

基因不稳在胃癌发生中的作用

房殿春

房殿春,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心
重庆市 400038
国家自然科学基金资助项目, No.30070043, 全军“十五”科研基金重点项目, No.01Z075.
项目负责人:房殿春, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院
全军消化专科中心. fangdianchun@hotmail.com
电话: 023-68754124
收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2002-11-14

摘要

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制尚未完全明了. 基因不稳在肿瘤的发生、发展中起重要作用, 亦是导致胃癌发生、发展的分子基础. 研究表明, 基因不稳可以分为2种不同的途径, 即染色体不稳和微卫星不稳. 染色体不稳涉及到抑癌基因的大片段丢失和重排, 由此导致了大量的异倍体细胞. 而微卫星不稳则涉及到错配修复基因的突变, 由此导致了广泛的微卫星不稳定性. 卫星不稳定性胃癌常常伴有甲基化的异常改变. 近年发现线粒体基因不稳亦参与了肿瘤的发生, 本文结合我们自己的工作, 重点讨论了染色体不稳、微卫星不稳、甲基化异常及线粒体基因不稳在胃癌发生发展中的作用.

房殿春. 基因不稳在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(1):1-5
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1.htm>

0 引言

基因不稳在胃癌的发生中起重要作用. 基因不稳包括核基因组不稳 (nMSI) 和线粒体基因组不稳 (mtMSI). 核基因组不稳包括两种不同的形式, 即染色体不稳 (chromosome instability) 和微卫星不稳 (microsatellite instability, MSI)^[1,2]. 染色体不稳亦称肿瘤抑制途径 (suppressor pathway), 由于染色体大片段的丢失、易位和重排, 导致了大量的异倍体细胞. 微卫星不稳亦称 MSI 途径 (MSI pathway), 由于错配修复基因突变使单核苷酸水平的突变率增加, 导致了广泛的 MSI. 近年线粒体基因组不稳 (mtMSI) 在胃癌发生中的作用开始受到关注^[3-7], nMSI 和 mtMSI 共同构成了胃癌发生的分子基础.

1 肿瘤抑制途径 - 抑癌基因缺失的研究

抑癌基因或抗癌基因是一大类可抑制细胞生长, 并有潜在抑制癌变作用的基因群, 他仅在某一种特定细胞内起作用. 抑癌基因必须具备以下条件: (1) 在该癌的相应正常组织中必须有正常的表达; (2) 在该种恶性肿瘤中应有所改变, 如点突变, DNA 片段或全基因缺失, 或

表达缺陷; (3) 将抑癌基因导入该基因缺陷的恶性肿瘤细胞可部分或全部地抑制其恶性表型. 抑癌基因的活化方式包括突变、缺失、易位、重排、扩增和高表达、甲基化状态改变等. 不同组织来源的癌涉及的基因群也不尽相同, 涉及到胃癌的抑癌基因主要有 p53、Rb、APC、MCC、DCC 和 p16 基因等.

1.1 p53 基因 p53 基因突变在各期胃癌均非常普遍, 但较多地发生在晚期胃癌及转移者. p53 基因突变中最常见的 G:C 向 A:T 转换可以被甲基硝基亚硝基胍 (MNNG) 诱发, 而 MNNG 被认为是诱发胃癌的一种致癌剂. 文献报告胃癌 p53 基因的杂合缺失 (LOH) 率为 36.5-73.0%. p53 基因突变先于 LOH, 且随肿瘤的进展 LOH 发生率呈递增趋势. 应用流式细胞仪进行染色体核型分析发现, p53 蛋白阳性胃癌染色体畸变率为 6.9%, 而 p53 蛋白阴性胃癌为 45%; 对胃黏膜细胞动力学进行观察研究发现, 具有突变 p53 蛋白表达的胃癌具有高增生能力, 并且易于发生淋巴结转移; 有 p53 蛋白表达 5 a 存活率为 56%, 无表达者为 24%, 两组 5 a 存活率有明显不同. 我们采用 PCR-SSCP 技术检测 p53 基因第 3-11 外显子, 发现胃癌 p53 突变率为 13.6%, 采用免疫组化方法对胃癌 p53 蛋白的表达进行观察, 染色阳性率为 36.5%, 肿瘤大于 5 cm 组, 有淋巴结转移和浆膜侵犯及 III、IV 期胃癌组 p53 蛋白染色阳性率分别显著高于肿瘤 < 5 cm, 无淋巴结转移和浆膜侵犯及 I、II 期胃癌组. p53 染色阳性者 5 a 存活率为 21.1%, 阴性者为 50.0%, 两者 5 a 存活率差别非常显著. 以上结果提示, 检测胃癌组织 p53 蛋白对胃癌患者预后判断有一定价值^[8,9].

1.2 Rb 基因 对 13 号染色体 LOH 研究发现, 胃癌 13 号染色体 LOH 率为 11-41%. 应用 Southern 杂交技术检测 Rb 基因结构改变, 发现胃癌 Rb 基因 LOH 率 29%, 未发现 Rb 基因重排. 我们采用 Southern 杂交方法对 15 例胃癌及癌旁组织进行研究, 发现 2 例胃癌组织有 Rb 基因的缺失, 其中 1 例伴有 Rb 基因的重排, 说明 Rb 基因的失活也参与了胃癌的发生和发展.

1.3 APC 基因 APC 基因最初是在结肠腺瘤性息肉 (adenomatous polyposis coli) 患者中发现的, 并以此命名. APC 基因定位于染色体 5q21-22. 对胃腺瘤研究表明, APC 基因突变率为 20%, 说明同大肠腺瘤发生的分子机制相似, APC 基因突变在胃腺瘤向癌转变过程可能起重要作用. 胃癌组织中 APC 基因突变率为 20-40%, 杂合缺失率 30-60% 左右. 先用流式细胞仪分选胃癌细胞, 然后检测胃癌细胞 APC 基因改变, 发现胃癌 APC 的

LOH 率为 86%, APC 基因 LOH 既可见于分化型胃癌, 又可见于未分化癌, 既可见于早期癌, 又可见于晚期癌. APC 突变将引起编码蛋白异常, 进一步导致细胞的黏附、生长、分化、增生及凋亡的重要改变. 我们研究发现在犬胃黏膜肠化生阶段即有 APC 蛋白异常表达, 胃癌 APC 第 15 外显子突变率 22.1%, 缺失率亦在 20% 以上, 肠型胃癌中 APC 突变率显著高于胃型胃癌, 提示该基因可能是肠型胃癌的易感基因^[10-12].

1.4 MCC 基因 MCC 基因即结直肠癌突变基因(mutated in colorectal cancer), 同 APC 基因一样也位于 5q21, 仅与 APC 基因相隔 150 kb. 采用细胞分选技术检测异倍体胃癌细胞 MCC 基因 LOH, 发现 7 例信息个体均存在 LOH, 认为 MCC 基因 LOH 是胃癌最常见的基因改变之一. 多数文献报告 MCC 基因的 LOH 总是伴有 APC 基因的 LOH, 是胃肠肿瘤发生的早期改变. 我们的研究表明, 在肠化生、异型增生和胃癌中有 MCC 基因 LOH, 胃癌组织 MCC 基因 LOH 率为 31.3%, 胃、肠两型胃癌 MCC 基因 LOH 率无显著差别, MCC 可能在胃癌的早期发生阶段起作用^[12,13].

1.5 DCC 基因 DCC 基因亦称结直肠癌缺失基因(deleted in colorectal carcinoma), 定位于染色体 18q21.3. DCC 基因在胃肠肿瘤中的缺失率为 40-70% 左右. DCC 基因缺失主要出现于中晚期肿瘤, 并与临床预后相关. 我们发现在肠化生及异型增生组织中 DCC 基因 LOH 检出率分别为 4.3% 和 12.5%, 胃癌为 43.1%. DCC 基因 LOH 率及 mRNA 表达丢失 (LOE) 率随着肿瘤体积增大、浸润深度增加及淋巴结转移而增高, 临床 III、IV 期胃癌组 DCC 基因 LOH 率显著高于 I、II 期, 提示 DCC 基因可能与胃癌的进展相关^[14,15].

