46 ± 5.87	0.29 ± 0.10
N2	17.56 ± 6.12	0.29 ± 0.08
N4	17.39 ± 5.91	0.28 ± 0.09
N8	16.78 ± 5.27	0.30 ± 0.10
N12	17.45 ± 6.42	0.29 ± 0.10

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

2.2 肝细胞凋亡的检测结果 肝组织TUNEL检测结果显示, 模型组在用药后2 h, 肝组织可出现少量阳性细胞, 4 h阳性细胞有所增加, 8 h阳性细胞明显增加, 12 h亦存在凋亡细胞, 且肝组织出现明显的坏死表现. 经阻断NO后, 各时间点阳性细胞变化与模型组相一致, 二者

表2 鼠肝组织TUNEL检测结果 %/n

分组	+++	++	+	-
T2	0	30 (3)	40 (4)	30 (3) ^b
T4	20 (2)	30 (3)	40 (4)	20 (2) ^b
T8	80 (8)	20 (2)	0	0 ^b
T12	40 (4)	40 (4)	20 (2)	0 ^{ba}
L2	0	40 (4)	30 (3)	30 (3) ^b
L4	20 (2)	30 (3)	40 (4)	20 (2) ^b
L8	80 (8)	20 (2)	0	0 ^b
L12	40 (4)	40 (4)	20 (2)	0 ^{ba}
N2	0	0	20 (2)	80 (4)
N4	0	0	0	100 (5)
N8	0	0	0	100 (5)
N12	0	0	20 (1)	80 (4)

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

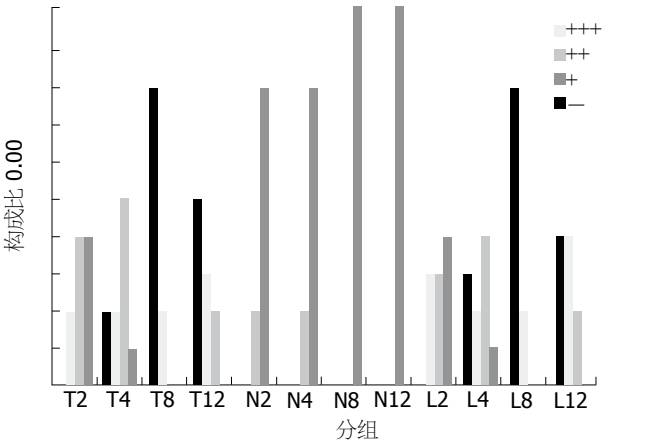
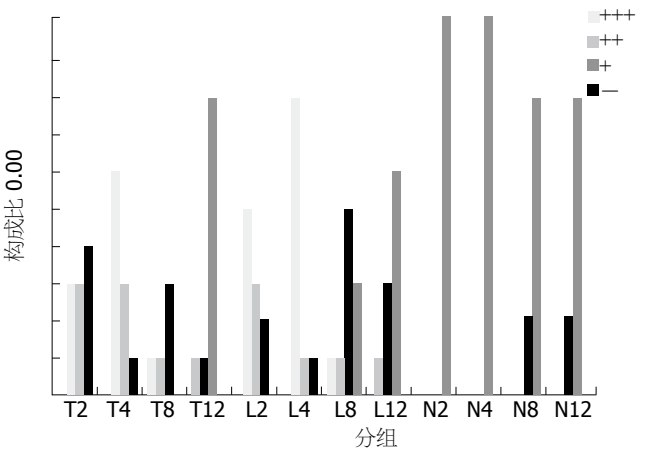


图1 鼠肝组织Fas检测结果



比较差异无显著性(表2).

2.3 肝组织中Fas和Bcl-2的表达 各时间点的对照组无Fas表达, 模型组2 h Fas有少量表达, 4 h表达较多, 8 h和12 h时表达均很多, 8 h和12 h比较无显著差异, 与2 h比较 $P<0.01$, 与4 h比较 $P<0.05$. 抗NO组并未出现Fas表达的明显变化, 与模型组各时间点比较 $P>0.05$ (图1). 各时间点的对照组无Bcl-2表达, 模型组2 h Bcl-2有较多表达, 4 h表达最多, 8 h明显减少, 12 h则很少表达, 4 h与2 h比较, $P<0.05$, 与8, 12 h比较 $P<0.01$. 抗NO组并未出现Bcl-2表达的明显变化, 与模型组各时间点比较 $P>0.05$ (图2).

3 讨论

肝细胞的凋亡主要通过Fas/FasL途径介导所致^[1,3,4,14-20]. 在病毒性肝病中, 肝细胞的死亡主要通过Fas抗原介导^[1,21-25], 在重型肝炎、慢性肝病患者的肝细胞表面均有Fas抗原的表达^[1,21-25]. 对暴发性肝衰竭模型小鼠*ip* Fas受体的抗体可加重肝细胞凋亡和肝功能衰竭. 本结果表明, 在LPS+GalN用药后Fas表达增加, 且其表达水平的变化与肝细胞凋亡的检测结果相一致, 提示在此种FHF模型中肝细胞凋亡的发生与Fas的表达增加有关. Bcl-2为重要的抗凋亡因子, 定位于线粒体膜的

Bcl-2蛋白可通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生。以往的研究认为, Bcl-2可通过抑制内膜 Ca^{2+} 的释放、抗氧化、阻止胞内细胞色素C的释放、抑制白细胞介素- 1β 转化酶的自身催化等机制而抑制凋亡。近年来的研究显示肝细胞是否发生凋亡受Bcl-2家族的调控^[5,6,26-28]。将Bcl-2转基因表达于重型肝炎模型小鼠的肝细胞,可保护小鼠肝脏功能。在肝缺血-再灌注损伤后进行肝移植术的大鼠中Bcl-2表达增加可提高存活率^[27]。Bcl-2的上调可减轻肝细胞的纤维化程度^[28]。本结果表明,在LPS+GalN用药后Bcl-2表达增加,但随着肝细胞凋亡的增加, Bcl-2的表达反而下降,提示Bcl-2的表达与肝细胞凋亡呈负相关。

在炎症环境下NO及其反应产物在生理和病理方面起着关键的作用,在不同的情况下NO对肝细胞可能起着保护和损伤的双重作用^[2,8,11,29,30]。研究表明, LPS诱导的NO在体内发挥细胞保护作用,而在体外却表现为细胞毒性^[11]。目前关于NO对肝细胞作用的报道仍有争议。一些研究者认为NO促进肝细胞凋亡^[12,13,31,32],可启动Fas凋亡途径,抑制NO的过量产生可上调Bcl-2 mRNA的表达,从而起到抑制肝细胞凋亡的作用^[31]。LPS通过刺激NO大量产生而诱导肝细胞凋亡^[32]。给予NOS抑制剂可减轻损伤^[12]。iNOS的强烈上调可能有助于FHF时的炎症过程^[13]。但也有相反的报道,认为NO对肝细胞凋亡起抑制作用^[2,7,10,33-36]。近年来的研究表明,在部分肝切除术后NO的持续存在发挥着促进肝脏再生和有效地保护肝脏免于发生细胞凋亡的作用^[2]。NO可减少肝缺血-再灌注损伤后肝酶的释放,抑制肝细胞的凋亡,改善肝缺血-再灌注损伤^[33]。给予NO供体可减轻由APAP引起的凋亡并阻断caspase活性^[10]。NO可保护肝细胞免于acetaminophen引起的损伤,减轻肝脏毒性^[35]。本结果表明,在由LPS+D-GalN造成的FHF动物模型中血清NO水平及肝组织iNOS mRNA表达均显著增加。应用iNOS的抑制剂L-NMMA后, Fas、Bcl-2的表达无明显变化,拮抗NO作用不能阻断肝细胞凋亡和肝脏组织学变化,提示在本实验条件下,外源性地给予iNOS的抑制剂不能抑制肝细胞凋亡的发生,单纯应用NO拮抗剂对肝细胞凋亡及肝损伤无保护作用。

总之,从细胞凋亡的角度研究FHF发病机制有很重要的意义,同时,对其调控机制的研究可能会对临床治疗提供依据,此方面的研究还待进一步深入。

4 参考文献

- Zhang SJ, Chen HY, Chen ZX, Wang XZ. Possible mechanism for hepatitis B virus X gene to induce apoptosis of hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4351-4356
- Zeini M, Hortelano S, Traves PG, Gomez-Valades AG, Pujol A, Perales JC, Bartrons R, Bosca L. Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of

- hepatocyte proliferation. *FASEB J* 2005; 19: 995-997
- Zhang M, He W, Liu F, Zou P, Xiao J, Zhong ZD, Hu ZB. Inhibition of mouse hepatocyte apoptosis via anti-Fas ribozyme. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2567-2570
- Yang J, Gallagher SF, Haines K, Epling-Burnette PK, Bai F, Gower WR Jr, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 166-174
- Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonikos DS, Gogos C. Potential role of bcl-2 and bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2003; 16: 1273-1288
- Wang J, Li W, Min J, Ou Q, Chen J, Song E. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes modified by BCL-2 gene protects rats from acute liver failure. *Transplant Proc* 2004; 36: 2924-2926
- Qu W, Liu J, Fuquay R, Shimoda R, Sakurai T, Saavedra JE, Keefer LK, Waalkes MP. The nitric oxide prodrug, V-PYRRO/NO, protects against cadmium toxicity and apoptosis at the cellular level. *Nitric Oxide* 2005; 12: 114-120
- Siendones E, Fouad D, Diaz-Guerra MJ, de la Mata M, Bosca L, Muntane J. PGE1-induced NO reduces apoptosis by D-galactosamine through attenuation of NF-kappaB and NOS-2 expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 2004; 40: 1295-1303
- Wang K, Brems JJ, Gamelli RL, Ding J. Reversibility of caspase activation and its role during glycochenodeoxycholate-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 23490-23495
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Mencarelli A, Farneti S, Del Soldato P, Morelli A. Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 33-42
- Farghali H, Canova N, Kucera T, Martinek J, Masek K. Nitric oxide synthase inhibitors modulate lipopolysaccharide-induced hepatocyte injury: dissociation between *in vivo* and *in vitro* effects. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 1627-1638
- Rahman TM, Hodgson HJ. The effects of early and late administration of inhibitors of inducible nitric oxide synthase in a thioacetamide-induced model of acute hepatic failure in the rat. *J Hepatol* 2003; 38: 583-590
- Leifeld L, Fielenbach M, Dumoulin FL, Speidel N, Sauerbruch T, Spengler U. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 2002; 37: 613-619
- Loo G, Lippens S, Hahne M, Matthijssens F, Declercq W, Saelens X, Vandenabeele P. A Bcl-2 transgene expressed in hepatocytes does not protect mice from fulminant liver destruction induced by Fas ligand. *Cytokine* 2003; 22: 62-70
- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-351
- Nakamoto Y, Kaneko S, Fan H, Momoi T, Tsutsui H, Nakaniishi K, Kobayashi K, Suda T. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp Med* 2002; 196: 1105-1111
- Taira K, Hiroyasu S, Shiraishi M, Muto Y, Koji T. Role of the Fas system in liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *Eur Surg Res* 2001; 33: 334-341
- Oberholzer A, Oberholzer C, Bahjat FR, Edwards CK 3rd, Moldawer LL. Genetic determinants of lipopolysaccharide and D-galactosamine-mediated hepatocellular apoptosis and lethality. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 375-380
- Pianko S, Patella S, Ostapowicz G, Desmond P, Sievert W. Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001; 8: 406-413
- Malassagne B, Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Bedda S, Trebden H, Jaffray P, Calmus Y, Weill B, Batteux F. The su-

- peroxide dismutase mimetic MnTBAP prevents Fas-induced acute liver failure in the mouse. *Gastroenterology* 2001; 121: 1451-1459
- 21 Dmitrieva EV, Moskaleva Elu, Kogan EA, Bueverov AO, Belushkina NN, Ivashkin VT, Severin ES, Pal'tsev MA. The role of Fas/FasL system in induction of hepatocyte apoptosis in chronic viral hepatitis. *Arkh Patol* 2003; 65: 13-17
- 22 Kiyici M, Gurel S, Budak F, Dolar E, Gulden M, Nak SG, Memik F. Fas antigen (CD95) expression and apoptosis in hepatocytes of patients with chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1079-1084
- 23 Yoneyama K, Goto T, Miura K, Mikami K, Ohshima S, Nakane K, Lin JG, Sugawara M, Nakamura N, Shirakawa K, Komatsu M, Watanabe S. The expression of Fas and Fas ligand, and the effects of interferon in chronic liver diseases with hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2002; 24: 327-337
- 24 Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P, Quadri R, Abid K, Spahr L, Negro F. Lack of *in vivo* blockade of Fas- and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002; 197: 617-623
- 25 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoer H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002; 21: 377-386
- 26 Neuman MG. Apoptosis in diseases of the liver. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 109-166
- 27 Kienle K, Rentsch M, Muller T, Engelhard N, Vogel M, Jauch KW, Beham A. Expression of BCL-2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 439-441
- 28 Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2706-2710
- 29 Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, Ermentrout GB, Chow CC, Bahar I, Billiar TR. Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies. *Curr Mol Med* 2004; 4: 753-762
- 30 Siendones E, Fouad D, Abou-Ellella AM, Quintero A, Barrera P, Muntane J. Role of nitric oxide in D-galactosamine-induced cell death and its protection by PGE1 in cultured hepatocytes. *Nitric Oxide* 2003; 8: 133-143
- 31 Xia Q, Li ZY. Study on the role of BCL-2 and FAS in nitric oxide-mediated hepatocyte apoptosis. *Chinese J of Histochemistry and Cytochemistry* 2002; 12: 434-438
- 32 Zhang MS, Wang YM, GU CH, Ding J, Xu LR. Nitric oxide mediates hepatocyte apoptosis induced by lipopolysaccharide. *Chin J Infect Dis* 2001; 19: 19-223
- 33 Wu TM, Yang X, Gao ZG, Xing CH, He Q. The influence of nitric oxide on apoptosis of hepatocytes during the rat liver ischemia-reperfusion injury. *Chin J Exp Surg* 2001; 18: 225-227
- 34 Dash PR, Cartwright JE, Baker PN, Johnstone AP, Whitley GS. Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation. *Exp Cell Res* 2003; 287: 314-324
- 35 Wallace JL. Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 1-2
- 36 Fouad D, Siendones E, Costan G, Muntane J. Role of NF-kappaB activation and nitric oxide expression during PGE protection against d-galactosamine-induced cell death in cultured rat hepatocytes. *Liver Int* 2004; 24: 227-236

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 •

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。

胆汁纳米细菌的培养

王利民, 沈文律, 张士莲, 曹立赢, 王宝强

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普通外科 广东省汕头市 515041
张士莲, 曹立赢, 王宝强, 开滦矿务局医院 河北省唐山市 063000
王利民, 男, 1970-01-28生, 河北省唐山市人, 汉族, 2005年汕头大学医学院博士, 主治医师, 主要从事肝胆胰腺疾病的研究.
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: 2005-08-06 接受日期: 2005-08-26

Culture of nanobacteria from human gallbladder bile

Li-Min Wang, Wen-Lv Shen, Shi-Lian Zhang, Li-Ying Cao, Bao-Qiang Wang

Li-Min Wang, Department of General Surgery, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Wen-Lv Shen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515043, Guangdong Province, China
Shi-Lian Zhang, Li-Ying Cao, Bao-Qiang Wang, 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 a method for culturing nanobacteria from human gallbladder bile.

METHODS: The bile samples were collected from 30 patients with gallbladder-stone. After pretreatment with dilution-centrifuge-filtration (DCF) and filtration method, respectively, those samples were cultured under the routine cell culture condition for nanobacteria. The morphological features of the obtained nanobacteria were observed under light and electron microscope. Indirect immunofluorescence staining was used to identify the nanobacteria.

RESULTS: Of the 30 bile samples, the positive rate of nanobacteria was 40% when the samples were pretreated by DCF method, and the positive rate was 57% when they were pretreated by filtration method. There was no significant difference between those two methods ($\chi^2 = 1.669$, $P > 0.05$). Brown movement of the tiny nanobacteria was observed at 2 wk. At 4 wk, nanobacteria started to attach on the bottom of the cul-

ture bottles. Specific combination of the obtained nanobacteria with 8D10 antibodies was observed. The nanobacteria were ball- or stick-like with a length of 80-350 nm under electron microscope.

CONCLUSION: The infection of nanobacteria exists in the bile of gallbladder-stone patients. Filtration is a simple and effective method for the preparation of the gallbladder bile.

Key Words: Gall bladder-stone; Nanobacteria; Cell culture; Electron microscopy; Indirect immunofluorescence staining

Wang LM, Shen WL, Zhang SL, Cao LY, Wang BQ. Culture of nanobacteria from human gallbladder bile. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(22):2663-2666

摘要

目的: 介绍从胆汁中培养纳米细菌的方法。

方法: 无菌抽取30例胆囊结石患者的胆汁经“稀释-离心-过滤”或“过滤法”预处理后, 在常规细胞培养条件下进行纳米细菌培养。光镜下观察细菌形态。采用间接免疫荧光染色对培养所得细菌进行鉴定, 并在电镜下观察。

结果: 30例胆汁样本, 经过“稀释-离心-过滤”预处理后, 纳米细菌培养的阳性率为40%, 经“过滤法”预处理后, 纳米细菌培养的阳性率为57%, 两种方法预处理后, 胆汁纳米细菌培养阳性率无统计学差异($\chi^2 = 1.669$, $P > 0.05$)。培养2 wk时, 显微镜下可见做布朗运动的微小的颗粒状纳米细菌。4 wk时, 可见纳米细菌开始贴附于培养瓶底部形成细菌被膜。培养所得纳米细菌与8D10抗体产生特异性结合, 电镜下观察呈球形或短棒状颗粒, 大小约为80-350 nm。

结论: 在胆囊结石患者的胆汁中存在纳米细菌感染, “过滤法”是一种简单有效的预处理胆汁的方法。

关键词: 胆囊结石; 纳米细菌; 细胞培养; 电子显微镜; 间接免疫荧光染色

王利民, 沈文律, 张士莲, 曹立赢, 王宝强. 胆汁纳米细菌的培养. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2663-2666
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2663.asp>

0 引言

芬兰科学家Kajander *et al*^[1]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,遂将此种微生物命名为纳米细菌(nanobacteria, Nb). 研究发现,在人卵巢癌组织^[2]、肾囊肿的囊液^[3]、钙化的主动脉瓣膜和心脏瓣膜^[4-6]以及胆囊结石患者的胆汁和胆囊壁中都发现了纳米细菌^[7]. 已经证实,纳米细菌可以作为结石形成的核心引起肾结石的形成^[8,9]. 本课题组已经成功地制作出纳米细菌感染所引起的胆囊黑色结石的动物模型,研究过程中发现胆汁中纳米细菌的培养是研究的关键之一,在此简介有关方法与体会.

1 材料和方法

1.1 材料 电视腹腔镜: WOLF, 德国; 倒置相差显微镜: COIC-XSI-D型, 中国; 冷冻离心机: Hettich UNIVERSAL 16R型, 德国; 二氧化碳培养箱: Forma Scientific-3164型, 美国; 超净工作台: SZX-ZPA型, 中国; 细胞培养瓶: 北京中山生物试剂公司, 中国; 25 mm针头式滤器(0.1 μm , 0.22 μm , 0.45 μm 孔径): MILLEX-GP, 爱尔兰; 高糖DMEM培养基(pH 7.4, 含L-谷氨酰胺): GIBCO, 美国; 胎牛血清(γ -FBS): Sigma, 美国; Mouse anti-nanobacteria mAb 8D10: Nanobac Oy, 芬兰; Rabbit anti-mouse IgG-FITC: Sigma, 美国.

1.2 方法

1.2.1 病例选择以及胆汁标本收集 选择手术前无急性胆囊炎发作病史, 本次住院未进行抗菌治疗, 并且拟接受腹腔镜胆囊切除的胆囊结石患者30例, 男性12例, 女性18例, 年龄30-69岁, 平均47岁. 手术前征得患者同意留取胆汁标本. 术中由腹腔中完整取出胆囊后, 立即用无菌注射器穿刺胆囊, 无菌操作抽取胆汁5 mL.

1.2.2 胆汁的预处理 方法一: 取胆汁1 mL, 生理盐水稀释5倍, 经0.45 μm 一次性正压滤器过滤, 12 000 g 离心45 min, 小心吸除上清液4 mL, 生理盐水稀释5倍, 经0.22 μm 一次性正压滤器过滤, 12 000 g 离心45 min, 小心吸除上清液4 mL, 剩余胆汁震荡混匀, 取0.5 mL滤液进行纳米细菌培养. 方法二: 取胆汁1 mL, 生理盐水稀释5倍, 通过一次性输液器滤膜过滤两次后, 依次经0.45 μm 和0.22 μm 一次性正压滤器过滤, 取0.1 mL滤液进行纳米细菌培养.

1.2.3 纳米细菌培养 上述胆汁滤液分别加入含100 mL/L γ -FBS的细胞培养基中(DMEM), 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 条件下培养. 以生理盐水代替胆汁, 重复上述操作作为阴性对照. 每周在倒置相差显微镜下观察并记录一次纳米细菌的生长情况.

1.2.4 纳米细菌鉴定 间接免疫荧光染色在纳米细菌



图1 倒置相差显微镜下的纳米细菌($\times 400$).

滴片上进行. 首先用含100 mL/L FBS(经培养证实不含纳米细菌)的PBS封闭20 min, 一抗(100 mg/L, mouse monoclonal antibody against nanobacteria 8D10, Nanobac Oy)室温孵育60 min, PBS洗涤5 min $\times 4$ 次, 二抗(1:40 dilution, Rabbit anti-mouse IgG FITC, Sigma-Aldrich)室温孵育45 min, PBS洗涤5 min $\times 4$ 次, 双蒸水洗涤1 min, 500 mL/L甘油封片, 置荧光显微镜下观察. 以PBS代替8D10抗体作阴性对照.

吸取含纳米细菌的培养液, 12 000 g 离心20 min, 弃上清, PBS洗涤沉淀, 25 mL/L戊二醛4 $^{\circ}\text{C}$ 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双蒸水制成混悬液. 用同样方法制成羟基磷灰石的混悬液, 作为实验对照. 进行负染色时, 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.

2 结果

30份胆汁标本在细胞培养的条件下, 部分标本可以培养出纳米细菌, 而阴性对照培养液中无纳米细菌生长. 胆汁样本在37 $^{\circ}\text{C}$ 和50 mL/L CO_2 存在的条件下, 经过2 wk的培养, 在倒置相差显微镜下可见做布朗运动的微小的颗粒状纳米细菌. 4 wk时, 可见纳米细菌开始贴附于培养瓶底部形成细菌被膜(图1), 此时, 肉眼即可看到在培养瓶的底部附着一层白色颗粒状沉淀.

经间接免疫荧光染色, 培养所得纳米细菌与8D10抗体产生特异性结合, 图2中可见发出绿色荧光的纳米细菌. 在以PBS代替8D10抗体的阴性对照中, 未观察到绿色荧光. 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3A), 其表面被覆泥样的细菌被膜(biofilm)(图3B).

其中, 按方法一处理后的胆汁, 纳米细菌培养的阳性率为40%(12/30), 而按方法二处理后的胆汁, 纳米细菌培养的阳性率为57%(17/30)(图4). 两种方法进行比



图2 纳米细菌间接免疫荧光染色($\times 400$).

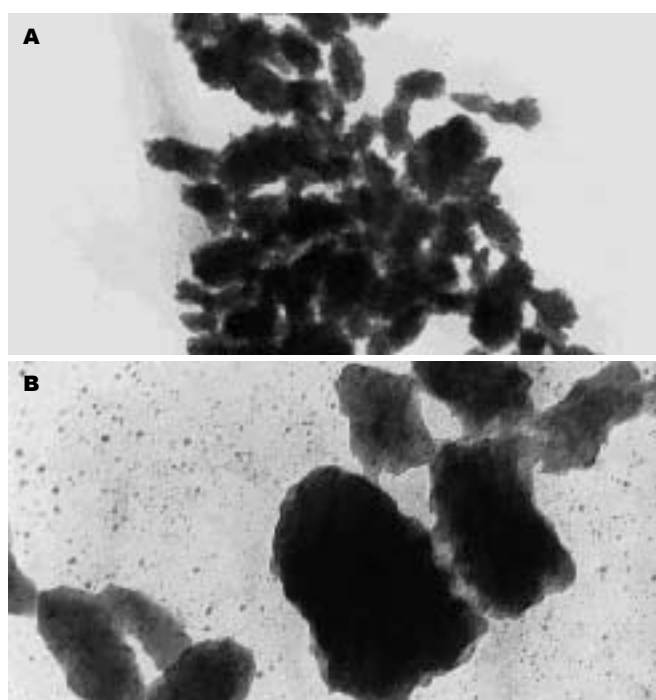


图3 纳米细菌电镜负染图像. A: $\times 10\,000$; B: $\times 30\,000$.

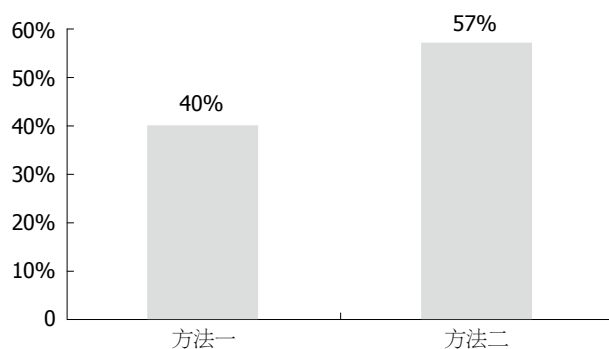


图4 两种方法阳性率比较.

较, 纳米细菌阳性率无显著性差异($\chi^2 = 1.669, P > 0.05$).

3 讨论

纳米生物(nanobe)指直径(横径)在0.10-100 nm的极微小自由生物, 或直径(横径)在100 nm以下的微生物. 纳米细菌(nanobacteria, 或nannobacteria)一词作为

纳米生物的同义词, 现在似乎已成了体积小于正常细菌的微生物的专用名称. 纳米细菌具有独特的生物学特性, 难以用传统的微生物理论诠释. 由于他们体形微小, 难以被常规的细菌学检测方法检出, 而且侵入生物体内的纳米细菌具有独特的生物矿化作用(bio-mineralization), 很难被彻底清除, 因此纳米细菌一经发现, 即在医学界引起了广泛关注, 已成为当前研究的一个热点问题^[10-16].

我们选取30位无其他伴发疾病, 并且无胆囊炎症状的单纯胆囊结石患者, 在腹腔镜胆囊切除手术(laparoscopic cholecystectomy, LC)过程中, 于无菌、厌氧条件下留取胆囊结石患者的胆囊胆汁, 进行纳米细菌培养. 结果显示30例胆汁标本在细胞培养条件下, 经过4 wk的培养, 有17份标本可以观察到大量100-350 nm的颗粒物聚集在培养瓶底部.

正常胆汁中存在大量的黏蛋白以及胆砂、胆固醇结晶等多种有形成分. 这些成分的存在, 为从胆汁中分离纳米细菌造成了不小的麻烦, 如何从成分复杂的胆汁中迅速而高效地提取纳米细菌, 成为胆汁纳米细菌研究中一个技术难点. 在本实验中, 我们采用“稀释-离心-过滤法”(方法一)和“过滤法”(方法二), 对相同的30份胆汁样本分别进行纳米细菌的培养. 虽然经方法二处理后的胆汁, 纳米细菌培养阳性率高于方法一处理的胆汁阳性率(图4), 但这种差异无统计学意义, 可以认为两种方法所得结果是一致的. 而方法二的全部处理过程可以在超净工作台内一次完成, 减少了实验过程中的污染机率, 并且方法二不需要超速离心机, 使操作更加简洁, 值得在今后的研究中加以推广和完善.

纳米细菌体积微小, 可通过0.1 μm 的滤菌膜, 但不能通过0.05 μm 的滤菌膜, 并且常规高压蒸汽灭菌法不能将其灭活, 只有在180 $^{\circ}\text{C}$ 下烤4 h才可以将其灭活^[17]. 因为我们未能得到0.05 μm 的滤菌膜, 故而在实验时我们用3层0.1 μm 的滤菌膜代替, 以便尽可能减少纳米细菌对试剂的污染, 但这一措施并不能完全避免培养过程中纳米细菌的污染, 从而造成胆汁纳米细菌感染的假阳性结果. 为此, 在开始纳米细菌培养之前, 我们对上述细胞培养基以及在鉴定纳米细菌实验过程中将要使用的各种试剂(包括PBS、FBS、蒸馏水等), 在细胞培养条件下进行长达2 mo的培养, 证实无任何颗粒物生长后才在正式实验中使用; 在实验中所用的玻璃及金属器械、器皿, 均采用干烤灭菌法灭菌(180 $^{\circ}\text{C}$, 4 h), 同时在胆汁处理及纳米细菌培养过程中设立阴性对照, 因此胆汁纳米细菌培养的阳性结果是确实、可靠的.

本研究显示, 在胆囊结石患者的胆汁中确实存在纳米细菌. 由人胆汁中培养出的纳米细菌极其微小, 其

横径仅50-100 nm, 长径90-350 nm, 在普通光学显微镜下几乎无法观测, 但在相差显微镜下却可以比较容易的观测到, 而对其细微结构的观察则只能通过分辨率更高的电子显微镜才能实现。

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 Sedivy R, Battistutti WB. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. *APMIS* 2003; 111: 951-954
- 3 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
- 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 Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 1999; 56: 1893-1898
- 9 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
- 10 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
- 11 Sommer AP. Primordial proteins and HIV-Part II. *J Proteome Res* 2005; 4: 1022-1024
- 12 Rieu P. Infective lithiasis. *Ann Urol* 2005; 39: 16-29
- 13 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
- 14 Sommer AP, Pavlath AE. Primordial proteins and HIV. *J Proteome Res* 2005; 4: 633-636
- 15 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
- 16 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
- 17 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

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 •

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年。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1204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, 可为相关领域广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 2005-10-08)

重症急性胰腺炎并发胰性脑病的发病机制

张喜平, 田 华

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
田 华, 浙江大学医学院附属第二医院普外科 浙江省杭州市 310009
浙江省中医药卫生科计划项目, No. 2003C130、No. 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.2003123B134
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, 杭州市第一人民医院普外科.
zxp99688@yahoo.com
电话: 0571-87065701
收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

摘要

胰性脑病(pancreatic encephalopathy, PE)是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病程中的严重并发症, 其发病机制尚未完全明确, 阐明引起和加剧PE的各种因素对有效防治PE具有重要意义. 目前认为PE的发病机制与以下几方面因素有关: 胰酶激活; 细胞因子、氧自由基的过度释放; 血流动力学紊乱导致微循环障碍; ET-1/NO比值失调; 低氧血症; 细菌感染; 水、电解质紊乱及VitB1缺乏等, 上述因素可参与PE的发病过程. 我们对PE上述发病机制研究进行阐述.

关键词: 胰性脑病; 重症急性胰腺炎; 发病机制

张喜平, 田华. 重症急性胰腺炎并发胰性脑病的发病机制. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2667-2671

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2667.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)伴有中枢神经系统症状且在病程早期出现的被认为是胰性脑病(pancreatic encephalopathy, PE), 在病程后期甚至恢复期发生的相同症状表现, 且与禁食和输液未补充维生素B1(vitB1)有关的称韦尼克脑病(wernicke encephalopathy, WE), 亦称为迟发性胰性脑病^[1-2]. PE目前尚无特异性检查方法和统一的诊断标准. 通常根据临床症状及急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)病史诊断^[3]. 主要表现为定向力障碍、烦躁、妄想、幻觉、意识不清或反应迟钝、表情淡漠、抑郁等神经精神症状, 病理检查可观察到脑神经细胞发生弥漫性脱髓鞘病变, 在MRI影像学仅表现为程度不同的白质信号的异常^[4], 以往认为可能与SAP时血液中胰酶作用有关, 故亦称酶性脑病^[5]. 目前SAP的治愈率虽已明显提高^[6], 但临床上SAP并发PE仍占同期患者的18.2%^[7], 且死亡率高达67.0%^[1, 7], 因此是SAP常见的致死原因之一. SAP并发PE时脑组织的病理改变为神经细胞中毒

性水肿, 出血灶、软化灶等^[8]. 近来研究发现SAP患者伴发PE的发病机理有多种, 单一因素都难以全面解释^[9, 10]. 李海民 *et al*^[3]推测脂肪酶与磷脂酶A2 (PLA2)可引起中枢神经系统结构破坏, 是引起PE的病理基础, 而其他因素如低钠、低磷、低氧血症、氮质血症、血糖紊乱以及感染等则可能是发病的诱因. 部分脑组织病变严重的病例可能直接表现出PE^[3]. 近年来国内外学者对PE的报道日见增多^[11], 但其发病机制仍然不完全清楚, 阐明PE的发生机制和各种诱发因素, 仍然是指导临床有效防治PE的关键. 我们就PE的发病机制相关研究进展进行综述.

1 胰酶激活

大脑毛细血管内皮细胞间的紧密连接为主的特殊结构-血脑屏障对脑发挥着屏障保护作用. SAP时大量胰酶(包括胰蛋白酶、弹力蛋白酶、脂肪酶及PLA2等)进入血循环中, 其中PLA2最为重要^[12]. 激活后的PLA2能将脑磷脂和卵磷脂转变成溶血脑磷脂和溶血卵磷脂, 后者具有高度的细胞毒性, 能溶解细胞膜上磷脂结构, 水解线粒体, 导致脑细胞代谢障碍、水肿^[13-16], 引起通透性改变而造成脱髓鞘损害^[16], 破坏血脑屏障的完整性. 内毒素中的脂多糖引起血脑屏障的通透性增加, 溶血卵磷脂可与之存在叠加效应^[17-18]. PLA2自身具有强烈的嗜神经性, 可直接作用于脑细胞的磷脂层, 产生脑细胞水肿、局灶性出血坏死, 并引起神经纤维严重的脱髓鞘改变^[19, 20]及神经细胞继发细胞代谢障碍, 从而出现各种神经精神症状. PLA2还可破坏乙酰胆碱囊泡而抑制其释放, 影响神经肌肉传导, 导致PE的发生^[1], 这是多数学者普遍认可的胰性脑病发病机制^[15].

