

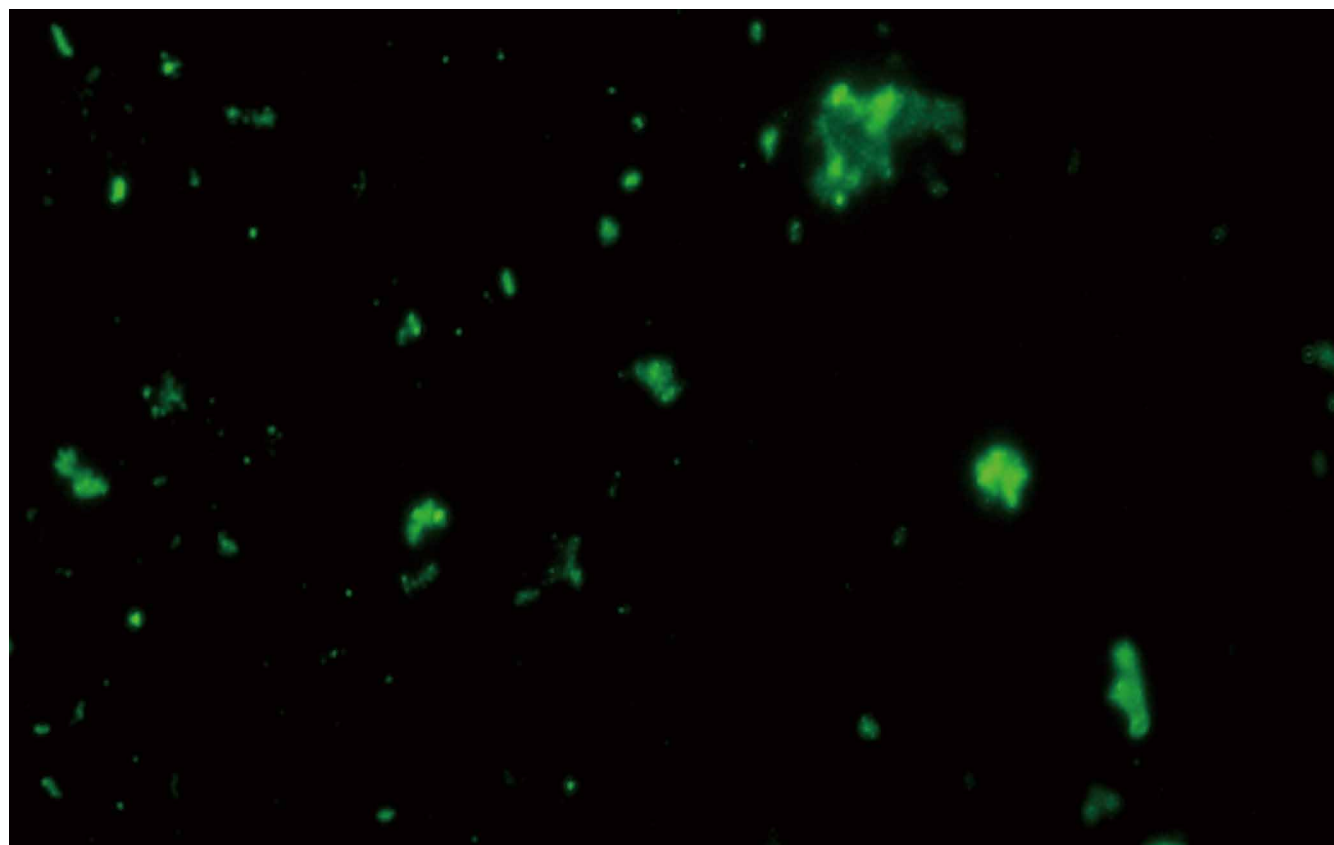
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2011 年 10 月 28 日 第 19 卷 第 30 期 (Volume 19 Number 30)**



**30/2011**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊,是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
黄象谦教授  
黄志强教授  
王宝恩教授  
危北海研究员  
吴孟超教授  
杨春波教授  
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

纪小龙教授  
姜洪池教授  
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  
岳茂兴教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 常务编委

程英升教授  
范学工教授  
高毅主任医师  
江学良主任医师  
李岩教授  
刘连新教授  
吕宾教授  
罗和生教授  
聂青和教授  
王小众教授

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
栾新明教授  
陈国忠副主任医师  
陈洪刚教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
崔立红教授

邓长生教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
何松教授  
洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
霍丽娟教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
廖家智副主任医师  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
马红主任医师  
马欣主任医师  
毛高平教授

孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
邹晓平主任医师  
诸琦教授  
于珮主任医师

#### 消化外科学

白雪巍副主任医师

蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凇教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
杜成友教授  
杜顺达副主任医师  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高成新教授  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
郝立强副教授  
何超教授  
何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
姜卫东教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
金山副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师

李杰教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李小荣教授  
李旭副教授  
李永翔主任医师  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
卢实春教授  
陆才德教授  
陆云飞教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
仇毓东副教授  
袁正军教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤恢焕教授  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪教授  
徐洪副教授  
徐洪副教授  
徐允良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨维良教授  
杨银学教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
赵刚副教授

智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
高润平教授  
高泽立副教授  
高志良主任医师  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郝春秋副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师  
林菊生教授  
刘正稳教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

### 消化中医药学

蔡淦教授

陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
龙致贤教授  
南极星教授  
牛英才研究员  
沈洪教授  
司富春教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
徐庆教授  
袁红霞研究员  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰教授  
曹志成院士  
陈公琰主任医师  
陈克能教授  
代智副研究员  
华海清教授  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
秦叔逵教授  
沈克平主任医师  
王阁教授  
向德兵副教授  
肖文华主任医师  
谢丹教授  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
胡红杰主任医师  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师

倪才方教授  
施海彬教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐辉雄教授  
徐克教授  
严惟力副教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授  
吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
杨钦河教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
曹师承教授  
陈敬贤教授  
陈秋生教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授  
黄园教授  
李东辉教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李君文研究员  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授

梅林教授  
钱其军研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
任晓峰副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田文静副教授  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福副研究员  
吴道澄教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赓宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授  
周晓东研究员  
周晓武副主任医师  
朱进霞教授

### 消化病理学

杜祥教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
吕宁主任医师  
马大烈教授  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
孙伟副研究员  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵春玲副教授  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年10月28日 第19卷 第30期 (总第362期)

## 述 评

3111 Peutz-Jeghers综合征的诊治进展和预防性治疗

魏学明, 顾国利, 徐丽梅, 毛高平, 王石林

## 基 础 研 究

3117 一种用于HCV核心蛋白体外表达研究的CHO细胞模型的建立

薛宏丽, 冯国和

3122 P-selectin、IVAM-1、ICAM-1在大鼠重症急性胰腺炎并发急性心肌损害中的作用机制

范辉, 王小红, 沈云志

## 临 床 研 究

3130 人类MMP3基因5'端转录调控区rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系

陈清波, 高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 姚品芳, 王立东, 李劲

## 文 献 综 述

3137 EZH2在肝癌发生发展中的功能研究进展

张莹莹, 周晓巍, 黄培堂

3143 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展

曹秀红, 张学彦, 张晓娜

## 研 究 快 报

3149 姜黄素抑制STAT3信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响

杨芳, 赵秋, 王渝, 马松林, 龚勇

3154 有机阴离子转运肽oatp4a1与脾主运化本质的关系

孙保国, 陈泽雄, 张诗军, 项婷, 陈肖霖, 罗纯

## 临 床 经 验

3159 Klotho基因在胃癌组织中的表达及意义

黄曙, 汤小伟, 林洁, 范志宁, 季国忠

3163 转录抑制因子ZHX2在胃癌组织中的表达及临床意义

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶, 孙忠亮

3168 CDX2与DNMT1在胃癌组织中的mRNA表达及临床意义

张健锋, 李增丽, 丁伟峰, 蒋伟, 张弘, 毛振彪

3172 EB病毒感染与血管生成在胃癌组织芯片中的关系

何影娟, 白光辉, 郭云娣

3177 房颤导致肠系膜上动脉栓塞的综合介入治疗的应用价值

邓梨平, 张宏文, 邓小军, 段诗娇, 谢卫华, 肖燕

3182 食物不耐受与炎症性肠病

杨旭, 章金春, 李梅, 丁义江, 张苏闽

3186 8 d与10 d序贯疗法根除幽门螺杆菌的疗效比较

张杰, 段和力, 汪海涛

## 病 例 报 告

3190 隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎1例

赵可, 彭德银, 邸雅南, 李丽坤, 张波, 吴昱美, 于丽利, 李文杰

附 录	3194 《世界华人消化杂志》投稿须知 3199 2011年国内国际会议预告
志 谢	3200 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3116 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 3136 《世界华人消化杂志》外文字符标准 3148 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 3162 WJG总被引频次排名位于第174名 3167 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3176 《世界华人消化杂志》参考文献要求 3181 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录 3189 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 3193 WJG成功通过评审被PMC收录
封面故事	薛宏丽, 冯国和. 一种用于HCV核心蛋白体外表达研究的CHO细胞模型的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3117-3121 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3117.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3117.asp</a>
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-10-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p><b>编辑</b> 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 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 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)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 <b>ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)</b> 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56.00元 全年1616.00元 1401004000050</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com">www.wjgnet.com</a></p>		



# World Chinese Journal of Digestology

## October 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 30

<b>EDITORIAL</b>	3111 Advances in the prevention, diagnosis and treatment of Peutz-Jeghers syndrome <i>Wei XM, Gu GL, Xu LM, Mao GP, Wang SL</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	3117 Establishment of a CHO cell model expressing hepatitis C virus core protein <i>in vitro</i> <i>Xue HL, Feng GH</i> 3122 Expression of P-selectin, IVAM-1 and ICAM-1 genes in acute myocardial damage secondary to severe acute pancreatitis in rats <i>Fan H, Wang XH, Shen YZ</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	3130 Association of the rs522616 single nucleotide polymorphism in the 5'-transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma <i>Chen QB, Gao WQ, Deng ZF, Ou YG, Hu WJ, Liu Y, Yao PF, Wang LD, Li J</i>
<b>REVIEW</b>	3137 Progress in understanding the role of EZH2 in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma <i>Zhang YY, Zhou XW, Huang PT</i> 3143 Progress in understanding the role of interleukins in the pathogenesis of ulcerative colitis <i>Cao XH, Zhang XY, Zhang XN</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	3149 Curcumin suppresses proliferation of pancreatic carcinoma cells by inhibiting the STAT3 signal pathway <i>Yang F, Zhao Q, Wang Y, Ma SL, Gong Y</i> 3154 Relationship between organic anion transporter peptide-4a1 and nature of spleen governing transportation and transformation <i>Sun BG, Chen ZX, Zhang SJ, Xiang T, Chen XL, Luo C</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	3159 Clinical significance of expression of Klotho in gastric cancer <i>Huang S, Tang XW, Lin J, Fan ZN, Ji GZ</i> 3163 Clinical significance of ZHX2 protein expression in gastric carcinoma <i>Chen QJ, Lv ZL, Dang YW, Wei JJ, Sun ZL</i> 3168 Expression of CDX2 and DNMT1 mRNAs in human gastric cancer <i>Zhang JF, Li ZL, Ding WF, Jiang W, Zhang H, Mao ZB</i> 3172 Correlation between Epstein-Barr virus infection and tumor angiogenesis in patients with gastric carcinoma <i>He YJ, Bai GH, Guo YD</i> 3177 Clinical value of comprehensive intervention in the management of superior mesenteric artery embolism caused by atrial fibrillation <i>Deng LP, Zhang HW, Deng XJ, Duan SJ, Xie WH, Xiao Y</i> 3182 Food intolerance and inflammatory bowel disease <i>Yang X, Zhang JC, Li M, Ding YJ, Zhang SM</i> 3186 Efficacy of 8-day versus 10-day sequential therapy for <i>Helicobacter pylori</i> eradication <i>Zhang J, Duan HL, Wang HT</i>

<b>CASE REPORT</b>	3190 Cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis: A report of one case and review of the literature <i>Zhao K, Peng DY, Di YN, Li LK, Zhang B, Wu YM, Yu LL, Li WJ</i>
<b>APPENDIX</b>	3194 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 3199 Meeting events calendar in 2011
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	3200 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<i>Xue HL, Feng GH.</i> Establishment of a CHO cell model expressing hepatitis C virus core protein <i>in vitro</i> . Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(30): 3117-3121 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3117.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3117.asp</a>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** October 28, 2011

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

### SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center  
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,  
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

### EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Telephone: +86-351-4078656  
E-mail: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Telephone: +86-351-4078656  
E-mail: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)  
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue  
RMB 2016 Yuan for one year

### CSSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

### COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at [www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp](http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp). If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

# Peutz-Jeghers综合征的诊治进展和预防性治疗

魏学明, 顾国利, 徐丽梅, 毛高平, 王石林

魏学明, 顾国利, 王石林, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100142

徐丽梅, 中国人民解放军空军总医院康复科 北京市 100142  
毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100142

顾国利, 硕士研究生导师, 外科学硕士, 副主任医师, 中国人民解放军空军军医进修学院外科学教研室副主任, 主要从事遗传性结直肠肿瘤的临床和基础研究。

作者贡献分布: 魏学明与顾国利对此文的贡献均等; 本文由魏学明、顾国利及毛高平共同设计; 魏学明与顾国利负责外科诊治和论文撰写; 毛高平负责小肠镜诊治; 徐丽梅负责中药治疗; 王石林审校。

通讯作者: 顾国利, 副主任医师, 100142, 北京市, 中国人民解放军空军总医院普通外科, kzggl@163.com

电话: 010-68410099-6302

收稿日期: 2011-09-07 修回日期: 2011-10-26

接受日期: 2011-10-27 在线出版日期: 2011-10-28

## Advances in the prevention, diagnosis and treatment of Peutz-Jeghers syndrome

Xue-Ming Wei, Guo-Li Gu, Li-Mei Xu, Gao-Ping Mao, Shi-Lin Wang

Xue-Ming Wei, Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Li-Mei Xu, Department of Rehabilitation, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Gao-Ping Mao, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Correspondence to: Guo-Li Gu, Department of General Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China. kzggl@163.com

Received: 2011-09-07 Revised: 2011-10-26

Accepted: 2011-10-27 Published online: 2011-10-28

## Abstract

Peutz-Jeghers syndrome (PJS) is an autosomal dominant inherited disease caused by inactivating germline mutations of the LKB1/STK11 gene and characterized by mucocutaneous pigmentation, multiple gastrointestinal hamartomatous polyps and family history. Life-threatening complications include intestinal obstruction and an increased risk for developing gastrointestinal malignancies and extraintestinal cancers. Surgery and endoscopic therapy are still main ways to manage gastrointestinal polyposis in PJS patients, and double-balloon enteroscopy has important clinical significance in the diagnosis

and treatment of this disease. With the development of translational medicine, molecular targeted therapy (e.g., selective COX-2 inhibitors) brings a new approach to preventive treatment of gastrointestinal polyposis in PJS patients. Traditional Chinese medicine provides an alternative choice. In this paper, we review the recent advances in the prevention, diagnosis and treatment of PJS.

**Key Words:** Peutz-Jeghers syndrome; Gastrointestinal polyposis; Therapy; Diagnosis; Translational medicine

Wei XM, Gu GL, Xu LM, Mao GP, Wang SL. Advances in the prevention, diagnosis and treatment of Peutz-Jeghers syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3111-3116

## 摘要

Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)以皮肤黏膜色素斑、胃肠道错构瘤息肉和遗传性为临床特征。PJS胃肠道息肉可产生梗阻、出血、套叠、恶变等严重并发症, 目前其临床治疗以手术和内镜治疗为主, 其中双气囊电子小肠镜对于PJS胃肠道息肉的诊断和治疗具有重要的临床意义。随着转化医学的进步, 分子靶向治疗为PJS胃肠道息肉带来预防性治疗的新途径, 其代表就是环氧合酶-2的选择性抑制剂。而以“济生乌梅丸”为代表的中药也为PJS息肉的预防性治疗提供另一个选择。本文在总结近年来国内外学者在PJS研究中所取得的共识与进展的基础上, 结合自身经验, 提出了PJS胃肠道息肉的中西医结合综合治疗设想, 以期提高临床医生对PJS胃肠道息肉的诊治能力, 从而使PJS患者能得到最大的临床获益。

**关键词:** Peutz-Jeghers综合征; 胃肠道息肉; 治疗; 诊断; 转化医学

魏学明, 顾国利, 徐丽梅, 毛高平, 王石林. Peutz-Jeghers综合征的诊治进展和预防性治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19(30): 3111-3116

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3111.asp>

## ■背景资料

Peutz-Jeghers综合征(PJS)是一种由LKB1/STK11突变而引起的常染色体显性遗传性疾病, 其主要临床特点是胃肠道错构瘤息肉、皮肤黏膜色素斑和家族遗传性。本病好发于青少年, 胃肠道息肉可继发肠梗阻、肠套叠、出血、恶变等严重并发症, 造成患者反复住院、多次手术、最终恶变的悲惨命运, 对患者及其家庭、乃至社会的危害巨大。

## ■同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科; 傅华群, 教授, 南昌大学第二附属医院普外科



## ■创新盘点

本文在总结国内外基础研究进展基础上,结合自身诊治PJS胃肠道息肉的经验,将转化医学理念应用于PJS胃肠道息肉的临床诊治,勾画出了PJS胃肠道息肉的临床综合性治疗体系,逻辑清晰,指出了PJS胃肠道息肉治疗的方向和目标。

## 0 引言

Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)是一种由LKB1/STK11胚系突变引起的、以皮肤黏膜黑斑和胃肠道错构瘤息肉为特征的常染色体显性遗传病<sup>[1-3]</sup>。黑斑一般无需特殊治疗;而胃肠道息肉可继发出血、梗阻、肠套叠、恶变等多种严重并发症,且具有发病年龄早、诊治困难、病程迁延的特点<sup>[4-6]</sup>。对患者及其家庭的危害极大。目前,针对PJS胃肠道息肉尚无临床诊治规范。本文在总结近年来国内外学者在PJS研究中所取得进展的基础上,结合自身临床诊治经验;提出了PJS胃肠道息肉的综合治疗模式和中西医结合的预防性治疗设想,以期提高临床医生对PJS胃肠道息肉的诊治能力,从而使PJS患者得到最大的临床获益。

## 1 诊断

2003年全国遗传性大肠癌协作组制定的PJS的诊断标准<sup>[7]</sup>为:胃肠道多发错构瘤性息肉伴皮肤黏膜色素沉着,可有或无家族史。被诊断为PJS者应进行LKB1/STK11和(或)FHIT基因的检测。因此,典型PJS病例的临床诊断并不困难;但如不熟悉PJS的临床病理特点、不重视家族史的调查,仍可造成漏诊。

1.1 病史 约有60%的PJS患者有明确或可疑家族史,但部分PJS病例可出现隔代遗传现象,真正散发性PJS非常罕见<sup>[8]</sup>。因此,当面对疑似PJS病例时,除注意调查其父母发病情况外,也应注意调查其祖父母、外祖父母有无PJS病例。目前,我国家庭规模趋于小型化,家庭成员的数目减少将使PJS的遗传表现更加隐匿。

### 1.2 症状、体征

1.2.1 PJS黑斑: PJS黑斑一般在幼儿期即发生<sup>[9]</sup>,但随着年龄增长、多数在青春后期趋向于消失或变淡。所以一部分成年PJS病例可能无法找到黑斑。对于此类病例的诊断不要拘泥于是否存在黑斑,而应依赖于息肉的错构瘤病理类型和家族史。

1.2.2 PJS胃肠道息肉: PJS胃肠道息肉最好发于空肠上段,具有数目多、大小不一、全胃肠道分布的特点<sup>[10]</sup>,可引起急慢性腹痛、肠套叠、肠扭转、肠梗阻、胃肠道出血等并发症;其临床表现复杂多变,其中以小肠套叠最常见<sup>[11]</sup>。另外, PJS还可伴发乳腺癌、胰腺癌、女性生殖系统肿瘤、睾丸支持细胞瘤、神经节胶质瘤等肠外肿瘤。而且这些肠外肿瘤可作为PJS的首发表

现<sup>[12]</sup>。因此,临床上当遇到上述PJS相关肿瘤患者时,应警惕其是否为PJS的可能。

1.3 辅助检查 PJS胃肠道息肉最好发于空肠上段,这是传统内镜检查的盲区。因此,传统内镜和影像学检查对于PJS的诊断意义有限,而胶囊内镜和电子小肠镜则优势明显。

1.3.1 胶囊内镜: 胶囊内镜可检查胃肠道全程,具有操作方便、无创性、容易耐受、无需镇静剂的优点。但也存在肠道洁净度依赖度高、设备及检查费用昂贵、无法取活检及镜下治疗、拍照没有针对性和选择性、电池工作时间短等的缺点<sup>[13-15]</sup>。另外,不宜对有梗阻倾向的病例实施胶囊内镜检查,因其可能无法通过不全梗阻处,反而加重梗阻,最终需手术或电子小肠镜才能取出胶囊内镜。我院就曾诊治过一例在外院行胶囊内镜检查而堵塞在小肠梗阻处的病例,最终在电子小肠镜下取出,而免于开腹手术。

1.3.2 双气囊电子小肠镜: 双气囊电子小肠镜(DBE)具有创伤小、安全性高、可重复检查治疗、效果确切的优点<sup>[16-18]</sup>。经口和经肛门DBE对接检查可以检查胃肠道全程,并可取活检及进行镜下息肉圈套灼除等治疗。但其也存在操作复杂费时、需进行静脉麻醉、设备和检查费用昂贵等缺点。

1.4 鉴别诊断 临床上, PJS需与Cronkhite-Canada综合征(Cronkhite-Canada syndrome, CCS)相鉴别。CCS发病晚,是一种获得性、非遗传性疾病,可能与感染、缺乏生长因子、砷中毒有关,精神紧张、过度劳累也是其高危因素<sup>[19,20]</sup>。CCS除了胃肠道息肉和黏膜色素沉着表现外,还有脱发、指(趾)甲萎缩脱落的特征性表现。

## 2 治疗

目前, PJS胃肠道息肉的临床治疗仍以手术为主,辅以内镜治疗。但PJS的病因是LKB1/STK11胚系突变,手术和内镜治疗只能毁损致病基因的靶器官,都只是一种被动和局部的治疗手段<sup>[21]</sup>;无法达到病因治疗。如何提前预防、延缓息肉生长及恶变、甚至消灭息肉这才是PJS胃肠道息肉的科研方向和临床目标。目前临床上尚无法开展基因治疗,但PJS胃肠道息肉发生→发展→恶变→转移的生物学过程需要很长的时间,多种细胞因子、酶等参与其中<sup>[22]</sup>。如果能在其发生发展过程中加以阻断或抑制,就可以达到抑制息肉形成、延缓其发展的作用;分子靶向药物是其主要代表<sup>[23-25]</sup>。而中药也因其不良反应小、价

廉易制等优点而受到广大PJS患者的青睐。因此, 中西医结合的综合治疗(分子靶向药物+中药)有可能为PJS胃肠道息肉的治疗开辟预防性途径。

## 2.1 局部治疗

**2.1.1 内镜治疗:** 内镜下治疗虽是局部治疗手段, 但可使部分患者延长手术的间隔时间, 甚至避免开腹手术, 所以也具有重要的临床意义。DBE对于PJS胃肠道息肉的诊治具有非常大的优势<sup>[16]</sup>。内镜还可对手术进行辅助配合; 术前内镜检查有助于了解息肉的范围、大小以及对是否需要外科处理做出初步评价, 对于小息肉、细蒂息肉可采用内镜下电灼烧除或圈套摘除。术中内镜检查可了解外科手术探查的“盲区”(如十二指肠水平部)有无息肉、是否梗阻、有无癌变(通过肉眼观察和活检); 同时可对确定肠管切开口位进行指导; 对小息肉进行镜下处理(但可能延长手术时间)。术后内镜检查一般在术后3-6 mo内进行, 对小息肉进一步处理、了解有无新发病灶并及时处理。

**2.1.2 手术治疗:** 目前, 开腹及腹腔镜手术主要是针对由息肉引起的肠梗阻、套叠、出血、恶变等并发症。基于微创和最大限度保留肠管的治疗原则, 术中应注意以下问题<sup>[5]</sup>: (1)处理肠套叠时不能强拉硬拽以免肠管断裂, 应逐步将套叠的肠管从套叠的鞘中挤出, 这样可减少肠管的切除; (2)PJS息肉大多有细长的蒂, 距离切口10-15 cm范围内的息肉都可从一个切口中牵出或挤出。因此, 手术时应计划的做切口, 小肠切口要小, 尽可能减少肠道切口, 摘除息肉后应及时修补切口, 以免遗漏而造成医源性肠瘘; (3)较大的息肉有其独立的滋养血管, 摘除时应注意在基底部彻底缝扎止血, 以免术后继发出血; (4)病变密集的肠段可选择肠段部分切除, 切缘无息肉即可, 不必切除过多肠管。对已恶变的息肉则按照肠癌的原则进行处理。

**2.2 预防性治疗** 基础研究的深入和制药技术的进步使预防性治疗PJS胃肠道息肉成为可能, 这也是转化医学应用于PJS胃肠道息肉治疗的体现。相关预防性药物目前在临床上治疗PJS胃肠道息肉虽然尚属起步阶段, 但其应用前景却光明而广阔。这有可能为PJS胃肠道息肉开辟预防性治疗的新途径。

**2.2.1 分子靶向治疗:** 分子靶向治疗具有特异性强、效果显著、基本不损伤正常组织的优点。目前, 针对PJS的分子靶向药物已开始应用于临床。代表有以下几类: (1)选择性环氧合酶-2抑制

剂: 环氧合酶(COX)是前列腺素合成过程中的限速酶。人体中COX-2在炎症细胞因子、肿瘤促进因子、生长因子和癌基因的诱导下表达, 参与多种病理生理过程。COX-2抑制剂已被用于结直肠息肉和结直肠癌的预防和治疗。研究显示<sup>[26-28]</sup>, COX-2在PJS胃肠道息肉中呈现高表达。因此, COX-2抑制剂将可以抑制PJS胃肠道息肉的发展。选择性COX-2抑制剂于20世纪90年代开始上市, 第一代有尼美舒利、美洛昔康、塞来昔布、罗非昔布等, 第二代有伐地昔布(Valdecoxib)、帕瑞昔布(Parecoxib)、依托昔布(Etoricoxib)等。将COX-2作为PJS胃肠道息肉的治疗靶点具有广阔的应用前景。原因: COX-2在肿瘤细胞中高表达, 而在正常细胞中不表达; 是良好的肿瘤治疗靶点。筛选COX-2抑制剂相对容易。因为大量的COX-2抑制剂作为消炎止痛一线药物已使用多年, 筛选的药物不必再进行临床实验。可根据COX-2延伸寻找与前列腺素合成相关的新的治疗靶点。因此, 随着研究的深入, 选择性COX-2抑制剂将在PJS的治疗中发挥越来越重要的作用。(2)mTOR信号通路抑制剂: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是PI3K/Akt通路的下游分子, 可接受生长因子、营养、能量等多种信号, 是调节细胞生长和增殖的关键分子。研究证实<sup>[29-31]</sup>, mTOR信号通路参与了PJS的发生、发展等过程。因此, 抑制mTOR信号通路将可以抑制PJS的发生发展。第一代mTOR通路抑制剂-雷帕霉素(Rapamycin)具有抗淋巴细胞增殖、抗肿瘤和抗真菌的作用。新一代的mTOR通路抑制剂-特癌适(Temsirolimus)、依维莫司(Everolimus)已经开始应用于临床, 其用于治疗PJS胃肠道息肉尚在研究中。由于不良反应高于选择性COX-2抑制剂, 这可能限制其在PJS胃肠道息肉治疗中的应用。(3)EGFR、VEGF及其受体的抑制剂: 目前针对EGFR、VEGF及其受体的靶向抑制剂已经开始应用于大肠癌的临床治疗。但关于他们在PJS胃肠道息肉中的作用报道很少<sup>[32,33]</sup>。其相关靶向药物应用于PJS胃肠道息肉的治疗尚需进一步研究。(4)PJS分子靶向治疗的实践和思考: 近3年来, 在医院伦理委员会批准和签署知情同意的前提下, 我们进行了塞来昔布预防性治疗PJS胃肠道息肉的临床实验, 共入组8例, 其中3例于服药1 mo后因出现过敏性皮疹而停药。2例于服药2mo后因出现胃肠道出血表现而停药。完成6 mo疗程者2例, 完成9 mo疗程者1例。这3例患者完成疗程后复查

## ■应用要点

本文从临床实用角度着重阐述了PJS胃肠道息肉诊治新动向, 有助于加深人们对PJS的认识、提高临床诊治能力, 同时也为PJS胃肠道息肉的预防性治疗提供了理论基础和实践经验。

### ■同行评价

该文紧密结合临床实践, 逻辑主线清晰, 全面论述了PJS胃肠道息肉的临床诊治问题; 提出了预防性治疗的设想, 并进行了相关临床实验, 对PJS胃肠道息肉的临床诊治实践具有很好的指导意义。

DBE显示息肉的分布、大小趋于缩小, 但因样本量太少, 尚无统计学意义。

对于PJS的分子靶向治疗, 我们认为尚需解决以下问题: (1)指标筛查方法问题。目前临床上对于相关靶标的检测多是采用免疫组化方法, 虽简便易行, 但结果易受试剂质量、操作水平等因素的影响, 且无法定量检测; 表达阳性率差异非常大。能否采用更稳定的筛查方法(如: 荧光原位杂交技术、定量PCR等)或统一试剂标准(如: 固定厂商、固定克隆系)来预防上述问题值得学者探讨。(2)如何依据COX-2、mTOR、EGFR和VEGF的表达情况来制定统一的标准以作为PJS靶向治疗的适应证? 这需要进一步明确PJS靶向药物治疗与COX-2、mTOR、EGFR和VEGF表达之间的关系。(3)确定靶向治疗的最佳时机、方案和剂量, 如何将其与手术、放化疗联合应用? 多种靶向药物能否联合应用?

**2.2.2 中医药治疗:** 各种分子靶向药物虽然具有针对性强、作用好的优点; 但也存在费用昂贵、不良反应较大等缺点, 尚无法在临床上普及。而中医中药对PJS胃肠道息肉的认识和治疗有独到之处, 具有服用方便、价格便宜、不良反应小的优点; 因此, 中药治疗也为PJS的预防性治疗提供了一种不错的选择。(1)PJS胃肠道息肉的中医辨证: 中医视息肉为痰凝瘀积之赘生物<sup>[34]</sup>, 认为先天禀赋因素及饮食因素是PJS胃肠道息肉的主要病因<sup>[35]</sup>。先天禀赋不足及久病脏腑受损, 导致脾阳虚衰、水湿运化失常, 从而使痰湿内聚, 聚而成积, 致使气机不畅, 气滞血瘀, 脉络壅塞, 以致气、湿、痰、瘀相互结聚, 日久终成息肉。(2)针对PJS胃肠道息肉的中药治疗: 中药治疗胃肠道息肉的资料中, 以古方“济生乌梅丸”的使用频率最高。该方是宋朝人严用和为治疗“肠风下血”而设。清朝人陈修园所著《时方歌括》中记载: 下血淋漓治颇难, 济生遗下乌梅丸, 僵蚕炒研乌梅捣, 醋下几回病即安。重庆中医研究所龚志贤在原药基础上加用酒醋、人指甲、象牙屑而制成“加味济生乌梅丸”<sup>[36]</sup>; 用于治疗各种息肉的疗效可靠。因人指甲、象牙屑不易得到, 故用穿山甲替代, 效果不减。还有一些中医专家加用三七、威灵仙、地龙等药物以促进其化瘀通络、磨坚散结的功效<sup>[37]</sup>。对于乌梅的功效, 古籍记载很多<sup>[38]</sup>。《本草纲目》曰: “其蚀恶疮赘肉, 虽是酸收, 却有物理之妙”。《刘涓子鬼遗方》曰: “用乌梅肉烧存性, 研敷恶肉上, 一夜立尽”。《本草经解》曰: “去青黑

痣, 及蚀恶肉, 酸收之味外治, 能消痣与肉也”。

《本经》论乌梅能“……蚀恶肉”。《外科大成》“平胬丹”中也以乌梅为主药销蚀腐肉。现代医学研究发现: 乌梅的有效成分熊果酸有抗肿瘤作用, 实验表明<sup>[39]</sup>, 乌梅煎剂在体外试验对子宫肌瘤JTC-26株的抑制率在90%以上。体外抗肿瘤及体外免疫调节试验结果表明, 乌梅水提液、醇提液具有抑制人原始巨核白血病细胞和人早幼粒白血病细胞生长的作用。乌梅对HL-40细胞的作用机制之一是抑制了细胞DNA合成, 并使细胞停滞于G/M期, 从而达到抑制结肿瘤形成的作用<sup>[40]</sup>。僵蚕乃蚕之病风者也, 具有熄风止痉、祛风止痛、解毒散结的功用<sup>[41]</sup>。《本草纲目》曰: “散风痰, 结核, 瘰癧, 头风, 风虫齿痛, 皮肤风疹, 丹毒作痒, 一切金疮, 疗肿风痔”。(3)加味济生乌梅丸的制法及注意事项: 乌梅1 500 g(选用肥大肉多的乌梅为上, 酒醋浸泡一宿, 去核、焙焦存性)、僵蚕500 g(米拌炒微黄为度)、穿山甲50 g(用碱水或皂水洗净, 晒干, 再用滑石粉入锅内同炒至甲片黄色鼓起为度, 取出筛去滑石粉, 放凉, 碾粉用)上药共为细末, 炼蜜为丸, 每丸重9 g, 3次/d口服。丸药制成后, 装入玻璃瓶内, 放于干燥通风处, 以防受潮霉烂变质。由于PJS胃肠道息肉好发于小儿, 服丸药较困难, 可改用乌梅、僵蚕各15 g煎汤, 2次/d口服。服药期间饮食宜清淡, 多食水果和蔬菜, 保持大便通畅, 忌煎炒辛辣, 忌烟酒。在签署知情同意和医院伦理委员会批准的前提下, 我们选取11例PJS患者进行口服“济生乌梅丸”治疗。服完6 mo疗程者有8例, DBE复查显示, 6例有效、2例无效。具体疗效情况尚有待增加样本量和更长期的观察随访。(4)中药灌肠: 文献报道<sup>[42]</sup>。五倍子乌梅汤保留灌肠具有清湿热、祛腐化瘀、广谱抗炎之功效。可以延缓胃肠道息肉的发生发展。五倍子10 g, 乌梅15 g, 黄连10 g, 金银花10 g, 紫草15 g, 白芨15 g, 薄荷10 g, 丹参10 g, 僵蚕10 g, 加水500 mL, 水煎浓缩至100-150 mL, 滤除杂质后装瓶备用。每晚睡前1 h点滴法保留灌肠1次, 12 d为1疗程。1疗程结束后休息7 d, 共2疗程, 6 mo后重复第2疗程。方中五倍子、乌梅能收敛止血、平胬去腐; 黄连、金银花、紫草、丹参有清热除湿解毒、活血化瘀之功; 白芨收敛止血、消肿生肌, 局部应用可促进创伤愈合; 薄荷有清热作用; 僵蚕有平胬去腐之功。(5)对于PJS的中药治疗, 我们认为尚需解决以下问题: 明确PJS患者的中医体质特点和分型。中医比较强调治疗的个体

化, PJS患者不同的中医体质决定着其中药治疗的差异. 中医治疗PJS的标准化问题. 尽量将治疗限定于特定药物、固定剂量、固定治疗时间的范围中, 否则将很难评价中药治疗PJS的确切疗效. 明确相关中药的有效成分及其治疗PJS的机制.

### 3 结论

在基因治疗尚未临床应用的背景下, 探索有效治疗PJS的临床模式具有重要意义. 我们认为局部治疗(内镜)+解救治疗(手术)+预防治疗(药物干预)的临床综合治疗模式具有一定的优势. 小肠镜治疗虽是局部治疗手段, 但可延长患者的手术间隔时间, 甚至可使部分患者免于开腹手术. 中西医结合预防性治疗PJS消化道息肉虽然面临着种种难题和不确定性, 但其临床应用前景是广阔而光明的; 这有可能为PJS患者开辟新治疗方法, 值得继续深入研究.

### 4 参考文献

- Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5397-5408
- 王石林, 顾国利. 遗传性结直肠肿瘤研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3075-3085
- Ausavarat S, Leoyklang P, Vejchapipat P, Chongsri-sawat V, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Novel mutations in the STK11 gene in Thai patients with Peutz-Jeghers syndrome. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5364-5367
- Wang H, Luo T, Liu WQ, Huang Y, Wu XT, Wang XJ. Clinical presentations and surgical approach of acute intussusception caused by peutz-jeghers syndrome in adults. *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 2218-2225
- 王石林, 毛高平, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征胃肠道息肉的36例诊治经验. *中华胃肠外科杂志* 2009; 12: 428
- Latchford AR, Phillips RK. Gastrointestinal polyps and cancer in Peutz-Jeghers syndrome: clinical aspects. *Fam Cancer* 2011; 10: 455-461
- 全国遗传性大肠癌协作组. 中国人遗传性大肠癌筛检标准的实施方案. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 191-192
- Yang C, Liu Y, Lu X, Qian F, Zhao L. Sporadic bilateral retinitis pigmentosa sine pigmento associated with atypical Peutz-Jeghers syndrome. *Can J Ophthalmol* 2010; 45: 184-185
- Patel LM, Lambert PJ, Gagna CE, Maghari A, Lambert WC. Cutaneous signs of systemic disease. *Clin Dermatol* 2011; 29: 511-522
- Sereno M, Aguayo C, Guillén Ponce C, Gómez-Raposo C, Zambrana F, Gómez-López M, Casado E. Gastric tumours in hereditary cancer syndromes: clinical features, molecular biology and strategies for prevention. *Clin Transl Oncol* 2011; 13: 599-610
- van Lier MG, Mathus-Vliegen EM, Wagner A, van Leerdam ME, Kuipers EJ. High cumulative risk of intussusception in patients with Peutz-Jeghers syndrome: time to update surveillance guidelines? *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 940-945
- Weng MT, Ni YH, Su YN, Wong JM, Wei SC. Clinical and genetic analysis of Peutz-Jeghers syndrome patients in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2010; 109: 354-361
- Pennazio M, Rondonotti E, de Franchis R. Capsule endoscopy in neoplastic diseases. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5245-5253
- 袁晋华, 辛磊, 廖专, 李兆申. 胶囊内镜全小肠检查的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3662-3666
- Gupta A, Postgate AJ, Burling D, Ilangoan R, Marshall M, Phillips RK, Clark SK, Fraser CH. A prospective study of MR enterography versus capsule endoscopy for the surveillance of adult patients with Peutz-Jeghers syndrome. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 195: 108-116
- 宁守斌, 毛高平, 曹传平, 白莉, 唐杰, 杨春敏, 周平, 陈英, 杜斌. 双气囊小肠镜对Peutz-Jeghers综合征患者小肠息肉的治疗价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1588-1591
- Sakamoto H, Yamamoto H, Hayashi Y, Yano T, Miyata T, Nishimura N, Shinhata H, Sato H, Sunada K, Sugano K. Nonsurgical management of small-bowel polyps in Peutz-Jeghers syndrome with extensive polypectomy by using double-balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 328-333
- Lai JH, Chang CW, Chen MJ, Lin SC, Wang HY, Chang CW. Treatment of intermittent intussusception in Peutz-Jeghers syndrome with single-balloon enteroscopy. *Endoscopy* 2010; 42 Suppl 2: E312-E313
- Matsui S, Kibi M, Anami E, Anami T, Inagaki Y, Kanouda A, Yoshinaga H, Watanabe A, Sugahara A, Mukai H, Toyokawa A, Iwasaki T, Tachibana M, Teramura K. A case of Cronkhite-Canada syndrome with multiple colon adenomas and early colon cancers. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2011; 108: 778-786
- Chen HM, Fang JY. Genetics of the hamartomatous polyposis syndromes: a molecular review. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 865-874
- 王石林, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征临床诊断治疗的现状和相关问题. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2385-2389
- Fan D, Ma C, Zhang H. The molecular mechanisms that underlie the tumor suppressor function of LKB1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41: 97-107
- Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 2008; 7: 27-39
- 王石林, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征胃肠道息肉的药物干预性治疗的进展. *中国普外基础与临床杂志* 2009; 16: 333-335
- van Veelen W, Korsse SE, van de Laar L, Peppelenbosch MP. The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene* 2011; 30: 2289-2303
- De Leng WW, Westerman AM, Weterman MA, De Rooij FW, Dekken Hv H, De Goeij AF, Gruber SB, Wilson JH, Offerhaus GJ, Giardiello FM, Keller JJ. Cyclooxygenase 2 expression and molecular alterations in Peutz-Jeghers hamartomas and carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3065-3072
- Wei C, Amos CI, Rashid A, Sabripour M, Nations

- L, McGarrity TJ, Frazier ML. Correlation of staining for LKB1 and COX-2 in hamartomatous polyps and carcinomas from patients with Peutz-Jeghers syndrome. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1665-1672
- 28 McGarrity TJ, Peiffer LP, Amos CI, Frazier ML, Ward MG, Howett MK. Overexpression of cyclooxygenase 2 in hamartomatous polyps of Peutz-Jeghers syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 671-678
- 29 Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat Res* 2008; 659: 284-292
- 30 Haidinger M, Werzowa J, Weichhart T, Säemann MD. Targeting the dysregulated mammalian target of rapamycin pathway in organ transplantation: killing 2 birds with 1 stone. *Transplant Rev (Orlando)* 2011; 25: 145-153
- 31 Klümpen HJ, Queiroz KC, Spek CA, van Noesel CJ, Brink HC, de Leng WW, de Wilde RF, Mathus-Vliegen EM, Offerhaus GJ, Alleman MA, Westermann AM, Richel DJ. mTOR inhibitor treatment of pancreatic cancer in a patient With Peutz-Jeghers syndrome. *J Clin Oncol* 2011; 29: e150-e153
- 32 McGarrity TJ, Peiffer LP, Billingsley ML. Overexpression of epidermal growth factor receptor in Peutz-Jeghers syndrome. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1136-1141
- 33 Brugarolas J, Kaelin WG. Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell* 2004; 6: 7-10
- 34 高家信. 大肠息肉的中医临床研究概况. *现代中西医结合杂志* 2001; 10: 117-118
- 35 张毅. 消化道息肉的中医证治. *中医药临床杂志* 2009; 21: 183-184
- 36 李志, 陈原, 张国英. 龚志贤加味济生乌梅丸临床应用举隅. *中国中医急症杂志* 2002; 11: 151
- 37 黄明河. 脾胃疑难病证治验采撷. *中华中医药杂志* 2008; 23: 328-330
- 38 杨澍. 乌梅祛息肉妙用四则. *中外健康文摘·医药学刊* 2008; 5: 92
- 39 沈红梅, 程涛. 乌梅的体外抗肿瘤活性及免疫调节作用初探. *中国中药杂志* 1995; 20: 365
- 40 杨炜, 徐进康. 乌梅用于大肠息肉治疗探讨. *中国民族民间医药杂志* 2010; 19: 45-48
- 41 郑建国, 杜文. 僵蚕治疗息肉. *中医杂志* 2009; 50: 1011-1012
- 42 张凤清, 方军. 肠息肉摘除术后中药灌肠预防复发的疗效观察及护理. *护士进修杂志* 2002; 17: 200-201

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、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、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多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1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)



# 一种用于HCV核心蛋白体外表达研究的CHO细胞模型的建立

薛宏丽, 冯国和

薛宏丽, 冯国和, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

薛宏丽, 辽宁省人民医院感染科 辽宁省沈阳市 110016

薛宏丽, 硕士, 主要研究方向为传染病。

作者贡献分布: 此课题研究过程与实验操作由薛宏丽完成; 冯国和负责设计与论文修改。

通讯作者: 冯国和, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. fenggh@sj-hospital.org  
电话: 024-96615-62101

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-10-15

接受日期: 2011-10-21 在线出版日期: 2011-10-28

## Establishment of a CHO cell model expressing hepatitis C virus core protein *in vitro*

Hong-Li Xue, Guo-He Feng

Hong-Li Xue, Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Hong-Li Xue, Department of Infectious Diseases, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Correspondence to: Guo-He Feng, Professor, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fenggh@sj-hospital.org

Received: 2011-09-01 Revised: 2011-10-15

Accepted: 2011-10-21 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To establish a non-hepatic cell model expressing hepatitis C virus (HCV) core protein *in vitro*.

**METHODS:** Recombinant plasmid pCMH6K containing the gene encoding HCV 1b core protein was identified by restriction digestion and temporarily or stably transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells using Lipofectamine 2000. CHO cells transfected with the pCMH6K plasmid were passaged continuously for 110 days. Distribution of HCV core protein in transfected CHO cells was examined by immune fluorescence. The mRNA expression of HCV core protein in transfected CHO cells was examined by RT-PCR.

**RESULTS:** The pCMH6K plasmid contains the gene encoding HCV1b core protein. HCV core protein was mainly distributed in the cytoplasm and scarcely in the membrane of CHO cells temporarily or stably transfected with the pCMH6K plasmid. The mRNA expression of HCV core protein was also detected in CHO cells transfected with the pCMH6K plasmid.

**CONCLUSION:** CHO cells transfected with the pCMH6K plasmid could express HCV core protein persistently.

**Key Words:** Hepatitis C virus; Core protein; Chinese hamster ovary cells; Cell passage

Xue HL, Feng GH. Establishment of a CHO cell model expressing hepatitis C virus core protein *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3117-3121

## 摘要

**目的:** 建立丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)核心(core, C)蛋白体外表达的非肝细胞模型。

**方法:** 核酸酶切法鉴定含有HCV1b基因型C蛋白编码基因的重组质粒pCMH6K的稳定性, 将pCMH6K瞬时及稳定转染于中华仓鼠卵巢(China hamster ovary, CHO)细胞并连续传代110 d, 免疫荧光法检测转染细胞内HCV C蛋白分布特征, RT-PCR法检测转染细胞内HCV C mRNA。

**结果:** pCMH6K含有与HCV1b基因型C蛋白编码基因(573 bp)相一致的特异性片段; 在pCMH6K瞬时以及稳定转染的CHO细胞内可见HCV C蛋白主要分布在胞质, 少部分在胞膜; 在不同时期稳定转染CHO细胞中均可见到与HCV C mRNA相一致的基因特异性片段(267 bp)。

**结论:** 成功建立了能够持续表达HCV C蛋白的

## ■背景资料

丙型肝炎病毒核心蛋白可与宿主细胞蛋白相结合, 通过多种途径参与肝细胞脂肪变性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌的发生, 与胰岛素抵抗、干扰素抵抗有密切关系, 在HCV感染的致病机制中起重要作用。至今尚不能建立长期而稳定的HCV体外感染细胞模型和动物模型, 严重影响了对HCV复制机制、持续感染机制、与宿主蛋白的相互作用以及新药与疫苗研发等相关内容的深入研究。

## ■同行评议者

任浩, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

## ■研发前沿

如何建立长期而稳定的HCV体外感染细胞或动物模型,为HCV变异性、复制机制、与宿主蛋白的相互作用以及新药与疫苗的研发提供研究平台,一直是近20余年来丙型肝炎研究领域的热点与难点。

## ■相关报道

任浩等建立了持续产生HCVcc的HCV 2a型体外细胞感染模型,IFN $\alpha$ 能抑制FL-J6FH HCVcc感染细胞中HCV RNA的复制,为研究HCV的结构与功能提供了实验平台。

CHO细胞株。

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 核心蛋白; 中华仓鼠卵巢细胞; 细胞传代

薛宏丽, 冯国和. 一种用于HCV核心蛋白体外表达研究的CHO细胞模型的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3117-3121  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3117.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒核心(hepatitis C virus core, HCV C)蛋白可与宿主细胞蛋白相结合,通过多种途径参与肝细胞脂肪变性、肝纤维化、胰岛素抵抗和干扰素抵抗等<sup>[1]</sup>.长期、稳定的HCV体外细胞或动物感染模型的建立,有益于对HCV持续感染机制、抗病毒治疗新药以及有效疫苗研发进行更深入的研究<sup>[2,3]</sup>.本研究将构建的含有HCV C蛋白编码基因的真核表达重组质粒pCMH6K转染到中华仓鼠卵巢(China hamster ovary, CHO)细胞,通过G418加压筛选获取阳性细胞克隆.在进行持续传代110 d中,定期通过免疫荧光、RT-PCR等方法检测HCV 1b基因型的C蛋白编码基因复制与表达.稳定表达HCV C蛋白的CHO细胞株的建立将为进一步研究HCV C蛋白与宿主细胞的相互作用,阐述HCV感染致病机制奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 在BamH I 酶切位点插入全长573 bp的HCV 1b基因型C基因的重组质粒pCMH6K由日本金泽医科大学综合医学研究所王春福博士惠赠.感受态菌DH5 $\alpha$ 购自TaKaRa公司;CHO细胞购自中国科学院上海细胞库,生长于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>及含有10% FCS的DMEM中.小量质粒提取试剂盒购自Axygen公司;细胞培养基DMEM购自Thermo Fisher生物制品北京有限公司;胎牛血清购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;氨苄青霉素、脂质体(Lipofectamine 2000)和G418购自Invitrogen公司;BamH I、Total RNA提取试剂和RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司;小鼠的单克隆抗体HepC cAg(C7-50)购自Santa公司;FITC标记山羊抗小鼠IgG购自北京中杉公司.引物选自HCV C区序列:5'-TTA GGA TCC ACG AAT CCT AAA CCT CAA A-3'为上游引物,位于HCV C区第348-366 nt位点;5'-ACT GAA TTC CCT CAT TGC CAT AGA GGG-3'为下游引物,互补于HCV C区第592-610 nt位点,由TaKaRa公司合成.采用RT-

PCR方法检测pCMH6K稳定转染的不同时期CHO细胞中HCV C mRNA.