1.6 p16 基因 p16 基因又称多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor1, MTS1), 定位于 9p21 上, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 外显子 2 是 p16 基因最常发生改变的部位, DNA 低甲基化是 p16 失活重要的原因. p16 的抑癌作用在于他抑制了细胞从 G1 → S 期转变过程中起关键作用的 CDK4 的功能. 胃癌组织中 p16 纯合缺失率为 18.0-23.1%, 且缺失多见于低分化、有淋巴结转移的进展期胃癌, 提示 p16 基因缺失是胃癌的晚期改变. 应用免疫组化技术分析检测胃癌 p16 蛋白的表达发现, p16 蛋白表达在胃癌组织阳性率显著低于癌旁正常组织, 在低分化腺癌阳性率显著低于高分化腺癌, 提示 p16 蛋白表达缺失与胃癌的分化有关.

2 nMSI 途径的研究

微卫星(microsatellite)是由 2-6 个核苷酸组成, 具有高度多态性的简单串联排列而成的 DNA 序列, 尤以二核苷酸重复序列(CA/GT)最为常见. 微卫星的功能尚未完全明了, 有的微卫星有自身特异性结合蛋白或能直接编码蛋白质; 有的微卫星如(CA/GT)与性别分化、X 染

色体的失活有关; 有的则可能参与染色单体的折叠及染色体端粒的形成等. 微卫星可能通过改变 DNA 结构或通过特异性蛋白结合而发挥其基因调控作用.

微卫星不稳定性(MSI)是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变. MSI 系错配修复基因(mismatching repair gene)的突变所致. 由于错配修复基因的突变及功能异常造成 DNA 频发的复制错误(replication errors, RER)并不断积累, 导致细胞的微卫星 DNA 序列发生改变. 微卫星 DNA 序列的改变使其不能正常地发挥调控作用, 使细胞的增生及分化发生异常, 由此导致了肿瘤的发生.

为深入研究 MSI 的发生机制, 我们采用分子生物学技术对散发性胃癌 MSI、抑癌基因缺失(APC、MCC 和 DCC 基因 LOH)和相关突变(包括 p53、TGFβ R II、BAX、IGF- II R 和 hMSH6)进行分析. 将胃癌分为高频率 MSI (MSI-H)、低频率 MSI (MSI-L) 和 MSI 阴性(MSS)三组, 研究发现 TGFβ R II、BAX 基因和 hMSH6 突变均见于 MSI-H 胃癌, 而 p53 突变和 APC、MCC 和 DCC 基因 LOH 均见于 MSI-L 和 MSS 阴性胃癌. 我们的研究表明, 胃癌的发生涉及到 2 条不同的基因病理途径: 其一为经典的肿瘤抑制病理途径, 另一为 MSI 途径. 前者包括 MSI-L 和 MSS 的多数胃癌, APC/MCC、DCC 和 p53 基因等抑癌基因的 LOH 和突变在其发生和发展中起重要作用; 而后者包括少数 MSI-H 胃癌, 由于错配修复基因异常, 导致了 TGFβ R II、BAX、hMSH6 等基因单核苷酸水平突变率的增加和广泛的 MSI. 通过对 MSI 及其相关突变分析为进一步揭示胃癌 MSI 病理途径的分子机制提供了依据^[16-20]. 在 MSI 的临床表型方面, MSI-H 多见于多发胃癌, 多位于胃窦, 组织学上多为肠型, 血清学 H.pylori 抗体多为阳性, 少有淋巴结转移, 多数认为恶性程度较低, 预后较好. 以上说明 MSI-H 胃癌无论在临床病理特点还是在基因改变方面均与 MSI-L 和 MSS 胃癌有明显不同^[21-31].

我们还对胃癌端粒长度与 MSI 和 APC/MCC 及 DCC 基因 LOH 和移码突变进行了分析, 发现端粒缩短与 APC/MCC 及 DCC 基因 LOH 呈正相关, 而与 MSI 及移码突变无相关性. 提示端粒丢失参与了 LOH 病理途径, 而与 MSI 无关^[32].

3 DNA 甲基化异常的研究

DNA 甲基化的不平衡为肿瘤的特性之一, DNA 去甲基化或各种原因导致低甲基化, 均可引起染色体结构松散、重排, 脆性位点不稳定. CpG 位点是肿瘤基因甲基化异常的热点部位. 在胃癌中发现有 DNA 甲基化异常的基因主要有 DNA 错配修复基因 hMLH1、p16 基因、p14 基因、CD44 基因、金属蛋白酶 3 组织抑制物基因 (TIMP-3)、pS2 基因和 E-钙黏蛋白基因等^[33-35]. MSI-H 胃癌多表现为 hMLH1 表达的丢失和 hMLH1 启动子区高甲基化, MSI-L 和 MSS 肿瘤则少有甲基化,

提示hMLH1启动子区甲基化可能是引起MSI-H胃癌的主要机制。Leung检测35例MSI-H胃癌,发现100%病例有hMLH1基因CpG岛高甲基化,90.0%的病例伴有hMLH1蛋白表达的丢失和mRNA水平的降低,MSI-L和MSS胃癌均无高甲基化发现,hMSH2蛋白表达在各组胃癌均为正常,提示MSI-H胃癌系由于hMLH1启动子区高甲基化所致。我们采用二维DNA电泳、DNA测序和甲基化特异PCR方法检测胃癌hMLH1突变和启动子区甲基化,hMLH1突变率为4.4%,正常胃黏膜未见启动子区高甲基化,胃癌高甲基化16.2%,hMLH1突变均发生MSI-H胃癌,MSI-H胃癌组hMLH1启动子区高甲基化的检出率显著高于MSI-L和MSS组,提示hMLH1突变和高甲基化参与了MSI途径^[36]。其他的研究也得出相似的结果^[37]。

胃癌常有p16基因表达丢失,但少有p16基因突变。CpG岛甲基化与p16表达丢失密切相关,可能是p16基因失活的重要机制之一。弥漫型胃癌p14基因启动子甲基化频率高于肠型胃癌,提示p14基因启动子甲基化与弥漫性胃癌的发生有关。无CD44基因表达胃癌细胞株MKN-28常伴有CD44基因启动子区高甲基化,而表达CD44的胃癌细胞株则无甲基化。应用去甲基化制剂5-氮杂胞苷可恢复CD44基因表达,提示胃癌细胞株MKN-28 CD44基因表达可被DNA甲基化所抑制。金属蛋白酶3组织抑制物基因(TIMP-3)表达的丢失与TIMP转录起始部位甲基化异常有关。应用去甲基化合物5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理可恢复TIMP-3基因的表达,提示TIMP-3基因是一种肿瘤相关DNA甲基化异常的靶位。pS2启动子区甲基化导致的pS2表达减少可能参与了高分化胃癌的早期发生过程。大约半数胃癌存在E-钙粘蛋白基因启动子区的高甲基化。早期胃癌和晚期胃癌E-钙粘蛋白基因启动子区的高甲基化频率相同,甲基化均发生在转录起始部位CpG岛序列,常伴有表达的下调,发生在胃癌的早期阶段。胃癌E-钙粘蛋白的甲基化可伴随p16和hMLH1的甲基化^[38]。

由于DNA甲基化状态可被逆转,因此针对基因甲基化的靶向治疗已引起人们的重视。通过恢复未发生突变或丢失,而仅仅被抑制的生长调控基因的表达而恢复细胞正常生长调控功能,从而可达到治疗的目的。

4 胃癌mtMSI研究

线粒体是迄今发现的人类细胞核外唯一具有自己基因组,且能不依赖nDNA进行复制、转录和翻译的细胞器,被称为“人类第25号染色体”^[39,40]。mtDNA是一条全长为16 569 bp的双链闭环分子,一条为重链(H链),一条为轻链(L链),H链含有较多的鸟嘌呤(G),而L链则含有较多的胞嘧啶(C)。mtDNA由2种rRNA基因、22种tRNA基因、13种多肽编码基因、控制区(D-环区)和轻链复制起始区组成,大部分基因位于H链。mtDNA独立于

细胞核DNA,能独立进行复制、转录和翻译,具有非常活跃的自我复制能力。他编码的蛋白质是ATP酶和呼吸链复合物的组分,并与核基因编码的蛋白质和酶共同完成生物氧化功能。mtDNA还编码24种RNA用于线粒体蛋白质合成。D-环区是mtDNA的复制起点,为人类mtDNA的主要非编码区,对mtDNA的转录和复制起调控作用。

由于真核细胞mtDNA几乎均是<20 kb的闭环分子,与核基因组相比,其分子量小,缺乏组蛋白保护,易受致癌物攻击,且其缺乏损伤修复系统,因此是致癌物的重要靶点^[41]。此外,人体内90%以上的氧直接与线粒体的电子传递体系-呼吸链相联系,且大量的自由基类物质在有氧代谢过程中不断地产生。由于线粒体内氧浓度很高,易产生自由基及过氧化氢等物质,他本身又不能合成谷胱甘肽而将这些过氧化物有效地清除,因此线粒体及mtDNA易受氧化性损伤。线粒体受损以后可通过改变细胞能量产生,提高线粒体氧化压力,引起线粒体酶表达异常和/或调控凋亡等途径来影响细胞的生物学行为^[42,43]。