有研究证实SAP大鼠血清淀粉酶、PLA2及脑组织中PLA2明显高于假手术组, PLA2通过通透性升高的血脑屏障进入脑组织并引起脑组织的病理改变, 表现为脑膜血管扩张出血, 脑内微血管充血, 脑膜、脑实质细胞可见炎性细胞浸润, 细胞间隙增宽. PLA2抑制剂依地钙酸钠, 可显著降低脑组织中PLA2的水平, 减轻脑组织的损害^[15]. 血脑屏障的通透性增加, 也可导致血液中致敏的T细胞进入脑实质引起中枢神经系统产生脱髓鞘病变^[19]. 溶血卵磷脂提高胰腺炎大鼠血脑屏障通透性的机制可能主要与SAP时血脑屏障紧密连接处的破坏有关, 此与毛细血管内皮细胞间紧密连接的不均匀分布特点一致. 溶血卵磷脂对胰腺炎大鼠脑损害效

应的病理基础是脱髓鞘病变,脱髓鞘病变表现为神经冲动传导发生紊乱^[16]。神经冲动传导的变慢、紊乱、泛化在一定程度上解释了PE患者产生神经精神症状的原因^[16]。

2 细胞因子

正常情况下细胞因子在体内的浓度非常低,受到外界刺激后其在短期内迅速增加。细胞因子与脏器细胞受体结合发挥生物学效应,同时又可与循环的可溶性受体结合再次引发细胞因子过度释放。SAP伴发中毒样症状与细胞因子过度产生引起脏器和功能损害密切相关^[21]。研究发现SAP早期细胞因子升高,继发内毒素血症后,细胞因子进一步增高,产生瀑布效应,引起脏器功能损害^[22]。参与的细胞因子主要有TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β ^[14, 23-31],PE与细胞因子关系尚未非常清楚,可能与TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎性细胞因子有关,上述细胞因子促使血脑屏障通透性增加,从而破坏血脑屏障^[14, 32]。研究还证实TNF- α 、IL-1 β 参与和促进了SAP脑损害的发生和发展^[33]。脑缺氧、缺血可引起神经元中TNF- α mRNA升高,脑脊液中TNF- α 浓度显著高于血浆浓度进一步加重脑组织损伤。Farkas *et al*^[14]研究发现,血清TNF- α 和IL-6水平在PE患者大脑中的不同区域均显著增高。国内研究^[34]发现TNF- α 在PE动物模型的脑脊液中显著升高,TNF- α 介导脑组织损害的作用机制^[35-38]可能与以下几个方面有关:(1)TNF- α 可刺激PLA2的分化,也可直接激活PLA2;(2)TNF- α 可激活白细胞并导致白细胞积聚,激活的白细胞可释放增强毛细血管通透性的炎性介质,炎性介质又可正反馈促进TNF- α 等细胞因子产生,从而形成“瀑布”样级联反应;(3)TNF- α 既可直接诱导血管内皮细胞的通透性增加,也可间接通过白细胞发挥作用;(4)TNF- α 对血管内皮的黏附分子如ELAM-1和ICAM-1有向上调节作用,黏附分子向上调节可促进白细胞的黏附和收缩,造成毛细血管渗漏和组织损害;(5)TNF- α 介导髓鞘的炎性损伤,刺激免疫细胞活化,造成对髓鞘的破坏,也可直接对髓鞘产生毒性破坏作用;(6)刺激血小板活化因子(PAF)生成,促使血小板聚集及释放反应,诱导脑微血管血栓形成及内皮细胞的破坏。因而细胞因子在PE的发生中起着重要的作用。TNF- α 抗体能减轻SAP大鼠的脑损害,进一步证实TNF- α 在PE病情发展中具有重要作用^[23]。

3 血流动力学紊乱

血流动力学紊乱在PE发病机制中起着重要的作用。SAP时产生的大量坏死组织毒素、各种胰酶入血,激活体内激肽、凝血、补体等系统,严重影响血流动力学的稳定,对微循环影响更加明显。胰腺在缺血、缺氧

情况下可分泌心肌抑制因子^[39],致使心肌泵血功能下降^[40],加剧了组织器官的灌注不足;SAP引发的血性腹水时导致大量蛋白质渗入腹腔一方面导致膈肌活动减弱,同时血浆胶体渗透压下降引起肺间质水肿,造成肺通、换气功能障碍,加重机体缺氧;大量液体进入第三间隙^[41],有效循环容量不足,严重干扰血流动力学的稳定,引起脑组织微循环障碍和缺血、缺氧^[32];频繁呕吐及后腹膜及网膜组织的广泛水肿,亦是加重休克的原因之一。以上多因素作用导致脑组织缺血、缺氧、微循环障碍,最终形成恶性循环,引起不可逆性中枢神经损害及多器官功能衰竭甚至导致死亡^[8]。坏死胰腺组织得不到充分引流或引流不畅,导致胰腺及胰周感染并加重毒素及酶的吸收,同时前列腺素、组织胺等血管活性物质的释放,使脑组织的血灌注量明显减少,均促进了PE的发生^[42]。

4 ET-1/NO

内皮素-1(ET-1)是目前体内最强的血管收缩因子^[43],脑血管持续痉挛造成脑血流严重下降。NO是主要的内皮细胞依赖性舒血管物质,具有强烈的血管舒张作用及抗血小板聚集、黏附功能。生理状态下ET-1和NO之间存在负反馈调节作用,ET-1通过 β 受体促进NO释放,而NO则经过cGMP途径抑制ET-1产生。正常状态下,ET-1与NO的合成与释放处于动态平衡,其比值水平相对稳定以维持脑血流恒定^[44]。SAP时ET-1、NO水平增加,ET-1/NO比值的失衡导致SAP全身血循环紊乱^[45]。目前证实血清ET-1/NO比值显著升高与脑水肿、血脑屏障损伤程度及脑细胞凋亡呈正相关^[46]。其机制有待进一步研究。

5 氧自由基与PLA2的协同作用

氧自由基在SAP伴发脑组织损害发病机理中可能起重要作用^[47]。研究发现SAP大鼠脑间质及神经细胞肿胀随时间延长而加重,并出现髓鞘变性改变。大鼠血浆及脑组织SOD(超氧化物歧化酶)活性降低,PLA2及MDA(丙二醛)活性则增高,表明胰腺产生PLA2及MDA入血后通过血脑屏障积聚脑组织,而使脑组织逐渐产生水肿、出血及脱髓鞘改变;脑组织氧自由基(OFR)清除剂SOD活性下降证明SAP引发的血浆PLA2及MDA活性升高及其协同作用参与PE的发生发展^[48]。OFR代谢产物MDA含量及PLA2活性增高是引起PE的可能机制^[33]。SAP脑组织中OFR代谢产物MDA增高的可能机制:(1)胰酶可激活黄嘌呤氧化酶,后者催化次黄嘌呤而产生OFR,透过血脑屏障而损害脑组织;(2)胆汁酸是PLA2前身物的激活因子,胆源性胰腺炎时胆汁反流入胰管可激活PLA2,逸出PLA2循门脉系统达肝肺脑等重要器官破坏脑细胞膜上磷脂层,脑细胞功能降

低,引起意识障碍;(3)PLA₂、炎性介质和损伤的血管内皮细胞均可活化血小板,释放OFR。(4)PE晚期随多系统器官功能衰竭(MOSF)的发生,脑组织进一步破坏并继发微血管血栓形成,加剧脑组织缺氧,产生的OFR加重脑损害^[49-53]。

6 谷氨酰胺

SAP患者体内产生的PLA₂可造成肺表面活性物质破坏,肺泡表面张力增高,肺顺应性降低,形成肺水肿、肺不张,V/Q比值降低,通、换气障碍最终导致脑细胞功能障碍并诱发神经精神症状^[54]。低氧血症严重者可导致微循环障碍造成组织缺血。两者进一步加剧脑组织缺血低氧,脑功能受损。SAP时的低氧血症和大量液体丧失,激活肾素-血管紧张素系统亦在PE的发生、发展过程中起重要的作用^[55-57]。临床统计显示SAP发病48 h内有58%的患者出现动脉低氧血症,可能与SAP患者肺泡表面活性物质大量破坏有关,通、换气障碍最终诱发低氧血症,引起脑细胞代谢紊乱和脑水肿的发生^[54]。

7 继发细菌/真菌感染

SAP患者后期继发细菌和/或真菌感染。各种病原体、毒素和抗原抗体聚合物可激活肾上腺髓质系统、补体系统、激肽系统、凝血及纤溶系统等,产生各种血管活性物质,后腹膜坏死组织吸收、腹腔感染、肺部感染和/或霉菌感染引起的毒、败血症^[32],发生感染性休克和多脏器功能障碍^[58]。另一方面,病原体毒素可直接作用于脑细胞,损伤线粒体功能^[59,60],ATP合成减少,脑细胞代谢障碍,发生细胞性脑水肿。SAP患者长期应用大量广谱抗生素,造成肠道菌群失调;肠道功能紊乱、肝肾功能受损和患者免疫功能低下等因素使患者感染真菌的机率大大提高^[61],SAP后期的真菌性菌血症可造成中枢神经系统真菌感染也可能参与PE的发生。

8 水和电解质紊乱

SAP时常合并血液钠、镁、磷、钙、钾等电解质的降低,脑细胞易受水电解质和渗透压等变化的影响,导致脑细胞代谢障碍及脑水肿,产生颅内高压、脑膜刺激征等表现。Knochel *et al*^[62]指出,低钠血症病人可产生脑水肿,重者发生脑疝,低钠血症合并低氧血症时病情则更为凶险,甚至死亡。Ayus *et al*^[63]研究了53例低钠血症患者,发现无低氧血症的患者均痊愈,合并低氧血症的患者遗留不同程度的脑损害或死亡;另一方面,补充电解质剂量过大、速度过快亦可导致脑损伤。SAP时肝、肾功能障碍,钠、镁、磷、钙、钾等电解质紊乱以及低蛋白血症等可使脑细胞灌注不足,导致脑水肿及代谢障碍和脑细胞受损。胰腺坏死常继发胰岛细胞

功能障碍,胰岛素生成减少,血糖升高,渗透性利尿后期引起血容量减少致肾小球滤过率下降,尿糖排出障碍,使血糖进行性升高和血液高渗状态,引起神经功能障碍和昏迷^[64]。

9 VitB₁缺乏

韦尼克脑病(WE)多见于慢性酒精中毒,VitB₁缺乏引起丘脑背棱和乳头体细胞功能损害,导致认知功能部分丧失。VitB₁是硫胺系焦磷酸盐的前体,而焦磷酸盐是三羧酸循环中丙酮酸与 α -酮戊二酸和红细胞醇基转移酶的重要辅酶^[65]。VitB₁缺乏时转酮基酶活性下降,丙酮酸难以进入三羧循环氧化,血中丙酮酸含量增加,SAP患者补充大量葡萄糖的液体可降低丙酮酸脱氢酶的活性,血中丙酮酸的含量增加,大量丙酮酸滞留体内并经肾脏代谢,影响机体能量代谢和利用,可诱发神经症状的产生^[2,66]。VitB₁在体内不能合成且储存较少,容易缺乏。SAP患者长期禁食尤其手术后的较长时间禁食,容易忽视VitB₁的补充,故极易产生WE的临床表现;此外,VitB₁缺乏与内环境紊乱、细胞营养代谢障碍等也有联系^[3]。

10 其他因素

全身性炎症反应(SIRS)期可能和存在的高脂血症、高糖或低糖血症引起的脑代谢障碍、氮质血症、手术应激状态等与早期PE也有关^[44,67]。后期PE(感染期)可能与过早进食、疾病反弹、长期禁食、摄入不足、消耗导致全身各脏器功能代偿储备耗竭,内环境缓冲系统受损^[44],或继发性腹腔高压及并发大出血休克,导致低血容性脑损伤等有关。值得注意的是,随着胰腺炎的控制,胰腺肿胀消退,胰岛功能逐渐恢复,胰岛素治疗调整不及时导致低血糖,亦是诱发PE的重要因素之一^[32,68]。

总之,引起PE的因素众多,单一因素难以解释PE病情演变过程的全貌,SAP并发PE是在胰酶引起大脑细胞脱髓鞘病理改变的基础上多种因素综合作用的结果。因此,对PE发病机制的分析要全面系统,充分了解其发病机制,积极消除各种诱因,对降低PE的发病率及死亡率,具有极其重要的意义。

11 参考文献

- 1 杨春生.急性胰腺炎并发脑病22例临床分析. 陕西医学杂志 2003; 32: 832
- 2 Chen L, Zhang X. Pancreatic encephalopathy and Wernicke encephalopathy. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002; 41: 94-97
- 3 李海民, 窦科峰, 周景师, 高志清, 李开宗, 付由池. 急性胰腺炎并发胰性脑病26例分析. 临床外科杂志 2003; 11: 73-75
- 4 Boon P, de Reuck J, Achten E, de Bleecker J. Pancreatic encephalopathy. A case report and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* 1991; 93: 137-141
- 5 李子禹, 胡义利, 赵宜仁. 胰性脑病. 中华肝胆外科杂志 1999; 5:

- 142-143
- 6 Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G. Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP* 2005; 6: 438-444
- 7 Ding X, Liu CA, Gong JP, Li SW. Pancreatic encephalopathy in 24 patients with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2004; 3: 608-611
- 8 陈鹏, 刘文东, 赵兵, 丁红彬. 重症胰腺炎手术后并发胰性脑病的临床分析. *现代中西医结合杂志* 2002; 11: 836c
- 9 Raraty MG, Murphy JA, McLoughlin E, Smith D, Criddle D, Sutton R. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis. *Scand J Surg* 2005; 94: 89-96
- 10 Pandolfi SJ. Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 538-543
- 11 Tsai HH, Hsieh CH, Liou CW, Chen SD, Huang CR, Chang WN. Encephalopathy and acute axonal sensorimotor polyneuropathy following acute pancreatitis: a case report and review of the literature. *Pancreas* 2005; 30: 285-287
- 12 Mayer JM, Raraty M, Slavin J, Kemppainen E, Fitzpatrick J, Hietaranta A, Puolakkainen P, Beger HG, Neoptolemos JP. Severe acute pancreatitis is related to increased early urinary levels of the activation peptide of pancreatic phospholipase A(2). *Pancreatology* 2002; 2: 535-542
- 13 陈熹, 姚炬, 纪宗正, 吴涛. 急性坏死性胰腺炎大鼠脑组织中磷脂酶A2变化及对脑组织的影响. *陕西医学杂志* 2002; 31: 771-772
- 14 Farkas G, Marton J, Nagy Z, Mandi Y, Takacs T, Deli MA, Abraham CS. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin 6. *Neurosci Lett* 1998; 242: 147-150
- 15 Takeuchi H. Pancreatic encephalopathy. *Ryokibetsu Shokogun Shirizu* 2000; 30: 533-536
- 16 刘小丰, 钱祝银, 苗毅. 溶血卵磷脂对胰腺炎大鼠脑损害作用的实验研究. *中国现代普通外科进展* 2004; 7: 341-342
- 17 邝芳, 王百忍, 鞠躬. 静脉注射脂多糖和小剂量肾上腺素后血脑屏障的开放. *第四军医大学学报* 2000; 21: 83-85
- 18 Schmid B, Finnen MJ, Harwood JL, Jackson SK. Acylation of lysophosphatidylcholine plays a key role in the response of monocytes to lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 2003; 270: 2782-2788
- 19 Homma M, Suzuki H, Kusuhara H, Naito M, Tsuruo T, Sugiyama Y. High-affinity efflux transport system for glutathione conjugates on the luminal membrane of a mouse brain capillary endothelial cell line (MBEC4). *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 198-203
- 20 Homma M, Suzuki H, Kusuhara H, Naito M, Tsuruo T, Sugiyama Y. High-affinity efflux transport system for glutathione conjugates on the luminal membrane of a mouse brain capillary endothelial cell line (MBEC4). *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 198-203
- 21 Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-156
- 22 Douzinas EE, Tsidemiadou PD, Pitaridis MT, Andrianakis I, Bobota-Chloraki A, Katsouyanni K, Sfyras D, Malagari K, Roussos C. The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 53-59
- 23 Yang YL, Li JP, Li KZ, Dou KF. Tumor necrosis factor alpha antibody prevents brain damage of rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2898-2900
- 24 Jiang HL, Xue WJ, Li DQ, Yin AP, Xin X, Li CM, Gao JL. Influence of continuous veno-venous hemofiltration on the course of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4815-4821
- 25 Alsasser G, Antoniu B, Thayer SP, Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Degradation and inactivation of plasma tumor necrosis factor-alpha by pancreatic proteases in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 37-43
- 26 Rau B, Schilling MK, Beger HG. Laboratory markers of severe acute pancreatitis. *Dig Dis* 2004; 22: 247-257
- 27 Jiang CF, Shiau YC, Ng KW, Tan SW. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J Chin Med Assoc* 2004; 67: 442-446
- 28 Naskalski JW, Kusnierz-Cabala B, Panek J, Kedra B. Poly-C specific ribonuclease activity correlates with increased concentrations of IL-6, IL-8 and sTNFR55/sTNFR75 in plasma of patients with acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 439-448
- 29 Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 263-266
- 30 Yang ZH, Yang J, Wang YJ. Protective effect of continuous veno-venous hemofiltration on tissue and organ damage in patients with severe acute pancreatitis. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2004; 16: 232-234
- 31 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
- 32 万赤丹, 熊炯斯, 刘涛, 周峰, 俞建雄, 王春友. 重症胰腺炎并发胰性脑病的临床分析. *腹部外科* 2004; 17: 157-159
- 33 成俊, 周亚魁, 陈纪伟, 史海安. TNF- α , IL-1 β 在胰性脑病发病机制中的作用. *中国普通外科杂志* 2002; 11: 142-145
- 34 李军成, 田斌, 陈易人, 俞秋兴, 吴浩荣. 大鼠急性胰腺炎急性期脑脊液肿瘤坏死因子- α 和脑组织CD44表达. *中华消化杂志* 2004; 24: 373-374
- 35 Riche FC, Cholley BP, Laisne MJ, Vicaut E, Panis YH, Lajeunie EJ, Boudiaf M, Valleur PD. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 257-262
- 36 Nakae H, Endo S, Inoue Y, Fujino Y, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. Matrix metalloproteinase-1 and cytokines in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 134-138
- 37 Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, Qiu-Feng H, Egawa S, Sunamura M, Matsuno S. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery* 2002; 132: 86-92
- 38 Heering P, Grabensee B, Brause M. Cytokine removal in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26: 128-134
- 39 Tenenbein MS, Tenenbein M. Acute pancreatitis due to erythromycin overdose. *Pediatr Emerg Care* 2005; 21: 675-676
- 40 Ates F, Kosar F, Aksoy Y, Yildrm B, Sahin I, Hilmioglu F. QT interval analysis in patients with acute biliary pancreatitis. *Pancreas* 2005; 31: 238-241
- 41 Chen CH, Lu MY, Lin KH, Lin DT, Peng SF, Jou ST. Ureteral obstruction caused by L-asparaginase-induced pancreatitis in a child with acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 380-384
- 42 汪谦, 李湘珏. SAP病人胰性脑病的研究进展. *中国实用外科杂志* 2004; 24: 63-64
- 43 Andrzejewska A, Dlugosz JW. The endothelin-1 receptor antagonists ameliorate histology and ultrastructural alterations in the pancreas and decrease trypsinogen activation in severe taurocholate pancreatitis in rats. *Int J Exp Pathol* 2003; 84: 221-229
- 44 Liu X, Nakano I, Yamaguchi H, Ito T, Goto M, Koyanagi S, Kinjoh M, Nawata H. Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2162-2169
- 45 Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin mediates local and systemic disease sequelae in severe experimental pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 248-254
- 46 殷保兵, 马保金, 蔡端, 张群华, 任惠民, 张延龄. 生长抑素联合生长激素治疗对重症急性胰腺炎大鼠脑损伤的保护作用. *中华消化杂志* 2004; 24: 271-272
- 47 Tadao M, Yuji O. Role of free radicals in the development of

- severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 48 Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatol* 2005; 5: 492-500
- 49 赵海平, 王万祥, 刘淑萍, 欧阳晓晖, 孔广忠, 杨成旺, 寿乃延. 实验性急性出血坏死性胰腺炎血浆及脑组织氧自由基与磷脂酶A₂的关系及纳屈酮治疗作用. *内蒙古医学院学报* 2000;22:84
- 50 赵海平, 王万祥, 欧阳晓晖, 刘淑萍, 罗淑琴, 杨成旺, 寿乃延. 氧自由基对大鼠急性出血坏死性胰腺炎并发脑组织损害的作用. *肝胆胰外科杂志* 1999;11:77-78
- 51 赵海平, 王万祥, 刘淑萍, 罗淑琴, 杨成旺, 寿乃延. 磷脂酶A₂对胰性脑病的作用. *中国病理生理杂志* 1998; 10: 254-256
- 52 赵海平, 王万祥, 刘淑萍, 罗淑琴, 杨成旺, 寿乃延. 急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰腺组织结构改变与内毒素血症的关系及纳屈酮的治疗作用. *中国普外基础与临床杂志* 1998; 5: 326-327
- 53 赵海平, 王万祥, 刘淑萍, 欧阳晓晖, 孔广忠, 杨成旺, 寿乃延. 实验性急性出血坏死性胰腺炎胰腺组织学改变及其与氧自由基的关系. *内蒙古医学院学报* 1998; 20: 156
- 54 甄宗礼. 重症胰腺炎并发胰性脑病的临床分析. *中国现代外科学杂志* 2004; 5: 453
- 55 Leung PS. Local renin-angiotensin system in the pancreas: the significance of changes by chronic hypoxia and acute pancreatitis. *JOP* 2001; 2: 3-8
- 56 Leung PS, Carlsson PO. Tissue renin-angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas. *J Mol Endocrinol* 2001; 26: 155-164
- 57 Leung PS, Chan WP, Nobiling R. Regulated expression of pancreatic renin-angiotensin system in experimental pancreatitis. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166: 121-128
- 58 Powell JJ, Miles R, Siriwardena AK. Antibiotic prophylaxis in the initial management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 1998; 85: 582-587
- 59 Coticchia JM, Lessler MA, Ellison EC, Carey LC. Mitochondrial dysfunction induced by pancreatitis-associated ascitic fluid. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 412-418
- 60 Moreno A, Quereda C, Moreno L, Perez-Elias MJ, Muriel A, Casado JL, Antela A, Dronda F, Navas E, Barcena R, Moreno S. High rate of didanosine-related mitochondrial toxicity in HIV/HCV-coinfected patients receiving ribavirin. *Antivir Ther* 2004; 9: 133-138
- 61 Hoerauf A, Hammer S, Muller-Myhsok B, Rupprecht H. Intra-abdominal Candida infection during acute necrotizing pancreatitis has a high prevalence and is associated with increased mortality. *Crit Care Med* 1998; 26: 2010-2015
- 62 Knochel JP. Hypoxia is the cause of brain damage in hyponatremia. *JAMA* 1999; 281: 2342-2343
- 63 Ayus JC, Arieff AI. Chronic hyponatremic encephalopathy in postmenopausal women: association of therapies with morbidity and mortality. *JAMA* 1999; 281: 2299-2304
- 64 金世龙, 宋小文, 顾红光, 袁涛. 急性重症胰腺炎胰性脑病13例. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 721-722
- 65 Buerstatte CR, Behar KL, Novotny EJ, Lai JC. Brain regional development of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 125: 139-145
- 66 Buerstatte CR, Behar KL, Novotny EJ, Lai JC. Brain regional development of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 125: 139-145
- 67 张刚, 张肇达, 刘续宝, 胡伟明, 严律南, 蒋俊明. 急性胰腺炎并发胰性脑病17例分析. *中国普外基础与临床杂志* 1999; 6: 344-346
- 68 Tsai HH, Hsieh CH, Liou CW, Chen SD, Huang CR, Chang WN. Encephalopathy and acute axonal sensorimotor polyneuropathy following acute pancreatitis: a case report and review of the literature. *Pancreas* 2005; 30: 285-287

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●

第一届全国临床营养支持学术会议通知

本刊讯 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。

含缬酪肽蛋白与消化系统肿瘤

尹义梅, 穆建平, 张晓岚

尹义梅, 河北省邯郸市第一医院消化内科 河北省邯郸市 056002
穆建平, 解放军285医院内三科 河北省邯郸市 056003
张晓岚, 河北医科大学第二附属医院消化内科 河北省石家庄市 050000
通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二附属医院
消化内科. lanz63@163.com
电话: 0311-87222301
收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

摘要

含缬酪肽蛋白(valosin-containing protein, VCP)即p97, 是一种广泛存在的膜结合糖蛋白, 在细胞活性中有着广泛的功能, 其总的特点是作为类似分子伴侣的作用在内质网相关的蛋白降解及细胞周期调控中起重要作用. 已有许多研究证实: VCP的表达水平与食道癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌等消化系统恶性肿瘤的临床病理特征之间密切相关. VCP表达水平高者, 出现复发及转移早, 无瘤生存期短, 预后差. 本文就近年来有关VCP表达水平与消化系统肿瘤相关性的文章进行了回顾.

关键词: 急性胰腺炎; 急性脑损伤; 发病机制

尹义梅, 穆建平, 张晓岚. 含缬酪肽蛋白与消化系统肿瘤. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2672-2676
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2672.asp>

0 引言

在我国消化系统恶性肿瘤的死亡率较高, 其中胃癌居各种恶性肿瘤死亡率的首位^[1], 胃癌的5 a生存率仅约20%^[2]. 近年来, 由于诊断技术的不断提高, 消化系统肿瘤的早期发现比率不断提高, 患者的预后得到显著改善. 进展期的患者选择合理的治疗方案, 对于提高生存率至关重要, 有些病人的全身转移就发生在外科治疗后, 甚至是根治术后; 即便是严格的TNM分期, 同一病理分期的患者的预后, 也有大大的不同, 这可能是在手术时就有患者发生了微转移. 因此, 有效的判断胃癌的进展和预后, 对于合理选择治疗方案、提高生存率非常重要. 近年来越来越多的研究显示, 含缬酪肽蛋白(valosin-containing protein, VCP)对消化系统肿瘤的进展和预后具有预测价值.

1 VCP的结构

VCP是与多种细胞活性相关的三磷酸腺苷酶超家族(ATPases associated with various cellular activities, AAA)中的一员, 是糖基磷脂酰肌醇连接的转铁蛋白同系物, 最初发现于黑色素瘤细胞表面, 是一种膜结合糖

蛋白, 其相对分子质量为 M_r 97 000, 又称黑色素转铁蛋白或p97, 它有着广泛的分布, 在酵母、两栖动物及昆虫中均有同系类似物存在^[3,4]. VCP是一个可溶性似环六聚体, 由250个氨基酸残基组成的N端、2个保守的ATP结合域和C端组成. N端的250个氨基酸残基包含有Walk A、B基序, 这是ATP结合和水解的重要结构, N端能结合多泛素链, 负责识别底物. VCP的2个保守的ATP结合域D1、D2区域有高度的序列相似性, 负责类似分子伴侣的活性, 在VCP的ATP酶循环中, D1环是其稳固性所必需的, 在热诱导的活性中发挥作用. D2环控制主要的ATP酶活性, 主要执行构象改变^[5]. 在色氨酸荧光性及胰蛋白酶分析中发现^[6], 只有在D2环完整存在条件下, ATP/ADP与VCP结合才能使其构象改变, 使被束缚的底物发生张力改变, 导致蛋白络合物被分解或底物的伸展.

2 VCP的生物学功能

2.1 调控细胞增殖 无论在植物细胞细胞膜融合和细胞质分裂的过程中, 还是在哺乳动物细胞发生有丝分裂时, 必须有VCP同系类似物cdc48p或者VCP存在才能保证高尔基体能平等分配到子细胞中, 才能使纺锤体断开, 与染色体的分离最后完成^[7]. Uchiyama *et al*^[8]将注射了p97的细胞进行检测, 证实VCP存在才能保证高尔基体的分解和组装, 从而促进细胞的分裂与增殖. zhang *et al*^[9]将人4.1带-相关蛋白-酪氨酸磷酸酯酶1(the human band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase, PTPH1)导入NIH3T3细胞中, 发现PTPH1的异常表达能抑制细胞的生长, 而PTPH1通过VCP的去磷酸化作用实现对细胞生长的调控. Huyton *et al*^[10,11]亦证实VCP的去磷酸化作用对于细胞周期的进展至关重要.

2.2 激活T细胞 Egerton *et al*^[12]研究发现, 在由T细胞受体引起一系列快速的细胞蛋白的酪氨酸磷酸化致T细胞激活时, 无论从鼠科动物、猪, 还是人的蛋白纯化测序中发现, VCP是T细胞受体早期酪氨酸磷酸化的底物, 在T细胞的激活中发挥重要作用.

2.3 维持内环境稳态 内质网中错误折叠蛋白的蓄积, 可以引起内环境稳态的失衡, 导致内质网应激, 致细胞程序化死亡. 内质网相关降解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)是一个蛋白质量控制机制. Zhong *et al*^[13], Rao *et al*^[14]及Hirabayashi *et al*^[15,16]先后在实验中发现: 在ERAD过程中, VCP是反常折叠蛋

白的识别因子和病理效应器, 陪伴底物从内质网到细胞质中, 通过泛素蛋白酶体(ubiquitin proteasome, Ub-Pr)途径降解^[17-21]. Ub-Pr系统是真核细胞中的一种蛋白降解途径, 主要降解细胞内泛素化的蛋白质. 泛素经过泛素活化酶E1、泛素结合酶E2、泛素连接酶E3等一系列催化步骤结合底物蛋白, 形成泛素-底物蛋白复合物, 使底物进入26S蛋白酶体内实现泛素化降解^[22]. VCP是此泛素介导的蛋白酶降解过程中多泛素链上的标记因子, VCP的缺失导致Ub-Pr的抑制和泛素化蛋白的蓄积. VCP同泛素化的蛋白通过直接结合在其N末端至底物的多泛素链上, 而且其N末端在Ub-Pr中是必需的.

2.4 对核转录因子- κ B 的调控作用 有研究证实^[23], VCP的抗凋亡作用及促肿瘤转移作用是通过激活核转录因子NF- κ B(Nuclear-Factor kappa B, NF- κ B)信号转导通路实现的. NF- κ B的活化在抵抗细胞凋亡中的重要作用已被广泛证实. NF- κ B是由Rel蛋白家族中的成员以二聚体形式组成的转录因子. 细胞静息时, NF- κ B与其抑制因子(inhibitor of Nuclear-Factor kappa B, I- κ B)结合成无活性的复合物存在于细胞浆中, I- κ B遮蔽着NF- κ B的基因定位序列. 当细胞受到细菌、病毒、炎性细胞因子、肿瘤坏死因子、电力辐射及化疗药物等外界因子刺激时, I- κ B发生磷酸化并迅速降解, NF- κ B被激活, 转入细胞核内调控一系列基因表达. VCP对NF- κ B信号通路的作用是通过调控I- κ B实现的. I- κ B的失活导致NF- κ B的持续活化, 其发生包括I- κ B的磷酸化及Ub-Pr途径的降解作用. 已有研究证明: VCP确与I- κ B呈免疫复合物沉淀. VCP与泛素化的I- κ B的络合物与NF- κ B解离, 使NF- κ B激活. 在这个过程中, VCP在I- κ B和26S蛋白酶之间提供一个物质上和功能上的链, 并在Ub-Pr的降解中发挥重要作用, 缺乏VCP导致I- κ B代谢受阻, NF- κ B活性下降; VCP增高, 则NF- κ B的活性增强, 进而表达出抗凋亡和促肿瘤转移的作用.

VCP的所有活性, 已被证明^[24-27], 直接或间接的由泛素依赖的蛋白降解途径Ub-pr调控, 在此途径中VCP是作为一个普遍存在的分子伴侣来标记多种底物, 到蛋白酶处降解. 由于底物的多样性也形成了VCP在许多看起来并不相关的细胞活性中起作用^[28,29]. 这些底物有: 有丝分裂的细胞周期蛋白、细胞周期的蛋白的激酶抑制剂P27、原癌基因产物P53、c-myc、c-Jun、I- κ B. Asai *et al*^[23]应用VCP转染小鼠的骨肉瘤细胞株Dunn, 研究了VCP是否影响NF- κ B活性. 融合状态的Dunn细胞, VCP水平低, 磷酸化的I- κ B增加, NF- κ B活性近乎停止; 应用肿瘤坏死因子 α 刺激时, Dunn/VCP细胞则表现出持续的NF- κ B活化. 进一步研究证实, VCP的抗凋亡作用, 由于持续的NF- κ B的激活及直接的P-I- κ B活性减低.

3 VCP表达水平与消化系统肿瘤临床病理和预后的关系

Yamamoto *et al*^[30-35]先后对食道癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌进行了VCP表达水平的研究应用免疫组织化学方法分析以上肿瘤切除物中VCP的表达水平, 并与同系无瘤相关组织进行对比, 将VCP表达水平弱于或等于同系无瘤相关组织定为水平1, 强于同系无瘤相关组织定为水平2, 结果显示, 食道癌、胃癌、结直肠癌、肝癌及胰腺癌组织中VCP呈水平2表达率达61.4-71.3%, 与肿瘤的大小、浸润程度、组织学类型、病理分期等密切相关, VCP高水平表达的患者易于淋巴结转移及复发; 相反则预后较好. 并对胃癌患者治疗后复查, 在早期胃癌中VCP表达水平1者, 5 a无瘤生存率100%, VCP表达水平2者, 5 a无瘤生存率90.4%; 在进展期胃癌中VCP表达水平1者, 5 a无瘤生存率85.7%, VCP表达水平2者, 5 a无瘤生存率51.8%, $P < 0.05$, 有明显的统计学差异. 证实VCP表达水平可以作为胃癌患者进展和预后预测因素.

Yamamoto *et al*又进行了结肠良恶性肿瘤间VCP表达水平的研究, 发现VCP在8例结肠腺瘤中全部呈低水平表达, 在10例结肠癌中全部呈高水平表达. Yamamoto, Tomita, Hoshida *et al*在食道癌、结直肠癌、肝癌中各选取病历, 分别为10例、8例和11例, 应用RT-PCR技术, 测定VCP mRNA, 比较其与VCP蛋白表达之间的关系, 发现VCP蛋白水平与VCP mRNA表达量显著正相关, 证明了免疫组织化学测定VCP水平的可靠性.

越来越多的实验证实, VCP的表达水平在消化系统肿瘤组织中比同系非瘤组织中的表达水平明显增高, 与肿瘤的大小、浸润深度、组织学类型、血管或淋巴管的转移及淋巴结的转移有明显的相关性. 组织学TNM分级与VCP水平相结合分析后认为, 无论是早期, 还是进展期, VCP表达水平对肿瘤都有提示和预测作用, 而与年龄、性别及肿瘤生长部位等未见相关关系. 有人在非小细胞性肺癌、前列腺癌、齿龈癌等病例中用同样的方法测定VCP水平^[36-38], 分析后得出与肿瘤的病理分型及转移等有显著相关性的结论.

诸多实验的多变量分析显示: 免疫组织化学方法测定VCP水平, 对于消化系统肿瘤的转移和复发是独立的预示因子.

总之, 由于VCP存在的广泛性^[39-51]、在细胞活动中的基础性^[52-67], 包括膜融合、细胞分裂周期调控、细胞内蛋白的运输和调控以及细胞凋亡等活动中, 均可见其重要作用. 目前比较肯定的抗凋亡及促肿瘤转移作用是通过激活核转录因子NF- κ B信号转导通路实现的. NF- κ B信号转导通路在肿瘤细胞代谢过程中的作用有研究证实^[68,69]. 因此可以预见, VCP对于肿瘤的转移与预后可能有预示作用. 在目前微创治疗日益成熟的今天, 能提前预示转移风险, 对于肿瘤患者合理的选择治疗极为有利.