### 1.2 方法

**1.2.1 pCMH6K转化与鉴定:** (1)pCMH6K转化:解冻感受态细胞DH5 $\alpha$ 并取60  $\mu$ L后加入pCMH6K溶液50 ng,冰上放置30 min后42℃水浴热击90 s,再迅速置冰上3 min,加入1 mL LB液体培养基于37℃混匀,225 r/min振荡1 h.取10  $\mu$ L菌液在含氨苄青霉素(80 mg/L)的LB琼脂糖培养基上37℃过夜培养; (2)pCMH6K提取:从平板培养基上挑取单菌落接种于含有氨苄青霉素(80 mg/L)的3 mL LB液体培养基中,37℃、225 r/min,摇菌16 h,参照质粒小提试剂盒说明书进行pCMH6K小剂量提取; (3)pCMH6K酶切鉴定:取pCMH6K溶液2  $\mu$ L加BamH I 2  $\mu$ L,10 $\times$  Buffer 4  $\mu$ L,最终总体积40  $\mu$ L,37℃酶切1 h,取5  $\mu$ L用于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.2 脂质体(Lipofectamine2000)法瞬时转染pCMH6K:** (1)CHO细胞常规培养:取6孔板培养CHO细胞(37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>、10%胎牛血清和双抗的DMEM)至培养细胞达到90%以上融合; (2)pCMH6K转染:将4  $\mu$ g pCMH6K与无血清无抗生素的DMEM混合至总体积250  $\mu$ L,即溶液A;将10  $\mu$ L脂质体与240  $\mu$ L无血清无抗生素的DMEM混匀并室温孵育5 min,即溶液B;将溶液A与溶液B混合并室温孵育20 min形成脂质体/质粒混合物.加上述混合物于6孔板培养的CHO细胞,37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育4 h后加入10% FCS的DMEM继续培养至24 h; (3)免疫荧光法检测HCV C蛋白:4%多聚甲醛固定转染pCMH6K的CHO细胞1 h,加入0.1%的Triton溶液10 min,加入1% BSA封闭1 h,加入一抗HepC cAg(0.1% BSA稀释,稀释度1:100)并于4℃孵育过夜,暗室中加入二抗FITC标记山羊抗小鼠IgG(0.1% BSA稀释,稀释度1:100)37℃避光孵育1 h;荧光显微镜下观察细胞并拍照。

**1.2.3 脂质体(Lipofectamine2000)法稳定转染pCMH6K:** (1)筛选最佳G418浓度:将CHO细胞接种于24孔板,孵育24 h后,每孔分别加入不同浓度的G418,依次为600 mg/L、650 mg/L、700 mg/L、750 mg/L、800 mg/L、850 mg/L、900 mg/L,每种浓度设3个孔,余下3孔为正常细胞对照.培养11 d后确定能杀死所有细胞的最低G418浓度作为本实验的最佳筛选浓度,即为800 mg/L; (2)pCMH6K稳定转染:用24孔板(每孔0.5 mL)培养CHO细胞24 h,将pCMH6K 0.8  $\mu$ g与脂质体2  $\mu$ L

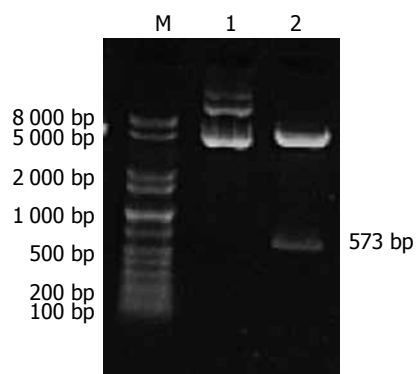


图1 pCMH6K质粒酶切. M: Marker; 1: pCMH6K; 2: pCMH6K经BamH I酶切.

混合并加入无血清无抗生素的DMEM至总体积为100  $\mu$ L, 室温孵育20 min后加入24孔板的CHO细胞中, 培养6 h后更换为新鲜含10% FCS的DMEM继续培养至24 h, 将CHO细胞以1:4的比例接种到6孔板和24孔板中, 常规培养24 h, 待细胞密度增至50%-70%汇合时, 分别加入800 mg/L含G418的DMEM培养液筛选, 加压筛选2 wk时, 正常细胞及脂质体对照细胞均死亡. 将具有抗生素抗性的阳性CHO细胞克隆, 用含400 mg/L G418的DMEM维持筛选培养扩大阳性克隆, 传代培养110 d, 细胞稳定生长, 并收集维持筛选后第35、40、45、50、65、85、90、95、100、105以及110天等不同时期的细胞.

**1.2.4 免疫荧光检测稳定转染细胞株中HCV C蛋白:** 培养pCMH6K转染的CHO细胞并接种至6孔板中的盖玻片上, 培养24 h使细胞密度达到80%以上, 免疫荧光检测pCMH6K转染的CHO细胞中HCV C蛋白的方法同前, 50%甘油封片, 于荧光显微镜下观察细胞并拍照.

**1.2.5 RT-PCR法检测稳定转染细胞株中HCV C mRNA:** (1)细胞总RNA提取: 将上述不同时期收集的pCMH6K稳定转染CHO细胞, 按Total RNA提取试剂盒说明书进行细胞总RNA提取, 紫外线分光光度仪分别测定其浓度; (2)RT-PCR: 将提取的RNA稀释成500 mg/L, 以小鼠管家基因GAPDH作为内参, RT-PCR反应条件, RT: 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min, PCR: 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 35循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min. 取PCR反应液3  $\mu$ L、小鼠管家基因GAPDH PCR反应液2  $\mu$ L进行1.5%琼脂糖凝胶电泳分析.

## 2 结果

### 2.1 pCMH6K的鉴定 提取pCMH6K经BamH I酶

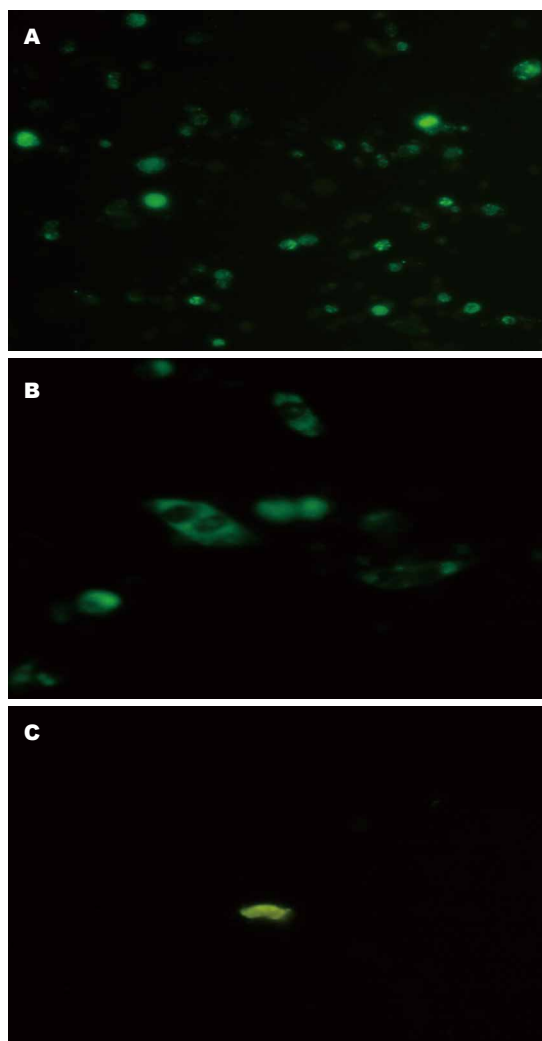


图2 免疫荧光检测HCV C蛋白的表达. A: pCMH6K转染的CHO细胞(200 $\times$ ); B: pCMH6K转染的CHO细胞(400 $\times$ ); C: 未转染的CHO细胞(400 $\times$ ).

切、1%琼脂糖凝胶电泳分析, 可见到约573 bp的片段, 与HCV 1b基因型C蛋白编码基因大小相一致(图1).

**2.2 pCMH6K瞬时转染以及免疫荧光检测** 转染pCMH6K的CHO细胞于24 h可见较显著的绿色荧光标记(图2A), 高倍视野可见绿色荧光标记主要分布在胞质, 也可见于胞膜(图2B); 未转染pCMH6K的CHO细胞未见特异性绿色荧光标记, 仅见散在的无特异性绿色荧光杂质(图2C).

**2.3 pCMH6K稳定转染后的CHO细胞筛选与传代培养** pCMH6K稳定转染后的CHO细胞于培养后48 h加入G418, 加压筛选2 wk, 可见单个及小细胞团簇形成即阳性克隆出现(图3A), 维持筛选第3天(图3B)、6天、12天、15天可见细胞团簇逐渐扩大并融合; 维持筛选后第35天、40天、45天、50天、65天、85天、90天、95天、100天、105天以及110天(图3C)等不同时期的细

### ■创新盘点

本研究选用非人源CHO细胞作为含HCV C基因重组质粒稳定转染的受体细胞, 建立稳定表达HCV C蛋白的细胞模型, 为研究HCV C蛋白的作用奠定基础.

### ■应用要点

本研究建立了体外稳定表达HCV核心蛋白的非肝细胞模型,为后续研究HCV核心蛋白与宿主细胞的相互作用,阐述HCV感染的致病机制提供研究平台。

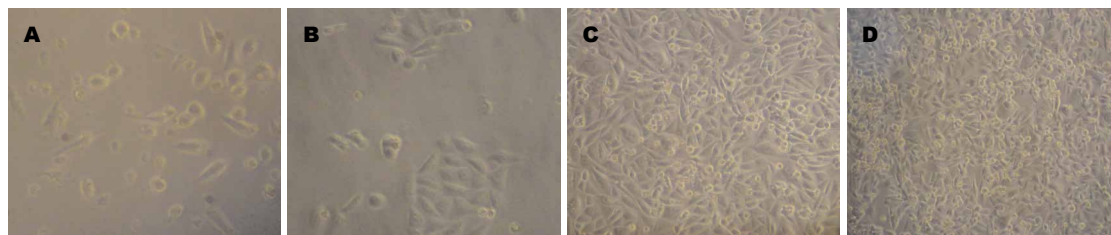


图3 筛选培养pCMH6K稳定转染CHO细胞( $\times 200$ )。A: 加压筛选2 wk; B: 维持筛选3 d; C: 维持筛选第110 d; D: 正常CHO细胞。

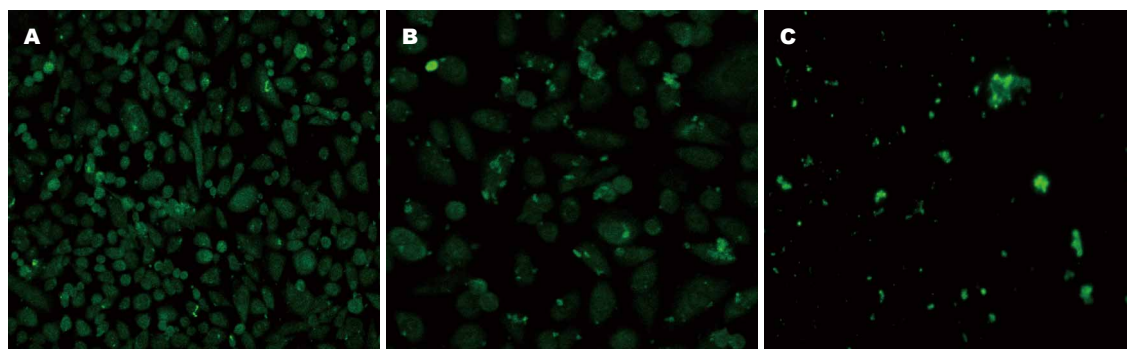


图4 免疫荧光检测稳定转染细胞中HCV C蛋白的表达。A: pCMH6K稳定转染的CHO细胞( $\times 200$ ); B: pCMH6K稳定转染的CHO细胞( $\times 400$ ); C: 未转染CHO细胞( $\times 200$ )。

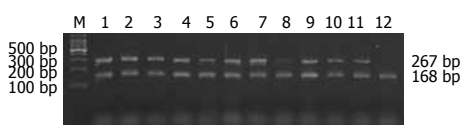


图5 pCMH6K稳定转染CHO细胞传代后不同时间的mRNA检测。M: Marker; 1: 维持筛选第35天; 2: 第40天; 3: 第45天; 4: 第50天; 5: 第65天; 6: 第85天; 7: 第90天; 8: 第95天; 9: 第100天; 10: 第105天; 11: 第110天; 12: 未转染细胞。

胞,可见细胞稳定生长,通过与同步传代的正常CHO细胞(图3D)进行光镜下比较,二者在细胞形态上没有显著区别。

**2.4 免疫荧光检测稳定转染细胞株中HCV C蛋白的表达** 与未转染CHO细胞(图4C)比较,稳定转染的CHO细胞(图4A, 4B)可见较显著绿色荧光标记。

**2.5 RT-PCR检测稳定转染细胞株中HCV C基因** 反应产物经琼脂糖凝胶电泳可见特异性条带,反应产物大约267 bp,未转染细胞未见特异性条带,小鼠的管家基因GAPDH产物约168 bp(图5)。

### 3 讨论

近年研究发现HCV C蛋白除作为核壳体蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还参与调节细胞凋亡<sup>[4,5]</sup>、脂代谢<sup>[6,7]</sup>、转录<sup>[8,9]</sup>以及抗原递呈<sup>[10]</sup>等作用,与干扰素抵抗也有密切关系<sup>[11]</sup>。HCV C蛋白具有广泛的反式激活作用,与宿主细胞蛋白相互作用,是导致病毒持续感染以及肝细胞癌变的重要原

因<sup>[12]</sup>。深入认知和分析HCV C蛋白分子生物学特性,对阐明HCV持续性感染与致癌机制以及HCV对肝细胞脂肪变与干扰素疗效的影响等诸多问题具有重要意义。稳定、持续表达HCV C蛋白的细胞感染模型的建立,将为HCV C蛋白与宿主细胞相互作用的系列研究提供契机<sup>[2,3]</sup>。

本研究将构建的含有HCV 1b基因型C基因的真核表达重组质粒pCMH6K,经转化、提取、酶切鉴定后,通过脂质体法瞬时转染CHO细胞。经免疫荧光检测证实HCV C蛋白在细胞中表达,高倍视野下可见表达的部位在胞质和胞膜,以胞质为主。pCMH6K稳定转染的研究将为用于HCV C蛋白体外表达研究的CHO细胞模型的建立提供可能。在适宜的G418筛选浓度控制下,从筛选出pCMH6K转染的CHO细胞阳性克隆到细胞成簇、细胞团融合以及稳定传代共计110 d期间,分别收集维持筛选的第35、40、45、50、65、85、90、95、100、105以及110天的传代CHO细胞,经免疫荧光检测细胞中HCV C蛋白表达分布特点,可见特异性的绿色荧光标记仍主要分布在胞质,少部分在胞膜;同pCMH6K瞬时转染的CHO细胞的免疫荧光检测结果相一致,但表达量较前者明显增加。应用针对HCV C基因负链区域特异性引物,通过RT-PCR方法检测上述不同时期稳定转染CHO细胞中HCV C基因mRNA,经1.5%琼脂糖凝胶电泳



分析, 均可见到与HCV C mRNA相一致的特异性片段(267 bp), 证实pCMH6K稳定转染的CHO细胞在110 d内存在HCV C基因的持续性转录与表达, 进而提示建立了稳定表达HCV C蛋白的CHO细胞模型。

早期研究认为HCV是一种严格的嗜肝病毒, 不能在肝细胞以外的细胞中复制, 而后续研究发现HCV还可体外感染单核细胞与淋巴细胞。先后用HCV体外感染的细胞株包括人单核细胞株(U937)、人T淋巴细胞株(Molt-4)、人胆囊细胞株(Kirlich)、猪肾细胞株(PK15)以及鼠睾丸细胞株(STE)<sup>[13]</sup>等。虽然HCV在猪肾细胞株、鼠睾丸细胞株和人肝癌细胞(Hep3B)中能间接表达相关蛋白, 但是在上述细胞中只能检测到HCV RNA的正链, 却无法检测到HCV负链, 即复制中间体, 说明上述细胞的选择仍难阐述HCV复制环节。本研究选用非人源CHO细胞作为含HCV C基因重组质粒稳定转染的受体细胞, RT-PCR法在pCMH6K稳定转染的不同时期CHO细胞内检测到HCV C mRNA, 证明了含HCV C基因重组子可在CHO细胞内转录与表达特点, 此模型的建立可为后续HCV C蛋白分子生物学特性以及与宿主细胞相互作用的体外研究奠定基础。

#### 4 参考文献

- 1 张莉莉, 冯国和. 丙型肝炎病毒核心蛋白作用研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2019-2024
- 2 薛宏丽, 冯国和, 窦晓光. 丙型肝炎病毒感染实验模型的研究新进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1269-1274
- 3 任浩, 王永智, 赵平, 刘媛, 戚中田. HCV 2a J6FH细胞感染模型的建立及初步应用. 中国生物制品学杂志 2009; 22: 1-5
- 4 Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2005; 79: 1271-1281
- 5 Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology* 2003; 317: 24-35
- 6 Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C viral infection: steatohepatitis resembling but distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005; 40: 329-336
- 7 Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, Ohishi W, Hyogo H, Nomura S, Chayama K. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1361-1371
- 8 de Lucas S, Bartolomé J, Amaro MJ, Carreño V. Hepatitis C virus core protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter via NF-kappaB activation. *Antiviral Res* 2003; 60: 117-124
- 9 Sato Y, Kato J, Takimoto R, Takada K, Kawano Y, Miyanishi K, Kobune M, Sato Y, Takayama T, Matunaga T, Niitsu Y. Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* 2006; 55: 1801-1808
- 10 Giannini C, Caini P, Giannelli F, Fontana F, Kremsdorf D, Bréchet C, Zignego AL. Hepatitis C virus core protein expression in human B-cell lines does not significantly modify main proliferative and apoptosis pathways. *J Gen Virol* 2002; 83: 1665-1671
- 11 Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355
- 12 Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Ueda K, Takehara T, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 2004; 279: 11719-11726
- 13 Boonstra A, van der Laan LJ, Vanwolleghem T, Janssen HL. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology* 2009; 50: 1646-1655

#### ■同行评价

本研究旨在建立HCV体外感染的非肝细胞模型, 既是HCV感染研究领域的热点, 又具有创新性, 具有较好的学术价值。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# P-selectin、IVAM-1和ICAM-1在大鼠重症急性胰腺炎并发急性心肌损害中的作用机制

范辉, 王小红, 沈云志

## ■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见的急重症, 它是一种全身性、系统性的疾病。炎症反应(SIRS)是SAP的基本病理生理过程, 若炎症失控, 常导致MODS、MOF的发生。在MODS、MOF过程中, AMD的发生机制缺乏系统性的研究。细胞黏附分子(AM)是一类调节细胞与细胞、细胞与细胞外基质(ECM)间相互结合、起黏附作用的细胞表面跨膜糖蛋白, 他在SAP并发AMD病程中的具体作用机制尚无系统的研究。

范辉, 江苏省南通市第二人民医院消化内科 江苏省南通市 226002

王小红, 沈云志, 苏州大学附属第三医院消化内科 江苏省常州市 213003

范辉, 医学博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床工作。

作者贡献分布: 范辉对此篇文章所作贡献较大, 承担了课题的绝大部分工作; 课题在沈云志教授的指导下由范辉与王小红共同探讨、设计; 实验过程由范辉与王小红共同操作完成; 研究所需材料、经费由沈云志教授提供; 数据分析由范辉完成; 本论文写作由范辉、王小红完成; 沈云志教授提供了整体修改意见。

通讯作者: 沈云志, 教授, 博士生导师, 213003, 江苏省常州市, 苏州大学附属第三医院消化内科。ntfh1970@163.com

电话: 0138-14622418

收稿日期: 2011-08-12 修回日期: 2011-10-12

接受日期: 2011-10-16 在线出版日期: 2011-10-28

## Expression of P-selectin, IVAM-1 and ICAM-1 genes in acute myocardial damage secondary to severe acute pancreatitis in rats

Hui Fan, Xiao-Hong Wang, Yun-Zhi Shen

Hui Fan, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Nantong City, Nantong 226002, Jiangsu Province, China

Xiao-Hong Wang, Yun-Zhi Shen, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yun-Zhi Shen, Professor, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. ntfh1970@163.com

Received: 2011-08-12 Revised: 2011-10-12

Accepted: 2011-10-16 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of P-selectin, IVAM-1 and ICAM-1 in acute myocardial damage (AMD) secondary to severe acute pancreatitis (SAP) in rats, and to explore possible mechanisms underlying the protecting effect of Danhong Injection on AMD in rats with SAP.

**METHODS:** Ninety male SD rats were randomly and equally divided into three groups: control group (group A), SAP model group (group

B) and treatment group (group C). The rats in groups B and C received two injections of L-Arg (3.2 g/kg body weight, i.p.) at an interval of 1 h to induce SAP. Artery blood samples were collected at 4, 8 and 12 h after SAP induction. Serum concentrations of CK-MB, CTnI, P-selectin, IVAM-1 and ICAM-1 were measured. The expression of P-selectin, IVAM-1 and ICAM-1 genes in myocardial tissue was detected by qRT-PCR. Myocardial pathological changes were examined by optical and electron microscopy.

**RESULTS:** Compared to group A, serum contents of CK-MB, CTnI, P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 significantly increased in group B (all  $P < 0.05$ ). Compared to group B, serum contents of CK-MB, CTnI, P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 significantly decreased in group C (all  $P < 0.05$ ). Myocardial tissue morphology was normal in rats of the control group. Myocardial histopathologic score was significantly higher in group B than in group A. In the group C, myocardial pathological changes were alleviated, and myocardial histopathologic score was significantly lower than that in group B. Compared to group A, the expression of P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 significantly increased in group B (all  $P < 0.05$ ). Compared to group B, the expression of P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 significantly decreased in group C (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** SAP induces AMD possibly by increasing the expression of P-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 genes in rats. Danhong Injection is effective in attenuating AMD and its protective mechanism might be related to decreasing the expression of P-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 genes.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Acute myocardial damage; P-selectin; VCAM-1; ICAM-1

Fan H, Wang XH, Shen YZ. Expression of P-selectin, IVAM-1 and ICAM-1 genes in acute myocardial damage secondary to severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3122-3128

## ■同行评议者

陈贻胜, 教授, 福建省立医院消化内科; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

## 摘要

**目的:** 研究大鼠重症急性胰腺炎(SAP)并发急性心肌损害(AMD)时心肌组织黏附分子(P-selectin、VCAM-1、ICAM-1)基因表达的变化以及丹红注射液对表达的影响。

**方法:** 90只S-D大鼠随机分为对照组(A组,  $n = 30$ )、SAP模型组(B组,  $n = 30$ )和治疗组(C组,  $n = 30$ ), 采用腹腔注射L-Arg的制作SAP模型。检测血清CTnI、CK-MB、P-selectin、VCAM-1和ICAM-1浓度; 光镜、电镜下观察心肌组织的病理变化; 实时荧光定量PCR检测大鼠SAP成模后4 h、8 h、12 h心肌黏附分子(P-selectin、VCAM-1、ICAM-1)表达产物。

**结果:** 实验室检查: B组各时间点血清中CTnI、CK-MB、P-selectin、VCAM-1与ICAM-1较A组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。C组各时间点血清中CTnI、CK-MB、P-selectin、VCAM-1与ICAM-1较B组明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。心肌病理评分: B组大鼠心肌组织病理学评分较A组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); C组大鼠心肌病理学评分较B组明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。基因表达: B组各时间点大鼠心肌组织黏附分子基因表达较A组明显上调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。C组各时间点心肌组织黏附分子(P-selectin、VCAM-1、ICAM-1)基因表达较B组明显降低, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 大鼠SAP可并发AMD, AMD的发生与心肌组织黏附分子P-selectin、IVAM-1、ICAM-1的基因表达上调有关。丹红注射液对SAP并发的AMD具有防治作用, 其作用机制与下调心肌组织中黏附分子P-selectin、VCAM-1、ICAM-1的基因表达有关。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 急性心肌损害; P-选择素基因; 血管细胞间黏附分子-1; 细胞间黏附分子-1

范辉, 王小红, 沈云志. P-selectin、IVAM-1和ICAM-1在大鼠重症急性胰腺炎并发急性心肌损害中的作用机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3122-3128  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3122.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见的消化系统危重急症, 常并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response

syndrome, SIRS)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。目前, 国内外对SAP并发急性心肌损害(acute myocardial damage, AMD)的研究并不多见, 本研究动态观察了SAP大鼠血清中CTnI、CK-MB、P-selectin、VCAM-1和ICAM-1水平的变化, 心肌损害的光镜、电镜病理学表现, 心肌组织P-selectin、VCAM-1和ICAM-1基因表达产物的变化及丹红注射液对大鼠SAP并发急性心肌损害(AMD)的防治作用, 以探讨SAP并发AMD的可能发生机制和丹红注射液的防治作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂健康S-D大鼠90只, 体质量200-250 g, 250 g/L L-精氨酸购自上海第一生化制药厂产品(国药准字H31020517), 丹红注射液采用济南步长制药有限公司生产的制剂(国药准字Z20026866)。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型制作及给药方法:** 将实验大鼠随机分为3组, A组(对照组,  $n = 30$ )、B组(SAP模型组,  $n = 30$ )、C组(治疗组,  $n = 30$ )。实验前禁食12 h, 自由饮水。B、C组造模按照文献介绍方法多次预试验后采用腹腔注射25 g/L浓度L-精氨酸(剂量3.2 g/kg)2次, 间隔1 h<sup>[1,2]</sup>; C组于第2次L-精氨酸后1 h按照文献报道用法<sup>[3]</sup>予以肌注丹红注射液1.6 mL/(kg·d), 分2次, 间隔6 h; 对照组动物肌注等量的生理盐水。于模型成功后4、8、12 h 3个时间点处死各组存活大鼠, 打开腹腔提取胰腺组织; 采集胸主动脉血, 离心后血清-80 °C下保存待测; 提取心脏。

**1.2.2 光镜检查:** 各时间点提取大鼠胰腺头部组织及心肌组织于100 g/L多聚甲醛中固定24 h, 脱水石蜡包埋、切片及石蜡包埋制片后HE染色。组织坏死的范围和细胞浸润范围用对照双盲法评分。用Schmidt<sup>[4]</sup>评分标准对胰腺进行组织学评分, 用Chiharu<sup>[5]</sup>评分标准对心肌进行组织学评分。

**1.2.3 电镜检查:** 取离体心脏沿着室间隔方向纵向剖开心脏, 以心肌纤维排列的垂直方向为长轴, 切取1 mm×1 mm×2 mm的长方体心肌组织为电镜取材标本, 1 min内置于4 °C、25 g/L戊二醛前固定、漂洗, 以10 g/L四氧化锇固定1.5 h, 丙酮逐级脱水, 用环氧树脂EPON812包埋机包埋, 取半薄切片先于光镜下定位, 选取需要观察的细胞部分, 再用LKBIII型超薄切片机切成超

## ■ 研究前沿

细胞黏附分子(adhesion molecule, AM)(包括P-selectin、VCAM-1和ICAM-1)与配体结合后, 促使炎症细胞向毛细血管内皮表面的黏附, 炎症细胞释放的氧自由基与多种酶类将加重内皮细胞细胞和组织损伤, 导致心肌组织形态结构和功能障碍, 探索各种黏附分子的作用及其相互关系是SAP并发AMD病理生理过程中的热点、重点和难点问题, 可以对此病的发病过程有新的认识, 并更好地为临床治疗提供指导。

## ■相关报道

张喜平等研究发现, 中药制剂黄芩苷注射剂具有抗心肌细胞凋亡的作用, 从而对SAP并发的急性心肌损害产生保护作用。

表 1 相关基因的基因名称、基因文库编号、引物序列及引物长度

基因序列编号	引物名称	序列(5'-3')	扩增长度(bp)
P-selectin	Rn-Selp-Q2-F'	GCATACTCATGGAATAACTCACG	99
NM_013114	Rn-Selp-Q2-R'	GACGTCATTGAGGTGAGCG	
VCAM-1	Rn-Vcam1-Q2-F'	ATCTGGGTTAGCCCCCTCTCC	51
NM_012889	Rn-Vcam1-Q2-R'	CAGGTTCACAGGACTGCCCT	
ICAM-1	Rn-Icam1-Q2-F'	GAGTGGACACAAGTGAAGC	244
NM_012967	Rn-Icam1-Q2-R'	ACGGAGCAGCACTACTGAGA	
GAPDH	Hs-GD-1-F'	GAAGGTGAAGTCTGGAGTC	225
NM_002046	Hs-GD-1-R'	GAAGATGGTGTGGGATTTC	

薄切片, 醋酸铀及枸橼酸铅双重染色。

1.2.4 血清中CTnI、CK-MB、P-selectin、VCAM-1和ICAM-1浓度的测定: 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清CTnI、P-selectin、VCAM-1和ICAM-1浓度, 日立7180全自动生化分析仪测定CK-MB。

1.2.5 黏附分子基因表达的检测: 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定心肌组织黏附分子P-selectin、VCAM-1和ICAM-1的基因表达。引物序列(表1)。

**统计学处理** 所有数据以mean±SD表示, 通过SPSS13.0统计软件统包统计, 计量资料数据采用单因素方差分析, 对各组均数进行显著性检验, 取 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组生存率 对照组大鼠全部存活, 存活率100%。SAP模型大鼠4 h组存活10只, 存活率100%; 8 h组存活8只; 12 h组存活7只。SAP模型组总体存活率73.3%, 治疗组4 h组存活10只, 8 h组存活10只, 12 h组存活9只, 治疗组总体存活率96.7%。

### 2.2 胰腺及心肌病理学改变

2.2.1 胰腺组织: 对照组大鼠胰腺组织结构清晰, 腺泡细胞无水肿、坏死, 无炎症细胞浸润(图1A)。SAP组胰腺腺泡细胞肿胀、坏死, 间质有充血、水肿, 有不同程度的炎症细胞浸润。SAP组各时间点与对照组组间胰腺组织学评分差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图1B、C、D, 表2)。

2.2.2 心脏组织: 对照组大鼠心肌组织细胞完整, 无肿胀, 无炎症细胞浸润(图2A); SAP组大鼠出现心肌组织学改变的现象: 早期心肌细胞排列结构基本正常, 之后逐渐出现心肌间隙水肿, 肌纤维结构消失、紊乱现象, 其间可见少许炎细胞浸润; 后期心肌细胞肿胀, 部分细胞崩解, 心肌

表 2 两组大鼠胰腺、心肌组织学评分比较 (mean ± SD)

分组	n	胰腺病理评分	心肌病理评分
对照组	30	0.38 ± 0.34	0.07 ± 0.25
SAP组			
4 h	10	5.40 ± 1.52 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.92 <sup>a</sup>
8 h	8	8.69 ± 1.25 <sup>ac</sup>	3.25 ± 0.71 <sup>ac</sup>
12 h	7	11.86 ± 1.77 <sup>abc</sup>	3.85 ± 0.38 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs SAP 4 h组; <sup>b</sup> $P<0.05$  vs SAP 8 h组。

纤维结构消失, 周围大量炎症细胞浸润(图2B、C、D); SAP组各时间点与对照组组间心肌组织学评分差异也有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗组大鼠在早期也出现心肌细胞间隙水肿, 肌纤维结构消失、紊乱的现象, 其间可见少许炎细胞浸润, 但治疗后12 h时间点的心肌病理损害评分较SAP相同时间点明显降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图3A、B、C, 表3)。

2.3 心肌电镜病理学改变 对照组: 大鼠心肌细胞亚细胞结构正常, 肌膜及细胞器结构完整, 形态正常(图3D); SAP模型组: 弥漫性心肌细胞肿胀、细胞核及线粒体肿胀, 肌浆网扩张, 肌原纤维部分断裂, 肌丝分解(图4A、B、C); 治疗组: 肌浆网轻度扩张、线粒体轻度扩张(图4D、5A、5B)。

2.4 血清中CK-MB、CTnI、P-selectin、VCAM-1和ICAM-1浓度的变化 对照组大鼠血清中CTnI、CK-MB浓度较低, SAP组大鼠从术后4 h开始出现CTnI、CK-MB水平升高, 8、12 h进一步增高, 组间差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 治疗组各时点CTnI、CK-MB水平较SAP组下降, 组间差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表4)。对照组的血清P-selectin、VCAM-1、ICAM-1处于低水平状态, SAP组4 h、8 h、12 h各时间点上上述黏附分子较对照组显著增高, 差异有统计学意义



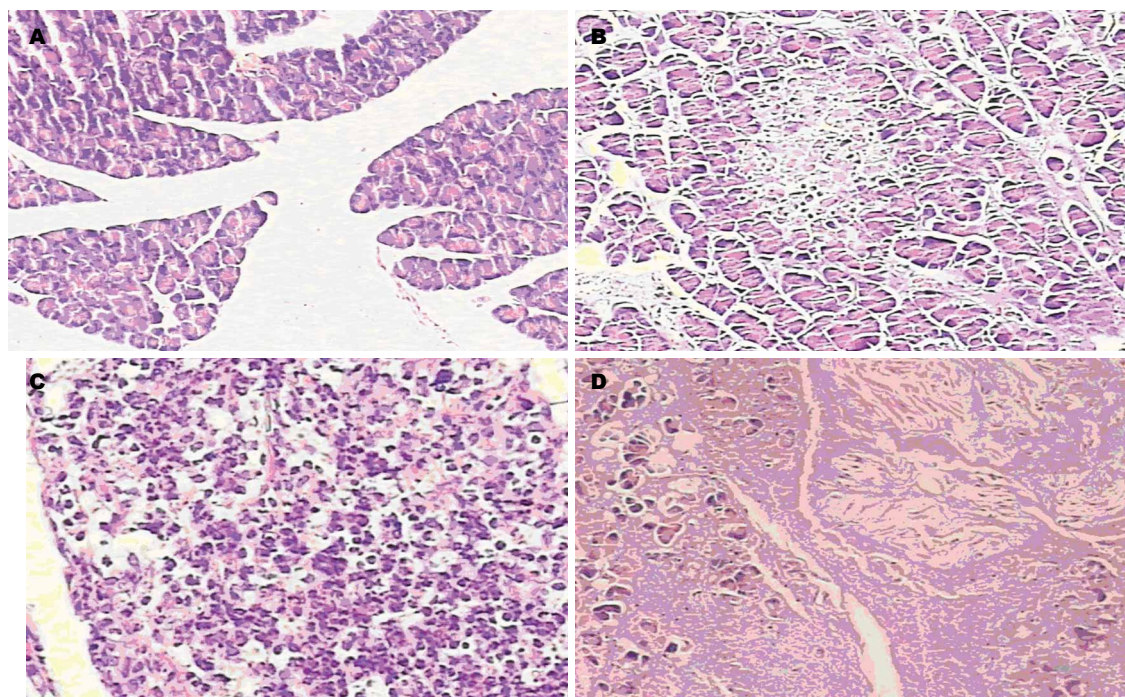


图1 大鼠胰腺光镜图(HE). A: 对照组( $\times 400$ ); B-D: SAP组4 h、8 h、12 h( $\times 200$ ).

#### ■创新盘点

文章从SAP大鼠并发AMD心肌细胞的光镜、电镜形态学、血清酶学标志物与黏附分子基因的表达等方面证实了心肌损害程度与黏附分子基因表达、黏附分子血清浓度之间的关联性;并探讨了丹红注射液对大鼠SAP并发AMD的治疗作用及机制。

表3 治疗后两组大鼠心肌组织学评分比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	4 h	8 h	12 h
SAP组	2.20 $\pm$ 0.92	3.25 $\pm$ 0.71	3.85 $\pm$ 0.38
治疗组	2.00 $\pm$ 0.94	2.90 $\pm$ 0.99	3.00 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs SAP组相同时间点的结果。

( $P < 0.05$ ); 且8 h、12 h时间点ICAM-1、VCAM-1均显著高于4 h, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗组4、8、12 h各时间点VCAM-1、P-selectin较SAP组显著降低; 治疗组8、12 h时间点ICAM-1较SAP组显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表5)。

**2.5 心肌组织P-selectin、VCAM-1和ICAM-1基因表达** 心肌组织P-selectin基因表达: 对照组的各时间点P-selectin基因表达处于较低水平, 组内各时间点差异无统计学意义。SAP组4、8、12 h各时间点P-selectin基因表达(RQ值)较对照组相同时间点显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 同时8、12 h时间点各指标均显著高于4 h, 12 h时间点各指标显著高于8 h指标, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗组4、8、12 h时间点P-selectin基因表达较SAP组相同时间点RQ值有显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表6, 图5C)。

心肌组织VCAM-1基因表达: 对照组的各时间点VCAM-1基因处于较低水平表达, 对照组组

内各时间点差异无统计学意义。SAP组4、8、12 h各时间点VCAM-1基因表达(RQ值)较对照组相同时间点显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 同时8、12 h时间点各指标均显著高于4, 12 h时间点各指标显著高于8 h指标, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗组4 h时间点VCAM-1基因表达(RQ值)较SAP组相同时间点有所降低, 但是差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 治疗组8、12 h时间点VCAM-1基因表达(RQ值)较SAP组相同时间点RQ值显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表7, 图5D)。

心肌组织ICAM-1基因表达: 对照组的各时间点ICAM-1基因表达处于较低水平表达, 对照组组内各时间点差异无统计学意义。SAP组4、8、12 h各时间点ICAM-1基因表达(RQ值)较对照组相同时间点显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 同时8、12 h时间点各指标均显著高于4, 12 h时间点各指标显著高于8 h指标, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗组4、8 h时间点ICAM-1基因表达(RQ值)较SAP组相同时间点有所降低, 但是差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 治疗组12 h时间点ICAM-1-mRNA的PCR产物RQ值显著低于SAP组相同时间点RQ值, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表8, 图5E)。

### 3 讨论

决定SAP患者预后的主要因素是SIRS的严重程



## ■应用要点

重症急性胰腺炎并发急性心肌损害,本研究采用分子生物学和电镜等手段阐明SAP并发AMD时黏附分子的作用机制,中药丹红注射液对黏附分子基因表达的影响,有助于临床医师采取有效治疗措施。

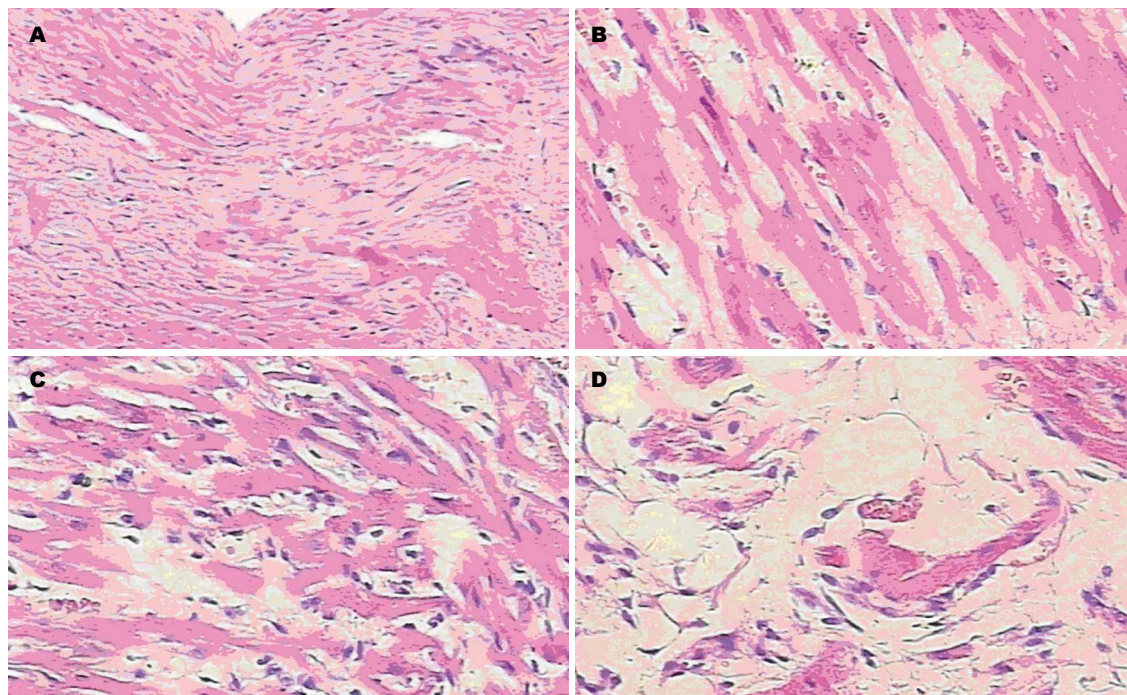


图2 大鼠心肌光镜图(HE). A: 对照组( $\times 200$ ); B-D: SAP组4 h、8 h、12 h( $\times 400$ ).

表4 3组大鼠血清CK-MB、cTnI浓度 (mean  $\pm$  SD)

分组	心肌标志物浓度		
	4 h	8 h	12 h
cTnI( $\mu$ g/L)			
对照组	0.13 $\pm$ 0.03	—	—
SAP组	2.31 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	3.35 $\pm$ 0.24 <sup>ac</sup>	3.92 $\pm$ 0.29 <sup>ace</sup>
治疗组	1.07 $\pm$ 0.27 <sup>ac</sup>	1.91 $\pm$ 0.33 <sup>ac</sup>	2.77 $\pm$ 0.32 <sup>ace</sup>
CK-MB(U/L)			
对照组	191.78 $\pm$ 31.37	—	—
SAP组	2 157.99 $\pm$ 268.63 <sup>a</sup>	3 841.35 $\pm$ 466.54 <sup>ac</sup>	5 096.14 $\pm$ 276.15 <sup>ace</sup>
治疗组	1 237.47 $\pm$ 251.68 <sup>ac</sup>	1 906.55 $\pm$ 262.43 <sup>ac</sup>	2 972.65 $\pm$ 487.47 <sup>ace</sup>

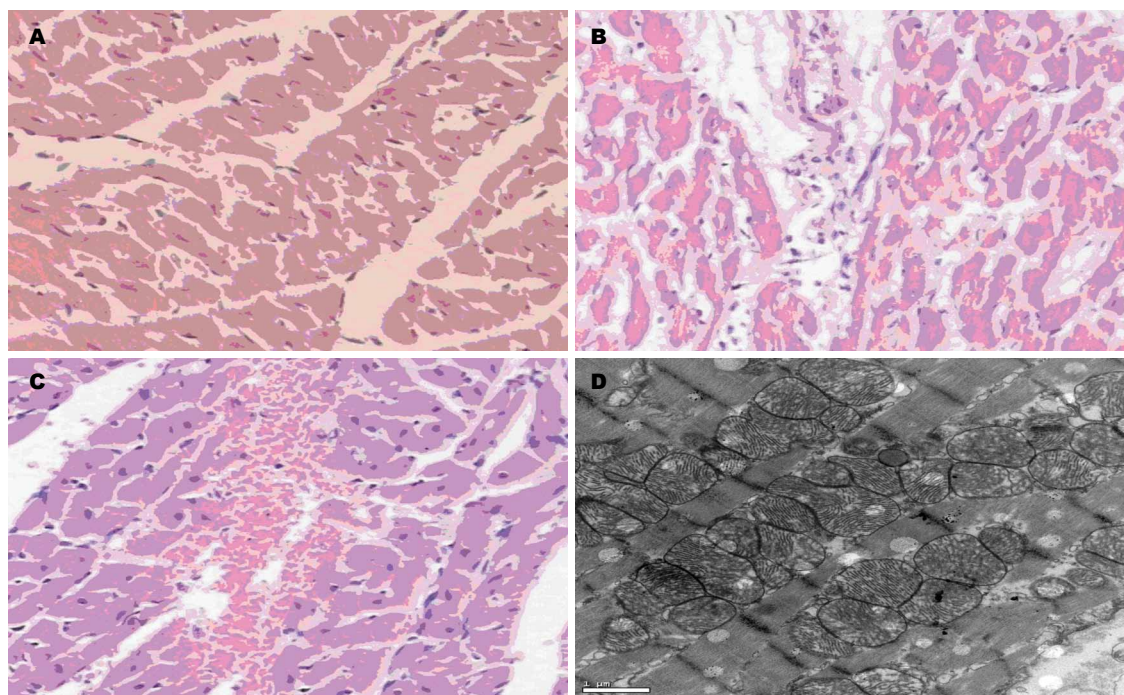
<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 组内4 h时间点; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 组内8 h时间点。

度和MODS, 死亡原因大多数为MOF. 在MODS与MOF中, 以心、肺、肾、肝脏等损害最为常见<sup>[6-8]</sup>. SAP并发AMD的发生是多种机制作用的结果, 细胞黏附分子(adhesion molecule, AM)是一类调节细胞与细胞、细胞与ECM间相互结合, 起黏附作用的细胞表面跨膜糖蛋白. P-选择素与配体PSGL-1结合介导炎症细胞在活化内皮细胞上的滚动和迁移, 还参与血小板和某些T细胞亚群的沿血管壁的滚动过程. VCAM-1与配体 $\beta 1$ 整合素VLA-4(very late antigen-4)结合后选择性地促进单个核细胞如单核细胞、淋巴细胞与内皮细胞黏附的作用. ICAM-1能促进中性粒细胞和内皮细胞的黏附, 诱导中性粒细胞黏附在内皮

细胞和内皮下基质并穿过内皮迁移流入缺血区, 通过阻塞微血管、释放氧自由基等机制导致心肌细胞损伤<sup>[9]</sup>.

本研究的结果显示, 对照组的各时间点P-selectin、VCAM-1和ICAM-1基因表达处于较低水平, 组内各时间点差异无统计学意义( $P > 0.05$ ). 对照组的标本光镜、电镜检查结果未发现有明显形态学改变. SAP组4 h、8 h、12 h各时间点P-selectin、VCAM-1和ICAM-1表达较对照组相同时间点显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 同时8 h、12 h时间点P-selectin、VCAM-1和ICAM-1基因表达显著高于4 h, 12 h时间点各基因的表达显著高于8 h, 差异均有统计学意义





#### 同行评价

本研究选题较好, 结论可信, 对临床也有一定的指导价值。

图3 大鼠心肌光镜图(HE). A-C: 治疗组4 h、8 h、12 h( $\times 400$ ); D: 对照组大鼠心肌电镜( $\times 15\,000$ ).

表5 3组大鼠血清黏附分子浓度 (mean  $\pm$  SD)

分组	n	ICAM-1( $\mu\text{g/L}$ )	VCAM-1( $\mu\text{g/L}$ )	P-selectin( $\text{ng/L}$ )
对照组	30	10.70 $\pm$ 0.79	5.33 $\pm$ 0.60	45.02 $\pm$ 7.35
SAP组				
4 h	10	15.29 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>	8.14 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	62.92 $\pm$ 5.18 <sup>a</sup>
8 h	8	29.47 $\pm$ 2.00 <sup>ac</sup>	9.56 $\pm$ 0.53 <sup>ac</sup>	65.34 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>
12 h	7	32.18 $\pm$ 2.05 <sup>ac</sup>	9.94 $\pm$ 0.63 <sup>ac</sup>	71.49 $\pm$ 1.87 <sup>ac</sup>
治疗组				
4 h	10	12.68 $\pm$ 0.86	6.19 $\pm$ 0.30 <sup>e</sup>	50.68 $\pm$ 2.10 <sup>e</sup>
8 h	10	17.67 $\pm$ 2.02 <sup>e</sup>	6.56 $\pm$ 0.33 <sup>e</sup>	52.76 $\pm$ 3.35 <sup>e</sup>
12 h	9	20.93 $\pm$ 2.14 <sup>e</sup>	6.67 $\pm$ 1.25 <sup>e</sup>	54.70 $\pm$ 2.18 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 组内4 h时间点; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs SAP组相同时间点。

( $P < 0.05$ ). 在本研究中, 对照组血清黏附分子浓度ICAM-1、VCAM-1、P-selectin处于低水平状态, SAP组各时间点血清黏附分子浓度较对照组显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 且8 h、12 h时间点ICAM-1、VCAM-1均显著高于4 h, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 虽然ICAM-1、VCAM-1在12 h较8 h时增加不明显, P-selectin在8 h、12 h时间点血清浓度较4 h血清浓度无显著增高( $P > 0.05$ ), 但是12 h时间点ICAM-1、VCAM-1和8 h、12 h时间点P-selectin仍处于较高水平. 本研究的结果表明, P-selectin、VCAM-1和ICAM-1等黏附分子与各自的配体结合后, 促使单核细胞、白细胞、淋巴细胞等炎

症细胞向毛细血管内皮表面的黏附, 炎症细胞释放的氧自由基与多种酶类将加重内皮细胞细胞和组织损伤, 导致心肌组织形态结构和功能障碍. 本研究形态学结果发现SAP组随时间延长心肌组织坏死程度逐渐加重的结果与之相符.

沙建平等<sup>[10-12]</sup>的动物试验和临床实践研究表明, 中药制剂治疗SAP并发的急性心肌损害有很大的优越性. 研究发现, 益活清胰汤 I 号及重组葡激酶加中药益活清胰汤 I 号通过下调心肌组织NF- $\kappa$ B活化, 降低循环中TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症介质的浓度对心肌起保护作用. 张喜平等研究发现, 中药制剂黄芩苷注射剂具有抗心肌细胞凋亡的作用, 从而对SAP并发的急性心肌损害

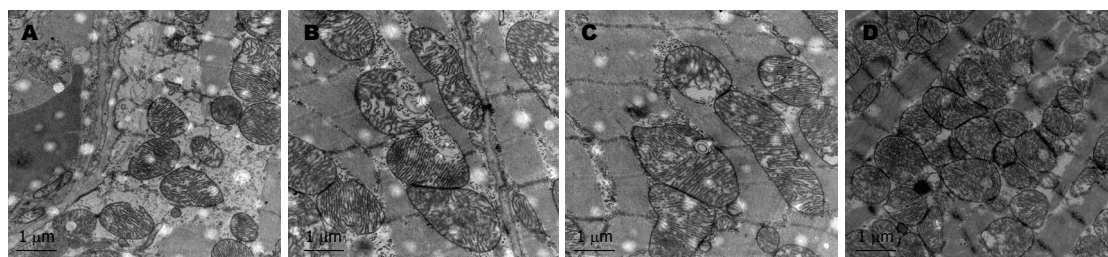


图 4 大鼠心肌电镜. A-C: SAP组4 h、8 h、12 h( $\times 20\,000$ ); D: 治疗组4 h( $\times 15\,000$ ).

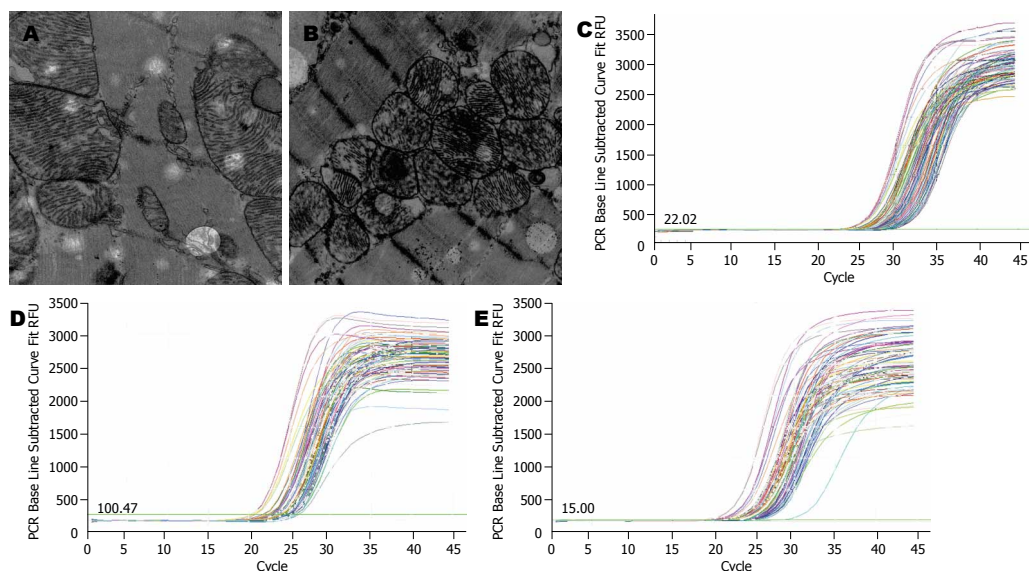


图 5 大鼠心肌电镜. A, B: 治疗组8 h( $\times 20\,000$ )、12 h( $\times 25\,000$ ); C-E: P-selectin、VCAM-1、ICAM-1基因扩增曲线.

表 6 3组大鼠心肌组织P-selectin mRNA的PCR产物的RQ值 (mean  $\pm$  SD)

分组	4 h	8 h	12 h
对照组	0.47 $\pm$ 0.20	0.48 $\pm$ 0.19	0.51 $\pm$ 0.19
SAP组	1.65 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.79 $\pm$ 0.14 <sup>ac</sup>	7.67 $\pm$ 1.76 <sup>ace</sup>
治疗组	1.02 $\pm$ 0.12 <sup>ag</sup>	2.19 $\pm$ 0.25 <sup>ag</sup>	4.23 $\pm$ 0.80 <sup>ag</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs SAP 4 h组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs SAP 8 h组; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs SAP组相同点.