由于特殊的生物学环境和遗传学地位,mtDNA更容易发生突变,其突变频率要比核DNA高10倍。mtDNA属母系遗传,突变会沿母系连续积累。在可能导致mtDNA突变的环境有害因子中,研究较多的是活性氧自由基。线粒体在呼吸链代谢中产生的超氧粒子和电子转运过程中生成的自由基,都可能造成mtDNA的损伤,诱发点突变。点突变可提高DNA双链的分离机会,促使mtDNA进一步发生突变、缺失和重排。mtDNA损害还与吸烟有关,吸烟者mtDNA损伤的水平为非吸烟者的5.6倍。许多资料显示,mtDNA突变有“热点”及与相应的序列结构,这也许对预防和治疗因mtDNA突变引起的疾病有所启示。众多研究表明,致癌物与mtDNA的结合率比nDNA高。烷化类致癌剂与mtDNA的结合率是nDNA的5倍;苯并芘与mtDNA的结合率为nDNA的40-90倍;多环香烃与mtDNA的结合率为nDNA的50-500倍;黄曲霉素B1与肝细胞mtDNA的结合率是nDNA的3-4倍。mtDNA氧化损伤后可造成碱基片段丢失、碱基修复及插入突变等,其中以片段丢失较多。研究证实,抗氧化剂可减少机体突变相关事件如细胞恶性变的发生,表明自由基引发的线粒体及mtDNA损伤在细胞癌变过程中发挥一定的作用。

与正常组织比较,肿瘤细胞mtDNA的数量、结构均发生变化。Alonso et al^[44]检测21例胃癌mtDNA控制区突变,发现37%的胃癌存在该区的序列改变。Habano et al^[45]检测62例胃癌,16%表现为mtMSI表型,mtDNA突变伴有mtMSI表型者与肠型胃癌的发生有关,并发现mtMSI与nMSI呈正相关。但亦有报道胃癌mtMSI和nMSI并无相关性^[46]。Maximo et al^[47]检测胃癌MSI、mtDNA缺失和突变,发现81%存在mtDNA改变,mtDNA突

变主要发生在 D- 环区、ND1 和 ND5 基因.我们对 30 例胃癌 mtMSI 进行检测,结果检出 mtMSI 11 例,占 36.7 %,提示 mtMSI 是胃癌常见改变.由浅表性胃炎?萎缩性胃炎?胃癌前病变?胃癌的过程中, mtMSI 的检出率似乎有增加趋势,提示 MtMSI 可能与胃癌的发生有关.我们还发现,不但胃癌组织中检出 mtMSI,而且肠上皮化生和异型增生组织中也检出了 mtMSI,提示 mtMSI 可能发生于胃黏膜癌变的早期阶段^[48].

越来越多的资料表明, mtDNA 可以稳定地整合到 nDNA 中.我们的研究发现,部分胃癌及其癌前病变细胞核基因组中存在 mtDNA 序列,提示 mtDNA 可整合到核基因组中,其意义值得进一步研究.我们还发现这种 MtDNA 整合现象主要发生于 H.pylori 感染胃黏膜,提示可能与 H.pylori 感染有关^[49].我们推测这种整合至少可通过两条途径引起细胞癌变:(1)通过引起核基因组的不稳定性,抑制肿瘤抑制基因的活性或激活癌基因的活性引起癌变;(2)通过改变细胞能量产生,提高线粒体氧化压力,引起线粒体酶表达异常和/或调控凋亡等途径来影响细胞的生物学行为.以上推论尚需进一步研究来证实.

多数消化系肿瘤具有高频率的 mtDNA 体细胞突变,突变型 mtDNA 容易在各种癌的体液中被检测到,相当于核 p53 DNA 的 19-220 倍.由于他们的克隆特性和高拷贝数,线粒体突变可能为癌的非侵入性诊断提供一种有效的分子标记^[50].检测胰腺癌细胞 mtDNA 突变亦发现, mtDNA 体细胞突变几乎发生于所有的检测标本之中,因此 mtDNA 检测有希望在临床诊断上进行应用.

5 参考文献

- Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 1994;266:1959-1960
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-816
- Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, Penta JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest* 2002;20:557-569
- Miyazono F, Schneider PM, Metzger R, Warnecke-Eberz U, Baldus SE, Dienes HP, Aikou T, Hoelscher AH. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Oncogene* 2002;21:3780-3783
- Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:972-976
- Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin Cancer Res* 2002;8:481-487
- Liu MR, Pan KF, Li ZF, Wang Y, Deng DJ, Zhang L, Lu YY. Rapid screening mitochondrial DNA mutation by using denaturing high-performance liquid chromatography. *World J Gastroenterol* 2002;8:426-430
- 房殿春,罗元辉,鲁荣,刘为纹,晋华源,门荣甫,周子成,王振华.胃癌组织 P53 基因突变、蛋白产物的表达及其与患者预后的关系.第三军医大学学报 1994;16:418-421
- 王东旭,房殿春,罗元辉,刘为纹,王明荣.胃癌组织 17p13.3 杂合性丢失及 p53 蛋白异常表达的研究.中华病理学杂志 1997;26:134-136
- Wang DX, Fang DC, Liu WW. Induction of intestinal metaplasia in stomach of dogs and expression of tumor-related proteins in animal gastric mucosa lesions. *Chin Med J* 2000;113: 336-339
- 王东旭,房殿春,罗元辉,鲁荣,刘为纹.胃癌组织 DCC、APC/MCC 基因杂合性缺失研究.中华医学遗传学杂志 1996;13:269-272
- 房殿春,罗元辉,杨仕明,李小安,凌贤龙,方丽,刘为纹.多重 PCR 和 DNA 测序技术检测胃癌 APC 基因 15 外显子突变.第三军医大学学报 2001;23:1007-1009
- 房殿春,王东旭,罗元辉,鲁荣,刘为纹. PCR 检测胃癌 MCC、DCC 基因和 YNZ22 位点串联重复序列的杂合性丢失.中华消化内镜杂志 1997;14:203-206
- 王东旭,房殿春,刘为纹,罗元辉,鲁荣.胃黏膜肠化生组织中多种抑癌基因的杂合缺失.中华病理学杂志 1999;28:264-267
- Fang DC, Jass JR, Wang DX. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1998;51:593-596
- 房殿春,罗元辉,杨仕明,刘为纹.胃癌微卫星不稳定性及其相关突变的研究.中华医学杂志 1999;79:920-922
- Fang DC, Jass JR, Wang DX, Zhou XD, Luo YH, Young J. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Clin Pathol* 1999;52:504-508
- 周晓东,房殿春,罗元辉,鲁荣,王东旭.胃癌微卫星不稳定性及其临床意义.中华医学杂志 1997;77:850-851
- 房殿春,罗元辉,杨仕明,刘为纹.胃癌微卫星不稳定性与移码突变的关系.中华消化杂志 1999;19:385-387
- 房殿春,周晓东,罗元辉,王东旭,鲁荣,杨仕明,刘为纹.胃癌微卫星不稳定性与抑癌基因杂合缺失.世界华人消化杂志 1999;7:479-481
- Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;95:350-353
- Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, Chen JY. A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:92-101
- Ogata S, Tamura G, Endoh Y, Sakata K, Ohmura K, Motoyama T. Microsatellite alterations and target gene mutations in the early stages of multiple gastric cancer. *J Pathol* 2001;194:334-340
- Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab Invest* 2001;81:593-598
- Yamamoto H, Min Y, Itoh F, Imsumran A, Horiuchi S, Yoshida M, Iku S, Fukushima H, Imai K. Differential involvement of the hypermethylator phenotype in hereditary and sporadic colorectal cancers with high-frequency microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:322-325
- Halford S, Sasieni P, Rowan A, Wasan H, Bodmer W, Talbot I, Hawkins N, Ward R, Tomlinson I. Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 2002;62:53-57
- Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001;159:2107-2116
- Lee JH, Abraham SC, Kim HS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Inverse Relationship between APC Gene Mutation in Gastric Adenomas and Development of Adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:611-618
- Duval A, Hamelin R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet* 2002;45:71-75
- Peiro G, Diebold J, Lohse P, Ruebsamen H, Lohse P, Baretton GB, Lohrs U. Microsatellite instability, loss of heterozygosity, and loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2002;33:347-354
- 张立力,张振书,张亚历,吴保平,郭文,刘晓霞,周殿元.多原发大肠癌微卫星不稳定性研究.世界华人消化杂志 1999;7:397-399
- Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526