4 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 黄浦小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠. 中国1990-1992年胃癌死亡率调查分析. *中华肿瘤杂志*, 2002; 24: 4-8
- 2 郑芝田, 林三仁, 郑芝田. *胃肠病学*. 第三版. 人民卫生出版社, 2000: 428-429
- 3 Efrat Rabinovich, Anat Kerem, Kai-Uwe Fröhlich, Noam Diamant, Shoshana Bar Nun. AAA-ATPase p97/cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 2: 626-634
- 4 Song C, Wang Q, Li CC. ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 3648-3655
- 5 Wang Q, Song C, Yang X, Li CC. D1 ring is stable and nucleotide-independent. whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-vcp. *Biol Chem* 2003; 278: 32784-32793
- 6 Rouiller I, DeLaBarre B, May AP, Weis WI, Brunger AT, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM. Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 950-957
- 7 Hemmo H, Meyer, James G, Shorter, Joachim Seemann, Darryl Pappin, Graham Warren. A complex of mammalian Ufd1 and Np14 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO* 2000; 19: 2181-2192
- 8 Uchiyama K, Jokitalo E, Lindman M, Jackman M, Kano F, Murata M, Zhang X, Kondo H. The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J Cell Biol* 2003; 161: 1067-1079
- 9 Zhang SH, Liu J, Kobayashi R, Tonks NK. Identification of the cell cycle regulator VCP (p97/CDC48) as a substrate of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem* 1999; 274: 17806-17812
- 10 Madeo F, Schlauer J, Zischka H, Mecke D, Fröhlich KU. Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 131-141
- 11 Huyton T, Pye VE, Briggs LC, Flynn TC, Beuron F, Kondo H, Ma J, Zhang X, Freemont PS. The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6 Å. *J Struct Biol* 2003; 144: 337-348
- 12 Egerton M, Ashe OR, Chen D, Druker BJ, Burgess WH, Samelson LE. VCP, the mammalian homolog of cdc48, is tyrosine phosphorylated in response to T cell antigen receptor activation. *EMBO J* 1992; 11: 3533-3540
- 13 Zhong X, Shen Y, Ballar P, Apostolou A, Agami R, Fang S. AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 2004; 279: 45676-45684
- 14 Rao RV, Poksay KS, Castro-Obregon S, Schilling B, Row RH, del Rio G, Gibson BW, Ellerby HM, Bredesen DE. Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2004; 279: 177-187
- 15 Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, Nakadate K, Ohsawa Y, Kamei Y, Popiel AH, Sinohara A, Iwamatsu A, Kimura Y, Uchiyama Y, Hori S, Kakizuka A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* 2001; 8: 977-984
- 16 Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A. Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 47358-47365
- 17 Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S. Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J* 2002; 21: 615-621
- 18 Rabinovich E, Kerem A, Fröhlich KU, Diamant N, Bar-Nun S. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 626-634
- 19 Bays NW, Wilhovsky SK, Goradia A, Hodgkiss-Harlow K, Hampton RY. HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 4114-4128
- 20 Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8035-8044
- 21 Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, Nakadate K, Ohsawa Y, Kamei Y, Popiel AH, Sinohara A, Iwamatsu A, Kimura Y, Uchiyama Y, Hori S, Kakizuka A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* 2001; 8: 977-984
- 22 Nagahama M, Suzuki M, Hamada Y, Hatsuzawa K, Tani K, Yamamoto A, Tagaya M. SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 262-273
- 23 Asai T, Tomita Y, Nakatsuka S, Hoshida Y, Myoui A, Yoshikawa H, Aozasa K. VCP (p97) regulates NFκB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 296-304
- 24 Dai RM, Li CC. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 740-744
- 25 Efrat Rabinovich, Anat Kerem, Kai-Uwe Fröhlich, Noam Diamant, Shoshana Bar-Nun. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 2: 626-634
- 26 Uchiyama K, Jokitalo E, Kano F, Murata M, Zhang X, Canas B, Newman R, Rabouille C, Pappin D, Freemont P, Kondo H. VCI135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly *in vivo*. *J Cell Biol* 2002; 159: 855-866
- 27 Meyer HH, Wang Y, Warren G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J* 2002; 21: 5645-5652
- 28 Partridge JJ, Lopreiato JO Jr, Latterich M, Indig FE. DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4221-4229
- 29 Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF, Visconti PE. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem* 2003; 278: 11579-11589
- 30 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Kidogami S, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Nakamori S, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5558-5565
- 31 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Nakamori S, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2537-2544
- 32 Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, Harabuchi Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 634-640
- 33 Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepa-

- tocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. *J Clin Oncol* 2003; 21: 447-452
- 34 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Ishikawa O, Ohigashi H, Nakamori S, Monden M, Aozasa K. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 165-172
- 35 Wang ZH, Shen D, Williams P, Alberto B, Jason S, Steve S, Janine P, Natalie S, Brock A. Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 2004; 304: 1164-1166
- 36 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Monden M, Yamamoto S, Iuchi K, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 697-704
- 37 Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, Kono T, Oka T, Yamamoto S, Nonomura N, Okuyama A, Aozasa K. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3007-3012
- 38 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Toyosawa S, Inohara H, Kishino M, Kogo M, Nakazawa M, Murakami S, Iizuka N, Kidogami S, Monden M, Kubo T, Ijuhin N, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein (VCP) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2004; 15: 1432-1438
- 39 Zhang H, Wang Q, Kajino K, Greene MI. VCP, a weak ATPase involved in multiple cellular events, interacts physically with BRCA1 in the nucleus of living cells. *DNA Cell Biol* 2000; 19: 253-263
- 40 Yen CH, Yang YC, Ruscetti SK, Kirken RA, Dai RM, Li CC. Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of nontyrosine kinase-type cytokine receptors of IL-9, IL-2, and erythropoietin. *J Immunol* 2000; 165: 6372-6380
- 41 Hitchcock AL, Krebber H, Frieze S, Lin A, Latterich M, Silver PA. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 3226-3241
- 42 Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 2001; 414: 652-656
- 43 Hasselgren PO, Wray C, Mammen J. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1-10
- 44 Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 134-139
- 45 Higashiyama H, Hirose F, Yamaguchi M, Inoue YH, Fujikake N, Matsukage A, Kakizuka A. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ* 2002; 9: 264-273
- 46 Lord JM, Ceriotti A, Roberts LM. ER dislocation: Cdc48p/p97 gets into the AAA. *Curr Biol* 2002; 12: R182-R184
- 47 Chong SP, Jangi MS, Wan KL. Molecular characterization and expression of a putative ATPase domain from *Eimeria tenella*. *J Biochem Mol Biol Biophys* 2002; 6: 123-128
- 48 Geusova G, Kalab P, Peknicova J. Valosine containing protein is a substrate of cAMP-activated boar sperm tyrosine kinase. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 366-375
- 49 Kaneko C, Hatakeyama S, Matsumoto M, Yada M, Nakayama K, Nakayama KI. Characterization of the mouse gene for the U-box-type ubiquitin ligase UFD2a. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 297-304
- 50 Matsumoto A, Dobashi H, Ohnishi H, Tanaka T, Kubota Y, Kitataka A, Ishida H, Tokuda M, Waki M, Kubo A, Ishida T. Tyrosine phosphorylation of a novel 100-kDa protein coupled to CD28 in resting human T cells is enhanced by a signal through TCR/CD3 complex. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 63-69
- 51 Waugh MG, Minogue S, Anderson JS, Balinger A, Blumenkrantz D, Calnan DP, Cramer R, Hsuan JJ. Localization of a highly active pool of type II phosphatidylinositol 4-kinase in a p97/valosin-containing-protein-rich fraction of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2003; 373: 57-63
- 52 Zalk R, Shoshan-Barmatz V. ATP-binding sites in brain p97/VCP (valosin-containing protein), a multifunctional AAA ATPase. *Biochem J* 2003; 374: 473-480
- 53 Bruderer RM, Brasseur C, Meyer HH. The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 49609-49616
- 54 Shiozawa K, Maita N, Tomii K, Seto A, Goda N, Akiyama Y, Shimizu T, Shirakawa M, Hiroaki H. Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain. *J Biol Chem* 2004; 279: 50060-50068
- 55 Doolman R, Lechner GS, Avner R, Roitelman J. Ubiquitin is conjugated by membrane ubiquitin ligase to three sites, including the N terminus, in transmembrane region of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for sterol-regulated enzyme degradation. *J Biol Chem* 2004; 279: 38184-38193
- 56 Miyachi K, Hirano Y, Horigome T, Mimori T, Miyakawa H, Onozuka Y, Shibata M, Hirakata M, Suwa A, Hosaka H, Matsushima S, Komatsu T, Matsushima H, Hankins RW, Fritzler MJ. Autoantibodies from primary biliary cirrhosis patients with anti-p95c antibodies bind to recombinant p97/VCP and inhibit in vitro nuclear envelope assembly. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 568-573
- 57 Hartmann-Petersen R, Wallace M, Hofmann K, Koch G, Johnsen AH, Hendil KB, Gordon C. The Ubx2 and Ubx3 cofactors direct Cdc48 activity to proteolytic and nonproteolytic ubiquitin-dependent processes. *Curr Biol* 2004; 14: 824-828
- 58 Indig FE, Partridge JJ, von Kobbe C, Aladjem MI, Latterich M, Bohr VA. Werner syndrome protein directly binds to the AAA ATPase p97/VCP in an ATP-dependent fashion. *J Struct Biol* 2004; 146: 251-259
- 59 Yamanaka K, Okubo Y, Suzuki T, Ogura T. Analysis of the two p97/VCP/Cdc48p proteins of *Caenorhabditis elegans* and their suppression of polyglutamine-induced protein aggregation. *J Struct Biol* 2004; 146: 242-250
- 60 Dreveny I, Kondo H, Uchiyama K, Shaw A, Zhang X, Freemont PS. Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *EMBO J* 2004; 23: 1030-1039
- 61 Wojcik C, Yano M, DeMartino GN. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 2004; 117: 281-292
- 62 Brunger AT, DeLaBarre B. NSF and p97/VCP: similar at first, different at last. *FEBS Lett* 2003; 555: 126-133
- 63 DeLaBarre B, Brunger AT. Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 856-863
- 64 Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG, Madura K. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 6469-83
- 65 Imamura S, Ojima N, Yamashita M. Cold-inducible expression of the cell division cycle gene CDC48 and its promotion of cell proliferation during cold acclimation in zebrafish cells. *FEBS Lett* 2003; 549: 14-20
- 66 Wang Q, Song C, Irizarry L, Dai R, Zhang X, Li CC. Multifunctional roles of the conserved Arg residues in the second region of homology of p97/valosin-containing protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 40515-40523
- 67 De Visser E, Deckers JA, Veth RP, Schreuder HW, Mulder TW,

- Duysens J. Deterioration of balance control after limb-saving surgery. *Am J Phys Med Rehabil* 2001; 80: 358-365
- 68 Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 883-888
- 69 Nobuhiko S, Takashi M, Kentaro H, Takashi Y, Masazumi T, Hirokazu N, Kenjiro N, Takeharu Y, Akihiko U, Masao T and Mitsuo K. Nuclear factor-B p65 (RelA) transcription factor Is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 4136-4142

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 •

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

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: 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.

δ 氨基酮戊酸-光动力疗法诱导 SW480 细胞钙调素和突变型 p53 的表达变化

郑江华, 时德, 陈祖林, 梁平

郑江华, 时德, 重庆医科大学附属第一医院血管外科 重庆市 400016
陈祖林, 梁平, 第三军医大学新桥医院普外科 重庆市 400037
国家自然科学基金资助项目, No. 30271481
通讯作者: 陈祖林, 400037, 重庆市, 第三军医大学新桥医院普外科.
chenzulin@163.com
电话: 023-68774405 传真: 023-68774605
收稿日期: 2005-09-02 接受日期: 2005-09-30

Expression of calmodulin and mutant p53 in SW480 cells in response to delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy

Jiang-Hua Zheng, De Shi, Zu-Lin Chen, Ping Liang

Jiang-Hua Zheng, De Shi, Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Zu-Lin Chen, Ping Liang, Department of General Surgery, Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271481

Correspondence to: Zu-Lin Chen, Department of General Surgery, Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China. chenzulin@163.com
Received: 2005-09-02 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To investigate the expression of calmodulin (CaM) and mutant p53 in human colon carcinoma SW480 cell lines after induced by delta-aminolevulinic acid (ALA)-based photodynamic therapy (PDT).

METHODS: SW480 cells were divided into control, laser light, ALA, and ALA-PDT group. The expression of CaM3 and mutant p53 in SW480 cells were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The relative contents of CaM3 in the control, light, ALA group, and ALA-PDT 30, 60, and 90 min group were 3.97 ± 0.29 , 4.28 ± 0.39 , 4.51 ± 0.44 , 12.60 ± 1.84 , 11.39 ± 1.13 , and 12.77 ± 1.35 , respectively. The expression of CaM3 in the ALA-PDT 30-90 min group was significantly increased in comparison with that in the control, light, and ALA group ($P < 0.001$). The relative expression of p53 gene in the control, light, ALA group, and ALA-PDT 30, 60, and 90 min group were 1.12 ± 0.083 , 1.53 ± 0.191 , 1.23 ± 0.145 , 0.47 ± 0.04 , $0.42 \pm$

0.06 , and 0.49 ± 0.38 , respectively. The expression of p53 in the ALA-PDT 30-90 min group was significantly decreased in comparison with that in the control, light, and ALA group ($P < 0.001$).

CONCLUSION: The increase of calmodulin expression and decrease of mutant p53 expression may be involved in the mechanism of ALA-PDT-induced apoptosis in SW480 cells.

Key Words: Colon carcinoma; Aminolevulinic acid; Photodynamic therapy; SW480 cell line; Calmodulin; Mutant p53; Gene expression

Zheng JH, Shi D, Chen ZL, Liang P. Expression of calmodulin and mutant p53 in SW480 cells in response to delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2677-2680

摘要

目的: 探讨 δ 氨基酮戊酸-光动力疗法(ALA-PDT)诱导SW480细胞钙调素(CaM)和突变型p53基因表达变化。

方法: 将SW480细胞分为4组: 对照组、光照组、ALA组、ALA-PDT组, 采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测各组细胞中CaM3和突变型p53基因的表达。

结果: 空白对照组, 激光照射组, ALA组, ALA-PDT后30 min组, ALA-PDT后60 min组以及ALA-PDT后90 min组的CaM3的相对表达量分别为 3.97 ± 0.29 , 4.28 ± 0.39 , 4.51 ± 0.44 , 12.60 ± 1.84 , 11.39 ± 1.13 和 12.77 ± 1.35 , 空白对照组、激光照射组和ALA组CaM3的相对表达与ALA-PDT组比较具有显著差异($P < 0.001$), 即ALA-PDT后30-90 min, CaM3表达显著升高; 空白对照组, 激光照射组, ALA组, ALA-PDT后30 min组, ALA-PDT后60 min组以及ALA-PDT后90 min组的p53的相对表达量分别为: 1.12 ± 0.083 , 1.53 ± 0.191 , 1.23 ± 0.145 , 0.47 ± 0.04 , 0.42 ± 0.06 和 0.49 ± 0.38 , 空白对照组、激光照射组和ALA组p53的相对表达与ALA-PDT组比较具有显著差异($P < 0.001$), 即p53表达显著下降。

结论: δ 氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞凋亡机制之一可能与钙调素表达升高和突变型p53表达降低有关。

关键词: 结肠癌; δ 氨基酮戊酸; 光动力疗法; SW480; 钙调素; 突变型p53; 基因表达

郑江华, 时德, 陈祖林, 梁平. δ -氨基酮戊酸-光动力学疗法诱导SW480细胞钙调素和突变型p53的表达变化. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2677-2680
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2677.asp

0 引言

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是指光敏剂选择性地聚集在肿瘤组织中, 接受光照后在细胞内产生活性氧物质, 而导致肿瘤细胞凋亡或坏死的一种治疗方法. 迄今为止, 加拿大、美国、法国、荷兰、德国和日本等国家已先后批准PDT用于一些恶性肿瘤^[1]. δ -氨基酮戊酸(aminolevulinic acid, ALA) 光动力学疗法(ALA-PDT)的优势在于使用了 δ -氨基酮戊酸, 一种血红素生物合成的前体物质. 在大多数类型的癌细胞中, 由于胆色素原脱氢酶活性增加而亚铁螯合酶活性降低^[2], 导致原卟啉IX(protoporphyrin IX, Pp IX)在癌细胞内积累, Pp IX具有极好的光敏特性, 用与之吸收波段相应的光照射后将导致癌细胞的破坏^[3]. ALA-PDT的临床应用主要在于其对癌细胞具有高度特异性且全身应用后的皮肤光敏的副作用时间短^[4]. PDT能诱导许多不同细胞系发生凋亡^[5], 其细胞毒机制主要依赖于细胞类型、光敏剂及其在细胞内的分布位置. ALA-PDT诱导细胞凋亡的研究也有报道^[5], 但其所诱导的细胞凋亡是否存在钙信号途径还不清楚. 我们以前的研究表明ALA-PDT作用SW480细胞后存在细胞内钙离子浓度瞬时升高^[6], 并发现细胞凋亡与细胞内钙离子浓度变化密切相关, 为此我们对ALA-PDT作用SW480后细胞内钙调素(calmodulin, CaM)基因CaM3和p53 mRNA的含量变化进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 光敏剂ALA购于Sigma公司; SW480由第四军医大学实验中心提供; 引物由上海生工合成; RT-PCR试剂盒购于北京鼎国生物技术公司.

1.2 方法

1.2.1 PDT处理 用含有青霉素和链霉素(分别 1×10^5 U/L)和100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养基培养人结肠癌细胞(SW480), 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度, 单层贴壁生长. 实验分为4组: 空白对照组, 激光照射组, ALA组及ALA-PDT处理组. 光敏剂ALA用PBS配制成400 mg/L的储存液, 过滤待用, 工作液用无血清培养基稀释为40 mg/L(终浓度). ALA组和ALA-PDT处理组在暗室按预定时间加入ALA, 严格避光条件下继续孵育4 h, 激光照射组和ALA-PDT处理组使用半导体激光仪(西南师范大学激光所, 波长532 nm, 距光斑3 cm处输出功率12 mW)垂直照射培养板30 min. 空白对照组不加ALA且不受激光照射, ALA组加入ALA不受激光照射.

1.2.2 总RNA提取 取对数生长期 2×10^5 个细胞接种到6孔培养板中, 分别为ALA组、激光照射组、空白对照组、ALA-PDT后30 min组、ALA-PDT后60 min组及ALA-

表1 CaM3和p53基因的引物序列及PCR反应条件

基因	引物序列 (5'-3')	退火温度	PCR产物长度
CaM3	上游: CTTGGCGCCGCTTCCTCACATCTG	63℃	404 bp
	下游: GCCTCAGCCTACCTGCCCTTACC		
p53	上游: TCTGGGACAGCCAAGTCTGT	58℃	435 bp
	下游: GGAGTCTTCCAGTGTGATGA		

PDT后90 min组. 48 h后进行PDT处理, 按预定时间加入1 mL Trizol(北京鼎国生物技术公司)/孔, 适当吹打, 室温放置5 min, 将细胞吸入1.5 mL EP中, 加入0.2 mL氯仿. 用力震荡15 s后室温放置15 min, 4℃, 12 000 g离心15 min, 将上层水相移入新的EP管后加0.5 mL异丙醇, 用力混合后室温放置10 min, 4℃, 12 000 g离心10 min, 弃上清后加入750 mL/L乙醇洗涤2次, 室温干燥5-10 min, 加入20 μ L高压灭菌的DEPC水溶解RNA沉淀. 然后用紫外分光光度计测定浓度和纯度, 并用甲醛变性凝胶电泳检测RNA的完整性.

1.2.3 RT-PCR 每组取1 μ g总RNA于一支0.2 mL的EP管中, 65℃保温10 min, 离心数秒, 放置冰浴中, 按照RT-PCR试剂盒操作说明进行RT反应, 结束后将cDNA放入-20℃备用. PCR体系为25 μ L: RT反应产物2 μ L、10 \times PCR buffer 2.5 μ L、dNTP 0.5 μ L、上下游引物(上海生工合成)各25 pmol、通用引物(GAPDH, 594 bp, 试剂盒自带)0.25 μ L、Taq酶0.5 μ L, 加高压灭菌的DEPC水补足25 μ L. 引物序列、PCR反应条件及产物长短见表1.

1.2.4 PCR产物的检测及扩增量的测量 CaM3和p53分别与GAPDH采用Touch-down PCR方法同管扩增, PCR结束后, 取5 μ L扩增产物与6 \times loading buffer 1 μ L混合后, 用20 g/L琼脂糖凝胶(含EB)在100 V恒电压下电泳60 min后, 用凝胶成像仪在紫外线照射下直接将电泳图像输入计算机, 用图像分析软件测量目的条带灰度值/单位面积, 结果与相应的GAPDH灰度值/单位面积相除后, 所得的商作为各组被检测基因mRNA的相对含量.

统计学处理 每组重复8次, 所得数据以mean \pm SD表示, 显著性检验采用 χ^2 检验, 采用SPSS 11.5统计软件进行数据处理.

2 结果

2.1 RNA样品的鉴定 A_{260}/A_{280} 值在1.8-2.0之间, 说明RNA有较高的纯度. 1 μ L RNA的量为0.5-1.5 μ g之间. 10 g/L甲醛变性琼脂糖凝胶变性电泳结果说明RNA没有降解, 较完整.

2.2 RT-PCR产物半定量分析 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳后, CaM3、p53以及GAPDH基因的产物长度与理论长度一致(图1, 图2). 空白对照组、激光照射组、ALA组、ALA-PDT后30 min组、ALA-PDT后60 min组以及ALA-PDT后90 min组的CaM3相对表达量分别为 3.97 ± 0.29 , 4.28

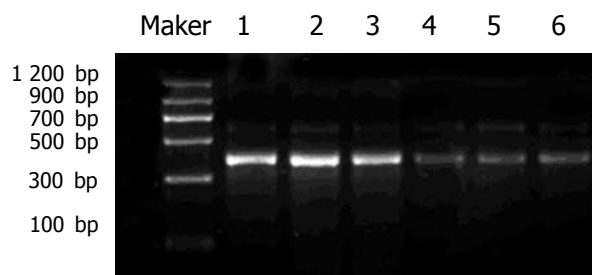


图1 CaM3在各组细胞中的表达. 1: ALA-PDT后30 min组; 2: ALA-PDT后60 min组; 3: ALA-PDT后90 min组; 4: 空白对照组; 5: 激光照射组; 6: ALA组.

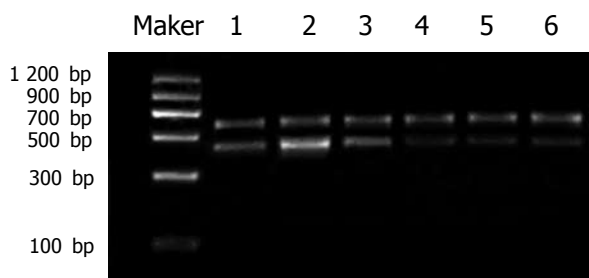


图2 p53在各组细胞中的表达. 1: 空白对照组; 2: 激光照射组; 3: ALA组; 4: ALA-PDT后30 min组; 5: ALA-PDT后60 min组; 6: ALA-PDT后90 min组.

± 0.39 , 4.51 ± 0.44 , 12.60 ± 1.84 , 11.39 ± 1.13 和 12.77 ± 1.35 , 空白对照组、激光照射组和ALA组CaM3的相对表达与ALA-PDT组比较具有显著差异($\chi^2 = 63.45$, $P < 0.001$), 即ALA-PDT后30-90 min, CaM3表达显著升高; 空白对照组、激光照射组、ALA组、ALA-PDT后30 min组、ALA-PDT后60 min组以及ALA-PDT后90 min组的p53相对表达量分别为: 1.12 ± 0.083 , 1.53 ± 0.191 , 1.23 ± 0.145 , 0.47 ± 0.04 , 0.42 ± 0.06 和 0.49 ± 0.38 , 空白对照组、激光照射组和ALA组p53的相对表达与ALA-PDT组比较具有显著差异($\chi^2 = 61.23$, $P < 0.001$), 即ALA-PDT后30-90 min, p53表达显著下降.

3 讨论

细胞内游离钙作为重要的第二信使参与多种细胞功能的调节, 钙浓度的改变是细胞生理功能的重要物质基础, 也是多种受体激活后信号传递过程的中心环节. Ca^{2+} 信使的靶分子或感受体是 Ca^{2+} 结合蛋白(CaBPs), CaBPs种类极多, 按照从 Ca^{2+} 调节反应的性质上分, 有的是起缓冲 Ca^{2+} 或运输体的作用, 有的是 Ca^{2+} 直接调节的、与传递信号相关的酶蛋白, 最多的一类是与 Ca^{2+} 结合后产生构象变化而后作为中介体, 可耦合激活一些下游蛋白激酶、蛋白磷酸酶、钙通道和钙泵等活性, 即钙信号的感受体, 在钙信号途径中起重要作用, 特别是钙信号的多功能感受体-CaM, 是细胞中分布最广、功能最多的一种钙信号的感受体. CaM可以两种方式调节靶蛋白的活性: 一是直接与靶酶结合, 诱导靶酶的活性构象而调节他们的活性, 如

Ca^{2+} -ATP酶、PDE 酶、cAMP环化酶等; 二是通过活化依赖 Ca^{2+} -CaM的蛋白激酶, 间接影响其活性, 如磷酸化酶、糖原合成酶等, 这种方式在钙信号传递中起着重要作用.

细胞内游离钙离子(Ca^{2+})浓度异常升高是导致细胞死亡的重要信号^[7], 我们以前的实验表明ALA-PDT对SW480细胞具有很强的杀伤作用, 并能引起细胞内 Ca^{2+} 瞬时升高^[6]. 本研究表明ALA-PDT后30-90 min, CaM3 mRNA含量显著高于其他对照组. Grebenova *et al*^[8]用ALA-PDT处理HL60人白血病细胞, 结果发现ALA-PDT处理组细胞的CaM蛋白表达增高, 并导致caspase-3激活. 因此ALA-PDT对SW480细胞的强细胞毒效应可能机制之一是: Ca^{2+} 浓度升高刺激CaM从mRNA水平到蛋白水平表达增加, 从而激活caspase-3, 其底物包括Ras-GTP酶激活蛋白(Ras-GAP)、聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶[poly(adenosine diphosphate-ribose)polymerase, PARP]和Bap-31^[9], DNA依赖的蛋白激酶C^[10], caspase活化的DNA酶抑制物(inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease, ICAD)^[11], 病灶黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)和核纤层蛋白^[12]等; 通过上述蛋白的裂解或活化, 切断与周围细胞的联络、关闭DNA复制和修复、破坏DNA和核结构, 最终造成ALA-PDT对SW480的强细胞毒作用. 另外, Ca^{2+} 浓度升高可能直接激活 Ca^{2+} 依赖核酸内切酶^[13], 导致单链和双链DNA断裂, 引起p53表达增加. p53在细胞凋亡中起着重要作用^[14], 并对DNA修复有直接和间接作用^[15]. p53基因分为野生型和突变型两种, 其产物也有野生型和突变型. 野生型蛋白具有反式激活功能和广谱的肿瘤抑制作用, 针对许多不同原因(紫外线照射, 化疗等)的DNA损伤, 野生型p53从转录水平激活或抑制p53反应基因(如Bax、Fas/Apol、p21等). 突变型p53能减少野生型p53特定DNA结合序列并降低野生型p53转录激活^[14], 改变细胞对DNA损伤的敏感性, 促进肿瘤细胞恶化. 野生型p53是人类肿瘤中突变率最高的基因, SW480细胞主要表达突变型p53^[16], ALA-PDT对SW480细胞的p53是否有抑制作用呢? 我们的实验表明, ALA-PDT后30-90 min, p53 mRNA含量显著低于其他对照组. Zacal *et al*^[17]用PDT处理人结肠癌细胞HT29, 结果发现突变型p53表达降低, 与我们的实验结果一致. 说明ALA-PDT能抑制突变型p53的转录, 从而具有抗肿瘤的作用.

4 参考文献

- 1 Johansen LS. Photodynamic therapy. A new method for the treatment of cancer. *Ugeskr Laeger* 1999; 161: 3992-3995
- 2 Bartosova J, Hrkal Z. Accumulation of protoporphyrin-IX (PpIX) in leukemic cell lines following induction by 5-aminolevulinic acid (ALA). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000; 126: 245-252
- 3 Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 889-905
- 4 Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic

- therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 1997; 79: 2282-2308
- 5 Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1704: 59-86
- 6 郑江华, 时德, 陈祖林. δ 氨基酮戊酸-光动力疗法对人结肠癌细胞 SW480 游离钙浓度的影响. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 250
- 7 Antoine AF, Faure JE, Dumas C, Feijo JA. Differential contribution of cytoplasmic Ca^{2+} and Ca^{2+} influx to gamete fusion and egg activation in maize. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1120-1123
- 8 Grebenova D, Kuzelova K, Smetana K, Pluskalova M, Cajthamlova H, Marinov I, Fuchs O, Soucek J, Jarolim P, Hrkal Z. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B* 2003; 69: 71-85
- 9 Vantieghe A, Assefa Z, Vandenabeele P, Declercq W, Courtois S, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte P, Agostinis P. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett* 1998; 440: 19-24
- 10 Granville DJ, Levy JG, Hunt DW. Photodynamic therapy induces caspase-3 activation in HL-60 cells. *Cell Death Differ* 1997; 4: 623-628
- 11 Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. Overexpression of Bcl-X(L) prevents caspase-3-mediated activation of DNA fragmentation factor (DFF) produced by treatment with the photochemotherapeutic agent BPD-MA. *FEBS Lett* 1998; 422: 151-154
- 12 Carthy CM, Granville DJ, Jiang H, Levy JG, Rudin CM, Thompson CB, McManus BM, Hunt DW. Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porphyrin-derived photosensitizer: Bcl-2 and BclxL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. *Lab Invest* 1999; 79: 953-965
- 13 Krebs J. The role of calcium in apoptosis. *Biometals* 1998; 11: 375-382
- 14 Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12: 2973-2983
- 15 McKay BC, Ljungman M, Rainbow AJ. Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1389-1396
- 16 Wang T, Chen F, Chen Z, Wu YF, Xu XL, Zheng S, Hu X. Honokiol induces apoptosis through p53-independent pathway in human colorectal cell line RKO. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2205-2208
- 17 Zacal N, Espiritu M, Singh G, Rainbow AJ. Increased BNip3 and decreased mutant p53 in cisplatin-sensitive PDT-resistant HT29 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 648-657

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 •

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)；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3500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：zhwcwk@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。

胃癌高低发区差异基因型幽门螺杆菌菌株对人胃上皮细胞系GES-1的损伤作用

何红梅, 宫月华, 袁媛

何红梅, 宫月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001

国家“十五”科技攻关资助项目, No.2004BA703B04-02

通讯作者: 袁媛, 110001, 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三研究室: yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23256666-6153 传真: 024-22703576

收稿日期: 2005-08-01 接受日期: 2005-08-26

Damage effect of different genotype of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer

Hong-Mei He, Yue-Hua Gong, Yuan Yuan

Hong-Mei He, Yue-Hua Gong, Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by National Key Technologies Research and Development Program of China during the 10th Five-Year Plan Period, No.2004BA703B04-2

Correspondence to: Professor Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 North Nanjing Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

Received: 2005-08-01 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To investigate the damage effect of the different genotypes of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer, and to explore its related mechanism.

METHODS: *H. pylori* were identified by hematoxylin-eosin (HE) staining, Gimsa staining, and Warthin-Starry silver staining. The DNA was obtained by proteinase K and phenol-chloroform extraction method. The *cagA*, *vacAs1/s2*, *m1a*, *m1b*, and *m2* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The damage effects of *H. pylori* with differential sub-genotypes and 2 other non-differential genotypes on GES-1 cells were observed by cell and *H. pylori* co-culture. The expression of 8-OHdG in GES-1 cells was detected by S-P immunohistochemistry.

RESULTS: GES-1 cells were seriously damaged by *H. pylori*. With the prolongation of the co-culture time, the morphology of GES-1 cells were changed from

spindle to round, and the nuclei showed chromatin pyknosis and clustered on the inner border of karyon. The cytoplasm condensed and blebbing appeared. The numbers of the dead and damaged cells were increasing. The damage effect of *H. pylori* with differential genotypes on GES-1 cells was more serious than that of the non-differential genotypes. The expression of 8-OHdG were almost all negative (0.5% positive) in GES-1 cells of the normal controls, while the positive rate was 98.5% in the *H. pylori* treatment cells ($P < 0.01$).

CONCLUSION: *H. pylori* with *cagA*⁺, *vacAs1*⁺*lm1b*⁺ genotypes in the high-risk area of gastric cancer have more serious damage effects on gastric cancer cell line GES-1, and they can promote the transformation of normal gastric epithelial cells to malignant cells by up-regulation of 8-OHdG expression.

Key Words: Gastric cancer; *Helicobacter pylori*; Differential genotype; Gastric epithelial cell; Co-culture; 8-OHdG

He HM, Gong YH, Yuan Y. Damage effect of different genotype of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2681-2684

摘要

目的: 研究胃癌高、低发区差异基因型幽门螺杆菌(*H. pylori*)菌株对永生化的非肿瘤胃上皮细胞GES-1的损伤作用; 并阐明*H. pylori*致细胞损伤的分子机制。

方法: 通过常规HE染色、Gimsa染色、W-S银染色鉴定*H. pylori*菌株, 采用蛋白酶K及酚-氯仿抽提法提取DNA, PCR法扩增*cagA*、*vacAs1*、*s2*、*m1a*、*m1b*、*m2*基因, 对*H. pylori*基因型进行检测。利用细胞和幽门螺杆菌共培养技术, 观察胃癌高低发区差异基因型*H. pylori*以及其他两种非差异基因型*H. pylori*对胃上皮细胞系GES-1的损伤作用, 并通过免疫细胞化学方法检测GES-1细胞8-OHdG的表达。

结果: 幽门螺杆菌对GES-1细胞具有损伤作用, 随着作用时间的延长, GES-1细胞形态由贴壁的梭形变为圆形, 细胞核染色质浓缩, 呈新月形聚集于核缘, 细胞质浓缩, 可见空泡变性, 死亡细胞逐渐增多。差异基因型*H. pylori*对GES-1细胞的损伤程度比非差异基因型的损伤作用重。正常对照组

8-OHdG表达基本阴性(0.5%), 而*H pylori*处理组GES-1细胞8-OHdG表达阳性达98.5%, 二者差异显著($P<0.01$), 有统计学意义。

结论: 胃癌高发区差异基因型*H pylori*即*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺对胃上皮细胞GES-1具有更强损伤作用, 其损伤具有时间依赖关系; *H pylori*可能通过增加胃上皮细胞8-OHdG表达而导致正常胃黏膜上皮细胞恶性转化。

关键词: 胃癌; 幽门螺杆菌; 差异基因型; 胃黏膜上皮细胞; 共培养; 8-OHdG

何红梅, 宫月华, 袁媛. 胃癌高低发区差异基因型幽门螺杆菌菌株对人胃上皮细胞系GES-1的损伤作用. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2681-2684
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2681.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是慢性胃炎、消化性溃疡的病因, 并与胃腺癌和黏膜相关性淋巴瘤等疾病密切相关^[1-5]. 但*H pylori*致癌的机制目前还不是很清楚, 目前研究也不足以解释*H pylori*感染后发生胃癌的差异性, 有人认为这可能与研究中所应用的菌株或细胞系不同有关。

有证据表明, *H pylori*基因亚型的遗传学差别对产生不同的临床结局具有重要作用, 特别是致病相关基因如: *cagA*、*vacA*和*iceA*等的差异, 与感染的临床结局密切相关^[6]. 辽宁庄河是我国北方胃癌高发区, 胃癌死亡率为50/10万, 本室前期工作发现当地*H pylori*检出率高达79.3%^[7], 明显高于胃癌低发区沈阳, 胃癌高低发区*H pylori*菌株基因型的分布存在明显差异, 其差异基因型组合为*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺^[8].