表 7 3组大鼠心肌组织VCAM-1 mRNA的PCR产物的RQ值 (mean  $\pm$  SD)

分组	4 h	8 h	12 h
对照组	0.41 $\pm$ 0.16	0.43 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.17
SAP组	0.91 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.65 $\pm$ 0.17 <sup>ac</sup>	4.28 $\pm$ 0.57 <sup>ace</sup>
治疗组	0.74 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.10 <sup>acg</sup>	2.43 $\pm$ 0.42 <sup>aceg</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs SAP 4 h组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs SAP 8 h组; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs SAP组相同点.

表 8 3组大鼠心肌组织ICAM-1 mRNA的PCR产物RQ值 (mean  $\pm$  SD)

分组	4 h	8 h	12 h
对照组	0.44 $\pm$ 0.18	0.46 $\pm$ 0.18	0.48 $\pm$ 0.17
SAP组	1.06 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.12 <sup>ac</sup>	5.85 $\pm$ 2.92 <sup>ace</sup>
治疗组	0.84 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 0.090 <sup>acg</sup>	2.40 $\pm$ 0.34 <sup>aceg</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs SAP 4 h组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs SAP 8 h组; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs SAP组相同点.

产生保护作用<sup>[13]</sup>. 丹红注射液是一中药组方, 君

药丹参具有改善微循环、抗氧化、抑制细胞膜脂质氧化的作用<sup>[14,15]</sup>. 红花是丹红注射液中的臣药, 红花的活性成分有效地保护细胞免受由缺血引发的氧化损伤及内皮屏障完整性<sup>[16]</sup>. 本实验观察到, 应用丹红注射液干预后, 与SAP组相比, 治疗组大鼠血清CTnI、CK-MB明显降低, 心脏及胰腺的病理损伤明显减轻; 治疗组大鼠心肌组织P-selectin、VCAM-1和ICAM-1基因表达在SAP成模后4 h、8 h、12 h较模型组明显下降, 差异有统计学意义均有( $P < 0.05$ ).

本研究结果表明, 在SAP并发急性心肌损

害早期应用丹红注射液可下调心肌组织P-selectin、VCAM-1和ICAM-1等黏附分子的表达,降低循环和心肌局部血液中黏附分子的浓度,对防治SAP及其合并心脏损害的起积极作用,具有较好的治疗价值。

**志谢:** 在本研究的动物实验过程中得到了多位专家、学者的指导帮助,在动物血样采集、心脏分离提取方面得到了江苏省南通市第二人民医院心胸外科施卫东副主任医师的指导、帮助;在光镜、电镜标本制作、图像分析过程中得到了南通大学附属医院病理诊断中心章建国副主任医师的指导和帮助,在此一并志谢。

#### 4 参考文献

- 1 Rakonczay Z, Hegyi P, Dósa S, Iványi B, Jármai K, Biczó G, Hracskó Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takács T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med* 2008; 36: 2117-2127
- 2 Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Papai G, Varga I, Jarmay K, Kaszaki J, Sari R, Rakonczay Z, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 251-258
- 3 邵明辉, 刘兰梅, 马仁强, 李雪, 庞建新, 徐江平. 丹红注射液一般药理学实验研究. *第一军医大学学报* 2005; 25: 335-338
- 4 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 5 Kishimoto C, Kuroki Y, Hiraoka Y, Ochiai H, Kurokawa M, Sasayama S. Cytokine and murine coxsackievirus B3 myocarditis. Interleukin-2 suppressed myocarditis in the acute stage but enhanced the condition in the subsequent stage. *Circulation* 1994; 89: 2836-2842
- 6 Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF-kappaB expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 548-556
- 7 Xiping Z, Yan P, Xinmei H, Guanghua F, Meili M, Jie N, Fangjie Z. Effects of dexamethasone and Salvia miltiorrhizae on the small intestine and immune organs of rats with severe acute pancreatitis. *Inflammation* 2010; 33: 259-266
- 8 Zhang XP, Tian H, Lai YH, Chen L, Zhang L, Cheng QH, Yan W, Li Y, Li QY, He Q, Wang F. Protective effects and mechanisms of Baicalin and octreotide on renal injury of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5079-5089
- 9 Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Lifschitz-Mercer B, Berger E, Paz Y, Matsa M, Kramer A, Mohr R. Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1554-1561
- 10 蒋建春, 易辉, 沙建平, 刘仕群, 薛耀明, 曾展军, 王玲, 何飞英, 祝彼得, 蒋俊明, 陈卫银. 细胞凋亡调节基因在重症急性胰腺炎大鼠心肌组织中表达及益活清胰汤的干预作用. *成都中医药大学学报* 2008; 31: 24-26
- 11 沙建平, 薛耀明, 陈炫, 曾展军, 卓凤婷, 王玲, 何飞英, 祝彼得, 蒋俊明, 叶夏云. 重组葡激酶加中药对重症急性胰腺炎大鼠心肌核转录因子κ-B的激活作用. *中国中西医结合消化杂志* 2008; 16: 4-7
- 12 陈炫, 沙建平, 赵艳, 胡蓉, 冯本华, 刘芳. 益活清胰 I 号对大鼠重症急性胰腺炎心肌损伤的保护作用. *中国现代医学杂志* 2006; 16: 1345-1348
- 13 Xiping Z, Hua T, Hanqing C, Li C, Zhiwei W, Keyi W, Wei Y, Yun L, Qingyu L, Qing H, Fei W. The protecting effects and mechanisms of Baicalin and Octreotide on heart injury in rats with SAP. *Mediators Inflamm* 2007; 2007: 19469
- 14 张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥. 丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1 mRNA的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 35-38
- 15 Zhang XP, Li ZJ, Liu DR. Progress in research into the mechanism of Radix salviae miltiorrhizae in treatment of acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 501-504
- 16 陈克永. 丹红注射液对血液流变学影响的临床观察. *中国现代医生* 2008; 46: 91

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# 人类MMP3基因5'端转录调控区rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系

陈清波, 高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 姚品芳, 王立东, 李劲

## ■背景资料

食管癌是世界十大恶性肿瘤之一, 在我国食管癌居癌症死因第4位。我国的河南、河北、山西3省交界的太行山区(林州、磁县、阳城县)是食管癌的高发区。

陈清波, 姚品芳, 湖北省肿瘤医院内镜室 湖北省武汉市 430079

高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 李劲, 中南民族大学生命科学院 湖北省武汉市 430074

王立东, 郑州大学基础医学院癌症研究室 河南省郑州市 450052

陈清波, 湖北省肿瘤医院内镜室主任, 主要从事肿瘤的诊断和研究。

湖北省卫生厅医学研究基金资助项目, No. JX4B36

中南民族大学自然科学基金基金资助项目, No. HZY10012

作者贡献分布: 陈清波与高雯琪对此文所作贡献均等; 此课题由李劲、高雯琪、陈清波及姚品芳设计; 研究过程由高雯琪、陈清波、邓志芳、欧阳刚、胡文娟、刘莹及姚品芳操作完成; 数据分析由李劲、高雯琪及陈清波完成; 本论文写作由高雯琪、陈清波与李劲完成。

通讯作者: 李劲, 副教授, 博士, 430074, 湖北省武汉市洪山区民院路708号, 中南民族大学生命科学院。lijin@mail.scuec.edu.cn  
电话: 027-67843181

收稿日期: 2011-07-02 修回日期: 2011-10-11

接受日期: 2011-10-16 在线出版日期: 2011-10-28

## Association of the rs522616 single nucleotide polymorphism in the 5'-transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma

Qing-Bo Chen, Wen-Qi Gao, Zhi-Fang Deng, Yang-Gang Ou, Wen-Juan Hu, Ying Liu, Pin-Fang Yao, Li-Dong Wang, Jin Li

Qing-Bo Chen, Pin-Fang Yao, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Wen-Qi Gao, Zhi-Fang Deng, Yang-Gang Ou, Wen-Juan Hu, Ying Liu, Jin Li, School of Life Sciences, South Central University For Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer Research, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Medical Research Project of Health Ministry of Hubei, No. JX4B36; and the Natural Science Foundation of State Ethnic Affairs Commission of China, No. HZY10012

Correspondence to: Jin Li, Associate Professor, School of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Min Yuan Road 708, Hong Shan District, Wuhan 430074, Hubei, China. lijn@mail.scuec.edu.cn

Received: 2011-07-02 Revised: 2011-10-11

Accepted: 2011-10-16 Published online: 2011-10-28

## ■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

## Abstract

**AIM:** To investigate the genetic association between a single nucleotide polymorphism [-774 rs522616 (A/G)] in the matrix metalloproteinase 3 gene and susceptibility to esophageal cancer.

**METHODS:** Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples of sporadic cases of esophageal cancer in both Henan and Hubei, immigrants from an area of high incidence in Henan, and healthy controls in both Henan and Hubei. The rs522616 polymorphism was genotyped using PCR-RFLP, and genotyping results were analyzed using SPSS software.

**RESULTS:** The rs522616 (A/G) allele has three genotypes: GG, GA and AA. There were significant differences between healthy controls in Hubei and sporadic cases of esophageal cancer in Henan in genotypes GG and AA ( $P = 0.001$ ,  $0.003$ ;  $OR = 4.249$ ,  $4.424$ ); immigrants from an area of high incidence in Henan and healthy controls in genotype GG ( $P = 0.019$ ,  $OR = 0.488$ ); sporadic cases of esophageal cancer in Henan and sporadic cases of esophageal cancer in Hubei in genotypes GG and AA ( $P = 0.04$ ,  $0.001$ ;  $OR = 1.926$ ,  $0.282$ ); immigrants from an area of high incidence in Henan and sporadic cases of esophageal cancer in Henan in genotypes AG and AA ( $P = 0.024$ ,  $0.005$ ;  $OR = 0.549$ ,  $2.311$ ); and sporadic cases of esophageal cancer in Henan and healthy controls in Henan in genotypes AG and AA ( $P = 0.049$ ,  $0.005$ ;  $OR = 1.65$ ,  $2.311$ ). Moreover, there were significant differences between people in Hubei and those in Henan in genotype AA ( $P = 0.001$ ,  $OR = 2.553$ ), and between healthy controls (including healthy controls both in Henan and Hubei) and sporadic cases of esophageal cancer (including sporadic cases of esophageal cancer both in Henan and Hubei) in genotype AA ( $P = 0.001$ ,  $OR = 2.152$ ).

**CONCLUSION:** The single nucleotide polymorphism rs522616 in the transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase 3 gene is apparently associated with susceptibility

to esophageal cancer.

**Key Words:** Matrix metalloproteinase 3; Transcriptional regulatory region; Single nucleotide polymorphism; Esophageal squamous cell carcinoma; Genetic susceptibility

Chen QB, Gao WQ, Deng ZF, Ou YG, Hu WJ, Liu Y, Yao PF, Wang LD, Li J. Association of the rs522616 single nucleotide polymorphism in the 5'-transcriptional regulatory region of the human matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3130-3136

## 摘要

**目的:** 探寻人类基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)基因单核苷酸多态性与食管鳞癌易感性的关系。

**方法:** 选择mmp3基因上游转录调控区-774位rs522616(A/G)位点为研究对象. 利用蛋白酶K法提取人类外周血基因组DNA; 采用PCR-RFLP的方法对外周血标本进行基因分型, 分别对河南食管鳞癌散发病例、湖北食管鳞癌散发病例以及两地正常人、河南高发区移民的不同人群组合做病例-对照分析. 运用SPSS软件(version17.0)对基因分型结果进行数据统计分析。

**结果:** rs522616(A/G)等位基因有AA、AG、GG 3种分型. 湖北正常人群与河南散发人群在AA基因型频率上有显著差异( $P=0.001$ ,  $OR=4.249$ ), 在GG基因型频率有差异( $P=0.003$ ,  $OR=4.424$ ); 湖北正常人群与河南高发区移民在GG基因型频率上有差异( $P=0.019$ ,  $OR=0.488$ ); 湖北散发人群和河南散发人群在GG基因型频率上有差异( $P=0.04$ ,  $OR=1.926$ )、在AA基因型频率上有显著差异( $P=0.001$ ,  $OR=0.282$ ); 河南散发患者与河南正常人群有在AA基因型频率上有显著差异( $P=0.001$ ,  $OR=1.893$ )、在AG基因型频率上有差异( $P=0.049$ ,  $OR=1.652$ ); 河南高发区移民与河南散发患者在AA基因型频率上有显著差异( $P=0.005$ ,  $OR=2.311$ )、在AG基因型频率上有差异( $P=0.024$ ,  $OR=0.549$ ); 另外, 湖北人群(湖北正常人群+湖北散发患者)与河南人群(河南正常人群+河南散发患者)在AA基因型频率有显著差异( $P=0.001$ ,  $OR=2.553$ ); 湖北与河南两地的正常人群与两地的散发病例AA基因型频率有显著差异( $P=0.001$ ,  $OR=2.152$ )。

**结论:** MMP3基因上游转录调控区rs522616单

核苷酸多态性与人群食管鳞癌的遗传易感性有明显相关。

**关键词:** 基质金属蛋白酶3; 转录调控区; 单核苷酸多态性; 食管鳞癌; 遗传易感关联分析

陈清波, 高雯琪, 邓志芳, 欧阳刚, 胡文娟, 刘莹, 姚品芳, 王立东, 李劲. 人类MMP3基因5'端转录调控区rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系. *世界华人消化杂志* 2011; 19(30): 3130-3136

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3130.asp>

## 0 引言

食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是世界十大恶性肿瘤之一, 也是我国最常见的癌症之一, 目前其临床治疗效果还相当有限, 5年生存率不到15%<sup>[1]</sup>. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类依赖锌离子的蛋白水解酶, 迄今为止在人基因组中已经发现了26种. MMPs具有降解细胞外基质等功能, 同时在细胞核内通过对基因的转录调控来调节细胞的生长和凋亡, 影响血管生成和免疫监视, 在肿瘤发生的早期起重要作用<sup>[2,3]</sup>. 在MMP3基因上众多的SNPs中, 5'端转录调控区的-1171 5A/6A位点备受关注. 其启动子区-1171存在的5A和6A的基因多态性与多种肿瘤的易感性相关, 国内外对其进行了大量研究表明, 5A基因型可能与女性乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌以及口腔黏膜下纤维化患病风险相关<sup>[4-6]</sup>. 国内学者张健慧等<sup>[7]</sup>研究结果表明, 5A基因型与食管鳞癌易感呈相关性, 但5A基因型与贲门癌(gastric cardiac adenocarcinoma, GCA)易感性不相关. 欧阳刚等<sup>[8-10]</sup>利用病例-对照分析, 发现MMP3基因2号外显子单核苷酸多态性rs679620与食管鳞状上皮细胞癌相关. MMP3基因5'调控区SNP多态性与食管癌相关性尚未见报道. 本研究利用PCR-RFLP技术对湖北、河南食管鳞癌散发患者以及两地正常人、河南高发区移民的不同人群分组进行MMP3基因SNP分型研究, 旨在发现MMP3基因上游5'端转录调控区的rs522616单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 蛋白酶K为默克公司产品, 引物、dNTP购于上海赛百盛基因技术有限公司, Taq聚合酶购于天根生化科技(北京)公司, *EcoR* I 限制性内切酶购于TaKaRa公司。

## ■研究前沿

食管癌的发生与遗传、环境及生活方式密切相关, 他是多因素作用, 多基因参与, 多阶段发展的疾病. 对食管癌的发生和发展的分子遗传机制的研究是我国癌症研究的热点之一。



## ■相关报道

近有报道, MMP3 也存在于肝细胞核内并参与细胞凋亡的过程。进一步的研究表明, MMP3 含有的多个 NLS(nuclear localization signal) 介导 MMP3 的细胞核内定位; 其多肽链 C 末端的 PEX 区域参与核内 DNA 的结合, 并证实了 MMP3 作为反式因子参与细胞核内基因的转录调控。

## 1.2 方法

1.2.1 分组: 所有研究对象的血样样本按来源地区(籍贯)和食管鳞癌病理诊断(并排除有其他恶性肿瘤病史)分为 5 组: (1)湖北省食管鳞癌散发患者的 EDTA 抗凝血由湖北省肿瘤医院经胃镜检查 and 病理切片诊断后收集[男 70 例, 女 25 例; 年龄范围 44-82(平均  $64.4 \pm 9.6$ ) 岁]; (2)湖北正常对照为中国人民解放军广州军区武汉总医院和武汉市中医医院随机收集的非肿瘤患者的 EDTA 抗凝静脉血[男 87 例, 女 40 例; 年龄范围 40-78(平均  $55.8 \pm 10.6$ ) 岁]; (3)湖北省钟祥的河南高发区(淅川)移民对照随机选自该地区自愿参加内镜普查移民人群的 EDTA 抗凝静脉血[男 70 例, 女 35 例; 年龄范围 40-69(平均  $52.3 \pm 7.8$ ) 岁], 由湖北省肿瘤医院收集, 并经胃镜检查 and 病理活检证实来自非食管癌患者; (4)河南高发区(安阳市人民医院诊断收治的)食管鳞癌患者[男 92 例, 女 37 例; 年龄范围 40-77(平均  $59.6 \pm 6.8$ ) 岁]; (5)安阳当地正常对照, 随机选自该地区自愿参与内镜普查人群的 EDTA 抗凝静脉血[男 80 例, 女 40 例; 年龄范围 40-87(平均  $54.4 \pm 9.7$ ) 岁], 由郑州大学基础医学院癌症研究室提供; 所有标本均为  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。按分层抽样原则, 各实验组的个体年龄均大于 40 岁, 每组男女性别比例按 2:1 抽样, 使之与人群食管鳞癌患者实际性别比例一致; 两两相互匹配(包括年龄、性别和地域匹配)的两肿瘤组和三对照组相互间在年龄、性别分布上分别经  $t$  检验和  $\chi^2$  检验均无统计学差异( $P > 0.05$ ,  $t > 0.05$ )。在不同人群的年龄、性别和地域相匹配和针对医院诊断明确的食管鳞癌患者血样全收集及正常对照人群血样随机收集的前提下, 按随机分层抽样原则取样分析, 并利用 Hardy-Weinberg 平衡法检测样本以确保抽样的群体代表性。

1.2.2 设计引物及限制性内切酶筛选: 根据 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 查询 MMP3 基因序列信息, 利用软件 Primer Premier (version 5.0) 设计引物和筛选限制性内切酶。上游引物: 5'-AACAAAGAGGGTCTGTGAAAA-3'; 下游引物 5'-GGTAAGCAATGTAATTCATTTGA-3'。扩增片段长度 142 bp, 退火温度为  $46.5^{\circ}\text{C}$ 。因 rs522616 无酶切位点, 所以在下游引物 3' 端第 2 个碱基人为地由 "C" 改为 "G", 使之与多态性位点形成 GAATTC, 即 *EcoR* I 的酶切识别序列。PCR 扩增片段(142 bp)酶切后片段长度为 119 bp 和 23 bp。

表 1 PCR 扩增体系

成分	体积( $\mu\text{L}$ )
ddH <sub>2</sub> O	20.50
10 × Buffer	2.50
100 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	0.25
100 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	0.25
10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP	0.25
Taq 聚合酶	0.25
人体基因组 DNA 模板	1.00
总体积	25.00

1.2.3 基因组 DNA 制备: 抽取 200  $\mu\text{L}$  抗凝血至于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 无菌蒸馏水裂红后, 经细胞裂解液(内含 NaCl/EDTA、SDS 及蛋白酶 K)裂解, 于  $56^{\circ}\text{C}$  温箱中孵育 3 h, 氯仿异戊醇抽提 DNA, 以荧光光度计检测 DNA 浓度, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.4 PCR 扩增: 按照 Taq 聚合酶使用说明书配置反应体系(表 1)。经温度梯度实验后确定最优 PCR 反应程序: (1)  $94^{\circ}\text{C}$ , 5 min; (2)  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min; (3)  $46.5^{\circ}\text{C}$ , 1 min; (4)  $72^{\circ}\text{C}$ , 15 s; (5) 回到步骤(2), 35 循环; (6)  $72^{\circ}\text{C}$ , 10 min。PCR 反应结束后, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 凝胶成像仪拍照。

1.2.5 限制性内切酶酶切: 按照 *EcoR* I 的产品说明书体系和要求进行酶切。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测基因分型: 本实验所用凝胶浓度为 8%, 以  $1 \times \text{TBE}$  为电解液, 电压 15 V/cm。电泳完成后, EB 染色, 凝胶成像仪拍照。

1.2.7 MMP3 基因 5' 端调控区 DNA 序列中转录因子核心序列的搜索与比对: 通过生物信息学方法对 MMP3 基因上游 5' 转录调控区进行分析, 运用 Searching Transcription Factor Binding Sites(ver 1.3) 软件(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)对 MMP3 基因翻译起始点上游 -2 000 bp 区域的预测结果显示, 可能与 rs522616 附近核苷酸序列结合的转录因子有 C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein beta) 和 CRE-BP1(cAMP-responsive element binding protein 1)。Williams 等<sup>[11]</sup>对增强子 C/EBP 转录调节功能的研究发现, C/EBP 所结合的顺式作用元件核心序列为 TTAATTGCTTCA。据此, 应用 Clustal-W 软件对 MMP3 基因 5' 端调控区 DNA 序列进行比对。

统计学处理 对于实验中涉及的人群信息包括年龄、是否患食管癌、SNP 位点基因分型

表 2 不同人群MMP3 SNP rs522616基因分型统计

分组	<i>n</i>	GG <i>n</i> (%)	AG <i>n</i> (%)	AA <i>n</i> (%)	Hardy-Weinberg 平衡 <i>P</i> 值	G : A
湖北正常人群	127	43(0.339)	68(0.535)	16(0.126)	0.1707	0.606 : 0.394
湖北散发病例	95	28(0.295)	53(0.558)	14(0.147)	0.1707	0.574 : 0.426
河南高发区正常人群	120	30(0.250)	68(0.567)	22(0.183)	0.1295	0.533 : 0.467
河南高发区散发病例	129	23(0.178)	57(0.442)	49(0.380)	0.3704	0.399 : 0.601
高发易感移民人群	105	21(0.200)	62(0.590)	22(0.210)	0.0636	0.495 : 0.505

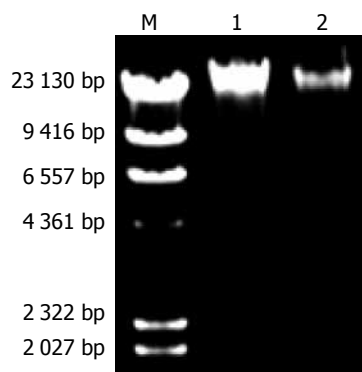


图 1 蛋白酶K法提取外周血基因组DNA。1, 2: 人体外周血基因组条带; M: Marker.

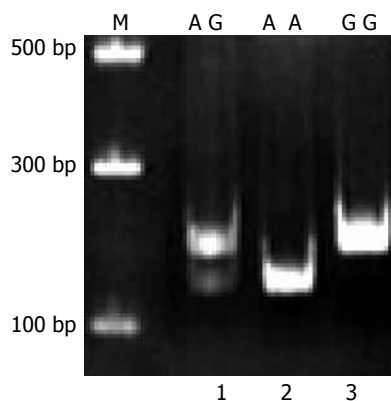


图 2 rs522616区域DNA PCR扩增产物EcoR I 酶切结果。1-3: EcoR I 完全酶切产物; M: Marker.

等数据, 首先输入EXCEL里进行初步处理; 然后运用SPSS17.0软件包, 进行 $t$ 检验、 $\chi^2$ 检验、Logistic regression分析等; HWE值用SHEsis软件(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)计算。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 基因组DNA提取 提取后的人体外周血基因组DNA经琼脂糖凝胶电泳结果(图1)。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳基因分型 PCR产物酶切后经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 依据基因分型结果可知, rs522616 PCR扩增产物经EcoR I 完全酶切后产生3种结果, 1号泳道为杂合型半数酶切, 从上到下2个片段大小分别为142 bp、119 bp, 即A/G基因型; 2号泳道为纯合型完全酶切, 单一片段大小为119 bp, 即A/A基因型; 3号泳道为纯合型完全不酶切, 此单一片段大小为142 bp, 即G/G基因型(图2)。其中, 随机抽样上述PCR产物的10%进行DNA测序验证, 其结果与酶切结果相符合。

2.3 MMP3基因型相关数据统计 rs522616基因型频率差异的统计结果见表2, 之后对rs522616各组间的基因型进行 $\chi^2$ 检验和Logistic回归分析。对研究对象中的湖北人群(包括湖北食管鳞癌病例和湖北正常人群共计222人)与河南人群(包括河南食管鳞癌散发病例和河南正常人群共计249人)的MMP3 SNP rs522616基因分型进行

$\chi^2$ 检验和Logistic回归分析, 发现: 具AA基因型的河南人群达28.5%, 湖北人群仅为13.5%( $P = 0.001$ ,  $\chi^2 = 15.677$ ,  $OR = 2.553$ , 95%CI = 1.591-4.097, 两人群Hardy-Weinberg 平衡*P*值均>0.05; 此两种人群在性别、年龄及籍贯上能相互匹配)。对研究对象中的正常人群(包括湖北和河南正常人群共计247人)与两地食管鳞癌患者(包括湖北和河南食管鳞癌病例共计224人)的MMP3 SNP rs522616基因分型进行 $\chi^2$ 检验和Logistic回归分析发现: 具AA基因型的两地食管鳞癌患者达28.1%, 两地正常人群仅为15.3%( $P = 0.001$ ,  $\chi^2 = 11.319$ ,  $OR = 2.152$ , 95%CI = 1.370-3.382, 两人群Hardy-Weinberg平衡*P*值均>0.05; 此两种人群在性别、年龄及籍贯上能相互匹配, 表3)。

经SPSS检验, 发现在rs522616(G/A)SNP位点上, 湖北正常人群与河南食管鳞癌人群在AA基因型频率上有显著差异( $P = 0.001$ ,  $OR = 4.249$ ); 在GG基因型频率有差异( $P = 0.003$ ,  $OR = 4.424$ ); 湖北正常人群与河南高发区移民在GG基因型频率上有差异( $P = 0.019$ ,  $OR = 0.488$ ); 湖北食管鳞癌人群和河南食管鳞癌人群在GG基因型频率上有差异( $P = 0.04$ ,  $OR = 1.926$ ); 在AA基因型频率上有显著差异( $P = 0.001$ ,  $OR = 0.282$ );

## ■创新盘点

新发现在基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)基因基因的5'端转录调控区DNA序列中单核苷酸多态性位点rs522616具有AA型的人有更高的MMP3的表达量, 更容易罹患食管癌, 且更快地引起癌症的转移。这也可能是食管癌高发区特别是一些高发家族里有较多人患食管癌并且预后很差的原因之一。

## ■应用要点

这项研究对于食管癌易患人群卫生工作中的“预防为主”和“早诊早治”来说, SNP-rs522616可作为一个潜在的食管癌易感性的“肿瘤标志物”, 可指导相关的预防、治疗和研究工作。

表 3 分组人群MMP3 SNP rs522616基因型频率差异 $\chi^2$ 检验和Logistic回归分析

不同人群 组间比较		GG		AG		AA	
		P值	$\chi^2$ 值	P值	$\chi^2$ 值	P值	$\chi^2$ 值
		OR值	95%CI	OR值	95%CI	OR值	95%CI
湖北 正常组 vs	湖北散发人群	0.488	0.480	0.739	0.111	0.645	0.213
		0.816	0.460–1.450	1.095	0.642–1.868	1.199	0.554–2.596
	河南高发区正常人群	0.127	2.325	0.622	0.243	0.212	1.559
		0.651	0.651–1.132	1.135	0.687–1.874	1.557	0.774–3.133
	河南高发区散发病例	0.003	8.593	0.134	2.243	0.001	21.771
		0.424	0.237–0.758	1.456	0.890–2.382	4.249	2.256–8.005
湖北 散发组 vs	高发易感移民人群	0.019	5.526	0.400	0.707	0.109	2.929
		0.488	0.267–0.893	1.251	0.742–2.109	1.839	0.910–3.718
	河南高发区正常人群	0.462	0.539	0.898	0.017	0.483	0.492
		0.798	0.436–1.460	1.036	0.602–1.783	1.299	0.625–2.700
	河南高发区散发病例	0.040	4.219	0.086	2.947	0.001	14.627
		1.926	1.025–3.619	1.594	0.935–2.718	0.282	0.144–0.551
河南高发区 散发组 vs	高发易感移民人群	0.12	2.420	0.642	0.217	0.253	1.305
		1.672	0.872–3.204	0.875	0.499–1.534	0.652	0.312–1.362
	河南高发区正常人群	0.167	1.908	0.049	3.874	0.001	11.778
		0.651	0.353–1.200	1.652	1.001–2.726	1.893	1.041–3.442
	高发易感移民人群	0.673	0.179	0.024	5.115	0.005	7.945
		0.868	0.450–1.675	0.549	0.326–0.925	2.311	1.282–4.166
河南高发区 正常组 vs	高发易感移民人群	0.371	0.799	0.718	0.130	0.621	0.244
		0.750	0.399–1.411	1.103	0.649–1.875	1.181	0.611–2.283

河南食管鳞癌患者与河南正常人群有在AA基因型频率上有显著差异( $P = 0.001$ ,  $OR = 1.893$ ), 在AG基因型频率上有差异( $P = 0.049$ ,  $OR = 1.652$ ); 河南高发区移民与河南食管鳞癌患者在AA基因型频率上有显著差异( $P = 0.005$ ,  $OR = 2.311$ ), 在AG基因型频率上有差异( $P = 0.024$ ,  $OR = 0.549$ ); 另外, 湖北人群(湖北正常人群+湖北食管鳞癌患者)与河南人群(河南正常人群+河南食管鳞癌患者)在AA基因型频率有显著差异( $P = 0.001$ ,  $OR = 2.553$ ); 湖北与河南两地的正常人群与两地的食管鳞癌病患在MMP3 SNP rs522616基因AA基因型频率有显著差异( $P = 0.001$ ,  $OR = 2.152$ ). 因此, 河南人群在MMP3基因5'端调控区rs522616位点上具有明显较高的AA基因型频率可能与其食管鳞癌遗传易感性有明显的关联关系。

**2.4 MMP3基因5'端调控区DNA序列中转录因子核心序列的搜索与比对的结果** 应用Clustal-W软件对MMP3基因5'端调控区DNA序列进行比对发现, rs522616及附近DNA序列与其能较好匹配, 且rs522616的第14位为单核苷酸多态性位点(图3)。

### 3 讨论

湖北省钟祥柴湖乡在50多年前因整体迁入河南

```

          ****  **  ****  *
1 rs522616 T T A T C A C A T C T T A A C T T A C T T A A T G T A A
2 C/EBP   - - - - - T T A A - - T T G T T C A - - - - -

```

图 3 C/EBP核心序列与MMP3基因5'端调控区DNA序列的Clustal-W比对。

浙川食管癌高发区居民(约4万人)而成为一个新的相对封闭的食管癌高发区。这一特殊的人群为研究环境、遗传与食管癌的关系提供了极佳的样本。2004年初湖北省肿瘤医院对钟祥柴湖乡进行的流行病学调查结果显示, 该迁移人群人口已增长至10万多人, 其食管癌的发病率、死亡率仍呈上升趋势( $>131/10$ 万)<sup>[12,13]</sup>。在以往的食管癌普查过程中, 利用电子内窥镜检查发现, 移民村的居民与湖北当地的土著居民相比较食管生理状态存在明显不同和异常。与环境因素相比, 河南移民村居民极为明显的食管癌家族聚集趋势提示遗传因素在食管癌变过程中起着重要作用<sup>[12,13]</sup>。

已发现MMP1、MMP2、MMP3基因多态性与一些肿瘤的遗传易感性相关, 进一步研究MMPs家族其他成员与肿瘤易感性的关系将为肿瘤的预防和早期诊断及治疗提供更完善的分子生物学基础<sup>[14]</sup>。近有报道, MMP3也存在于肝

细胞核内并参与细胞凋亡的过程<sup>[3]</sup>. 进一步的研究表明, MMP3含有的多个NLS(nuclear localization signal)介导MMP3的细胞核内定位; 其多肽链C末端的PEX区域参与核内DNA的结合, 并证实了MMP3作为反式因子参与细胞核内基因的转录调控<sup>[15]</sup>. 其中, MMP3蛋白第44-56位氨基酸的NLS<sub>0</sub>(LKDVDKQFVRRKD)中含有SNP Lys45Glu(rs679620), 他的多态性对NLS<sub>0</sub>的影响及其后续的转录调控和细胞凋亡的改变可能与癌症的发生和发展相关<sup>[8,9]</sup>. 随着MMP3在肿瘤发生、发展和转移中的作用机制研究的进展, 将会进一步了解有关MMP3基因5'端转录调控区单核苷酸多态性对MMP3蛋白的表达效率和数量, 及其在细胞代谢和周期调控中的影响, 进而揭示其在诱发肿瘤及其导致肿瘤转移中的作用机制. 迄今为止, 对MMP3与肿瘤的关系的研究大都集中在研究其基因启动子区域的-1171的5A/6A SNP现象, 而对基因5'端转录调控区其他SNP的筛查和研究报道极少<sup>[16]</sup>. 一般认为, 转录因子特异结合序列可能因其碱基组成和排列的变化, 导致转录因子对核苷酸序列识别和结合能力的改变, 造成转录活性增强或者减弱, 进而改变MMP3蛋白的表达量, 这有可能对肿瘤发生、发展和转移产生较大影响.

转录因子C/EBP特异识别和结合的核心序列与MMP3基因5'端调控区rs522616附近核苷酸序列能良好匹配, 而转录因子C/EBP(CCAAT enhancer factor)是CCAAT增强子结合蛋白, 显然他对其调控的基因表达有重要影响. 国内外研究者发现C/EBP $\beta$ 与肿瘤细胞的侵袭和扩散有关, 过表达的C/EBP $\beta$ 可以激活elafin在乳腺癌细胞中表达, 使癌细胞侵袭和转移能力增强<sup>[17,18]</sup>. 这些表明, C/EBP转录因子在肿瘤的发生和发展中可能具有重要的作用.

MMP3基因5'端转录调控区DNA序列中单核苷酸多态性位点rs522616由G到A的改变, 显示其更符合C/EBP转录因子与之结合的序列要求, 即具更强的结合能力导致更明显的增强子作用, 因此rs522616的A型MMP3的转录效率也会显著增强. MMP3蛋白表达量的升高则会导致肿瘤易感和浸润扩散以及预后效果差, 这种遗传差异暗示河南食管癌高发区人群较高比例的MMP3基因rs522616的AA基因纯合型可能与其食管癌高发有关; 在基因转录调控区顺式因子中关键性的单核苷酸的改变有可能导致转录因子在与之结合时结构有明显改变, 以致对MMP3

基因的表达调控也发生重大变化, 引起细胞生长分化的错误, 加速肿瘤的发生、发展和转移.

Cre-BP1(ATF-2)重要的细胞信号转导途径中的转录因子乙型肝炎病毒X蛋白与C/EBP $\alpha$ 和ATF-2相互作用形成复合物而作用于近端启动子的cAMP反应元件位点(CRE-1), 从而介导了磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶基因的反式激活<sup>[19]</sup>, 从而诱导一系列生理生化过程的改变. 转录因子C/EBP和Cre-BP1可能在rs522616附近核苷酸序列结合后相互作用, G $\rightarrow$ A的改变, 共同作用导致MMP3基因转录效率的增强.

由此看出, rs522616由G到A的单核苷酸多态性改变(特别是AA基因纯合型)可作为潜在的人群食管癌易感性的肿瘤标志物. 不过, 以上分析尚需深入的多方面研究来证实.

总之, 通过MMP3基因5'端调控区单核苷酸多态性(rs522616)进行SNP分型检测及统计分析, rs522616的AA基因型与食管癌的部分人群高发和易感呈现明显的相关性.

#### 4 参考文献

- 1 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究. 中华流行病学杂志 2003; 24: 939-943
- 2 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174
- 3 Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc JF, Robinson DR, Rosenbaum J. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* 2006; 169: 1390-1401
- 4 Zinzindohoué F, Blons H, Hans S, Lorient MA, Houllier AM, Brasnu D, Laccourreye O, Tregouet DA, Stucker I, Laurent-Puig P. Single nucleotide polymorphisms in MMP1 and MMP3 gene promoters as risk factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 2021-2026
- 5 Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3820-3823
- 6 Tu HF, Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Kao SY, Chang CP, Liu TY. The functional (-1171 5A $\rightarrow$ 6A) polymorphisms of matrix metalloproteinase 3 gene as a risk factor for oral submucous fibrosis among male areca users. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 99-103
- 7 Zhang J, Jin X, Fang S, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Kuang G, Dong Z. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2519-2524
- 8 欧阳刚, 姚品芳, 胡文娟, 黄环元, 王红, 王朝元, 陈思礼, 王立东, 李劲. MMP3基因Lys45Glu单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2456-2462

#### ■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 研究内容具有一定的研究价值.

- 9 Ouyang G, Yao PF, Hu WJ, Chen QB, Wang H, Wang LB, Li J. A non-synonymous coding SNP Lys45Glu of MMP3 associated with ESCC genetic susceptibility in population of Henan, China. *Chin-Ger J Clin Oncol* 2009; 8: 510-515
- 10 欧阳刚, 胡文娟, 姚品芳, 黄环元, 王红, 王朝元, 陈思礼, 王立东, 李劲. PCR-RFLP中Chelex-100制备DNA模板方法建立及其条件优化. 中南民族大学学报(自然科学版) 2009; 28: 38-41
- 11 Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE. C/EBP regulates hepatic transcription of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 30232-30239
- 12 姚品芳, 黄环元, 付由高, 李广灿, 夏和顺, 杨小玲, 王瑞勤, 王锡印, 沙聚伟. 湖北钟祥河南移民与湖北本地居民食管鳞状细胞癌组织中HPV感染的比较. 肿瘤防治研究 2005; 32: 46-48
- 13 Yao PF, Li GC, Li J, Xia HS, Yang XL, Huang HY, Fu YG, Wang RQ, Wang XY, Sha JW. Evidence of human papilloma virus infection and its epidemiology in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1352-1355
- 14 金霞, 张健慧. 基质金属蛋白酶基因多态性的研究进展. 国外医学·遗传分册 2005; 28: 76-79
- 15 Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 2391-2413
- 16 葛金梅, 张忠英, 彭宣宪, 任建林. SNP的研究现状及在MMPs研究中的应用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2128-2137
- 17 Sterneck E, Zhu S, Ramirez A, Jorcano JL, Smart RC. Conditional ablation of C/EBP  $\beta$  demonstrates its keratinocyte-specific requirement for cell survival and mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 2006; 25: 1272-1276
- 18 O'Brien P, O'Connor BF. Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 1130-1145
- 19 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕. 乙型和丙型肝炎病毒与转录因子ATF-2的调节. 世界华人消化杂志 2004; 12: 165-168

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

**本刊讯** 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能写Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L),  $\phi$ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, *V*<sub>d</sub>, *T*<sub>1/2</sub> *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.



# EZH2在肝癌发生发展中功能的研究进展

张莹莹, 周晓巍, 黄培堂

张莹莹, 周晓巍, 黄培堂, 中国人民解放军军事医学科学院  
生物工程研究所 北京市 100071

艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治国家重大基金资助  
项目, No. 2008ZX10002-021

作者贡献分布: 本论文由张莹莹综述, 周晓巍和黄培堂审校。

通讯作者: 黄培堂, 研究员, 100071, 北京市丰台区东大街20号,  
军事医学科学院生物工程研究所蛋白质工程研究室。

amms832@126.com

电话: 010-66948832 传真: 010-66948833

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011-10-22

接受日期: 2011-10-25 在线出版日期: 2011-10-28

## Progress in understanding the role of EZH2 in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma

Ying-Ying Zhang, Xiao-Wei Zhou, Pei-Tang Huang

Ying-Ying Zhang, Xiao-Wei Zhou, Pei-Tang Huang, In-  
stitute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sci-  
ence, Chinese PLA, Beijing 100071, China

Supported by: the National Science and Technology  
Key Project on "Major Infectious Diseases such as HIV/  
AIDS, Viral Hepatitis Prevention and Treatment", No.  
2008ZX10002-021

Correspondence to: Pei-Tang Huang, Researcher Labo-  
ratory of Protein Engineering, Institute of Biotechnology,  
Academy of Military Medical Science, Chinese PLA, 20  
East Avenue, Fengtai District, Beijing 100071,  
China. amms832@126.com

Received: 2011-04-28 Revised: 2011-10-22

Accepted: 2011-10-25 Published online: 2011-10-28

## Abstract

Primary hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies, with a multifaceted molecular pathogenesis. The activation of proto-oncogenes and the inactivation of tumor suppressor genes induced by genetic and epigenetic alterations are major mechanisms of hepatocarcinogenesis. The Polycomb-group gene EZH2 is a newly identified oncogene with gene silencing function, which is mediated by intrinsic histone methyltransferase activity for trimethylation of histone h3 lysine 27 (H3K27me3) and involved in regulation of X-inactivation, cell differentiation and embryonic development. In recent years, EZH2 has been reported to be highly expressed in HCC and is closely related to hepatocarcinogenesis by aberrant regulation

of tumor-associated gene expression. In this paper we give an overview of the role of EZH2 in the development of HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; EZH2; Histone methyltransferase; H3K27me3; Gene silencing

Zhang YY, Zhou XW, Huang PT. Progress in understanding the role of EZH2 in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3137-3142

## 摘要

多种因素引起的原癌基因激活和抑癌基因失活是导致肝癌发生发展的主要原因。EZH2是新近发现的具有组蛋白甲基转移酶活性的癌相关基因, 主要通过催化H3K27me3修饰介导基因沉默, 参与X染色体失活、细胞分化和胚胎发育调节。近来发现, EZH2在多种机制调节下在肝癌组织中过度表达, 通过多种机制调控其下游基因异常表达, 从而参与肝癌发生发展的多个过程。本文针对以上进行了总结和讨论。

**关键词:** 肝癌; EZH2; 组蛋白甲基转移酶; H3K27mer3; 基因沉默

张莹莹, 周晓巍, 黄培堂. EZH2在肝癌发生发展中功能的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(30): 3137-3142

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3137.asp>

## 0 引言

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 病死率高, 我国每年因肝癌死亡人数约30万人, 占世界肝癌死亡人数的45%, 严重威胁人们的生命健康和生活质量<sup>[1]</sup>。多种因素可导致肝癌的发生, 如病毒感染、黄曲霉素暴露和重度脂肪肝等。目前认为, 肝癌发生是一个多基因表达异常引起的综合病变过程, 原癌基因和抑癌基因在多种调控机制作用下被异常激活或失活是导致肿瘤发生的主要原因<sup>[1]</sup>。一直以来, 遗传学上的基因突变、缺失或扩增被认为是影响基因表达

## ■背景资料

肝癌的发生发展与多种癌基因的激活和抑癌基因的失活密切相关。组蛋白甲基化酶EZH2在多种机制调节下在肝癌组织中过度表达, 从而参与肝癌发生发展的多个过程。了解更多EZH2与肝癌发生的关系及其分子机制, 将对开发针对EZH2的特异性药物用于肝癌治疗具有重要价值。

## ■同行评议者

黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医学院普外科; 王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科



## ■ 研发前沿

表观遗传学机制异常在肿瘤发生发展中的作用目前已成为肿瘤发生机制的研究热点,同时从表观遗传学机制角度开发肿瘤治疗药物已逐渐成为药物研发的重要方向。目前已有DNA甲基化酶抑制剂5'-aza-2'dC,组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA和组蛋白甲基化酶抑制剂DZNep等用于肿瘤治疗的研究。

的主要机制,但近年来也发现通过DNA甲基化<sup>[2]</sup>和组蛋白修饰<sup>[3,4]</sup>等表观遗传学机制调控肿瘤相关基因表达在肝癌发生过程中也发挥着同等重要的作用,成为目前肝癌机制研究的热点。Polycomb group(PcG)蛋白复合成员EZH2(enhancer of zeste homolog 2)是新近发现具有组蛋白甲基转移酶活性的癌相关蛋白,在胚胎发育早期普遍存在,与SUZ12(suppressor of Zeste 12)和EED(embryonic ectoderm development)共同组成PRC2(polycomb-repressive complex 2)沉默复合物,通过催化组蛋白3第27位三甲基化(H3K-27me3)修饰介导基因沉默,参与X染色体失活、细胞分化和胚胎发育调节<sup>[5]</sup>。在肿瘤中的研究发现<sup>[6]</sup>,EZH2在前列腺癌、乳腺癌、淋巴瘤等多种肿瘤中过度表达,与肿瘤的形成和生长密切相关,具有促进细胞增殖、肿瘤细胞扩散和转移的恶性表型。最近研究发现<sup>[7,8]</sup>,EZH2在肝癌发生过程中也发挥重要作用,并且与肝癌的恶性程度及预后密切相关。本文仅就EZH2结构功能及其与肝癌发生发展的关系作简要综述。

## 1 EZH2的蛋白结构

PRC2沉默复合物是新近发现的具有组蛋白甲基转移酶活性的多亚基复合物,主要通过介导H3K27me3修饰参与基因沉默调控过程<sup>[9]</sup>。研究发现,PRC2复合物在多种物种中保守存在,并具有相似的亚基组成和功能,EZH2是其唯一的催化亚基,在PRC2的组蛋白甲基转移活性中发挥关键作用<sup>[6]</sup>。

EZH2是果蝇zeste基因增强子[E(z)]的人源同系物,最早在研究与原癌基因Vav相互作用中发现<sup>[10]</sup>,同年Chen等<sup>[11]</sup>从DNA文库中克隆出人EZH2编码序列,并将其基因定位于染色体21q22.2位置上。随后Cardoso等<sup>[12]</sup>将其定位更正为染色体7q35位置,并证实染色体21q22.2位置的EZH2拷贝是假基因。人源EZH2基因共编码751个氨基酸,含有5个功能性结构域,分别为EID(EED-interaction domain)结构域,Domain I和Domain II结构域,CXC结构域(cysteine-rich domain)和SET结构域(suppressor of variegation 39, enhancer of zeste and trithorax domain),除EID外,其余结构域均与果蝇E(Z)蛋白相应区域高度同源<sup>[6,13]</sup>。EID结构域位于EZH2蛋白最N端第39-68氨基酸,是介导与PRC2复合物EED亚基相互作用的充分必要区域,在维持PRC2复合物稳定性上发挥重要作用<sup>[14]</sup>。Domain I和Domain II结构

域分别位于EZH2 94-160氨基酸和218-335氨基酸区域,与果蝇E(Z)蛋白相应区域同源性分别为77%和62%,主要介导EZH2与DNA甲基转移酶DNMTs、Polycomb样蛋白PHF1和SUZ12亚基等蛋白的相互作用。CXC结构域为半胱氨酸富含区,且在多个物种中高度保守,是EZH2发挥其甲基转移酶活性的必要区域。SET结构域紧邻着CXC结构域,约113个氨基酸,是EZH2中最为保守的结构域(人与果蝇同源性为88%),在多个组蛋白赖氨酸甲基转移酶中广泛存在,是催化甲基转移的关键结构域<sup>[13]</sup>。SET结构域中两个保守的基序相互穿插,形成一个独特的“绳结”样结构(knot like structure),底物蛋白的赖氨酸和甲基供体辅助因子分别结合于SET结构域两侧,从而在“绳结”样结构的帮助下完成甲基转移过程<sup>[15]</sup>。

## 2 EZH2的生物学功能

尽管EZH2具有甲基转移酶活性,但是其单独作用并不足够催化组蛋白甲基化修饰,至少需要与另外3个polycomb蛋白EED、SUZ12和RbAp46/48共同组成PRC2核心复合物,才能完整发挥组蛋白甲基转移酶活性<sup>[6,16,17]</sup>。近来也发现,PRC2复合物中还有一些亚基如PHF1、MTF2及DNA结合蛋白AEBP2和JARID2等可进一步增强EZH2的甲基转移酶活性<sup>[17-20]</sup>。研究已经证实,EZH2参与形成的PRC2复合物主要介导H3K27me3修饰,而较少影响H3其他位点赖氨酸的甲基化修饰<sup>[5]</sup>。在此基础上,组蛋白H3K27me3可进一步募集另一个由polycomb蛋白组成的PRC1(polycomb-repressive complex 1)沉默复合物结合至核小体结构<sup>[21]</sup>。PCR1沉默复合物亚基RING1B蛋白具有泛素连接酶活性,可通过催化组蛋白2A第119位赖氨酸泛素化(H2A K119)诱导染色体结构改变,进而导致稳定的转录抑制和基因沉默。EZH2可通过这种基因沉默作用调控多种细胞分化和胚胎发育相关基因如oct3/4及Hox等<sup>[17,22]</sup>表达,从而在细胞分化和胚胎发育中发挥作用。

除此之外,研究还发现,EZH2还在介导X染色体失活过程中发挥重要作用<sup>[21]</sup>。胚胎发育过程中,EZH2所在的PRC2复合物可在Xist RNA的引导下募集于失活的X染色体,催化H3K27me3修饰,从而参与Xist RNA沉默X染色体过程。最近有报道<sup>[23]</sup>,在PRC2复合物参与的情况下,EZH2在人骨肉瘤U2OS细胞中可与DNA甲基化酶

DNMTs相互结合, 并募集DNMTs至启动子区特定定位点催化CpG岛从头甲基化诱导基因沉默, 且DNMTs介导的启动子区DNA甲基化依赖于EZH2的存在, 表明EZH2在调控DNA甲基化过程中也发挥着重要作用. 进一步研究发现, 在正常细胞中受H3K27me3修饰调控的基因, 其启动子区往往在肿瘤细胞中发生超甲基化, 这表明EZH2介导的H3K27me3修饰可能是抑癌基因在肿瘤中从头甲基化的预标记(pre-mark), 从而使抑癌基因在H3K27me3修饰和DNA甲基化修饰的双重作用下被深度沉默, 从而导致肿瘤的发生<sup>[24]</sup>.

EZH2介导的H3K27me3修饰不仅与DNA甲基化相关, 而且与组蛋白乙酰化修饰也密切相关<sup>[25]</sup>. EZH2可与组蛋白去乙酰化酶HDACs组合成一个包括PRC2复合物在内的大蛋白复合物共同参与基因沉默, 且HDAC抑制剂TSA能够消除EZH2所诱导的基因沉默<sup>[26]</sup>. 但是, HDACs并不是PRC2复合物的核心成员, 而是在特定情况下与PRC2暂时结合催化H3K27去乙酰化, 从而利于EZH2介导的H3K27me3修饰, 协同参与EZH2所介导的基因沉默过程<sup>[5]</sup>. 综上可知, EZH2生物学功能的发挥需要多种调控因子的共同参与, 尤其在肿瘤发生过程中, EZH2介导的H3K27me3修饰, DNMTs介导的DNA超甲基化和HDACs介导的组蛋白去乙酰化修饰三者之间的调控异常导致下游基因的表达水平异常, 进而可能进一步促进肿瘤的发生发展. 在肿瘤的研究中的确发现, EZH2蛋白在前列腺癌、乳腺癌、淋巴瘤、结肠癌和胃癌等多种肿瘤中呈高水平表达, 且与肿瘤的进展和预后密切相关<sup>[6]</sup>. 最近在肝癌的多项研究发现<sup>[7,8,27]</sup>, EZH2的过度表达与肿瘤细胞的增殖及血管浸润性呈正相关, 并可能成为治疗靶点.