- 33 Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter Methylation Status of E-Cadherin, hMLH1, and p16 Genes in Nonneoplastic Gastric Epithelia. *Am J Pathol* 2002;161:399-403
- 34 Lee TL, Leung WK, Chan MW, Ng EK, Tong JH, Lo KW, Chung SC, Sung JJ, To KF. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:1761-1766
- 35 Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001;91:2294-2301
- 36 房殿春,罗元辉,李小安,凌贤龙,杨仕明,方丽,汪荣泉.胃癌错配修复基因 hMLH1 突变和启动子甲基化与基因不稳的关系.中华消化杂志 2002;22:327-330
- 37 Yanagisawa Y, Akiyama Y, Iida S, Ito E, Nomizu T, Sugihara K, Yuasa Y, Maruyama K. Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;85: 50-53
- 38 Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:569-573
- 39 Martinou JC. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999;399: 411-412
- 40 Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999;283:1482-1488
- 41 Penta JS, Johnson FM, Wachsmann JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001;488:119-133
- 42 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309-1312
- 43 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-443
- 44 Alonso A, Martin P, Albarran C, Aquilera B, Garcia O, Guzman A, Oliva H, Sancho M. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis* 1997;18:682-685
- 45 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000;118:835-841
- 46 Schwartz S, Perucho M. Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2000; 119:1806-1808
- 47 Maximo V, Soares P, Seruca R, Rocha AS, Castro P, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:136-143
- 48 凌贤龙,房殿春,周晓东,罗元辉,鲁荣.胃黏膜幽门螺杆菌感染与线粒体 DNA 微卫星不稳的关系.第三军医大学学报 2001;23:1024-1026
- 49 凌贤龙,房殿春,周晓东,罗元辉,鲁荣.胃黏膜细胞线粒体DNA核内整合与幽门螺杆菌感染的关系.第三军医大学学报 2001;23:1043-1045
- 50 liss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-2019

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学情报研究所 (ISI), 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine® (即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴. WJG® 被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)、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. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 世界消化学网数据库, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种,“双奖”期刊 58 种,“双百”期刊 122 种,“双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 200 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjcd@public.bta.net.cn http://www.wjgnet.com (世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究

郝冬梅,孙秀菊,郑志红,贺光,马鸣超,徐惠绵,王梅先,孙开来

郝冬梅,孙秀菊,郑志红,贺光,马鸣超,孙开来,中国医科大学医学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001
徐惠绵,王梅先,中国医科大学附属一院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
郝冬梅,女,1970-04-17生,辽宁省沈阳市人,汉族,中国医科大学医学遗传学博士研究生,主要从事胃癌发生分子机制研究。
国家重点基础研究发展规划项目(973项目), G1998051203
项目负责人:孙开来,110001,辽宁省沈阳市和平区北二马路92号,中国医科大学医学遗传学教研室. sunkailai@21cn.com
电话:024-23265842 传真:024-23265842
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-28

Screening and expression of associated genes in gastric dysplasia

Dong-Mei Hao, Xiu-Ju Sun, Zhi-Hong Zheng, Guang He, Ming-Chao Ma, Hui-Mian Xu, Mei-Xian Wang, Kai-Lai Sun

Dong-Mei Hao, Xiu-Ju Sun, Zhi-Hong Zheng, Guang He, Ming-Chao Ma, Kai-Lai Sun, Department of Medical Genetics, Chinese Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Hui-Mian Xu, Mei-Xian Wang, Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Chinese Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by the National Major Basic Research Development Program, G1998051203
Correspondence to: Dr. Kai-Lai Sun, Department of Medical Genetics, Chinese Medical University, No.92, the 2th Northern Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. sunkailai@21cn.com
Received: 2002-11-12 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To explore molecular mechanism of gastric carcinogenesis, we screened associated genes of gastric dysplasia and further investigated their expression in gastric carcinomas with different stages.

METHODS: Relatively pure dysplasia and normal tissue were procured by manual microdissection, amplified by cDNA-PCR, and then used to carry out forward (dysplasia as tester, normal tissue as driver) and reverse (normal tissue as tester, dysplasia as driver) SSH. Subtracted cDNA fragments were cloned into vector, screened, sequenced, and made homologous analysis. The expression of differentially expressed fragments was detected and verified by Dot hybridization and reverse transcription-PCR.

RESULTS: Two subtracted cDNA libraries were constructed. Twenty-one of 26 sequenced clones were verified to be expressed differentially. It was noted that differential expressions of 4 genes (P125, cytochrome c oxidase subunit I, meprin A, acidic calponin) were detected simultaneously in dysplasia, early cancer and advanced cancer.

CONCLUSION: Four new associated genes have been identified

in dysplasia. Further studies are necessary to determine their roles in gastric carcinogenesis.

Hao DM, Sun XJ, Zheng ZH, He G, Ma MC, Xu HM, Wang MX, Sun KL. Screening and expression of associated genes in gastric dysplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):6-9

摘要

目的:胃黏膜异型增生是一种公认的重要癌前病变,筛查癌前病变相关基因并研究这些基因在胃癌不同阶段的表达,探讨胃癌发生分子机制。

方法:手工显微切割取胃异型增生和正常组织,应用 cDNA PCR 方法对少量组织全基因组扩增后进行双向抑制性消减杂交,消减后片段与载体连接、克隆、筛选、测序及同源性检索。应用斑点杂交检测基因在胃癌不同阶段的表达,并用半定量 RT-PCR 方法进一步验证检测结果。

结果:正常和异型增生组织互为 tester 和 driver 成功构建了两个 cDNA 消减文库,测序的 26 个克隆中 21 个片段在胃癌不同阶段有表达异常,特别是其中 4 个基因(P125, cytochrome oxidase subunit I, meprin A, acidic calponin)在异型增生、早癌、进展期胃癌中皆有表达改变,可能是重要的胃癌癌前病变相关基因。

结论:发现 4 个新的与胃癌发生相关基因,其具体机制有待进一步研究。

郝冬梅,孙秀菊,郑志红,贺光,马鸣超,徐惠绵,王梅先,孙开来.胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(1):6-9
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/6.htm>

0 引言

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其发病率呈明显的上升趋势^[1,2],胃黏膜异型增生是公认的重要癌前病变,但由于异型增生细胞取材困难,局部分布,数量少,该阶段是胃癌发生分子机制研究的重点也是难点,基因表达变化研究刚刚起步,而且局限于应用免疫组化、原位杂交或显微切割方法研究单个基因的表达,系统化研究较少,尚未发现重要的相关基因^[3-15].应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)从整体水平筛选差异表达基因^[16,17],寻找胃癌相关基因,是研究胃癌发生分子机制的重要途径,对胃癌的早期诊断、治疗和预防有重要意义,迄今未见报道.本研究借鉴代表性差

异显示技术(RDA)首先对少量组织 cDNA 进行全基因组扩增,然后应用抑制性消减杂交技术进行双向杂交,把三种方法结合创建了显微切割 - cDNA PCR-SSH法.应用此方法成功构建了胃异型增生和正常组织间 cDNA 消减文库,为少量组织消减文库的构建提供新途径.此外,应用斑点杂交和半定量 RT-PCR 方法检测差异基因在胃癌不同阶段的表达情况,初步筛选胃异型增生相关基因,为阐明胃癌发生分子生物学机制提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 由中国医科大学附属一院肿瘤科提供.抑制性消减杂交所用标本由显微切割取材,将胃癌患者癌旁组织,切成若干块,分别做冰冻切片,HE 染色后置于倒置显微镜上在 10 倍镜下用玻璃细针手工显微切割取病理诊断为异型增生处组织^[18,19],胃正常组织取自切缘处,方法同上.斑点杂交用标本为早癌 1 例,进展期癌 4 例,大体标本;异型增生 1 例,同 SSH. RT-PCR 实验标本为进展期癌,30 例,大体标本.