研究提示, 庄河胃癌高发区的胃癌高发与*H pylori*感染有密切关系, 是否是由于差异基因型*H pylori*是庄河地区胃癌高发的重要危险因素, 还不清楚. 我们通过比较胃癌高低发区差异基因型*H pylori*菌株对永生化的非肿瘤胃上皮细胞GES-1的损伤作用, 以明确差异基因型*H pylori*的致病能力; 检测共培养后GES-1细胞8-OHdG的表达, 以阐明其损伤的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌高发区高危人群胃黏膜培养出的不同基因亚型*H pylori*(中国医科大学肿瘤研究所第三研究室提供), 胃黏膜上皮细胞系GES-1(北京市肿瘤防治研究所细胞研究室提供)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 我们在微需氧的条件下, 把本室菌库中的菌株接种于含70 mL/L羊血的脑心浸液琼脂培养基上, 置于37℃, 50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 相对湿度为97%的三气细菌培养箱内培养, 3-4 d后挑取阳性菌落传代, 涂于新

板上, 48 h后收集。

1.2.2 幽门螺杆菌菌株鉴定 形态学观察: 用常规HE染色、Gimsa染色、W-S银染色鉴定菌株. 用接种环挑取一个菌落, 涂片, 火焰固定细菌. 光学显微镜下观察, HE染色呈蓝色, Gimsa染色呈蓝紫色, W-S银染色见棕黑色或黑色的“S”型、弯曲状、海鸥状、杆状细菌者为*H pylori*阳性. 聚合酶链反应: 采用蛋白酶K及酚-氯仿抽提法提取DNA, PCR法扩增*cagA*、*vacAsI*、*s2*、*mla*、*mlb*、*m2*基因, 对*H pylori*基因亚型进行检测. PCR反应条件如下: *cagA*: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min; *vacA*: 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min; PCR扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外凝胶成像系统观察, 照相。

1.2.3 胃黏膜上皮细胞GES-1培养 采用胃上皮永生化非肿瘤细胞系GES-1置于细胞培养箱, 于37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度的环境培养, 用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 每周更换3次营养液, 并于细胞生长约80%融合时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化并以1:3传代。

1.2.4 *H pylori*与GES-1细胞共培养 细胞处于对数生长期时, 用PBS调节*H pylori*浓度 6×10^8 CFU/mL, 按细胞/细菌(1:200)比例加入不同亚型*H pylori*, 共同孵育. 实验分组根据PCR结果进行: A组细胞加*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺型*H pylori*, B组细胞加*cagA*⁺, *vacAsI*⁻/*mlb*⁻型*H pylori*, C组细胞加*cagA*⁻, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺型*H pylori*, D组细胞只加PBS空白对照。

1.2.5 S-P免疫组化法检测GES-1细胞8-OHdG表达 细胞爬片后用冰丙酮固定15 min, 4℃ PBS冲洗3遍后, 利用S-P免疫组化法检测各组细胞8-OHdG表达. 经DAB显色, 细胞质内出现棕黄色为阳性。

统计学处理 用SPSS软件进行统计学处理: χ^2 检验, $P<0.05$, 认为8-OHdG在*H pylori*阳性和阴性组细胞间表达差别有统计学意义。

2 结果

2.1 *H pylori*及其基因亚型的鉴定 细菌培养和形态学染色结果证实, 培养细菌为*H pylori*, 基因亚型A组菌: *cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺, B组菌, *cagA*⁺, *vacAsI*⁻/*mlb*⁻, C组菌*H pylori*即*cagA*⁻, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺。

2.2 共培养GES-1细胞损伤的形态学观察

2.2.1 幽门螺杆菌对GES-1细胞的损伤作用 正常情况下, GES-1细胞在倒置显微镜下观察呈菱形或多边形等不规则形状, 贴壁, 生长旺盛, 偶见漂浮细胞. 随着作用时间的延长, GES-1细胞形态由正常贴壁的多角形、梭形变为圆形, 贴壁细胞减少, 悬浮细胞增多, 并且细胞周围出现碎片; 细胞核染色质浓缩, 呈新月形聚集于核缘, 细胞质浓缩, 可见空泡变性, 死亡细胞逐渐增多; 死亡和受损伤的细胞逐渐增多; 随着时间的延长, 细胞培养液颜色变黄,

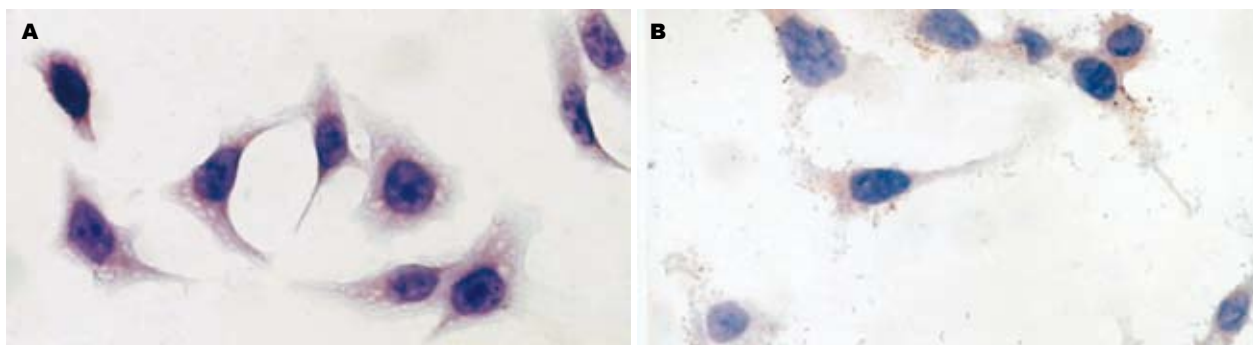


图1 免疫组化8-OHdG表达。A: 无*H. pylori*细胞8-OHdG表达阴性; B: *H. pylori*作用细胞8-OHdG表达阳性。

变混。

2.2.2 高低发区差异基因型*H. pylori*与非差异基因型*H. pylori*致损伤作用的比较 倒置显微镜下,观察到A组细胞加入高低发区差异基因型*H. pylori*后,随着时间的变化,细胞数明显减少,细胞折光性减弱,变圆,与培养瓶附着没有以前紧密,部分细胞脱离瓶壁,悬浮细胞逐渐增多,最后大多数细胞悬浮、死亡,生长液中有大量的死细胞及细胞碎片悬浮;存活细胞贴壁状态也不佳,细胞轮廓变粗,细胞中出现黑色颗粒,空泡变性,老化细胞增多,细胞培养液变黄,变浑。A组、B组、C组、D组细胞损伤程度比较,以A组(差异基因型*H. pylori*)对GES-1细胞的损伤程度最重,而非差异基因型的损伤作用较轻。

2.2.3 免疫组化8-OHdG表达的改变 阴性对照组8-OHdG表达基本阴性,阳性率0.5%(图1A),而*H. pylori*处理组8-OHdG表达阳性率达98.5%,二者差别有统计学意义($P<0.05$,图1B)。

3 讨论

GES-1是胎儿胃黏膜上皮细胞经SV40转化而建立的人胃黏膜上皮细胞永生代细胞株,现已证明GES-1为一基本的胃黏膜细胞株^[9-11]。GES-1是了解正常胃黏膜细胞离体特征以及胃癌致病机制的良好细胞株。以往对*H. pylori*致病性研究多使用胃癌细胞系,本研究使用接近正常胃上皮细胞的GES-1,更能了解*H. pylori*的体内致病性。

*H. pylori*的DNA指纹图和限制性片段长度多肽等方法研究表明在*H. pylori*不同分离株间存在巨大的遗传变异,其遗传异质性大于多种细菌^[7,8]。这种遗传学的差别产生不同的临床结局,特别是*H. pylori*致病相关基因如:*cagA*、*vacA*和*iceA*等的差异,与感染的临床结局密切相关^[9]。来自中国胃癌高发区研究发现*cagA*⁺菌株感染与各型胃疾病、胃癌前病变等均呈明显正相关^[10]。流行病学结果分析,*vacA*等位基因各种组合的产毒能力不同:s1m1型*vacA*基因的菌株产生高水平毒素;s1m2型菌株产生低至中等水平的毒素;而s2m2型菌株不产生有活性的毒素^[11]。

中国医科大学肿瘤研究所第三研究室在十五期间的分析发现庄河地区*H. pylori*感染率高达79.3%,差异基因

型为*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺,与沈阳低发区的*H. pylori*菌株类型差异显著;*vacA*基因亚型两地具有显著性差异。本研究通过*H. pylori*对体外人胃黏膜细胞作用发现,胃癌高低发区差异基因型*H. pylori* *cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺,对非肿瘤细胞GES-1具有明显的DNA损伤作用,而且比非差异基因型*H. pylori*损伤强度更大,结果提示,在胃癌高发区,*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺型*H. pylori*可能具有更大的细胞毒性,从而导致胃癌的发生,庄河地区的*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺型*H. pylori*可能为辽宁庄河地区胃癌高发的环境致癌因素。

研究认为,*H. pylori*代谢产物对胃上皮的基因毒性作用在*H. pylori*致癌作用中占重要地位,特别是在由多因素多步骤参与的致癌始动阶段^[12,13]。机体内细胞的氧化损伤广泛存在,8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanine, 8-OHdG)是活性氧代谢产物之一,目前已成为DNA氧化损伤中最常采用的生物标志物。8-OHdG通过改变碱基配对的性质,导致抑癌基因p53基因和ras原癌基因等基因发生难以修复的DNA G→T或A→C碱基颠换,导致DNA误读,突变,从而启动细胞突变,是癌变过程中的重要事件。*H. pylori*对胃上皮的基因毒性作用在致癌过程中占重要地位,特别是在由多因素多步骤参与的致癌始动阶段^[14,15]。我们的研究表明,胃上皮8-OHdG在*H. pylori*处理组明显高于无*H. pylori*组,提示*H. pylori*使胃上皮细胞8-OHdG表达增加,引起细胞DNA损伤,这可能是*H. pylori*导致胃黏膜上皮细胞恶性转化的机制之一。

致谢:本研究GES-1细胞系由北京市肿瘤所遗传研究室柯杨教授提供。

4 参考文献

- 1 Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology* 1997; 113: 1983-1991
- 2 Graham DY, Yamaoka Y. *H. pylori* and *cagA*: relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. *Helicobacter* 1998; 3: 145-151
- 3 Isaacson PG, Spencer J. Is gastric lymphoma an infectious disease? *Hum Pathol* 1993; 24: 569-570
- 4 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136
- 5 Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogel-

- man JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131
- 6 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279
- 7 袁媛. 辽宁省庄河地区胃癌高发人群综合防治研究. *中国肿瘤* 2005; 14: 307-311
- 8 Gong YH, Wang Y, Yuan Y. Distribution of *Helicobacter pylori* in north China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3523-3527
- 9 Ke Y, Ning T, Wang B. Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell line-GES-1. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1994; 16: 7-10
- 10 Zhang J, Ke Y, Ning T. Glucocorticoid-induced apoptosis of human gastric epithelial cells transfected with p53 genes. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1996; 18: 328-330
- 11 Zheng S, Ke Y. Study of APC, Rb, c-met gene copy numbers of human gastric mucosa epithelial cell line GES-1. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999; 21: 409-411
- 12 Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996; 56: 1279-1282
- 13 Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario FD, Bonvicini P, Naccarato R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1998; 42: 351-356
- 14 Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5137-5142
- 15 Marshall DG, Coleman DC, Sullivan DJ, Xia H, O'Morain CA, Smyth CJ. Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 509-517

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●

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4000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: kewei1968@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: ssshhhqqq66@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。

N-去硫酸肝素对 SCID 小鼠胃癌血管生成和 VEGF 表达的影响

陈金联, 陆金来, 陈明祥, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陈国强, 耿建国

陈金联, 陆金来, 陈明祥, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233
陈国强, 中国科学院上海实验动物中心 上海市 200031
耿建国, 中国科学院上海细胞生物学研究所 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. wqq_021002@163.com
电话: 021-64369181-8970 传真: 021-64837019
收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-10-19

Effect of N-desulfated heparin on angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in mice with severe combined immunodeficiency

Jin-Lian Chen, Jin-Lai Lu, Ming-Xiang Chen, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Guo-Qiang Chen, Jian-Guo Geng

Jin-Lian Chen, Jin-Lai Lu, Ming-Xiang Chen, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Guo-Qiang Chen, Centre of Animal Laboratory, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China
Jian-Guo Geng, Institute of Cell Biology, 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 Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. wqq_021002@163.com
Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-10-19

Abstract

AIM: To investigate the effect of N-desulfated heparin on tumor metastasis, angiogenesis, and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) after orthotopic implantation of human gastric carcinoma in mice with severe combined immunodeficiency (SCID).

METHODS: The SCID mice metastasis model was established by *in situ* implantation of human gastric carcinoma tissue, then the mice were randomly divided into two groups: the normal saline group (treated with normal saline) and NNH group [treated with N-desulfated heparin, 10 mg/(kg·d) iv, 2/wk, for 3 wk]. The mice were sacrificed 6 wk after the implantation. The tumor metastasis, intratumoral microvessel density (MVD), and VEGF expression were evaluated respectively.

RESULTS: The tumor metastasis rates were significantly different between normal saline and NNH group (80% vs 20%, $P < 0.05$). No side effect such as hemorrhage was observed in the mice. The MVD was 8.0 ± 3.1 in the normal saline group and 4.3 ± 1.8 in the NNH group, and there was significant difference between those 2 groups ($P < 0.05$). The positive rate of VEGF expression was significantly higher in the normal saline group than that in the NNH group (90% vs 20%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: N-desulfated heparin can inhibit the metastasis of gastric cancer through inhibiting the expression of tumor VEGF and angiogenesis with no obvious side effect such as hemorrhage.

Key Words: N-desulfated heparin; Gastric carcinoma metastasis; Tumor angiogenesis; VEGF

Chen JL, Lu JL, Chen MX, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Chen GQ, Geng JG. Effect of N-desulfated heparin on angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in mice with severe combined immunodeficiency. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2685-2688

摘要

目的: 研究N-去硫酸肝素对人胃癌重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠转移模型肿瘤转移抑制、血管生成和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。

方法: 建立人胃癌组织原位移植SCID小鼠转移模型, 随机分成两组. 移植1 wk, 分别从静脉内注射生理盐水(生理盐水组)与N-去硫酸肝素[10 mg/(kg·d)](N-去硫酸肝素组), 2次/wk, 共3 wk. 第6 wk处死动物, 观察肿瘤转移情况, 免疫组化方法检测肿瘤组织微血管密度(MVD)、VEGF的表达。

结果: 生理盐水组肿瘤转移率为80%, N-去硫酸肝素组转移率为20%, 两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。未发现出血等副作用。生理盐水组平均微血管密度为 8.0 ± 3.1 , N-去硫酸肝素治疗组平均微血管密度为 4.3 ± 1.8 。经统计学处理, 两组之间差别有显著意义($P < 0.05$)。生理盐水组VEGF阳性表达率明显高于N-去硫酸肝素治疗组, 分别为90%与20%($P < 0.05$)。

结论: N-去硫酸肝素通过抑制肿瘤组织VEGF表达和血管生成, 从而抑制肿瘤的转移, 并且无明显出血等不良反应。

关键词: N-去硫酸肝素; 胃癌转移; 血管生成; 血管内皮生长因子

陈金联, 陆金来, 陈明祥, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陈国强, 耿建国. N-去硫酸肝素对SCID小鼠胃癌血管生成和VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2685-2688
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2685.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的健康. 肿瘤转移是肿瘤致死的关键因素. 迄今为止, 肿瘤转移缺乏有效的防治方法. 近年研究表明, 肿瘤转移与肿瘤血管生成相关, 肿瘤血管生成是一系列血管生长因子和血管生长抑制因子共同调节的, 其影响患者的预后, 抑制血管的生成可抑制肿瘤转移, 从而改善肿瘤患者的生存期和预后^[1-4]. 目前已发现血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维生长因子等, 促进肿瘤血管生成. 抑制血管内皮生长因子等促血管生长因子, 可抑制肿瘤的血管生成和肿瘤转移^[5-7].

肝素为高度硫酸化的蛋白多糖, 作为抗凝剂, 已被广泛应用于临床. 体外实验发现, 肝素可抑制血管内皮生长因子和成纤维生长因子刺激的血管内皮细胞的增殖和血管的形成. 动物实验发现肝素可抑制实验性肿瘤的转移. 因此, 肝素可能具有抗肿瘤转移作用^[8,9]. 然而, 由于肝素强烈的抗凝活性, 限制了他的临床应用. 对肝素进行化学修饰, 可降低其抗凝活性, 但可增强其抗血管生成作用^[10]. 我们用人胃癌组织原位移植SCID小鼠建立胃癌转移模型, 旨在探讨N-去硫酸肝素对肿瘤血管生成和转移的抑制作用, 为N-去硫酸肝素抗肿瘤转移的临床应用提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 羊抗人CD34抗体和羊抗人VEGF抗体系Santa Cruz生物技术公司产品.

1.1.2 动物模型 健康♂重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供, 鼠龄6-7 wk, 体质量20-25 g. 裸鼠皮下传代的人胃癌组织SGC-7901由上海市肿瘤研究所提供, 移植时处死荷瘤裸鼠, 皮肤消毒, 取下肿瘤, 浸入生理盐水中. 采用人胃癌组织原位移植SCID小鼠建立胃癌转移模型. 将动物麻醉后, 依次切开左上腹皮肤、腹壁和腹膜, 仔细暴露胃壁, 在胃大弯中部用剪刀损伤胃浆膜层, 将人胃癌组织块(约5 mm×7 mm)缝在损伤处, 然后将胃送入腹腔内, 缝合腹壁和皮肤^[11].

1.2 方法

1.2.1 分组 模型制作后, 动物随机分为N-去硫酸肝素注射组(N-去硫酸肝素组, $n = 10$)和生理盐水注射组(生理盐水组, $n = 10$). 术后第1 wk, N-去硫酸肝素组静脉内注射N-去硫酸肝素(中国科学院上海细胞生物学和生化所), 每次10 mg/(kg·d)(以100 μ L生理盐水稀释), 2次/wk, 共3 wk. 生理盐水组静脉内注射生理盐水, 每次100 μ L, 2次/wk, 共

3 wk. 每周SCID小鼠称质量2次.

1.2.2 标本收集和病理学检查 所有动物于第6 wk末处死. 对胃癌组织、肿大淋巴结与可疑转移脏器进行病理学检查. 肿瘤组织标本以40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋后常规切片, HE染色, 光镜下观察肿瘤病理变化, 检测肿瘤转移情况.

1.2.3 肿瘤平均微血管密度测定 4 μ m厚的石蜡切片脱蜡后, 应用免疫组化Envision二步法检测CD34, 一抗浓度为1:300, 以血管内皮细胞出现棕黄色染色为阳性. 参照Weidner的方法, 计算肿瘤平均微血管密度, 先在低倍光镜($\times 100$)下全面观察切片以确定肿瘤内血管密度最高处. 再在高倍镜($\times 200$)下, 记录5个视野内的微血管数, 取其平均数作为该动物的平均微血管密度值.

1.2.4 肿瘤组织VEGF表达测定 4 μ m厚的石蜡切片脱蜡后, 应用免疫组化Envision二步法检测VEGF的表达, 一抗浓度为1:60, 以肿瘤细胞细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性染色. 阳性染色的细胞在10%以下为阳性+, 阳性染色的细胞在10%以上为阳性++, 两者相加为阳性染色数.

统计学处理 应用Student's t 检验和 χ^2 精确法检验, $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 N-去硫酸肝素对人胃癌转移的抑制作用 人胃癌SGC-7901组织原位移植SCID小鼠后第6 wk, 见胃癌移植瘤均原位生长良好, 肿瘤向胃腔内突出, 质硬脆; 光镜下见肿瘤组织为低分化胃腺癌组织, 浸润肌层、黏膜下层和黏膜层. 对肿大淋巴结与可疑转移脏器进行病理学检查, 发现淋巴结转移以胃周、肠系膜和主动脉旁淋巴结为主; 各脏器转移以肝脏最为常见, 其次为肺、胰、脾等脏器.

生理盐水组肿瘤转移率为80%, 分别为淋巴结转移8例(8/10), 肝脏转移6例, 其他脏器转移6例. 但经N-去硫酸肝素治疗的小鼠, 则胃癌的淋巴结和脏器的转移明显被抑制. N-去硫酸肝素组发现2例肿瘤转移(2/10), 转移率为20%. 经 χ^2 精确法检验, 生理盐水组肿瘤转移率高于N-去硫酸肝素组, 两组之间差异有统计学意义, $P < 0.05$. N-去硫酸肝素应用对SCID小鼠体质量未见明显影响, 未发出血等副作用.

2.2 N-去硫酸肝素对人胃癌微血管密度的抑制作用 光学显微镜下观察, 可见CD34在血管内皮细胞膜和细胞质染色, 出现管腔结构(图1A). 生理盐水组SCID小鼠胃的原位移植瘤血管生成明显, 平均微血管密度为 8.0 ± 3.1 . N-去硫酸肝素治疗组SCID小鼠胃的原位移植瘤新生血管生成被抑制, 其平均微血管密度为 4.3 ± 1.8 . 经统计学处理, 两组之间差别有显著意义($P < 0.05$).

2.3 N-去硫酸肝素对人胃癌组织VEGF的影响 VEGF阳性染色为棕黄色, 位于肿瘤细胞细胞质内(图1B). 生理盐水组VEGF阳性表达率明显高于N-去硫酸肝素治疗组

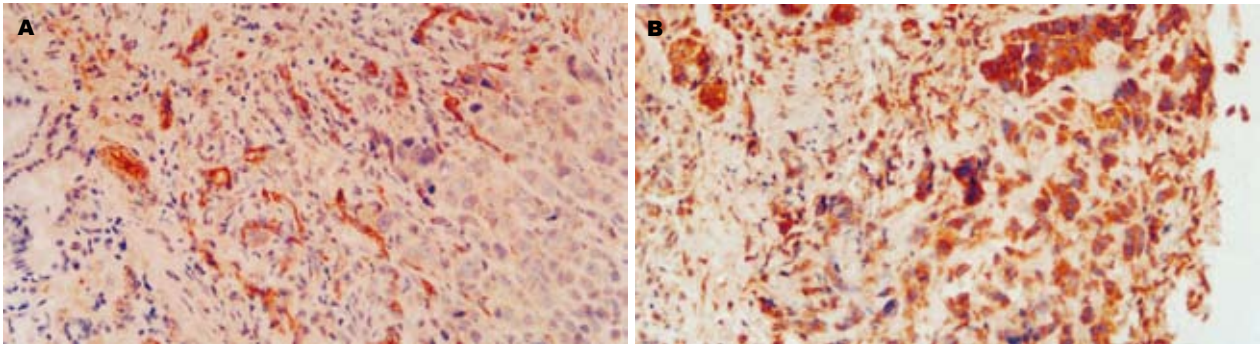


图1 胃癌组织的阳性表达(×200). A: 血管内皮CD34; B: 细胞质内VEGF.

表1 SCID小鼠胃癌组织VEGF阳性表达率(n=10)

分组	-	+	++	阳性率(%)
生理盐水组	1	2	7	90
N-去硫酸肝素组	8	1	1	20 ^a

^a*P*<0.05 vs 生理盐水组.

(*P*<0.05, 表1).

3 讨论

自1971年Folkman提出肿瘤生长依赖新生血管以来, 近年有关肿瘤血管生成与肿瘤生长和转移的研究已受到关注^[12,13]. 血管生成是体积大于1-2 mm³实体瘤生长和肿瘤细胞转移的条件, 抗血管生成治疗对改善胃癌患者临床疗效和预后有重要意义^[1,3,12,14]. 动物实验研究发现, 肝素除了抗凝作用外, 可抑制血管生成, 因此可能具有抗肿瘤转移作用^[8,15]. 然而由于其强烈的抗凝活性, 限制了其在临床应用. 对肝素进行化学修饰, 可降低其抗凝活性, 但可增强其抗血管生成作用. 近年研究表明, 低分子肝素抗凝活性显著下降, 但其结合血管内皮生长因子、成纤维生长因子和肝细胞生长因子等活性显著增强, 因此抑制肿瘤的血管生成作用加强^[16]. N-乙酰肝素对肝素酶的抑制作用加强, 抗血管生成和抗转移作用较非修饰肝素显著增强^[10]. N-去硫酸肝素为化学修饰肝素, 抗凝活性为肝素的1/76, 但其抗炎作用加强^[17]. 目前未见N-去硫酸肝素抗肿瘤转移研究报道.

我们用人胃癌SGC-7901组织原位移植SCID小鼠建立胃癌转移模型, 研究N-去硫酸肝素对胃癌转移及血管生成的影响. 该模型与人类胃癌转移相似, 肿瘤转移率高, 是胃癌转移研究的理想模型. 我们研究发现, 人胃癌组织原位移植SCID小鼠6 wk后, 肿瘤转移率为80%. 但经N-去硫酸肝素治疗后, 肿瘤转移显著被抑制, 转移率为20%, 经 χ^2 检验, 两组之间差别显著(*P*<0.05). 这与文献报道一致. Szende *et al*^[18]的研究发现, 低分子肝素(Fraxiparine)剂量为57 IU/kg和173 IU/kg, 对两种实验性肿瘤转移模型具有显著的抗转移作用, 肝素以100 IU/kg对肿瘤转移未见明显影响. Amirkhosravi *et al*^[19]研究了低分子肝素

(tinzaparin)对黑色素瘤的抗转移作用. 结果发现低分子肝素对黑色素瘤转移的抑制作用为89%(*P*<0.001). Naggi *et al*^[10]的研究发现N-乙酰肝素的抗凝活性较低, 但抗肿瘤转移作用较未修饰肝素明显增强. Kragh *et al*^[20]研究发现, 非抗凝肝素NAC8000对实验性肿瘤转移模型具有抗转移作用, 且未发现明显出血副作用. 研究结果表明N-去硫酸肝素对胃癌等肿瘤具有抗转移作用.

肿瘤血管生成是肿瘤生长和转移的条件. 肿瘤血管生成机制极其复杂, 肿瘤细胞产生的血管内皮生长因子是重要的促血管生长因子, 通过与受体VEGFR1、VEGFR2结合, 具有特异性促进血管内皮细胞增殖和迁移, 增加血管通透性, 在肿瘤的生长与转移中起到重要的作用^[3-6].

我们研究了N-去硫酸肝素对SCID小鼠胃癌血管生成和VEGF的影响. 结果发现, N-去硫酸肝素组的肿瘤平均微血管密度明显低于对照组, 说明N-去硫酸肝素对肿瘤新生血管的生成具有显著的抑制作用. Collen *et al*^[15]的体外研究发现, 肝素与低分子肝素对VEGF刺激的血管内皮细胞增殖和血管形成具有抑制作用. Fernandez *et al*^[21]的研究结果表明, 低分子肝素可抑制肿瘤血管形成. Mousa *et al*^[22]发现, 低分子肝素(tinzaparin)可抑制肿瘤血管生成, 但与促血管生成因子作用无关. Naggi *et al*^[10]的研究表明, N-乙酰肝素等修饰肝素较未修饰肝素具有更强的抗血管生成和抗转移作用. 表明, 肿瘤新生血管大量形成增加了肿瘤细胞转移的机会, 新生的血管通透性较高, 因此增加了肿瘤的转移, 而N-去硫酸肝素通过抑制肿瘤血管生成对胃癌等实体瘤具有抗转移作用.

我们发现, 人胃癌组织原位移植SCID小鼠第6 wk, 肿瘤组织VEGF的阳性率为90%, 但经去硫酸肝素治疗后, 肿瘤细胞VEGF明显被抑制(*P*<0.05), 说明N-去硫酸肝素对胃癌VEGF具有抑制作用. Kakeji *et al*^[23]研究了VEGF表达与胃癌患者的肿瘤转移和预后的关系, 结果发现, VEGF阳性患者的肿瘤转移明显高于阴性患者, VEGF阳性患者预后较差. Fondevila *et al*^[24]的研究表明VEGF表达与胃癌患者术后肿瘤转移复发和预后相关. Tsujitani *et al*^[4]研究了胃癌患者VEGF表达与微血管密度的关系, 结果发现肿瘤细胞内VEGF阳性表达的微血管密度明显高于阴

性患者。Pisano *et al*^[25]的研究表明, 低硫酸化的低分子肝素可抑制VEGF诱导的新生血管形成。研究结果表明, 肿瘤细胞通过分泌VEGF等促血管生长因子, 促进肿瘤新生血管生成, 从而使肿瘤组织内血管增多, 血管通透性增加, 因此在肿瘤转移中起重要作用, N-去硫酸肝素通过抑制VEGF和肿瘤新生血管形成, 对胃癌等肿瘤具有抗转移作用。

总之, N-去硫酸肝素具有抑制肿瘤血管生成和抗肿瘤转移作用, 但无明显出血等副作用, 表明其抗凝活性低, 因此对胃癌等肿瘤转移的治疗具有重要的临床意义。

4 参考文献

- 1 Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, Lensing AW, Prins MH, Piovella F, Prandoni P, Bos MM, Richel DJ, van Tienhoven G, Buller HR. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2130-2135
- 2 Castelli R, Porro F, Tarsia P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med* 2004; 9: 205-213
- 3 Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003; 3: 95-117
- 4 Tsujitani S, Saito H, Maeta Y, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, Kaibara N. Neoangiogenesis in patients with gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Anticancer Res* 2004; 24: 1853-1859
- 5 Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, Takeda A, Akagi M, Ellis LM. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 199-207
- 6 Petralia GA, Lemoine NR, Kakkar AK. Mechanisms of disease: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 356-363
- 7 Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, Takeda A, Liu W, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-1140
- 8 Tovari J, Bereczky B, Gilly R, Skopal J, Vago A, Timar J. Heparin inhibits metastatization of experimental melanoma. *Magy Onkol* 2004; 48: 235-241
- 9 Bobek V, Kovarik J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 213-219
- 10 Naggi A, Casu B, Perez M, Torri G, Cassinelli G, Penco S, Pisano C, Giannini G, Ishai-Michaeli R, Vlodaysky I. Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting. *J Biol Chem* 2005; 280: 12103-12113
- 11 Chen JL, Chen WX, Zhu JS, Chen NW, Zhou T, Yao M, Zhang DQ, Wu YL. Effect of P-selectin monoclonal antibody on metastasis of gastric cancer and immune function. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1607-1610
- 12 Mousa SA. Low-molecular-weight heparin in thrombosis and cancer. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 25-30
- 13 Zacharski LR. Anticoagulants in cancer treatment: malignancy as a solid phase coagulopathy. *Cancer Lett* 2002; 186: 1-9
- 14 Ranieri G, Coviello M, Chiriatto A, Stea B, Montemurro S, Quaranta M, Dittadi R, Paradiso A. Vascular endothelial growth factor assessment in different blood fractions of gastrointestinal cancer patients and healthy controls. *Oncol Rep* 2004; 11: 435-439
- 15 Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, van Hinsbergh VW. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60: 6196-6200
- 16 Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Hashimoto H, Saito Y, Yura H, Kurita A, Maehara T. Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. *Br J Cancer* 2002; 86: 1803-1812
- 17 Zhou T, Chen JL, Song W, Wang F, Zhang MJ, Ni PH, Geng JG. Effect of N-desulfated heparin on hepatic/renal ischemia reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 897-900
- 18 Szende B, Paku S, Racz G, Kopper L. Effect of Fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Res* 2005; 25: 2869-2872
- 19 Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1972-1976
- 20 Kragh M, Binderup L, Vig Hjarnaa PJ, Bramm E, Johansen KB, Frimundt Petersen C. Non-anti-coagulant heparin inhibits metastasis but not primary tumor growth. *Oncol Rep* 2005; 14: 99-104
- 21 Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 31-44
- 22 Mousa SA, Mohamed S. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncol Rep* 2004; 12: 683-688
- 23 Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 125-129
- 24 Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A, Volant A, Pera M. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 206-215
- 25 Pisano C, Aulicino C, Vesci L, Casu B, Naggi A, Torri G, Ribatti D, Belleri M, Rusnati M, Presta M. Undersulfated, low-molecular-weight glycol-split heparin as an antiangiogenic VEGF antagonist. *Glycobiology* 2005; 15: 1C-6C

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

体外培养的肝癌细胞株与正常肝细胞株蛋白质的差异表达

宋旭霞, 闫志勇, 王斌, 牟文凤, 钱冬萌, 丁守怡, 姚宗良

宋旭霞, 闫志勇, 王斌, 牟文凤, 钱冬萌, 丁守怡, 青岛大学医学院微生物教研室 山东省青岛市 266021
姚宗良, 青岛大学师范学院 山东省青岛市 266071
青岛市科技发展计划资助项目, No.05-1-NS-70
通讯作者: 王斌, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院微生物教研室. wangbin31@yahoo.com
电话: 0532-82991508 传真: 0532-83812439
收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-11-04

Differential protein expression between *in vitro* cultured liver cancer cell line HepG2 and normal cell line L02

Xu-Xia Song, Zhi-Yong Yan, Bin Wang, Wen-Feng Mu, Dong-Meng Qian, Shou-Yi Ding, Zong-Liang Yao

Xu-Xia Song, Zhi-Yong Yan, Bin Wang, Wen-Feng Mu, Dong-Meng Qian, Shou-Yi Ding, Department of Microbiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Zong-Liang Yao, Normal College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Qingdao, No. 05-1-NS-70
Correspondence to: Bin Wang, Department of Microbiology, Medical College of Qingdao University, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. wangbin31@yahoo.com
Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-11-04

Abstract

AIM: To investigate the differentially expressed proteins between liver cancer cell line HepG2 and normal cell line L02 cultured *in vitro* using surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) protein array technology.

METHODS: The *in vitro* cultured liver cancer cell line HepG2 and normal cell line L02 were harvested and then split by cell lysate solution. The protein mass spectra of the HepG2 and L02 cells were detected by IMAC3 and WCX2 based on SELDI protein array technology.

RESULTS: A total of 61 proteins were captured by IMAC3 array, and 7 different peaks were found. Compared with those in the L02 cells, 3 differential proteins were highly expressed, while 4 were lowly expressed in the HepG2 cells. A total of 91 proteins were captured by WCX2 array, and 14 differential peaks were found. Among those differentially expressed proteins, 3 were highly expressed, while 11 were lowly expressed in the HepG2 cells.

CONCLUSION: SELDI protein array technology is convenient, highly sensitive, and repeatable in the detection of the differently expressed proteins between hepatocarcinoma cells and normal hepatocytes.

Key Words: Protein array; Liver cancer cell line; Differential protein

Song XX, Yan ZY, Wang B, Mu WF, Qian DM, Ding SY, Yao ZL. Differential protein expression between *in vitro* cultured liver cancer cell line HepG2 and normal cell line L02. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2689-2692

摘要

目的: 运用SELDI蛋白质芯片技术分析体外培养的肝癌细胞株(HepG2)与正常肝细胞株(L02)蛋白质表达差异。

方法: 在体外培养HepG2和L02细胞株, 收获细胞, 将细胞用细胞裂解液裂解后, 采用SELDI蛋白质芯片技术用IMAC3及WCX2芯片检测HepG2、L02的蛋白质谱。

结果: 体外培养的肝癌细胞株与正常肝细胞株的蛋白质存在差异表达, IMAC3芯片共捕获61个蛋白, 发现差异峰7个, 与L02细胞相比, 其中3个差异蛋白在肝癌细胞中高表达, 4个差异蛋白在肝癌细胞中低表达。WCX2芯片共捕获91个蛋白, 发现差异峰14个, 其中3个差异蛋白在肝癌细胞中高表达, 11个差异蛋白在肝癌细胞中低表达。

结论: SELDI蛋白芯片技术检测肝癌细胞株与正常肝细胞株蛋白质的差异表达方法简便, 敏感性高, 重复性好。

关键词: 蛋白质芯片; 肝癌细胞株; 差异蛋白

宋旭霞, 闫志勇, 王斌, 牟文凤, 钱冬萌, 丁守怡, 姚宗良. 体外培养的肝癌细胞株与正常肝细胞株蛋白质的差异表达. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2689-2692
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2689.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一, 严重的威胁着人们的健康. 据国际癌症研究中心(IARC)估计, 2000年全球肝癌发病数为56.4万人^[1], 其死亡率居世界第三位. 其中约55%发生在中国, 即中国肝癌发病30.6万人, 肝癌死亡30.0万人^[2], 肝癌死亡率居我国肿瘤死因的第二位. 肝癌的早期诊断较为困难, 缺乏可靠的早期诊断指标是其预后较差的主要原因, 大部分肝

癌患者发现时已经失去手术机会。甲胎蛋白(AFP)是目前普遍应用的肝癌标志物, 但仍有30%的肝癌患者AFP是阴性的^[3], 因此, 探索和建立一种简单、快速、敏感性高和特异性强的早期诊断技术已成为临床医学上的迫切需要。目前对肝癌发生机制的研究大都是在基因水平, 但是mRNA的水平并不能真正代表所表达的蛋白质水平, 两者之间的相关性通常低于0.5%。因此, 要求对生物功能的执行者——蛋白质进行研究。SELDI(surface enhanced laser desorption/ionization)蛋白质芯片技术是近年来新兴的一种蛋白质组学技术, 它具有简单、快捷、灵敏等特点, 可以检测分子质量在500-500 000 u之间的蛋白或多肽, 而且所需样本体积小(0.5-400 μ L)^[4-7], 是发现蛋白质标记物的理想方法^[8]。目前SELDI蛋白质芯片技术是蛋白质组学研究中的重要工具, 人们已经应用该项技术寻找肿瘤相关性的蛋白质^[9-13], 并有报道用蛋白质飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达^[14]。我们采用美国CIPHERGEN公司研制的SELDI蛋白质芯片技术分析了体外培养的肝癌细胞HepG2和正常肝细胞L02的蛋白质表达谱, 发现了一系列差异表达的蛋白。为今后从血清中筛选标志蛋白及研究肝癌的发生、发展机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 正常肝细胞株(L02)购自中科院上海细胞库, 肝母细胞瘤细胞株(HepG2)由第四军医大学吴力克主任医师赠送。HPLC水, 乙晴, 三氟乙酸, SPA(Sinapinic acid), TritonX-100, 尿素, HEPES, CHAPS购自美国Sigma公司, 蛋白质芯片时间质谱分析仪(PBS II-C)及WCX-2(弱阳离子交换芯片)、IMAC3(固定金属亲和芯片)购自美国CIPHERGEN Biosystems公司。蛋白质芯片WCX-2(弱阳离子交换芯片)芯片表面结合有弱型阴离子羧基, 可以被分析物表面的正电荷基团相互作用(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)而捕获蛋白, 可用于检测高等电点的蛋白质和生物标记分子。IMAC3(固定金属亲和芯片)其表面结合有亚硝基, 他可以螯合金属离子(如Cu, Ni, Ga等), 加到芯片表面结合点上的蛋白质通过半胱氨酸和色氨酸位点上的磷酸化氨基酸等与金属离子结合, 主要用于检测磷酸化蛋白及生物标记分子。

1.2 方法

1.2.1 细胞总蛋白质的提取 L02、HepG2细胞采用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基培养, 细胞长成单层后, 用无菌细胞刮刀刮取细胞, PBS洗3次, 细胞计数 10^{10} /L, 加入裂解液(8 mol/L Urea, 40 g/L CHAPS, 40 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)200 μ L, 4 $^{\circ}$ C剧烈震荡30 min, 14 000 g离心30 min。采用日立的Gene Spec V蛋白核酸分析系统测定上清的蛋白浓度, 用裂解液调至样品浓度为2 g/L, 其余上清分装-86 $^{\circ}$ C备用。每种细胞收获3次, 以排

除组间差别。每份样品至少在两个以上的同种芯片上检测, 以排除不同芯片间的差异。

1.2.2 IMAC3蛋白芯片操作步骤 每孔加入5 μ L 50 mmol/L硫酸镍并在湿盒中孵育15 min, 重复操作一次。用流动的去离子水清洗芯片10 s以除去过多的镍。每孔加入5 μ L结合缓冲液(0.5 mol/L NaCl, pH 7.0), 震荡孵育5 min, 将蛋白芯片放入蛋白工作平台(Bioprocessor), 每孔加入200 μ L缓冲液, 震荡孵育5 min。弃去缓冲液, 每孔立即加入50 μ L 1:2稀释于缓冲液中的样品(蛋白终浓度1 g/L), 震荡孵育1 h。弃去样品, 每孔使用200 μ L缓冲液洗涤两次, 每次5 min, 然后用水进行清洗。从蛋白工作平台中取出蛋白芯片, 空气中干燥, 每孔加入0.5 μ L EAM, 重复一次。干燥后用蛋白质芯片阅读机进行质谱分析。

1.2.3 WCX-2蛋白芯片操作步骤 将芯片装入蛋白工作平台, 每孔加入200 μ L结合缓冲液(50 mmol/L NaAc, pH 4.0)预处理芯片, 置于振荡器5 min, 重复上述操作一次。在每孔中加入50 μ L 1:2稀释的样品, 剧烈震荡, 孵育1 h。弃掉样品, 每孔用200 μ L结合缓冲液洗涤2次, 每次5 min。弃去孔中液体, 每孔加入200 μ L HPLC水, 立刻甩出。从蛋白工作平台中取出蛋白芯片, 空气中干燥, 每孔加入0.5 μ L EAM, 重复一次。干燥后用蛋白质芯片阅读机进行质谱分析。