### 3 EZH2与肝癌发生发展的关系

从2002年Varambally等<sup>[28]</sup>首次在前列腺癌中报道EZH2与肿瘤的关系至今, 不到10年间已有近300篇文章在10多种肿瘤中发现EZH2呈过度表达, 且与肿瘤的发生发展密切相关. 在肝癌中, Sudo等<sup>[7]</sup>首次于2005年利用定量PCR方法在66例肝细胞癌及相应癌旁组织中检测了EZH2 mRNA的表达水平差异, 结果发现EZH2在肝癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织, 且常发现癌细胞的门静脉浸润, 这与在前列腺癌、乳腺癌等肿瘤中的检测结果一致. 随后, Sasaki等<sup>[8]</sup>和Yonemitsu等<sup>[29]</sup>

利用免疫组织化学方法检测了EZH2在肝细胞癌和增生性结节中的表达情况, Cai等<sup>[30]</sup>利用Western blot方法检测EZH2在肝癌组织和癌旁组织中的表达情况, 均得到了与Sudo一致的结果. 进一步利用RNAi方法敲低肝癌细胞中EZH2的表达水平, 可显著抑制细胞的增殖活性和裸鼠成瘤能力, 将针对EZH2的siRNA或者表达shRNA的慢病毒注射入裸鼠肝癌模型可显著降低移植肿瘤的生长, 这些结果从细胞模型和动物模型进一步确定了EZH2在肝癌发生发展中的作用<sup>[27]</sup>.

在肝癌组织中对EZH2表达情况的研究还发现, EZH2高表达水平不仅仅与肝癌发生及肝癌进展过程相关, 而且还与肝癌分化程度显著相关. Sasaki等<sup>[8]</sup>利用定量PCR发现, EZH2 mRNA水平在高、中、低分化肝癌组织中具有显著差异, 与肝癌的分化程度呈负相关. 国内Cai等<sup>[30]</sup>利用免疫组织化学方法对不同分化程度的肝癌组织检测发现, EZH2在高、中、低分化的肝癌组织中表达水平差异显著, 进一步通过联合检测HSP70和GPC3 2个蛋白分子, 可用于不同分化程度的肝癌及高分化肝癌与增生性结节的鉴别诊断标记, 且具有较高的灵敏度和特异性.

在研究EZH2表达水平与肝癌预后的关系上, 得到了与在前列腺癌、乳腺癌等肿瘤中不同的结论. 在前列腺癌和乳腺癌中, EZH2的高表达水平与较差的临床预后显著相关<sup>[28,31]</sup>, 而在肝癌研究中, Sudo等<sup>[7]</sup>发现尽管EZH2在肝癌组织高表达水平与癌细胞门静脉浸润显著相关, 且癌细胞门静脉浸润是临床预后不良重要因素之一, 但Kaplan-Meier生存曲线显示EZH2在肝癌的表达水平与临床预后并无明显相关性. Yonemitsu等<sup>[29]</sup>在研究EZH2与临床预后的关系时发现, 虽然EZH2的高表达水平与肝癌术后较高的复发率密切相关, 但EZH2表达水平与临床预后并无显著关系. 同时对另一个polycomb蛋白Bmi1的检测也发现, 尽管Bmi1在肝癌组织呈过度表达, 且可与EZH2协同作用参与肝癌的发生发展过程, 但Bmi1的表达水平与临床预后也无显著关系. 由于EZH2主要介导H3K27me3修饰, 因此Cai等<sup>[32]</sup>进一步检测了H3K27me3的修饰水平与肝癌及肝癌预后的关系, 结果发现H3K27me3的高修饰水平同EZH2一样与肝癌显著相关. 同时还发现, H3K27me3修饰水平与肝癌预后不良显著相关, 并可作为一个独立的分子指标用于肝癌预后分析.

#### ■ 相关报道

Cai等利用免疫组织化学方法对不同分化程度的肝癌组织检测发现, EZH2在高、中、低分化的肝癌组织中表达水平差异显著, 进一步通过联合检测HSP70和GPC3两个蛋白分子, 可用于不同分化程度的肝癌及高分化肝癌与增生性结节的鉴别诊断标记, 且具有较高的灵敏度和特异性.

## ■创新盘点

本文创新性地综述了组蛋白甲基化酶EZH2近年来在肝癌发生发展中的研究进展,着重介绍了EZH2导致肝癌发生的多种作用机制,为基础研究和临床治疗提供了新的思路。

## 4 EZH2在肝癌发生发展过程中的作用机制

大量数据表明<sup>[1,33]</sup>,肿瘤的发生与癌相关基因的异常表达调控密切相关,从而导致细胞获得持续的生长信号和不受调控的增殖能力。在前列腺癌、乳腺癌等其他肿瘤中研究证实,EZH2导致肿瘤发生发展主要与其影响细胞周期进程和H3K27me3修饰介导的抑癌基因失活有关<sup>[6,34,35]</sup>。也有研究表明<sup>[36]</sup>,胞质分布的EZH2可通过不依赖于其组蛋白甲基转移酶活性的作用影响细胞骨架及F-actin的聚合,从而在肿瘤侵袭转移过程中发挥作用。Chen等<sup>[37]</sup>利用蛋白双向电泳技术在肝癌细胞中检测了敲低EZH2表达后下游蛋白表达谱的变化,发现了18个差异表达蛋白,这些蛋白大多参与肿瘤的发生发展过程。其中,核糖体蛋白L10E在敲低EZH2的肝肿瘤细胞中表达水平显著上调,且在MIHA细胞中外源表达L10E能够显著抑制EZH2对细胞促增殖作用。癌相关蛋白stathmin 1是双向电泳鉴定的另一个蛋白,在敲低EZH2的肝肿瘤细胞中表达水平显著下调。Chen等<sup>[27]</sup>发现, stathmin 1在EZH2促进细胞增殖中发挥重要作用,其在肝肿瘤细胞的高表达能够拯救敲低EZH2对细胞增殖的抑制作用,但是EZH2调控stathmin 1表达的具体机制目前尚不清楚。Kondo等<sup>[4]</sup>在肝癌组织中检测了孕激素受体(progesterone receptor, PGR)和雌激素受体 $\alpha$ (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )基因表达情况及其启动子区DNA甲基化水平,结果发现PGR和ER $\alpha$ 在肝癌组织中表达水平显著下调,但其启动子区DNA甲基化水平与正常肝组织相比并无明显差异。进一步在多种肝癌细胞系中检测发现,PGR和ER $\alpha$ 启动子区主要结合H3K27me3蛋白,利用组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA去除启动子区H3K27me3修饰能够显著恢复PGR和ER $\alpha$ 表达水平,表明在肝癌组织中EZH2介导的H3K27me3修饰在PGR和ER $\alpha$ 表达水平下调中发挥重要作用。

近来研究还发现,EZH2在维持生物体昼夜节律上发挥重要作用。Etchegaray等<sup>[38]</sup>发现EZH2在体内可与昼夜节律调控复合物CLOCK-BMAL1结合,并通过介导基因启动子区H3K27me3修饰调控昼夜节律相关蛋白PER1和PER2的表达。改变EZH2在细胞的表达水平将会影响到细胞正常昼夜节律的运转过程。有研究表明<sup>[39,40]</sup>,调控昼夜节律的相关基因表达紊乱将可能会导致疾病的发生。Lin等<sup>[41]</sup>比较了肝癌组织与正常组织中9个昼夜节律相关基因的表达水平差异,结果发现

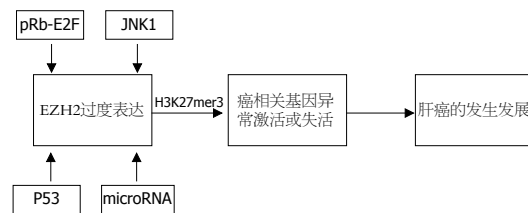


图1 EZH2导致肝癌发生发展的机制。

在肝癌组织中PER1、PER2、PER3、CRY2和TIM的表达水平显著降低,且与肿瘤的大小和分级密切相关。进一步检测发现,这些基因在肝癌组织中并未发现遗传学上的缺失或突变,而是以表观遗传学的机制诱导基因沉默。EZH2在肝组织中的异常表达,进而导致肝脏昼夜节律生物钟调控紊乱,可能是导致肝癌发生的原因之一。

EZH2不仅可通过调控癌相关基因表达直接导致肝癌的发生,近来发现在肝纤维化过程中也发挥重要作用<sup>[42]</sup>。在各种刺激因子的作用下,甲基化CpG结合蛋白2(methyl CpG binding protein 2, MeCP2)上调肝星状细胞中EZH2的表达水平,进而通过介导H3K27me3修饰抑制过氧化物酶增殖体激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )表达,诱导肝星状细胞向成肌纤维细胞转化<sup>[42,43]</sup>。肝纤维化是一切慢性肝病发展至肝硬化甚至肝癌的必经途径,因此EZH2在肝癌发生早期过程中也发挥间接作用。

## 5 调控EZH2在肝癌中过度表达的机制

多项研究表明<sup>[7,8,29]</sup>,EZH2在肝癌细胞中高水平表达,进而通过介导H3K27me3修饰调控下游基因异常表达,从而导致肿瘤的发生。但是,在肝癌细胞中调控EZH2过度表达的机制目前尚不清楚,可能主要与EZH2的正向调控途径的激活和负向调控途径的失活有关。Bracken等<sup>[44]</sup>发现,EZH2处于pRb-E2F信号途径下游,并受转录因子E2Fs的直接调控。Chang等<sup>[45]</sup>发现,JNK1激酶在肝癌细胞中的持续激活能够诱导EZH2表达及其介导的H3K27me3修饰。因此,在肝癌中常常发现多种原因导致的pRb-E2F途径和JNK1途径激活,可能是EZH2在肝癌中过度表达的原因之一。另有一些研究表明,抑癌基因P53<sup>[46]</sup>和microRNA-101<sup>[47]</sup>在负性调控EZH2表达中发挥重要作用,在肝癌发生过程中常常伴随p53基因突变或功能丧失<sup>[48]</sup>,Su等<sup>[49]</sup>还发现在肝癌组织中microRNA-101表达水平显著低于正常组织,这可能是EZH2在肝癌中过度表达的另一原因。

## 6 结论

在肝癌的发生发展过程中, 多种癌相关基因的异常激活或失活, 是导致肝癌多阶段进展的重要原因<sup>[1,48,50]</sup>。组蛋白甲基转移酶EZH2可通过多种机制在肝癌发生过程中过度表达, 进而通过介导H3K27me3修饰调控下游基因异常表达, 在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>(图1)。EZH2通过组蛋白修饰机制调控下游基因表达, 并不涉及基因组遗传学上的变化, 因此开发针对EZH2的特异性抑制剂可能用于逆转EZH2介导的肿瘤发生发展过程。同时也应注意到, 在EZH2的功能研究中, EZH2复杂的调控模式尤其与DNA甲基化和组蛋白其他修饰的相互作用对下游基因表达的影响, 以及与肝癌发生发展的关系仍需进一步研究。

## 7 参考文献

- Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063
- Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 125: 388-397
- Bai X, Wu L, Liang T, Liu Z, Li J, Li D, Xie H, Yin S, Yu J, Lin Q, Zheng S. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 83-91
- Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2007; 37: 974-983
- Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 155-164
- Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 2008; 647: 21-29
- Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, Inoue H, Wakiyama S, Fujita H, Shirouzu K, Mori M. Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 1754-1758
- Sasaki M, Ikeda H, Itatsu K, Yamaguchi J, Sawada S, Minato H, Ohta T, Nakanuma Y. The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2008; 88: 873-882
- Hansen KH, Bracken AP, Pasini D, Dietrich N, Gehani SS, Monrad A, Rappsilber J, Lerdrup M, Helin K. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1291-1300
- Hobert O, Jallat B, Ullrich A. Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3066-3073
- Chen H, Rossier C, Antonarakis SE. Cloning of a human homolog of the Drosophila enhancer of zeste gene (EZH2) that maps to chromosome 21q22.2. *Genomics* 1996; 38: 30-37
- Cardoso C, Mignon C, Hetet G, Grandchamps B, Fontes M, Colleaux L. The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 174-180
- Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A, Popkin D, Pillus L, Jenuwein T. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. *EMBO J* 1997; 16: 3219-3232
- Han Z, Xing X, Hu M, Zhang Y, Liu P, Chai J. Structural basis of EZH2 recognition by EED. *Structure* 2007; 15: 1306-1315
- Qian C, Zhou MM. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2755-2763
- Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 2004; 15: 57-67
- Cao R, Wang H, He J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y. Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 1862-1872
- Simon JA, Kingston RE. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 697-708
- Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev* 2010; 24: 368-380
- Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 2009; 139: 1290-1302
- Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, Mechtler K, Spahn L, Koseki H, Jenuwein T, Wutz A. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J* 2006; 25: 3110-3122
- Erhardt S, Su IH, Schneider R, Barton S, Bannister AJ, Perez-Burgos L, Jenuwein T, Kouzarides T, Tarakhovskiy A, Surani MA. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development* 2003; 130: 4235-4248
- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439: 871-874
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 232-236

## ■应用要点

EZH2通过组蛋白修饰机制调控下游基因表达, 并不涉及基因组遗传学上的变化, 因此开发针对EZH2的特异性抑制剂可能用于逆转EZH2介导的肿瘤发生发展过程。



# 同行评价

该文语言简练准确, 内容反映该领域的最新进展, 具有一定的科学和参考价值.

- 25 van der Vlag J, Otte AP. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 474-478
- 26 Garrick D, De Gobbi M, Samara V, Rugless M, Holland M, Ayyub H, Lower K, Sloane-Stanley J, Gray N, Koch C, Dunham I, Higgs DR. The role of the polycomb complex in silencing alpha-globin gene expression in nonerythroid cells. *Blood* 2008; 112: 3889-3899
- 27 Chen Y, Lin MC, Yao H, Wang H, Zhang AQ, Yu J, Hui CK, Lau GK, He ML, Sung J, Kung HF. Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin. *Hepatology* 2007; 46: 200-208
- 28 Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624-629
- 29 Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2009; 40: 1304-1311
- 30 Cai MY, Tong ZT, Zheng F, Liao YJ, Wang Y, Rao HL, Chen YC, Wu QL, Liu YH, Guan XY, Lin MC, Zeng YX, Kung HF, Xie D. EZH2 protein: a promising immunomarker for the detection of hepatocellular carcinomas in liver needle biopsies. *Gut* 2011; 60: 967-976
- 31 Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11606-11611
- 32 Cai MY, Hou JH, Rao HL, Luo RZ, Li M, Pei XQ, Lin MC, Guan XY, Kung HF, Zeng YX, Xie D. High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients. *Mol Med* ; 17: 12-20
- 33 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674
- 34 Sellers WR, Loda M. The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2002; 2: 349-350
- 35 Zeidler M, Kleer CG. The Polycomb group protein Enhancer of Zeste 2: its links to DNA repair and breast cancer. *J Mol Histol* 2006; 37: 219-223
- 36 Bryant RJ, Winder SJ, Cross SS, Hamdy FC, Cunliffe VT. The Polycomb Group protein EZH2 regulates actin polymerization in human prostate cancer cells. *Prostate* 2008; 68: 255-263
- 37 Chen Y, Lin MC, Wang H, Chan CY, Jiang L, Ngai SM, Yu J, He ML, Shaw PC, Yew DT, Sung JJ, Kung HF. Proteomic analysis of EZH2 downstream target proteins in hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2007; 7: 3097-3104
- 38 Etchegaray JP, Yang X, DeBruyne JP, Peters AH, Weaver DR, Jenuwein T, Reppert SM. The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function. *J Biol Chem* 2006; 281: 21209-21215
- 39 Toh KL. Basic science review on circadian rhythm biology and circadian sleep disorders. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37: 662-668
- 40 Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, Liu XS, Lazar MA. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* 2011; 331: 1315-1319
- 41 Lin YM, Chang JH, Yeh KT, Yang MY, Liu TC, Lin SF, Su WW, Chang JG. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2008; 47: 925-933
- 42 Mann J, Chu DC, Maxwell A, Oakley F, Zhu NL, Tsukamoto H, Mann DA. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology* 2010; 138: 705-714, 714.e1-e4
- 43 Matarazzo MR, De Bonis ML, Strazzullo M, Cerase A, Ferraro M, Vastarelli P, Ballestar E, Esteller M, Kudo S, D'Esposito M. Multiple binding of methyl-CpG and polycomb proteins in long-term gene silencing events. *J Cell Physiol* 2007; 210: 711-719
- 44 Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323-5335
- 45 Chang Q, Zhang Y, Beezhold KJ, Bhatia D, Zhao H, Chen J, Castranova V, Shi X, Chen F. Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *J Hepatol* 2009; 50: 323-333
- 46 Tang X, Milyavsky M, Shats I, Erez N, Goldfinger N, Rotter V. Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene* 2004; 23: 5759-5769
- 47 Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008; 322: 1695-1699
- 48 Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2166-2176
- 49 Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-1142
- 50 Cornella H, Alsinet C, Villanueva A. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 821-825

编辑 李军亮 电编 何基才

# 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展

曹秀红, 张学彦, 张晓娜

曹秀红, 张学彦, 张晓娜, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

作者贡献分布: 本文综述由曹秀红和张晓娜完成; 张学彦审校。

通讯作者: 张学彦, 教授, 副主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院消化科. zxyxw@sina.com  
电话: 0451-86605143

收稿日期: 2011-08-16 修回日期: 2011-10-20

接受日期: 2011-10-26 在线出版日期: 2011-10-28

## Progress in understanding the role of interleukins in the pathogenesis of ulcerative colitis

Xiu-Hong Cao, Xue-Yan Zhang, Xiao-Na Zhang

Xiu-Hong Cao, Xue-Yan Zhang, Xiao-Na Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xue-Yan Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zxyxw@sina.com

Received: 2011-08-16 Revised: 2011-10-20

Accepted: 2011-10-26 Published online: 2011-10-28

## Abstract

Ulcerative colitis (UC) is a chronic, nonspecific inflammatory bowel disease. The assessment of UC reactivity can be used to guide clinical treatment. Therefore, it is of important significance to find markers which have sufficient specificity and sensitivity for ease of monitoring UC. In recent years, a intensive study of the relation between interleukins (ILs) and the pathogenesis of UC has revealed changes in the secretion levels of ILs in the progression of UC, which suggests that ILs can be used as markers for monitoring the activity of UC to guide diagnosis and treatment. This paper is a review on the mechanism of action of ILs in the pathogenesis of UC.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Interleukin; Inflammatory factor

Cao XH, Zhang XY, Zhang XN. Progress in understanding the role of interleukins in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3143-3148

## 摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性、非特异性炎症性肠病。UC活动性的评估结果可指导临床制订治疗方案。因此寻找有足够的特异性和灵敏度并易于监测UC病情程度的标志物具有重要的临床意义。近些年来随着UC发病机制研究的日益深入,发现白介素(interleukin, IL)在UC发生、发展过程中存在表达改变,提示IL可以作为监测UC病情变化的检测指标,成为UC诊疗的新热点。本文对IL在溃疡性结肠炎发病及病理变化中的作用机制进行综述。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 白介素; 炎症性细胞因子

曹秀红, 张学彦, 张晓娜. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(30): 3143-3148

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3143.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)因病因不明,病程迁延,溃疡难愈,复发率高,易致癌变而被WHO列为难治病之一,近年来国内的发病率呈逐年上升趋势。其病因和发病机制尚未完全明确,免疫异常被公认在UC的发病中具有极为重要的作用,包括炎症递质、细胞因子及免疫调节等多个方面。其中细胞因子参与免疫反应和炎症过程,是当前关于发病机制的研究热点之一。白介素(interleukin, IL)是细胞因子中最主要的具有多种生物活性的一组淋巴因子,并在免疫细胞的发育、分化、免疫应答及某些细胞的激活过程中有重要调节作用。现对白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展进行综述。

## 1 促炎症性细胞因子

1.1 IL-1 IL-1是一种具有多种功能的细胞因子,尤其在应对病原入侵时宿主反应的启动与发展中起着关键性作用,是免疫与炎症启动的重要调节因子,能够由单核细胞、肥大细胞、平滑肌细胞和内皮细胞等分泌产生。IL-1有2种形式,即IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ,人体内IL-1的活性主要由

## ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)的病因目前尚不十分明确,虽然有不同的致病诱因,但却遵循共同的免疫发病机制。其中细胞因子起着不可忽视的作用,白介素(IL)构成细胞因子网络在UC炎症反应、免疫调节中起到十分重要的作用,可以作为观察UC患者病情的发展、活动性和判断预后的重要参考指标。

## ■同行评议者

陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第211医院中医科

## ■ 研究前沿

近年来认为肠黏膜免疫紊乱在UC发病机制中具有中心性地位, UC的免疫发病机制以及针对免疫发病机制的治疗方法探讨是目前研究的热点. 近年来越来越多的研究表明IL与UC的发生、发展及预后密切相关, 但IL对UC的具体作用机制不十分清楚有待于进一步研究和探索.

IL-1 $\beta$ 介导. 有研究发现<sup>[1-4]</sup>, UC患者组IL-1 $\beta$ 水平显著高于对照组, 受累黏膜的IL-1 $\beta$ 显著高于未受累黏膜, 后者又显著高于正常组, 随着病情的缓解, IL-1 $\beta$ 水平又显著降低, 非活动期UC患者IL-1 $\beta$  mRNA水平与正常对照组相比无显著性差异. Szkaradkiewicz等<sup>[5-7]</sup>采用ELISA法测定UC患者组血清IL-1 $\beta$ 水平明显高于对照组. 近几年发现<sup>[8-11]</sup>, UC患者治疗后IL-1 $\beta$ 的含量明显下降. 提示UC患者IL-1 $\beta$ 的变化可以用于UC患者病情轻重及疗效的判断. 在UC中发病作用表现在以下4个方面: (1)UC黏膜固有层中活化的巨噬细胞可释放IL-1 $\beta$ , 激活树突样细胞吞噬、消化外来抗原, 释放抗原片段并呈递至T淋巴细胞发生免疫反应; (2)IL-1 $\beta$ 能增加由巨噬细胞所产生的细胞因子如IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\beta$ , TNF- $\alpha$ )和IL-18, 使得中性粒细胞向炎症部位聚集, 进入肠道病变部位, 从而引起一系列的肠道病变, 如结肠上皮的损伤、小血管炎、隐窝脓肿等, 最终造成UC的发病; (3) IL-1 $\beta$ 与IL-1受体的失衡是UC发生的重要环节; (4) IL-1 $\beta$ 可以通过诱导释放H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 影响Ca<sup>2+</sup>释放和NK-A的信号转导途径的开关, 从而导致UC患者的结肠平滑肌收缩功能紊乱<sup>[12]</sup>.

1.2 IL-2 IL-2主要由辅助性T淋巴细胞在抗原或有丝分裂原刺激和IL-1诱导下合成分泌. 与T细胞、B细胞、单核细胞表面的IL-2受体结合后, 能引起T细胞活化、增殖, 促进其杀伤作用, 以及增强NK细胞活性, 促进B细胞分泌等细胞免疫反应. 血清IL-2可溶性受体(sIL-2R)水平是反映机体细胞免疫功能的重要指标, 高水平的血清sIL-2R出现在与免疫系统激活有密切相关的炎症性疾病中. 在不同时期UC患者中IL-2及sIL-2R水平有很大的差别<sup>[13-15]</sup>. 与正常人比较, UC患者活动期IL-2最低, 缓解期次之; 而sIL-2R则相反, UC患者活动期sIL-2R水平最高, 缓解期次之, 且IL-2与sIL-2R水平的高低与UC病情活动相关. 表明UC发病机制可能与血清IL-2降低及sIL-2R升高有密切关系, 提示UC患者存在有细胞免疫功能的障碍, 免疫系统处于激活状态. UC患者血清sIL-2R增高的机制尚不清楚, 可能是因为黏膜的免疫系统受到激活, 进而导致活化的B细胞, 巨噬细胞和NK细胞表达sIL-2R的水平增高.

1.3 IL-6 IL-6主要由活化的巨噬细胞、淋巴细胞及上皮细胞分泌, 其生物学效应类似于IL-1 $\beta$ , 可通过STAT-3途径激活NK- $\kappa$ B而诱导细胞间黏附分子(ICAM-1)的极化表达, 后者是在炎症性肠

病患者的中性粒细胞与上皮细胞间相互作用中起重要作用的一种黏附颗粒, 因而, 在慢性肠道炎症反应的发病机制中起至关重要的作用. IL-6过度表达常导致机体内环境紊乱, 影响肠上皮细胞的电解质分泌, 使其通透性增强, 进而使黏附其上的中性粒细胞游出并浸润到炎症部位. IL-6在溃疡性结肠炎的发病中起重要的作用, 并可用来监测疾病活动和治疗效果. 许多研究证实<sup>[1,2,4,5,14,16-26]</sup>, UC患者活动期黏膜组织和血清中的IL-6水平明显高于缓解期和正常对照组, 且在炎症反应时与TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 产生协同作用, 和炎症分级成正相关, 治疗后随着病情的缓解IL-6浓度下降, 而缓解期患者血清IL-6的水平与正常对照组相比差异无统计学意义. 另有研究发现, 即使样品来自UC患者正常黏膜组织, 其IL-6水平仍然高于正常人, 而同一患者正常和病变黏膜组织间无差异性<sup>[27]</sup>.

1.4 IL-8 IL-8是一种强有力的中性粒细胞趋化和活化因子, 主要由单核细胞、内皮细胞、表皮细胞及T淋巴细胞在IL-1、肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ 和外源性因子脂多糖(LPS)的刺激下产生. 其主要生物作用为趋化并激活中性粒细胞, 促进中性粒细胞的溶酶体活性和吞噬作用, 故IL-8在炎症反应中起着更直接的介导作用. UC患者的IL-8活性与其疾病的活动性是一致的, 通过检测患者IL-8活性, 可以反映疾病的活动度及其转归. UC患者活动期的结肠黏膜、外周血及尿液中IL-8浓度明显高于缓解期与正常对照组<sup>[2,4,5,19,22,24,28-34]</sup>. 而治疗后UC患者IL-8浓度降低<sup>[10,17,25,35,36]</sup>. UC患者肠黏膜IL-8升高的程度与局部炎症程度相一致, 在隐窝脓肿中有大量中性粒细胞浸润的UC患者, IL-8升高程度与黏膜组织中的中性粒细胞数成正相关.

1.5 IL-12 IL-12是一种异源二聚体细胞因子, 由40 kD的重链(p40)和35 kD的轻链(p35)组成, 开始时被认为是NK细胞和T细胞的细胞毒性促进剂, 后来发现是帮助原T细胞向Th1细胞分化的一个关键性分子. IL-12的作用是刺激NK和T细胞, 产生多种细胞因子, 如干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IL-8等, 再通过这些介质发挥作用. 庞艳华等<sup>[37]</sup>对UC患者与IL的关系进行研究, 发现UC患者结肠黏膜组织中IL-12的表达较正常对照组增加, 而血清中无明显差异. 但是郭海建等<sup>[38]</sup>研究发现, UC患者血清学中IL-12的表达与对照组存在差异, UC活动期患者血清中IL-12活性明显高于对照组, 且随病情加重呈上升趋势.

势, TL-12活性与病变累及范围无关. 上述研究说明IL-12与UC的发生有密切关系.

1.6 IL-17 IL-17主要由基质细胞产生, 是T细胞诱导和促进炎症发生过程中一种重要可溶性因子, 能促进中性粒细胞发育成熟, 刺激上皮细胞、内皮细胞等多种细胞产生IL-6、IL-8、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和PGE2等炎症递质, 促进C3等急性期反应蛋白的产生, 诱导炎症反应. 研究发现, UC组结肠组织中IL-17表达明显增高, 说明局部IL-17增高, 可以引发UC的发病<sup>[39-44]</sup>. 由此也可推测, 阻断IL-17分泌可能为治疗UC的一个新的手段. 另对UC患者血清学研究发现<sup>[45,46]</sup>, 轻度、中度、重度UC患者血清IL-17的浓度水平呈逐渐升高趋势, 重度患者高于中度患者, 中度患者高于轻度患者, 三组间比较存在显著差异, 而轻度UC组与对照组相比差异无统计学意义. 说明IL-17的表达水平与UC的炎症程度及疾病进展密切相关. IL-17在UC的发病中起重要作用, 他可能通过刺激上皮细胞和抗原递呈细胞产生IL-1、IL-6、IL-8和TNF等炎性因子, 进而激活并募集大量中性粒细胞迁移到炎症部位而引起结肠炎的发生.

1.7 IL-18 IL-18作为炎症前细胞因子参与多种免疫性疾病的发生, 它具有促进IL-1和GM-CSF产生、诱导Th1细胞产生IFN- $\gamma$ , 并诱导TNF- $\alpha$ 和多种趋化因子的基因表达等功能. 研究表明, IL-18与UC的发生有密切关系, 其表达水平可以作为观察UC患者病情的发展、活动性和判断预后的重要参考指标. 中、重度UC患者组结肠黏膜IL-18的表达高于轻度组, 后者又高于缓解期组及正常对照组, 缓解期组IL-18的表达高于正常对照组<sup>[32]</sup>. 另外活动期患者血清IL-18水平较缓解期患者和健康对照者明显升高, 而缓解期患者与健康对照者比较差异无统计学意义. 重度UC患者血清IL-18水平明显高于轻、中度UC患者和健康对照者, 血清IL-18水平高低与UC患者病情轻重、病变累及范围有关, 重度和全结肠患者IL-18水平明显升高<sup>[47-51]</sup>. 血清IL-18水平还与内镜黏膜损伤、疾病活动指数、临床活动指数(CAI)呈正相关, 与非特异性炎性反应因子血清C-反应蛋白(CRP)呈正相关, 另外还与红细胞沉降率(ESR)、白细胞(WBC)计数呈正相关<sup>[50,52]</sup>.

## 2 抗炎细胞因子

2.1 IL-4 IL-4是T细胞来源的细胞因子, 具有多种生物学功能, 最令人关注的是其抑制炎症的特

性. IL-4主要由激活的淋巴细胞合成, 对淋巴细胞和巨噬细胞发挥免疫调节作用. 他能抑制单核巨噬细胞产生IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ ; 下调活化的单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力, 且存在剂量效应关系; IL-4还能抑制PGE2和IL-8的产生; 此外, IL-4能诱导IL-1RA产生, 提高IL-1RA/IL-1 $\beta$ 的比例. 但目前科学家们对于IL-4在UC患者结肠黏膜中的表达出现不一致的研究结果, Sawa等<sup>[53]</sup>应用实时定量PCR检测了患者结肠黏膜许多细胞因子的含量, 认为IL-4表达显著增高; 另有研究表明<sup>[54-56]</sup>, UC患者结肠黏膜IL-4表达明显降低, 且UC患者血清中IL-4浓度活动期低于静止期, 有显著差异. 不同病情患者之间血清IL-4浓度比较亦有显著性差异, 即重度UC患者血清IL-4浓度低于中度UC患者, 中度UC患者低于轻度UC患者<sup>[44]</sup>. 可见, IL-4与UC的发病有关, 可作为监测疾病程度的一个指标, 但是确切的作用机制还不明确.

2.2 IL-10 IL-10又名细胞因子合成抑制因子, 有多种生物学作用, 他的主要免疫调节作用是抑制激活的单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、T细胞发挥有效功能. IL-10为Th2型细胞分泌, 在黏膜免疫中是一种重要的细胞因子调节剂, 在肠道黏膜内环境稳定中发挥重要作用. IL-10在UC的发病过程中发挥重要作用. 活动期UC患者无论是结肠黏膜中还是血清中IL-10的表达较对照组降低, 且与病情的严重程度有关<sup>[9,13,28,31,57-59]</sup>. IL-10的含量下调使炎症抑制作用下降, UC的发生可能与IL-10含量的降低有相关性, IL-10的表达与疾病的活动度也有关系, 随着病变进展, 其IL-10的表达呈下降趋势, 而缓解期开始升高, 说明IL-10开始发挥其炎性抑制作用, 以进一步恢复炎性因子和抗炎因子之间的平衡. 因此IL-10可以作为UC疾病状态的一个重要的参考指标.

2.3 IL-13 IL-13是由T淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞产生的具有抗炎效应的一种多效性的Th2细胞因子, 他从转录水平对G-CSF产生抑制作用. G-CSF能调节中性粒细胞的存活、增生和分化, 并且增强成熟中性粒细胞功能, 不仅在抗感染的非特异性细胞免疫中起重要作用, 而且与整个机体的免疫功能密切相关. 研究发现, 活动期UC患者肠黏膜组织中IL-13浓度和mRNA表达显著降低. 同时发现, UC患者病变黏膜多核白细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等炎症细胞的浸润程度与IL-13浓度有关<sup>[55,57,60]</sup>. 随着炎症细胞浸润程度的加强, IL-13的浓度逐渐降低. 提示UC

### ■相关报道

Lmaoka等体外实验研究显示双歧杆菌可明显增加UC患者外周血单个核细胞的IL-10分泌, 同时减少促炎症因子IL-8的释放而缓解UC患者的炎症程度, 这说明IL-10在介导益生菌调节肠道炎症中起着重要作用.



## ■创新盘点

本文综述了IL在UC发生、发展过程中的变化,发现IL与UC的病变严重程度及活动性有关,从而为寻找监测UC病情变化的检测指标开辟了新的途径。

病变黏膜中IL-13的降低程度与其炎症程度呈平行关系。周宇等<sup>[61]</sup>的试验研究显示,血浆中IL-13的浓度重度UC比轻度UC显著降低,活动期比静止期也明显降低,而且血浆IL-13的浓度与UC的活动性指标C-反应蛋白有显著的负相关。以上资料说明IL-13参与UC的炎症过程,检测血浆IL-13可作为临床判断UC患者病变严重程度和活动性的指标。

**2.4 IL-23** IL-23主要由激活的单核-巨噬细胞和树突状细胞分泌,由IL-12p40和IL-23p19亚单位组成。其通过结合细胞膜表面IL-23受体复合物,刺激细胞内信号传导系统来诱导细胞激活,在免疫记忆CD4<sup>+</sup> T细胞效应应答中起重要作用。IL-23可刺激炎性细胞向病变部位移动,诱导炎性肉芽肿形成,参与抗感染免疫应答。一系列研究发现,IL-23在溃疡性结肠炎的发病中具有重要作用,UC患者肠黏膜中其表达较正常对照组明显增高<sup>[40,62-64]</sup>。且血清学研究进一步证实,随着病情进展IL-23的浓度水平亦呈逐渐升高趋势<sup>[44,64,65]</sup>。IL-23在UC的发病中发挥积极的免疫调节作用,他是一种强有力的细胞免疫刺激因子和调节因子,这种作用可能是通过促进IL-17的分泌发挥的。IL-23通过诱导记忆型Th17细胞分泌大量IL-17可能是导致UC反复发作的关键原因,即IL-23/IL-17免疫通路失调可能破坏自身组织和抗原的免疫耐受而导致自身免疫性疾病的发生。IL-23在UC中的突出作用使他可能成为今后治疗UC患者的一个重要靶点,有助于研发预防与治疗包括UC在内的自身免疫性疾病的新药<sup>[40,66]</sup>。

## 3 结论

UC的发生发展中,促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子所致的免疫异常发挥着重要作用,二者之间的相互抗衡决定着病变的发展。IL在UC的发生发展中存在相应表达和分泌的变化,很多研究发现IL与UC的病变严重程度及活动性有关,这为寻找监测UC病情变化的检测指标开辟了新的途径。但IL的表达、分泌和调节是一个十分复杂的网络系统,其生物学活性存在多向性和双重性的特点,这就为相关研究带来一定的复杂性,关于IL在UC中所起的作用尚存在分歧,有待进一步的研究。只有通过全面严谨的设计并综合应用多种技术加以实施,才能明确IL与UC关系,为临床治疗提供客观依据。

## 4 参考文献

1 Dharmani P, Chadee K. Biologic therapies against

- inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the key. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1: 195-212
- 2 Leal RF, Coy CS, Ayrizono ML, Fagundes JJ, Milanski M, Saad MJ, Velloso LA, Góes JR. Differential expression of pro-inflammatory cytokines and a pro-apoptotic protein in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Tech Coloproctol* 2008; 12: 33-38
- 3 Chang YY, Ouyang Q. [Expression and significance of mucosal beta-defensin-2, TNFalpha and IL-1beta in ulcerative colitis]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2008; 47: 11-14
- 4 Yamamoto T, Maruyama Y, Umegae S, Matsumoto K, Saniabadi AR. Mucosal inflammation in the terminal ileum of ulcerative colitis patients: endoscopic findings and cytokine profiles. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 253-259
- 5 Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugała I, Wasilewska A, Drews M, Majewski P, Karpiński T, Zwoździak B. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* ; 57: 291-294
- 6 蒋志坚, 曹文涛, 石巍. 溃疡性结肠炎患者血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的临床意义. *中国现代医生* 2009; 47: 63-65
- 7 万德惠, 徐萍. 溃疡性结肠炎患者血浆白介素-1 $\beta$ 的变化. *江西医药* 2006; 41: 485-486
- 8 Førland DT, Johnson E, Saetre L, Lyberg T, Lygren I, Hetland G. Effect of an extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of cytokines and calprotectin in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Immunol* 2011; 73: 66-75
- 9 D'Inca R, Barollo M, Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Vettorato MG, Castagliuolo I, Sturniolo GC. Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and Toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1178-1187
- 10 Li Z, Zhang de K, Yi WQ, Ouyang Q, Chen YQ, Gan HT. NF-kappaB p65 antisense oligonucleotides may serve as a novel molecular approach for the treatment of patients with ulcerative colitis. *Arch Med Res* 2008; 39: 729-734
- 11 Yamamoto T, Saniabadi AR, Umegae S, Matsumoto K. Impact of selective leukocytapheresis on mucosal inflammation and ulcerative colitis: cytokine profiles and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 719-726
- 12 张涛, 谢建群. 清肠栓对大鼠溃疡性结肠炎血清白介素-1 $\beta$ 影响的研究. *江西中医学院学报* 2006; 18: 57-58
- 13 Ebert EC, Panja A, Das KM, Praveen R, Geng X, Rezac C, Bajpai M. Patients with inflammatory bowel disease may have a transforming growth factor-beta-, interleukin (IL)-2- or IL-10-deficient state induced by intrinsic neutralizing antibodies. *Clin Exp Immunol* 2009; 155: 65-71
- 14 卢艺涛, 高静, 姚桂琴. 溃疡性结肠炎患者相关细胞因子的实验性研究. *现代预防医学* 2005; 32: 735-736
- 15 古学文. 溃疡性结肠炎患者血清IL-2及sIL-2R浓度变化的研究. *临床和实验医学杂志* 2003; 2: 153
- 16 Drastich P, Frolova-Brizova L, Zanvit P, Spicak J, Tlaskalova-Hogenova H. Spontaneous in vitro IL-6 production in various intestinal segments in patients with inflammatory bowel disease. *Folia Mi-*

- crobiol* (Praha) 2011; 56: 185-190
- 17 Faghfoori Z, Navai L, Shakerhosseini R, Somi MH, Nikniaz Z, Norouzi MF. Effects of an oral supplementation of germinated barley foodstuff on serum tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and -8 in patients with ulcerative colitis. *Ann Clin Biochem* 2011; 48: 233-237
  - 18 Ohtani K, Ohtsuka Y, Ikuse T, Baba Y, Yamakawa Y, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Nagata S, Shimizu T. Increased mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 in pediatric ulcerative colitis. *Pediatr Int* 2010; 52: 584-589
  - 19 任保从. 溃疡性结肠炎患者血清IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 水平变化及意义. *山东医药* 2010; 50: 57
  - 20 Fonseca-Camarillo G, Villeda-Ramírez M, Sánchez-Muñoz F, Barreto-Zúñiga R, Domínguez-López A, Uribe-Esquivel M, Yamamoto-Furusho J. [IL-6 and TNF- $\alpha$  gene expression in the rectal mucosal of patients with chronic idiopathic ulcerative colitis and controls]. *Rev Gastroenterol Mex* 2009; 74: 334-340
  - 21 Sato K, Chiba T, Ohkusa T. Serial changes of cytokines in active ulcerative colitis: effects of antibiotic combination therapy. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1016-1021
  - 22 Matsuda R, Koide T, Tokoro C, Yamamoto T, Godai T, Morohashi T, Fujita Y, Takahashi D, Kawana I, Suzuki S, Umemura S. Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 328-334
  - 23 陈颖颖, 杨幼林, 马志斌, 徐丹, 刘芳, 刘玲. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-6与溃疡性结肠炎的关系. *胃肠病学* 2009; 14: 159-162
  - 24 宋爱玲. TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8与溃疡性结肠炎严重程度相关研究. *中国实用医药* 2008; 3: 3-4
  - 25 Umehara Y, Kudo M, Nakaoka R, Kawasaki T, Shiomi M. Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 879-882
  - 26 Raddatz D, Bockemühl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 547-557
  - 27 Daig R, Rogler G, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Gross V, Schölmerich J, Andus T. Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut* 2000; 46: 350-358
  - 28 张晓博, 杨宪武, 党惠娇, 吴国斌, 李红玉, 徐志斌, 吴明利. 溃疡性结肠炎患者血清和结肠组织白细胞介素8和白细胞介素10的表达. *临床荟萃* 2010; 25: 210-212
  - 29 董玉柱. 溃疡性结肠炎患者血清TNF- $\alpha$ 、IL-8的检测及意义. *山东医药* 2010; 50: 97-98
  - 30 Li K, Yao S, Liu S, Wang B, Mao D. Genetic polymorphisms of interleukin 8 and risk of ulcerative colitis in the Chinese population. *Clin Chim Acta* 2009; 405: 30-34
  - 31 贾长河, 许波实, 康谊. 溃疡性结肠炎患者血清IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 的水平及临床意义. *实用诊断与治疗杂志* 2008; 22: 574-578
  - 32 高伟, 司雁菱, 吴瑜. 白细胞介素-8、白细胞介素-15、白细胞介素-18溃疡性结肠炎患者结肠黏膜的表达及意义. *中国综合临床* 2006; 22: 1095-1097
  - 33 郭海建, 刘新民, 刘俊, 熊鹰, 王建平, 胡银清. 溃疡性结肠炎患者白细胞介素-8活性研究. *山西医药杂志* 2005; 34: 920-921
  - 34 Keates AC, Castagliuolo I, Cruickshank WW, Qiu B, Arseneau KO, Brazer W, Kelly CP. Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 972-982
  - 35 Yao J, Wang JY, Liu L, Li YX, Xun AY, Zeng WS, Jia CH, Wei XX, Feng JL, Zhao L, Wang LS. Antioxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res* 2010; 41: 288-294
  - 36 Ishiguro Y, Ohkawara T, Sakuraba H, Yamagata K, Hiraga H, Yamaguchi S, Fukuda S, Munakata A, Nakane A, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor has a proinflammatory activity via the p38 pathway in glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2006; 120: 335-341
  - 37 庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 郑长青, 张文杰. 溃疡性结肠炎患者Th1类细胞因子的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1665-1667
  - 38 郭海建, 刘新民, 刘俊, 熊鹰, 王建平, 刘若丹, 胡银清. 溃疡性结肠炎患者PBMC体外白细胞介素12诱导水平研究. *实用临床医药杂志* 2007; 11: 65-67
  - 39 Sugihara T, Kabori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 386-393
  - 40 付好, 童晶晶, 潘琦, 王文峰, 邹开芳, 刘俊, 钱伟, 侯晓华. IL-23/IL-17炎症轴在溃疡性结肠炎中的作用. *中华消化内镜杂志* 2010; 27: 200-203
  - 41 何英, 李春明, 侯凤雪, 刘玉杰. IL-17及IFN- $\gamma$ 在溃疡性结肠炎中的表达. *中国当代医药* 2010; 17: 36-37
  - 42 何英, 李春明, 单景军, 蒋萍. Th17类细胞因子在溃疡性结肠炎患者中的表达. *中国临床医学* 2010; 17: 501-503
  - 43 杨淑萍, 智绪亭, 卢雪峰, 冯立娟, 王琴伊. IL-17A/及Th17在炎症性肠病中的作用. *中国现代普通外科进展* 2009; 12: 222-225
  - 44 梁雄均, 马泽舜, 曾雅静. 白介素4和17在溃疡性结肠炎发生发展中的作用. *右江医学* 2005; 33: 6-8
  - 45 郑紫丹, 万晓强, 刘梁英. 溃疡性结肠炎患者血清IL-23和IL-17的水平变化及意义. *细胞与分子免疫学杂志* 2011; 27: 203-204
  - 46 Ajduković J, Tonkić A, Salamunić I, Hozo I, Simunić M, Bonacin D. Interleukins IL-33 and IL-17/IL-17A in patients with ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 1442-1444
  - 47 董跃滨, 徐晖. 白细胞介素-18基因单核苷酸多态性及其血清含量与溃疡性结肠炎的相关性. *中华消化杂志* 2010; 30: 78-80
  - 48 魏思忱, 田树英, 孔郁, 郑国启, 张秀刚, 李春英, 陈霞. 血清IL-18与溃疡性结肠炎的关系. *中国医师进修杂志* 2008; 31: 34-35
  - 49 Hanai H, Iida T, Yamada M, Sato Y, Takeuchi K, Tanaka T, Kondo K, Kikuyama M, Maruyama Y, Iwaoka Y, Nakamura A, Hirayama K, Saniabadi AR, Watanabe F. Effects of adacolumn selective leukocytapheresis on plasma cytokines during active disease in patients with active ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3393-3399
  - 50 Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 605-608
  - 51 Ludwiczek O, Kaser A, Novick D, Dinarello CA, Rubinstein M, Tilg H. Elevated systemic levels of

## ■应用要点

近年来国内外纷纷推崇生物学治疗, 随着对细胞因子IL一族在UC中的生物学行为的研究不断深入, IL受体拮抗剂、抗IL单克隆抗体、人类重组IL的研究初有成效, 其相对小的不良反应和较好的耐受性为治疗复发性顽固性UC拓宽了前景, 可望在不久有重大突破。

# ■同行评价

本文选题很好,符合当前研究的热点,观点明确,对溃疡性结肠炎理论研究和临床治疗有参考意义。

- free interleukin-18 (IL-18) in patients with Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16: 27-33
- 52 Aizawa Y, Sutoh S, Matsuoka M, Negishi M, Torii A, Miyakawa Y, Sugisaka H, Nakamura M, Toda G. Association of interleukin-18 gene single-nucleotide polymorphisms with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 2005; 65: 88-92
- 53 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsu-moto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175-179
- 54 赵晓军, 王志红, 韩英. 白细胞介素4、干扰素 $\gamma$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在溃疡性结肠炎患者结肠黏膜中的表达及意义. *中国误诊学杂志* 2008; 8: 3029-3031
- 55 庞艳华, 郑长青, 王轶淳, 李晓东, 李丰. IL-4和IL-13在溃疡性结肠炎中的表达. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 410-412
- 56 Rogy MA, Beinhauer BG, Reinisch W, Huang L, Pokieser P. Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1731-1741
- 57 高伟, 司雁菱, 吴瑜. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜中IL-10、IL-13表达变化及意义. *山东医药* 2010; 50: 80-81
- 58 魏思忱, 郑国启, 田树英, 张秀刚, 孔郁, 李春英, 魏新亮. IL-10在溃疡性结肠炎患者血清中的表达及意义. *河北医药* 2010; 32: 559-560
- 59 李睿, 罗时兵, 潘威进, 郭绿云, 邹开芳. 白细胞介素-10在溃疡性结肠炎结肠黏膜中表达的研究. *中国医师杂志* 2006; 8: 694-69
- 60 Kadivar K, Ruchelli ED, Markowitz JE, Defelice ML, Strogatz ML, Kanzaria MM, Reddy KP, Baldassano RN, von Allmen D, Brown KA. Intestinal interleukin-13 in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 593-598
- 61 周宇, 叶文桃, 麦海妍, 郭汉城, 王翠霞. 白介素13和一氧化氮在溃疡性结肠炎的作用及意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 319
- 62 Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 597-606
- 63 刘占举, 杨丽, 崔铁, 黄志刚, 黄培新, 郭传勇, 王兴鹏. 白细胞介素-23在炎症性肠病的表达升高并诱导促炎细胞因子分泌. *中华消化杂志* 2009; 29: 370-373
- 64 Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2483
- 65 郑紫丹, 万晓强, 刘梁英. 溃疡性结肠炎患者血清IL-23和IL-17的水平变化及意义. *细胞与分子免疫学杂志* 2011; 27: 203-204
- 66 邢鹭, 韩英, 王志红, 王继恒. IL-23对溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞分泌IL-17的影响. *中国医药导刊* 2010; 12: 640-642

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)

# 姜黄素抑制STAT3信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响

杨芳, 赵秋, 王渝, 马松林, 龚勇

杨芳, 厦门市第二医院消化内科 福建省厦门市 361021  
赵秋, 王渝, 马松林, 龚勇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030  
作者贡献分布: 此课题由杨芳与赵秋设计; 研究过程由杨芳、王渝、马松林及龚勇操作完成; 研究所用试剂及分析工具由赵秋提供; 数据分析由杨芳完成; 本论文写作由杨芳与赵秋完成。  
通讯作者: 赵秋, 教授, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。  
zhaoqiu461@163.com  
电话: 027-83663208  
收稿日期: 2011-08-24 修回日期: 2011-10-14  
接受日期: 2011-10-22 在线出版日期: 2011-10-28

## Curcumin suppresses proliferation of pancreatic carcinoma cells by inhibiting the STAT3 signal pathway

Fang Yang, Qiu Zhao, Yu Wang, Song-Lin Ma, Yong Gong

Fang Yang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Xiamen, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Qiu Zhao, Yu Wang, Song-Lin Ma, Yong Gong, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Qiu Zhao, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. Zhaoqiu461@163.com

Received: 2011-08-24 Revised: 2011-10-14

Accepted: 2011-10-22 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To investigate whether the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signal pathway is involved in the effect of curcumin on cell proliferation in pancreatic carcinoma cell line SW1990.

**METHODS:** SW1990 cells were incubated with different concentrations (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) of curcumin for different durations (0, 4, 12, 24, 48, 32 h). MTT assay was used to measure the proliferation of SW1990 cells. The protein expression of STAT3 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) in SW1990 cells was detected by Western blotting. Semi-quantitative RT-PCR was used to determine the mRNA expression of

bcl-2, bax, survivin and bak in SW1990 cells.

**RESULTS:** Curcumin inhibited SW1990 cell proliferation in a time- and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis revealed that curcumin reduced the level of p-STAT3 protein expression ( $F = 36.157$ ,  $P < 0.05$ ) in a dose-dependent manner, but had no significant impact on STAT3 level ( $F = 8.29$ ,  $P > 0.05$ ). Moreover, curcumin inhibited mRNA expression levels of bcl-2, bak and survivin ( $F = 75.690$ ,  $62.301$ ,  $52.73$ ;  $P < 0.01$ ,  $0.01$ ,  $0.05$ ) in a dose-dependent manner and up-regulated bax mRNA expression ( $F = 65.93$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Curcumin inhibits the proliferation of pancreatic carcinoma cells perhaps by inhibiting STAT3 phosphorylation and thereby reducing bcl-2, bak and survivin expression.