1.2 方法 (1)cDNA PCR 扩增:正常和异型增生组织 cDNA 分别用 Mbo I 酶切,连接头,接头序列为:R-Bgl-24: 5' -AgCACTCTCCAgCCTCTCACCgCA-3' R-Bgl-12: 5' -gATCTgCggTg-3' 然后以 R-Bgl-24 为引物做 PCR 扩增,循环条件:72 °C 5 min → 25 × (95 °C 1 min → 72 °C 3 min) → 72 °C 7 min,合并 20 管扩增产物,再用 Mbo I 酶切,利用 Gel Extraction Kit (上海华舜)除去接头,参照 cDNA-RDA 方法^[20,21],酶切产物用 T4 DNA 聚合酶补齐粘末端后分别做 tester 和 driver 进行双向 SSH.(2)SSH:以正常组织做 tester,异型增生组织做 driver 进行 SSH,简称 NT;以异型增生组织做 driver,正常组织做 tester 进行 SSH,简称 PT,应用 Clontech PCR select™ cDNA Subtraction Kit,具体步骤同说明书.(3)cDNA 消减文库构建、筛选和序列鉴定:消减杂交产物经 PCR Purification kit (上海华舜)纯化,与 pMD-18 载体连接,转化受体菌 JM109 进行蓝白斑筛选(含 x-gal, IPTG, Amp),分别随机挑取 30 个白色克隆,以巢式 PCR 引物 1 和 2R 进行 PCR 扩增,再分别将其中 20 个有清晰单条带的克隆送上海博亚生物技术公司测序,测序结果在 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行 blastN 和 EST-human 同源性比较,如果为新序列,送交 GenBank.(4)斑点杂交:阳性克隆 PCR 扩增后应用 96 well dot-blot system 制备杂交膜,β-actin 做内对照.应用随机引物法(Takara)标记正常和异型增生组织 cDNA PCR 扩增产物,应用逆转录反应体系标记癌组织和配对正常组织中 RNA,探针标记,杂交,洗膜,放射自显影同分子克隆.压片同时放两张 X-片,48 h 后洗第一张,10 d 时洗第二张.杂交结果用安莱图像分析仪扫描和 Chemilmager 5500 软件分析.(5)半定量 RT-PCR:CFDP1

引物序列:F 5' -AggCATTggATCAgAggATg-3' R 5' -ATggATggCCAgtTCTTCAC-3' 扩增片段长度为 499 bp; β-actin 做内对照,引物序列:F 5' -AgAgCTACgAgCTgCCTgAC-3' R 5' -AgTACTTgCgCTCAggAggA,扩增片段长度为 300 bp,利用 Primer 3.0 软件设计. PCR 扩增条件: 95 °C 5 min → 30 × (94 °C 45 " → 56 °C 45 " 72 °C 45 ") → 72 °C 7 min.

2 结果

2.1 SSH 实验 cDNA 测序结果 从两个 cDNA 消减文库中各自挑取 30 个克隆,经 PCR 扩增验证其中 NT 25 个、PT 26 个克隆有插入片段,分别选取 20 个阳性克隆测序,测序结果与 GenBank 数据库进行同源性分析,结果显示:含有 26 个不同克隆,其中 15 个克隆与已知基因高度同源,3 个与已知 EST (expressed sequence tags) 高度同源,8 个为未知 EST,已被 GenBank 收录,登录号为 BQ164614- BQ164616, BQ291516- BQ291520,可能代表新基因.

2.2 斑点杂交结果 应用斑点杂交技术检测 26 个阳性克隆在异型增生(1 例)、早癌(1 例)和进展期胃癌(4 例)中表达水平,结果显示:21 个克隆在至少 1 例标本中有表达差异,其中 10 个克隆在异型增生(图 1),8 个克隆在早癌,20 个克隆在进展期癌中表达改变.5 个克隆在异型增生、早癌、进展期癌中皆有表达改变,其中 4 个克隆为已知基因(P125, cytochrome c oxidase subunit I, meprin A, acidic calponin),1 个克隆为 EST,3 个克隆表达上调,2 个克隆表达下调,统计结果见表 1.

2.3 半定量 RT-PCR 结果 进展期胃癌及配对正常组织内皆有 CFDP1 基因表达,但其中 9 例胃癌标本表达显著下降,阳性率 30 % (9/30),与斑点杂交结果基本一致(1/4, 25 %),进一步验证上述实验数据,见图 2.

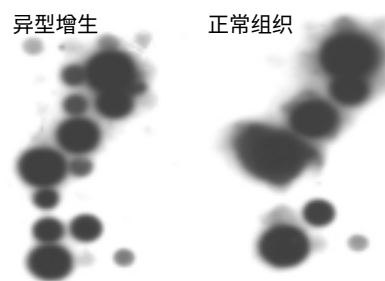


图 1 正常和异型增生组织斑点杂交结果(曝光 48 h).

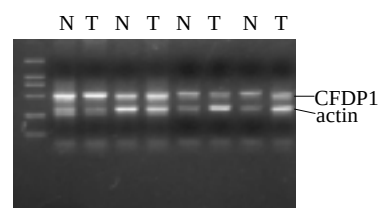


图 2 RT-PCR 检测结果 N:正常组织 T:胃癌组织.

表 1 阳性克隆在胃癌不同阶段中的表达

克隆	基因名称	差异表达 <i>n</i>	差异表达标本类型	阳性率(%)
PT1	AL713668 (hypothetical protein)	1	进展期	17
PT2	NM_007190 (Sec 23 -interacting protein p125)	3	异型增生 早期 进展期	50
PT3	AI339219 (EST)	1	早期	17
PT4	FLJ10417 (hypothetical protein)	2	异型增生 进展期	33
PT6	NM_004190.1 (gastric lipase, LIPF)	1	进展期	17
PT10	BM840901 (EST)	2	早期 进展期	33
PT11	XM_044902 (differentially expressed in hematopoietic lineages)	3	异型增生 进展期	50
PT17	NM_004859 (clathrin, heavy polypeptide, CLTC)	1	进展期	17
PT18	XM_008731 (meprin A, beta)	3	异型增生 早期 进展期	50
PT19	AF382013 (cytochrome C oxidase subunit I)	3	异型增生 早期 进展期	50
PT21	BQ291520 (EST)	2	早期 进展期	33
PTB1	NM_021804 (angiotensin I converting enzyme 2)	3	异型增生 进展期	50
PTB4	AB023058 (chromosome 6p21.3, HLA class I region)	1	进展期	17
NT4	BQ291517 (EST)	1	进展期	17
NT8	BQ291516 (EST)	1	进展期	17
NT12	NM_017455 (stromal cell derived factor receptor 1)	2	进展期	33
NT13	S80562 (acidic calponin)	3	异型增生 早期 进展期	50
NT14	XM_058493 (similar to pepsin A precursor)	3	异型增生 进展期	50
NT15	BQ291519 (EST)	3	异型增生 早期 进展期	50
NT17	NM_006324 (CFDP1)	2	异型增生 进展期	33
NT21	BQ291518 (EST)	1	进展期	17

3 讨论

肿瘤学研究中，分析微小癌前病变非常重要，他是正常细胞演变为癌细胞的中间过程，是癌症发生的第一个关键步骤.胃黏膜上皮异型增生是胃癌的一种重要癌前病变，但由于肉眼无法辨别，细胞数量少，细胞异质性干扰严重，需要利用显微切割技术在显微镜下定点准确切取组织，取材非常困难，研究受到严重限制。我们借鉴 cDNA RDA 方法首先对显微切割获取的少量组织进行全基因组（cDNA PCR）扩增，然后再进行消减杂交，将显微切割、RDA 和 SSH 的优点结合，有效保证了实验的精确性。抑制性消减杂交技术是 Diatchenko et al [22]1996 年建立起来的一种以 PCR 为基础的 cDNA 消减杂交技术,其归一化(normalization)过程可使高、低丰度的差异基因都能有效分离，从整体水平系统化筛选差异表达基因，研究该阶段基因表达变化和特异性标志物。获得的 26 个不同基因片段中 21 个经斑点杂交方法证实在异型增生或胃癌组织中差异表达，这提示:利用本室建立的显微切割 - cDNA PCR-SSH 法从少量组织构建 cDNA 消减文库，是一种简便、快速、高效克隆鉴定差异表达基因的方法。