1.2.4 数据采集和结果分析 蛋白质芯片采用PBS II-C型读取数据, 用加有All-in-one标准蛋白的NP-20芯片校正质谱仪, 仪器参数设置如下: 激光强度220, 检测敏感度10, 优化 M_r 范围为2 000-10 000, 最高为 M_r 50 000。

统计学处理 采用CIPHERGEN proteinchip 3.0版本的分析软件自动采集数据, 然后用Biomarker Wizard软件分析L02、HEPG2细胞的蛋白质谱差异。

2 结果

2.1 利用IMAC3芯片分析肝癌细胞与正常细胞之间存在的蛋白质表达差异 采用PBS II-C型蛋白质芯片阅读机自动收集数据, 设有意义峰的信噪比(signal/noise)为2, 试验结果表明, IMAC3芯片共检测出61个蛋白峰, 发现HepG2、L02细胞的差异峰7个, 其中7 979, 13 428, 15 940 u蛋白分子在肝癌细胞中高表达, 而8 103, 8 492, 10 160, 11 304 u蛋白分子在肝癌细胞中低表达(图1)。

2.2 利用WCX2芯片分析肝癌细胞与正常细胞之间存在的蛋白质表达差异 采用PBS II-C型蛋白质芯片阅读机自动收集数据, 设有意义峰的信噪比(signal/noise)为2, 试验结果表明, WCX2芯片共检测出91个峰, 发现HepG2、L02细胞差异峰共14个, 其中7 517, 7 945, 7 979 u蛋白分子在肝癌细胞中高表达, 5 061, 5 551, 5 818, 8 428, 10 100, 10 312, 11 081, 11 621, 11 662, 11 830, 12 772 u蛋白分子在肝癌细胞中低表达(图2), 在上述差异蛋白中, 7 979 u蛋白峰可同时被IMAC3及WCX2两种芯片捕获。

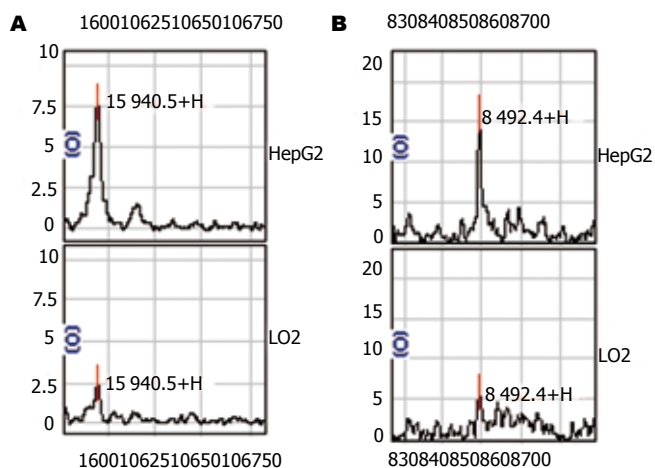


图1 蛋白在肝癌细胞株HepG2中高表达。A: 15 940.5 u蛋白; B: 8 492.4 u蛋白。

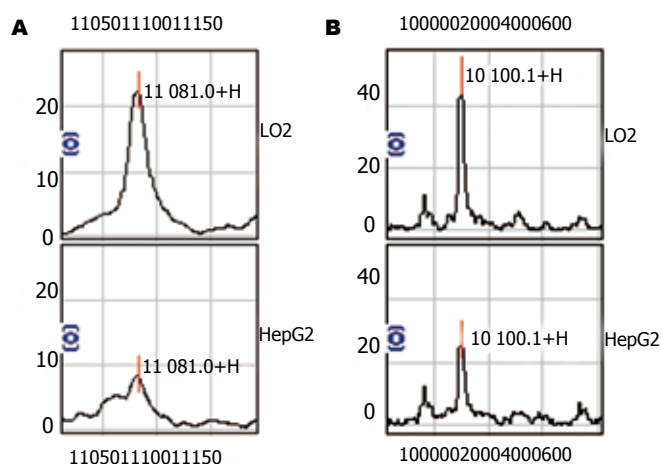


图2 蛋白在正常肝细胞LO2中高表达。A: 11 081.0 u蛋白; B: 10 100.1 u蛋白。

3 讨论

蛋白质组是指一个基因组、一个细胞或组织或一种生物体所表达的全部蛋白质^[15]。蛋白质组学(proteomics)是蛋白质组概念的延伸,是在整体水平上研究细胞内蛋白质组成及其活动规律的学科。与传统的针对单一蛋白质进行的研究相比,蛋白质组学所采用的高通量和大规模的研究手段,在回答有关生命活动机制的基本问题方面达到空前的规模和速度。蛋白质组学研究最终将构建出细胞的“功能图”。SELDI-TOF-MS蛋白质芯片技术是近年发展起来的最先进的蛋白质组学技术,他能对原始样品进行大量检测,而其他的质谱分析在分析之前都需要有效的样品纯化和制备步骤。SELDI-TOF-MS技术具有高分辨力,高重复性,应用简便,敏感性高等优点^[16],在蛋白质组学中得到越来越广泛的应用。

近来研究表明,肿瘤性疾病从蛋白质组学的角度又可以被认为是一种蛋白质缺陷病,其发生过程中有多种蛋白会发生异常变化。从组织增生产生原位癌到产生癌变的过程中,有不同的功能性蛋白参与;转移也是多步

骤复杂连续的过程,与转移有关的特殊基因受到激活并有多水解酶的参与。总之,肿瘤在发生、发展、转移的过程中,在分子水平有不同的功能性蛋白参与,并且功能性蛋白很可能在各个环节相互协调共同表达。蛋白表达异常不仅包括蛋白表达量的增加或减少,还包括蛋白翻译后加工上的改变,从而导致肿瘤组织表达的蛋白质谱(protein profile)的改变。虽然从mRNA水平能够快速研究相应转录子的表达谱,但在翻译的过程中要进行磷酸化、巯基化、乙酰化、糖基化等修饰,并不能了解肿瘤进展过程中蛋白表达质与量的变化。另外有研究表明体内mRNA与相应蛋白的表达水平并没有直接的联系。因此利用蛋白质组学方法检测蛋白质谱的变化可以更加准确地诊断肿瘤及了解肿瘤的发病机制。

体外培养的细胞株虽然不能完全反映体内细胞的生长状态和生物学活性,但他具有成分单一,均质性好,实验条件容易控制等优点。尤其在对比性研究时可避免由组织细胞成分复杂,细胞异质性等缺点造成的结果不真实和不可靠^[17]。我们培养了正常肝细胞株LO2和肝癌细胞株HepG2,细胞裂解液裂解细胞,蛋白定量后SELDI-TOF-MS分析蛋白表达的差异。在实验中每种细胞收获三次,以排除组间差别;每份样品至少做两个点以排除由于芯片不同而引起的误差。结果表明我们的实验重复性好,敏感性高。我们选用了肝癌细胞株HepG2与正常肝细胞株LO2蛋白质谱进行比较,结果发现与正常肝细胞质谱相比,共有21个差异的蛋白峰,其中6个标志蛋白在肝癌细胞中高表达,15个标志蛋白在肝癌细胞中低表达,在上述差异蛋白中,7 979 u蛋白峰可同时被IMAC3及WCX2两种芯片捕获。另外我们在WCX2芯片上发现的7 945 u蛋白峰与Melle *et al*^[18]在肝癌组织中发现的7 935 u的蛋白峰很有可能为一个峰。

任何疾病在出现病理变化之前,细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有相应改变,有的可能通过血清中的蛋白质反映出来。我们还研究了HBV感染携带者与HCC患者及正常对照血清蛋白质的差异性表达,共发现了18个差异的蛋白峰。我们比较了培养的细胞株与血清的蛋白质谱,发现二者有一个共同的蛋白峰7 979 u在肝癌中高表达,这可能是肝癌组织特异性的分泌蛋白,由肝癌组织产生分泌入血。

我们发现的这些组织特异性蛋白生物标记对肝癌的早期诊断有潜在的应用价值,更主要的是为研究肝细胞癌变机制提供了一个基础,而且这些蛋白有可能为肝癌治疗提供新的靶位,可以进行RNA干扰来阻断其高表达或通过基因导入来促进低表达蛋白的表达。下一步我们打算应用串联质谱分析鉴定特定的蛋白,从而进一步研究肝癌的发病机制及肝癌的治疗。

4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet*

- Oncol* 2001; 2: 533-543
- 2 Wang HT, Wang J, Ou QJ, Liu XP, Chen S. Expression of growth hormone receptor mRNA in hepatocellular carcinoma and matched para-cancer cirrhotic liver tissue. *Aizheng* 2002; 21: 146-148
- 3 宋森涛, 朱樑, 王文静, 罗治文, 谢渭芬. 应用SELDI-TOF MS技术分析肝癌血清差异表达蛋白. *实用癌症杂志* 2004; 19: 601-604
- 4 Robinson JC, Kerjan P, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol* 2000; 304: 983-994
- 5 Stoop AA, Jespers L, Lasters I, Eldering E, Pannekoek H. High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I). *J Mol Biol* 2000; 301: 1135-1147
- 6 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1164-1177
- 7 Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001; 47: 1901-1911
- 8 Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X. Application of serum protein pattern model in diagnosis of colorectal cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 417-420
- 9 Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158: 1491-1502
- 10 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 11 Petricoin EF 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP, Ardekani A, Hackett PS, Hitt BA, Velasco A, Trucco C, Wiegand L, Wood K, Simone CB, Levine PJ, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Steinberg SM, Kohn EC, Liotta LA. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1576-1578
- 12 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1296-1304
- 13 Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49: 752-760
- 14 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌. 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1684-1687
- 15 Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-1091
- 16 Persidsky Y, Gendelman HE. Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 691-701
- 17 肖雪媛, 刘丹慧, 刘博, 何大澄. 体外培养的不同亚型肝癌细胞差异蛋白的初步筛查. *解剖学报* 2004; 35: 602-606
- 18 Melle C, Kaufmann R, Hommann M, Bleul A, Driesch D, Ernst G, von Eggeling F. Proteomic profiling in microdissected hepatocellular carcinoma tissue using ProteinChip technology. *Int J Oncol* 2004; 24: 885-891

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 •

加入台湾华艺 CEPS 中文电子期刊服务声明

本刊讯 世界华人消化杂志, 将自2005年7月起, 加入台湾中文电子期刊服务—思博网(CEPS)。中文电子期刊服务—思博网是目前台湾地区最大的期刊全文数据库, 其访问地址为: www.ceps.com.tw。自此, 读者可以通过这一网址检索世界华人消化杂志于1993年起各期的全文, 在一段时期后, 还可以回溯检索13年前历年的全文。

此外, 由于世界华人消化杂志被CEPS收录, 故凡向本刊投稿者, 均视为其文稿刊登后可供思博网(CEPS)收录、转载并上网发行; 其作者文章著作权使用费与稿酬一次付清, 本刊不再另付其它报酬。

请各位继续支持本刊, 谢谢! (世界华人消化杂志 2005-10-28)

愈肝胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用

高萍, 程留芳, 谢朝良

高萍, 程留芳, 北京市解放军总医院消化科 北京市 100853
谢朝良, 四川省泸州医学院附属第二医院 四川省泸州市 646000
通讯作者: 高萍, 100853, 北京市复兴路28号, 北京市解放军总医院消化科.
greenpla@163.com
电话: 010-89861915
收稿日期: 2005-08-05 接受日期: 2005-08-26

Inhibitory effect of *Yugan* capsule on hepatitis B virus *in vitro*

Ping Gao, Liu-Fang Cheng, Chao-Liang Xie

Ping Gao, Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Chao-Liang Xie, the Second Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Correspondence to: Ping Gao, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. greenpla@163.com
Received: 2005-08-05 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To investigate the anti-hepatitis B virus effect of *Yugan* capsule *in vitro*.

METHODS: The experimental rabbits ($n = 6$) were randomly divided into 3 groups (2 for each), and then were treated with the normal serum, *Yiganning* granule and *Yugan* capsule, respectively. The blood samples were collected from the hearts and diluted into various concentrations. The effects of the serums on the 2.2.15 cell line were observed. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the contents of HBsAg and HBeAg, and polymerase chain reaction and hybridization were used to determine the contents of HBV DNA.

RESULTS: Five days after treatment, *Yugan* capsule of 1 : 1 group had significant anti-HBV effect in comparison with *Yiganning* granule (HBsAg: 53.93 ± 1.34 vs 41.03 ± 0.85 , $P < 0.05$; HBeAg: 55.25 ± 1.42 vs 36.26 ± 0.97 , $P < 0.01$; HBV DNA: 56.81 ± 2.37 vs 43.71 ± 0.98 , $P < 0.01$), while *Yugan* capsule of 1 : 2, 1 : 4, and 1 : 8 group was not markedly different, and that of 1 : 16 group had less anti-HBV effect. Ten days after treatment, *Yugan* capsule of different concentrations inhibited the proliferation of HBV significantly in comparison with cell control and normal serum group, while in comparison with *Yiganning* granule, *Yugan* capsule of 1 : 1 group notably inhibited the replication of HBV DNA (67.23 ± 2.79 vs 48.02 ± 1.03 , $P < 0.05$). Also

Yugan capsule of 1 : 2 and 1 : 4 group was superior to *Yiganning* granule in inhibiting the secretion of HBeAg and replication of HBV DNA, but that of 1 : 8 and 1 : 16 group was inferior to *Yiganning*.

CONCLUSION: *Yugan* capsule serum can inhibit the secretion of HBsAg, HBeAg, and replication of HBV DNA in 2.2.15 cells cultured *in vitro* in a concentration-dependent manner.

Key Words: *Yugan* capsule; 2.2.15 cell; Hepatitis B virus; Anti-HBV effect

Gao P, Cheng LF, Xie CL. Inhibitory effect of *Yugan* capsule on Hepatitis B virus *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2693-2696

摘要

目的: 通过观察愈肝胶囊对2.2.15细胞分泌的HBsAg、HBeAg及HBV DNA的影响, 探讨在体外水平上愈肝胶囊的抗乙肝病毒作用。

方法: 将实验家兔($n = 6$)随机分为3组: 正常血清组、乙肝宁颗粒组、愈肝胶囊组, 分别灌服洁净生理盐水5 mL/次, 乙肝宁颗粒3.4 g/(kg·d), 愈肝胶囊 0.7 g/(kg·d), 3次/d. 测定含不同浓度愈肝胶囊血清抗HBV活性情况。2.2.15细胞培养上清液HBsAg、HBeAg测定采用ELISA法, HBV DNA检测采用PCR杂交试验法。

结果: 作用5 d时, 与乙肝宁颗粒组比较, 含愈肝胶囊血清1 : 1组抗HBV作用优于乙肝宁颗粒组(HBsAg: 53.93 ± 1.34 vs 41.03 ± 0.85 , $P < 0.05$; HBeAg: 55.25 ± 1.42 vs 36.26 ± 0.97 , $P < 0.01$; HBV DNA: 56.81 ± 2.37 vs 43.71 ± 0.98 , $P < 0.01$); 1 : 2组、1 : 4组、1 : 8组差异无显著性; 1 : 16组则作用较乙肝宁颗粒组低。药物作用10 d时, 与细胞对照组及正常血清组比较, 各含愈肝胶囊血清组抗HBV作用均比较显著。与乙肝宁颗粒组比较, 含愈肝胶囊血清1 : 1组抗HBV DNA作用优于乙肝宁颗粒组(67.23 ± 2.79 vs 48.02 ± 1.03 , $P < 0.05$); 1 : 2组和1 : 4组对HBeAg及HBV DNA的作用优于乙肝宁颗粒组; 1 : 8组和1 : 16组对HBV DNA作用低于乙肝宁颗粒组。

结论: 含愈肝胶囊血清在体外细胞培养中对2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg及HBV DNA均有较好的抑制作用, 其抑制作用随其浓度增大而增强。

关键词: 愈肝胶囊; 2.2.15细胞; 乙肝病毒; 抗HBV活性

高萍, 程留芳, 谢朝良. 愈肝胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2693-2696

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2693.asp>

0 引言

乙型肝炎(hepatitis B)是乙型肝炎病毒(HBV)引起的一种严重的世界范围内危害人类健康的疾病. 中医药辨病与辨证相结合, 多途径, 多层次, 整体调控, 在乙型肝炎的治疗中发挥着独特的优势. 本实验应用中药含药血清药理学研究方法, 通过严格的体外实验, 对愈肝胶囊治疗乙肝的有效性进行进一步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 取纯种♂日本大耳白兔6只, 体质量约3 kg, 由泸州医学院实验动物中心提供.

1.1.2 药物 愈肝胶囊每克含生药14.7 g, 处方主要由茵陈、栀子、黄芪、党参、丹参、白术、虎杖等药组成. 泸州医学院附属第二医院制剂室生产, 批号: 990815; 乙肝宁颗粒 17克/包, 广西半宙制药股份有限公司生产, 批号: 22-5010-桂卫药准字(1990)第079023号.

1.1.3 主要试剂 2.2.15细胞株(由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供)、RPMI-1640培养基(Gibco BRL Co)、胎牛血清(由华西医科大学生物学教研室制备)、四甲基偶氮唑蓝(Sigma)、二甲基亚砜(Sigma)、HBsAg、HBeAg ELISA试剂盒(华美生物工程公司), HBV DNA PCR杂交试剂盒(华美生物工程公司).

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备 实验家兔每2只一组, 分为正常血清组(I组)、乙肝宁颗粒组(II组)、愈肝胶囊组(III组). 分别灌服洁净生理盐水5 mL/次, 乙肝宁颗粒, 3.4 g/(kg·d)(成人公斤体重用量的12倍^[1], 相当于临床等效剂量), 愈肝胶囊 0.7 g/(kg·d), (成人千克质量用量的12倍, 相当于临床等效剂量), 3/d, 第7日上午连续给药2次(间隔1 h)^[2], 1 h后, 无菌采血, 3 000 r/min 离心20 min分离血清, 56℃灭活30 min^[3], 抽滤除菌后-20℃冰箱保存备用.

1.2.2 体外培养实验分组方法 每3孔为1组, 共分8组, 分别为细胞对照组(2.2.15细胞常规培养)、正常血清组(含I组血清)、乙肝宁颗粒组(含浓度为1:1 II组药物血清)、愈肝胶囊A组(含浓度为1:1 III组药物血清)、愈肝胶囊B组(含浓度为1:2 III组药物血清)、愈肝胶囊C组(含浓度为1:4 III组药物血清)、愈肝胶囊D组(含浓度为1:8 III组药物血清)、愈肝胶囊E组(含浓度为1:16 III组药物血清).

1.2.3 细胞培养 将长满2.2.15细胞的培养瓶用2.5 g/L胰蛋白酶消化3 min左右; 培养液吹打使细胞分散, 配制成 1×10^8 /L种于细胞培养板中, 96孔板0.2 mL/孔; 24孔板1.2 mL/孔, 37℃ 50 mL/L CO₂培养.

1.2.4 2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg及HBV DNA规律的测定^[3] 将2.2.15细胞按 1×10^8 个/L的浓度传入多个培养瓶, 37℃ 50 mL/L CO₂培养, 每天收集培养液上清. 供测HBsAg、HBeAg、HBV DNA用, 共14 d. 同法重复进行采样和检测2次.

1.2.5 含愈肝胶囊血清对2.2.15细胞存活率影响实验 96孔板细胞培养24 h后, 含愈肝胶囊血清用培养液倍比稀释5个浓度, 加入细胞培养板, 每浓度3孔, 并设正常细胞(2.2.15细胞常规培养)、正常血清(含I组血清)、阳性对照组(含浓度为1:1 II组药物血清), 每4 d换同浓度含药血清, 10 d后MTT染色法^[4]测定细胞存活率. 加入MTT 400 mg/L, 100 μL/孔, 4-6 h后加二甲基亚砜, 完全溶解后测定570 nm波长A值. 细胞存活率计算公式: 细胞存活率=药物处理细胞[A]/药物未处理细胞[A]×100%.

1.2.6 含愈肝胶囊血清体外抗HBV活性的测定 24孔板细胞培养4 d后各组分别加入不同浓度的药物血清培养基, 继续培养5 d收集上清液, 供测HBsAg、HBeAg、HBV DNA用. 然后再加入相应不同浓度的药物血清培养基, 10 d后, 再收集上清液, 供测HBsAg、HBeAg、HBV DNA用. 重复2次, 取平均值.

1.2.7 样品检测与结果计算方法 上清液HBsAg、HBeAg的检测: ELISA法. 上清液HBV DNA的测定: PCR杂交试验法. P/N 值=试验孔cpm / 阴性孔cpm

$$\text{抑制率} = \frac{\text{细胞对照cpm值} - \text{给药组cpm值}}{\text{细胞对照cpm值} - \text{空白对照cpm值}} \times 100\%$$

抑制率>50%判为有抑制作用.

统计学处理 用SPSS10.0统计软件处理. 所有计量资料以均值加减标准差(mean±SD)表示, 进行方差分析, 组间两两比较用SNK法; 两时间点前后均值比较用配对t检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg及HBV DNA规律(图1).

2.2 含愈肝胶囊血清对2.2.15细胞存活率的影响 含愈肝胶囊血清各组作用10 d后, 各组细胞存活率均大于82%, 细胞生长良好, 结果显示: 含愈肝胶囊血清对细胞存活率无明显影响. 含愈肝胶囊血清对HBV抑制率测定(表1).

3 讨论

愈肝胶囊重用黄芪补益脾胃之气, 以纠正肝病脾气虚弱这一根本问题, 党参、白术、云苓健脾益气, 采用中药含药血清药理学研究方法, 以含有愈肝胶囊药物成分的血清代替中药粗提物进行体外实验, 不仅能反映愈肝胶囊中可吸收部分的直接作用, 且能反映药物成分在机体作用下形成的代谢产物和药物诱生的机体内源性物质的间

表 1 含愈肝胶囊血清对HBV抑制率

组 别	n	HBsAg		HBeAg		HBV DNA	
		5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d
细胞对照组	6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
正常血清组	6	1.63 ± 0.04	0.17 ± 0.05	1.94 ± 0.05	1.47 ± 0.03	4.81 ± 1.15	7.17 ± 1.24
乙肝宁颗粒组	6	41.03 ± 0.85 ^{bd}	58.01 ± 1.31 ^{bd}	36.26 ± 0.97 ^{bd}	38.62 ± 1.02 ^{bd}	43.71 ± 0.98 ^{bd}	48.02 ± 1.03 ^{bd}
愈肝胶囊A组	6	53.93 ± 1.34 ^{bde}	57.94 ± 2.95 ^{bd}	55.25 ± 1.42 ^{bdf}	61.55 ± 1.67 ^{bd}	56.81 ± 2.37 ^{bdf}	67.23 ± 2.79 ^{bdf}
愈肝胶囊B组	6	52.20 ± 1.06 ^{bd}	55.56 ± 1.87 ^{bd}	51.73 ± 1.35 ^{bdf}	57.25 ± 1.74 ^{bdf}	51.71 ± 2.55 ^{bd}	65.21 ± 2.96 ^{bdf}
愈肝胶囊C组	6	48.83 ± 2.01 ^{bd}	49.79 ± 1.23 ^{bd}	47.38 ± 2.11 ^{bd}	49.06 ± 2.08 ^{bd}	46.29 ± 3.07 ^{bd}	52.08 ± 2.91 ^{bde}
愈肝胶囊D组	6	32.83 ± 0.98 ^{bd}	39.49 ± 1.18 ^{bd}	34.15 ± 1.06 ^{bd}	33.94 ± 1.17 ^{bd}	33.37 ± 1.98 ^{ac}	38.45 ± 2.01 ^{bde}
愈肝胶囊E组	6	15.90 ± 0.75 ^{acf}	10.71 ± 0.92 ^f	14.87 ± 0.78 ^f	14.60 ± 0.85 ^f	23.08 ± 1.76 ^f	25.44 ± 2.43 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 细胞对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 正常血清组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 乙肝宁颗粒组。

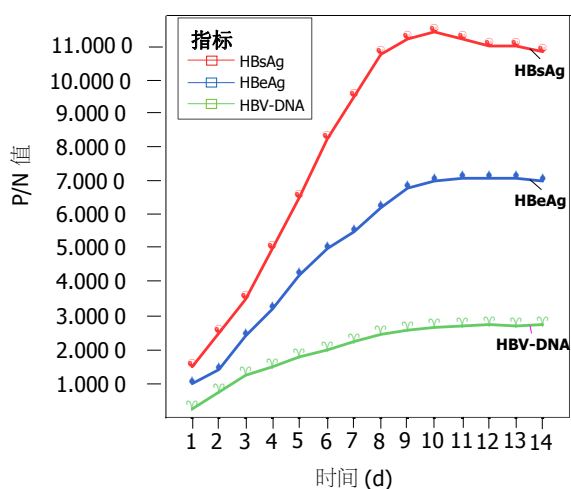


图 1 细胞分泌HBsAg、HBeAg及HBV DNA规律。

接效果,克服了中药制剂本身理化性质对实验结果的干扰^[5-7];在动物选择、给药方案、采血时间^[8],血清灭活与保存^[9-10],血清添加及对照组设立^[11]等各方面均按该实验方法研究的最新、最可靠的方法操作,最大限度地保证了含药血清的质量和有效成分,达到了体外实验和体内实验的完美结合。

1990年之前,国外学者利用PLC/PRF/5细胞株作了大量抗HBV研究工作^[12-13],1986年, Sereau *et al*^[14]人利用电穿孔基因转移技术将克隆的环状DNA与带耐药新霉素基因的载体质粒重组,转染近似正常肝细胞的HepG2细胞系,获得2.2.15细胞系,使HBV体外组织培养获得了真正的突破。2.2.15细胞可以在体外无性繁殖,能够长期稳定的向培养上清液中分泌HBsAg、HBeAg和完整的Dane颗粒,而且还能产生大量的复制中间体,细胞内含有整合型和游离型HBV DNA,还有rcDNA和单链DNA似为病毒基因组的复制型,但无cccDNA。整合分子在培养期内始终稳定^[15]。在我们所用的培养条件下,现有的2.2.15细胞株能稳定地分泌HBsAg、HBeAg、HBV DNA,愈肝胶囊含药血清培养2 d即可稳定检出HBsAg、HBeAg,各标志物的分泌量均随培养时间的延长而升高,10 d达最高峰,此后不再增加;培养1 d可从上清液中检出HBV DNA,并可

持续至14 d,11 d后处于高峰,不再增加。其复制规律与HBsAg、HBeAg分泌规律相似,可用于抗HBV药物筛选实验。任何药物在达到一定浓度作用一定时间时,都会产生细胞毒性而造成死亡,从而影响药物作用的判定。本实验结果显示各不同浓度含药血清作用10 d后,细胞的存活率均很高。故本实验利用中药含药血清在体外实验中的优势避免了因细胞死亡造成的HBsAg、HBeAg、HBV DNA滴度下降,更好地反映药物的抗HBV活性。

各组含愈肝胶囊血清与空白对照组及正常血清组比较认为愈肝胶囊不同浓度含药血清对乙肝病毒分泌HBsAg、HBeAg、HBV DNA均有一定的抑制作用,各组含愈肝胶囊血清与乙肝宁颗粒组比较,可以认为含愈肝胶囊血清A组抑制HBsAg、HBeAg及HBV DNA的作用均优于乙肝宁颗粒,有统计学意义($P < 0.05$);含愈肝胶囊血清B组则对HBeAg的作用可以优于乙肝宁颗粒($P < 0.05$);而含愈肝胶囊血清E组抗乙肝病毒的作用则明显低于乙肝宁颗粒($P < 0.05$);从而认为含愈肝胶囊血清抗乙肝病毒的作用呈剂量依赖性;尤其值得重视的是其对HBV DNA的抑制作用,含愈肝胶囊血清A组和B组作用10 d时,抑制率可达65-67%,提示愈肝胶囊在抗乙肝病毒的治疗中具有较好的应用前景。

4 参考文献

- 1 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理 1999; 10: 95-98
- 2 李振光, 王净净. 关于中药血清药理学方法的思考. 中国中医药信息杂志 2002; 9: 5
- 3 叶下珠. 复方肝丹体外抗HBV作用特点的实验研究. 中国中医基础医学杂志 1999; 5: 29-33
- 4 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
- 5 Amagaya S, Harada K, Miyake A, Iwama H, Ogiwara Y. A new pharmacological testing method-different effects of levamisole and the serum of mice orally treated with levamisole on mitogenic activity of lipopolysaccharide. *Chem Pharm Bull* 1989; 37: 1117-1119
- 6 Umeda M, Amagaya S, Ogiwara Y. Effects of certain herbal medicines on the biotransformation of arachidonic acid: a new pharmacological testing method using serum. *J Ethnopharmacol* 1988; 23: 91-98

- 7 周明眉, 扬奎, 姜远平, 王一涛. 中药血清药理学的方法学研究-反应体系中含药血清加入量的研究. *中药药理与临床* 1998; 14: 43-44
- 8 崔晓兰, 周爱香, 贺玉琢, 高英杰, 李小芹, 田甲丽, 郭淑英, 霍海茹, 姜廷良. 中药复方药理研究方法探讨. *中国实验方剂学杂志* 2000; 6: 23
- 9 周芝兰, 耿 娅, 付惠娣, 符胜光, 胡月娟, 李仪奎. 中药血清药理研究方法中几种血清预处理方法对消除正常血清活性的比较. *中药药理与临床* 1999; 15: 46
- 10 陈长勋. 用血清药理学实验方法观察附子的强心作用. *中国中医药科技* 1996; 3: 12
- 11 王宁生, 雷燕, 刘平. 关于血清药理学的若干思考. *中国中西医结合杂志* 1999; 19: 263-266
- 12 Yamashita Y, Koike K, Takaoki M, Matsuda S. Suppression of HBsAg production in PLC/PRF/5 human hepatoma cell line by interferons. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 1119-1126
- 13 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1005-1009
- 14 Yared G, Hussain KB, Nathani MG, Moshier JA, Dosescu J, Mutchnick MG, Naylor PH. Cytokine-mediated apoptosis and inhibition of virus production and anchorage independent growth of viral transfected hepatoblastoma cells. *Cytokine* 1998; 10: 586-595
- 15 Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, Redondo JM, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J* 1998; 17: 7066-7077

电编 张勇 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 Buechler 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 2005-11-28)

冷冻保存后成人胰岛细胞与小肠黏膜下层的共培养

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱, 西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科 陕西省西安市 710061

通讯作者: 薛武军, 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肾移植科. xuewujunductor@sina.com

电话: 029-85324033 传真: 029-85324033

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-27

Co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa

Jun Hou, Wu-Jun Xue, Xin-Shun Feng, Xiao-Hui Tian, Xin-Lu Pang, Yan Teng

Jun Hou, Wu-Jun Xue, Xin-Shun Feng, Xiao-Hui Tian, Xin-Lu Pang, Yan Teng, Department of Renal Transplantation, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Wu-Jun Xue, Department of Renal Transplantation, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, 1 Jiankang Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. xuewujunductor@sina.com

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-27

Abstract

AIM: To investigate the supportive and protective effect of the small intestinal submucosa (SIS) on the post-cryopreserved human pancreatic islet cells.

METHODS: The purified human islet cells were divided into SIS and control group after they were cryopreserved for 1 mo. The recovery rate of the islet cells was determined after they were cultured in RPMI-1640 for 1 wk. The morphological features and insulin excretion after stimulation were assessed *in vitro*.

RESULTS: The recovery rate of the islet cells in SIS group was significantly higher than that in the control group ($90.5 \pm 1.8\%$ vs $62.7 \pm 3.6\%$, $P < 0.05$), and the cells were well shaped. After stimulation, the insulin secretion in the SIS group was markedly higher than that in the control group (25.8 ± 1.7 mU/L vs 14.6 ± 1.3 mU/L, $P < 0.05$). When the islet cells were placed in the high glucose solution containing theophylline, the calculated stimulation index in SIS group was about 3 times as high as that in the control group.

CONCLUSION: The co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa is a promising way to increase recovery rate

and improve the function of the post-cryopreserved islets.

Key Words: Cryopreservation; Recovery rate; Islet; Small intestinal submucosa

Hou J, Xue WJ, Feng XS, Tian XH, Pang XL, Teng Y. Co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2697-2699

摘要

目的: 探讨猪小肠黏膜下层 (SIS) 对冷冻保存后的胰岛细胞的支持和保护作用。

方法: 分离纯化后的成人胰岛细胞经冷冻保存1 mo后分为SIS组 and 对照组, 在RPMI-1640培养液培养1 wk后分别测定两组的胰岛细胞回收率, 观察胰岛细胞形态并进行胰岛素刺激释放试验。

结果: SIS组胰岛细胞回收率为 $90.5 \pm 1.8\%$, 较游离组 $62.7 \pm 3.6\%$ 显著提高 ($P < 0.05$), 胰岛形态较对照组完整。在高糖刺激下, SIS组胰岛素分泌量较游离组增高 (25.8 ± 1.7 mU/L vs 14.6 ± 1.3 mU/L, $P < 0.05$)。在含有茶碱的高糖溶液中, 微囊组的刺激指数为游离组的3倍。

结论: SIS作为一种天然的细胞外基质材料, 可显著提高胰岛细胞冷冻保存后的回收率, 并改善胰岛细胞的功能。

关键词: 冷冻保存; 回收率; 胰岛功能; 小肠黏膜下层

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱. 冷冻保存后成人胰岛细胞与小肠黏膜下层的共培养. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2697-2699

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2697.asp>

0 引言

虽然糖尿病的治疗在上个世纪取得了显著的进步, 但是该病的发病率和死亡率仍较高。预计到2030年, 全世界糖尿病患者将从2000年的1.71亿上升至3.66亿^[1]。胰岛移植作为根治糖尿病的方法受到了广泛关注。随着临床胰岛移植的不断开展, 胰岛的冷冻保存成为重要的研究领域。胰岛的冷冻保存可以为临床胰岛移植工作提供许多便利, 例如长途运输胰岛及建立胰岛细胞库^[2]。但目前胰岛的冷冻保存不可避免的在冷冻过程中会使胰岛细胞受到损害, 从而使复温后的胰岛细胞活性及功能大大降低^[3]。冷冻损伤主要发生在胰岛的冻融

过程中. 虽然使用甘油或二甲基亚砷 (DMSO) 作为冷冻保护剂, 但冷冻后胰岛细胞的回收率只有67-89%^[4]. 猪的小肠黏膜下层 (small intestinal submucosa, SIS) 作为一种细胞外基质, 具有支持细胞生长, 促进伤口愈合、组织再生的功能. 我们将冷冻保存1 mo后的成人胰岛细胞与SIS共培养1 wk, 探讨SIS对胰岛细胞的支持和保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺取自脑死亡供者, 热缺血时间 <5 min, 冷却血时间 <4 h; 微机生物降温仪 (上海理工大学低温生物工程研究所研制); 倒置式显微镜 (日本Olympus公司); 荧光显微镜 (日本Olympus公司, 型号VANOX); 液氮罐; 细胞培养箱 (美国NAPCC公司, 5100型; 二甲亚砷 (DMSO, Sigma, USA); Hanks液 (作为冷冻保护剂); RPMI1640培养液 (美国Gibco公司); 双硫脲 (DTZ) 溶液等 (美国Sigma公司).

1.2 方法

1.2.1 胰岛细胞的分离与纯化 胰腺取回后, 置于4 °C Hanks液中. 在超净工作台下, 快速去除胰腺周围脂肪组织、血管和被膜. 经胰管注入预温至37 °C胶原酶消化液. 将灌注过的胰腺组织放入锥形瓶中. 38 °C恒温水浴振荡箱消化约20-25 min, 约10倍体积的4 °C Hanks液 (含100 mL/L小牛血清) 中止消化, 消化液用300 μ m不锈钢筛网过滤, 所得滤过液即为胰岛悬液. 50 mL离心管, 依次加入250 mL/L、200 mL/L、110 mL/L Ficoll分离液各10 mL, 其上方缓慢加入制备的胰岛悬液. 4 °C 2 000 r/min、离心20 min, 分层. 吸出11-20%界面细胞, 用不含小牛血清RPMI-1640液4 °C 1 500 r/min、离心5 min, 洗涤, 沉淀制成细胞悬液, 备用.

1.2.2 冻存与复温 按照文献[5]所载方法进行. 分离纯化的成人胰岛置于0.2 mL RPMI-1640液中, 移入冷冻管内, 然后向冷冻管内缓慢注入二甲亚砷(30 min)至2.0 mmol/L. 标本首先快速降温至-7.4 °C, 然后缓慢(0.25 °C/min)降至-40 °C, 投入液氮内保存1 mo. 冻存时间到后标本置于37 °C水浴复温, 使用0.75 mmol/L蔗糖析去二甲亚砷.

1.2.3 SIS的制备 参照Badyalak *et al*^[6]的方法进行. 经过检疫的成猪空肠洗去内容物, 翻转后使黏膜面朝外, 用特制

刀片刮去最上层黏膜, 直至黏膜下层完全显露; 复原到正常解剖结构, 用刀片除去浆膜层和肌层. 清洗剩下的小肠黏黏下层, 完全去除小肠黏膜下层上的残留组织. 制成的小肠黏膜下层厚度约为80-100 μ m, 延长轴剪开, 洗涤后进行脱细胞和消毒、灭菌处理.