**Key Words:** Curcumin; Pancreatic carcinoma; Signal transducer and activator of transcription 3

Yang F, Zhao Q, Wang Y, Ma SL, Gong Y. Curcumin suppresses proliferation of pancreatic carcinoma cell by inhibiting the STAT3 signal pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3149-3153

## 摘要

**目的:** 研究姜黄素对STAT3活性的调控作用, 以探讨姜黄素对人类胰腺癌细胞增殖的影响。

**方法:** 应用MTT法检测姜黄素在不同浓度(20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ )及以中效浓度( $\text{IC}_{50}$ )的姜黄素分别作用于胰腺癌SW1990细胞0、4、12、24、48、32 h后对胰腺癌SW1990细胞增殖活性的影响; 不同浓度姜黄素(0、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ )作用于胰腺癌后应用Western blot检测STAT3、pSTAT3蛋白表达水平; 半定量RT-PCR检测Bcl-2、Bax、Survivin、Bak的转录水平。

**结果:** 姜黄素作用于人胰腺癌细胞系SW1990后, 细胞增殖水平明显下降, 姜黄素呈时间、剂量依赖型方式抑制胰腺癌细胞增殖。姜黄素对STAT3的蛋白表达水平无明显影响( $F$

## ■背景资料

STAT3是JAK-STAT信号通路中一个至关重要的转录因子, 在细胞内起着重要的信号传递作用。姜黄素具有明显的抗肿瘤作用, 作用机制是否与STAT3有关尚不清楚。

## ■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科



## ■研发前沿

近年来,研究针对肿瘤细胞内异常信号通路为靶点的特异性抗肿瘤药物已成为肿瘤治疗研究的热点。

= 8.29,  $P > 0.05$ ), 而对pSTAT3蛋白表达水平的抑制作用呈现为剂量依赖型( $F = 36.157$ ,  $P < 0.05$ ), 姜黄素抑制SW1990细胞内STAT3靶基因Bcl-2、Bak以及Survivin的mRNA转录水平( $F = 75.690$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 62.301$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 52.73$ ,  $P < 0.05$ ), 而使Bax mRNA的表达上调( $F = 65.93$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 姜黄素能抑制胰腺癌细胞的增殖, 这种抑制作用可能和姜黄素抑制STAT3信号分子的活化, 并进一步抑制其下游靶基因的表达有关。

**关键词:** 姜黄素; 胰腺癌; 信号转导与转录激活因子3

杨芳, 赵秋, 王渝, 马松林, 龚勇. 姜黄素抑制STAT3信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3149-3153

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3149.asp>

## 0 引言

胰腺癌是较常见的消化系恶性肿瘤, 该疾病的早期诊断十分困难, 多数新发病例已存在周围器官侵犯和/或远处转移, 手术切除率不到30%, 5年生存率低于5%<sup>[1]</sup>. 胰腺癌的发病率仍呈逐年上升趋势, 2009年美国在因肿瘤致死疾患中居第4位<sup>[2]</sup>. 信号转导和转录激活因子家族(signal transducers and activators of transcription, STATs)是一类将由细胞因子受体和生长因子受体传递的细胞外信号传送到细胞核的转录因子<sup>[3]</sup>. 在多种肿瘤组织中皆发现有其成员的过度表达, 其中以STAT3最为活跃. 激活的STAT3对肿瘤细胞的形成、生长、增殖、凋亡抑制等过程均起着重要的调控作用. 姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科植物姜黄中提取的 $\beta$ -二酮多酚类化合物, 具有抑制癌细胞增殖, 诱导癌细胞凋亡的抗癌活性, 可以减少肿瘤细胞体内外的侵袭和转移<sup>[4-7]</sup>. 为研究姜黄素对人类胰腺癌体外抗癌作用及其机制, 我们对姜黄素诱导胰腺癌细胞凋亡的可能途径进行初步探讨. 本研究拟选取胰腺癌细胞系SW1990, 通过外源性给予姜黄素, 观察姜黄素在胰腺癌细胞株中对STAT3的作用, 并进一步探索其对胰腺癌细胞增殖的作用, 再以此为依据, 探索胰腺癌治疗的新的靶点, 为临床上应用姜黄素治疗胰腺癌提供新的思路 and 理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞SW1990由华中科技

大学同济医学院附属同济医院肝病研究所保存; 姜黄素粉剂购自Sigma公司, 用二甲基亚砜(DMSO)稀释成5 mmol/L, 等量分装, -20 °C保存; DMEM高糖培养基购自Hyclone公司; 标准胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 兔抗人STAT3单克隆抗体、兔抗人pSTAT3单克隆抗体购自Cell Signaling公司; Taq DNA聚合酶为美国MBI公司产品; 莫洛尼氏鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶试剂为Promega公司产品; 四甲基偶氮唑蓝购自Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理: 细胞培养采用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基, 在37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养, 每48 h换液传代1次, 倍增时间约24 h. 取生长良好, 细胞活性大于98%的细胞进行实验. 用不同浓度的姜黄素(0、20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L)作用后收集细胞进行相关检测。

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色实验: 取对数生长期细胞, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^5$ /mL, 细胞接种于96孔培养板中, 在37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养24 h. 试验设试剂对照组、肿瘤细胞阴性组及五种不同浓度的试验组. 24 h后弃上清, 按实验要求加入终浓度为20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L的姜黄素, 同时取等量DMSO作为对照组, 每组设6个复孔, 以上各组培养24 h后, 弃上清, 每孔加20  $\mu$ L MTT(5 g/L)和180  $\mu$ L无血清DMEM培养液, 继续培养4 h, 去培养液, 加150  $\mu$ L DMSO振荡溶解10 min, 以空白孔调零, 在自动酶标仪上测定每孔吸光度值A, 波长为492 nm, 计算各组药物浓度的抑制率及中效浓度(IC<sub>50</sub>), 试验重复3次取平均值. 再以IC<sub>50</sub>浓度的姜黄素分别作用于胰腺癌SW1990细胞0、4、12、24、48、32 h后, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 计算出作用不同时间的增殖抑制率<sup>[8]</sup>. 增殖抑制率(%) = (1-实验孔A值/对照孔A值) × 100%。

1.2.3 免疫印迹法(Western blot)检测STAT3和pSTAT3蛋白的表达: 用不同浓度的姜黄素(0、20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L)作用于胰腺癌细胞24 h后, 分别收获细胞, 用冷PBS洗3次, 尽量吸尽瓶内PBS, 加入裂解缓冲液, 剧烈振荡混匀约10 s, 放置冰上30 min后收集. 低温下12 000 r/min离心15 min, 取上清, 等量分装后-80 °C冻存. 用Bradford比色法测所提核蛋白浓度后, 各组取等质量蛋白上样, 采用5%浓缩胶, 8%分离胶进

## ■相关报道

Pham等发现胰腺癌细胞中存在STAT3的过表达. Wei等的研究表明, 80%以上的胰腺癌细胞株显示组成性激活的STAT3的表达。

行SDS-PAGE电泳,电转蛋白至硝酸纤维素膜上。37℃用5%的脱脂奶粉封闭2 h, PBST洗膜3次后加入1:800稀释的鼠抗人STAT-3、p-STAT3单克隆抗体,4℃下孵育过夜,TBS洗膜后,加入PBST冲洗10 min,共洗3次。加入1:50稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔的二抗,37℃孵育2 h,洗去未结合的二抗,滴加ECL化学发光试剂,X线曝光显影,洗片显示蛋白条带,各组均以 $\beta$ -actin蛋白作为内参照。用图像分析软件分析条带的平均光密度值,蛋白相对表达水平以STAT3/ $\beta$ -actin、pSTAT3/ $\beta$ -actin平均光密度比值表示。

**1.2.4 半定量RT-PCR检测各组细胞内Bcl-2、Bax、Survivin、Bak基因mRNA的表达水平:** 25  $\mu$ L逆转录反应体系,取2  $\mu$ g总RNA, M-MLV逆转录酶42℃逆转录1 h,之后进行PCR反应。反应体系25  $\mu$ L,取2  $\mu$ L cDNA,用Taq DNA聚合酶进行PCR反应。程序设置如下:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,梯度退火45 s,72℃延伸35 s,共31个循环。各条引物序列如下: Bcl-2: 5'TATCCAATCCTGTGCTGC3', 5'GCAGT-TAAGATGCAGATGTG 3'; Bax: 5'ATGCGTC-CACCAAGAAGC3', 5'AGTCTCACCCAAC CACCCT3'; Survivin: 5'GGGAAACGGGGT GAACCTT3', 5'CAAATCCATCATCTTACGCC3'; Bak: 5'GGATTGGTGGGTCTATGTTC3', 5'CTA-CACCCCTGGATTACACTG3',  $\beta$ -actin: 5'GTT-GCGTTACACCCTTTCTTG3', 5'GACTGCTGT-CACCTTCACCGT3'。上述引物均由上海生物工程技术有限公司合成。将PCR产物用1.5% TAE琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像分析系统测得各组条带的平均灰度值以进行半定量分析。

**统计学处理** 采用SPSS13.0进行数据录入和统计分析。实验数据以mean $\pm$ SD表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 姜黄素对胰腺癌细胞增殖的影响** 浓度分别为20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L的姜黄素对SW1990细胞作用24 h后,MTT检测各实验组细胞的增殖抑制率分别为:22.60% $\pm$ 12.65%、40.45% $\pm$ 7.30%、57.09% $\pm$ 8.20%、71.52% $\pm$ 8.67%、81.42% $\pm$ 4.39%,与对照组相比,均有显著性差异( $F=58.37$ ,  $P<0.01$ ),而浓度分别为80与100  $\mu$ mol/L的两组间比较无显著性差异( $P>0.05$ )。姜黄素对SW1990细胞的增

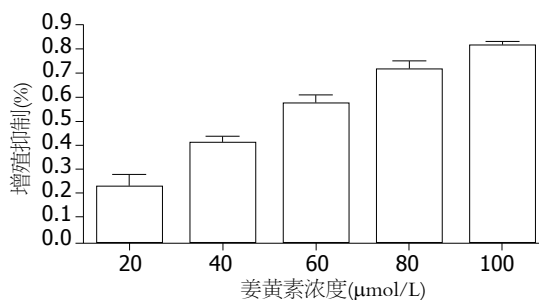


图1 不同浓度姜黄素对胰腺癌SW1990细胞增殖抑制率的影响。

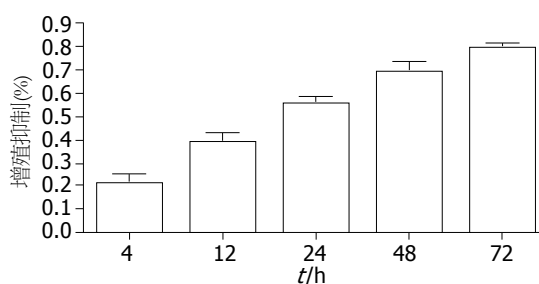


图2 60  $\mu$ mol/L的姜黄素作用不同时间对SW1990细胞增殖活性的影响。

殖抑制作用呈剂量依赖性(图1)。Bliss法计算出 $IC_{50} = 56.78$   $\mu$ mol/L。我们选浓度为60  $\mu$ mol/L的姜黄素分别作用于SW1990细胞4、12、24、48、72 h后MTT检测各组细胞的增殖抑制率分别为:11.23% $\pm$ 8.51%、39.08% $\pm$ 8.78%、55.72% $\pm$ 6.79%、69.19% $\pm$ 10.56%、80.05% $\pm$ 3.59%。随着姜黄素作用时间的延长,细胞增殖率逐渐降低,姜黄素对SW1990细胞的增殖抑制作用呈时间依赖性( $F=58.37$ ,  $P<0.01$ ,图2)。

**2.2 姜黄素对SW1990细胞内STAT3、pSTAT3蛋白表达水平的影响** 各组STAT3和pSTAT3蛋白相对表达量以STAT3/ $\beta$ -actin和pSTAT3/ $\beta$ -actin比值表示。Western blot检测显示:随着姜黄素作用浓度的升高,pSTAT3蛋白表达水平逐渐减低,当姜黄素浓度为100  $\mu$ mol/L时,pSTAT3蛋白条带明显变弱,姜黄素抑制pSTAT3蛋白表达呈明显的剂量依赖性( $F=36.157$ ,  $P<0.05$ )。而随着姜黄素作用浓度的升高,细胞内STAT3蛋白均呈强表达,并且其表达水平不随姜黄素作用浓度的增高而变化( $F=8.29$ ,  $P>0.05$ ,图3)。

**2.3 姜黄素对STAT3下游靶基因mRNA表达水平的影响** 姜黄素作用SW1990细胞株后,明显下调Bcl-2、Bak以及Survivin水平( $F=75.690$ ,  $P<0.01$ ;  $F=62.301$ ,  $P<0.01$ ;  $F=52.73$ ,  $P<0.05$ ),

### ■创新盘点

本文观察了不同剂量姜黄素作用下,人胰腺癌细胞STAT3及pSTAT3蛋白表达的变化,并探讨了可能的分子机制。发现姜黄素能抑制STAT3的活化,继而下调其下游靶基因的表达,抑制人胰腺癌细胞增殖,诱导其凋亡。

### ■应用要点

姜黄素是姜黄最重要的生物活性成分,近年来其抗肿瘤作用得到越来越多的实验证实。本研究结果加深了对其作用机制的认识,为其进一步开发应用奠定了理论基础。

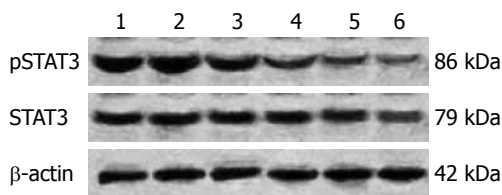


图3 姜黄素对SW1990细胞内STAT3及pSTAT3蛋白表达水平的影响。1: 对照组; 2: 20  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 3: 40  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 4: 60  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 5: 80  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 6: 100  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组。

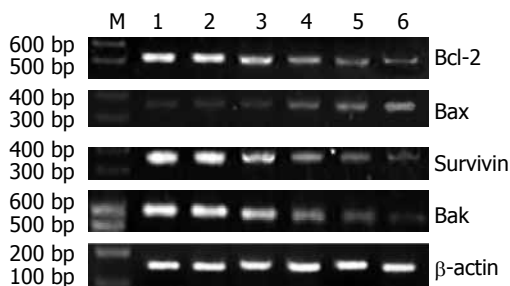


图4 姜黄素对STAT3的靶基因mRNA表达水平的影响。1: 对照组; 2: 20  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 3: 40  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 4: 60  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 5: 80  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; 6: 100  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组; M: DNA Marker。

上调Bax水平( $F = 65.93$ ,  $P < 0.05$ )。并且其表达水平随姜黄素作用浓度的变化而变化,呈剂量依赖性(图4)。

### 3 讨论

STAT3是存在于细胞浆与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白,在细胞内起着重要的信号传递作用。目前已发现多种细胞外信号可激活STAT3,之后可形成二聚体入核,识别并结合于特定的DNA启动子序列,激活靶基因的转录<sup>[9,10]</sup>。研究发现,STAT3信号转导通路在多种原发癌灶和肿瘤来源细胞株中异常激活和过表达<sup>[11-16]</sup>。激活的STAT3对肿瘤细胞的形成、生长、增殖、凋亡抑制等过程起着重要的调控作用,这可能与STAT3的活化导致一系列靶基因的激活有关<sup>[17]</sup>。

近年来关于STAT3与胰腺癌关系的研究较多,Pham等<sup>[18]</sup>发现胰腺癌细胞中存在STAT3的过表达。Wei等<sup>[19]</sup>的研究表明,80%以上的胰腺癌细胞株显示组成型激活的STAT3的表达。Toyonaga等<sup>[20]</sup>研究发现,在人胰腺癌细胞系(Panc1, Kp4, AsPC-1, BxPC-3)中STAT3组成型激活。这些结果均提示,STAT3的活化与胰腺癌密切相关,而以STAT3作为靶点可能为胰腺癌的治疗提供一种新的治疗策略。

姜黄素(curcumin, Cur)具有抗癌谱广、不良

反应小的优点,最近被肿瘤学家们认为是一种潜在的第3代抗癌化疗药。姜黄素抗癌作用的机制是多方面的,其中诱导肿瘤细胞凋亡可见于多种肿瘤研究中,但其诱导肿瘤细胞凋亡的机制仍不清楚。体外研究表明,姜黄素抑制癌细胞增殖和诱导凋亡是通过多条通路和调节多种肿瘤基因表达实现的,其作用靶点可以从DNA、mRNA到蛋白水平。我们通过研究姜黄素对胰腺癌细胞STAT3信号分子的作用,初步探讨了姜黄素对胰腺癌的可能作用机制。

我们的研究结果显示,姜黄素能有效抑制人类胰腺癌细胞株SW1990的增殖,胰腺癌SW1990细胞增殖活力随姜黄素药物浓度增大和作用时间的延长而不断下降,其抑制作用呈剂量和时间依赖方式,与Jutooru等<sup>[21]</sup>的报道一致。本研究结果还显示,随着姜黄素浓度升高,STAT3蛋白表达无明显变化,而pSTAT3蛋白表达水平逐渐下降,姜黄素可以抑制胰腺癌细胞中活化的pSTAT3的表达水平。Glienne等<sup>[22]</sup>的研究结果显示,姜黄素可以明显抑制胰腺癌细胞系的STAT3的磷酸化,并且下调Survivin/BIRC5基因的表达,这与我们的研究结果相同。本实验显示,姜黄素作用SW1990细胞株后,明显下调Bcl-2 mRNA和上调Bax mRNA,而Survivin mRNA表达水平也明显下降。表明姜黄素可能是通过抑制STAT3活化从而抑制了其下游靶基因的转录,以削弱其抑制肿瘤细胞凋亡的作用,进而促进胰腺癌细胞的凋亡。

本研究初步探讨了姜黄素抑制胰腺癌生长的作用机制,结果表明,姜黄素可阻断高表达STAT3的人胰腺癌细胞系SW1990细胞STAT3活化,并可能通过下调Bcl-2的表达抑制人胰腺癌细胞增殖,诱导其凋亡。此外,姜黄素对STAT3的功能有显著影响,但STAT3途径是不是姜黄素抑制效应的主要或唯一途径,仍需进一步研究。

### 4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- 2 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 3 Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-2488
- 4 Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer* 2010; 62: 919-930

- 5 Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 1340-1351
- 6 Tharakan ST, Inamoto T, Sung B, Aggarwal BB, Kamat AM. Curcumin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 218-228
- 7 Cheng CY, Lin YH, Su CC. Curcumin inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma J5 cells by inducing endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Int J Mol Med* 2010; 26: 673-678
- 8 Yang CR, Guh JH, Teng CM, Chen CC, Chen PH. Combined treatment with denbinobin and Fas ligand has a synergistic cytotoxic effect in human pancreatic adenocarcinoma BxPC-3 cells. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1175-1185
- 9 Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, Zhang C, Reckamp K, Armstrong B, Wang L, Kowolik C, Deng J, Figlin R, Yu H. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the in vivo antitumor functions of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 2010; 70: 7455-7464
- 10 Spano JP, Milano G, Rixe C, Fagard R. JAK/STAT signalling pathway in colorectal cancer: a new biological target with therapeutic implications. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2668-2670
- 11 Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 2888-2899
- 12 Chen CL, Cen L, Kohout J, Hutzen B, Chan C, Hsieh FC, Loy A, Huang V, Cheng G, Lin J. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival. *Mol Cancer* 2008; 7: 78
- 13 Lee SO, Lou W, Qureshi KM, Mehraein-Ghomi F, Trump DL, Gao AC. RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate* 2004; 60: 303-309
- 14 Hsieh FC, Cheng G, Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 292-299
- 15 Leeman RJ, Lui VW, Grandis JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 231-241
- 16 Yu LF, Cheng Y, Qiao MM, Zhang YP, Wu YL. Activation of STAT3 signaling in human stomach adenocarcinoma drug-resistant cell line and its relationship with expression of vascular endothelial growth factor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 875-879
- 17 Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 315-324
- 18 Pham NA, Schwock J, Iakovlev V, Pond G, Hedley DW, Tsao MS. Immunohistochemical analysis of changes in signaling pathway activation downstream of growth factor receptors in pancreatic duct cell carcinogenesis. *BMC Cancer* 2008; 8: 43
- 19 Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 319-329
- 20 Toyonaga T, Nakano K, Nagano M, Zhao G, Yamaguchi K, Kuroki S, Eguchi T, Chijiwa K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Blockade of constitutively activated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2003; 201: 107-116
- 21 Jutooru I, Chadalapaka G, Lei P, Safe S. Inhibition of NFkappaB and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation. *J Biol Chem* 2010; 285: 25332-25344
- 22 Glienke W, Maute L, Wicht J, Bergmann L. Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. *Cancer Invest* 2010; 28: 166-171

**同行评价**

本文采用姜黄素来研究其对肿瘤的抑制作用, 有一定的学术研究和临床意义。

编辑 李军亮 电编 何基才



# 有机阴离子转运肽oatp4a1与脾主运化本质的关系

孙保国, 陈泽雄, 张诗军, 项婷, 陈肖霖, 罗纯

## ■背景资料

脾主运化是脾的主要生理功能, 目前对于脾主运化本质的研究还较为薄弱。机体对水、电解质、药物、食物消化分解产物的吸收和转运有着复杂的机制和系统, 他们的功能一定程度上反映了脾主运化的生理功能, 通过研究其与脾虚的关系, 对阐明脾主运化的微观基础有重要意义。

孙保国, 陈泽雄, 张诗军, 项婷, 陈肖霖, 罗纯, 中山大学附属第一医院中医科 广东省广州市510080

孙保国, 主治医师, 主要从事中西医结合肝病临床基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072806; No. 811102581

广东省科技计划项目基金, No. 2009B030801128

作者贡献分布: 孙保国、陈泽雄、张诗军、项婷、陈肖霖及罗纯对此文所作贡献均等; 此课题由孙保国、陈泽雄、张诗军、项婷、陈肖霖及罗纯共同设计并实施完成; 研究试剂经费由张诗军提供; 数据分析由孙保国完成; 论文写作由孙保国、陈泽雄、张诗军、项婷、陈肖霖及罗纯共同完成。

通讯作者: 张诗军, 博士, 教授, 主任医师, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院中医科. zhsjun1967@yahoo.com.cn  
电话: 020-87332200-8385

收稿日期: 2011-08-29 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-10-23 在线出版日期: 2011-10-28

## Relationship between organic anion transporter peptide-4a1 and nature of spleen governing transportation and transformation

Bao-Guo Sun, Ze-Xiong Chen, Shi-Jun Zhang, Ting Xiang, Xiao-Lin Chen, Chun Luo

Bao-Guo Sun, Ze-Xiong Chen, Shi-Jun Zhang, Ting Xiang, Xiao-Lin Chen, Chun Luo, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81072806 and 811102581; and the Science and Technology Project of Guangdong Province, No. 2009B030801128

Correspondence to: Shi-Jun Zhang, Professor, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. zhsjun1967@yahoo.com.cn  
Received: 2011-08-29 Revised: 2011-10-18

Accepted: 2011-10-23 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To explore the relationship between organic anion transporter peptide-4a1 (oatp4a1) and nature of spleen governing transportation and transformation by examining oatp4a1 protein expression in rats with spleen deficiency syndrome.

**METHODS:** Thirty-six male SD rats were randomly divided into six groups: saline-treated control group (normal rats treated with saline),

aristolochic acid (AA)-treated control group (normal rats treated with AA), spleen deficiency group (rats with reserpine-induced spleen deficiency syndrome), AA-treated spleen deficiency group (rats with spleen deficiency syndrome treated with AA), high-fat group (normal rats given a high fat diet), and AA-treated high-fat group (normal rats given a high fat diet and treated with AA). Rats were treated with reserpine or given a high-fat diet for 21 d, and AA was intragastrically administered for 3 d. Tissue samples were taken within an hour after the last administration of AA. Oatp4a1 protein expression in the lung, liver, kidney, stomach, small intestine and large intestine was detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Oatp4a1 was expressed in all the six tissues and was located in both the cytoplasm and nucleus in the lung and in the cytoplasm in the other tissues. Under normal conditions, oatp4a1 expression level was highest in the small intestine ( $P<0.01$ ). Oatp4a1 expression levels declined in the small intestine but increased in the large intestine in rats with spleen deficiency and those given a high fat diet (both  $P<0.05$ ).

**CONCLUSION:** Spleen governing transportation and transformation might be closely associated with small intestine absorption and oatp4a1 expression in the small intestine.

**Key Words:** Spleen deficiency syndrome; Water metabolism; Organic anion transporter peptide-4a1

Sun BG, Chen ZX, Zhang SJ, Xiang T, Chen XL, Luo C. Relationship between organic anion transporter peptide-4a1 and nature of spleen governing transportation and transformation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3154-3158

## 摘要

**目的:** 通过观察脾虚状态下大鼠oatp4a1蛋白表达来探讨oatp4a1与脾主运化本质的关系。

**方法:** 36只♂大鼠随机分为空白组、空白AA(AA为马兜铃酸I)组、脾虚组、脾虚AA

## ■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

组、高脂饮食组、高脂饮食AA组6组。高脂饮食及利血平造模21 d, 造模成功后给予相应组别大鼠AA灌胃3 d, 末次给AA后1 h内采集标本, 免疫组化方法检测各组大鼠肺、肝、肾、胃、小肠、结直肠组织中oatp4a1的蛋白表达和分布情况。

**结果:** oatp4a1在上述6种脏器中都有不同程度的表达, 其在肺组织定位于细胞质和细胞核, 其余组织定位于细胞质。正常情况下, oatp4a1在小肠中表达水平最高( $P<0.01$ )。oatp4a1在脾虚模型和高脂饮食模型组的小肠中表达水平下降( $P<0.05$ ), 结直肠中oatp4a1表达水平较高( $P<0.05$ )。

**结论:** 脾主运化功能可能与小肠吸收转运功能及定位于小肠的oatp4a1有着密切的关系。

**关键词:** 脾虚症; 水液代谢; 有机阴离子转运肽

孙保国, 陈泽雄, 张诗军, 项婷, 陈肖霖, 罗纯. 有机阴离子转运肽oatp4a1与脾主运化本质的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3154-3158

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3154.asp>

## 0 引言

中医水液代谢理论是中医脏腑理论的重要组成部分, 是我国传统医学在长期临床实践的基础上发展起来的一种理论, 又有效地指导着临床实践。随着气候环境、生活方式等的变化, “新”的疾病不断出现, 其中不乏与水液代谢障碍相关的“新”的疾病。这就迫切需要有科学创意的假说提出, 从不同的角度对水液代谢的发生机制进行研究, 进而为临床提供有效的手段用于水液代谢障碍相关性病症的防治。在目前的水液代谢研究中, 对水液中之精微物质、水的运化的研究较多, 但对水液中之湿浊的研究较少, 在一定程度上阻碍了中医水液代谢理论理论内涵的深入研究, 是中医基础理论研究的薄弱环节之一。因此, 我们选取在机体内各组织中广泛分布的oatp4a1作为检测对象, 来探讨有关湿浊转运的分子学机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 6周龄SPF级SD雄性大鼠36只, 体质量150-180 g, 由广东省实验动物中心提供, 许可证号SCXK(粤)2008-0002粤监证字2008A020。马兜铃酸I(AA), 20 mg/支, 纯度达99%, 由芜湖忒尔塔医药科技有限公司提供; 利血平注射液1 mg/

支, 购自广州中医药大学附属第一医院; Oatp4A1一抗抗体(羊抗)购自Santa Cruz公司, 羊抗小鼠IgG二抗(HRP标记)、兔抗羊IgG二抗(HRP标记)购自武汉博士德公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 动物先饲养2 wk, 自由饮食、活动、睡眠, 使其体重增加至250-280 g。36只大鼠随机分为空白组、空白AA(AA为马兜铃酸)组、脾虚组、脾虚AA组、高脂饮食组、高脂饮食AA组共6组, 每组6只。

**1.2.2 脾虚大鼠模型复制方法:** 给予利血平5 mg/(kg·d), 皮下注射, 连续15 d, 给予普通饲料; 造模方法参照脾虚大鼠模型参考文献并改进<sup>[1]</sup>。脾虚的判别标准: 精神萎靡, 嗜卧懒动(扎堆); 食欲不振; 便溏(肛周不洁); 饮水减少。对于高质饮食模型组, 给予高质饮食(77%的普通饲料, 15%的猪油, 8%的蛋黄), 每天自由食用, 连续21 d。

**1.2.3 各组干预方法:** 各组大鼠自由饮食、活动、睡眠。造模成功后, 给予空白+AA组、脾虚+AA组、高脂饮食+AA组大鼠马兜铃酸20 mg/kg·d, 连续灌胃3 d<sup>[2]</sup>。其余各组给予0.9%生理盐水(10 mL/kg)灌胃, 连续3 d。各组大鼠在最后一次灌胃后1 h内进行取样。

**1.2.4 一般体征的观察:** 实验过程中每天密切观察大鼠的一般状态, 如饮水量、饮水量、体质量、生长体态、粪便情况、精神状态、活动状态、被毛色泽等。

**1.2.5 取样:** 用3%的戊巴比妥钠2 mL/kg进行腹腔注射, 对大鼠进行麻醉, 每只大鼠分别取肺、肝、肾、胃、小肠、结直肠等组织各1块, 放入40 g/L甲醛固定, 作免疫组织化学检测。

**1.2.6 oatp4a1蛋白分布检测:** 采用免疫组织化学染色检测, 免疫组化主要程序: 冰冻或石蜡切片→水化→血清封闭→I抗孵育→II抗孵育→加底物→显色(DAB)→复染→封片(具体操作参阅免疫组织化学试剂盒说明书), 图像采集利用OLYMPUS BX51生物显微镜及CCD感光系统, 所有图片在固定光源和恒定光强度下同一人一次性完成。

用Image-Pro Plus 6.0进行平均吸光度检测<sup>[3]</sup>, HSI(色调、色饱和度、强度)通道进行光密度分析(参数设置H: 26-36, S: 255, I: 210-250)。对于结直肠、胃、小肠检测腺体染色强度, 肾组织检测肾小球染色强度, 肺组织检测肺肺泡染色强度, 肝组织检测肝小叶染色强度。平均吸光度(A) = 积分吸光度(LA)/检测面积(area)。

### ■研究前沿

长期以来, 脾的生理功能是中医基础理论研究的重点和热点, 脾主运化有着广泛的生理基础, 有机阴离子转运肽是机体有机分子转运代谢的重要载体, 其与脾主运化的关系如何目前不明确。

### ■创新盘点

从有机阴离子转运肽oatp4a1在脾虚状态下的表达情况探索脾主运化的微观基础,目前在国内研究报道很少.

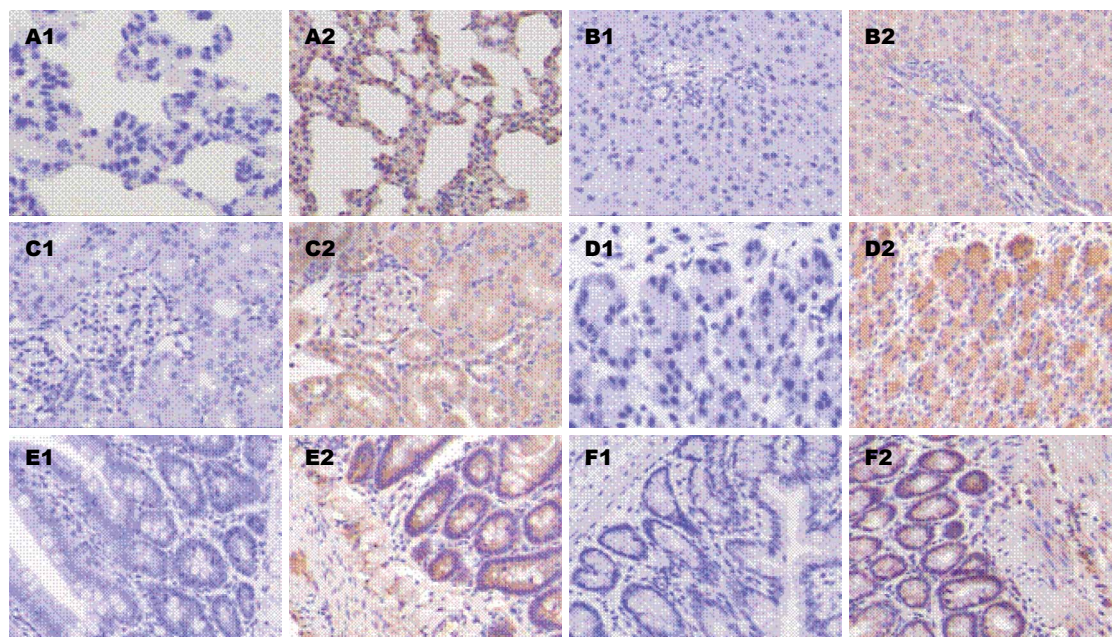


图2 oatp4a1在大鼠各个组织中的表达及定位( $\times 200$ ). A: 1: -; 2: +; A: 肺组织; B: 肝组织; C: 肾组织; D: 胃组织; E: 小肠组织; F: 大肠组织.

**统计学处理** 采用SPSS17.0软件进行数据处理, 正态计量资料采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  认为有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 一般体征情况比较** 脾虚组大鼠造模后, 表现为食欲不振, 嗜卧懒动, 便溏, 消瘦, 身体羸弱, 毛色晦暗发黄, 精神萎靡. 高质饮食组大鼠造模后, 表现为体格硕大、被毛光泽、反应敏捷、饮食量大. 正常对照组情况介于两者中间. 结果提示, 高脂饮食在实验期间可以明显改善大鼠的营养状况, 促进蛋白质和脂肪蓄积; 而利血平引起的脾虚状态则削弱了大鼠的营养吸收能力; 由此推测, 大鼠机体所发生的变化可能与体内有机阴离子转运肽oatp4a1存在一定的相关性.

**2.2 oatp4a1在大鼠肾、肺、小肠、结肠等脏组织中的蛋白分布** oatp4a1在大鼠的肝脏、肺脏、肾脏、胃、小肠、结肠内均有表达, 具体为: 肝脏定位于肝细胞质内; 肺脏定位于肺细胞核及细胞质内; 肾脏定位于肾小球的细胞核及肾小管管腔上皮细胞的胞质内; 胃定位于胃腺上皮的细胞质内; 小肠定位于小肠腺上皮的细胞质内; 结肠定位于结肠腺上皮的细胞质内(图1).

**2.3 oatp4a1的吸光度分析** 在正常情况或正常给予马兜铃酸刺激的情况下, oatp4a1在小肠组织中表达水平均高于其在肺、肝、肾、结肠、

胃中的表达水平( $P < 0.01$ ). oatp4a1在肾、结肠、胃中的表达水平均高于其在肝和肺中的表达水平( $P < 0.01$ ), 而其在肾、结肠、胃中的表达水平无统计学差异(表1).

在脾虚状态下oatp4a1在小肠组织中表达水平低于其在结肠中的表达水平( $P = 0.007$ ), 而从oatp4a1平均光密度的均数来看, 其均数水平在小肠中低于肾、胃、结肠. oatp4a1在肺、肝中的表达水平低于其他组织( $P < 0.01$ ). 脾虚给予马兜铃酸刺激的情况下, oatp4a1在小肠组织中表达水平均高于其在肺、肝、肾、结肠、胃中的表达水平( $P < 0.01$ ), 也高于脾虚状态下其小肠中的表达水平( $P = 0.006$ ). 脾虚给予马兜铃酸刺激的情况下, oatp4a1在肾、结肠、胃中的表达水平均高于其在肝和肺中的表达水平( $P < 0.01$ ), 而其在肾、结肠、胃中的表达水平无统计学差异(表2).

在高脂饮食下oatp4a1在小肠组织中表达水平低于其在结肠中的表达水平( $P = 0.017$ ); 并且oatp4a1在结肠组织中表达水平明显高于其在肺、肝、肾、胃中的表达水平( $P < 0.01$ ). oatp4a1在肺、肝中的表达水平低于其他组织( $P < 0.01$ ). 高脂饮食给予马兜铃酸刺激的情况下, oatp4a1在小肠组织中表达水平均高于其在肺、肝、结肠、胃中的表达水平( $P < 0.01$ 或 $0.05$ ), 也高于高脂饮食下其小肠中的表达水平( $P = 0.048$ ). 高脂饮食给予马兜铃酸刺激的情况下,



表 1 正常情况及马兜铃酸刺激后oatp4a1在各器官组织中的表达水平 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	肺	肝	结直肠	胃	肾	小肠
空白组	0.48 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.28 <sup>bdf</sup>	0.95 $\pm$ 0.26 <sup>bdf</sup>	0.78 $\pm$ 0.08 <sup>bdf</sup>	1.22 $\pm$ 0.17 <sup>df</sup>
空白AA	0.44 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.91 $\pm$ 0.29 <sup>bdf</sup>	0.75 $\pm$ 0.09 <sup>bd</sup>	0.90 $\pm$ 0.03 <sup>bdf</sup>	1.45 $\pm$ 0.33 <sup>df</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 小肠; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 肺; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 肝.

表 2 脾虚及脾虚马兜铃酸刺激后oatp4a1在各器官组织中的表达水平 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	肺	肝	结直肠	胃	肾	小肠
脾虚	0.44 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>be</sup>	0.91 $\pm$ 0.12 <sup>bdf</sup>	0.80 $\pm$ 0.11 <sup>df</sup>	0.81 $\pm$ 0.09 <sup>df</sup>	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>df</sup>
脾虚AA	0.38 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.57 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.21 <sup>af</sup>	0.90 $\pm$ 0.30 <sup>bdf</sup>	0.92 $\pm$ 0.17 <sup>bdf</sup>	1.24 $\pm$ 0.24 <sup>dhi</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 小肠; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 肺; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 肝; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 脾虚小肠.

表 3 高脂饮食及高脂饮食马兜铃酸刺激后oatp4a1在各器官组织中的表达水平 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	肺	肝	结直肠	胃	肾	小肠
高脂饮食	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.16	0.79 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
高脂饮食AA	0.46 $\pm$ 0.18 <sup>d</sup>	0.55 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.89 $\pm$ 0.11 <sup>cig</sup>	0.86 $\pm$ 0.15 <sup>cig</sup>	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>fg</sup>	1.18 $\pm$ 0.50 <sup>ghi</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 结直肠; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 小肠; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 肺; <sup>g</sup> $P < 0.05$ , <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 肝; <sup>i</sup> $P < 0.01$  vs 高脂饮食小肠.

oatp4a1在肾、结直肠、胃中的表达水平均高于其在肝和肺中的表达水平( $P < 0.01$ 或 $0.05$ ), 而其在肾、结直肠、胃中的表达水平无统计学差异,  $P > 0.05$ (表3).

### 3 讨论

脾主运化是脾最为重要的生理功能, 脾主运化包括脾对水谷精微的转化和运输两方面的功能. 脾主运化功能是脏腑系统代谢水液、营养物质、代谢产物的中心环节, 进入消化道的食物、药物、水液以及机体生命活动过程中形成的种种代谢产物的运输、转化乃至最终排出体外的过程都离不开脾主运化的生理功能. 那么, 从微观上来讲, 脾主运化的具体功能载体为何物, 又是如何发挥作用的呢?

研究发现, 有机阴离子转运肽(organic anion transporter polypeptides, oatps)广泛分布于机体各组织中, 可以高效运转多种异体代谢产物, 如食物代谢产物<sup>[4]</sup>、内源性及外源性毒素<sup>[5]</sup>、药物代谢产物<sup>[6]</sup>、内分泌激素<sup>[7]</sup>等, 在转运“湿浊”中起着关键作用<sup>[8]</sup>. oatp属于溶质载体超家族<sup>[9,10]</sup>, 是人和动物体内重要的膜转运蛋白. 目前已在大鼠体内发现14个oatp家族基因, 分布在

相应组织器官中, oatp表达的位置与被表达脏器的功能状态密切相关, 其中oatp4a1广泛分布于肠、肾、肺、肝等组织器官中, 由于功能需要其在不同组织器官细胞中的定位不尽相同, 介导内、外源物质的跨膜转运, 对保持机体和细胞内外环境的稳态平衡起重要作用<sup>[11,12]</sup>.

通过研究oatp4a1在利血平诱导的脾虚大鼠模型和高脂饮食诱导的高脂饮食模型肺、肝、结直肠、胃、肾、小肠中的表达情况, 来探讨脾主运化功能的生理本质. 并通过观察外界湿邪马兜铃酸刺激机体后对oatp4a1表达水平的影响来反证oatp4a1转运水湿的功能及oatp4a1与脾主运化功能的相关性.

根据本研究结果, oatp4a1广泛分布于大鼠肺、肝、结直肠、胃、肾、小肠中, 并且其在结直肠、小肠、胃、肝、肾定位于细胞质内, 而在肺定位于细胞核和细胞质中, 说明oatp4a1因不同器官功能的不同而定位是有区别的. 正常情况下, oatp4a1在小肠腺体细胞质中的浓度最高, 并且马兜铃酸刺激可以一定程度上增强其表达水平, 说明在水谷精微代谢的主要器官是小肠. oatp4a1在肺、肝中的表达水平最低, 结直肠、胃、肾中的表达水平居中并且无差别,

#### ■应用要点

本研究对于进一步确定定位于小肠的oatp4a1与脾主运化的本质关系有重要价值.



## ■同行评价

研究思路新颖,具有较强的创新性,对中医学的基础理论也是一种很好的前瞻性的研究。

说明oatp4a1主要参与水谷精微的转运和排泄。所以,对于脾主运化功能来说,oatp4a1是十分重要的功能载体。

在脾虚模型中,oatp4a1在小肠中的表达水平是降低的,其在结肠中表达水平最高,但是马兜铃酸刺激后小肠中oatp4a1表达水平可以恢复为最高,说明脾虚状态下小肠中oatp4a1表达水平下降,结肠中oatp4a1高表达可能是对小肠转运功能下降的代偿。尹朋等<sup>[13]</sup>发现利血平致脾虚大鼠的小肠粘膜受到明显损害,并且免疫防御功能也明显下降,说明脾虚与小肠功能有着密切关系。另外,有研究<sup>[14]</sup>表明在炎症性肠病患者中,肠道组织(53例克隆恩病和54例溃疡性结肠炎)oatp4a1 mRNA表达水平明显升高,提示oatp4a1与肠道正常结构和功能有着密切的关系,而肠道系统药物食物转运代谢的重要场所,其功能是脾主运化功能的重要体现,这也反映出oatp4a1与脾主运化的密切关系。所以,脾主运化与小肠和大肠及其oatp4a1可能有着的密切关系,小肠吸收转运能力下降及其oatp4a1表达水平的下降可能是脾虚的重要微观表现。

高脂饮食是一种经典的湿浊邪气,短期内给予高脂饮食可以缓解营养不良、促进脂肪和蛋白质的在体内的蓄积,因此本研究中高脂饮食大鼠营养状况最好。但是,长期高脂饮食必然加重脾的负担,进而损伤脾主运化功能,造成湿浊的留滞,产生痰湿。有研究<sup>[15]</sup>发现高脂饮食可以明显改变大鼠肠道菌群的分布,这可能是脾胃损伤的表现,并且大鼠血清总胆固醇水平明显升高,说明高脂饮食可以促进湿浊产生。本研究中,给予大鼠高脂饮食21 d,大约相当于人类进食高脂饮食360-500 d,虽然表面上无脾虚表现,但是小肠中oatp4a1表达水平已经明显下降,而大肠中oatp4a1表达水平成为最高,与脾虚组类似,说明高脂饮食可能明显损伤脾主运化的功能,通过进一步的延长高脂饮食干预动物,动物可能出现脾虚的临床表现。

从组间比较(空白组、空白AA组、高脂饮食组、高脂饮食AA组、脾虚组、脾虚AA组)来看,只有小肠组织和肝组织中oatp4a1表达水平有组间差异,其余各组织中oatp4a1表达水平均无组间差异,说明脾虚主要与小肠中oatp4a1的表达水平相关。这个结果符合这样的假设:小肠作为人体最长的消化器官,是饮食、药物吸收转运的主要器官,脾主运化水谷精微的功能

定位主要在小肠,并且oatp4a1是其重要的功能载体。

总之,本研究的结果初步说明脾主运化功能可能主要与小肠的吸收转运功能关系密切,oatp4a1是小肠吸收转运物质功能的重要载体,也可能是脾主运化功能的物质基础之一。

## 4 参考文献

- 1 李仪奎. 中药药理实验研究方法论. 上海: 上海科学技术出版社, 2006; 162-163
- 2 李恒, 刘志红, 裘奇, 王建平, 陈惠萍, 黎磊石. 马兜铃酸-1所致大鼠急性肾损害的实验研究. 中华肾脏病杂志 2002; 18: 53-55
- 3 Johansson AC, Visse E, Widegren B, Sjögren HO, Siesjö P. Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high- and low-magnification images. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1073-1079
- 4 Seden K, Dickinson L, Khoo S, Back D. Grapefruit-drug interactions. *Drugs* 2010; 70: 2373-2407
- 5 薛翔, 宫丽崑, 任进. 有机阴离子转运蛋白在外源化学物毒性中的作用. 中国药理学与毒理学杂志 2009; 23: 237-240
- 6 Tamai I. Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. *Adv Drug Deliv Rev* 2011 Jul 30. [Epub ahead of print]
- 7 Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 50-56
- 8 Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004; 447: 653-665
- 9 Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ. Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 73-79
- 10 Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G271-G278
- 11 Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T. The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19: 171-179
- 12 Svoboda M, Riha J, Wlcek K, Jaeger W, Thalhammer T. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Curr Drug Metab* 2011; 12: 139-153
- 13 尹朋, 赵焯, 朱晓宇, 王宁, 刘凤华, 许剑琴, 胡艳欣. 实验性脾虚大鼠小肠结构与免疫功能的变化. 中国兽医杂志 2010; 46: 16-20
- 14 Wojtal KA, Eloranta JJ, Hruz P, Gutmann H, Drewe J, Staumann A, Beglinger C, Fried M, Kullak-Ublick GA, Vavricka SR. Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug Metab Dispos* 2009; 37: 1871-1877
- 15 任婷婷, 卢放根, 张允历, 程兆明, 徐珉. 高脂饮食对SD大鼠肠道菌群的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2694-2697

# Klotho基因在胃癌组织中的表达及意义

黄曙, 汤小伟, 林洁, 范志宁, 季国忠

黄曙, 汤小伟, 林洁, 范志宁, 季国忠, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所 江苏省南京市 210011

国家自然科学基金资助项目, No. 81001076

江苏省六大人才高峰资助项目, No. 2009041

作者贡献分布: 黄曙与汤小伟对此文所作贡献均等; 此课题由黄曙、范志宁与季国忠设计; 研究过程及统计分析由黄曙、汤小伟、林洁完成; 本论文由黄曙、汤小伟与季国忠总结成文。

通讯作者: 季国忠, 主任医师, 教授, 210011, 江苏省南京市姜家园路121号, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所. jgzl@163.com

电话: 025-58509996

收稿日期: 2011-08-25 修回日期: 2011-10-15

接受日期: 2011-10-23 在线出版日期: 2011-10-28

## Clinical significance of expression of Klotho in gastric cancer

Shu Huang, Xiao-Wei Tang, Jie Lin, Zhi-Ning Fan, Guo-Zhong Ji

Shu Huang, Xiao-Wei Tang, Jie Lin, Zhi-Ning Fan, Guo-Zhong Ji, Institute of Digestive Endoscopy; Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81001076; the Foundation for "Talents in Six Fields" of Jiangsu Province, No. 2009041

Correspondence to: Guo-Zhong Ji, Professor, Institute of Digestive Endoscopy; Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. jgzl@163.com

Received: 2011-08-25 Revised: 2011-10-15

Accepted: 2011-10-23 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To examine the expression of Klotho in gastric cancer and to analyze its relationship with the biological behaviors of gastric cancer.

**METHODS:** Tissue microarray technique and immunohistochemistry were used to examine Klotho expression in 75 gastric cancer tissue and tumor-adjacent tissue specimens. The correlation between Klotho expression and clinicopathological features of gastric cancer was then analyzed.

**RESULTS:** The positive rate of Klotho expression was significantly lower in gastric cancer

than in tumor-adjacent tissue (76.0% vs 90.6%,  $P < 0.05$ ). Klotho expression was negatively correlated with tumor stage and lymph node metastasis (both  $P < 0.05$ ), but showed no significant correlation with sex, age, tumor size and pathological grade (all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Down-regulation of Klotho expression in gastric cancer may contribute to tumor metastasis and development. Klotho might be a novel and useful molecular marker for predicting outcome and lymph node metastasis in gastric cancer.