基因芯片技术是高通量研究基因表达谱的新方法^[23-25]，国外文献报道将消减杂交获得的差异片段制成芯片进行基因的初步筛查及验证，替代传统的 Northern 杂交方法，省时省力效率高^[26,27]，但费用昂贵，本实验应用斑点杂交技术代替基因芯片进行小规模的表达谱检测，国内尚无报道。胃癌发生发展过程中保留了绝大多数早期的遗传学改变，由于无法直接应用斑点杂交检测筛查基因在异型增生大体标本中的表达水平，我们研究了这些基因在胃癌不同阶段的表达状况，筛选频繁表达异常的基因，从而反推法间接寻找重要的癌前病变相关基因。获得的 21 个差异片段中有 5 个片段在异型增生、早癌、进展期胃癌中皆有表达改变，3 个表达上调，2 个表达下调，其中 4 个为已知基因，1 个为 EST，可能是重要的胃癌发生相关基因，尚无这些基因在胃癌方面研究报道。已知基因中，cytochrome c oxidase subunit I（细胞色素 c 氧化酶亚单位 I）编码呼吸链蛋白，参与细胞能量代谢，其缺陷可引起肌肉、神经等退行性病变。Weber et al [28]应用差异显示方法发现该基因在低侵袭能力的上皮肉瘤细胞系中表达增强。P125 蛋白有磷脂酶活性，与 Cop II 包被成分 Sec23P 相互作用，参与将蛋白质从内质网运输到高尔基体^[29]。这两种基因表达上调,我们认为可能与细胞过度增生时需要提供大量营养能量有关.meprin A 编码上皮细胞分泌的金属蛋白酶，能够裂解细胞外基质蛋白^[30]。Lottaz et al [31]证明人结肠癌组织中 meprin A 表达增加，酶活性增强，呈现肿瘤特异性分布，与肿瘤转移有关。Acidic calponin 在平滑肌细胞和非平滑肌细胞中皆大量表达，功能未知，可能与细胞骨架运动有关，已证明 Basic calponin 是抑癌基因^[32,33]。meprin A 表达上调和 Acidic calponin 表达下调可促进癌细胞向远处扩散。

本室曾经应用 RDA 方法在胃肠上皮化生阶段筛选出 CFDP1 基因，表达下调，本实验又证明该基因在异型增生组织和进展期癌中表达显著降低，其正常生理功能尚无报道，进一步的分析和功能鉴定正在进行中，推测 CFDP1 基因在维持胃黏膜细胞功能形态方面起重要作用，这也提示了胃癌由肠化生到异型增生再到癌的发生发展顺序^[34]。本实验首次成功建立胃异型增生组织消减文库，并研究了这些基因在异型增生、早癌、进展期等胃癌不同阶段的表达，初步筛选癌前病变相关基因，作者将深入研究这些基因的功能及其在胃癌发生、发展过程中的作用机制。

4 参考文献

- Zheng ZH,Xun XJ,Qiu GR,Liu YH,Wang MX,Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition;early and advanced stage of gastric cancer.*Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- Cheng SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells.*Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134
- Wang B, Shi LC, Zhang WB, Xiao CM, Wu JF, Dong YM. Expression and significance of P16 gene in gastric cancer and its

- precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:39-42
- 4 Chen SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- 5 Yao XX, Yin L, Zhang JY, Bai WY, Li YM, Sun ZC. hTERT expression and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:508-512
- 6 Guo YQ, Zhu ZH, Li JF. Flow cytometric analysis of apoptosis and proliferation in gastric cancer and precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:983-987
- 7 Wang DX, Fang DC, Liu WW. Study on alteration of multiple genes in intestinal metaplasia, atypical hyperplasia and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:855-859
- 8 Zhou YN, Xu CP, Han B, Wang JS, Fang DC, Peng GY, Yang JM, Liu HF. E-cadherin expression correlates with clinicopathological features in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:1121-1124
- 9 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Yang SM, Wang RQ. Bax gene expression and its relationship with apoptosis in human gastric carcinoma and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:665-668
- 10 He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomerase expression, *Hp* infection and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:505-508
- 11 He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomere, cellular DNA content and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:509-512
- 12 Luo ZB, Luo YH, Lu R, Jin HY, Zhang PB, Xu CP. Immunohistochemical study on dendritic cells in gastric mucosa of patients with gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:400-402
- 13 Wang RQ, Fang DC, Liu WW. MUC2 gene expression in gastric cancer and preneoplastic lesion tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:285-288
- 14 Mi JQ, Zhang ZH, Shen MC. Significance of CD44v6 protein expression in gastric carcinoma and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:156-158
- 15 Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and c-myc protein in gastric carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:258-261
- 16 Han P, Liu Y, Cheng J, Wang G, Lu YY, Li K, Li L. The expression of oncogene c-myc upregulated by c-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:141-144
- 17 Zeng JX, Wang WL, Luo WJ, Wang ZL. Construction of differentially expressed cDNA library in apoptotic human hepatocellular carcinoma cells with suppression subtractive hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1233-1237
- 18 Li C, Liang Y, Wu M, Xu L, Cai W. Telomerase activity analysis of esophageal carcinoma using microdissection-TRAP assay. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1405-1408
- 19 Li C, Wu M, Liang Y, Xu L, Cai W. Analysis of telomerase activity in esophageal carcinoma using microdissection telomeric repeat amplification protocol assay. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:39-42
- 20 Bowler LD, Hubank M, Spratt BG. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 1999;145:3529-3537
- 21 Melia MJ, Bofill N, Hubank M, Meseguer A. Identification of androgen-regulated genes in mouse kidney by representational difference analysis and random arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Endocrinology* 1998;139:688-695
- 22 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6025-6030
- 23 Zhang JZ, Huang YW, Liu DM, Yang LT, Han RG, Wang JF, Yue MX. Tissue microarray technology and its preliminary application in large intestinal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:157-160
- 24 Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohshima H, Kohno Y, Posner M, Gallagher GT, Varvares M, Cohen D, Kim D, Kent R, Donoff RB, Todd R, Yung CM, Warrington JA, Wong DT. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001;20:6196-6204
- 25 Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Tsunoda T. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res* 2001;61:3544-3549
- 26 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1517-1523
- 27 Rho J, Altmann CR, Socci ND, Merkov L, Kim N, So H, Lee O, Takami M, Brivanlou AH, Choi Y. Gene expression profiling of osteoclast differentiation by combined suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray analysis. *DNA Cell Biol* 2002;21:541-549
- 28 Weber A, Engers R, Nockemann S, Gohr LL, Zur Hausen A, Gabbert HE. Differentially expressed genes in association with in vitro invasiveness of human epithelioid sarcoma. *Mol Pathol* 2001;54:324-330
- 29 Tani K, Mizoguchi T, Iwamatsu A, Hatsuzawa K, Tagaya M. p125 is a novel mammalian Sec23p-interacting protein with structural similarity to phospholipid-modifying proteins. *J Biol Chem* 1999;274:20505-20512
- 30 K]ohler D, Kruse M, St]ocker W, Sterchi EE. Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro. *FEBS Lett* 2000;465:2-7
- 31 Lottaz D, Maurer CA, Hahn D, Buchler MW, Sterchi EE. Nonpolarized secretion of human meprin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res* 1999;59:1127-1133
- 32 Sasaki Y, Yamamura H, Kawakami Y, Yamada T, Hiratsuka M, Kameyama M, Ohigashi H, Ishikawa O, Imaoka S, Ishiguro S, Takahashi K. Expression of smooth muscle calponin in tumor vessels of human hepatocellular carcinoma and its possible association with prognosis. *Cancer* 2002;94:1777-1786
- 33 Yamamura H, Yoshikawa H, Tatsuta M, Akedo H, Takahashi K. Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *Int J Cancer* 1998;79:245-250
- 34 van Dekken H, Alers JC, Riegman PH, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K. Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. *Am J Pathol* 2001;158:1961-1967

胃癌细胞nm23H1基因表达与体内外侵袭力的关系

孙秀菊,孙开来,付浩,王舒宝,陈峻青

孙秀菊,孙开来,付浩,中国医科大学分子遗传教研室 辽宁省沈阳市 110001
王舒宝,陈峻青,中国医科大学第一临床学院 肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
孙秀菊,女,1965-09-19生,辽宁省大连市人,汉族,1999年于中国医科大学获博士学位.现为副教授,主要从事胃癌分子机制的研究.
国家“973”项目(国家重点基础研究发展规划项目)“恶性肿瘤发生与发展的基础性研究”子项目课题, No.G1998051203
项目负责人:孙开来,110001,辽宁省沈阳市,沈阳中国医科大学分子遗传教研室. klsun@vip.sina.com
电话:024-23265842 传真:024-23265842
收稿日期:2002-06-01 接受日期:2002-07-26

Relationship between expression of nm23H1 gene and *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cells

Xiu -Ju Sun,Kai -Lai Sun,Hao Fu,Shu -Bao Wang,Jun- Qing Chen

Xiu -Ju Sun , Kai -Lai Sun, HaoFu,Department of Molecular Genetics, China Medical University ,Shenyang 110001,Liaoning Province ,China
Shu -Bao Wang, Jun- Qing Chen,Oncology Department,The first Clinical College, China Medical University ,Shenyang 110001,Liaoning Province ,China
Supported by the National “973” Project (National key program on basic research)No.G19980501203
Correspondence to: Kai -Lai Sun,Department of Molecular Genetics, China Medical University ,Shenyang 110001,Liaoning Province,China. klsun@vip.sina.com
Received:2002-06-01 Accepted:2002-07-26

Abstract

AIM:To explore the relationship between the expression of nm23H1 gene and the *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cells

METHODS:The invasive capacity of gastric cancer cell *in vitro* was determined by Boyden chamber method. And the expressions of nm23H1 in gene and protein level were measured by Northern Blot, RT-PCR and immunohistochemical method in gastric cancer cell lines, respectively.