1.2.4 胰岛细胞培养 复温后胰岛分为两组: SIS组置于铺有片状SIS的细胞培养孔中, 加入RPMI-1640培养液, 对照组胰岛直接放入含有RPMI-1640培养液的细胞培养孔. 两组胰岛细胞均放入37 °C, CO₂含量为50 mL/L的培养箱中培养1 wk.

1.2.5 胰岛形态和回收率 双硫脲染色后在装有标尺的显微镜下, 计数胰岛细胞, 换算出相当于150 μ m直径胰岛细胞数量. 比较冷冻保存前后胰岛细胞数量即得出回收率.

1.2.6 胰岛功能的测定 在SIS及对照组中各取8份样本(20个胰岛), 测定胰岛素释放量. 胰岛先置于含有2.7 mmol/L葡萄糖的RPMI-1640培养液37 °C孵育45-50 min. 随后胰岛分别置于含有2.7 mmol/L、16.7 mmol/L、16.7 L mmol/L、葡萄糖和10 mmol/L茶碱的RPMI-1640培养液中各孵育45 min. 每次孵育结束后, 弃去上清液, 使用放射免疫法测定胰岛素分泌量(mU/L).

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示. 不同组间差别采用SPSS10.0 进行 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学差异.

2 结果

胰岛的冷冻保存主要涉及三个过程: 在浅冷冻期胰岛细胞进入冷休克, 深冷冻期胰岛承受渗透压和内部热量释放的压力; 复温期胰岛内部结构由固态转化为液态^[7]. 在这三个过程中, 胰岛细胞膜易受到损害, 导致细胞死亡. 本研究中, 冷冻保存后培养1 wk后SIS组胰岛的回收率为90.5 \pm 1.8%, 对照组为62.7 \pm 3.6%, 两组间存在统计学差异($P<0.05$). 显微镜下观察, SIS组胰岛细胞(图1A)较游离组(图1B)结构完整, 染色均匀. 胰岛功能测定采用胰岛素释放试验. 游离组与微囊组在低糖刺激下的基础胰岛素分泌无明显差别; 而在高糖刺激下, 微囊组胰岛素分泌量较游离组显著增加; 当在高糖内加入茶碱时最大胰岛素分泌量微囊

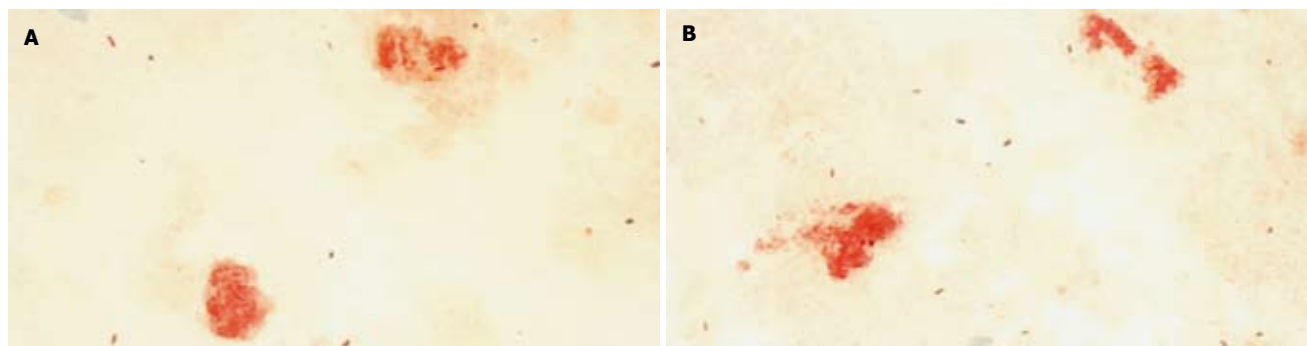


图1 冷冻保存后培养1 wk胰岛细胞形态. A: 冷冻保存后和SIS共培养1 wk的成人胰岛细胞; B: 冷冻保存后仅与RPMI-1640共培养1 wk的成人胰岛细胞.

组明显高于游离组,由此得出的刺激指数(SI)微囊组约为游离组的3倍(表1)。

表1 SIS组和游离组在不同刺激下胰岛素分泌量

组别	低糖 (2.7 mmol/L)	高糖 (16.7 mmol/L)	高糖+茶碱	SI
SIS组	8.2 ± 0.6	25.8 ± 1.7 ^a	76.6 ± 3.4 ^a	9.5 ± 0.3 ^a
游离组	7.9 ± 0.4	14.6 ± 1.3	26.1 ± 1.9	3.3 ± 0.2

^a $P < 0.05$ vs 游离组。

3 讨论

胰岛细胞的保存一直是人们关注的问题,胰岛的体外培养可以延长保存时间,但不宜过长,否则会出现纤维组织过度增生,导致移植失败^[8]。而建立胰岛细胞库则需冷冻保存胰岛。胰岛细胞库的建立可以更灵活的选择供受者,使胰岛移植的临床应用变得可行。Rojotte将冷冻保存的胰岛移植给糖尿病患者,成功的使其停用胰岛素2 a之久。但是在冷冻保存和复温过程中,不可避免会损伤胰岛细胞,虽然采用二甲基亚砷和甘油作为冷冻保护剂,冷冻保存复温后胰岛细胞的回收率也只有60±7%^[3]~78±5%^[9,10]。更为重要的是,冷冻保存后的胰岛在体外环境中对高糖刺激明显减弱^[9],说明其功能也受到损害,会严重影响移植效果。Rich *et al*^[9,10]研究认为,冷冻后胰岛会损失其功能的38%。因此,如何避免和减少胰岛细胞的冷冻损伤引起许多学者的关注。

胰岛在冷冻和复温的过程中细胞承受渗透压的巨大变化,如果是单个胰岛细胞可以承受这种压力,但胰岛实际上是一种多细胞结构,彼此依靠细胞外基质进行联系,冷冻-复温过程不可避免的会损害胰岛细胞间的这种联系,从而对胰岛细胞的结构和功能造成损害。

猪的小肠黏膜下层(SIS)作为一种天然的细胞外基质,由胶原,糖蛋白,蛋白聚糖,葡萄糖胺聚糖组成,并含有多种生长因子,如纤维母细胞生长因子(PGF-2),肿瘤生长因子(TGF),血管内皮细胞生长因子(VEGF),能促进细胞生长^[11]。SIS作为组织工程材料已进行了较为广泛的研究。Badylak *et al*^[6]首先使用SIS修复一段犬肾动脉取得成功,Lantz *et al*^[12]报道了使用SIS修复犬颈动脉和股动脉,2 mo后SIS在形态上和被修复组织已无区别。国内顾庭*et al*^[13]也报道了使用SIS替代兔跟腱肌获得成功。近年来,国外有学者认为SIS对体外培养的胰岛细胞也应具有支持和保护作用。Lakey *et al*^[14]报道分离纯化的犬胰岛细胞与SIS共培养后回收率和体外功能均有所提高。因此我们推测,SIS作为一种天然的细胞外基质,能够为冷冻

和复温后的胰岛细胞提供一定的支持和保护,从而使胰岛的形态和功能得到改善。

本研究中,我们将冷冻保存1 mo后的成人胰岛细胞置于放有SIS的细胞培养孔中,使用RPMI-1640培养液培养1 wk,结果显示:SIS组胰岛细胞的回收率较对照组显著提高,胰岛细胞形态较对照组完整;胰岛素释放试验也证实SIS组胰岛细胞功能较对照组明显改善。本研究说明SIS作为一种天然的细胞外基质,能够改善冷冻保存后的胰岛细胞的形态和体外胰岛素分泌功能。为长期保存胰岛细胞提供了一条新的路径。但胰岛细胞体外胰岛素分泌测试尚不能完全反映胰岛功能,下一步研究我们考虑将SIS组胰岛细胞移植于大鼠糖尿病模型,观察其对糖尿病的治疗作用。

4 参考文献

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053
- Jindal R, Gray D. Preservation and storage of pancreatic islets. *Transplantation* 1994; 57: 317-321
- Bodziony J, Schmitt P, Feifel G. *In vitro* function, morphology, and viability of cryopreserved rat pancreatic islets: comparison of vitrification and six cryopreservation protocols. *Transplant Proc* 1994; 26: 833-834
- Cattral MS, Lakey JR, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Effect of cryopreservation on the survival and function of murine islet isografts and allografts. *Cell Transplant* 1998; 7: 373-379
- Rajotte RV, Scharp DW, Downing R, Preston R, Molnar GD, Ballinger WF, Greider MH. Pancreatic islet banking: the transplantation of frozen-thawed rat islets transported between centers. *Cryobiology* 1981; 18: 357-369
- Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res* 1989; 47: 74-80
- Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 1993; 30: 423-431
- 陈明, 吴德权. 胰岛移植. 哈尔滨医科大学学报 2005; 39: 95-97
- Rich SJ, Swift S, Thirdborough SM, James RF, Bell PR, London NJ. Islet cryopreservation: a detailed study of total functional losses. *Transplant Proc* 1994; 26: 823-824
- Rich SJ, Swift S, Thirdborough SM, Rumford G, James RF, London NJ. Cryopreservation of rat islets of Langerhans: a comparison of two techniques. *Cryobiology* 1993; 30: 407-412
- Luo JC, Yang ZM. Preparation and characteristics of small intestinal submucosa. *Zhongguo Xuefu Chongjian Waike Zazhi* 2003; 17: 425-428
- Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Blevins WE. Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog. *J Invest Surg* 1990; 3: 217-227
- 顾庭, 戴冠戎. 猪小肠黏膜下层替代兔跟腱的实验研究. 中华医学杂志 2002; 82: 1279-1282
- Lakey JR, Woods EJ, Ziegler MA, Avila JG, Geary WA, Voytik-Harbin SL, Critser JK. Improved islet survival and *in vitro* function using solubilized small intestinal submucosa. *Cell Tissue Bank* 2001; 2: 217-224

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

大鼠急性坏死性胰腺炎 NF- κ B 的变化及乌司他丁的调控作用

刘瑞林, 刘牧林, 马良龙, 吴 薇

刘瑞林, 刘牧林, 吴薇, 蚌埠医学院附属医院胃肠外科 安徽省蚌埠市 233004

马良龙, 淮北市人民医院肝胆外科 安徽省淮北市 235000

通讯作者: 刘瑞林, 233004, 安徽省蚌埠市长淮路41号, 蚌埠医学院附属医院胃肠外科. zyq_lb@yahoo.com.cn

电话: 0552-3064590-2466 传真: 0552-3070260

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-17

Effect of ulinastatin on nuclear factor- κ B expression in acute necrotic pancreatitis in rats

Rui-Lin Liu, Mu-Lin Liu, Liang-Long Ma, Wei Wu

Rui-Lin Liu, Mu-Lin Liu, Wei Wu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China

Liang-Long Ma, Department of Hepatobiliary Surgery, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235000, Anhui Province, China

Correspondence to: Rui-Lin Liu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China. zyq_lb@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-17

Abstract

AIM: To evaluate the effect of ulinastatin (UTI) on the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and related cytokines in acute necrotic pancreatitis (ANP) in rats.

METHODS: Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation (SO) group, ANP group and UTI treatment group. The levels of NF- κ B, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and serum amylase in rats were detected. ANP model was induced by retrograde administration of 50 g/L sodium taurocholate into biliary-pancreatic duct.

RESULTS: In ANP group, the levels of serum amylase ($195\ 907.51 \pm 38\ 618.39$ nkat/L), TNF- α (41.37 ± 7.54 ng/L), IL-6 (32.32 ± 8.62 ng/L) as well as the expression of pancreatic and pulmonary NF- κ B were all increased as compared with those in SO group (all $P < 0.01$). After treatment with UTI, the levels of serum amylase ($69\ 804.30 \pm 19\ 432.55$ nkat/L), TNF- α (18.66 ± 6.45 ng/L), IL-6 (23.41 ± 7.65 ng/L) as well as the expression of pancreatic and pulmonary NF- κ B were all significantly decreased as compared with those in SO and ANP group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: In the pathogenesis of ANP, activated

NF- κ B and up-regulated TNF- α and IL-6 aggravated the injuries of pancreas and lung tissues. UTI plays a protective role in ANP by inhibiting the activation of NF- κ B, so as to alleviate the injuries of pancreas and lung tissues.

Key Words: Acute necrotic pancreatitis; Ulinastatin; Nuclear factor- κ B; Lung injury; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-6; Amylase

Liu RL, Liu ML, Ma LL, Wu W. Effects of ulinastatin on nuclear factor- κ B expression in acute necrotic pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2700-2703

摘要

目的: 探讨乌司他丁对急性坏死性胰腺炎大鼠核因子- κ B(NF- κ B)的表达及有关细胞因子的影响。

方法: 将30只Sprague-Dawley大鼠随机分为假手术组(SO组)、急性坏死性胰腺炎组(ANP组)和急性坏死性胰腺炎乌司他丁治疗组(UTI组), 比较各组大鼠NF- κ B、IL-6、TNF- α 、血清淀粉酶的水平。

结果: ANP组淀粉酶活性 $195\ 907.51 \pm 38\ 618.39$ nkat/L, TNF- α 值 41.37 ± 7.54 ng/L, IL-6值 32.32 ± 8.62 ng/L, 肺、胰腺组织NF- κ B表达增加, 与SO组比较 P 均 < 0.01 , 乌司他丁治疗后, 淀粉酶活性 $69\ 804.30 \pm 19\ 432.55$ nkat/L, TNF- α 值 18.66 ± 6.45 ng/L, IL-6值 23.41 ± 7.65 ng/L, 肺、胰腺组织NF- κ B表达降低, 与SO组和ANP组比较 P 均 < 0.01 。

结论: 急性坏死性胰腺炎时NF- κ B活化, 上调IL-6、TNF- α , 加重胰腺及肺的损伤, 乌司他丁抑制NF- κ B表达而减轻胰腺及肺的损伤, 改善急性坏死性胰腺炎的预后。

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 乌司他丁; NF- κ B; 肺损伤; IL-6; TNF- α ; 血清淀粉酶

刘瑞林, 刘牧林, 马良龙, 吴薇. 大鼠急性胰腺炎NF- κ B的变化及乌司他丁的调控作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2700-2703

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2700.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎(ANP)是普外科最常见的急腹症之一, 是由胰腺广泛出血、坏死而引起的一种严重疾病, 临床表现重, 病死率高, 平均约为20-30%^[1], 其发病也有逐年升

高的趋势。目前, ANP确切的发病机制尚未完全阐明。国内外学者以前推崇的是胰酶自身消化学说, 认为是胰酶的广泛激活而引起的一种全身性损害。但近年来的大量实验数据提示, 细胞因子级联效应也是ANP病程不断恶化的主要原因^[2,3]。

核因子- κ B(NF- κ B)是一类能与多种基因启动子部位 κ B位点发生特异性结合, 并促进基因转录的蛋白质总称。目前发现急性胰腺炎早期腺泡细胞就发生NF- κ B的过度表达, 其对急性胰腺炎时细胞因子的表达有调控作用^[4]。NF- κ B表达与急性胰腺炎的肺损伤密切相关^[5,6]。广谱蛋白酶抑制剂乌司他丁具有抑制多种胰酶和抑制炎症介质释放的作用, 是治疗急性胰腺炎的有效药物^[7,8], 但其作用机制是否与抑制NF- κ B的表达有关, 国内外研究甚少, 我们试图揭示乌司他丁与NF- κ B变化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)牛磺胆酸钠(Sigma公司), 乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司)。 (2)TNF- α 、IL-6细胞因子ELISA试剂盒(上海森雄科技实业有限公司), 洗板机(ENLEY, DRAGON), 酶标仪(DENLEY, DRAGON), 振荡器KJ-201A型, 混合型XH-B型, 温箱PYX-DHS-40 \times 50。 (3)超薄切片机(LKBV型), 光学显微镜(Olympus BA)。 (4)LGR-160-W高速微量低温离心机。 (5)蛋白抽提试剂盒(Active Motiff公司), BCA蛋白定量试剂盒(Pierce公司), EMSA(电泳迁移率变迁检测)试剂盒(Pierce公司), DNA探针(5'-GCC TCC AAT GTT CGC GAA CTT TCG-3')由上海生工公司合成并进行末端生物素标记, 垂直电泳仪及半干转移仪(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作^[9] δ Sprague-Dawley大鼠30只, 体质量220-280 g, 随机分为假手术组(SO组)、急性坏死性胰腺炎组(ANP组)及急性坏死性胰腺炎乌司他丁治疗组(UTI组), 每组10只, 术前12 h禁食, 自由饮水。假手术组(SO组): 开腹后翻动胰腺, 经门静脉注射生理盐水4 mL/kg。ANP组: 经胰胆管逆行加压注射50 g/L牛磺胆酸钠溶液1 mL/kg, 然后立即经门静脉注射生理盐水4 mL/kg, 5 min后可见整个胰腺出现明显充血、水肿、片状出血, 证实ANP动物模型已建立成功。UTI组: ANP模型建立后5 min, 经门静脉给予乌司他丁4 mL/kg(40 000 U/kg)。各组动物均于术后6 h处死, 取血标本作淀粉酶、TNF- α 、IL-6检测, 取胰腺、肺组织, 40 g/L甲醛固定, 组织切片行HE染色及免疫组化检查。

1.2.2 淀粉酶(Amy)检测 取血清样品待测液, 经碘-淀粉酶法分别测定660 nm波长下测定管(加入血清样品)和对照管(不含血清样品)的吸光度(A), 计算淀粉酶含量。

1.2.3 血清TNF- α 、IL-6含量测定 取血清样品待测液, 通过大鼠TNF- α 、IL-6定量ELISA试剂盒测定, 严格参照试剂盒操作说明进行。

表1 各组大鼠血清Amy、TNF- α 、IL-6含量比较 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	Amy (nkat/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
SO	10	12 004.07 \pm 2 209.61	12.35 \pm 7.82	11.85 \pm 6.64
ANP	10	195 907.51 \pm 38 618.39 ^b	41.37 \pm 7.54 ^b	32.32 \pm 8.62 ^b
UTI	10	69 804.30 \pm 19 432.55 ^{bd}	18.66 \pm 6.45 ^{bd}	23.41 \pm 7.65 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs SO组; ^d $P < 0.01$ vs ANP组, SO组。

1.2.4 组织病理学检查 将胰腺、肺组织固定于40 g/L中性甲醛溶液中, 常规脱水, 石蜡包埋切片, HE染色后光镜下观察病理变化。

1.2.5 NF- κ B活化表达检测 (1)SP(链霉素抗生素蛋白-过氧化酶)法: 免疫组化法测胰腺、肺组织NF- κ B的活化表达, 标本取出后迅速放入中性(40 g/L)甲醛溶液中固定, 常规脱水, 石蜡包埋切片, 采用SP法进行免疫组化染色, 正常情况下NF- κ B与抑制蛋白I κ B结合, 胰腺炎时, I κ B释放, NF- κ B的亚单位P65区暴露, 应用抗P65单克隆抗体与其结合, 经过特殊处理, 可以在原位识别活化的NF- κ B。结果评定: 着色强度按未着色, 淡黄, 棕黄及黄褐色分为-、+、++、+++。阳性比率: 随机观察5个中倍视野(10 \times 20), 计算阳性细胞占细胞数的比例。 (2)EMSA法: 新鲜胰腺取材组织称质量匀浆后抽提核蛋白, 步骤按试剂盒说明书。以BCA法测定抽得的蛋白浓度。制备60 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶。按照EMSA试剂盒说明书, 每孔取抽提的核蛋白6 μ g, 与缓冲液及探针混匀, 室温孵育20 min后, 上样电泳, 100 V, 1.5-2 h。半干电转移(280 mA 40 min)将蛋白转至带阳性电荷的尼龙膜。紫外灯交联后化学发光显色。

统计学处理 TNF- α 、IL-6、Amy均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用方差分析、*q*检验和等级相关分析。

2 结果

2.1 血清Amy、TNF- α 、IL-6变化(表1) ANP组较SO组及UTI组明显增高, 有统计学意义($P < 0.01$), UTI组较ANP含量低, 但高于SO组($P < 0.01$)。

2.2 病理检查

2.2.1 胰腺 SO组 胰腺组织分散, 形状不规则, 胰腺细胞形态正常, 胰岛清晰可见, 胰腺小叶完整, 间质无充血水肿, 无炎细胞浸润。ANP组: 胰腺水肿、出血明显呈暗红色, 分叶结构模糊, 胰周腹膜大量皂化斑。镜下胰腺组织大片坏死, 细胞结构模糊, 片状出血, 小叶轮廓不清, 间质出血, 大量炎细胞浸润。UTI干预组: 胰腺质软, 水肿较轻, 分叶结构模糊, 点状出血坏死较少。镜下小叶轮廓存在, 可见点状出血, 偶见坏死灶, 间质有少量炎细胞浸润。

2.2.2 肺 SO组 两肺分叶清楚, 无水肿渗出充血。镜下肺小叶结构完整, 肺泡腔无渗出, 间质无充血水肿, 无炎细胞浸润。ANP组: 肺组织充血水肿。镜下肺泡壁增厚, 肺泡腔浆液渗出, 肺泡间隔增宽, 间质有大量炎细胞浸润。UTI干

表2 各组大鼠胰腺组织着色强度的例数

分组	<i>n</i>	—	+	++	+++
SO	10	10	0	0	0
ANP ^b	10	0	2	3	5
UTI ^d	10	4	5	1	0
合计	30	14	7	4	5

^b*P*<0.01 vs SO组; ^d*P*<0.01 vs ANP组, SO组.

表3 各组大鼠胰腺、肺组织阳性细胞比例数

分组	<i>n</i>	胰腺				肺			
		0%	1-29%	30-69%	70-100%	0%	1-29%	30-69%	70-100%
SO	10	10	0	0	0	10	0	0	0
ANP ^b	10	0	0	5	5	0	2	3	5
UTI ^d	10	2	4	4	0	7	2	1	0
合计	30	12	4	9	5	17	4	4	5

^b*P*<0.01 vs SO组; ^d*P*<0.01 vs ANP组, SO组.

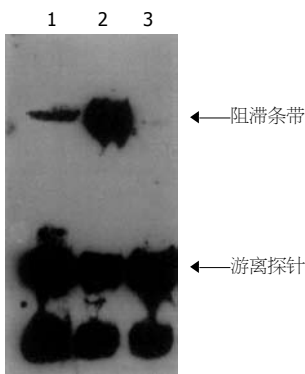


图1 大鼠胰腺组织NF-κB表达EMSA结果. 1: UTI干预组; 2: ANP模型组; 3: SO组.

预组: 肺组织炎症反应较ANP组明显减轻.

2.3 胰腺、肺组织NF-κB的表达

2.3.1 SP法(表2-3) 从表2和表3可见UTI组胰腺内NF-κB表达量明显低于ANP组, 有显著性差异(*P*<0.01), 从表3可见UTI组肺组织NF-κB的表达量明显低于ANP组, 有显著性差异(*P*<0.01).

2.3.2 EMSA法(图1) SO组无特异性阻滞条带; ANP组可见活化蛋白与探针结合产生的明显阻滞条带; UTI组有少量蛋白活化, 阻滞条带的面积与灰度均明显弱于ANP组.

3 讨论

重症急性胰腺炎发病急骤, 病情较重, 死亡率居高不下. 重要原因之一就是病变早期就可引起肺、肾、心脏等器官功能衰竭^[10,11]等. 其发病机制仍不清楚, 传统胰腺酶激活和自身消化机制不能完全解释. 近年实验室研究表明细胞因子的瀑布样级联反应在胰外器官损害中起着重要的作用^[12-14]. NF-κB是细胞因子释放的开关^[15], 在急性胰

腺炎发病机制中起着重要作用, 本实验也证实此点.

NF-κB是NF-κB/Rel家族中的最主要成员之一^[16], 正常情况下NF-κB以无活性状态存在于细胞质中, 他是一条由 M_r 50 000的多肽链(NF-κB1)和一条 M_r 65 000的多肽链(RelA)构成的二聚体, 与其抑制蛋白IκB结合形成非活性的三聚体, 处于不表达状态. 细胞外的许多刺激物如LPS、TNF-α、IL-1β、生长因子、病毒蛋白以及缺血-再灌注、内毒素血症、氧中毒等病理生理状态下均可激活NF-κB. 首先引起NF-κB诱导激酶的活化, 继而活化IκB激酶, IκB磷酸化, IκB从NF-κB复合体上脱落, 活化的NF-κB移向细胞核内, 结合到靶基因的启动子或增强子的κB结构域, 引起许多因子的转录, 包括细胞因子: TNF-α、IL-1β、IL-2和IL-6等; 化学趋化因子: IL-8, 巨噬细胞趋化肽; 细胞黏附分子: E-选择素, ICAM-1, VCAM-1; 生长因子: IL-3, GM-CSF; 免疫受体; 急性期反应蛋白等^[17,18]. Gukovsky *et al*^[19]发现NF-κB的激活是急性胰腺炎发病中重要的早期事件, 制作急性胰腺炎模型后6 h NF-κB达高峰, 此后开始下降. Telek *et al*^[20]认为急性胰腺炎早期腺泡细胞氧自由基大量生成并造成细胞损伤与NF-κB的激活密切相关. Vaquero *et al*^[21]在以大鼠胰胆管逆行注射50 g/L牛磺胆酸钠建立的急性坏死性胰腺炎模型上发现胰腺组织NF-κB的活性与TNF-α及IL-6等炎性细胞因子和化学趋化因子的表达密切相关, 而且与胰腺组织损伤的程度也密切相关, 因而认为NF-κB的激活在急性重症胰腺炎的发病中起重要作用. 我们在模型制成后6 h处死大鼠, 取胰腺及肺组织测定NF-κB的表达, 结果表明, 假手术组很少表达, ANP组表达明显增强并有统计学意义(*P*<0.01), 相应地, TNF-α、IL-6和淀粉酶也显著高于假手术组(*P*<0.01). 我们另一研究内容发现NF-κB和TNF-α、IL-6表达呈正相关, 说明NF-κB活化过量表达在ANP的病程演变及ANP肺损伤时起重要作用, 为治疗急性坏死性胰腺炎提供线索.

乌司他丁是从人尿中分离纯化出的一种糖蛋白^[22], 分子质量为67 ku, 经国内外学者研究证实其主要有以下作用: (1)具有抑制胰蛋白酶、弹性蛋白酶、纤溶酶等蛋白水解酶、透明质酸酶、淀粉酶、脂肪酶等糖类和脂类水解酶的作用^[23]. (2)稳定溶酶体膜, 抑制溶酶体的释放. ANP发生后, 由于溶酶体膜、线粒体膜受到损伤, 导致细胞呼吸功能受损, 最后引起多脏器功能衰竭. 因此, 乌司他丁用于ANP后, 可稳定溶酶体膜, 减少细胞损伤, 具有保护器官作用. (3)抑制炎症介质和细胞因子的释放, 从而减轻ANP后全身炎症反应并预防多器官功能损害^[24], 其抑制炎症介质释放的机制未完全阐明. 我们从基因水平研究了乌司他丁在治疗ANP时对细胞因子影响的机制. 从结果中我们可以看出, 乌司他丁干预组与ANP组血清中TNF-α、IL-6及胰腺、肺组织中NF-κB的表达差别显著(*P*<0.01). 提示乌司他丁治疗ANP预防并发症可能和抑

制NF- κ B活化有关, 为我们更好地认识乌司他丁的治疗作用机制提供了新的思路.

本实验结果表明: ANP时NF- κ B活化, 上调TNF- α 、IL-6等细胞因子, 参予ANP的病程, 并促进ANP肺损伤的发生. 乌司他丁可能通过抑制NF- κ B活化、下调TNF- α 、IL-6的表达而减轻胰腺炎及胰腺炎肺损伤, 改善ANP的预后.

4 参考文献

- 1 Woodcock S, Siriwardena A. High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-95. *Br J Surg* 2000; 87: 379-380
- 2 Brady M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos J, Slavin J. Cytokines and acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 265-289
- 3 Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000; 47: 546-552
- 4 裴红红, 杨正安, 秦兆寅. 核因子- κ B与急性胰腺炎. *中国危重病急救医学* 2001; 13: 248-249
- 5 Imrie CW, Ferguson JC, Murphy D, Blumgart LH. Arterial hypoxia in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1977; 64: 185-188
- 6 Willemer S, Feddersen CO, Karges W, Adler G. Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. I. Morphological studies. *Int J Pancreatol* 1991; 8: 305-321
- 7 王春友, 赵刚, 张维康, 润晓勤, 周峰, 屈新才. 乌司他丁对重症急性胰腺炎的疗效及其作用机制的研究. *临床外科杂志* 2000; 8: 172
- 8 Okuhama Y, Shiraishi M, Higa T, Tomori H, Taira K, Mamadi T, Muto Y. Protective effects of ulinastatin against ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1999; 82: 34-42
- 9 Lerch MM, Adler G. Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1994; 15: 159-170
- 10 Imrie CW, Whyte AS. A prospective study of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1975; 62: 490-494
- 11 Renner IG, Savage WT 3rd, Pantoja JL, Renner VJ. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1005-1018
- 12 Karne S, Gorelick FS. Etiopathogenesis of acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 699-710
- 13 Denham W, Norman J. The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 767-781
- 14 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83
- 15 Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 420-430
- 16 Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2513-2518
- 17 Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455
- 18 Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 1997; 91: 299-302
- 19 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998; 275: G1402-1414
- 20 Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001; 96: 56-67
- 21 Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1197-1208
- 22 Suzuki M, Kobayashi H, Tanaka Y, Hirashima Y, Terao T. Structure and function analysis of urinary trypsin inhibitor (UTI): identification of binding domains and signaling property of UTI by analysis of truncated proteins. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1547: 26-36
- 23 Yoshida K, Toki F, Takeuchi T. Antienzyme preparations in the treatment of acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 1990; 48: 165-172
- 24 秦仁义, 王春友, 邹声泉. 乌司他丁治疗急性胰腺炎的实验及临床研究. *中国普通外科杂志* 2001; 10: 292-295

电编 张敏 编辑 张海宁

中性粒细胞趋化因子在重症急性胰腺炎中的表达及临床意义

石建群, 周国雄, 黄介飞, 徐岷, 张弘, 魏群

石建群, 周国雄, 黄介飞, 徐岷, 张弘, 魏群, 南通大学附属医院消化科
江苏省南通市 226001

南通市社会发展基金资助项目, No.S5054

通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化科. zhoughuoxiong@pub.nt.jsinfo.net

电话: 0513-5052078

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-17

Clinical significance and expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in severe acute pancreatitis

Jian-Qun Shi, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Min Xu, Hong Zhang, Qun Wei

Jian-Qun Shi, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Min Xu, Hong Zhang, Qun Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by Social Development Foundation of Nantong City, No. S5054

Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, China. zhoughuoxiong@pub.nt.jsinfo.net

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-17

Abstract

AIM: To investigate the role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in the pathogenesis of severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: The acute pancreatitis model was induced by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct in SD rats. Forty-eight masculinity SD rats were randomly divided into 2 groups: the sodium taurocholate group and the operational control group. The serum amylase level and the histological pathologic changes of pancreas were measured at different time point in each group. The expression of pancreatic CINC protein and mRNA were determined by immunohistochemistry and semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

RESULTS: The level of serum amylase in sodium taurocholate group was significantly higher than that in the control group, and its histological pathologic changes were more significant. The expression of CINC protein in the pancreatic acinar cells and the expression of

CINC mRNA in the pancreatic tissues in the sodium taurocholate group were higher, and the expression of CINC mRNA in the pancreatic acinar cells in the sodium taurocholate group were significantly higher (0.37 ± 0.10 vs 0.29 ± 0.10 , $P < 0.05$) than that in the controls 1 h after operation. The expression of CINC and CINC mRNA were gradually up-regulated as the time increased. Immunohistochemistry showed the expression of CINC protein was higher than that of the operational control group.

CONCLUSION: CINC may play an important role in the pathogenesis of SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Cytokine-induced neutrophil chemoattractant; Pathogenesis

Shi JQ, Zhou GX, Huang JF, Xu M, Zhang H, Wei Q. Clinical significance and expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2704-2707

摘要

目的: 探讨中性粒细胞趋化因子(CINC)在重症急性胰腺炎(SAP)发病机制中的作用。

方法: 采用向胆胰管逆行注射50 g/L牛磺胆酸钠建立大鼠SAP模型, 48只♂SD大鼠随机分为手术对照组和SAP组, 分别检测各组不同时间点血清淀粉酶和胰腺组织病理学改变, 用免疫组织化学法和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测胰腺组织中CINC蛋白和CINC mRNA表达的变化情况。

结果: 牛磺胆酸钠组与手术对照组相比, 大鼠的血清淀粉酶明显增高、胰腺组织学改变明显; 术后1 h胰腺腺泡细胞CINC蛋白和胰腺组织中CINC mRNA的表达高于手术对照组, 随着时间的延长表达逐渐增强, 牛磺胆酸钠组术后1 h胰腺腺泡细胞CINC mRNA表达较手术对照组明显增高分别为(0.37 ± 0.10 vs 0.29 ± 0.10 , $P < 0.05$), 并且随着时间的延长差别更加明显; 免疫组化显示CINC蛋白表达也高于手术对照组。

结论: CINC可能在SAP发病过程中起了重要的作用。

关键词: 重症急性胰腺炎; 中性粒细胞趋化因子; 发病

石建群, 周国雄, 黄介飞, 张弘, 魏群. 中性粒细胞趋化因子在重症急性胰腺炎中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2704-2707
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2704.asp>

0 引言

由于急性胰腺炎(AP)的发病因素较复杂,目前确切的发病机制尚未完全阐明,近年来细胞因子尤其是趋化因子在AP的发病过程中所起的作用受到人们的重视,但对中性粒细胞趋化因子(CINC)在AP中究竟起何种作用的研究尚不多.我们通过建立重症AP模型,检测其CINC的表达变化情况,初步探讨CINC在重症急性胰腺炎(SAP)发病过程中所起的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠48只,清洁级,体质量 250 ± 30 g,由南通大学医学院动物实验中心提供.牛磺胆酸钠为美国Sigma公司产品,兔抗大鼠GRO/CINC-1抗体为美国Assay Designs公司产品,ABC免疫试剂盒为武汉博士德公司产品,RT-PCR一步法试剂盒为芬兰Finnzymes公司产品.

1.2 方法

1.2.1 分组及动物模型的建立 牛磺胆酸钠组和手术对照组各24只大鼠,大鼠术前禁食12 h,禁水6 h,用20 g/L戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔内注射麻醉,腹部皮肤消毒,正中切口进腹,胆胰管近端用无损伤金属夹夹闭,向十二指肠开口方向插入注射器针头,以0.1 mL/min的速度向胆胰管内注射50 g/L牛磺胆酸钠,剂量为1 mL/kg,5 min后拔除注射针,松开金属夹,缝合关腹.手术对照组仅向胆胰管注射与牛磺胆酸钠组等量的无菌生理盐水.分别随机选取6只大鼠在术后1, 3, 6, 12 h予安乐死,心脏穿刺抽取血液3-5 mL,4℃ 3 000 r/min离心15 min,离心后取血清,在-70℃中保存;取胰头的胰腺组织用40 g/L中性甲醛固定24-48 h,石蜡包埋.

1.2.2 血清淀粉酶测定 采用酶法,由美国Vitros-250型全自动生化分析仪测定.

1.2.3 胰腺组织病理评分 胰腺组织经HE染色后,由两位专业的病理医师双盲阅片,每张切片随机选取10个高倍镜视野,以水肿、感染、出血和坏死评价胰腺组织损伤的程度.具体参考Rongione *et al*^[1]的评分标准进行病理评分,各项最低分为0分,最高分为4分,取各项积分总和为最终得分.

1.2.4 免疫组织化学检测 石蜡包埋的组织标本4 μm连续切片,常规脱蜡,30 mL/L的H₂O₂阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)漂洗后,

与兔抗大鼠GRO/CINC-1抗体(工作浓度为1:50)孵育,用PBS代替一抗作为空白对照,再次TBS液漂洗,用生物素化羊抗兔IgG二抗孵育,再以TBS液漂洗,并以5 mL/L DAB-H₂O₂显色,最后苏木素复染及封片.

1.2.5 RT-PCR检测 采用Trizol试剂提取胰腺组织总RNA,根据GenBank中基因序列自行设计引物,CINC引物(310 bp):上游:5'-ATCGATGGTCGTTCAATTCC-3';下游:5'-GGCATTGTGCCCTACAAACT-3';GAPDH引物(484 bp):上游:5'-ATGGGAAGCTGGTCATCAAC-3';下游:5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3',由上海生工生物工程公司合成.PCR循环条件:55℃ RT反应45 min;92℃ 预变性2 min;92℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min;循环40次;72℃延伸5 min,反应体系为50 μL.PCR产物在17 g/L琼脂糖凝胶上作电泳观察结果,用凝胶图像扫描仪测定光密度值,以GAPDH为内参照,半定量测定CINC mRNA的表达情况.