**Key Words:** Gastric cancer; Tissue microarray; Klotho

Huang S, Tang XW, Lin J, Fan ZN, Ji GZ. Clinical significance of expression of Klotho in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3159-3162

## 摘要

**目的:** 探讨Klotho基因在胃癌与癌旁组织中蛋白表达水平的差异及其与胃癌临床病理特征的关系。

**方法:** 采用免疫组织化学EnVision二步法, 检测Klotho蛋白在75对胃腺癌与其癌旁组织芯片中的表达情况, 并结合临床病理资料进行统计分析。

**结果:** 胃癌组织中Klotho蛋白表达阳性率(76.0%)低于癌旁组织(90.7%)( $P < 0.05$ )。胃癌组织中Klotho的蛋白表达与胃癌的临床分期、淋巴结转移呈负相关( $P < 0.05$ ), 与患者性别、年龄、肿瘤大小、病理分级等的相关性无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**结论:** Klotho基因在胃腺癌中低表达, 可能参与了胃癌的转移与进展, 这为判断胃癌预后及有无淋巴结转移提供参考依据。

**关键词:** 胃癌; 组织芯片; Klotho基因

黄曙, 汤小伟, 林洁, 范志宁, 季国忠. Klotho基因在胃癌组织中

## ■背景资料

胃癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤, 发病率和死亡率均高, 我国胃癌在各种恶性肿瘤中居首位。对胃癌发生发展分子机制的探讨对于胃癌易感人群的筛选、肿瘤标志物的寻找以及基因治疗等具有重要的理论意义和临床应用价值。寻找与胃癌相关的肿瘤标记性指标始终是胃癌基础与临床研究的主题之一。

## ■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

## ■ 研发前沿

近年来,衰老相关基因在肿瘤发生发展中的作用开始引起人们的关注,正成为肿瘤研究领域新的热点。但Klotho在胃癌中的相关研究目前甚少,其发挥的功能尚不清楚。

的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3159-3162  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3159.asp>

## 0 引言

胃癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,占全球癌症死亡原因的第2位。对胃癌发生发展分子机制的探讨对于胃癌易感人群的筛选、肿瘤标志物的寻找以及基因治疗等具有重要的理论意义和临床应用价值。Klotho是1997年发现的与衰老相关的基因<sup>[1]</sup>,近年来,该基因在肿瘤发生发展中的作用开始引起人们的关注<sup>[2]</sup>。自2008年开始,10余篇文章相继报道了Klotho基因与肿瘤的相关性,如Klotho在乳腺癌、肺癌、结肠癌等中具有抑制肿瘤细胞生长与转移,促进肿瘤细胞凋亡等功能<sup>[3-5]</sup>。但是,对于Klotho基因与胃癌的相关性研究甚少<sup>[6]</sup>,Klotho基因在胃癌发生发展中的作用还不清楚。本研究利用免疫组织化学EnVision二步法检测Klotho基因在胃癌与癌旁组织芯片中的表达情况,探讨胃癌组织中Klotho基因的表达与胃癌临床病理特征的关系以及该基因在胃癌发生发展中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃腺癌组织芯片为上海芯超生物技术有限公司产品(编号OD-CT-DgStm01-014),每例芯片的直径为1.5 mm,厚度为4  $\mu$ m,10 $\times$ 16双芯排列,用统一标准的方法加工。每片芯片的完整性>95%。在75例标本中,男( $n=50$ ),女( $n=25$ );年龄30-84(中位年龄65)岁。参照2000年世界卫生组织推荐的肿瘤分化分级标准,低分化腺癌( $n=28$ ),中、高分化腺癌( $n=47$ )。按2002年国际抗癌联盟TNM分期法,I期( $n=12$ ),II期( $n=25$ ),III期( $n=32$ ),IV期( $n=6$ )。一抗山羊抗人Klotho多克隆抗体和相应驴抗山羊二抗均购自Santa Cruz公司(产品编号分别为sc-22218和sc-2020),-20 $^{\circ}$ C保存,一抗工作浓度为4 mg/L。免疫组织化学EnVision二步法试剂盒购买自DAKO公司。

**1.2 方法** 采用免疫组织化学EnVision二步法检测Klotho蛋白表达情况:使用上海芯超生物技术有限公司的胃腺癌组织芯片,采用免疫组织化学EnVision二步法检测胃癌和癌旁组织中Klotho蛋白表达情况,按试剂盒说明书进行操作。PBS代替一抗作为阴性对照,用Klotho阳性肾小管组织切片作为阳性对照。2位病理医师用双盲法对芯片进行观察,根据染色强度与阳性细胞比例综合计分,细胞的染色强度可分为0分(染色阴

表 1 Klotho在胃癌与癌旁正常组织中的表达 ( $n=75$ )

部位	Klotho的表达情况			P值
	阳性	阴性	阳性率(%)	
胃癌组织	57	18	76.0	<0.05
癌旁组织	68	7	90.7	

性),1分(淡黄色颗粒),2分(棕黄色颗粒),3分(褐色颗粒);阳性细胞比例的评分方法为:0分(阳性细胞比例 $\leq 5\%$ ),1分( $5\% <$ 阳性细胞比例 $\leq 25\%$ ),2分( $25\% <$ 阳性细胞比例 $\leq 50\%$ ),3分( $50\% <$ 阳性细胞比例 $\leq 75\%$ ),4分( $75\% <$ 阳性细胞比例 $\leq 100\%$ )。根据两项剩积的分数分为4级,分数 $\leq 4$ 记为-4<分数 $\leq 8$ 记为+, $8 <$ 分数 $\leq 12$ 记为++,分数 $>12$ 记为+++。其中-记为Klotho表达阴性;+、++、+++记为Klotho表达阳性。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行分析。Klotho蛋白在胃癌与癌旁组织中表达差异,以及Klotho与临床病理指标(性别、年龄、胃癌分期、分级、淋巴结转移、癌块大小、浸润深度等)的关系均采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 组织芯片的质量** 组织芯片经免疫组织化学染色后,光镜下剔除染色效果差,组织残缺不全的标本,最后进入统计的组织芯片含75例胃癌组织与75例癌旁组织。

**2.2 Klotho蛋白在胃癌与癌旁组织中的表达** 75例胃癌组织中,57例Klotho表达阳性(76.0%),显色部位主要为细胞浆;75例癌旁组织中,68例Klotho表达阳性(90.7%)。经分析,Klotho蛋白在胃癌与癌旁组织中表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图1,表1)。

**2.3 Klotho蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系** Klotho表达阳性与胃癌患者性别、年龄、癌块大小、病理分级、是否有浆膜层浸润、浸润深度及发生部位等的相关性均无统计学意义( $P > 0.05$ ),而与临床分期、淋巴结转移有密切关系,二者呈负相关( $P < 0.05$ ,表2)。

## 3 讨论

Klotho基因于1997年被发现<sup>[1]</sup>,最先研究认为,它是一种抗衰老基因,Klotho基因敲除的老鼠表现出一系列衰老的症状,如骨质疏松、肺气肿、皮肤萎缩、动脉硬化等<sup>[1]</sup>。近年来,对Klotho基



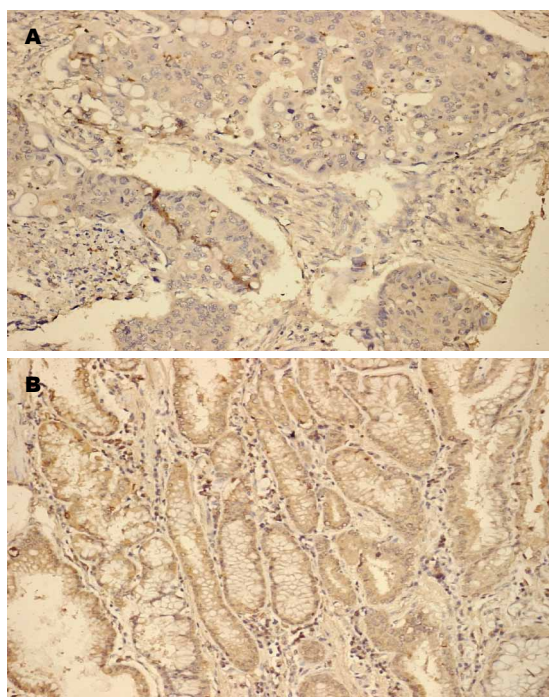


图 1 免疫组织化学EnVision二步法检测胃癌及其癌旁组织中Klotho蛋白的表达( $\times 200$ )。A: 胃癌组织中呈阴性表达; B: 癌旁组织中呈阳性表达。

因的功能研究提示其与恶性肿瘤的发生发展密切相关, 他能抑制多种恶性肿瘤相关信号通路如Insulin/IGF-1、Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1等, 从而抑制肿瘤细胞的生长与迁移<sup>[3,7,8]</sup>。Wolf等<sup>[3]</sup>首先报道了Klotho在乳腺癌细胞中能与IGF-1受体结合, 阻止其磷酸化, 从而抑制IGF-1信号通路的激活, 使乳腺癌细胞的生长受限, 进而导致其衰老与凋亡。Lee等<sup>[7]</sup>将Klotho基因成功转染宫颈癌细胞后, 发现癌细胞的生长大大受限, 凋亡率明显增加, 细胞内的Wnt通路重要的信号分子 $\beta$ -catenin含量显著减少, c-Myc与CCND1明显降低。Doi等<sup>[8]</sup>将Klotho基因转染肺癌细胞, 削弱了癌细胞的转移能力, 进一步地研究发现Klotho可与TGF- $\beta$ 1竞争性结合TGF- $\beta$  II型受体, 从而阻止TGF- $\beta$ 1的信号转导。其他研究还表明, Klotho能使促凋亡因子Bax表达升高, 使抑制凋亡因子Bcl-1表达降低, 从而促进癌细胞发生凋亡<sup>[9]</sup>。然而, 2008年Lu等<sup>[10]</sup>发现在卵巢上皮细胞癌组织中存在Klotho蛋白的高表达, 由此推测, Klotho蛋白表达可能与卵巢癌进展有关, 而并非发挥抑癌因子样作用。以上说明, Klotho基因在不同的肿瘤中可能发挥着不同的作用。而目前, 在胃癌发生发展中, Klotho基因的功能尚不清楚, 尤其是其与临床、病理参数间关系等基本信息尚未见研究报道。

表 2 Klotho蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Klotho表达情况			P值
		阳性	阴性	阳性率(%)	
性别					
男	50	38	12	76.0	1.000
女	25	19	6	76.0	
年龄(岁)					
$\leq 65$	38	26	12	83.8	0.119
$> 65$	37	31	6	68.4	
淋巴结转移					
有	47	31	16	66.0	0.008
无	38	26	12	92.9	
临床分期					
1期+2期	37	33	4	89.2	0.008
3期+4期	38	24	14	63.2	
病理分级					
高分化(I, I-II)	7	6	1	85.7	0.682
中分化(II, II-III)	40	31	9	77.5	
低分化(III, IV)	28	20	8	77.4	
浸润深度					
T1+T2	19	16	3	84.2	0.510
T3+T4	56	41	15	73.2	
突破浆膜层					
是	65	52	13	80.0	0.095
否	10	5	5	50.0	
肿瘤大小(cm)					
$< 5$	27	21	6	77.8	0.787
$\geq 5$	48	36	12	75.0	
肿瘤发生部位					
贲门	17	13	4	76.5	0.190
胃体	17	12	5	70.6	
胃角	8	8	0	100.0	
胃窦	30	22	8	73.3	

本实验通过组织芯片联合免疫组织化学法首次检测了胃癌及癌旁正常组织中Klotho蛋白的表达情况。结果表明, 该蛋白在胃癌中的表达低于癌旁组织, 且Klotho的表达还与胃癌的临床分期、淋巴结转移密切相关, 随着胃癌淋巴结的转移、临床分期的增高, Klotho的表达阳性率降低。结合我们的前期研究结果, Klotho基因启动子区G-395A多态与胃癌发病危险性呈显著相关, 携带A等位基因患者发生胃癌的危险性明显高于携带G等位基因的患者<sup>[6]</sup>。而Klotho基因启动子-395区G突变为A可抑制基因的转录, 降低Klotho的表达<sup>[11]</sup>, 进一步提示胃癌的发生与Klotho的低表达有关。所以, Klotho可能作为一种肿瘤抑制因子参与胃癌的进展过程。

总之, 本研究结果显示, Klotho基因的表达与胃癌的淋巴结转移与临床分期负相关, 可考

#### ■ 相关报道

对Klotho基因的功能研究提示, 他能抑制多种恶性肿瘤相关信号通路如Insulin/IGF-1、Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta$ 1等, 从而抑制肿瘤细胞的生长与迁移。自2008年始, 陆续有研究直接探讨了Klotho基因与肿瘤如乳腺癌、肺癌、结肠癌等的相关性, 但现有研究结果表明, Klotho并非总是发挥抑癌因子样作用, 该基因在不同的肿瘤中可能作用不同。



## ■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 数据统计及分析方法正确, 对判断胃癌转移倾向及预后评估有参考价值。

虑将其作为评估胃癌转移潜能及判断预后的指标之一, 也为胃癌的靶向治疗提供了新的思路。Klotho基因与胃癌的关系及其分子机制有待进一步深入研究。

## 4 参考文献

- 1 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohshima Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51
- 2 Duan ZX, Gu W, Du DY, Hu P, Jiang DP, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX. Distributions of glucocorticoid receptor gene polymorphisms in a Chinese Han population and associations with outcome after major trauma. *Injury* 2009; 40: 479-483
- 3 Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* 2008; 27: 7094-7105
- 4 Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwaru N, Uchida O, Nomura M, Ohira T, Ikeda N. Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer* 2011; 74: 332-337
- 5 Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2011; 32: 729-735
- 6 孟庆玲, 黄曙, 季国忠, 范志宁. Klotho基因G-395A和C1818T多态性与胃癌遗传易感性的研究. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2008; 10: 1258-1262
- 7 Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ, Lee MS. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 109
- 8 Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-o M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 2011; 286: 8655-8665
- 9 Chen B, Wang X, Zhao W, Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 99
- 10 Lu L, Katsaros D, Wiley A, de la Longrais IA, Puopolo M, Yu H. Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression. *Cancer Invest* 2008; 26: 185-192
- 11 Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1744-1751

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG)被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力。WJG在PubMed Central (PMC)统计, 单月独立IP地址访问58 257次, 全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次, 全文PDF下载59 694次。另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种, 总被引频次排名, WJG位于第174名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

# 转录抑制因子ZHX2在胃癌组织中的表达及临床意义

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶, 孙忠亮

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶, 孙忠亮, 广西医科大学第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021  
广西青年科学基金资助项目, No. 0728057

作者贡献分布: 此课题由陈其军与吕自力设计; 研究过程由陈其军、党裔武、魏晶晶及孙忠亮操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由党裔武提供; 数据分析由陈其军完成; 论文书写由陈其军与吕自力完成。

通讯作者: 吕自力, 副教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院病理科. lvzili@yahoo.com.cn  
电话: 0771-5356534

收稿日期: 2011-08-24 修回日期: 2011-10-14

接受日期: 2011-10-20 在线出版日期: 2011-10-28

## Clinical significance of ZHX2 protein expression in gastric carcinoma

Qi-Jun Chen, Zi-Li Lv, Yi-Wu Dang, Jing-Jing Wei, Zhong-Liang Sun

Qi-Jun Chen, Zi-Li Lv, Yi-Wu Dang, Jing-Jing Wei, Zhong-Liang Sun, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Supported by: the Youth Science Foundation of Guangxi, No.0728057

Correspondence to: Associate Professor Zi-Li Lv, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lvzili@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-24 Revised: 2011-10-14

Accepted: 2011-10-20 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of zinc-fingers and homeoboxes 2 (ZHX2) in gastric carcinoma and to analyze its clinical significance.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to examine the expression of ZHX2 protein in 62 cases of gastric carcinoma and tumor-adjacent tissue specimens. The relationship between ZHX2 protein expression and clinicopathological characteristics of gastric carcinoma was then analyzed.

**RESULTS:** The positive rate of ZHX2 expression was significantly higher in gastric carcinoma than in tumor-adjacent tissue (72.58% vs 14.52%,  $P < 0.001$ ). The expression of ZHX2 was not associated with age, gender, tumor size, classifica-

tion, tumor differentiation, lymph node metastasis, distant metastasis or TNM stage. However, ZHX2 expression was significantly associated with tumor location and depth of invasion (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of ZHX2 protein in gastric carcinoma was significantly higher than that in tumor-adjacent tissue. ZHX2 may be used to evaluate the origin and prognosis of gastric carcinoma.

**Key Words:** Zinc-fingers and homeoboxes 2; Gastric carcinoma; Clinicopathological features; Immunohistochemistry; Prognosis

Chen QJ, Lv ZL, Dang YW, Wei JJ, Sun ZL. Clinical significance of ZHX2 protein expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3163-3167

## 摘要

**目的:** 研究ZHX2基因在胃癌组织与癌旁正常胃组织中的表达差异及其与患者临床病理特征的相关性。

**方法:** 应用免疫组织化学Envision二步法检测62例胃癌组织与62例癌旁正常胃组织中ZHX2蛋白的表达, 用SPSS13.0统计软件对ZHX2蛋白表达差异与患者的临床病理特征之间的相关性进行统计学分析。

**结果:** ZHX2蛋白在62例胃癌组织中阳性表达( $n = 45$ ), 阴性表达( $n = 17$ ), 阳性表达率72.58%; 癌旁正常组织阳性表达( $n = 9$ ), 阴性表达( $n = 53$ ), 阳性表达率14.52%, 组间比较有明显统计学差异( $P < 0.001$ )。在62例胃癌组织中, ZHX2蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、大体类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无关( $P > 0.05$ ), 而与肿瘤的发生部位、浸润深度有关( $P < 0.05$ )。

**结论:** ZHX2蛋白在胃癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织中的表达, 且该蛋白在胃癌的起源及预后判断中起着重要作用。

## ■背景资料

转录抑制因子ZHX2是2003年克隆的新型转录抑制因子, 已有研究显示, 该基因与肝癌、骨髓瘤、肾小球疾病、神经系统发育等密切相关。

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

## ■研究前沿

目前有关胃癌的发生、发展和转移是胃癌研究领域的热点,有关ZHX2与胃癌关系的研究国内为尚无报道。

**关键词:** 转录抑制因子ZHX2; 胃癌组织; 临床病理特征; 预后

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶, 孙忠亮. 转录抑制因子ZHX2在胃癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3163-3167

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3163.asp>

## 0 引言

胃癌(gastric carcinoma)是消化系最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>. 胃癌的浸润和转移是影响生存质量和预后的主要因素, 提高胃癌的诊断率、寻找新的有效治疗靶点和预后指标, 是当前胃癌研究的重要方向. 转录抑制因子ZHX2(zinc-fingers and homeoboxes 2)是2003年克隆的新型转录抑制因子, 与肝癌<sup>[2-6]</sup>、骨髓瘤<sup>[7,8]</sup>等肿瘤的发生有关. 目前国内外尚无关于ZHX2与胃癌的发生发展的相关性研究的报道. 本研究应用免疫组织化学法首次检测胃癌组织与癌旁组织中ZHX2的表达, 分析其与患者临床病理特征的关系, 为胃癌的诊断、治疗及预后判断提供参考依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2010-04/2011-06在广西医科大学第一附属医院接受胃大部切除术的胃癌标本62例作为实验组, 其中男( $n = 42$ ), 女( $n = 20$ ), 年龄26-81(平均58.71)岁; 收集癌旁正常组织(均距肿瘤边缘5 cm以上)62例作为对照组. 所有病例术前均未行放化疗. 胃癌TNM分期采用美国癌症联合会(AJCC)标准(2002), 其中I期7例, II期33例, III期14例, IV期8例. 组织学分级; 其中高分化腺癌5例, 中分化腺癌14例, 低分化腺癌43例, 高-中分化组包括乳头状腺癌和管状腺癌, 低分化组中包括低分化腺癌、印戒细胞癌和黏液腺癌. 试剂采用兔抗人ZHX2多克隆抗体购自美国Proteintech公司, 免疫组织化学二步法Envision system、DAB显色液、即用型二抗购自上海长岛生物技术有限公司. 所有抗体试剂均按说明书要求保存和使用.

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学Envision二步法:** 标本离体后立即用40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋制作切片, 切片烤片后二甲苯脱蜡, 乙醇水化, EDTA抗原修复液高压修复, 3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, ZHX2抗体(1:800稀释)室温2 h, 二抗室温20 min, DAB显色, 流水冲洗, 苏木素复染, 常规脱水/透明后中性树胶封片. 以PBS代替一抗

表 1 ZHX2蛋白在实验组与对照组中的表达 ( $n = 62$ )

分组	+	-	阳性率(%)	P值
实验组	45	17	72.58	<0.001
对照组	9	53	14.52	

表 2 ZHX2蛋白表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	+	-	阳性率(%)	P值
男	42	31	11	73.81	0.753
女	20	14	6	70.00	
年龄(岁)					0.184
<60	28	18	10	64.29	
≥60	34	27	7	79.41	
肿瘤大小(cm)					0.282
<5	37	25	12	67.57	
≥5	25	20	5	80.00	
发生部位					0.032
胃底/贲门	12	8	4	66.67	
胃体	13	6	7	46.15	
胃窦/幽门	37	31	6	83.78	
大体类型					0.338
隆起型	8	6	2	75.00	
溃疡型	46	36	10	78.26	
浸润型	8	4	4	50.00	
分化程度					0.896
低分化	43	30	13	69.77	
中分化	14	11	3	78.57	
高分化	5	4	1	80.00	
浸润深度					0.022
T1	3	0	3	0.00	
T2	10	9	1	90.00	
T3	41	31	10	75.61	
T4	8	5	3	62.50	
淋巴结转移					0.710
N0	21	16	5	76.19	
N1	23	17	6	73.91	
N2	7	4	3	57.14	
N3	11	9	2	81.82	
远处转移					1.000
M0	54	39	15	72.22	
M1	8	6	2	75.00	
TNM分期					0.771
I期	7	4	3	57.14	
II期	33	24	9	72.73	
III期	14	11	3	78.57	
IV期	8	6	2	75.00	

作阴性对照.

**1.2.2 结果判定:** ZHX2阳性染色呈棕黄色颗粒, 该颗粒定位于癌细胞核或胃粘膜上皮细胞核, 具体可参照Zheng等<sup>[9]</sup>对免疫组化胞核阳性结果

## ■相关报道

本课题组既往的研究发现, 在肝细胞癌的研究中存在ZHX2基因启动子甲基化, 进而导致该基因在肝癌中呈低表达, 而这—基因在胃癌中却呈高表达, 由此推测出ZHX2基因发挥作用时呈现的多功能性.



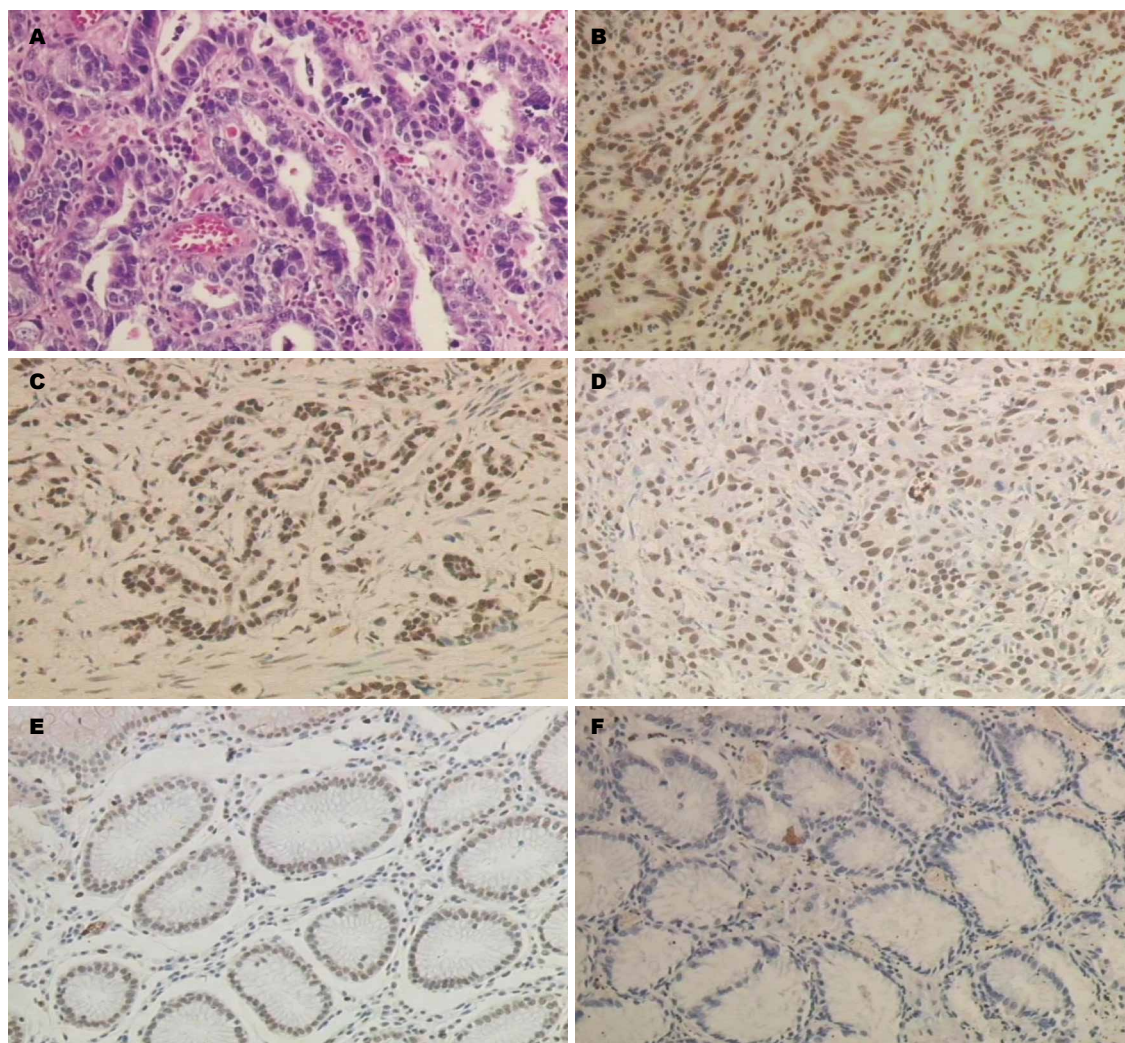


图1 ZHX2蛋白在胃癌及癌旁组织的表达( $\times 200$ )。A: 胃癌组织(HE); B: 高分化腺癌(IHC); C: 中分化腺癌(IHC); D: 低分化腺癌(IHC); E: 癌旁正常组织(IHC); F: 癌旁正常组织(阴性对照)。

#### ■应用要点

本研究旨在初步探讨ZHX2蛋白在胃癌组织和癌旁正常组织的表达情况,为进一步深入研究ZHX2在胃癌中的作用机制提供依据,从而为胃癌的生物学诊断指标、基因治疗靶点及预后判断提供新的思路和方法。

的评判:以肿瘤细胞不着色 $<10\%$ 的肿瘤细胞着色为阴性(-), $\geq 10\%$ 的肿瘤细胞着色为阳性,并根据肿瘤细胞阳性所占比例分为:10%-25%(+), 26%-50%(++), 51%-75%(+++),  $>75\%$ (++++).

**统计学处理** 应用SPSS13.0软件进行统计处理,组间比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法。

## 2 结果

**2.1 ZHX2蛋白在胃癌组织和癌旁正常组织中的表达** ZHX2蛋白在胃癌组织中高表达,定位于癌细胞核,其表达呈明显的异质性,不同分化程度的癌组织均有表达(图1)。该蛋白在癌旁正常组织也有少数表达,但胃癌组织中ZHX2表达阳性率显著高于癌旁组织(72.58% vs 14.52%,  $P<0.001$ , 表1)。ZHX2在胃癌间质细胞也有少量表达(比率为16.13%)。

**2.2 ZHX2蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的**

**关系** 胃癌组织中ZHX2蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、大体类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无明显统计学差异( $P>0.05$ ),与肿瘤的发生部位及浸润深度相关( $P<0.05$ , 表2)。

## 3 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,他的发生、浸润和转移与p53、E-cadherin、MSI、PTEN、c-myc、K-sam、HER-2、Cyclin E等众多因子有关<sup>[10,11]</sup>。近年来研究发现,核转录因子(NF- $\kappa$ B)通过调控各种靶基因转录,可抑制胃癌细胞凋亡,进而在胃癌的发生、发展、转移中具有重要作用<sup>[12]</sup>。

转录抑制因子ZHX2是人类同源框(zinc-fingers and homeoboxes, ZHX)蛋白家族成员之一,主要定位在细胞核内,在组织中广泛存在,通过

### ■同行评价

ZHX2蛋白的表达与胃癌的发生部位、浸润深度有关,有一定的理论意义和潜在的临床价值。

与核因子-YA(NF-YA)结合起到转录抑制作用,从而参与多种疾病的发生与发展。目前对ZHX2的功能探索多集中在非肿瘤疾病中的研究如肾小球疾病<sup>[13,14]</sup>、心血管疾病<sup>[15]</sup>和神经系统发育<sup>[16]</sup>等。

关于ZHX2与胃癌的研究国内外尚未见报道,本实验通过免疫组织化学法首次研究了ZHX2蛋白在人胃癌组织与癌旁正常组织的表达差异。结果显示,ZHX2在胃癌组织中的表达率为72.58%,而在癌旁正常组织表达率为14.52%,组间比较存在明显统计学差异( $P<0.001$ )。表明ZHX2蛋白在人胃癌组织表达明显高于癌旁正常组织的表达。由此推测,ZHX2蛋白的过表达与胃癌的发生存在着一定的相关性,但其调控机制有待进一步研究。我们先前的研究发现,在肝癌细胞中存在着ZHX2基因启动子的甲基化,即该基因在肝癌中呈低表达状态<sup>[17]</sup>,而在胃癌中却是高表达,由此可推测ZHX2基因呈多功能性。

对62例胃癌组织实验结果统计分析发现,ZHX2蛋白的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、大体类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无明显统计学差异( $P>0.05$ );与肿瘤的发生部位及浸润深度相关( $P<0.05$ )。表明ZHX2的表达与胃癌的生物学行为密切相关,可以作为评价胃癌患者预后的参考指标。有研究表明p53、TIMP和MMP的表达失衡促进了胃癌的浸润、转移<sup>[18-21]</sup>。而这些基因的表达均受NF-Y的调控。因此可以推测,ZHX2通过与NF-Y结合,影响其下游基因的表达而参与胃癌的浸润。

同时我们还发现ZHX2蛋白在胃癌间质细胞也有表达,并且在部分肌层和淋巴细胞中也有阳性分布,而在正常情况下ZHX2是一种在多种组织中均有表达的基因,这就说明该基因在多种组织的正常发育过程中都发挥着重要的生物学功能。

对胃癌发生分子机制的研究,我们目前已进行了大量的工作,发现胃癌的发生是一个多步骤的过程,多基因改变的积累最终导致胃癌的发生。然而,在不同条件下ZHX2是否与某些基因一起共同参与胃癌的发生、发展?ZHX2是否在胃癌发生发展的某一阶段发挥抑癌功能?此外,Sugimoto等<sup>[22]</sup>研究发现,幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染在胃癌发生发展过程中起重要作用。那么,ZHX2基因参与胃癌的发生与*H.pylori*的关系如何?伴随研究的进一步展开,会发现更多的、更深入的问题有待我们去解决。本研究

已初步探讨ZHX2蛋白在胃癌组织和癌旁正常组织的表达情况,这将为进一步深入研究ZHX2在胃癌中的作用机制提供依据,从而为胃癌的生物学诊断指标、基因治疗靶点及预后判断提供新的思路和方法。

### 4 参考文献

- 1 陈杰,李甘地.病理学.第1版.北京:人民卫生出版社,2005:270-273
- 2 Hu S, Zhang M, Lv Z, Bi J, Dong Y, Wen J. Expression of zinc-fingers and homeoboxes 2 in hepatocellular carcinogenesis: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Neoplasma* 2007; 54: 207-211
- 3 Morford LA, Davis C, Jin L, Dobierzewska A, Peterson ML, Spear BT. The oncofetal gene glypican 3 is regulated in the postnatal liver by zinc fingers and homeoboxes 2 and in the regenerating liver by alpha-fetoprotein regulator 2. *Hepatology* 2007; 46: 1541-1547
- 4 Shen H, Luan F, Liu H, Gao L, Liang X, Zhang L, Sun W, Ma C. ZHX2 is a repressor of alpha-fetoprotein expression in human hepatoma cell lines. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2772-2780
- 5 Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K, Kagawa N, Takagi K, Asano K, Haneishi A, Miyamoto K. ZHX2 and ZHX3 repress cancer markers in normal hepatocytes. *Front Biosci* 2009; 14: 3724-3732
- 6 Peterson ML, Ma C, Spear BT. Zhx2 and Zbtb20: novel regulators of postnatal alpha-fetoprotein repression and their potential role in gene reactivation during liver cancer. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 21-27
- 7 Armellini A, Sarasquete ME, García-Sanz R, Chillón MC, Balanzategui A, Alcoceba M, Fuertes M, López R, Hernández JM, Fernández-Calvo J, Sierra M, Megido M, Orfão A, Gutiérrez NC, González M, San Miguel JF. Low expression of ZHX2, but not RCBTB2 or RAN, is associated with poor outcome in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2008; 141: 212-215
- 8 Legartova S, Harnicarova-Horakova A, Bartova E, Hajek R, Pour L, Kozubek S. Expression of RAN, ZHX-2, and CHC1L genes in multiple myeloma patients and in myeloma cell lines treated with HDAC and Dnmts inhibitors. *Neoplasma* 2010; 57: 482-487
- 9 Zheng Y, Wang L, Zhang JP, Yang JY, Zhao ZM, Zhang XY. Expression of p53, c-erbB-2 and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 339-344
- 10 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 11 Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 86-94
- 12 杨晓艳,陈春华,苏秀兰. p53和NF- $\kappa$ B与胃癌的研究进展. *中华肿瘤防治杂志* 2010; 17: 391-394
- 13 Liu G, Clement LC, Kanwar YS, Avila-Casado C, Chugh SS. ZHX proteins regulate podocyte gene expression during the development of nephrotic syndrome. *J Biol Chem* 2006; 281: 39681-39692
- 14 Clement LC, Liu G, Perez-Torres I, Kanwar YS,



- Avila-Casado C, Chugh SS. Early changes in gene expression that influence the course of primary glomerular disease. *Kidney Int* 2007; 72: 337-347
- 15 Gargalovic PS, Erbilgin A, Kohannim O, Pagnon J, Wang X, Castellani L, LeBoeuf R, Peterson ML, Spear BT, Lusis AJ. Quantitative trait locus mapping and identification of *Zhx2* as a novel regulator of plasma lipid metabolism. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3: 60-67
- 16 Wu C, Qiu R, Wang J, Zhang H, Murai K, Lu Q. ZHX2 Interacts with Ephrin-B and regulates neural progenitor maintenance in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 2009; 29: 7404-7412
- 17 Lv Z, Zhang M, Bi J, Xu F, Hu S, Wen J. Promoter hypermethylation of a novel gene, ZHX2, in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 740-746
- 18 刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生. P53和Ki67在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19: 367-373
- 19 刘荣, 贺降福, 朱尤庆, 吕永红, 肖绍树. 胃腺癌组织 p53, p63和p73蛋白表达的意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2416-2420
- 20 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 3579-3583
- 21 Zhang JF, Zhang YP, Hao FY, Zhang CX, Li YJ, Ji XR. DNA ploidy analysis and expression of MMP-9, TIMP-2, and E-cadherin in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5592-5600
- 22 Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1188-1200

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

**本刊讯** 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

#### 1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

#### 2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

# CDX2与DNMT1在胃癌组织中的mRNA表达及临床意义

张健锋, 李增丽, 丁伟峰, 蒋伟, 张弘, 毛振彪

## ■背景资料

胃癌发生是由多基因改变、多因素参与, 涉及遗传学和表观遗传学的多阶段复杂过程。本文通过研究胃癌与相应远癌胃组织中CDX2和DNMT1 mRNA的表达及其相关性, 为探讨胃癌发生发展机制提供一定的科学依据。

张健锋, 蒋伟, 张弘, 毛振彪, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

李增丽, 南通大学附属医院肾脏内科 江苏省南通市 226001

丁伟峰, 南通大学附属医院医学检验中心 江苏省南通市 226001

南通市社会发展计划基金资助项目, No. S2009022

作者贡献分布: 张健锋与李增丽对此文所作贡献均等; 此课题由张健锋、李增丽及毛振彪设计; 研究过程由张健锋、李增丽、丁伟峰、蒋伟及张弘操作完成; 研究所用试剂及分析工具由张健锋及张弘提供; 数据分析由张健锋完成; 本论文写作由张健锋、李增丽及毛振彪完成。

通讯作者: 毛振彪, 教授, 主任医师, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科。mzb63@163.com

电话: 0513-81161806, 传真: 0513-85519820

收稿日期: 2011-08-25 修回日期: 2011-10-21

接受日期: 2011-10-25 在线出版日期: 2011-10-28

## Expression of CDX2 and DNMT1 mRNAs in human gastric cancer

Jian-Feng Zhang, Zeng-Li Li, Wei-Feng Ding, Wei Jiang, Hong Zhang, Zhen-Biao Mao

Jian-Feng Zhang, Wei Jiang, Hong Zhang, Zhen-Biao Mao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zeng-Li Li, Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Wei-Feng Ding, Medical Laboratory Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development Foundation of Nantong City, No. S2009022

Correspondence to: Zhen-Biao Mao, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. mzb63@163.com

Received: 2011-08-25 Revised: 2011-10-21

Accepted: 2011-10-25 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of caudal-type homeobox transcription factor 2 (CDX2) and DNA methyltransferase 1 (DNMT1) mRNAs in human gastric cancer and to evaluate their clinical significance.

**METHODS:** The expression of CDX2 and DNMT1 mRNA was detected by real-time PCR in 60 surgically dissected gastric cancer

specimens and matched normal gastric mucosal specimens. The relationship of CDX2 and DNMT1 mRNA expression with clinicopathological characteristics of gastric cancer was investigated.

**RESULTS:** The expression of CDX2 and DNMT1 mRNAs was significantly higher in gastric cancer than in normal noncancerous tissue. Expression of CDX2 mRNA was correlated significantly with Lauren classification, TNM stage and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). DNMT1 mRNA expression was correlated significantly with TNM stage, pathologic differentiation and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). Expression of CDX2 mRNA was inversely correlated with that of DNMT1 mRNA in gastric cancer ( $r = -0.385$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Abnormal expression of CDX2 and DNMT1 mRNAs may play an important role in the progression of gastric cancer.

**Key Words:** Gastric neoplasms; Caudal-type homeobox transcription factor 2; DNA methyltransferase 1

Zhang JF, Li ZL, Ding WF, Jiang W, Zhang H, Mao ZB. Expression of CDX2 and DNMT1 mRNAs in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3168-3171

## 摘要

**目的:** 研究尾型同源盒转录因子2(CDX2) mRNA和DNA甲基化转移酶1(DNMT1) mRNA在胃癌组织中的表达, 探讨其临床意义。

**方法:** 应用实时定量PCR(qRT-PCR)检测60例患者胃癌与相应远癌胃组织中CDX2与DNMT1 mRNA的表达, 并分析其与胃癌临床病理特征的关系以及两者表达的相关性。

**结果:** CDX2和DNMT1 mRNA在远癌胃组织中表达较低, 在胃癌组织中表达显著升高; CDX2 mRNA的表达与胃癌的Lauren分型、临床TNM分期和淋巴结转移等因素有关 ( $P < 0.05$ ), 而DNMT1 mRNA的表达与分化程

## ■同行评议者

刘云鹏, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科

度、临床TNM分期和淋巴结转移等因素有关 ( $P<0.05$ ). 两者在胃癌中的表达呈明显负相关 ( $r = -0.385, P<0.05$ ).

**结论:** 胃癌组织中CDX2表达下调与病情进展有关, DNMT1可能参与该过程的调控.

**关键词:** 胃癌; 尾型同源盒转录因子2; DNA甲基化转移酶1

张健锋, 李增丽, 丁伟峰, 蒋伟, 张弘, 毛振彪. CDX2与DNMT1在胃癌组织中的mRNA表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3168-3171

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3168.asp>

## 0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 居于恶性肿瘤死因的第3位, 亚洲人群中居第2位, 中国属于胃癌的高发地区. 外科治疗是胃癌目前的主要治疗手段, 而早期诊断及早期手术是降低胃癌病死率的关键<sup>[1]</sup>. 在正常组织中CDX2特异性表达于从十二指肠至直肠的上皮组织中, 正常食管和胃黏膜中不表达, 可异位表达于Barrett's食管、肠化生上皮和胃腺癌等组织<sup>[2-6]</sup>. 本实验应用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)方法检测胃癌与相应远癌胃组织中CDX2和DNMT1 mRNA的表达, 分析两者在胃组织中表达水平及其相互关系, 探讨CDX2和DNMT1在胃腺癌发生发展中的作用, 为筛选胃癌新的标志物提供理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集南通大学附属医院普外科2009-11/2010-08胃癌手术切除标本( $n = 60$ ), 采集后20 min内放入液氮速冻后转至-80℃冰箱保存备用. 远癌胃黏膜组织取自胃癌行胃切除的近侧断端胃黏膜, 距癌组织5 cm以上. 60例胃癌患者年龄31-84(平均年龄); 男( $n = 42$ )、女( $n = 18$ ); 肿瘤直径大小 $<5$  cm患者数( $n = 35$ ),  $\geq 5$  cm患者数( $n = 25$ ); 中、高分化腺癌( $n = 29$ ), 低分化腺癌( $n = 31$ ); 肠型胃癌( $n = 28$ ), 弥漫型胃癌( $n = 32$ ); 无淋巴结转移者( $n = 19$ ), 有淋巴结转移者( $n = 41$ ); 肿瘤分期I-II期胃癌( $n = 26$ ), III-IV期胃癌( $n = 34$ ). 所有标本切片皆有2位病理医生双盲法核片分类确定病理类型. 入选病例皆查实未进行化疗或放疗, 无长期服用非甾体类抗炎药, 皮质激素药物史.

### 1.2 方法

**1.2.1 组织RNA提取:** 按照说明书应用TRIzol

试剂提取不同组织总RNA. -80℃取出组织, 剪取50-100 mg, 放于1.5 mL Eppendorf管中, 加入TRIzol 1 mL, 剪碎, 室温静置5 min. 加入0.2 mL氯仿, 振荡15 s, 静置2 min. 4℃离心, 12 000  $g \times 15$  min, 取上清. 加入0.5 mL异丙醇, 将管中液体轻轻混匀, 静置10 min. 4℃离心, 12 000  $g \times 10$  min, 弃上清. 加入1 mL 75%乙醇, 轻轻洗涤沉淀. 4℃离心, 7 500  $g \times 5$  min, 弃上清. 再次加入1 mL 75%乙醇, 轻轻洗涤沉淀. 4℃离心, 7 500  $g \times 5$  min, 弃上清. 真空离心干燥后, 加入30  $\mu$ L的DEPC. 测RNA浓度, 分装, 于-20℃保存.

**1.2.2 逆转录反应合成cDNA:** 取总RNA 1  $\mu$ g在PCR仪中进行逆转录反应: 总RNA 1  $\mu$ g、Oligo(dT)1  $\mu$ g、DEPC H<sub>2</sub>O补齐至12  $\mu$ L, 70℃孵育5 min, 置冰上; 加5 $\times$ Reaction Buffer 4  $\mu$ L、Ribolock™ Ribonuclease inhibitor 1  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP mix 2  $\mu$ L, 37℃孵育5 min, 置冰上; 加Revert Aid™ M-Mulv Reverse Transcripts 1  $\mu$ L, 42℃ 60 min; 70℃ 10 min. 逆转录成cDNA后, 分装, -20℃保存.

**1.2.3 实时荧光定量PCR检测:** 从GenBank查取CDX2、DNMT1和 $\beta$ -actin基因序列, Primer 5.0软件分别设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成. 序列分别为: CDX2: 5'-CGC CGC AGA ACT TCG TCA G-3', 5'-CGT AGC CAT TCC AGT CCT CCC-3'; DNMT1: 5'-CTA CCA GGG AGA AGG ACA GG-3', 5'-CTC ACA GAC GCC ACA TCG-3';  $\beta$ -actin: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3', 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'. PCR反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ 12.5  $\mu$ L, PCR Forward Primer 1.0  $\mu$ L, PCR Reverse Primer 1.0  $\mu$ L, cDNA模板2.0  $\mu$ L, 无菌双蒸水8.5  $\mu$ L, 总体积25  $\mu$ L. 反应条件为95℃ 30 s预变性, 95℃ 5 s、60℃ 34 s共40个循环. 扩增完毕后分析溶解曲线, 用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法分析数据结果.

**统计学处理** 采用STATA11.0软件处理系统进行统计学分析. 样本mRNA的相对含量以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用单因素方差分析和 $t$ 检验, CDX2 mRNA与DNMT1 mRNA的相关性采用线性相关分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 RNA完整性和纯度检测** 提取的总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳, 结果样品呈现清晰的5S、

### ■研发前沿

癌基因显性作用与抑癌基因的失活是肿瘤发生的分子基础, 其中抑癌基因表观沉默是胃癌研究的热点. 近期发现, CDX2在上消化道中具有抑癌基因的功能, 本课题组前期研究亦发现, CDX2基因胃癌组织中的表达缺失率约40%, 但缺失表达具体机制有待进一步阐明.

### ■相关报道

文献报道从肠上皮化生-异型增生-胃癌过程中CDX2的表达逐渐下降, 且在肠上皮化生和异型增生中CDX2缺失表达的患者更易进展成胃癌, 转染高表达CDX2的人胃癌细胞株可明显抑制细胞生长和促进细胞凋亡.

## ■应用要点

联合检测CDX2和DNMT1 mRNA有助于预测胃癌的组织学类型和肿瘤的进展情况,可作为评估胃癌生物学行为的标志物。

表 1 CDX2和DNMT1 mRNA在胃癌和远癌胃组织中的表达(mean ± SD)

分组	CDX2	DNMT1
远癌胃组织	1.34 ± 2.12	5.23 ± 3.66
胃癌组织	18.43 ± 16.74 <sup>a</sup>	40.45 ± 24.45 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 远癌胃组织。

表 2 CDX2和DNMT1 mRNA与胃癌临床病理特征的关系(mean ± SD)

临床特征	n	CDX2	DNMT1
年龄(岁)			
<60	25	20.34 ± 23.31	38.25 ± 14.28
≥60	35	16.98 ± 21.21	42.12 ± 13.67
性别			
男	42	18.63 ± 22.13	38.57 ± 26.12
女	18	19.45 ± 22.32	43.10 ± 23.59
肿瘤大小(cm)			
<5	32	17.35 ± 18.54	41.17 ± 24.38
≥5	28	19.53 ± 20.12	39.65 ± 34.17
Lauren分型			
肠型	28	29.31 ± 23.15 <sup>a</sup>	38.33 ± 21.56
弥漫型	32	7.24 ± 11.75	43.43 ± 18.33
TNM分期			
I + II	26	27.50 ± 21.47 <sup>a</sup>	29.22 ± 17.21 <sup>a</sup>
III + IV	34	10.01 ± 12.39	52.46 ± 28.86
分化程度			
高、中分化	29	19.37 ± 20.41	30.56 ± 26.04 <sup>a</sup>
低分化	31	18.15 ± 21.20	51.53 ± 24.23
淋巴转移			
无	19	26.02 ± 18.72 <sup>a</sup>	26.37 ± 15.35 <sup>a</sup>
有	41	11.21 ± 12.02	54.37 ± 24.15

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同临床特征中的另一组。

18S和28S rRNA 3条带(图1),显示RNA样品没有出现明显的降解;核酸蛋白紫外分析仪检测各标本RNA的 $A_{260/280}$ 在1.80-2.00之间,提示总RNA质量较好。扩增曲线呈典型的S型,CDX2、DNMT1和 $\beta$ -actin mRNA熔解曲线都为单峰(图2),说明引物特异;峰温分别为88.9 °C、89.6 °C和89.7 °C,说明不存在引物二聚体的影响,得到的Ct值可信。以循环数Ct为纵坐标,样品各稀释度的倍数值为横坐标作标准曲线,观察到各个指标的扩增效率基本一致,可以用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析数据。

2.2 CDX2和DNMT1 mRNA在胃癌组织和远癌胃组织中的表达差异 qRT-PCR定量检测CDX2和DNMT1 mRNA在胃癌组织中的表达情况(表1, 2)。CDX2和DNMT1 mRNA在远癌胃组织中

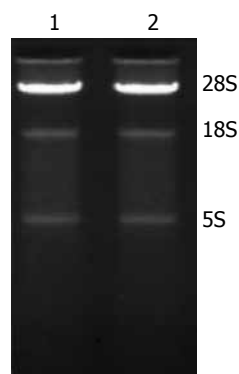


图 1 组织总RNA的琼脂糖凝胶电泳。1: 胃癌; 2: 远癌胃组织。

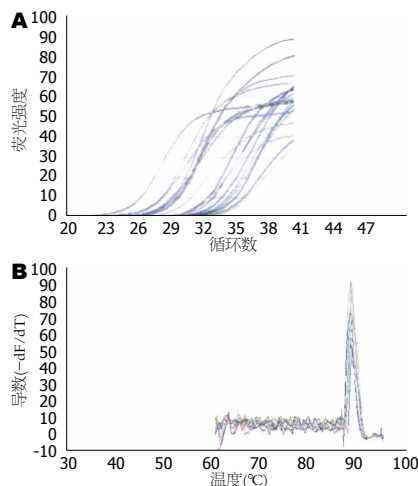


图 2 实时荧光定量PCR扩增曲线和熔解曲线。A: 扩增曲线; B: 熔解曲线。

表达较低,但在胃癌组织中表达均明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); CDX2 mRNA的表达与胃癌的Lauren分型、临床TNM分期和淋巴结转移等因素有关( $P < 0.05$ ),与年龄、性别、病灶大小、分化程度等因素无关; DNMT1 mRNA的表达与分化程度、临床TNM分期和淋巴结转移等因素有关( $P < 0.05$ ),与年龄、性别、病灶大小、Lauren分型等因素无关。

2.3 CDX2和DNMT1 mRNA在胃癌组织中表达的相关性分析 线性相关分析提示,胃癌组织中CDX2 mRNA和DNMT1 mRNA两者呈明显负相关( $r = -0.385$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

目前认为,胃癌的发生是由多基因改变、多因素参与,涉及遗传学和表观遗传学的多阶段复杂过程。其中,癌基因显性作用与抑癌基因的失活是肿瘤发生的分子基础。CDX2是在人体肠道特异性表达的核转录因子,他可表达于内胚层来源的肠道上皮以及胰腺的导管和腺泡上皮,在正常上消化道黏膜组织中CDX2基因不表达,

CDX2基因表达变化和失控对消化系肿瘤的发生和发展起着重要作用<sup>[3,6,7]</sup>。近期发现, CDX2在上消化道中具有抑癌基因的功能。Liu等<sup>[8]</sup>报道从肠上皮化生-异型增生-胃癌过程中CDX2的表达逐渐下降, 且在肠上皮化生和异型增生中CDX2缺失表达的患者更易进展成胃癌。国内谢玉波等<sup>[9]</sup>通过构建人CDX2真核表达载体, 并转染胃癌细胞MGC-803使其高表达CDX2, 结果提示CDX2基因可明显抑制胃癌细胞的生长和促进细胞凋亡。我们前期研究亦发现<sup>[10]</sup>, CDX2基因胃癌组织中的表达缺失率约40%, 但缺失表达的原因未进一步探讨。

DNMT1是维持DNA甲基化的关键酶, 涉及基因沉默、基因组印迹以及胚胎发生, 其主要功能是维持甲基化状态。DNA甲基化是除缺失与突变之外的第3种调控基因表达的机制, 属表观遗传调控中的一种最常见类型<sup>[11]</sup>。DNA甲基化可以在转录水平调控基因表达, 通过基因启动子及其附近区域内CpG岛胞嘧啶的甲基化关闭某些基因使其表达抑制<sup>[12,13]</sup>。Mizuno等<sup>[14]</sup>研究表明, 肿瘤细胞中DNMT1的表达较正常细胞高4-12倍, 证实DNMT1上调参与肿瘤发生。

本实验通过实时荧光定量PCR检测发现, 胃癌中CDX2和DNMT1 mRNA的表达明显高于远癌胃组织, 而在远癌胃黏膜组织两者表达较低。CDX2 mRNA在弥漫型、TNM III-IV期和有淋巴结转移的患者中表达明显下调( $P<0.05$ ), 与年龄、性别、病灶大小、分化程度等因素无关; DNMT1 mRNA的表达与分化程度、临床TNM分期和淋巴结转移等因素有关( $P<0.05$ ), 与年龄、性别、病灶大小、Lauren分型等因素无关, 与文献报道类似<sup>[15]</sup>。相关性分析提示, 胃癌组织中CDX2 mRNA和DNMT1 mRNA表达呈明显负相关, 我们推测CDX2在胃癌中表达下调可能与DNMT1高表达导致CDX2基因启动子区域CpG岛高甲基化有关, 具体机制有待进一步验证。

总之, 在胃黏膜癌变的过程中CDX2和DNMT1基因的异常表达是胃癌的“早期事件”, 联合检测CDX2和DNMT1 mRNA有助于预测胃癌的组织学类型和肿瘤的进展情况, 可

作为评估胃癌生物学行为的标志物。

#### 4 参考文献

- 1 Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG, Goh KL, Wu KC, Wu DC, Sollano J, Kachintorn U, Gotoda T, Lin JT, You WC, Ng EK, Sung JJ. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol* 2008; 9: 279-287
- 2 李慧, 帅晓玮, 谢鹏雁, 李江. CDX1/2在人Barrett's食管中的表达以及胆酸对CDX2表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1738-1744
- 3 Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 303-310
- 4 王旭光, 张忠, 孙丽萍, 袁媛. 同源异形盒基因CDX2的表达与胃黏膜肠上皮化生类型的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 86-89
- 5 牛海静, 陈鑫, 王邦茂. Sox2和Cdx2在胃黏膜肠化生中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1295-1299
- 6 宋光耀, 王金华, 高志安, 聂洪财, 李春宏, 孔庆儒. CDX2和MUC2蛋白表达与胃癌及癌前病变的关系. *中华肿瘤防治杂志* 2007; 14: 1129-1131
- 7 王书海, 毛振彪. 鸟苷酸环化酶C及尾型同源盒转录因子2在胃腺癌中的研究进展. *国际消化病杂志* 2009; 29: 6-7, 13
- 8 Liu Q, Teh M, Ito K, Shah N, Ito Y, Yeoh KG. CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Mod Pathol* 2007; 20: 1286-1297
- 9 Xie Y, Li L, Wang X, Qin Y, Qian Q, Yuan X, Xiao Q. Overexpression of Cdx2 inhibits progression of gastric cancer in vitro. *Int J Oncol* 2010; 36: 509-516
- 10 毛振彪, 许钟, 张健锋, 朱慧君, 章建国. 胃癌组织中GC-C和CDX2 mRNA的表达及临床意义. *江苏医药* 2009; 35: 176-178
- 11 Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-398
- 12 Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003; 33: 61-65
- 13 Guo G, Wang W, Bradley A. Mismatch repair genes identified using genetic screens in Blm-deficient embryonic stem cells. *Nature* 2004; 429: 891-895
- 14 Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001; 97: 1172-1179
- 15 Ding WJ, Fang JY, Chen XY, Peng YS. The expression and clinical significance of DNA methyltransferase proteins in human gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2083-2089

#### ■同行评价

该研究检测了胃癌组织中CDX2与DNMT1 mRNA的表达, 并分析了与临床病理特征的关系, 具有一定的临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# EB病毒感染与血管生成在胃癌组织芯片中的关系

何影娟, 白光辉, 郭云娣

## ■背景资料

EBV属于疱疹病毒科γ疱疹病毒亚科, 广泛分布于世界各地, 是最早发现的与人类肿瘤存在明显病因关系的病毒。近年来有学者报道EBV感染与胃癌之间有一定的关系, 并在胃腺癌组织中检测到EBV基因组的存在, 因此EBV感染与胃癌的发生发展存在某种相关性, 而肿瘤血管生成在胃癌发生、发展过程中所起的作用研究尚少。

何影娟, 苏州市九龙医院病理科 江苏省苏州市 215021  
白光辉, 苏州市立医院 江苏省苏州市 215008  
郭云娣, 苏州卫生职业技术学院 苏州检验医学生物技术重点实验室 江苏省苏州市 215009  
作者贡献分布: 此课题由何影娟、白光辉及郭云娣设计; 标本收集由何影娟与白光辉完成; 研究过程由郭云娣操作完成; 论文写作由何影娟、白光辉及郭云娣共同完成。  
通讯作者: 郭云娣, 主任医师, 215009, 江苏省苏州市, 苏州卫生职业技术学院, 苏州检验医学生物技术重点实验室。  
gyd1964@163.com  
收稿日期: 2011-08-25 修回日期: 2011-10-20  
接受日期: 2011-10-26 在线出版日期: 2011-10-28

## Correlation between Epstein-Barr virus infection and tumor angiogenesis in patients with gastric carcinoma

Ying-Juan He, Guang-Hui Bai, Yun-Di Guo

Ying-Juan He, Suzhou Kowloon Hospital, Suzhou 215021, Jiangsu Province, China  
Guang-Hui Bai, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China  
Yun-Di Guo, Suzhou Health College; Key Laboratory of Biotechnology for Laboratory Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Yun-Di Guo, Physician, Suzhou Health College; Key Laboratory of Biotechnology for Laboratory Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China. gyd1964@163.com  
Received: 2011-08-25 Revised: 2011-10-20  
Accepted: 2011-10-26 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the characteristics of Epstein-Barr virus (EBV)-associated gastric cancer and to explore the correlation between EBV infection and tumor angiogenesis in patients with gastric carcinoma.