RESULTS:The order of the invasive capacity of gastric cancer cell lines were: MKN45, being the highest (33.1 ± 5.23 , $P < 0.01$); BGC823 (15.8 ± 2.7) and MKN1 (14.1 ± 4.5), the moderate (there was no significant difference between them, $P > 0.05$), and GT3TKB (6.3 ± 2.5), the lowest ($P < 0.01$). The expression of nm23H1 gene was negatively correlated with the *in vivo* invasive capacity of gastric cancer cell lines, and also negatively correlated with the *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cell lines of MKN45, BGC823 and GT3TKB. But there was no relationship between the expression of nm23H1 gene and the invasive capacity of MKN1 *in vitro*.

CONCLUSION: The expression of nm23H1 gene is of great significance in evaluating the *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cell lines.

Sun XJ,Sun KL,Fu H,Wang SB,Chen JQ. Relationship between expression of nm23H1 gene and *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):10-13

摘要

目的:探讨 nm23H1 基因与胃癌细胞体内外侵袭力的关系.

方法:采用 Boyden 小室法测定四种胃癌细胞系 MKN1、MKN45、GT3TKB、BGC823 的体外侵袭力, Northern 印记杂交,RT-PCR 及免疫组化技术检测胃癌组织、四种胃癌细胞系的 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平.

结果:胃癌细胞体外侵袭力高低的顺序依次为MKN45最高 (33.1 ± 5.2 ,与其他三种细胞系相比 $P < 0.01$); BGC823 (15.8 ± 2.7), MKN1 (14.1 ± 4.5) 次之(二者无显著差异, $P > 0.05$), GT3TKB 最低(6.3 ± 2.5 ,与其他三种细胞系相比 $P < 0.01$).nm23H1 基因表达与胃癌细胞体内侵袭能力呈反比关系;nm23H1 基因表达与 MKN45 ,BGC823, GT3TKB 细胞体外侵袭力也呈反比关系, 但与 MKN1 细胞体外侵袭力无明显关系.

结论: nm23H1表达在评价胃癌细胞体内外侵袭力方面具有重要价值.

孙秀菊,孙开来,付浩,王舒宝,陈峻青.胃癌细胞 nm23H1 基因表达与体内外侵袭力的关系.世界华人消化杂志 2003;11(1):10-13
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/10.htm>

0 引言

肿瘤侵袭、转移是目前研究的一个热点问题^[1-6].由于胃癌严重威胁人类健康,近年来对胃癌侵袭、转移分子机制的研究日趋深入^[7-13],作为一种重要的肿瘤转移抑制基因,nm23 基因与胃癌关系的研究报道较多,但目前关于 nm23H1 基因与胃癌细胞体内外侵袭力关系的研究,国内外报道甚少.nm23H1 基因是 nm23 基因家族的重要成员,将该基因转染肝癌细胞可使其转移能力明显降低^[14,15].他影响细胞的运动、黏附等特性,调节肿瘤细胞侵袭转移能力.我们采用 Boyden 小室法测定不同胃癌细胞的体外侵袭力,分析 nm23H1 表达与胃癌细胞体内外侵袭力的关系,为认识胃癌侵袭转移的分子机制提供有价值的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学第一临床学院肿瘤科 1997-01/1998-04 胃癌手术切除标本,其中新鲜组织标本 24 例,术中取材,置液氮中速冻 10 min,然后 -70 °C 冰箱中保存,用于 mRNA 检测;石蜡标本(胃癌组织 62 例)连续 5 μ m 切片每例 3 张,分别进行 HE 染色及免疫组化

染色. 切除标本均进行病理学系统检查. 胃癌细胞系 MKN1, MKN45, GT3TKB 由日本理化研究所横山和尚教授惠赠, BGC823 细胞由中国医科大学肿瘤所提供; NIH3T3 细胞由中国医科大学细胞生物实验室提供. MKN45 及 BGC823 细胞均来源于低分化腺癌, GT3TKB 来自黏液细胞癌, MKN1 具有向腺瘤和鳞状上皮细胞双向分化的潜能. 微孔滤膜(8 μ m)、基底膜胶和 Boyden Chamber 均由中国医学科学院肿瘤所免疫室罗利群老师惠赠.

1.2 方法 MKN1, MKN45, BGC823 细胞培养基为 RPMI1640, GT3TKB 及 NIH3T3 细胞培养基为 DMEM, 二者均含青链霉素及 100 ml/L 小牛血清, 37 $^{\circ}$ C 恒温密闭式 CO₂ 培养箱培养. 侵袭实验参照 Albin et al (Cancer Res, 1987; 47:3239) 方法, 计数侵入滤膜的细胞数. 共计数中央和四周各 5 个视野, 每种细胞重复三次实验, 取平均值 ($n=30$). 将生长旺盛的胃癌细胞用胰酶消化, 制成密度为 1×10^8 /L 的悬液, 接种于直径 10 cm 培养皿中, 皿内预置盖玻片, 常规培养 72 h, 吸去培养液, $1 \times$ PBS 清洗细胞, 加 40 g/L 甲醛固定, 待免疫组化染色.

1.2.1 Northern- 印记杂交 根据 GenBank nm23H1 基因序列, 在 nm23H1 基因 3' 非翻译区 (与 nm23H2 非同源区) 设计引物, 采用 PCR 方法合成探针. 引物序列为 F: 5' G C A G A C C A C A T T G C T T T T C A 3'; R: 5' C A G G G A G A A C T C A C A G C T C C 3'; 片段长度为 134 bp. 采用 GIBCOBRL 公司总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 提取总 RNA, 在含有甲醛的琼脂糖凝胶上进行 RNA 电泳, 而后将 RNA 转移到尼龙膜上. 采用 Promega 公司随机引物试剂盒进行探针标记. 杂交条件参照《分子克隆》. 采用 Luzex-F 半自动图像分析仪定量分析杂交信号强度, nm23H1 灰度值指数 = nm23H1 灰度值: β -actin 灰度值, nm23H1 mRNA 含量与其灰度值指数呈反比关系.

1.2.2 RT-PCR 方法 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA (按试剂盒说明书进行), 然后进行 PCR 扩增. PCR 反应体积为 25 μ L. nm23H1 引物序列: F: 5' G T G A A A G C A A T G T G G T 3' R: 5' T T G C C A T G G T C T G G G A G 3' 产物长度 267 bp. β -actin 引物序列: F: 5' G T G G G G C G C C C C A G G C A C C A 3' R: 5' C T C C T T A A T G T C A C G C A C G A T T T C 3' 产物长度 513 bp. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 以 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 40 s 的顺序循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 1 h, 凝胶置 GDS 8 000 凝胶自动成像仪中, 采用 Gels Work-ID 软件检测各条带强度, nm23H1 指数 = nm23H1 值 / β -actin 值. nm23H1 指数与其 mRNA 表达呈正比关系.

1.2.3 免疫组化染色法 鼠抗人 nm23H1 单克隆抗体 NM301 (Santa cruz 产品). 过氧化酶标记的链霉卵白素 (streptavidin peroxidase, SP) 免疫组化染色试剂盒 (北京

中山生物技术公司产品). nm23H1 蛋白采用 SP 法染色 (AEC 显色), 染色步骤按试剂盒说明书进行, 以 PBS 代替一抗作阴性对照. 免疫组化结果判定: 细胞内出现桔红色颗粒为 nm23H1 阳性细胞. 组织标本中 nm23H1 蛋白表达参照 Shimizu et al (Hum Pathol, 1990; 21:607) 方法进行评定和积分, 2 分及 2 分以下为阴性, 3 分及 3 分以上为阳性. 胃癌细胞 nm23H1 蛋白表达水平采用 Luzex-F 半自动图像分析仪定量分析, 每种细胞取 2 张切片, 每张切片各测 5 个相同单位面积的灰度值, nm23H1 蛋白含量与其灰度值呈反比关系.