统计学处理 实验数据均用mean±SD表示,用STATA 7.0统计软件,t检验对两组均数进行显著性检验, $P<0.05$ 具有显著性差异.

2 结果

2.1 血清淀粉酶 牛磺胆酸钠组术后1 h淀粉酶比手术对照组明显升高,术后6 h达到高峰,术后12 h稍有下降.相同时间点牛磺胆酸钠组血清淀粉酶均高于手术对照组,有显著性差异($P<0.01$)(表1).

2.2 胰腺组织学改变和病理评分 牛磺胆酸钠组术后1, 3 h穿刺点附近可见明显的出血,肿胀,腹腔有血性腹水,量逐渐增多;术后6, 12 h除了见大量血性腹水外,胰腺质地变硬,见大片的黄色和白色的坏死灶.手术对照组术后1 h穿刺点附近可见轻度水肿、极少量散在的出血点,其他时间点胰腺外观正常.

牛磺胆酸钠组术后1, 3 h可见明显小叶间水肿,片状出血,炎性细胞浸润,腺泡细胞变性坏死;6, 12 h可见大量炎性细胞浸润,胰腺小叶结构破坏,大量腺泡细胞坏死.手术对照组早期可见部分间质水肿,极少量的炎性细胞浸润,偶见点状出血,未见腺泡细胞坏死.相同时间点的牛磺胆酸钠组病理评分明显高于手术对照组,有显著性差异($P<0.01$)(表1).

表1 牛磺胆酸钠组和手术对照组大鼠血清淀粉酶、胰腺病理积分和胰腺CINC mRNA ($n = 6$, mean ± SD)

	术后1 h		术后3 h		术后6 h		术后12 h	
	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠
血清淀粉酶(nkat/L)	158.13 ± 7.02	249.19 ± 37.37 ^b	207.26 ± 25.01	562.69 ± 61.91 ^b	156.57 ± 12.30	744.99 ± 114.88 ^b	121.59 ± 10.02	595.50 ± 56.75 ^b
胰腺病理积分	1.25 ± 0.46	6.25 ± 0.71 ^b	1.63 ± 0.52	9.13 ± 0.83 ^b	0.63 ± 0.52	10.50 ± 1.07 ^b	0.25 ± 0.46	11.75 ± 1.04 ^b
CINC mRNA	0.29 ± 0.10	0.37 ± 0.10 ^a	0.26 ± 0.07	0.47 ± 0.08 ^a	0.18 ± 0.02	0.82 ± 0.09 ^b	0.18 ± 0.04	0.86 ± 0.09 ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 手术对照组.

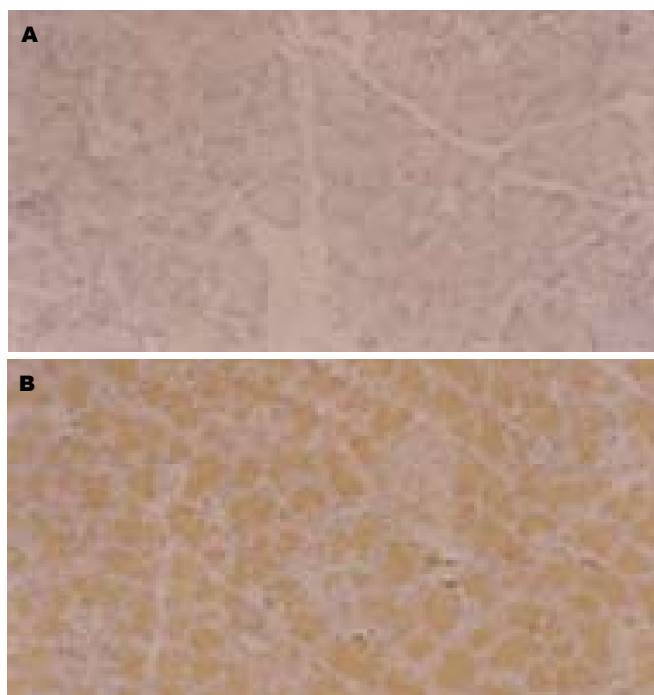


图1 胰腺组织免疫组织化学检测CINC蛋白的表达($\times 250$). A: 手术对照组12 h胰腺组织; B: 牛磺胆酸钠组12 h胰腺组织.

2.3 免疫组织化学染色 手术对照组术后1, 3 h见少量胰腺腺泡细胞有CINC蛋白的阳性表达, 表达较弱; 而术后6, 12 h腺泡细胞则未见阳性表达(图1A). 牛磺胆酸钠组术后1 h至6 h有CINC蛋白阳性表达的腺泡细胞数量逐渐增多, 且细胞着色逐渐加深, 胰岛细胞不着色. 术后12 h表达情况与术后6 h相似(图1B). CINC蛋白表达阳性的细胞以中性粒细胞和腺泡细胞为主.

2.4 RT-PCR 牛磺胆酸钠组术后1 h胰腺组织CINC mRNA表达升高, 随时间表达逐渐升高, 6 h和12 h达到高峰; 手术对照组CINC mRNA表达早期有轻度升高(图2). 相同时间点牛磺胆酸钠组表达高于手术对照组, 有显著差异($P < 0.05$)(表1).

3 讨论

趋化因子(chemokine)是细胞因子超家族成员中一类由组织细胞或炎症细胞衍生的, 具有白细胞趋化作用的小分子蛋白多肽, 根据其半胱氨酸排列位置的不同分为CXC、CC、C、CX3C四类趋化因子. 大鼠的CINC是一种含ELR的CXC类趋化因子, 与人的生长相关基因蛋白- α (GRO- α)同源, 主要趋化中性粒细胞, 与CXC受体2有高度的亲和力, 该受体高度表达于中性粒细胞, 促使他们黏附上皮细胞、通过血管壁迁移、组织入侵, 产生氧自由基、脱颗粒和增加钙离子内流, 进一步扩大炎症反应.

本实验表明SAP大鼠CINC蛋白及其mRNA表达随着时间变化逐渐增强, 且与胰腺组织的病理损害程度呈正相关, 提示CINC在AP大鼠的发病和炎症反应的发展中起了重要的作用, 与国外的文献[2,3]报道一致. 一些临床研究表明SAP患者血浆中含ELR的CXC类趋化因子

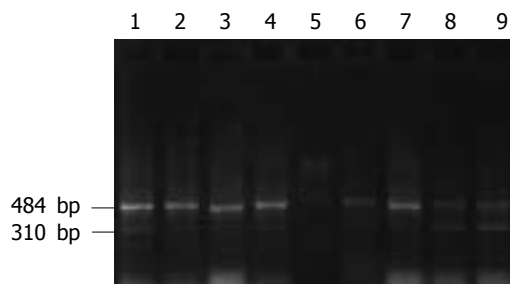


图2 牛磺胆酸钠组和手术对照组胰腺组织CINC mRNA的表达. 1-4: 手术对照组1, 3, 6, 12 h; 5: Marker; 6-9: 牛磺胆酸钠组1, 3, 6, 12 h.

GRO- α 、ENA-78等水平明显高于轻症患者, 且上升较早, 提示血浆CXC类趋化因子的高水平可能与SAP引起的全身系统炎症反应综合征、多脏器功能衰竭的早期高死亡率有关[4,5].

Brady *et al*^[2]通过免疫组化发现CINC的表达不仅定位在中性粒细胞上, 而且胰腺腺泡细胞内也有表达, 提示胰腺腺泡细胞和中性粒细胞均为急性胰腺炎CINC的来源之一. 本实验的免疫组织化学检测结果也显示胰腺组织中CINC蛋白表达阳性的细胞以中性粒细胞和胰腺腺泡细胞为主.

至于CINC的高表达是导致瀑布样级联炎症反应的原因, 还是其结果, 通过本实验, 我们认为CINC的高表达趋化了炎症细胞, 从而加重了炎症, 同时由于大量炎症细胞浸润和胰腺腺泡细胞受损进一步增加了CINC的分泌, 形成恶性循环, 最终导致全身系统炎症反应综合征和多脏器功能衰竭.

趋化因子在炎症中主要是吸引炎症细胞浸润于炎症部位参与炎症反应, 使不同的细胞网络之间产生相互作用, 本实验表明CINC可能在AP发病过程及MAP向SAP转变过程中起了重要的作用. Bhatia *et al*^[6]用绵羊抗CINC抗体干预雨蛙肽诱导的大鼠AP模型, 虽然对胰腺局部的损害没有明显作用, 但减轻了相关的急性肺损害. Yamaguchi *et al*^[7]用新型抗炎介质IS-741减少了AP模型CINC的合成, 抑制中性粒细胞的黏附和渗出, 对实验性急性胰腺炎具有治疗效果. 因此, 我们可以尝试通过用中和趋化因子或阻断趋化因子受体来抑制急性胰腺炎早期趋化因子的活性减少其有害的免疫应答, 避免炎症反应的进一步加重, 从而达到治疗急性胰腺炎和减少并发症的目的.

4 参考文献

- 1 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
- 2 Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 260-269
- 3 Sugita H, Yamaguchi Y, Ikei S, Yamada S, Ogawa M. Enhanced expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) by bronchoalveolar macrophages in cerulein-induced pancreatitis rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 154-160
- 4 Shokuchi S, Bhatia M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos JP,

- Slavin J. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 566-572
- 5 Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003; 29: 622-629
- 6 Bhatia M, Brady M, Zagorski J, Christmas SE, Campbell F, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut* 2000; 47: 838-844
- 7 Yamaguchi Y, Okabe K, Liang J. The novel carboxamide derivative IS-741 reduces neutrophil chemoattractant production by bronchoalveolar macrophages in rats with cerulein-induced pancreatitis complicated by sepsis. *Digestion* 1999; 60: 52-56

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 •

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、材料和方法、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。

幽门螺杆菌根除对门脉高压性胃病患者预后的影响

凌安生, 朱 励, 王 龙, 陈金联, 朱金水

凌安生, 安徽省安庆市第一人民医院内二科 安徽省安庆市 246003
朱 励, 王 龙, 陈金联, 朱金水, 上海交通大学附属第六人民医院消化科
上海市 200233
通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六
人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com
电话: 021-64369181-8969 传真: 021-64837019
收稿日期: 2005-07-15 接受日期: 2005-07-19

Effect of *Helicobacter pylori* eradication on prognosis of patients with portal hypertension gastric disease: an analysis of 106 cases

An-Sheng Ling, Li Zhu, Long Wang, Jin-Lian Chen, Jin-Shui Zhu

An-Sheng Ling, the Second Department of Internal Medicine, the First People's Hospital of Anqing, Anqing 246003, Anhui Province, China

Li Zhu, Long Wang, Jin-Lian Chen, Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Sixth Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Sixth Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2005-07-15 Accepted: 2005-07-19

Abstract

AIM: To investigate the effect of *H pylori* eradication on patients with portal hypertension gastric disease (PHGD).

METHODS: One hundred and six patients with PHGD and *H pylori* infection were randomly divided into control group ($n = 50$, treated with omeprazole) and *H pylori* eradication group ($n = 56$, treated with omeprazole, clarithromycin, and amoxicillin). All the patients received gastric endoscopy and ^{14}C breath test at the end of the experiment.

RESULTS: Before the experiment, erosive gastritis was found in 46 patients (45.8%). After treatment, the negative rate of *H pylori* was significantly different between the *H pylori* eradication and control group (95.9% vs 6.1%, $P < 0.01$). Invalidation appeared in a total of 16 patients (29.8%) of the *H pylori* eradication group and 7 (14.3%) of the control group, and there was sig-

nificantly difference between them ($P < 0.05$). However, the onset of corpus atrophy and intestinal metaplasia was more prevalent in the *H pylori* positive group than in the *H pylori* eradication group.

CONCLUSION: *H pylori* eradication may decrease the effect of proton pump inhibitor (PPI) in treatment of PHGD, whereas it can prevent the occurrence of corpus erosion and intestinal metaplasia in patients with PHGD.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Portal hypertension gastric disease; Efficacy; Prognosis

Ling AS, Zhu L, Wang L, Chen JL, Zhu JS. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on prognosis of patients with portal hypertension gastric disease: an analysis of 106 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(22):2708-2710

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)根除对门脉高压性胃病(portal hypertension gastric disease, PHGD)患者疗效。

方法: 106例PHGD患者, 均为*H pylori*阳性, 随机分为: 对照组50例, 仅服用奥美拉唑; *H pylori*根除组56例, 口服奥美拉唑和克拉霉素及阿莫西林, 试验结束时所有患者均行胃镜复查及 ^{14}C 呼气试验。

结果: 试验前46例患者(45.8%)内镜检查发现糜烂性胃炎, 试验结束后*H pylori*根除组50例患者*H pylori*阴性(95.9%), 对照组3例转阴(6.1%), 两组*H pylori*根除率差异显著($P < 0.01$)。 *H pylori*根除组16例失效, 对照组有7例失效, 两者相比差异显著(29.8% vs 14.3%, $P < 0.05$)。 对照组患者胃体萎缩及胃体肠化较*H pylori*根除组明显增多。

结论: *H pylori*根除可降低质子泵抑制剂(PPI)治疗PHGD的疗效, 但*H pylori*根除对PHGD患者胃体糜烂及胃体肠化有防治作用。

关键词: *H pylori*根除; 门脉高压性胃病; 疗效

凌安生, 朱励, 王龙, 陈金联, 朱金水. 幽门螺杆菌根除对门脉高压性胃病患者预后的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2708-2710
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2708.asp>

0 引言

门脉高压性胃病(portal hypertension gastric disease)是指门脉高压引起的胃炎、胃糜烂或溃疡病,具有胃部不适症状,内镜检查可有*H pylori*阳性发现,内镜检查阴性则称为内镜阴性PHGD或非糜烂性门脉高压性胃病。70%以上PHGD患者依赖抑酸药缓解症状,质子泵抑制剂(PPI)在PHGD治疗中起重要作用,近年来*H pylori*感染在PHGD患者中的作用引起广泛争议^[1-3],我们评估*H pylori*根除后质子泵抑制剂近期治疗PHGD患者的疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-04/2005-01本院住院确诊为肝硬化伴门脉高压患者106例,均至少在过去12 mo中每周存在反酸和/(或)腹胀症状,结合病史不符合下列排除标准之一:(1)现病史或既往史中有消化性溃疡;(2)既往有胃部手术史;(3)妊娠;(4)严重胃食管反流病相关并发症(如狭窄和Barrett食管等);(5)既往接受抗*H pylori*治疗或使用过非甾体类抗炎药(NSAID);(6)4 wk内服用过PPI类药物。所有患者均经胃镜(Olympus XQ-240)检查以除外消化性溃疡,胃黏膜标本尿素酶试验及组织病理检查均显示*H pylori*阳性。

1.2 方法

1.2.1 内镜及病理学评估 内镜下采用改良的Savary-Miller分类法评估门脉高压性胃病:1级,在一个黏膜皱襞中单个或数个非融合性糜烂;2级,多个黏膜皱襞上糜烂,可伴或不伴融合,但尚未累及食管全周;3级,全胃广泛散在分布糜烂,渗出性病变;4级,出现溃疡或狭窄等。从胃窦与胃体取两块标本,由同一病理科医生行病理检查,按照最新悉尼分类法对中性粒细胞及单核细胞浸润程度、肠腺化生及萎缩程度分别计分(均为0-3分),中性粒细胞积分作为炎症积分(0-6分)以评估胃炎活动程度。

1.2.2 症状评估 分组前记录反酸或腹胀症状持续时间,症状严重程度评估采用四分法:0分,无症状;1分,轻度,经提醒可意识症状存在,不影响日常活动;2分,中度,症状持续存在,不影响日常活动;3分,严重影响日常活动。腹胀和反酸症状不一致,则取相对高的症状计分。

1.2.3 分组 采用随机抽信封方法将患者分成两组,*H pylori*根除组行*H pylori*根除疗法(奥美拉唑20 mg,阿莫西林500 mg,克拉霉素500 mg,均2次/d);对照组仅予奥美拉唑20 mg,2次/d,两组治疗时间均为1 wk。两组患者在年龄、性别、吸烟、饮酒、体质指数、胃病的严重程度等方面均有可比性(表1)($P>0.10$)。

1.2.4 初始治疗 药物治疗1 wk后,两组患者均服用奥美拉唑20 mg/d,共3 wk,疗程结束时除每个症状单独计分外,试验前存在糜烂性胃炎的患者行胃镜复查以了解愈合情况,如食管炎未完全愈合(炎症分级 ≥ 1)或症状持续存在(症状计分 ≥ 1 分)为失效。

表1 治疗前两组患者一般资料

参数	<i>H pylori</i> 根除组 ($n = 56$)	对照组 ($n = 50$)
年龄(岁)	54.0 \pm 13.5	53.0 \pm 15.2
男性(%)	25 (51)	23 (46.9)
吸烟人数(%)	8 (16.3)	10 (20.4)
饮酒人数(%)	12 (24.5)	11 (22.4)
体质指数	24.5 \pm 3.4	23.8 \pm 3.7
食管炎分级(%)		
0	33 (67.3)	32 (65.3)
1-2	14 (28.6)	15 (30.6)
3-4	2 (4.1)	2 (4.1)
食管裂孔疝(%)	7 (14.3)	6 (12.2)
既往服用过PPI(%)	4 (8.2)	5 (10.2)
症状计分(%)		
1	13 (26.5)	17 (34.7)
2	29 (59.2)	27 (55.1)
3	7 (14.3)	5 (10.2)
症状持续时间(%)		
1 a	15 (30.6)	17 (34.7)
>1-5 a	22 (44.9)	20 (40.8)
>5-10 a	5 (10.2)	5 (10.2)
>10 a	7 (14.3)	7 (14.3)

1.2.5 维持治疗 症状完全缓解与食管炎完全愈合的患者继续服用奥美拉唑10 mg/d,直至试验第3 wk,第1,2及3 wk时患者随访以评估症状及依从性,反酸及腹胀症状复发及试验第3 wk均行胃镜复查(包括组织病理及尿素酶试验),试验时所有患者停用奥美拉唑,并于4 wk后行¹⁴C呼气试验以评估*H pylori*情况。维持阶段反流症状或食管炎复发(症状计分 ≥ 1 分和/(或)炎症分级 ≥ 1)为失效。

统计学处理 等级资料采用中位数(变化区间)表示,采用秩和检验,两组*H pylori*根除率及失效率比较采用 χ^2 检验,所有统计学处理均在SPSS 11.5 for windows软件包完成, $P<0.05$ (双侧)表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H pylori*清除情况 12 mo时依据C呼气试验,*H pylori*根除组*H pylori*根除率为95.9%(47例),而对照组仅为6.1%(3例),两组患者*H pylori*根除率差异显著($P<0.01$)。

2.2 失效情况 两组患者依从性均达80%以上,*H pylori*根除组16例治疗失败(起始阶段6例,维持阶段10例),起始阶段有4例症状未完全缓解,2例糜烂性胃炎持续存在,在维持阶段症状复发的10例患者中,4例同时有症状与食管炎的复发;对照组有7例患者失效,均发生在维持阶段,全部为症状复发,两组患者试验期间失效率差异显著($P<0.05$)。

2.3 胃黏膜病理变化(表2) 试验前两组胃炎程度相近,绝大多数患者胃炎以胃窦为主,但近半数同时存在中至重度胃体胃炎。对照组在根除*H pylori*后,胃窦与胃体的炎症程度均有明显降低($P<0.01$);而在对照组,胃炎从以胃窦为主变为胃体为主,PPI治疗1 a后,胃窦部胃炎活动

表2 两组患者治疗前后胃黏膜组织病理学变化

项目	<i>H. pylori</i> 根除组 (<i>n</i> = 49)		对照组 (<i>n</i> = 49)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
胃窦炎症	4 (1-6)	1 (0-4) ^b	4 (1-6)	3 (1-6)
胃体炎症	3 (0-6)	1 (0-4) ^b	3 (0-6)	4 (0-6) ^b
胃窦萎缩	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
胃体萎缩	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	2 (1-3) ^b
胃窦肠化	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
胃体肠化	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)	2 (1-3) ^a

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01

度无明显变化(*P*>0.05), 而胃体炎的炎症积分明显升高(*P*<0.01). 试验前两组患者胃萎缩及肠化生程度相似, *H. pylori*根除组患者在治疗12 mo后胃萎缩及肠化生程度变化均不明显, 而对照组在奥美拉唑治疗12 mo后胃体萎缩及胃体肠腺化生程度均显著加重.

3 讨论

目前*H. pylori*根除对门脉高压性胃病(PHGD)的影响引起广泛争论, 在本研究中, 我们在成功起始PPI全量治疗后采用递减法维持治疗, 研究结果显示根除*H. pylori*可导致以后的PHGD治疗失败的风险增加. 对于*H. pylori*根除后, 反流性疾病治疗难度增加可能有多方面的原因. 首先, 持续*H. pylori*感染可使产氨增加, 而氨可以加强药物的抑酸效果^[7], 更重要的是, 抑酸治疗可加重胃体部炎症程度, 而进一步抑制胃酸分泌^[3,4], 其次, 停用奥美拉唑后早期可观察到胃酸高分泌, 而这种现象可以在*H. pylori*感染时减轻^[5], 成功根除*H. pylori*的患者在减少PPI剂量后, 酸分泌的反跳可导致PHGD的复发, 最后, 有研究发现*H. pylori*根除可提高未接受抑酸维持治疗患者食管酸暴露时间, 这可能是由于胃体胃炎的缓解及胃酸分泌的恢复, 有研究发现胃体胃炎缓解及胃酸分泌功能的恢复可抵消抑酸剂维持治疗的疗效^[6-10].

长期PPI治疗对PHGD的影响也引起医学界的争论, 有研究显示*H. pylori*感染患者接受长期PPI治疗与接受抗反流手术治疗相比, 更易使PHGD患者出现萎缩性胃炎伴不典型增生^[12-14], 虽然这一病理学差异未得到随机临床研究的证实, 但这一担忧不能完全消除, 近期一项随机研究发现如果*H. pylori*未清除而长期PPI治疗, PHGD患者的胃体胃炎可进一步发展, 而在*H. pylori*根除后PHGD患者的胃炎可逆转^[7,15], 所以, PHGD患者在决定长期PPI治疗前,

特别在胃癌高发人群中^[8-9], 建议先行根除*H. pylori*以避免PHGD患者的萎缩性胃炎及肠化生的进展.

4 参考文献

- Armstrong D. Endoscopic evaluation of gastro-esophageal reflux disease. *Yale J Biol Med* 1999; 72: 93-100
- Bercik P, Verdu EF, Armstrong D, Idstrom JP, Cederberg C, Markert M, Crabtree JE, Stolte M, Blum AL. The effect of ammonia on omeprazole-induced reduction of gastric acidity in subjects with *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 947-955
- Moayyedi P, Wason C, Peacock R, Walan A, Bardhan K, Axon AT, Dixon MF. Changing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in long-standing acid suppression. *Helicobacter* 2000; 5: 206-214
- Gillen D, Wirz AA, Neithercut WD, Ardill JE, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection potentiates the inhibition of gastric acid secretion by omeprazole. *Gut* 1999; 44: 468-475
- Gillen D, Wirz AA, Ardill JE, McColl KE. Rebound hypersecretion after omeprazole and its relation to on-treatment acid suppression and *Helicobacter pylori* status. *Gastroenterology* 1999; 116: 239-247
- Koike T, Ohara S, Sekine H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T, Toyota T. *Helicobacter pylori* infection inhibits reflux esophagitis by inducing atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3468-3472
- Kuipers EJ, Nelis GF, Klinkenberg-Knol EC. *Helicobacter* eradication for the prevention of atrophic gastritis during omeprazole therapy; a prospective randomized trial. *Gastroenterology* 2001; 120(suppl 1): A14
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180
- 朱金水. 胃癌治疗的进展及现状. *中国临床医学* 2004; 11: 1-6
- Deguchi R, Takagi A, Kawata H. Association between Cag A+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-R II gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 91: 481-485
- Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem* 2000; 275: 16064-16072
- Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1263-1268
- Asahi M, Azuma T, Ito S. *Helicobacter pylori* Cag A protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000; 191(4): 593-602
- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500
- Deguchi R, Takagi A, Kawata H. Association between Cag A+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-R II gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 91: 481-485

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

原发性小肠淋巴瘤临床病理分析23例

毛永平, 杨云生, 王淑芳, 窦艳

毛永平, 杨云生, 王淑芳, 窦艳, 解放军总医院消化科 北京市 100853
通讯作者: 毛永平, 100853, 北京市复兴路28号, 解放军总医院消化科.
maoyongping@yahoo.com.cn
电话: 010-66937076
收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

Clinicopathological features of primary small intestinal lymphoma: analysis of 23 cases

Yong-Ping Mao, Yun-Sheng Yang, Shu-Fang Wang, Yan Dou

Yong-Ping Mao, Yun-Sheng Yang, Shu-Fang Wang, Yan Dou, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Yong-Ping Mao, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. maoyongping@yahoo.com.cn

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To summarize the clinicopathologic features of the small intestinal lymphoma.

METHODS: The clinical data, including the initial symptoms or signs, involved locations, histological subtypes, and complications, of 23 patients pathologically diagnosed with small intestinal lymphoma were retrospectively analyzed.

RESULTS: The initial symptoms or signs included abdominal pain (13 cases, 56.5%), abdominal mass (6 cases, 26.1%), melena or hematochezia (2 cases, 8.7%), diarrhea (1 cases, 4.3%), and constipation (1 cases, 4.3%). Five patients had B-symptom. The involved locations were ileocecum (7 cases, 30.4%), jejunum (7 cases, 30.4%), ileum (6 cases, 26.1%), and duodenum (1 cases, 4.3%). Multiple involvements appeared in 2 cases (8.7%). Hodgkin's lymphoma was not found in all the patients. Of the 23 cases, 19 were B-cell origin (82.6%) and 4 were T-cell origin (17.4%). For histological subtypes, 13 cases (56.5%) were diagnosed with diffuse large B cell lymphoma, 6 cases (26.1%) with B-cell MALT lymphoma, 3 cases (13.0%) with diffuse T-cell lymphoma, and 1 cases (4.3%) with enteropathy-associated T cell lymphoma.

CONCLUSION: Abdominal pain is the most common symptom for small intestinal lymphoma, and the most frequently involved location is ileocecum and jejunum. B-cell origin covers a larger percent. Diffuse large B cell non-Hodgkin's lymphoma is commonly occurred in terms of histological classification.

Key Words: Small intestinal lymphoma; Pathological features; Non-Hodgkin's lymphoma

Mao YP, Yang YS, Wang SF, Dou Y. Clinicopathological features of primary small intestinal lymphoma: analysis of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2711-2713

摘要

目的: 总结小肠淋巴瘤的临床病理特征。

方法: 经病理检查证实的小肠淋巴瘤患者23例, 对临床资料进行系统的回顾分析, 总结其首发症状、好发部位、组织学类型、并发症等临床病理特征。

结果: 首发症状和体征: 腹痛13例(56.5%), 腹部包块6例(26.1%), 黑便/便血2例(8.7%), 腹泻1例(4.3%), 便秘1例(4.3%)。有B症状的5例(21.7%); 肿瘤部位: 回盲部7例(30.4%), 空肠7例(30.4%), 回肠6例(26.1%)、多部位2例(8.7%), 十二指肠1例(4.3%)。均为非霍奇金淋巴瘤, B细胞来源19例(82.6%), T细胞来源4例(17.4%)。组织学类型: 弥漫大B细胞非霍奇金淋巴瘤13例(56.5%); 黏膜相关淋巴组织B细胞性淋巴瘤6例(26.1%), 弥漫T细胞性淋巴瘤3例(13.0%), 肠病相关T细胞非霍奇金淋巴瘤1例(4.3%)。

结论: 小肠淋巴瘤最常见的首发症状和体征是腹痛, 最好发的部位是回盲部和空肠, 大多数为B细胞来源, 最常见的组织学类型是弥漫大B细胞非霍奇金淋巴瘤。

关键词: 小肠淋巴瘤; 病理特征; 非霍奇金淋巴瘤

毛永平, 杨云生, 王淑芳, 窦艳. 原发性小肠淋巴瘤临床病理分析23例. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2711-2713

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2711.asp>

0 引言

原发性胃肠道淋巴瘤是最常见的结外非霍奇金淋巴瘤, 约占全部非霍奇金淋巴瘤的4-20%。在原发性胃肠道淋巴瘤中, 肠淋巴瘤约占15-20%, 其中多数为小肠淋巴瘤^[1-5]。

关于原发性胃肠道淋巴瘤或肠淋巴瘤的临床报道较多,而有关原发性小肠淋巴瘤的临床病理特征临床报道相对较少,我院经病理检查证实的原发性小肠淋巴瘤患者23例,对临床资料进行回顾性分析,了解和总结原发性小肠淋巴瘤的临床病理特征。

1 材料和方法

1.1 材料 我院1997-09/2004-12经病理检查证实的原发性小肠淋巴瘤患者23例,男18例,女5例,年龄20-74(中位53)岁。

1.2 方法 总结其首发症状和体征、好发部位、组织学类型、并发症(出血,梗阻,瘘管形成)等临床病理特征。临床资料包括病史、体格检查、B症状(体温 $>38^{\circ}\text{C}$,盗汗,6 mo内体质量下降超过原来体质量的10%)、血常规、尿常规、胸片、小肠气钡灌肠双重造影、B超、CT、内镜检查病理活检,骨髓穿刺活检等。免疫组化检查CD20和CD3。

2 结果

全部23例小肠淋巴瘤均经病理检查证实,均无浅表淋巴结及纵隔和腹膜后淋巴结肿大,没有肝、脾和骨髓等脏器受累。小肠淋巴瘤包括十二指肠、空肠、回肠、回盲部和小肠多部位淋巴瘤。回盲部淋巴瘤定义为病变累及末端回肠和回盲瓣、盲肠或阑尾。

小肠淋巴瘤患者23例,男18例,女5例,年龄20-74(中位53)岁。首发症状和体征:腹痛13例(56.5%),腹部包块6例(26.1%),黑便/便血2例(8.7%),腹泻1例(4.3%),便秘1例(4.3%)。有B症状的5例(21.7%);从首发症状或体征出现到临床确诊所需时间1-22(中位4) mo。需手术处理的并发症:肠梗阻4例,消化道大出血3例,回肠乙状结肠瘘1例。肿瘤部位:回盲部7例(30.4%),空肠7例(30.4%),回肠6例(26.1%)、多部位2例(8.7%),十二指肠1例(4.3%)。均为非霍奇金淋巴瘤,B细胞来源19例(82.6%),T细胞来源4例(17.4%)。组织学类型:弥漫大B细胞非霍奇金淋巴瘤13例(56.5%);黏膜相关淋巴组织B细胞性淋巴瘤6例(26.1%),弥漫T细胞性淋巴瘤3例(13.0%),肠病相关T细胞非霍奇金淋巴瘤1例(4.3%)。

病程中只有1例患者经小肠气钡灌肠双重造影检查发现病变累及全小肠(十二指肠至末端回肠),后经胃镜检查在十二指肠水平段取活检,结肠镜检查在末端回肠取活检,病理检查诊断为弥漫T细胞性非霍奇金淋巴瘤。因病变累及全小肠,无法手术而直接予以化疗。其余22例患者,经反复多次胃肠镜、小肠气钡灌肠双重造影、B超、CT等检查均未能明确诊断。直至术前疑诊为小肠肿瘤或发生需手术处理的并发症时而行剖腹探查,术后病理确诊为小肠非霍奇金淋巴瘤。其中术前疑诊小肠淋巴瘤者2例,小肠和回盲部肿瘤16例,克罗恩病1例,腹膜后肿瘤1例,盆腔肿瘤1例,十二指肠肿瘤1例。

有腹部包块的6例患者(回盲部3例,空肠3例),B超和CT检查均发现了病灶,其中3例回盲部病变术前即准确定位,而3例空肠病变,术前2例定位在小肠,1例疑诊为腹膜后肿瘤,术后才明确定位在空肠。7例回盲部淋巴瘤和2例末端回肠淋巴瘤,结肠镜都发现了病灶,但镜下病理活检均未能明确定性。1例十二指肠淋巴瘤,胃镜检查发现了病变,术前也未能定性;1例术前疑诊小肠克罗恩病患者,行胶囊内镜检查时发生了肠梗阻,经手术治疗病理证实为回肠淋巴瘤。其余的小肠淋巴瘤,小肠气钡灌肠双重造影检查,虽然发现了病灶,但既不好准确定位,也无法定性。

3 讨论

Nakamura *et al*^[5]对原发性胃肠道淋巴瘤455例的临床病理资料进行Cox多变量分析显示,淋巴瘤分期早、患者年轻、B细胞来源和没有B症状是好的总生存期和无事件生存期的独立预后因子。MALToma也是无事件生存期的独立预后因子,但不是总生存期的独立预后因子。Koch *et al*^[6]报道,回盲部淋巴瘤的总生存期和无事件生存期明显高于其它部位的小肠淋巴瘤。Daum *et al*^[7]对原发性肠淋巴瘤56例进行前瞻性、非随机、多中心研究显示,B细胞来源的肠淋巴瘤预后优于T细胞来源的肠淋巴瘤。Ibrahim *et al*^[8]报道原发性肠弥漫大B细胞非霍奇金淋巴瘤的中位总生存期为101 mo,5 a和10 a总生存期分别为58%和48%。本组资料原发性小肠淋巴瘤大多数是B细胞来源,其中以弥漫大B细胞和黏膜相关淋巴组织B细胞性淋巴瘤较为多见,多数患者没有B症状,回盲部淋巴瘤最为多见,与国外报道[1,9]相近,因此原发性小肠淋巴瘤预后较好。Koh *et al*^[10]报道,1989/1998英国谢菲尔德淋巴瘤协作组对1E期和IIE期的原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤患者71例的临床病理资料进行回顾性分析显示,对原发性小肠淋巴瘤,手术治疗(联合或不联合化疗),术后60%的患者可获得5-10 a的生存。Atalay *et al*^[11]报道,手术联合化疗与单纯手术或化疗相比,可明显提高原发性胃肠道淋巴瘤患者的总生存期。Isomoto *et al*^[12]报道1例46岁男性壶腹部MALToma患者,予以局部放疗,每次1.5G,总量30 G,6 mo后复查胃镜局部肿瘤消失,放疗后4 a复查,患者仍处于完全缓解。

对于原发性小肠淋巴瘤,临床上能够早期诊断对改善预后是非常重要的。原发性小肠淋巴瘤临床表现多样,缺乏特异性。从首发症状或体征出现到明确诊断往往要经历较长的时间。本组资料显示原发性小肠淋巴瘤的首发症状或体征可表现为腹痛、腹部包块、黑便/便血、腹泻和便秘。有B症状的仅占21.7%。因而单从临床表现不易作出小肠淋巴瘤的诊断。小肠处在消化道的中间位置,位于胃和大肠之间,常规的结肠镜和胃镜检查最多只能检查到末端回肠和屈氏韧带附近约20 cm的空肠,对于长约6-7 m的小肠来说,绝大部分小肠均无法检查到;而小肠

气钡灌肠双重造影对于较小的小肠黏膜病变也不易发现,即使发现了病变,有时也不易准确定位,同时也无法定性。Yoshida *et al*^[13]报道1例72岁老年男性患者,间断便血2 a,先后做过大量检查,包括血液学和生化检查,胃镜,结肠镜,CT,核素和血管造影,均未能发现胃肠道出血部位。最后行双气囊小肠镜检查发现扩张的回肠内有几处溃疡瘢痕,活检病理无异常发现,为预防再出血而行回肠部分切除,术后病理显示异常淋巴细胞聚集,以固有肌层为主,免疫组化检查证实肿瘤细胞CD20和BCL2阳性,从而诊断为MALT B细胞淋巴瘤。因而原发性小肠淋巴瘤的临床诊断比较困难。Nomura *et al*^[14]采用多参量(包括临床症状,内镜表现,常规HE染色光学显微镜形态学检查,流式细胞仪检测免疫表型,免疫组化和萃取DNA基因型鉴定)分析的方法可提高MALToMa的诊断准确率。

本组资料显示原发性小肠淋巴瘤,中老年患者多见,男性多见。最好发的部位是回盲部和空肠。与国外报道相近^[1,9,15]。因此在临床上对于那些原因不明的腹痛、腹部包块、黑便/便血、腹泻和便秘患者,尤其是中老年、男性患者,应该对小肠进行有针对性地检查。结肠镜检查应尽量做到末端回肠,以期发现回盲部和末端回肠病灶并取活检;胃镜检查应尽量做到屈氏韧带附近的空肠,以期发现十二指肠和近端空肠病灶并取活检;小肠气钡灌肠双重造影是临床上最常用的检查方法,可发现大多数的空、回肠病变,但无法取活检,因而无法定性,有时亦无法准确定位,尤其是不容易发现较小的黏膜病变;对于有腹部包块者,B超和CT检查可发现病灶,但也存在不易准确定位和定性的问题,B超或CT引导下细针穿刺活检,有时由于取材少,病理检查也不易定性;胶囊内镜检查可观察到小肠病变,但无法活检,尤其对有肠腔狭窄者,有发生梗阻的危险。新近在临床上应用的双气囊小肠镜可对全小肠进行全面的观察,并可在直视下进行活检,该项检查技术的开展和普及有望提高原发性小肠淋巴瘤的术前确诊率。

4 参考文献

- 1 Lee J, Kim WS, Kim K, Ko YH, Kim JJ, Kim YH, Chun HK, Lee WY, Park JO, Jung CW, Im YH, Lee MH, Kang WK, Park K. Intestinal lymphoma: exploration of the prognostic factors and the optimal treatment. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 339-344
- 2 Radman I, Kovacevic-Metelko J, Aurer I, Nemet D, Zupancic-Salek S, Bogdanic V, Sertic D, Mrcic M, Pulanic R, Gasparovic V, Labar B. Surgical resection in the treatment of primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: retrospective study. *Croat Med J* 2002; 43: 555-560
- 3 Crump M, Gospodarowicz M, Shepherd FA. Lymphoma of the gastrointestinal tract. *Semin Oncol* 1999; 26: 324-337
- 4 Zinzani PL, Magagnoli M, Pagliani G, Bendandi M, Gherlinzoni F, Merla E, Salvucci M, Tura S. Primary intestinal lymphoma: clinical and therapeutic features of 32 patients. *Haematologica* 1997; 82: 305-308
- 5 Nakamura S, Matsumoto T, Iida M, Yao T, Tsuneyoshi M. Primary gastrointestinal lymphoma in Japan: a clinicopathologic analysis of 455 patients with special reference to its time trends. *Cancer* 2003; 97: 2462-2473
- 6 Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rube C, Probst A, Jaenke G, Bodenstern H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3861-3873
- 7 Daum S, Ullrich R, Heise W, Dederke B, Foss HD, Stein H, Thiel E, Zeitz M, Riecken EO. Intestinal non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter prospective clinical study from the German Study Group on Intestinal non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2740-2746
- 8 Ibrahim EM, Ezzat AA, El-Weshi AN, Martin JM, Khafaga YM, Al Rabih W, Ajarim DS, Al-Foudeh MO, Zucca E. Primary intestinal diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: clinical features, management, and prognosis of 66 patients. *Ann Oncol* 2001; 12: 53-58
- 9 Al-Shemmari SH, Sajjani KP, Ameen RM, Ragheb AM. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: treatment outcome. *Clin Lymphoma* 2003; 4: 99-103
- 10 Koh PK, Horsman JM, Radstone CR, Hancock H, Goepel JR, Hancock BW. Localised extranodal non-Hodgkin's lymphoma of the gastrointestinal tract: Sheffield Lymphoma Group experience (1989-1998). *Int J Oncol* 2001; 18: 743-748
- 11 Atalay C, Kanlioz M, Demir S, Pak I, Altinok M. Primary gastrointestinal tract lymphomas. *Acta Chir Belg* 2003; 103: 616-620
- 12 Isomoto H, Kamihira S, Matsuo E, Tawara M, Mizuta Y, Hayashi T, Maeda T, Kohno S, Tomonaga M. A case of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the ampulla of Vater: successful treatment with radiation therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1037-1041
- 13 Yoshida N, Wakabayashi N, Nomura K, Konishi H, Yamamoto H, Mitsufuji S, Kataoka K, Taniwaki M, Yamagishi H, Okanoue T. Ileal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma showing several ulcer scars detected using double-balloon endoscopy. *Endoscopy* 2004; 36: 1022-1024
- 14 Nomura E, Takagi S, Ichinohasama R, Kikuchi T, Shiraki M, Oomori S, Yokoyama H, Utsunomiya K, Negoro K, Aihara H, Takahashi S, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Multiparameter analysis for discreet differential diagnosis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in the intestine. *In Vivo* 2004; 18: 437-441
- 15 Kohno S, Ohshima K, Yoneda S, Kodama T, Shirakusa T, Kikuchi M. Clinicopathological analysis of 143 primary malignant lymphomas in the small and large intestines based on the new WHO classification. *Histopathology* 2003; 43: 135-143

壶腹癌组织中P-gp、LRP的表达及其意义

金浩生, 周杰, 阚和平, 廖彩仙, 谭远飞

金浩生, 周杰, 阚和平, 廖彩仙, 谭远飞, 南方医科大学南方医院肝胆外科 广东省广州市 510515

通讯作者: 金浩生, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院肝胆外科. kinghaos@yahoo.com.cn

电话: 020-61687815

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

Expression and clinical significance of P-glycoprotein and lung resistance related protein in carcinoma of ampulla

Hao-Sheng Jin, Jie Zhou, He-Ping Kan, Cai-Xian Liao, Yuan-Fei Tan

Hao-Sheng Jin, Jie Zhou, He-Ping Kan, Cai-Xian Liao, Yuan-Fei Tan, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Hao-Sheng Jin, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. kinghaos@yahoo.com.cn

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

Abstract

AIM: To explore the expression and clinical significance of P-glycoprotein (P-gp) and lung resistance related protein (LRP) in the carcinoma of ampulla.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of P-gp and LRP in the tissues from 39 patients with the carcinoma of ampulla and 10 normal controls. The results and pathological features were comparatively analyzed by statistical methods.