**METHODS:** EBV infection was examined by localizing EBV-encoded small RNAs (EBERs) using *in situ* hybridization. Tumor angiogenesis was evaluated by examining the expression of VEGF protein using immunohistochemistry and tissue microarray technique. The association of EBV infection with clinicopathological parameters, including age, gender, tumor type, lymph node metastasis, and tumor stage, was analyzed. The correlation of VEGF expression with lymph

node metastasis and Lauren's classification was also analyzed.

**RESULTS:** Among 486 patients, 18 showed nuclear expression of EBV. EBV staining was seen only in tumor cells. 14 of 18 patients with EBV-associated gastric cancer had regional lymph node metastasis. Of note, metastatic tumor cells in all of the involved lymph nodes contained EBV. EBER-positive gastric carcinomas tended to have lymphoid stroma (17/18) and were mostly poorly differentiated type ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in TNM stage between EBV-positive and -negative carcinomas ( $P > 0.05$ ). The positive rate of VEGF protein expression was 28.2% (137/486). Angiogenesis was significantly associated with lymph node metastasis and TNM stage (both  $P < 0.05$ ). EBV infection was closely correlated with angiogenesis ( $r = 0.119$ ,  $P = 0.009$ ).

**CONCLUSION:** EBV is present exclusively in gastric cancer cells and tumor cells in all of the lymph nodes involved. EBV-positive gastric cancer has distinct clinicopathological features. Angiogenesis may be a good predictor of metastasis and prognosis of gastric carcinoma in patients with EBV-associated gastric cancer.

**Key Words:** Epstein-Barr virus; Gastric carcinoma; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor; Lymph node metastasis

He YJ, Bai GH, Guo YD. Correlation between Epstein-Barr virus infection and tumor angiogenesis in patients with gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3172-3176

## 摘要

**目的:** 探讨EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染相关胃癌的构成比, 其淋巴结转移癌的状况、临床病理特征及与血管生成的关系。

**方法:** 用原位杂交法检测胃癌组织中EBV编码的小RNA(EBERs), 分析EB病毒相关胃癌的病理形态、患者年龄、性别、淋巴结转移

## ■同行评议者

杨江华, 副教授, 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

状况等临床特征; 用免疫组织化学EnVision法检测血管生成(即血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达水平, 分析EBV和血管生成在胃癌的表达与患者淋巴结转移状态、Lauren's分型等的关系及其相互关系。

**结果:** 486例胃癌患者中检测出感染EB病毒者( $n = 18$ , 3.7%)。该病毒位于肿瘤细胞核内; 14例EB病毒相关胃癌患者中(77.8%)伴淋巴结转移癌, 其中所有癌细胞均表达EBERs; 与非EB病毒感染胃癌相比, EB病毒相关胃癌分化程度低( $P < 0.05$ ), 而临床TNM分期无明显差别( $P > 0.05$ ); 血管生成在胃癌组织中的表达率(28.2%, 137/486); 血管生成与患者淋巴结转移状态, TNM分期相关( $P < 0.05$ ); 同时, 血管生成与EBV感染胃癌二者之间呈正相关( $r = 0.088$ ,  $P = 0.001$ )。

**结论:** EB病毒独立存在于胃癌及其淋巴结转移癌细胞核中; EB病毒相关胃癌具有独特的临床病理特征; 胃癌组织中的血管生成对判断EBV感染胃癌的恶性程度和估计预后有一定意义。

**关键词:** EB病毒; 胃癌; 血管生成; 血管内皮生长因子; 淋巴结转移

何影娟, 白光辉, 郭云梯. 胃癌组织芯片中EB病毒感染与血管生成关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3172-3176  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3172.asp>

## 0 引言

Epstein. Barr Virus(EBV)属于疱疹病毒科γ疱疹病毒亚科成员, 广泛分布于世界各地, 是最早发现的与人类肿瘤存在明显病因关系的病毒。近年来有学者报道EBV感染与胃癌之间有一定的关系<sup>[1-4]</sup>, 并发现大多数淋巴上皮瘤样胃癌和少部分胃腺癌组织中均检测到EBV基因组的存在, 因此EBV感染与胃癌的发生发展存在某种相关性<sup>[4,5]</sup>。肿瘤血管生成在恶性肿瘤的发生、发展过程中起重要作用。迄今为止学者们已描述了多种促血管生成及抗血管生成因子, 其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>[6,7]</sup>, 此种糖蛋白能刺激内皮细胞增殖、阻止新生血管退化、增加微血管通透性。Shi等<sup>[8]</sup>研究发现, 胃癌组织中VEGF的表达预示增高的肿瘤转移风险和差的预后, 而EBV感染胃癌即EBV相关胃癌组织中VEGF蛋

白的表达及其相关功能报道较少。我们通过检测486例胃癌组织中EBV和VEGF的表达探讨其相互关系及临床意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2000/01/01-2010/12/31住院患者手术切除胃癌标本( $n = 486$ ), 患者男性( $n = 357$ ), 女性( $n = 129$ ); 年龄22-85(中位年龄63)岁。所有标本均经2位病理专家进行组织病理证实, 患者术前均未进行放疗和化疗。EBERs原位杂交检测试剂盒购于福建泰普生物科学有限公司。VEGF一抗及二抗均购自福州迈新公司。常规石蜡包埋、切片, 采用Envision免疫组织化学法进行染色, 以PBS液代替一抗作为阴性对照, 以试剂公司提供的阳性对照照片作为阳性对照。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织芯片的构建:** 组织标本经4%的甲醛固定、常规石蜡包埋制片, HE染色后, 在显微镜下定位、对应找出蜡块上相应部位并做标记, 选取无坏死的肿瘤组织。自制10×16(6个蜡块, 每个蜡块75例x2点)和10×9(1个蜡块, 40例x2点)的组织阵列蜡块(每例组织块取2个组织芯, 其直径为1.6 mm), 其中1列的特定部位为已知EB病毒阳性的鼻咽癌组织1-2例及正常胃组织1-2例作为芯片的自身对照。共收集肿瘤组织( $n = 489$ ), 其中未取到肿瘤组织( $n = 3$ ), 予以剔除, 胃癌芯片有效组织( $n = 486$ )。

**1.2.2 结果判定:** EBV原位杂交染色结果判断标准: 仅细胞核着棕褐色为阳性; 细胞质和细胞膜在核分裂时可以有阳性着色, 但视为阴性。VEGF阳性表达于肿瘤细胞质, 呈现棕黄色颗粒为阳性信号。结果判定方法按照Fromovitz<sup>[9]</sup>方法: 表达强度由染色深度(A)及阳性细胞百分比(B)共同评分。A: 阳性细胞染色深度按无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计0、1、2、3分; B: 阳性细胞所占百分比按: 阳性细胞数≤5%、5%-25%、25%-50%、50%-75%、>75%分别计0、1、2、3、4分。A+B即为免疫组化评分, 评分≥4者为阳性, <4者为阴性。

**统计学处理** 所有实验数据均采用SPSS13.0软件分析。组间差异比较采用 $\chi^2$ 检验, 采用Spearman等级相关分析胃癌组织中EBV和VEGF表达的相互关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EBERs在胃癌及淋巴结转移癌中的表达** 原

### ■研究前沿

一项纳入15 952例胃癌患者的荟萃分析显示, “EB病毒阳性胃癌可能具有独特意义”。VEGF在EBV相关性胃癌的血管微环境中起着非常重要的作用, 而EBV相关性胃癌的发病机制尚未研究清楚。

## ■相关报道

Kang等研究发现, VEGF在EBV相关性胃癌的血管微环境中起着非常重要的作用.

表 1 VEGF和EBV表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理参数	n	VEGF阳性			EBV阳性		
		n	$\chi^2$ 值	P值	n	$\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)							
<65	267	82			12		
≥65	219	55	1.862	0.172	6	1.039	0.308
性别							
男	357	104			16		
女	129	33	0.590	0.442	2	2.283	0.131
分化程度							
高、中分化	255	74			1		
低分化	231	63	0.183	0.669	17	16.496	0.000
淋巴结转移							
无	354	28			4		
有	132	109	4.358	0.037	14	0.230	0.631
浸润深度							
肌层	87	23			3		
浆膜及外	399	114	0.161	0.688	15	0.019	0.889
Lauren's分型							
肠型	255	75			2		
弥漫及混合型	231	62	0.396	0.529	16	12.820	0.000
TNM分期							
I/II期	167	37			5		
III/IV期	319	100	4.576	0.032	13	0.359	0.549

位杂交EBERs染色的棕褐色颗粒只显示在肿瘤细胞核中, 正常胃黏膜、肠上皮化生腺体及间质细胞或淋巴滤泡等炎细胞均未见阳性细胞核染色. 胃癌患者( $n = 486$ )中, EB病毒阳性表达者( $n = 18$ ), 占有胃癌的3.7%, 包括进展期胃癌( $n = 17$ ), 早期胃癌( $n = 1$ ); 年龄34-84(中位年龄58.5)岁. 大体病理特征: 肿瘤位于贲门( $n = 6$ )、胃体( $n = 7$ )、胃窦( $n = 5$ ); 肿瘤大体类型: 溃疡性( $n = 14$ )、蕈伞型( $n = 2$ )、浸润型( $n = 2$ ); 肿瘤直径2-9 cm; 肿瘤局部淋巴结有转移者数目为2-14枚不等. 按Lauren分型: 弥漫及混合型( $n = 16$ )、肠型( $n = 2$ ); 本组同时检测了EB病毒感染胃癌患者( $n = 14$ )的淋巴结转移癌情况, 发现所有淋巴结转移癌细胞核均表达EBERs, 而作为对照的随机抽取的10例淋巴结转移癌患者中未检测到EBERs表达(图1).

2.2 VEGF在胃癌中的表达 486例胃癌中VEGF的阳性表达率为28.2%(图1).

2.3 胃癌组织中EBV、VEGF与临床病理特征的关系 486例胃癌中, EBV和VEGF与患者的年龄、性别、肿瘤浸润深度阳性表达均无关( $P > 0.05$ ), EBV感染胃癌与Lauren分型、肿瘤分化程度相关( $P < 0.05$ ); VEGF的表达与肿瘤淋巴

结转移、TNM分期密切相关( $P < 0.05$ , 表1).

2.4 胃癌组织中EBV和VEGF的分析 Spearman等级相关分析结果显示, 18例EBV阳性胃癌中VEGF全部阳性, EBV和VEGF在胃癌中的表达呈正相关( $r = 0.119$ ,  $P = 0.009$ ).

## 3 讨论

EBV是一种全球分布、人群感染率很高的γ疱疹病毒(属DNA病毒). 20岁以上超过95%的人群存在EB病毒感染, 并常终身潜伏<sup>[2]</sup>; 原发性感染多发生在儿童期, 常表现为隐性感染; 若原发性感染发生在成年人, 可导致传染性单核细胞增多症<sup>[3]</sup>. 同时, EBV也涉及许多良、恶性肿瘤的发病机制, 如鼻咽癌、Hodgkin淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤等. 1990年, Burke首次报道用PCR技术在胃癌组织中检测出EBV, 其病理形态是一类伴有淋巴样间质的特殊胃癌类型.

原位杂交方法被公认为是在石蜡包埋组织切片中检测EB病毒的金标准<sup>[4,10-12]</sup>. 本组实验用此方法在已构建好的486例原发胃癌组织芯片中检测出棕褐色的EBERs颗粒, 该阳性颗粒只存在于胃癌细胞核中, 正常胃黏膜上皮、肠上皮化生腺体及间质均呈阴性表达. 18例EBV感



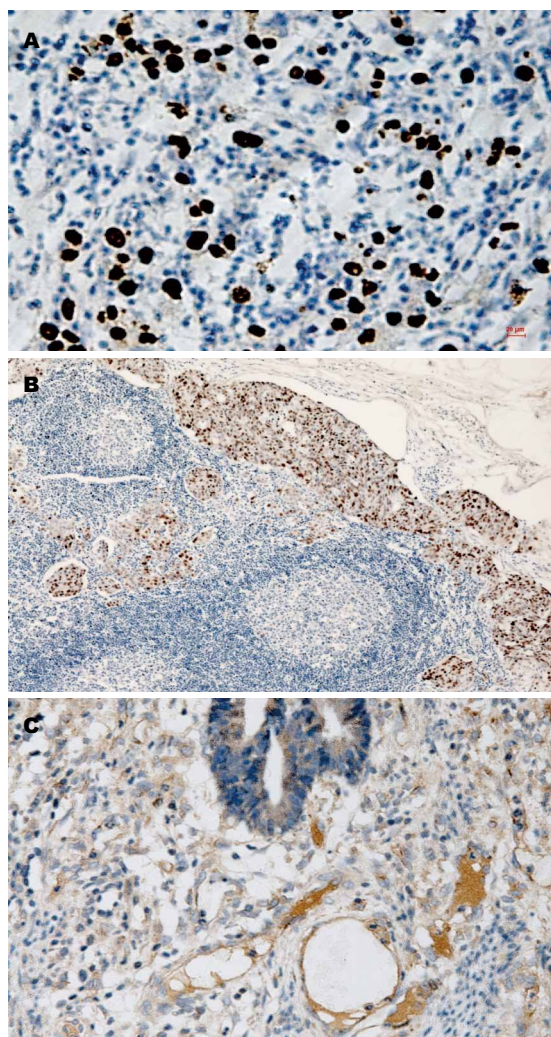


图1 胃癌组织变化. A: 肿瘤细胞核阳性; B: 淋巴结转移肿瘤细胞核阳性(EBERs原位杂交, 高倍放大); C: 肿瘤细胞浆阳性(Envision免疫组织化学法, 高倍放大).

染胃癌所有癌细胞核及其转移的淋巴结癌细胞核中也均呈阳性表达, 提示EB病毒与肿瘤细胞复制同时存在<sup>[13]</sup>. 这种在恶性肿瘤细胞中EBERs呈全或无的表达支持EB病毒感染可能是EB病毒相关胃癌发生、发展及转移的早期事件<sup>[4,14]</sup>. EBV感染胃癌占胃癌的3.6%, 而韩静等<sup>[15]</sup>的研究显示, 中国广州地区的鼻咽癌高发区EB病毒相关胃癌的构成比是6.4%, 而苏州地区的非鼻咽癌高发区其EB病毒感染胃癌的发病率也很低, 由此推测EB病毒感染有一定的地域性<sup>[12]</sup>.

本研究证明, 与非EB病毒感染性胃癌相比, EBV感染胃癌的组织学类型以弥漫型为主、分化程度低. 显微镜下观察HE染色切片, 将其大致分为4种组织结构, 包括: 淋巴上皮样型, 表现为肿瘤细胞巢缺乏腺体结构, 细胞呈片状排列, 间质可见大量淋巴细胞样细胞或淋巴滤泡结构, 肿瘤周围正常黏膜中也可见淋巴细胞和淋巴滤

泡; 条带或网状型, 表现为肿瘤细胞呈连续的线状、条带或网状排列; 小细胞巢状、未分化型以及腺样结构型, 即腺体相互吻合. 进一步的观察显示: 肿瘤细胞中等大小或呈小细胞状, 细胞质红染或几乎无胞质, 细胞核淡染, 核膜清楚, 核染色质呈细颗粒状, 偶见多个核仁; 小细胞的细胞核深染, 核分裂少见.

目前研究发现, VEGF在正常人多种组织中不表达或少量表达, 而在恶性肿瘤组织中常过量表达, 并以自分泌或旁分泌作用于肿瘤细胞, 与多种肿瘤的转移、预后及复发相关<sup>[16]</sup>. 本实验中VEGF阳性表达率为28.2%, 与胃癌临床分期呈正相关, 同时与淋巴结转移相关, 进一步验证了VEGF是促癌因子这一假设. 18例EBV感染胃癌患者中VEGF全部阳性, EBV和VEGF在胃癌中的表达呈正相关, 这就提示了VEGF可能作为胃癌肿瘤侵袭性的一个有用的生物指标, 包括EBV感染胃癌. 这一结果与Kang<sup>[17]</sup>的研究结果相一致. VEGF免疫组化在EBV感染胃癌细胞及间质血管内皮细胞弥漫阳性, 提示EBV感染胃癌中有增多的血管供应并反映了增高的转移能力. 肿瘤形成血管前, 肿瘤细胞很少进入全身血液循环, 新生的肿瘤血管有增加的长度、直径和不完整的内皮细胞层和基底膜, 其形状不规则, 且易于出血和/或血栓形成, 进而使肿瘤细胞进入循环系统. 所谓的血管生成开关依赖于肿瘤正阳性和负性血管生成物质的静平衡, 而EBV感染胃癌患者几乎全为VEGF阳性, 其中VEGF在EBV感染胃癌中有可能发挥着关键的正性调节作用.

总之, EB病毒感染胃癌具有独特的临床病理特征; VEGF是血管生成中的很重要的环节, 对判断胃癌包括EBV感染胃癌的恶性程度和估计预后有一定意义. 但目前还需要更多的前瞻性研究去确认VEGF在胃癌, 特别是在EBV感染胃癌中所起的作用.

#### 4 参考文献

- 1 梁琼, 丁运刚, 邵春奎. Epstein-Barr病毒相关胃癌的研究概况. 中华消化外科杂志 2009; 8: 158-160
- 2 Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 1726-1733
- 3 Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 803-821
- 4 Ryan JL, Morgan DR, Dominguez RL, Thorne LB, Elmore SH, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Booker JK, Gulley ML. High levels of Epstein-Barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma.

#### ■应用要点

EBV表达阳性的胃癌可能具有独特的临床意义, 为以后病因治疗提供依据.



## ■同行评价

文章有一定程度的科学性、创新性和可读性。

- 5 Herath CH, Chetty R. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like gastric carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 706-709
- 6 Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-580
- 7 龙辉, 吴清明, 李欢. VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 557-562
- 8 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1421-1426
- 9 Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1268-1275
- 10 Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 2008; 10: 279-292
- 11 Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001; 3: 1-10
- 12 Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45: 1-36
- 13 Truong CD, Feng W, Li W, Khoury T, Li Q, Alrawi S, Yu Y, Xie K, Yao J, Tan D. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 14
- 14 Lee HS, Chang MS, Yang HK, Lee BL, Kim WH. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with epstein-barr virus-negative carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1698-1705
- 15 韩静, 何丹, 冯智英, 丁运刚, 邵春奎. 广州地区EB病毒相关胃癌的临床病理特征及相关分子表达. *中华病理学杂志* 2010; 39: 798-803
- 16 Wu TT, Wang JS, Jiann BP, Yu CC, Tsai JY, Lin JT, Huang JK. Expression of vascular endothelial growth factor in Taiwanese benign and malignant prostate tissues. *J Chin Med Assoc* 2007; 70: 380-384
- 17 Kang J, Ko Y, Roh S, Hong S, Lee M, Chae H. Both VEGF and bFGF play an important role in distinctive angiogenic feature of microenvironment surrounding EBV positive gastric cancer. *J Clin Oncol* 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2008; 26: 15551

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

# 房颤导致肠系膜上动脉栓塞的综合介入治疗的应用价值

邓梨平, 张宏文, 邓小军, 段诗娇, 谢卫华, 肖燕

邓梨平, 张宏文, 邓小军, 段诗娇, 谢卫华, 肖燕, 南华大学附属南华医院介入科 湖南省衡阳市 421002  
衡阳市科学技术发展计划基金资助项目, No. 2011KS33  
作者贡献分布: 邓梨平、张宏文及邓小军等对此文所作贡献均等; 此课题由邓梨平设计; 研究过程由邓梨平、张宏文、邓小军、段诗娇及谢卫华等完成; 本论文写作由邓梨平完成。  
通讯作者: 邓梨平, 主治医师, 421002, 湖南省衡阳市, 南华大学附属南华医院介入科. doctordengliping@163.com  
收稿日期: 2011-08-26 修回日期: 2011-10-15  
接受日期: 2011-10-20 在线出版日期: 2011-10-28

## Clinical value of comprehensive intervention in the management of superior mesenteric artery embolism caused by atrial fibrillation

Li-Ping Deng, Hong-Wen Zhang, Xiao-Jun Deng, Shi-Jiao Duan, Wei-Hua Xie, Yan Xiao

Li-Ping Deng, Hong-Wen Zhang, Xiao-Jun Deng, Shi-Jiao Duan, Wei-Hua Xie, Yan Xiao, Department of Interventional Medicine, the Affiliated Nanhua Hospital of Nanhua University, Hengyang 421002, Hunan Province, China  
Supported by: the Science and Technology Development Program of Hengyang City, No.2011KS33.  
Correspondence to: Li-Ping Deng, Department of Interventional Medicine, the Affiliated Nanhua Hospital of Nanhua University, Hengyang 421002, Hunan Province, China. doctordengliping@163.com  
Received: 2011-08-26 Revised: 2011-10-15  
Accepted: 2011-10-20 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical value of comprehensive intervention in the management of superior mesenteric artery embolism caused by atrial fibrillation.

**METHODS:** The clinical data for four patients who had superior mesenteric artery embolism caused by atrial fibrillation and underwent comprehensive intervention at our hospital from 2008 to 2011 were analyzed retrospectively. The comprehensive intervention consisted of transcatheter arterial fibrinolysis/infusion (TAF/TAI), suction embolectomy, percutaneous transluminal angioplasty (PTA) and anticoagulation.

**RESULTS:** Treatment duration ranged from 6 to 29 hours. Vascular recanalization was achieved

in three patients, of whom one died of recurrence. The embolus was moved to the distal branches in one patient. No patients received surgical operation, and no treatment-related complications occurred.

**CONCLUSION:** Comprehensive intervention is safe and effective in managing superior mesenteric artery embolism caused by atrial fibrillation.

**Key Words:** Atrial fibrillation; Superior mesenteric artery embolism; Percutaneous transluminal angioplasty; Transcatheter arterial fibrinolysis/infusion; Anticoagulation

Deng LP, Zhang HW, Deng XJ, Duan SJ, Xie WH, Xiao Y. Clinical value of comprehensive intervention in the management of superior mesenteric artery embolism caused by atrial fibrillation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3177-3181

## 摘要

**目的:** 探讨综合介入治疗在房颤导致的肠系膜上动脉栓塞的临床疗效。

**方法:** 回顾性分析我院2008-2011年收治的发生肠系膜上动脉栓塞的房颤患者( $n=4$ ), 包括男( $n=3$ ), 女( $n=1$ ), 年龄65-78岁。先后采用经导管动脉溶栓/灌注术(TAF/TAI)、抽吸取栓术、经皮腔内血管成形术(PTA)及抗凝等综合介入治疗, 评价其治疗疗效。

**结果:** 就诊时间为6-29 h; 3例肠系膜上动脉栓塞患者成功血管复通, 其中1例复发并死亡, 1例栓子移位到远端安全小分支内, 0例外科手术, 无治疗相关并发症。

**结论:** 综合介入治疗在房颤导致的肠系膜上动脉栓塞中操作简便, 可迅速恢复动脉血运, 提高了临床治愈率。

**关键词:** 房颤; 肠系膜上动脉栓塞; 经皮腔内血管成形术; 经导管动脉溶栓/灌注术; 抗凝

邓梨平, 张宏文, 邓小军, 段诗娇, 谢卫华, 肖燕. 房颤导致肠系

## ■背景资料

房颤导致的肠系膜上动脉栓塞起病急、进展迅速、易导致广泛缺血性肠坏死, 其病死率极高, 预后极差。主要死亡原因包括肠坏死、缺血/再灌注损伤引起的休克、腹膜炎、败血症和多器官衰竭及原发病等。

## ■同行评议者

王悦华, 副主任医师, 首都医科大学宣武医院普外科

## ■ 研发前沿

如何及时、准确地判断肠缺血坏死的程度和制定适宜的治疗计划是目前研究的热点、重点。

膜上动脉栓塞的综合介入治疗的应用价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3177-3181  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3177.asp>

## 0 引言

据统计, 中国房颤患病率为0.77%, 80岁以上人群患病率达7.5%, 并随年龄增加而增加<sup>[1]</sup>. 房颤最严重的并发症之一是肠系膜上动脉栓塞(superior mesenteric arterial embolism, SMAE), 该病起病急、进展迅速、病情凶险、易导致广泛缺血性肠坏死, 其病死率大约在70%-100%<sup>[2]</sup>, 预后极差. 主要死亡原因包括肠坏死、缺血/再灌注损伤引起的休克、腹膜炎、败血症和多器官衰竭及原发病等. 本文就我院2008-2011年因房颤导致SMAE的4例患者的诊治报告进行分析.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组房颤患者( $n=4$ ), 包括男( $n=3$ ), 女( $n=1$ ), 年龄65-78(平均69)岁. 病程6-29(平均14) h. 临床均为突发剧烈腹痛, 以脐周明显, 但压痛点不固定, 发病早期伴恶心呕吐, 后期伴黏液血便, 腹肌均软, 肠鸣音增强, 无明显腹膜炎征象. 血压均高, 100-130/160-230 mmHg. GE Light-speed Ultra CT99、美国Mark V Provis高压注射器、GE aw 4.2影像工作站血管成像软件包; GE LCV<sup>+</sup> DSA系统、迈瑞PM-8000 express便携式多参数监护仪.

### 1.2 方法

1.2.1 SAME的确诊方法: (1)CT血管造影(CTA): 扫描参数KV 120, MA 80, pitch 1.35:1, speed 13.5 mm/rot, thick 5 mm. 全腹部CT平扫+增强扫描, 造影剂碘佛醇, 注射速度5-6 mL/s, 压力300-500 PSI, 获得动脉期(18-25 s)、门脉期(30-40 s)、静脉期(50-60 s)、延时期(120-180 s)各期的图像. 用工作站软件包以重建层厚2.5 mm, 重叠1.25 mm进行动脉期血管重建; (2)血管造影: 以Seldinger技术穿刺左侧肱动脉入路, 先行腹主动脉正位、小角度左前斜位造影, 了解腹腔干、肝脾动脉和肠系膜上动脉(SMA)阻塞情况及侧支血管的建立. 再选择性SMA造影, 明确诊断为SMAE者, 经导管注入3000 U肝素钠抗凝. 所有血管造影首选心脏模式, 必要时选DSA模式.

1.2.2 全身治疗: 所有肠系膜上动脉栓塞患者的最初治疗原则是循环的复苏及稳定, 怀疑有进一步缺血表现的应给予广谱抗生素<sup>[9]</sup>. 低分子肝素钙5 000 U, 皮下注射, Q12H; 抑酸护胃, 应用

大量维生素C, 纠正水、电解质紊乱, 纠正酸中毒, 加强静脉营养, 防止低血容量性休克和感染; 吸氧、适当降压, 持续心电监护, 每1 d复查凝血常规、血常规、电解质, 纤维蛋白原 $\leq 1.0$  g/L, 停止使用尿激酶, INR超过2.5, 减少抗凝药物; 禁食(直至血管再通且腹痛明显减轻后24 h), 谨慎止痛, 观察密、查体勤(有无腹膜炎, 有无溶栓抗凝并发症及肠管再灌注损伤), 肠功能恢复后逐渐过渡到完全肠内营养.

1.2.3 导管室介入治疗术: 将导管插至肠系膜上动脉接近栓子部位用尿激酶10万U+生理盐水10 mL溶液少量分次冲击溶栓, 溶栓时间20 min, 复查造影. 对残留血栓和栓子, 在路径图引导下, 导丝越过栓子, 跟进6 F导引导管用20 mL注射器边抽吸边后退导管, 反复抽吸, 用3层无菌纱布过滤栓子后的血液稀释后回注血管内. 对不易取出的大栓子采用导丝导管碎栓后再取栓, 尽快清除肠系膜上动脉主干栓子, 并间断经导管注入肝素水抗凝. 术中取出新鲜血栓或取出栓子; 但血流缓慢者, 换成溶栓导管, 用尿激酶10万U+生理盐水10 mL混合溶液少量分次接触性溶栓, 间断以罂粟碱(1 g/L)扩张血管. 对分支内的栓子和因反复取栓溶栓进入分支内的栓子碎块, 插入5 F导管取栓, 但分支远端的栓子不必追求完全取净, 只要血流速度正常, 侧支供血肠壁染色无缺损手术即可终止. 如果血管狭窄大于30%, 用ev<sup>3</sup>导丝前段越过狭窄, 跟进适宜的DEEP球囊行血管成形术. 术后保留溶栓导管于肠系膜主干内, 入病房后继续经溶栓导管行药物微量泵灌注治疗.

1.2.4 溶栓导管内药物灌注术方案: 尿激酶40万+生理盐水100 mL; 罂粟碱30 mg+生理盐水100 mL; 低分子右旋糖酐250 mL; 丹参20 mL+葡萄糖100 mL. 每组均用微量泵1-2 h内泵入, 2次/(组·d). 每1天经留置导管造影复查, 如血管大分支通则拔管, 否则重复上述综合介入治疗术. 累计时间不超过7 d.

1.2.5 外科手术治疗: 在造影及CTA等检查提示肠管坏死或者治疗过程中出现腹膜炎、肠鸣音消失, 症状加重等征象提示肠管坏死时, 需要及时转外科剖腹探查.

1.2.6 出院后治疗、随访方案: 积极治疗房颤, 房颤消除3 mo前均需口服肠溶阿司匹林100 mg/d, 华法林钠片, 维持INR在2.0-2.5. 采用电话和通信方式进行随访, 询问患者有无腹痛特别是进食后腹痛等症状.

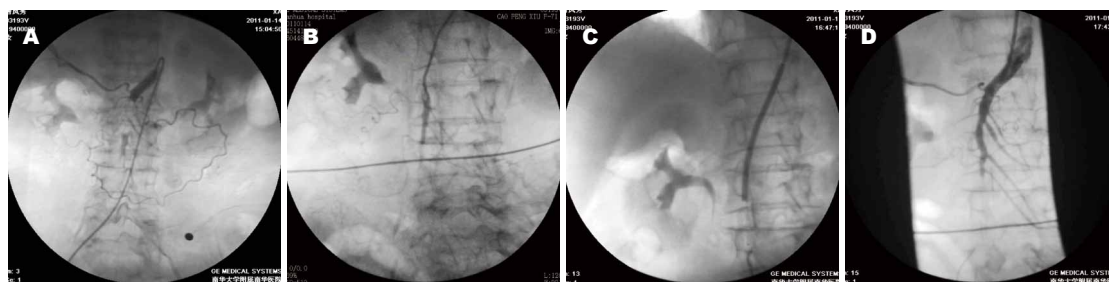


图1 SAME的血管造影术、溶栓术、血管成形术。A: 肠系膜上动脉主干栓塞; B: 主干内容栓后复查造影, 新鲜血栓消失; C: 经血栓抽吸后再行球囊扩张术; D: 血管成形术后造影复查, 显示血管血流增加、血栓继续消失, 但血管仍有狭窄。

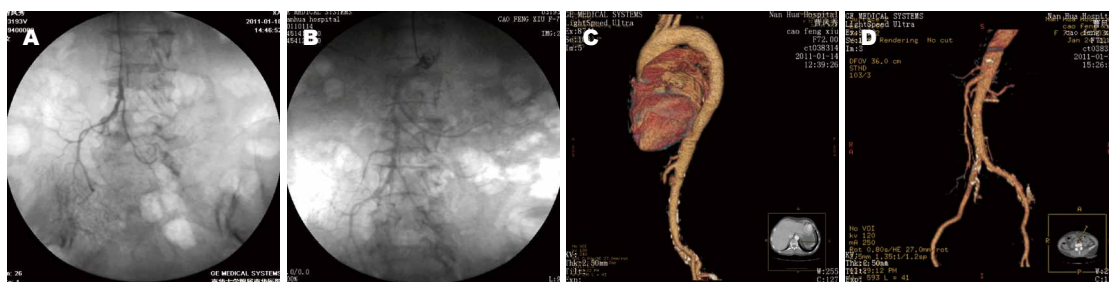


图2 同一SAME患者的综合介入术后复查造影及CTA。A, B: 综合介入术后复查造影, 显示血栓消失, 血管血流通畅, 肠壁染色无缺损; C: 术前CTA肠系膜上动脉主干栓塞; D: 综合介入术后CTA复查, 显示血栓消失, 血管血流通畅, SMA同图B。

## 2 结果

2.1 血管造影结果和CTA 4例患者均完成造影术, 栓子阻塞部位均位于肠系膜上动脉主干中远段和大的分支内, 栓塞位于结肠中动脉发出部或其下方3-5 cm范围内。1例行CTA检查确诊, 动脉重建图像分别与DSA动脉造影图像吻合(图1A与图2C, 图2B与图2D)。

2.2 综合介入治疗术结果 4例患者均顺利完成综合介入治疗过程(图1, 图2A, B), 其中3例成功血管再通, 1例远端小分支内仍有栓子, 但造影肠壁染色无缺损。术中无1例死亡, 生命体征无大波动, 未发生血管破裂等术中并发症。6 F指引导管可取出大块栓子, 5 F导管亦能取出部分分支内的栓子。3例取出陈旧性血栓, 且伴有新鲜血栓, 尿激酶不能溶解陈旧血栓, 但可使混合血栓、新鲜血栓的栓子变小冲向远端。取栓溶栓后肠系膜上动脉主干及一级分支全部再通, 血流正常, 肠壁染色无缺损。主干狭窄2例, 球囊扩张术后血管狭窄<30%, 且血流通畅。手术时间2 h内2例, 2-4 h 2例, 0例外科开腹手术。4例均有黑便, 1例3 d隐血消失, 3例5 d隐血消失, 小便隐血阳性1例, 无1例发生呕血、鼻衄、牙龈出血。治疗过程中无他处新发动脉栓塞。淀粉酶增高3例, 血管再通后5 d渐降至正常, 4例腹痛症状逐渐消失全部治愈。随访结果显示, 1 mo再发病1例, 家属拒绝治疗腹痛开始后65 h死亡; 3例随访

3-24 mo均健在且未发生他处动脉栓塞。

## 3 讨论

房颤患者左心耳、心房血流缓慢, 容易形成附壁血栓和瓣膜赘生物, 一旦脱落就可能发生SMAE。目前公认为Bergan三联征具有一定的特异性, 多层螺旋CT增强扫描及CT血管造影对主干和主要分支栓塞可以确诊。但患者疼痛多剧烈屏气配合不好, CTA图像质量不高及在DSA模式下出现运动伪影导致图像模糊, 但心脏模式下患者不需要屏气, 造影图像清晰。CT征象与肠梗塞病变分期及预后有一定的相关性<sup>[3-5]</sup>, 动脉血管造影为诊断金标准, 如条件允许对可疑患者果断行肠系膜上动脉造影明确诊断, 为患者缺血性的肠管争取更多的治疗时间, 以免贻误最佳治疗时机<sup>[6]</sup>。

肠系膜上动脉或其分支栓塞后, 受阻塞的动脉供应区的肠管发生血运障碍, 随着时间出现一系列病理病生变化, 大量血浆渗出至腹腔及肠腔内, 循环血容量锐减, 肠腔内细菌大量繁殖及毒性代谢产物的吸收, 导致低血容量性休克和中毒性休克<sup>[7]</sup>。因而SMAE的最初治疗原则是维持循环的复苏及稳定, 同时给予广谱抗生素。动物模型实验研究<sup>[8]</sup>表明完全栓塞后8 h内, 有效恢复血流灌注后缺血肠管损伤可逆, 可达到临床治愈效果; 完全栓塞后8 h以上, 缺血肠即使未

## ■ 相关报道

胡鹏志等研究急性肠系膜血管梗塞中多排CT征象与肠梗塞病变分期及预后的相关性, 认为CT征象与肠梗塞病变分期及预后有一定的相关性。马永强通过制作动物模型, 研究急性肠系膜上动脉栓塞不同病理分期经皮抽取栓术的治疗手段。



## ■ 同行评价

房颤导致肠系膜上动脉栓塞的病例在普外科并不罕见, 如果处理不及时或处理不当, 后果严重. 本文采用综合介入治疗, 其疗效有半数很好, 已属不易, 有一定的应用价值.

至透壁性梗死阶段, 恢复血流灌注后严重的再灌注损伤易致死亡, 该研究提示8 h内的时间窗为介入治疗的绝对适应证. 本组SMAE平均病程14 h, 远比8 h时间窗大, 其中有1例发病后29 h疗效依然显著. 笔者认为这是因为部分病例在病情发展的过程中存在由不完全性栓塞到完全性栓塞的过程, 而动物模型实验研究则是通过复制完全性栓塞模型后得出的时间窗, 因而临床上根据发病时间和临床症状确定治疗方案和判断预后, 有些不够准确和客观. 笔者认为急性肠缺血后肠管是否会发生全层坏死是决定可否行介入开通血管治疗方案的标志, 而后者又取决于肠道组织对缺血的耐受性、血流量的下降程度、侧枝循环建立情况、缺血持续时间及再灌注损伤. 只要血管造影或者CTA等影像学检查提示肠管仍有部分血供、有一定程度的强化, 即可采取介入方法尽早、尽量开通血管, 恢复血供后加强观察, 重视再灌注损伤进行综合治疗. 如果确认肠管已经发生全层坏死, 如出现肠鸣音消失、腹膜炎及多器官功能衰竭等症状, 是介入治疗的禁忌证.

Chabert等<sup>[9]</sup>认为SMAE死亡患者中90%是由于延误诊治造成的, SMAE的预后因素与患者的年龄、病情有无延误、基础病及肠管缺血坏死的病理情况有关. SMAE的治疗原则是迅速去除血管内的栓子, 恢复肠系膜上动脉的血液灌注. 以往的治疗多采用动脉切开取栓切除坏死肠段等, 围手术期死亡率高达55.92%-66.00%, 部分患者虽然经救治后得以存活. 但由于肠管切除较多, 终生需要胃肠外营养支持治疗, 生活质量差<sup>[6,10]</sup>. 动脉切开Fogarty球囊导管取栓溶栓术<sup>[11]</sup>, 因不能实时准确判断残留栓子情况及缺血肠段的侧支代偿情况, 存在一定的盲目性, 所以很难完全、准确取出分支内的血栓及栓子. 介入治疗SMAE, 最初经导管灌注罂粟碱扩血管治疗, 后采用经导管溶栓治疗, 取得了较好的临床效果<sup>[12]</sup>. 但房颤所致SMAE栓子多含有陈旧性血栓, 不能为溶栓药物完全溶解, 溶栓术费时且增加出血等并发症的发生, 近年来用导管等取栓溶栓术获得了更好的临床效果<sup>[6,13]</sup>; 有学者认为对于狭窄性病变形PTA联合支架植入术具有良好的疗效<sup>[14]</sup>; 有学者采取经行肠系膜上动脉取栓+坏死肠段切除术较为安全可靠<sup>[15]</sup>. 笔者认为应该将这些介入治疗手段综合应用, 可以扬长补短, 达到更加好的疗效.

确诊后的SMAE没有介入治疗禁忌证时先

应全身肝素化抗凝治疗. 将导管插至肠系膜上动脉接近栓子部位用尿激酶溶栓, 可以将新鲜的血栓溶掉. 对残留血栓和栓子, 导管抽吸取栓术能有效地将栓子尽快地去除; 对不易取出的大栓子采用导丝导管碎栓后再尽可能地取栓. 术中取出新鲜血栓或取出栓子但血流缓慢者, 换成溶栓导管, 用尿激酶接触性溶栓, 间断以罂粟碱扩张血管. 尽快尽量开通SMA主干及血管大分支后需要继续使用抗凝溶栓药物、活血化瘀药物来稳定疗效, 促进微循环, 有利于侧枝循环建立, 尽可能避免和减少肠管完全坏死的发生. 本组4例患者血管再通过造影肠壁染色无缺损, 且无1例发生肠管完全坏死而进行外科手术, 可能与病例数少或者重症患者未能收入我院治疗有关; 4例均有黑便, 可能与肠管部分坏死及再灌注损伤有关; 小便隐血阳性可能与溶栓药物使用有关; 淀粉酶的增高可能与SMAE后其胰腺分支供血部分障碍导致胰腺炎有关. 所以在治疗的过程中应该密切观察并发症的发生. 再发SMAE可能与出院后的抗凝治疗不力有关, 有效地抗凝治疗可能减少再发生率.

总之, 综合介入治疗在房颤导致的肠系膜上动脉栓塞中操作简便, 可迅速恢复动脉血运, 提高了临床治愈率, 值得推广.

## 4 参考文献

- 1 周自强, 胡大一, 陈捷, 张仁汉, 李奎宝, 赵秀丽. 中国心房颤动现状的流行病学研究. 中华内科杂志 2004; 43: 491-494
- 2 Park WM, Gloviczki P, Cherry KJ, Hallett JW, Bower TC, Panneton JM, Schleck C, Ilstrup D, Harmsen WS, Noel AA. Contemporary management of acute mesenteric ischemia: Factors associated with survival. *J Vasc Surg* 2002; 35: 445-452
- 3 胡鹏志, 王维, 聂唯, 容鹏飞. 急性肠系膜血管梗塞中多排CT征象与肠梗塞病变分期及预后的相关性研究. 南方医科大学学报 2010; 30: 1392-1394
- 4 Saba L, Mallarini G. Computed tomographic imaging findings of bowel ischemia. *J Comput Assist Tomogr* 2008; 32: 329-340
- 5 Chou CK, Mak CW, Tzeng WS, Chang JM. CT of small bowel ischemia. *Abdom Imaging* 2004; 29: 18-22
- 6 刘金朝, 王东林, 丁同文, 陈广礼. 肠系膜上动脉栓塞的导管取栓溶栓治疗. 临床放射学杂志 2009; 28: 991-993
- 7 方国恩, 章璠. 急性肠系膜上动脉栓塞的诊治. 中国实用外科杂志 2006; 26: 414-416
- 8 马永强. 急性肠系膜上动脉栓塞不同病理分期经皮抽吸去栓的实验研究. 北京: 中国协和医科大学, 2008: 1-110
- 9 Chabert S, Porcheron J, Balique JG. [Management of acute intestinal arterial ischemia]. *J Chir (Paris)* 1999; 136: 130-135
- 10 林永辉, 田华, 张法红, 吕磊. 国内177例肠系膜上动脉

- 血栓疾病诊治特点分析. 浙江实用医学 2008; 13: 166
- 11 赵传印. 急性肠系膜上动脉栓塞的外科治疗. 中国中西医结合外科杂志 2010; 16: 25-27
- 12 吴清海. 置管溶栓治疗急性肠系膜上动脉血栓栓塞. 介入放射学杂志 2008; 17: 92-94
- 13 李选, 欧阳强, 萧湘生. 介入取栓术治疗急性肠系膜上动脉栓塞临床研究. 介入放射学杂志 2006; 15: 206
- 14 张曦彤, 徐克, 梁松年, 庄薇, 刘静, 李红, 杨栋, 辛世杰. 经导管溶栓及支架植入术治疗肠系膜上动脉闭塞性肠缺血. 中国医学影像技术 2009; 25: 1683-1685
- 15 崔仁刚, 王明会, 崔旭杰. 肠系膜上动脉栓塞治疗体会. 中国当代医药 2009; 16: 44-45

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

**本刊讯** 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI))和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>

(总编辑: 马连生2011-05-30)

# 食物不耐受与炎症性肠病

杨旭, 章金春, 李梅, 丁义江, 张苏闽

## ■背景资料

食物不耐受是一种由免疫球蛋白G介导的复杂变态反应性疾病。英国过敏协会曾统计得出: 人群中有高达45%的人有不同程度食物不耐受, 婴儿与儿童的发生率比成人还要高, 且几乎所有系统的疾病都与食物不耐受有关。

杨旭, 南京市中西医结合医院 江苏省南京市 210014  
李梅, 南京中医药大学研究生院 江苏省南京市 210029  
章金春, 南京市中医院检验科 江苏省南京市 210001  
张苏闽, 南京市中医院全国肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001  
江苏省中医药局科技基金资助项目, No. LZ09088  
南京市医学科技发展基金重点资助项目, No. ZKX09038  
作者贡献分布: 杨旭与章金春对本文所作贡献均等; 此课题由杨旭、张苏闽、章金春及丁义江设计; 研究过程由杨旭、章金春、李梅、丁义江及张苏闽操作完成; 研究所用试剂及分析工具由章金春提供; 数据分析由杨旭和张苏闽完成; 论文写作由杨旭、章金春及张苏闽完成。  
通讯作者: 张苏闽, 主任医师, 教授, 210001, 江苏省南京市, 南京市中医院全国肛肠医疗中心。 chenmin740@hotmail.com  
电话: 025-52276441  
收稿日期: 2011-08-15 修回日期: 2011-10-08  
接受日期: 2011-10-16 在线出版日期: 2011-10-28

## Food intolerance and inflammatory bowel disease

Xu Yang, Jin-Chun Zhang, Mei Li, Yi-Jiang Ding, Su-Min Zhang

Xu Yang, Nanjing Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China  
Mei Li, Graduate School of Nanjing University of TCM; Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Jin-Chun Zhang, Department of Clinical Laboratory, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China  
Su-Min Zhang, Yi-Jiang Ding, National Anorectal Medical Center of China, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Key Program of Nanjing Medical Science and Technology Development Foundation, No. ZKX09038; the Science and Technology Fund of TCM Bureau of Jiangsu Province, No. LZ09088  
Correspondence to: Su-Min Zhang, Professor, National Anorectal Medical Center of China, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. chenmin740@hotmail.com  
Received: 2011-08-15 Revised: 2011-10-08  
Accepted: 2011-10-16 Published online: 2011-10-28

## Abstract

**AIM:** To explore the relationship between food intolerance and inflammatory bowel disease (IBD).

**METHODS:** One hundred and forty-three patients with IBD, including 97 patients with ulcerative colitis and 46 patients with Crohn's disease were included in the study. Forty-seven healthy

subjects served as normal controls. Serum levels of specific IgG antibodies to 14 food allergens were semi-quantitatively measured by ELISA.

**RESULTS:** The positive rates of food-specific IgG antibodies were 75.52% (108/143) in patients with IBD, 78.35% (76/97) in patients with UC and 69.57% (32/46) in patients with CD, all of which were significantly higher than that in the control group (17.02%) (all  $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the positive rates of food-specific IgG antibodies between patients with IBD, UC, or CD (all  $P > 0.05$ ). Of 14 kinds of food tested, the percentage of IBD patients developing food intolerance ranged from 1.39% (beef, mushroom) to 45.46% (egg). Egg was most likely to be intolerable, followed by shrimp, crab, corn, milk, rice, and codfish.

**CONCLUSION:** Food intolerance may be one of the causes of IBD. Testing the levels of food-specific IgG antibodies can provide reference for clinical diagnosis and treatment of IBD.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Food intolerance; Specific IgG; Ulcerative colitis; Crohn's disease

Yang X, Zhang JC, Li M, Ding YJ, Zhang SM. Food intolerance and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3182-3185

## 摘要

**目的:** 探讨食物不耐受(FI)与炎症性肠病(IBD)的相关性, 为IBD的临床诊治提供参考。

**方法:** 对符合IBD诊断的患者( $n = 143$ ), 包括溃疡性结肠炎(UC,  $n = 97$ ), 克罗恩病(CD,  $n = 46$ ), 对照组健康体检者( $n = 47$ ), 用ELISA半定量检测血清中14种食物过敏原特异性IgG抗体水平。

**结果:** 食物特异性IgG抗体检测的阳性率依次为: IBD(75.52%, 108/143), UC(78.35%, 76/97), CD(69.57%, 32/46), 均高于对照组(17.02%, 8/47,  $P < 0.05$ ); 而IBD、UC与CD组间均无显著

## ■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

性差异( $P>0.05$ ); IBD患者对14种食物不耐受率的范围为1.39%(牛肉、蘑菇)-45.46%(蛋黄蛋白), 其不耐受的食物多集中依次为蛋黄蛋白、虾、蟹、玉米、牛奶、大米及鳕鱼等。

**结论:** FI可能是引起或诱发IBD发病的原因之一。通过检测FI特异性IgG抗体的水平, 对临床IBD患者的饮食指导有一定意义, 并对进一步探讨IBD的发病机制具有积极意义。

**关键词:** 炎症性肠病; 食物不耐受; 特异性IgG; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病

杨旭, 章金春, 李梅, 丁义江, 张苏闽. 食物不耐受与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3182-3185  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3182.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种以机体肠道的慢性非特异性炎症反应为特征的自身免疫性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。目前, 该病的病因尚未明确, 并表现出临床症状多样化, 肠外表现较常见, 治疗亦无特异性方案等特征。欧洲和北美人群的IBD发病率较高, 亚洲人群发病率较低。然而近20年来, IBD在亚洲人群中的发病呈现明显增高趋势, 目前已成为消化系统常见疾病和慢性腹泻的主要病因, 患者多为青壮年, 这给社会生产力和个人生活质量带来了极大影响<sup>[1,2]</sup>。

近年来饮食因素与IBD关系受到国内外学者的关注, 报道显示, 食用牛奶、煎炸食物等与增加IBD的危险性密切相关。在饮食因素与IBD关系的研究中, 免疫球蛋白G介导的食物不耐受(food intolerance, FI)已成为目前国外研究的热点课题<sup>[3-5]</sup>。本研究中, 我们选择IBD患者143例, 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA)检测其血清中14种食物特异性IgG抗体水平, 观察不同疾病患者、不同食物抗原产生特异性IgG抗体水平的差异, 并初步探讨FI与IBD的相关性, 为临床诊治IBD提供参考。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008/09-2010/06在南京中医药大学第三附属医院全国肛肠医疗中心就诊的IBD患者( $n=143$ ), 男性( $n=69$ ), 女性( $n=74$ ), 平均年龄 $37.4\pm 7.2$ 岁; 诊断符合中华医学会消化病学

表 1 食物抗原不同浓度的IgG抗体

检测值(U/mL)	结果判断	分级
<50	阴性	0
50-100	轻度	+1
100-200	中度	+2
>200	重度	+3

分会炎症性肠病协作组制定“对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007, 济南)”中UC或CD诊断标准<sup>[6]</sup>。其中UC患者( $n=97$ ), 男性( $n=43$ ), 女性( $n=54$ ), 平均年龄 $39.5\pm 9.7$ 岁; CD患者( $n=46$ ), 男性( $n=26$ ), 女性( $n=20$ ), 平均年龄 $31.7\pm 5.3$ 岁。对照组( $n=47$ ), 为健康体检者, 并排除慢性腹痛、腹泻、皮炎、哮喘及偏头痛等疾病, 男性( $n=21$ ), 女性( $n=26$ ), 年龄 $43.6\pm 11.5$ 岁。组间比较, 无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 1.2 方法

**1.2.1 检测方法:** 静脉抽血3 mL, 分离血清, 采用美国BIOMERICA公司生产的食物过敏原检测试剂盒, 用ELISA半定量法检测血清中14种食物过敏原特异性IgG抗体水平。测定步骤: (1)制作标准曲线; (2)将稀释100倍的每份血清100  $\mu$ L加入每个反应孔; (3)封闭微孔板后室温孵育1 h; (4)清洗; (5)每孔加入100  $\mu$ L抗人IgG抗体-辣根过氧化物酶结合液; (6)封闭并室温孵育0.5 h; (7)清洗孔板; (8)每孔加入100  $\mu$ L工作底物混合液; (9)封闭微孔板后室温孵育10 min; (10)每孔加入50  $\mu$ L终止液混匀后测定吸光度。根据每孔吸光度值, 求得IgG抗体浓度。

**1.2.2 评价标准:** 14项食物检测包括牛肉、鸡肉、鳕鱼、玉米、蟹、蘑菇、牛奶、蛋黄蛋白、猪肉、大米、虾、大豆、西红柿和小麦。针对每种食物过敏原IgG抗体浓度的不同, 可判断为“阴性、轻度、中度、重度”4种情况, 并可对检测结果进行分级(表1)。

**统计学处理** 采用SPSS16.0统计软件进行处理, 抗体阳性率的比较, 用 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血清食物特异性IgG抗体检测结果** IBD患者中, 对1种食物不耐受者有( $n=49$ ), 占45.37%; 同时有2种食物不耐受者( $n=32$ ); 有3种、4种、5种、6种食物不耐受的人数分别为 $n=15, 3, 3,$

### ■ 研发前沿

近年来, 食物不耐受与慢性胃肠道疾病的相关性已成为国内外学者研究的热点课题。食物不耐受与炎症性肠病(IBD)的相关性研究可能为IBD的临床诊治提供参考, 对IBD的病因探讨提出新的视角。



## ■应用要点

本文认为食物不耐受与IBD可能存在相关性,通过食物不耐受介入的饮食健康管理方案可以改善IBD患者的症状,对IBD患者的临床诊治有重要意义。

表 2 143例IBD患者对14种食物的不耐受情况

食物	阳性 $n$	阳性程度( $n$ )			阳性率(%)
		+1	+2	+3	
蛋黄蛋白	65	22	26	17	45.46
虾	29	23	5	1	20.28
蟹	29	25	4	0	20.28
牛奶	21	15	3	3	14.69
玉米	21	10	6	5	14.69
大米	16	10	4	2	11.19
鳕鱼	14	11	3	0	9.79
大豆	10	9	1	0	6.99
西红柿	8	5	3	0	5.59
小麦	4	4	0	0	2.79
鸡肉	3	3	0	0	2.09
蘑菇	2	2	0	0	1.39
牛肉	2	2	0	0	1.39
猪肉	0	0	0	0	-

表 3 3组患者血清食物特异性IgG抗体检测结果比较

分组	阳性 $n$		阳性程度( $n$ )			阳性率%
			+1	+2	+3	
IBD组	143	108	141	55	28	75.52 <sup>a</sup>
UC组	97	76	94	35	15	78.35 <sup>b</sup>
CD组	46	32	47	20	13	69.57 <sup>b</sup>
对照组	47	8	7	5	0	17.02

<sup>a</sup> $P = 0.024$ , <sup>b</sup> $P = 0.019$ , <sup>c</sup> $P = 0.029$  vs 对照组。

除症状加重外均无使用其他疗法。门诊随访显示症状有不同程度改善,其中30例UC患者显示腹泻停止,每日排大便1-2次,成形;13例CD患者腹部隐痛基本消失,32例患者综合症状均较前好转;16例症状好转不明显;17例因各种原因未能随访成功。

5,最多有同时对7种食物不耐受的患者( $n = 1$ )。食物特异性IgG抗体浓度阳性者( $n = 108$ ),占75.52%,其中UC的阳性率(78.35%, 76/97),CD的阳性率(69.57%, 32/46),健康对照组食物特异性IgG抗体浓度升高者( $n = 8$ ),其中对1种食物不耐受患者( $n = 5$ ),同时对2种、3种食物不耐受者各1例。

2.2 IBD患者对不同食物的不耐受情况 对所有IBD患者进行血清食物过敏原特异性IgG抗体检测,其不耐受的食物多集中依次为蛋黄蛋白、虾、蟹、玉米、牛奶、大米及鳕鱼等。其中对蛋黄蛋白不耐受的患者( $n = 65$ ),阳性率45.46%;对虾、蟹不耐受均为( $n = 29$ ),阳性率20.28%;对食物不耐受率的范围为1.39%(牛肉、蘑菇)-45.46%(蛋黄蛋白)(表2)。

2.3 4组患者血清食物特异性IgG抗体检测结果比较 UC和CD患者分别与对照组检测结果相比较,均有统计学意义( $P < 0.05$ );而IBD组、UC组、CD组分别两两组间比较均无显著性差异( $P > 0.05$ ,表3)。

2.4 食物特异性IgG抗体检测阳性的IBD患者随访结果 对检测结果阳性的IBD患者( $n = 108$ ),包括UC患者( $n = 76$ )和CD患者( $n = 32$ ),根据食物不耐受检测结果分级,分别予饮食“轮替”、“忌食”计划。对不耐受食物种类少者,直接“忌食”;不耐受食物种类多者,则将中度敏感和重度敏感的食物列为“忌食”,而将轻度敏感的食物,列为“轮替”计划(轮替是指间隔一段时间后重新食用)。2 mo后随访1次,随访期间

## 3 讨论

食物不耐受是一种由免疫球蛋白G介导的复杂变态反应性疾病,具有起病隐匿、迟发性、多引起慢性病症、影响遍及全身各系统等特点。他不同于传统意义上的食物过敏,后者主要是一种由IgE介导的速发型变态反应<sup>[7]</sup>。英国过敏协会曾统计得出:人群中高达45%的人有不同程度食物不耐受,婴儿与儿童的发生率比成人还要高,且几乎所有系统的疾病都与食物不耐受有关。尽管人们对食物不耐受的机制至今尚未阐明并存在分歧,但其存在的事实及产生的后果是公认的,目前已成为国内外研究的热点课题<sup>[8-10]</sup>。

因食物不耐受起病隐匿、难以发现病因及诊断,其免疫反应的机制尚不清楚,但食物特异性IgG抗体在发病机制中发挥重要作用<sup>[11,12]</sup>。目前公认的诊断食物不耐受的常用方法是用ELISA检测外周血清食物特异性IgG抗体水平,Bernardi等<sup>[13]</sup>报道其敏感性和特异性分别为81%和87%。本试验中,我们使用该法检测143例IBD患者血清中14种食物特异性IgG抗体水平,发现有108例患者IgG抗体水平升高,阳性率为75.52%,明显高于健康对照组,与文献报道类似<sup>[14]</sup>。从检测结果可以看出IBD患者FI发生率较高,二者存在相关性,且以1-2种食物不耐受为主。

对于不同食物,IBD患者的不耐受程度亦不同。本试验中IBD患者对不同食物的不耐受率范围为1.39%(牛肉、蘑菇)-45.46%(蛋黄蛋白),对猪肉均耐受。研究发现:这些不耐受食物多为长

期食用的食物,如本试验中的蛋白蛋黄、虾等,食用后患者体内特异性IgG抗体的阳性率偏高,考虑到某些蛋白类物质可能未被完全分解为氨基酸、甘油等进而转化为机体所需能量,而以多肽或其他大分子形式透过肠黏膜进入血液或淋巴液中,成为被IBD患者机体免疫系统识别的抗原,刺激机体产生食物特异性IgG抗体,然后与食物抗原结合形成免疫复合物(immune complex, IC),沉积在组织及器官的毛细血管内,激活补体释放血管活性肽样物质和趋化因子,吸引中性粒细胞及吞噬细胞,引起相应部位的免疫损伤而导致腹痛、腹泻、低热等症状的出现<sup>[15]</sup>。且通过随访结果可初步得出,饮食调整可辅助改善IBD患者的相关症状,反之亦说明FI与IBD间存在相关性,即FI可能是引起或诱发IBD患者发病的原因之一。但食物相关IgG抗体浓度的高低与IBD患者症状有何相关性?以及是否能以此为突破口开发出治疗或调整食物不耐受的药物或食物?等问题尚有待于我们通过大量科学、规范的临床试验研究来加以阐明。

目前,IBD的病因尚不明确,治疗亦无特异性方法,人们对其认识只是“冰山一角”,食物不耐受检测为IBD病因的确定指引了新的方向,为IBD的临床诊治提供了新的方法。通过食物不耐受检测判断产生不耐受的食物品种,明确病因,制定个体化的饮食治疗方案,采用饮食“轮替”或“忌食”的方法,即可有效避免不耐受的食物持续损害机体,阻止疾病继续发展,并帮助减轻相关临床症状,最终提高患者生活质量。

#### 4 参考文献

- 1 Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 2009; 10: 1-6
- 2 陆忠凯, 陈志荣, 朱俊义, 徐亚, 华娴. IL-23R基因多态性与炎症性肠病的相关性. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2076-2080
- 3 Wang ZW, Ji F, Teng WJ, Yuan XG, Ye XM. Risk factors and gene polymorphisms of inflammatory bowel disease in population of Zhejiang, China. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 118-122
- 4 何新颖, 唐志鹏. 饮食与溃疡性结肠炎. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3826-3829
- 5 朱秀琴, 刘翌宇. 消化系统疾病患者食物不耐受状况及饮食护理. *护理学杂志* 2010; 25: 80-81
- 6 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. *现代消化及介入诊疗* 2008; 13: 139-145
- 7 郑延松, 赵威. 免疫球蛋白G抗体介导的食物不耐受. *中华健康管理学杂志* 2010; 4: 183-185
- 8 Khan DA. Chronic urticaria: diagnosis and management. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29: 439-446
- 9 Bullock RJ, Barnett D, Howden ME. Immunologic and clinical responses to parenteral immunotherapy in peanut anaphylaxis—a study using IgE and IgG4 immunoblot monitoring. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2005; 33: 250-256
- 10 黎明. 略论食物不耐受检测意义. *四川医学* 2010; 31: 675-676
- 11 谢志贤, 刘倩. 食物不耐受与相关性疾病. *中华内科杂志* 2006; 45: 50-51
- 12 Zopf Y, Baenkler HW, Silbermann A, Hahn EG, Raithel M. The differential diagnosis of food intolerance. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 359-369; quiz 369-370; 4 p following 370
- 13 Bernardi D, Borghesan F, Faggian D, Bianchi FC, Favero E, Billeri L, Plebani M. Time to reconsider the clinical value of immunoglobulin G4 to foods? *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 687-690
- 14 周燕, 王红玲, 肖建群, 赵琴玥, 潘华勤. 四种常见消化系疾病患者食物不耐受的检测. *现代检验医学杂志* 2010; 25: 134-136
- 15 孙荣, 王永红. 健康体检者14种食物过敏原特异性IgG检测及健康管理方案探讨. *重庆医学* 2010; 39: 2029-2030

#### ■同行评价

本文研究的选题新颖,从食物不耐受与IBD相关性的角度对UC、CD患者进行了血清特异性IgG抗体检测、随访及相关分析研究,对临床诊治IBD以及对IBD的病因进一步探讨提供了新的视角。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

## 8 d与10 d序贯疗法根除幽门螺杆菌的疗效比较

张杰, 段和力, 汪海涛

### ■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染是胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的主要病因, 应予以根除。然而随着抗生素耐药株*H. pylori*逐渐增加, 三联疗法*H. pylori*根除率日益下降。

张杰, 段和力, 汪海涛, 河北联合大学附属开滦医院消化科 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 张杰与段和力对此课题所作贡献均等; 课题由张杰与段和力设计; 研究过程由张杰、段和力与汪海涛共同完成; 数据分析由汪海涛完成; 本论文写作由张杰、段和力与汪海涛共同完成。

通讯作者: 段和力, 教授, 063000, 河北省唐山市, 河北联合大学附属开滦医院消化科。wh1207@163.com

电话: 0315-3025934

收稿日期: 2011-08-24 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-10-23 在线出版日期: 2011-10-28

### Efficacy of 8-day versus 10-day sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication

Jie Zhang, He-Li Duan, Hai-Tao Wang

Jie Zhang, He-Li Duan, Hai-Tao Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Kailuan Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: He-Li Duan, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Kailuan Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. wh1207@163.com

Received: 2011-08-24 Revised: 2011-10-18

Accepted: 2011-10-23 Published online: 2011-10-28

### Abstract

**AIM:** To compare the efficacy of 8-day versus 10-day sequential therapy in the eradication of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

**METHODS:** Two hundred and seventeen patients with *H. pylori* infection who had peptic ulcer or chronic gastritis were randomly divided into two groups: 8-d group ( $n = 103$ , received rabeprazole 10 mg plus amoxicillin 1.0 g for 4 days, and rabeprazole 10 mg plus clarithromycin 500 mg and ornidazole 500 mg for another 4 days) and 10-d group ( $n = 114$ , received rabeprazole 10 mg plus amoxicillin 1.0 g for 5 days, and rabeprazole 10 mg plus clarithromycin 500 mg and ornidazole 500 mg for another 5 days). All drugs were given twice daily. *H. pylori* infection status was compared between the two groups after completion of treatment.

**RESULTS:** Intention-to-treat eradication rate

was 89.3% and 91.2% ( $P > 0.05$ ), and per-protocol eradication rate was 92.0% and 93.7% ( $P > 0.05$ ) in the 8-d and 10-d group, respectively. However, the treatment cost was lower for the 8-day group. There were no significant differences in the incidence of side effects and the rate of symptomatic relief between the two groups (both  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The 8-day sequential therapy can achieve a high *H. pylori* eradication and relieve the symptoms effectively, and may be used as first-line treatment for *H. pylori* eradication.

**Key Words:** Sequential therapy; *Helicobacter pylori*; Eradication rate

Zhang J, Duan HL, Wang HT. Efficacy of 8-day versus 10-day sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3186-3189

### 摘要

**目的:** 比较雷贝拉唑、阿莫西林、克拉霉素、奥硝唑组成的8 d与10 d序贯疗法根除幽门螺杆菌(*H. pylori*)的疗效。

**方法:** 将经胃镜检查确诊为慢性胃炎和消化性溃疡, 且*H. pylori*阳性的217例患者随机分为2组, 8 d组( $n = 104$ )方案: 前4 d, 雷贝拉唑+阿莫西林; 后4 d, 雷贝拉唑+克拉霉素+奥硝唑。10 d组( $n = 113$ )方案: 前5 d, 雷贝拉唑+阿莫西林; 后5 d, 雷贝拉唑+克拉霉素+奥硝唑。根除治疗后复查 $^{14}\text{C}$ -尿素呼气试验, 比较两组*H. pylori*根除率。

**结果:** 8 d组和10 d组*H. pylori* ITT根除率分别为89.3%和91.2%, PP根除率分别为92.0%和93.7%。两种分析方法比较两组的根除率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但8 d序贯疗法降低了成本-效果比, 减轻了患者的经济负担。两种方案症状缓解率及不良反应发生率的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**结论:** 8 d序贯疗法可以获得较高的*H. pylori*根除率和症状缓解率, 且经济、安全, 是一种可供选择的一线治疗方案。

### ■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

关键词: 序贯疗法; 幽门螺杆菌; 根除率

张杰, 段和力, 汪海寿. 8 d与10 d序贯疗法根除幽门螺杆菌的疗效比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3186-3189  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3186.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染是胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴瘤组织淋巴瘤的主要病因<sup>[1]</sup>. 目前国内外均将质子泵抑制剂(PPI)三联疗法作为一线*H.pylori*根除方案推荐使用<sup>[2-3]</sup>. 然而, 随着抗生素的大量使用, *H.pylori*耐药性逐渐增强, 三联疗法的*H.pylori*根除率也逐渐下降. 近年来, 出现了一种新的*H.pylori*根除方案-序贯疗法, 他以其新颖的形式、较高的根除率以及较好的耐受性, 成为*H.pylori*根除治疗的新选择. 许多研究表明, 相比传统PPI三联疗法, 序贯疗法具有更好的疗效. 本研究通过比较8 d和10 d序贯疗法*H.pylori*根除率、症状缓解率和不良反应发生率, 探讨8 d序贯疗法是否可以作为*H.pylori*根除治疗的一线治疗方案.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集自2010-01/2011-06因上消化道症状于我院消化科门诊就诊并且符合以下条件的患者: (1)年龄20岁-70岁; (2)经胃镜确诊为消化性溃疡或者慢性胃炎, 且*H.pylori*阳性; (3)既往未曾接受过*H.pylori*根除治疗; (4)就诊前4 wk内未服用过抗溃疡药、抗生素、糖皮质激素及非甾体类抗炎药; (5)无腹部手术史; (6)无消化道大出血、穿孔和幽门梗阻等并发症; (7)无严重的心、肺、肝、肾功能损害; (8)非妊娠及哺乳期妇女; (9)无药物过敏史. 将患者随机分为序贯疗法8 d组和序贯疗法10 d组. 8 d组( $n = 103$ ), 男( $n = 59$ ), 女( $n = 44$ ), 年龄20岁-68岁, 消化性溃疡( $n = 42$ ), 慢性胃炎( $n = 61$ ); 10 d组( $n = 114$ ), 男( $n = 63$ ), 女( $n = 51$ ), 年龄22岁-70岁, 消化性溃疡( $n = 48$ ), 慢性胃炎( $n = 66$ ). 8 d组和10 d组各失访( $n = 3$ ), 最后有效病例( $n = 211$ ). 两组在年龄、性别及疾病分类方面的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ).

### 1.2 方法

1.2.1 *H.pylori*感染诊断和根除标准: 镜下取胃粘膜组织做快速尿素酶试验(RUT)或<sup>14</sup>C-尿素呼气试验(<sup>14</sup>C-UBT)检查, 有任意一项阳性者即诊断*H.pylori*感染. 慢性胃炎患者在根除治疗结束后4

wk行<sup>14</sup>C-UBT检测, 消化性溃疡患者在根除治疗结束后继续服用4 wk雷贝拉唑(10 mg, 1次/d), 停用雷贝拉唑2 wk后行<sup>14</sup>C-UBT检测, 结果为阴性, 确定为*H.pylori*已根除.

1.2.2 治疗方法和随访: 8 d组方案: 前4 d, 雷贝拉唑(江苏豪森药业股份有限公司生产)10 mg、阿莫西林(珠海市联邦制药有限公司生产)1.0 g; 后4 d, 雷贝拉唑10 mg、克拉霉素(扬子江药业集团有限公司生产)0.5 g、奥硝唑(湖南九典制药有限公司生产)0.5 g. 10 d组方案: 前5 d, 雷贝拉唑10 mg、阿莫西林1.0 g; 后5 d, 雷贝拉唑10 mg、克拉霉素0.5 g、奥硝唑0.5 g. 所有药物均2次/d. 疗程结束4 wk内患者复诊, 记录症状缓解和不良反应发生情况.

1.2.3 症状评定标准: 初诊及复诊时, 均记录患者胃肠道症状的程度及频度. 症状程度分为: 无症状(0级); 轻度(1级), 可以感觉到有症状, 但易于接受; 中度(2级), 有明显的不适, 足以干扰正常活动; 重度(3级), 不能从事正常活动. 症状频度分为: 偶发, 不是每天都发生, 每次持续数分钟缓解; 常发, 每天发生, 每次持续数分钟缓解; 频发, 每天反复发作, 每次持续数小时. 症状缓解标准: 治疗后胃肠道症状(腹痛、腹胀、返酸、嗝气等)消失或症状的程度(或频度)减轻1级及其以上认为症状缓解.

1.2.4 药物经济学分析: 采用成本-效果比(C/E)进行分析, C为各组药品的费用, E为根除率.

统计学处理 各组的*H.pylori*根除率按意向性治疗(ITT)分析和符合方案(PP)分析进行评价, 采用SPSS13.0统计学方法进行数据处理, 计量资料采用 $t$ 检验. 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

## 2 结果

2.1 *H.pylori*根除率 8 d组和10 d组*H.pylori* ITT根除率分别为89.3%和91.2%, PP根除率分别为92.0%和93.7%, 两种分析方法比较, 根除率差异均无统计学意义(表1).

2.2 症状缓解率 两组症状缓解率分别为95%和94.6%, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.017$ ,  $P = 0.895$ ).

2.3 不良反应发生情况 8 d组出现不良反应( $n = 6$ ), 10 d组出现不良反应( $n = 9$ ), 两组的不良反应发生率分别为6.0%和8.1%, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.354$ ,  $P = 0.552$ ). 主要为腹痛、口干、头晕、恶心及腹胀等, 反应较轻微, 均能耐受且坚持完成疗程.

### ■研究前沿

国外对序贯疗法研究较多, 近年来国内也有研究报道, 均取得了满意的疗效. 序贯疗法是*H.pylori*根除治疗的新选择, 但尚待大样本、多中心、随机双盲对照的临床研究来进一步证实其高效性和安全性.



## ■ 创新盘点

目前国内外已经有大量研究表明10 d序贯疗法能够获得理想疗效,本研究进一步对方案的疗程进行了优化,缩短了治疗周期,并且获得了不亚于10 d序贯疗法的根除效果,且减少了治疗费用。

表 1 两组患者*H.pylori*根除率的比较

分组	合计( <i>n</i> )	阴性( <i>n</i> )	失访( <i>n</i> )	根除率(ITT, %)	根除率(PP, %)
8 d组	103	92	3	89.3(92/103)	92.0(92/100)
10 d组	114	104	3	91.2(104/114)	93.7(104/111)
$\chi^2$ 值				0.225	0.229
<i>P</i> 值				0.635	0.633

表 2 两种治疗方案的成本-效果ITT分析

分组	成本(C, 元)	根除率(E, %)	C/E
8 d组	205.6	89.3	2.3
10 d组	257.0	91.2	2.8

表 3 两种治疗方案的成本-效果PP分析

分组	成本(C, 元)	根除率(E, %)	C/E
8 d组	205.6	92.0	2.2
10 d组	257.0	93.7	2.7

2.4 成本-效果分析 ITT分析和PP分析均显示, 8 d组的C/E低于10 d组的C/E(表2和表3)。

### 3 讨论

*H.pylori*是一种全世界范围的人类感染病原菌, PPI三联疗法是传统的一线根除治疗方案, 但近年来, 随着抗生素的大量使用, 尤其是甲硝唑和克拉霉素耐药的流行, *H.pylori*耐药性逐渐增强, 传统PPI三联方案根除率也逐渐下降。研究表明, 7 d和10 d的标准三联疗法获得的*H.pylori*根除率已降到了80%以下<sup>[4]</sup>。研究还发现, *H.pylori*的根除率在复治者比初治者明显下降, 且随着时间推移, 同样的方案会导致*H.pylori*的根除率逐步降低<sup>[5]</sup>, 因此选择有效的一线治疗方案以提高初治成功率是预防*H.pylori*产生耐药的关键。

序贯疗法是Zullo等<sup>[6-7]</sup>发现并提出的根除*H.pylori*的新方案, 近年来, 多个国内外的研究表明10 d序贯疗法对初治患者取得了超过90%的根除率<sup>[8-10]</sup>。Zullo<sup>[11]</sup>曾对10日序贯疗法的疗效进行Meta分析, 研究表明, 其*H.pylori*根除率明显高于7 d和10 d PPI三联疗法。最新意大利*H.pylori*指南中, 10 d序贯疗法被列为一线治疗方案。Francavilla等<sup>[12]</sup>报道, 对于儿童, 序贯疗法也比传统的三联疗法具有更高的*H.pylori*根除率。陈羽等<sup>[13]</sup>对国内序贯疗法与三联疗法根除*H.pylori*的疗效进行了荟萃分析, 结果表明, 在中国, 使用10 d序贯疗法*H.pylori*根除率明显高于7 d和10 d三联疗法。序贯疗法获得更高*H.pylori*根除率的机制尚不清楚, 分析其原因可能为: 阿莫西林本身能够杀灭*H.pylori*, 并能减少胃内细菌负荷量, 从而增加细菌对克拉霉素的敏感性; 同时第一阶段的阿莫西林通过破坏*H.pylori*的细胞壁阻止了

克拉霉素流出通道的形成, 从而预防*H.pylori*对克拉霉素耐药, 由此提高了第二阶段克拉霉素的治疗效果。

关于10 d以下序贯疗法的临床研究国内尚未见报道, 本研究比较了8 d与10 d序贯疗法的疗效。结果显示, 8 d疗法*H.pylori*根除率与10 d疗法根除率相当, 与Paoulzi等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。本研究中两组患者不良反应发生轻微, 可自行缓解, 不影响治疗, 患者依从性好。

成本-效果分析是药物经济学中成本与效果结合的常用分析方法, 在医学领域有广泛的应用。此方法旨在寻找达到某一治疗效果时费用相对最低的治疗方案, 即在成本和效果之间找到一个最佳点。C/E则把二者有机联系起来, 他表示每产生一份效果所需要的费用, 比值越小表示达到某一治疗效果时所需的费用越低, 则该方案的实施越有益<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 以*H.pylori*根除率作为疗效指标时, 获得同等疗效的前提下, 8 d组费用较低。因此从降低医疗费用角度考虑, 8 d序贯疗法更具有优势。

此项研究结果提示, 8 d序贯疗法可以获得和10 d序贯疗法同样满意的*H.pylori*根除率, 但8 d序贯疗法能够节省医疗资源, 减轻患者的经济负担, 可以作为根除*H.pylori*治疗的一线方案。

### 4 参考文献

- Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JL, Heatley RV. Helicobacter pylori associated chronic gastritis and peptic ulceration in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 1990; 4: 515-522
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management

- of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 3 中华医学会消化病分会, 幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007·庐山). *胃肠病学* 2008; 13: 42-46
- 4 Ford A, Moayyedi P. How can the current strategies for *Helicobacter pylori* eradication therapy be improved? *Can J Gastroenterol* 2003; 17 Suppl B: 36B-40B
- 5 田雨, 王蔚虹, 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌感染治疗共识意见. *中华医学杂志* 2007; 9: 104-105
- 6 Rinaldi V, Zullo A, Pugliano F, Valente C, Diana F, Attili AF. The management of failed dual or triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 929-933
- 7 Zullo A, Rinaldi V, Winn S, Meddi P, Lionetti R, Hassan C, Ripani C, Tomaselli G, Attili AF. A new highly effective short-term therapy schedule for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 715-718
- 8 Scaccianoce G, Hassan C, Panarese A, Piglionica D, Morini S, Zullo A. *Helicobacter pylori* eradication with either 7-day or 10-day triple therapies, and with a 10-day sequential regimen. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 113-117
- 9 Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, Hassan C, Bernabucci V, Tampieri A, Morini S. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-563
- 10 胡水清, 张玫. 10日序贯疗法治疗幽门螺杆菌感染39例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1693-1695
- 11 Zullo A, De Francesco V, Hassan C, Morini S, Vaira D. The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pooled-data analysis. *Gut* 2007; 56: 1353-1357
- 12 Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta SP, Magistà AM, Boscarelli G, Piscitelli D, Amoroso A, Di Leo A, Miniello VL, Francavilla A, Cavallo L, Ierardi E. Improved efficacy of 10-Day sequential treatment for *Helicobacter pylori* eradication in children: a randomized trial. *Gastroenterology* 2005; 129: 1414-1419
- 13 陈羽, 吴礼浩, 何兴祥. 中国序贯法与三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3365-3369
- 14 Paoluzi OA, Visconti E, Andrei F, Tosti C, Lionetti R, Grasso E, Ranaldi R, Stroppa I, Pallone F. Ten and eight-day sequential therapy in comparison to standard triple therapy for eradicating *Helicobacter pylori* infection: a randomized controlled study on efficacy and tolerability. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 261-266
- 15 徐端正. 药物经济学及其分析. *中国新药与临床杂志* 2000; 19: 139-142

#### ■同行评价

本研究立意较新, 设计合理, 结果和数据分析可靠, 研究结果对于今后制订我国的 *H.pylori* 诊治指南有一定借鉴价值, 结论对临床有较高的指导意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

# 隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎1例

赵可, 彭德银, 邸雅南, 李丽坤, 张波, 吴昱美, 于丽利, 李文杰

## ■背景资料

隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎为临床少见病, 目前国内外报告50例, 多因慢性、反复发作性腹痛、肠梗阻而多次就诊外科。不少患者面临反复、多次手术治疗。

赵可, 彭德银, 邸雅南, 李丽坤, 张波, 北京航天总医院消化内科 北京市 100076

吴昱美, 于丽利, 李文杰, 北京航天总医院消化内镜中心 北京市 100076

作者贡献分布: 病例资料由李丽坤与张波整理; 内镜图片提取与提供由吴昱美、于丽利与李文杰共同完成; 内镜操作与图片分析由彭德银与邸雅南完成; 本文写作由赵可完成。

通讯作者: 赵可, 主治医师, 100076, 北京市, 北京航天总医院消化内科. zhaoke2009@163.com

电话: 010-68383775

收稿日期: 2011-08-28 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-10-25 在线出版日期: 2011-10-28

## Cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis: A report of one case and review of the literature

Ke Zhao, De-Yin Peng, Ya-Nan Di, Li-Kun Li, Bo Zhang, Yu-Mei Wu, Li-Li Yu, Wen-Jie Li

Ke Zhao, De-Yin Peng, Ya-Nan Di, Li-Kun Li, Bo Zhang, Department of Gastroenterology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China  
Yu-Mei Wu, Li-Li Yu, Wen-Jie Li, Digestive Endoscopy Center, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China

Correspondence to: Ke Zhao, Department of Gastroenterology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China. zhaoke2009@163.com

Received: 2011-08-28 Revised: 2011-10-18

Accepted: 2011-10-25 Published online: 2011-10-28

## Abstract

Cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis (CMUSE) is a rare condition characterized by chronic or relapsing moderate ileus episodes resulting from multiple small intestinal strictures, multiple superficial ulcers of the small bowel and favorable therapeutic effect of glucocorticosteroids. Here we report a case of CMUSE in a 77-year-old female who presented with colicky pain, repeated moderate ileus episodes and weight loss. Multiple fibrous strictures and ulcers of the small bowel were found. The patient responded to glucocorticosteroid treatment. Severe tandem tight jejunal stenosis may be dilated endoscopically by means of double balloon enteroscopy. CMUSE should be considered when chronic moderate ileus episodes and multiple small intestinal strictures and ulcers of uncertain

etiology are found. Double balloon enteroscopy enables precise diagnostic work, possible endoscopic treatment of stenosis, and may obviate the need for surgery and prevent excessive small bowel resections.

**Key Words:** Cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis; Ileus; Small intestinal ulcers; Glucocorticosteroids

Zhao K, Peng DY, Di YN, Li LK, Zhang B, Wu YM, Yu LL, Li WJ. Cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis: A report of one case and review of the literature. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(30): 3190-3193

## 摘要

隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎(cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis, CMUSE), 由于多部位、多灶性浅溃疡、多部位狭窄导致患者出现慢性、反复发作性轻中度腹痛等症状。他以对糖皮质激素治疗反应良好为特征。本文报道1例CMUSE, 女性, 77岁, 表现为腹绞痛、肠梗阻和体重减轻、贫血、营养不良等, 肠镜发现小肠多部位纤维狭窄和溃疡, 对糖皮质激素治疗有反应, 严重的连续多部位小肠狭窄可用双气囊小肠镜扩张治疗。总之, 当有慢性、轻中度肠梗阻, 多灶性小肠溃疡、多部位小肠狭窄及无确定病因时, 应考虑为CMUSE。双气囊小肠镜可准确诊断, 合理的内镜下治疗可减少手术, 避免小肠过多切除。

**关键词:** 隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎; 肠梗阻; 小肠溃疡; 糖皮质激素

赵可, 彭德银, 邸雅南, 李丽坤, 张波, 吴昱美, 于丽利, 李文杰. 世界华人消化杂志 2011; 19(30): 3190-3193

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3190.asp>

## 0 引言

隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎(cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis, CMUSE)以小肠多灶性浅溃疡、多部位狭窄, 无明确病因导致的慢性复发性肠梗阻为特征, 对激素治疗

## ■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

有效. 日本胃肠病学者命名这种综合征为慢性非特异性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎. CMUSE病因、病理仍不明确, 有些学者甚至怀疑这种疾病是否真的存在. CMUSE患者因小肠狭窄、肠梗阻就诊外科, 多次行手术切除小肠. 我们报道1例CMUSE, 并回顾分析相关文献.

## 1 病例报告

女, 77岁, 因“慢性腹痛、腹泻、黑便、贫血6 mo, 下消化道出血、消化道肿瘤”入院. 患者6 mo前无明显诱因出现腹痛, 伴纳差、腹胀、腹泻、每天腹泻3-5次不等, 无黏液、脓血, 间断有低热、心悸、乏力及纳差, 消瘦呈进行性加重. 4 mo前因贫血、腹泻、腹痛、消瘦行胃镜、结肠镜检查、腹部CT、胸部X线检查均未见明显异常, 考虑小肠出血可能性大, 予以输血、对症治疗好转后出院. 出院后仍间断有腹痛、腹泻、消瘦、乏力及贫血进行性加重. 发病以来, 无畏寒, 体质量下降15 kg; 过去史: 既往体健, 否认结核及其他疾病史; 系统回顾: 无特殊病史; 查体: 慢性病容, 消瘦( $16.8 \text{ kg/m}^2$ )、贫血貌; 浅表淋巴结无肿大, 心肺阴性, 胸水阳性, 腹软, 无压痛, 移动性浊音阳性, 肠鸣音活跃, 未闻及血管杂音, 双下肢浮肿; 实验室检查: 大便潜血阳性; 血常规: HB 47 g/L; 肝功能: 总蛋白31.4 g/L, 白蛋白17.5 g/L; 肾功能、凝血、消化、呼吸、乳腺、卵巢肿瘤标志物、甲状腺功能、血脂、血糖、抗核抗体谱、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)、血清蛋白电泳、维生素B<sub>12</sub>正常, 高敏CRP129 mg/L, 血清铁3.0 mg/L, 转铁蛋白1.4 mg/L, 叶酸5.1 nmol/L; 纤维化4项: 透明质酸242.86  $\mu\text{g/L}$ , 层粘连蛋白15.6  $\mu\text{g/L}$ , III型前胶原N端肽16.6  $\mu\text{g/L}$ , IV-col型胶原189.93  $\mu\text{g/L}$ (均明显升高), 血沉56 mm/h, 结核菌素试验阴性.

影像学检查: 胸片、胸部CT提示少量胸腔积液; 腹部CT胆囊结石, 少量腹水, 肠腔有大量内容物; 腹部CTA示腹腔干、肠系膜上动、静脉正常; 结肠镜正常, 全消化道造影未见明显肠腔狭窄; 腹部B超见腹水; 胰腺CT正常; 腹主动脉、腹腔干、肠系膜上动静脉血管超声大致正常; 超声心动图见少量心包积液.

诊疗分析及治疗经过: 老年女性因慢性腹泻、腹绞痛、体重减轻和反复发作的不完全性肠梗阻, 极度消瘦乏力. 实验室检查示缺铁性贫血(HB 47 g/L), 血小板增多( $459 \times 10^9 \text{ g/L}$ ), 蛋白质-能量营养不良(血清前白蛋白0.07 g/L). 腹部

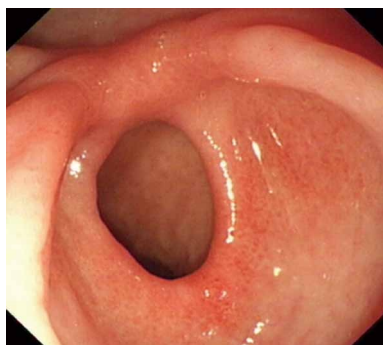


图1 胃镜显示CMUSE症状.



图2 双气囊小肠镜显示CMUSE症状.

超声示肠蠕动亢进, 肠腔大量液体潴留. 钡剂小肠检查未提示更多信息. 胃镜示十二指肠黏膜充血、水肿, 可见浅溃疡及狭窄环(图1). 结肠肠镜正常. 尽管钡剂检查未提示小肠狭窄, 小肠灌注CT可见部分小肠狭窄(最狭窄处 $>10 \text{ mm}$ ). 有学者认为狭窄超过10 mm不会引起胶囊嵌顿, 但胶囊内镜仍滞留于回肠, 23 d后排出. 胶囊内镜示十二指肠降部开始可见肠黏膜充血、水肿、糜烂及多灶性、环形溃疡、多部位纤维狭窄. 双气囊小肠镜示十二指肠降部、近端空肠、回肠黏膜高度充血、水肿, 多灶性浅溃疡及纤维狭窄环, 病变位置越低、越新鲜、程度越重、呈急性改变, 病理示急慢性非特异性炎性改变(由中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、B细胞、T淋巴细胞), 各层有显著的浆细胞浸润和胶原成分(图2). 乳糜泻、淋巴瘤、克隆氏病、血管炎、恶性肿瘤均排除, 未发现感染源; 全胃肠外营养和糖皮质激素治疗病情改善, 包括营养指标(血清白蛋白35.8 g/L, 前白蛋白0.29 g/L, 体重指数 $19.4 \text{ kg/m}^2$ ). 出院后口服糖皮质激素和5-氨基水杨酸, 随访至今, 无明显不适. 患者从未有服用非甾体类抗炎药(NSAIDs)史.

## 2 讨论

CMUSE病例首次描述是在50-60年代<sup>[1]</sup>, 随后相继有部分病例报告. Matumoto等<sup>[2]</sup>1968年日本报告首例CMUSE, 由于当时诊断手段有限, 早期报

### ■研究前沿

隐源性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎为排他性诊断, 当前的研究热点是探寻CMUSE的病因及发病机理, 并选择恰当的治疗手段平衡小肠胶原降解紊乱, 从而预防肠腔狭窄并解决激素依赖问题.



### ■同行评价

隐性多灶性溃疡性狭窄性小肠炎是临床少见病,值得临床报道。本文提供的病例,资料详细,且有图像资料作为证据,诊治与临床结论一致,说明了病例的真实性。诊治分析及文献复习有理有据,在临床工作中对少见病的诊治具有一定的参考价值。

告病例至今仍很难评估。现在由于双气囊小肠镜能观察全小肠<sup>[3]</sup>,可取得足量的病理标本及使用更先进诊断手段如流式细胞和或免疫组织化学,使诊断水平有很大提升。

至今全部报告病例不足50例<sup>[4]</sup>,有相当的病例没有诊断或误诊,大多数诊断为克罗恩病(CD)、或NSAIDs相关性肠病。Perlemuter等报告了12例CMUSE住院患者(1965-1993年),尽管有7例患者手术、症状仍复发,10例中有4例再发狭窄。炎症浸润主要由中性粒细胞、嗜酸性粒细胞构成,激素治疗有效,但多致激素依赖。Chang等<sup>[4]</sup>通过双气囊小肠镜48例中2例诊断为CMUSE(韩国6个大学医院)。所有患者有慢性、复发性腹痛,有一患者仅为反复发作黑粪41 mo;另一患者因胶囊滞留在狭窄部位,手术治疗组织受累,有多部位小肠狭窄、浅溃疡、混合性炎症浸润(浆细胞、单核粒细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞),肠系膜动脉造影无动脉炎的证据<sup>[4]</sup>。

激素治疗有效支持CMUSE的免疫病理反应和发病机制,大多数患者成为激素依赖。解决病因和发病机制的关键因素可能是纤维组织过度产生,与反复慢性肠梗阻发生相关。纤维母细胞增殖可被前炎症因子(IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ),纤维母细胞生长因子(FGFSF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )、血小板纤维生长因子(PDGF)放大,也可被内毒素(脂多糖)放大。其他生长因子,如结缔组织生长因子由纤维母细胞和内皮细胞分泌,也促进纤维组织形成;胶原降解由基质金属蛋白酶家族分解,包括胶原酶、基质细胞、中性粒细胞、巨噬细胞都分泌,这些蛋白酶健康人群胶原降解很快,而多灶性小肠胶原降解紊乱在CMUSE发病中起到关键作用。我们检测的纤维化指标明显异常也证实了这一点。

也有学者持不同观点,他们认为CMUSE可能是一种非典型的血管炎,任何原因、任何类型的血管炎一旦证实,应叫为单纯的血管炎,而不是“CMUSE”。小肠受累可见于变应性肉芽肿性血管炎综合征<sup>[5]</sup>、系统性红斑狼疮、伯格病、韦格纳氏肉芽肿<sup>[6]</sup>、韦伯病和系统性硬皮病<sup>[7]</sup>。血管炎与多灶性小肠溃疡及其并发症相关(包括穿孔),但很少见到多灶性小肠狭窄,且血管炎受累全身脏器(包括肾、关节、皮肤、肺等)。我们接诊的患者无小肠外的器官受累,所以小肠病理无血管炎证据。Matsumoto等<sup>[2]</sup>同样

提示无动脉炎。Perlemuter等认为CMUSE与补体(C2)缺乏有关,但未被其他学者证实。最近Fraille等<sup>[8]</sup>认为CMUSE与X连锁隐性色素沉着紊乱症有关。Hussey等<sup>[9]</sup>报道1例CMUSE患者与小肠、结肠静脉病变有关。

由于小肠多灶性狭窄导致的慢性反复发作性小肠梗阻是CMUSE的主要临床表现<sup>[10]</sup>,几乎所有CMUSE患者均存在不同程度肠梗阻,胶囊内镜检查可发生滞留,所以有学者主张使用自溶胶囊内镜检查。多灶性小肠纤维狭窄以前需外科手术切除,现在可使用双气囊小肠镜治疗<sup>[11]</sup>,严重多部位狭窄的CMUSE患者使用双气囊小肠镜通过气囊扩张治疗,多数扩张至直径18 mm即可使病情得到缓解。

与CMUSE鉴别诊断的首先是CD<sup>[12]</sup>,其次为NSAIDs相关性肠病<sup>[12]</sup>,肠结核和其他感染性小肠疾病<sup>[5]</sup>、白塞氏病<sup>[13]</sup>以及恶性肿瘤等必须排除。大多数结外恶性淋巴瘤累及消化道,不仅有息肉型和弥散型,同样有溃疡型分布于小肠,通常用组织学方法可证实是弥散型大B型淋巴瘤或黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT)<sup>[14]</sup>。

同样,应区分CMUSE与其他不常见的病理状况,CMUSE和溃疡性空肠炎、胶原性口炎性腹泻<sup>[15]</sup>、自身免疫性和嗜酸性粒细胞性肠炎<sup>[1]</sup>截然不同。假如没有多灶性小肠狭窄,非特异性小肠溃疡<sup>[16]</sup>不能诊断为CMUSE。CMUSE预后不确定,由于有症状的小肠狭窄都在外科治疗,然而手术后复发率仍高。Matsumoto等<sup>[2]</sup>报道1例CMUSE者,从1963年随访40年,因为小肠狭窄复发经历了7次手术和几次小肠切除。糖皮质激素是治疗的有效选择,然而,大多数发展为激素依赖,部分可被布地奈德替换;替换不成功者,可改用激素加甲氨蝶呤。

总之,CMUSE尽管是罕见病,但当有小肠多灶性小肠狭窄和多灶性溃疡导致的慢性反复发作性的肠梗阻时,若无CD及NSAIDs服用史和小肠感染因素,应考虑CMUSE。双气囊小肠镜可帮助进行准确诊断,合理的内镜下治疗可避免手术,防止过多的小肠切除。

### 3 参考文献

- 1 Ersoy O, Harmanci O, Aydinli M, Sivri B, Bayraktar Y. Capability of capsule endoscopy in detecting small bowel ulcers. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 136-141
- 2 Matsumoto T, Iida M, Matsui T, Yao T. Chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine: a proposal of the entity from Japanese gastroenterologists to Western enteroscopists. *Gastrointest Endosc*

- 2007; 66: S99-107
- 3 Kopáková M, Rejchrt S, Tacheci I, Bures J. Hyperamylasemia of uncertain significance associated with oral double-balloon enteroscopy. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1133-1138
  - 4 Chang DK, Kim JJ, Choi H, Eun CS, Han DS, Byeon JS, Kim JO. Double balloon endoscopy in small intestinal Crohn's disease and other inflammatory diseases such as cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis (CMUSE). *Gastrointest Endosc* 2007; 66: S96-S98
  - 5 Hayashi K, Horie Y, Takahata H, Adachi Y, Kitamura Y, Kato M. Ileal ulcers and cytomegalovirus infection in a case of Churg-Strauss syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: e141-e143
  - 6 Deniz K, Ozseker HS, Balas S, Akpýnar E, Sökmenstür C. Intestinal involvement in Wegener's granulomatosis. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 329-331
  - 7 Ebert EC. Gastric and enteric involvement in progressive systemic sclerosis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 5-12
  - 8 Fraile G, Norman F, Reguero ME, Defargues V, Redondo C. Cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis (CMUSE) in a man with a diagnosis of X-linked reticulate pigmentary disorder (PDR). *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 506-510
  - 9 Hussey S, Bourke B, Broderick A, Phelan E, McDermott M. Cryptogenic, multifocal, ulcerous, and stenosing enteritis as a manifestation of enterocolic venopathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 107-109
  - 10 Tacheci I, Ryska A, Rejchrt S, Kopáková M, Horava V, Bures J. Spontaneous disintegration of a retained video capsule in a patient with cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis: a rare complication. *Endoscopy* 2008; 40 Suppl 2: E104-E105
  - 11 Rejchrt S, Tacheci I, Bures J. Interventional double balloon endoscopy for Crohn's, gastrointestinal bleeding, and foreign body extraction. *Tech Gastrointest Endosc* 2008; 10: 101-106
  - 12 Matsumoto T, Nakamura S, Esaki M, Yada S, Koga H, Yao T, Iida M. Endoscopic features of chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine: comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1357-1363
  - 13 Isik B, Ara C, Kirimlioglu H, Sogutlu G, Yilmaz M, Yilmaz S, Kirimlioglu V. Single or multiple perforations with varying locations as a complication of intestinal Behçet's disease: report of three cases. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 599-603
  - 14 Li B, Shi YK, He XH, Zou SM, Zhou SY, Dong M, Yang JL, Liu P, Xue LY. Primary non-Hodgkin lymphomas in the small and large intestine: clinicopathological characteristics and management of 40 patients. *Int J Hematol* 2008; 87: 375-381
  - 15 Freeman HJ. Refractory celiac disease and sprue-like intestinal disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 828-830
  - 16 Kakegawa S, Kojima M, Ohwada S, Kawate S, Kawashima Y, Yamada T, Sasaki A, Oyama T, Morishita Y. Idiopathic ulcer of the small bowel containing numerous plasma cells: case resembling mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1304-1307

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology*, WJG)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

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

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径),  $T_{\max}$ ,  $C_{\max}$ , Vd,  $T_{1/2}$  CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}$ /L, WBC数用 $1 \times 10^9$ /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.



《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq \text{分母} \leq 1\,000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

### 3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-26/27

第四届福瑞肝纤维化论坛

会议地点: 上海市

联系方式: bstract@cosoman.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-09-24

2011中国消化病学大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-09-25/26

2011北京消化内镜节

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-10-07/09

第八届亚太肝病学会主题会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@apaslstc.org

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国

热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-10-22/26

第19届欧洲肠胃病学联合组织(UEG)会议周

会议地点: 斯德哥尔摩

联系方式: uegw2011@cpo-hanser.de

2011-10-28/11-02

2011美国胃肠病学会年度科学会议

会议地点: 华盛顿

联系方式: annualmeeting@acg.gi.org

2011-11-04/08

第62届美国肝病研究学会(AASLD)年会

会议地点: 旧金山

联系方式: medical\_conference@263.net

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全

国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswwk@yahoo.com.cn



## 志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!

白爱平 副教授  
南昌大学第一附属医院消化内科

曹秀峰 教授  
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈治水 主任医师  
中国人民解放军第211医院中医科

崔莲花 副教授  
青岛大学医学院公共卫生系

丁惠国 主任医师  
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

杜奕奇 副教授  
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

樊晓明 主任医师  
复旦大学附属金山医院消化科

高泽立 主任医师  
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

葛海燕 教授  
同济大学附属东方医院普通外科

管冬元 副教授  
上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

韩天权 教授  
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

黄恒青 主任医师  
福建省第二人民医院消化内科

黄志勇 教授  
华中科技大学同济医院普外科

季加孚 教授  
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

姜卫东 教授  
安徽省立医院肝胆外科

江米足 教授  
浙江大学医学院附属儿童医院儿科

姜春萌 教授  
大连医科大学附属第二医院消化科

靳雪源 副主任医师  
中国人民解放军第302医院消化内科

李华山 主任医师  
中国中医科学院广安门医院肛肠科

刘绍能 主任医师  
中国中医科学院广安门医院消化科

唐世刚 教授  
湖南省人民医院

唐文富 副教授  
四川大学华西医院中西医结合科

王健生 教授  
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王蒙 副教授  
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王振宁 教授  
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

肖恩华 教授  
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐宁志 研究员  
中国医学科学院肿瘤医院细胞生物与分子生物学实验室

颜宏利 教授  
中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

杨江华 副教授  
安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

周南进 研究员  
江西省医学科学研究所