RESULTS: The positive expression of P-gp and LRP in the tissues from the carcinoma of ampulla was significantly higher than that in the normal controls (66.7%, 59.0% vs 20%, 10%, $P < 0.05$). The expression of P-gp and LRP had no relations with the sex, age, tumor size, and clinical stages. The expression of P-gp was positively correlated with lymph node metastasis (metastasis vs non-metastasis: 80.0% vs 42.9%, $P < 0.05$). The expression of LRP was significantly higher in the highly differentiated adenocarcinoma than that in the poorly differentiated adenocarcinoma (77.8% vs 42.9%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: P-gp expression is correlated with the metastasis potential of the ampulla carcinoma, and LRP expression is correlated with the biological features of the ampulla carcinoma.

Key Words: P-glycoprotein; Lung resistance related protein; Carcinoma of ampulla; Immunohistochemistry

Jin HS, Zhou J, Kan HP, Liao CX, Tan YF. Expression and clinical significance of P-glycoprotein and lung resistance related protein in carcinoma of ampulla. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(22):2714-2716

摘要

目的: 探讨壶腹癌P-gp、LRP的表达及其意义。

方法: 用免疫组化染色方法检测39例壶腹癌和10例正常壶腹P-gp、LRP表达的情况, 并结合临床病理特征进行统计分析。

结果: P-gp和LRP在壶腹癌组织中的表达均高于正常壶腹组织(66.7%, 59.0% vs 20%, 10%, $P < 0.05$)。壶腹癌P-gp、LRP表达与患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期无关; 而有淋巴结转移的壶腹癌中P-gp表达率为80.0%, 明显高于无淋巴结转移的壶腹癌中P-gp表达率42.9% ($P < 0.05$); 而LRP在高分化腺癌中表达率为77.8%, 高于低分化腺癌42.9% ($P < 0.05$)。

结论: P-gp高表达与壶腹癌转移潜能有关, LRP与壶腹癌生物学特性有关。

关键词: P-糖蛋白; 肺耐药相关蛋白; 壶腹癌; 免疫组化

金浩生, 周杰, 阚和平, 廖彩仙, 谭远飞. 壶腹癌组织中P-gp、LRP的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2714-2716

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2714.asp>

0 引言

目前化疗仍然是肿瘤辅助治疗的重要手段之一, 但肿瘤细胞多药耐药现象(multidrug resistance, MDR)是严重阻碍化疗药物在肿瘤治疗中应用的主要原因。在肿瘤细胞多药耐药的机理中, P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、肺耐药相关蛋白(lung resistance related protein, LRP)的过度表达占有重要地位。我们应用免疫组织化学染色方法检测壶腹癌及正常壶腹中P-gp、LRP的表达, 探讨其在壶腹癌组织中表达的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 1998/2005在南方医科大学附属南方医院行胰十二指肠手术切除标本的病例39例, 术后病理证实为壶腹腺癌。其中男22例, 女17例, 年龄33-73岁, 平均 57 ± 9 岁, 术前均未用过化疗。肿瘤分化程度: 高分化腺癌18例, 中低分化腺癌21例。肿瘤直径 ≤ 2 cm 8例, > 2 cm 31例。淋巴结转移: 阳性25例, 阴性14例。按2002年国际抗癌联盟(UICC)TNM临床分期: I、II期共28例, III、IV期共11例。另取尸体标本的正常壶腹组织10例作对照。

1.2 方法 标本用40 g/L甲醛固定、石蜡包埋, 制备成4 μ m厚切片, 而后用免疫组化(S-P法)染色检测壶腹癌组织和正常壶腹组织中的P-gp、LRP表达。抗P-gp、LRP鼠抗人单克隆抗体及免疫组织化学染色试剂盒均购于北京中山生物技术有限公司。染色程序按试剂盒说明书进行。以已知胰腺癌阳性片为阳性对照, 以PBS代替一抗为阴性对照。免疫组化结果判断标准: 细胞出现棕黄色染色为阳性细胞, 高倍物镜下每张切片随机选取5个视野, 每个视野内观察100个细胞, 阳性细胞 $\geq 10\%$ 为阳性, 否则为阴性。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件行 χ^2 检验及Spearman等级相关分析法。

2 结果

2.1 P-gp在正常壶腹和壶腹癌中的表达 主要定位于在细胞膜, 部分位于细胞质(图1A-B)。LRP在正常壶腹和壶腹癌中的表达: 主要定位于细胞质, 部分位于细胞膜(图2A-B)。壶腹癌组织中P-gp的阳性表达率为66.7%

(26/39), 高于正常壶腹组织中P-gp的阳性表达率为20.0% ($P < 0.05$)。壶腹癌组织中LRP的阳性表达率为59.0% (23/39), 正常壶腹组织中LRP的阳性表达率为10.0% (1/10), 其差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 壶腹癌P-gp表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、肿瘤直径、临床分期无相关性($P > 0.05$); 但是P-gp在有淋巴结转移的壶腹癌中的表达率为80.0%, 明显高于无淋巴结转移的壶腹癌中的表达率42.9% ($P < 0.05$)。壶腹癌LRP表达与患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移无相关性($P > 0.05$); LRP在高分化腺癌中表达率为77.8%, 高于低分化腺癌42.9%, 随肿瘤分化程度下降而下降($P < 0.05$)(表1)。

表1 P-gp、LRP在壶腹癌组织中的表达

分组	<i>n</i>	P-gp阳性表达 (%)	LRP阳性表达 (%)
性别			
男	22	14 (63.6)	12 (54.5)
女	17	12 (70.6)	11 (64.7)
年龄 (岁)			
≤ 60	23	16 (69.6)	15 (65.2)
> 60	16	10 (62.5)	8 (50.0)
分化程度			
高分化腺癌	18	10 (55.6)	14 (77.8) ^b
中低分化腺癌	21	16 (76.2)	9 (42.9)
肿瘤直径			
≤ 2 cm	8	5 (62.5)	4 (50.0)
> 2 cm	31	21 (67.7)	19 (61.3)
TNM分期			
I + II	28	19 (67.9)	17 (60.7)
III + IV	11	7 (63.6)	6 (54.5)
淋巴结转移			
(-)	14	6 (42.9)	8 (57.1)
(+)	25	20 (80.0) ^a	15 (60.0)

^a $P < 0.05$, $\chi^2 = 5.571$ vs 淋巴结转移(-); ^b $P < 0.05$, $\chi^2 = 4.885$ vs 中低分化腺癌。

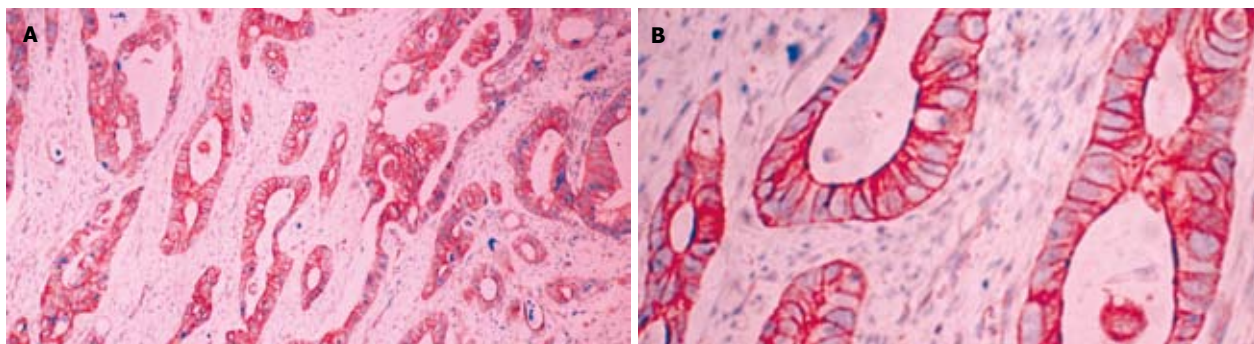


图1 P-gp在壶腹癌中的表达。A: $\times 100$; B: $\times 400$ 。

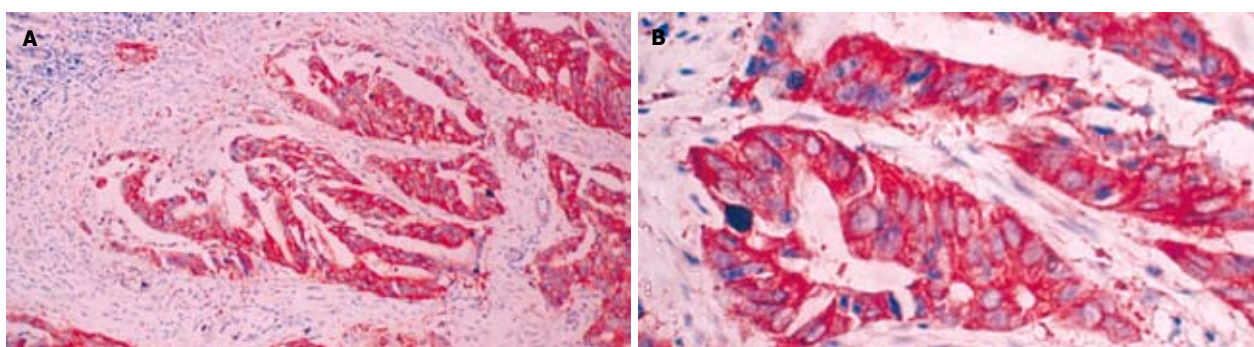


图2 LRP在壶腹癌中的表达。A: $\times 100$; B: $\times 400$ 。

2.3 P-gp和LRP在壶腹癌组织中的表达根据Spearman相关分析未发现两者有相关性。

3 讨论

P-gp基因定位于人类7号染色体的q21.1. 是ABC(ATP binding cassette family)超家族跨膜转运蛋白的一员. P-gp跨膜结构具有能量依赖性 " 药泵 " 的功能, 它可将抗肿瘤药物逆浓度从细胞内主动转运至细胞外, 降低细胞内药物浓度而导致肿瘤耐药^[1].

LRP最早从肺癌细胞中分离得到, 基因定位在16p11.2, 属于细胞质穹隆蛋白. LRP广泛分布于细胞器上, 它是细胞核与细胞质物质运输的通道, 构成核孔复合物的中心塞子或物质转运载体, 调控细胞核和细胞质物质的交换. LRP引起MDR的机制为: LRP阻止以胞核为效应点的药物转运到细胞质中; 将进入细胞质的药物转运到运输囊泡中, 隔绝药物作用, 并以胞吐的方式排出体外, 从而产生耐药^[2].

目前研究表明P-gp高表达多与肿瘤转移潜能、化疗疗效差、低缓解率、高复发率、生存期短等有关, 可作为肿瘤患者预后的评价指标之一^[3-6]. 本组壶腹癌P-gp表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、肿瘤直径、临床分期无相关性, 而在有淋巴结转移的患者中P-gp表达阳性率明显高于无转移的患者, 提示P-gp高表达与壶腹癌的转移潜能存在一定的关系. LRP高表达同样提示肿瘤化疗疗效差、缓解率低及预后不良^[7-9], LRP在本组壶腹癌病例中的表达随肿瘤分化程度下降表达有下降趋势, 与其他因素无相关性, 表明LRP与壶腹癌生物学特性有关. Schneider *et al*^[10]研究发现联合P-gp和LRP的表达情况可以有助于判断预后.

因为P-gp和LRP涉及不同的抗肿瘤耐药谱^[11-12], 而维拉帕米、PAK-104P等许多药物可以通过抑制P-gp或LRP功能而逆转肿瘤细胞多药耐药, 提高化疗治愈率^[13-17], 我们认为通过联合检测壶腹癌P-gp、LRP表达的情况, 临床上可根据其耐药谱制定合理有效的化疗方案和有针对性使用MDR逆转剂提高化疗的疗效和治愈率; 同时为我们对壶腹癌患者的预后判断提供一定的参考价值.

4 参考文献

1 Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-

- edged sword. *J Biol Chem* 1988; 263: 12163-12166
- 2 Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Schroeijers AB, van der Valk P, Scheper RJ. Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 979-984
- 3 姚学清, 卿三华. 多药耐药基因在进展期大肠癌中检测及意义. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 535-536
- 4 倪灿荣. 胃癌GST-II, P-gp, Top- II nm23 H1表达的意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 897-901
- 5 Casale F, D'Angelo V, Addeo R, Caraglia M, Crisci S, Rondelli R, Di Tullio MT, Indolfi P. P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2004; 12: 1201-1207
- 6 Surowiak P, Materna V, Matkowski R, Szczuraszek K, Kornafel J, Wojnar A, Pudelko M, Dietel M, Denkert C, Zabel M, Lage H. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R862-R870
- 7 Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 827-836
- 8 Zurita AJ, Diestra JE, Condom E, Garcia Del Muro X, Scheffer GL, Scheper RJ, Perez J, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA. Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. *Br J Cancer* 2003; 88: 879-886
- 9 王百林, 陈孝平, 翟淑萍. 肺耐药蛋白基因(lrp)与原发性和继发性肝癌化疗敏感性研究. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 568-569
- 10 Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, Alba A. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 183-191
- 11 李榕, 韩宝惠. 肺癌化疗中铂类药物耐药性检测的研究进展. *临床肿瘤学杂志* 2004; 9: 310-313
- 12 狄岩, 张明, 姜达. 肿瘤化疗多药耐药性的分子机制及其干预. *临床荟萃* 2005; 20: 476-478
- 13 Kitazono M, Okumura H, Ikeda R, Sumizawa T, Furukawa T, Nagayama S, Seto K, Aikou T, Akiyama S. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int J Cancer* 2001; 91: 126-131
- 14 王群英, 张振书, 马强. 大肠癌多药耐药性的逆转. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 822-825
- 15 Junker K, Gneist J, Melle C, Driesch D, Schubert J, Claussen U, Von Eggeling F. Identification of protein pattern in kidney cancer using ProteinChip arrays and bioinformatics. *Int J Mol Med* 2005; 15: 285-290
- 16 Wang H, Chen XP, Qiu FZ. Overcoming multi-drug resistance by anti-MDR1 ribozyme. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1444-1449
- 17 Shen LZ, Hua YB, Yu XM, Xu Q, Chen T, Wang JH, Wu WX. Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1060-1064

电编 李琪 编辑 张海宁

胰腺癌组织中 SKP2 和 P27 蛋白表达及其相互关系

杨竹林, 黄生福, 王群伟, 苗雄鹰, 梁珊

杨竹林, 黄生福, 王群伟, 苗雄鹰, 梁珊, 中南大学湘雅二医院肝胆胰疾病研究室 湖南省长沙市410011

通讯作者: 杨竹林, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝胆胰疾病研究室. yangzhuling@sina.com

电话: 13974830358

收稿日期: 2005-09-10

接受日期: 2005-09-30

Expression and correlations of S-phase kinase associated protein 2 and P27 protein in pancreatic cancer tissues: an analyses of 51 cases

Zhu-Lin Yang, Sheng-Fu Huang, Qun-Wei Wang, Xiong-Ying Miao, Shan Liang

Zhu-Lin Yang, Sheng-Fu Huang, Qun-Wei Wang, Xiong-Ying Miao, Shan Liang, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Zhu-Lin Yang, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. yangzhuling@sina.com

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

Abstract

AIM: To detect the expression of S-phase kinase associated protein 2 (SKP2) and P27 protein in human pancreatic ductal carcinoma and chronic pancreatitis, and to investigate the clinical significance and their correlations in the pancreatic ductal carcinoma.

METHODS: SP immunohistochemical method was used to detect the expression of SKP2 and P27 in the routinely paraffin-embedded sections of specimens from patients with pancreatic ductal carcinoma ($n = 51$) and chronic pancreatitis ($n = 10$).

RESULTS: The positive rate of SKP2 expression in the pancreatic ductal carcinoma (28/51, 54.9%) was significantly higher than that in the chronic pancreatitis (2/10, 20.0%, $P < 0.05$), while the rate of P27 was significantly lower [25/51(49.0%) vs 9/10(90.0%), $P < 0.05$]. The positive rates of SKP2 expression was significantly lower in the well-differentiated (7/20, 35.0%) and non-metastasis cases (5/16, 31.2%) than those in the poorly-differentiated (14/19, 73.7%) and metastasis ones (23/35, 65.7%) ($P < 0.05$), while the rate of P27 expression

was significantly higher in the well-differentiated (13/20, 65.0%) and non-metastasis cases (12/16, 75.0%) than those in the poorly-differentiated (6/19, 31.5%) and metastasis ones (13/35, 37.1%) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of SKP2 and P27 were closely correlated in the pancreatic ductal carcinoma tissue ($\chi^2 = 14.33$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: SKP2 and P27 are important biological markers for reflecting the carcinogenesis, progression, and prognosis of pancreatic ductal carcinoma. The positive expression of SKP2 or the negative expression of P27 reveals more serious status of the illness, the tendency of metastasis and unfavorable prognosis. There may be a co-regulatory relationship between SKP2 and P27 expression.

Key Words: Pancreatic carcinoma; S-phase kinase-associated protein 2; P27 protein; Immunohistochemistry

Yang ZL, Huang SF, Wang QW, Miao XY, Liang S. Expression and correlations of S-phase kinase associated protein 2 and P27 protein in pancreatic cancer tissues: an analyses of 51 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2717-2719

摘要

目的: 研究胰腺导管癌和慢性胰腺炎组织中(S期激酶相关蛋白-2)SKP2和P27表达, 探讨其临床病理意义及两者在胰腺导管癌中表达的相互关系。

方法: 51例胰腺导管癌和10例慢性胰腺炎手术切除标本常规制作石蜡包埋切片, SKP2和P27染色方法为SP免疫组化法。

结果: 51例胰腺导管癌SKP2阳性表达28例 (54.9%) 和P27阳性表达25例 (49.0%), 10例慢性胰腺炎SKP2阳性2例(20.0%)和P27阳性9例(90.0%), 两者之间均存在显著差异($P < 0.05$), 高分化腺癌(7/20, 35.0%)和未转移(5/16, 31.2%)病例SKP2表达阳性率明显低于低分化腺癌(14/19, 73.7%)和转移(23/35, 65.7%)病例, 均存在显著差异($P < 0.05$); 高分化腺癌(13/20, 65.0%)和未转移(12/16, 75.0%)病例P27表达阳性率明显高于低分化腺癌(6/19, 31.5%)和转移(13/35, 37.1%)病例, 有显著或高度显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。SKP2和P27在胰腺导管癌中表达呈密切相关($\chi^2 = 14.33$, $P < 0.01$)。

结论: SKP2和P27表达是反映胰腺导管癌发生、发展及预后的重要生物学标记物, SKP2阳性表达或P27阴性表达者恶性度高、易发生转移及预后不良, 且两者表达存在相互调控作用。

关键词: 胰腺肿瘤; S期激酶相关蛋白-2; P27蛋白; 免疫组织化学

杨竹林, 黄生福, 王群伟, 苗雄鹰, 梁珊. 胰腺癌组织中SKP2和P27表达及其相互关系. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2717-2719

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2717.asp>

0 引言

S期激酶相关蛋白-2(SK P2)属于F-box蛋白家族成员, 可与cyclinA-CDK复合体相互作用, 是细胞G1期向S期转化所必需^[1]. 新近研究发现SK P2表达与多种恶性肿瘤发生、发展及预后密切相关^[1-6]. P27蛋白, 又称激酶抑制蛋白1(Kip1), 是能够结合cyclin-CDK2复合体的一种多肽分子^[7-8]. 近年研究发现P27表达状况也与多种恶性肿瘤发生、发展及预后密切相关^[4,8-12]. 在许多恶性肿瘤中SK P2和P27表达呈密切负相关^[13-16]. 我们应用免疫组化方法研究人类胰腺导管癌和慢性胰腺炎组织中SK P2和P27表达特征, 探讨其临床病理意义及在胰腺癌表达中的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我院及湘雅医院胰腺癌手术切除标本51例, 男38例, 女13例, 年龄21-73(51±17)岁; 均为胰腺导管腺癌, 包括高分化腺癌20例, 中分化腺癌12例和低分化腺癌19例; 临床和(或)病理证实发生胰腺外转移(包括区域淋巴结、网膜、邻近组织器官等)35例(68.6%). 另收集我院慢性胰腺炎手术切除标本10例, 男7例, 女3例, 年龄35-55(44±10)岁. 标本经40 g/L甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片, 切片厚4 μm. HE染色复述病理组织学特征, 其他切片行SP免疫组化染色. 鼠抗人SK P2和P27单克隆抗体, 鼠SP试剂盒及DAB-HCL显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法 SK P2和P27表达染色均为常规SP免疫组化法, 细胞质内出现明显棕黄色颗粒者为阳性细胞, 以切片中阳性细胞率≥25%为阳性病例, <25%为阴性病例^[17-19]. 以北京中杉金桥生物公司提供的阳性切片作为阳性对照, 以0.01 mol/L PBS液(pH7.4)替代一抗作为每次染色的阴性或替代对照。

统计学处理 采用SPSS10.0软件包进行 χ^2 检验或Fishers精确概率法, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

SK P2和P27免疫反应阳性物质定位于细胞质, 偶见细胞核着色, 两者在癌组织中分布呈较明显异质性, 同一切片不同视野阳性细胞率及着色程度可有较明显不同. 胰腺

表1 SK P2和P27表达与胰腺癌分化程度和转移状况的关系

特征	n	SK P2阳性 (%)	P27阳性 (%)
高分化	20	7 (35.0)	13 (65.0)
中分化	12	7 (58.3)	6 (50.0)
低分化	19	14 (73.7) ^a	6 (31.5) ^a
无转移	16	5 (31.2)	12 (75.0)
有转移	35	23 (65.7) ^a	13 (37.1) ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 高分化或无转移

癌51例SK P2和P27阳性病例分别为28例(54.9%)和25例(49.0%), 慢性胰腺炎10例SK P2和P27阳性病例分别为2例(20.0%)和9例(90.0%), 胰腺癌SK P2阳性率明显高于慢性胰腺炎($P < 0.05$), 而胰腺癌P27阳性率明显低于慢性胰腺炎($P < 0.05$); SK P2阳性和(或)P27阳性慢性胰腺炎导管上皮均呈中至重度不典型增生. 高分化腺癌和未转移病例SK P2阳性率均明显低于低分化腺癌和转移病例($P < 0.05$), 而高分化腺癌和未转移病例P27阳性率均明显高于低分化腺癌和转移病例($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表1). SK P2和P27表达与胰腺癌患者年龄、性别及就诊前病程等其他临床病理特征均无明显关系($P > 0.05$). 28例SK P2阳性胰腺癌病例中P27阳性7例(阳性符合率25.0%), 23例SK P2阴性病例中P27阴性5例(阴性符合率21.7%), 两者表达呈密切负相关($\chi^2 = 14.33$, $P < 0.01$).

3 讨论

SK P2可与细胞周期素A-细胞周期素依赖性激酶2复合体相互作用, 调控细胞G1-S转化^[1]. 在正常组织中, 脾、扁桃体、胎盘和结肠等组织呈阳性表达, 但未发现在正常胰腺导管上皮及腺泡细胞中表达. 新近, 研究发现SK P2在恶性肿瘤中表达广泛, 如胃癌、肠癌、肝癌、肺癌、乳腺癌及前列腺癌等, 而其相应正常组织除结肠黏膜外多呈阴性表达^[1-6, 11, 13-18]. 进一步研究发现SK P2表达与大多数恶性肿瘤发生、进展、转移及预后密切相关, 与阴性恶性肿瘤比较, 阳性表达者进展快, 易发生转移和复发及预后差^[2,4, 6, 11, 17-29]. 本组资料发现胰腺导管癌SK P2表达阳性率明显高于慢性胰腺炎, 2例慢性胰腺炎阳性病例导管上皮呈中度和重度不典型增生各1例; 高分化和未转移胰腺导管癌SK P2阳性率明显低于低分化腺癌和转移病例. 其结果与国外文献报道较一致, 提示SK P2表达与胰腺导管癌发生、进展、转移及预后密切相关, 阳性表达者恶性度高和易发生转移, SK P2可能是评估胰腺导管癌预后的重要生物学标记物。

P27为一种参与细胞周期调控的重要抑癌基因, 它通过调定活化细胞周期素依赖性激酶2所需的细胞周期素E的阈值来抑制细胞增殖, 是一种细胞周期调节因子. 近年研究发现P27表达水平与恶性肿瘤发生及预后密切相关, 如胃癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌等^[4, 7-18]. 免疫组化和原位杂交研究发现部分恶性肿瘤P27及其mRNA呈阴性

表达, 而其相应正常组织及其良性病例P27多呈阳性表达, 且阴性表达的恶性肿瘤进展快、易发生转移和复发及预后差^[4, 7-14, 16-18, 21-23, 27, 29-30]. 本组资料发现胰腺导管癌P27表达阳性率明显低于慢性胰腺炎, 1例阴性表达慢性胰腺炎导管上皮呈重度不典型增生; 高分化和未转移病例P27表达阳性率明显高于低分化和转移病例. 提示P27阳性表达的胰腺导管癌多恶性度低和不易发生转移, P27表达可能是反映胰腺导管癌发生、进展、生物学行为和预后的重要生物学标记物.

国外大多数学者研究发现恶性肿瘤SKP2和P27表达水平呈密切负相关, 认为其机制与两者生物学作用有关, 两者从相反方面调控细胞周期素激酶活性^[13-16, 29]. 本组资料发现胰腺导管癌中两者表达呈高度不一致性, 也提示存在着密切负相关.

4 参考文献

- 1 Harada K, Supriatno, Kawashima Y, Itashiki Y, Yoshida H, Sato M. Down-regulation of S-phase kinase associated protein 2 (Skp2) induces apoptosis in oral cancer cells. *Oral Oncol* 2005; 41: 623-630
- 2 Oliveira AM, Okuno SH, Nascimento AG, Lloyd RV. Skp2 protein expression in soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2003; 21: 722-727
- 3 Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. S-phase kinase-associated protein 2 expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications. *Oncol Rep* 2003; 10: 321-325
- 4 Fernandez-Figueras MT, Puig L, Musulen E, Gilaberte M, Ferrandiz C, Lerma E, Ariza A. Prognostic significance of p27Kip1, p45Skp2 and Ki67 expression profiles in Merkel cell carcinoma, extracutaneous small cell carcinoma, and cutaneous squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2005; 46: 614-621
- 5 Radke S, Pirkmaier A, Germain D. Differential expression of the F-box proteins Skp2 and Skp2B in breast cancer. *Oncogene* 2005; 24: 3448-3458
- 6 Takanami I. The prognostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 727-731
- 7 Tigli H, Buyru N, Dalay N. Molecular analysis of the p27/kip1 gene in breast cancer. *Mol Diagn* 2005; 9: 17-21
- 8 Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Chimienti E, Berton S, Lovat F, Colombatti A, Baldassarre G. p27(kip1) functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1589-1605
- 9 Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Kitagawa M, Miyauchi M, Takata T. Small interfering RNA targeting of S phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell growth of oral cancer cells by inhibiting p27 degradation. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 471-476
- 10 Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E, Pezzullo L, Palombini L, Fusco A, Viglietto G. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol* 2005; 166: 737-749
- 11 Woenckhaus C, Maile S, Uffmann S, Bansemir M, Dittberner T, Poetsch M, Giebel J. Expression of Skp2 and p27KIP1 in naevi and malignant melanoma of the skin and its relation to clinical outcome. *Histol Histopathol* 2005; 20: 501-508
- 12 Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41: 105-116
- 13 Li Q, Murphy M, Ross J, Sheehan C, Carlson JA. Skp2 and p27kip1 expression in melanocytic nevi and melanoma: an inverse relationship. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 633-642
- 14 Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H. Inverse correlation between expression levels of p27 and the ubiquitin ligase subunit Skp2 in early esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 777-783
- 15 Pagano M. Control of DNA synthesis and mitosis by the Skp2-p27-Cdk1/2 axis. *Mol Cell* 2004; 14: 414-416
- 16 Shintani S, Li C, Mihara M, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Skp2 and Jab1 expression are associated with inverse expression of p27(KIP1) and poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oncology* 2003; 65: 355-362
- 17 Goto A, Niki T, Moriyama S, Funata N, Moriyama H, Nishimura Y, Tsuchida R, Kato JY, Fukayama M. Immunohistochemical study of Skp2 and Jab1, two key molecules in the degradation of P27, in lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2004; 54: 675-681
- 18 Langner C, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. Expression of p27 and its ubiquitin ligase subunit Skp2 in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2004; 64: 611-616
- 19 Shigemasa K, Gu L, O'Brien TJ, Ohama K. Skp2 overexpression is a prognostic factor in patients with ovarian adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1756-1763
- 20 Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Herskho DD. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1336-1346
- 21 Sanada T, Yokoi S, Arii S, Yasui K, Imoto I, Inazawa J. Skp2 overexpression is a p27Kip1-independent predictor of poor prognosis in patients with biliary tract cancers. *Cancer Sci* 2004; 95: 969-976
- 22 Kitajima S, Kudo Y, Ogawa I, Bashir T, Kitagawa M, Miyauchi M, Pagano M, Takata T. Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation. *Am J Pathol* 2004; 165: 2147-2155
- 23 Lahav-Baratz S, Ben-Izhak O, Sabo E, Ben-Eliezer S, Lavie O, Ishai D, Ciechanover A, Dirnfeld M. Decreased level of the cell cycle regulator p27 and increased level of its ubiquitin ligase Skp2 in endometrial carcinoma but not in normal secretory or in hyperstimulated endometrium. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 567-572
- 24 Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am J Pathol* 2004; 165: 175-180
- 25 Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, Beauchamp RD, Ishida T, Kuriyama S, Imaida K. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2004; 25: 87-95
- 26 Seki R, Okamura T, Koga H, Yakushiji K, Hashiguchi M, Yoshimoto K, Ogata H, Imamura R, Nakashima Y, Kage M, Ueno T, Sata M. Prognostic significance of the F-box protein Skp2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 73: 230-235
- 27 Down SE, Scott A, Mukherjee G, Stanley MA. Overexpression of Skp2 in carcinoma of the cervix does not correlate inversely with p27 expression. *Int J Cancer* 2003; 105: 326-330
- 28 Shim EH, Johnson L, Noh HL, Kim YJ, Sun H, Zeiss C, Zhang H. Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res* 2003; 63: 1583-1588
- 29 Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y, Nishiyama K, Imamura M, Yamada T, Nawata H, Tsuneyoshi M. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol* 2005; 36: 828-837
- 30 Auerkari EI. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol* 2005; 42: 4-12

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!

蔡威 教授

上海第二医科大学附属新华医院

唐承薇 教授

四川大学华西医院

陈海龙 教授

大连医科大学附属第一医院

王鲁 副主任医师

上海复旦大学附属中山医院肝外科肝癌研究所

陈立波 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

王庆国 教授

北京中医药大学

程明亮 教授

贵阳医学院附属医院

王兴鹏 教授

复旦大学第一临床医学院

房殿春 教授

第三军医大学西南医院消化内科

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

高春芳 教授

上海市第二军医大学附属长征医院全军医学免疫中心

许玲 副教授

第二军医大学长征医院中医科

江学良 副主任医师

第二军医大学长海医院消化科

严律南 教授

华西医科大学附属第一医院

刘连新 教授

哈尔滨医科大学附属第一医院普通外科

于聪慧 副主任医师

北京军区总医院肝胆外科

吕宁 主任医师

中国医学科学院肿瘤研究所

岳茂兴 教授

北京解放军第306医院(总装备部总医院)普通外科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

张锦生 教授

上海复旦大学上海医学院病理学系

石统东 副教授

重医附属二院肝炎所感染病科

张万岱 教授

第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

宋振顺 教授

第四军医大学西京医院肝胆外科

张宗明 教授

清华大学第一医院院长办公室