统计学处理 采用 t 检验、 χ^2 检验. $P < 0.05$ 具有统计学意义.

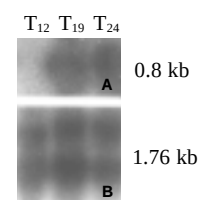
2 结果

2.1 nm23H1 基因表达与胃癌浸润深度的关系 RT-PCR 及免疫组织化学分析结果显示, 浸透浆膜的胃癌组织中 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平显著低于未透浆膜者, 表明 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平与胃癌浸润深度有关 (表 1). 为进一步验证 RT-PCR 研究结果, 我们又采用 Northern- 印记杂交检测了 8 例胃癌中 nm23H1 mRNA 表达水平, 结果表明, 浸透浆膜的胃癌中 nm23H1 mRNA 杂交信号灰度值指数 (1.74 ± 0.22) 显著高于未透浆膜者 (0.84 ± 0.19 , $P < 0.05$), 与 RT-PCR 结果一致 (图 1).

表 1 nm23H1 mRNA 及蛋白表达与胃癌浸润深度的关系

浸润深度	n	nm23H1 mRNA 指数 ($\bar{x} \pm s$)	n	n	nm23H1 蛋白 阳性率 (%)
未透浆膜	7	0.49 ± 0.16^a	28	21	75.0 ^b
浸透浆膜	17	0.27 ± 0.23	34	7	20.6

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 浸透浆膜.



a: nm23H1 mRNA; b: β -actin mRNA

T1: 浸透浆膜; T2, T3: 未浸透浆膜

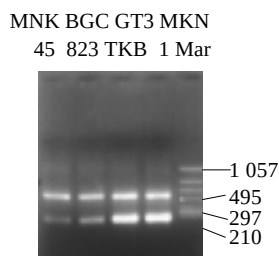
图 1 Northern- 印记杂交检测胃癌组织中 nm23H1 mRNA 表达.

2.2 胃癌细胞系体外侵袭力的测定 体外侵袭力以侵入滤膜的细胞数来判定, 在所检测的四种胃癌细胞系中, MKN45 侵袭力最高, MKN1 和 BGC823 的侵袭力 (侵入滤膜细胞数) 均低于 MKN45 (MKN1 14.1 ± 4.5 vs MKN45 33.1 ± 5.2 ; BGC823 15.8 ± 2.7 vs MKN 33.1 ± 5.2 , $P < 0.01$), 但 MKN1 和 BGC823 的侵袭力无显著差异 ($P > 0.05$), GT3TKB (6.3 ± 2.5) 侵袭力又低于 MKN1 和 BGC823 ($P < 0.01$), 其侵袭力最低.

2.3 nm23H1 mRNA 和蛋白表达与胃癌细胞体外侵袭力的关系 四种胃癌细胞系 nm23H1mRNA 及蛋白质水平检测的结果一致表明, MKN45 显著低于 BGC823 ($P < 0.02$), BGC823 又低于 GT3TKB ($P < 0.005$), 而 MKN1 与 GT3TKB 的 nm23H1 mRNA 及蛋白质表达无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2 及图 2-4); 侵袭力高低的顺序为: MKN45 最高, BGC823、MKN1 次之, GT3TKB 最低。可见 MKN45、BGC823、GT3TKB nm23H1 基因表达与其体外侵袭力呈反比关系, 但相比之下 MKN1 nm23H1 基因表达与其体外侵袭力无明显关系。

表 2 胃癌细胞 nm23H1 mRNA ($n=5$) 及蛋白表达 ($\bar{X} \pm s, n=10$)

细胞系	nm23H1 指数	nm23H1 灰度值
MKN45	0.28 ± 0.05	143.9 ± 3.5
BGC823	0.49 ± 0.07	104.4 ± 1.2
GT3TKB	1.06 ± 0.10	91.8 ± 3.3
MKN1	1.16 ± 0.15	91.4 ± 3.1



nm23H1 :267bp; 内对照 β -actin:513 bp M: DNA Marker
图 2 胃癌细胞 nm23H1mRNA RT-PCR 检测结果。

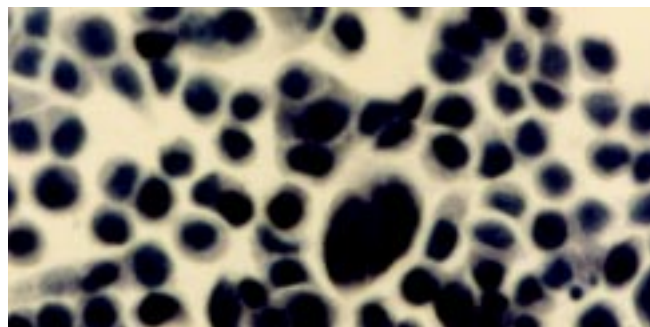


图 3 胃癌细胞 MKN45 nm23H1 蛋白表达 (S-P $\times 400$)

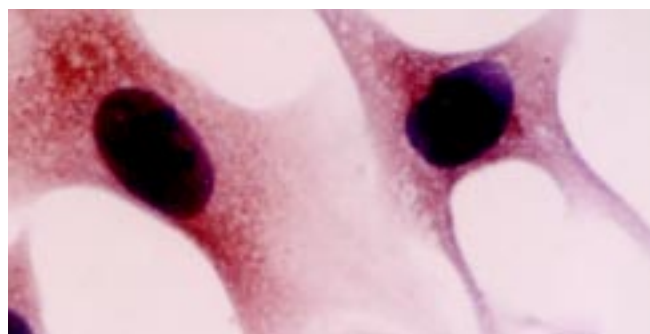


图 4 胃癌细胞 GT3TKB nm23H1 蛋白表达 (S-P $\times 400$)

3 讨论

作为一种转移抑制基因, nm23 倍受关注. 许多研究表明, nm23 基因表达水平与乳腺癌、结肠直肠癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、喉鳞状细胞癌、鼻咽癌、甲状腺癌等肿瘤侵袭转移呈显著负相关^[16-24], 且 nm23 基因低表达患者的生存期短、预后不良. nm23 基因与胃癌的研究报道不一, 有的研究表明胃癌中 nm23 低表达与胃癌肝转移、淋巴结转移及胃癌的浸润深度呈负相关^[25,26]; 另一些学者报道认为胃癌组织 nm23 基因表达与胃癌侵袭、淋巴结转移及血行转移呈正相关^[27-31]. Lee et al^[32,33] 报道胃癌组织 nm23 基因表达与胃癌预后无明显关系, 可见 nm23 与胃癌关系的研究结果不一. 产生这些差异的一个重要原因, 就是其检测方法不能有效区分 nm23H1 与 nm23H2. 有的研究采用 nm23 多克隆抗体, 他与 nm23H1、nm23H2 蛋白均可结合, 有的研究则采用 nm23H1 单克隆抗体, 只与 nm23H1 反应, 因此他们检测的分子有所不同; 由于 nm23H1、nm23H2 mRNA 具有很高的同源性, 因此如应用 nm23H1 全长 cDNA 探针进行 Northern blot 检测 mRNA 表达, 则很难特异检测 nm23H1 mRNA 表达水平. 因此有必要采用针对 nm23H1、nm23H2 特异的抗体或探针分别研究他们的表达与胃癌的关系, 将会对 nm23 基因与胃癌的关系有更准确的认识. 我们采用 nm23H1 特异的方法, 系统的研究 nm23H1 表达与胃癌细胞体内外侵袭力的关系, 而这方面的研究目前尚未见报道。

本研究中 Northern blot 所用探针位于 nm23H1 的 3' 非翻译区内, 此序列与 nm23H2 同源性很低, 可与 nm23H1 特异性结合; RT-PCR 引物亦可特异扩增 nm23H1, 免疫组化采用的抗体为 nm23H1 特异性单克隆抗体, 与 nm23H2 无交叉反应, 可特异性检测 nm23H1 基因的表达. 我们同时从 mRNA 和蛋白质二个水平检测胃癌有关组织标本 nm23H1 的表达, 结合临床资料进行分析表明, 胃癌 nm23H1 mRNA 及蛋白水平与胃癌浸润深度呈负相关。

肿瘤细胞侵袭基底膜是发生转移的关键步骤, 测定肿瘤细胞侵袭人工基底膜的能力, 可以间接反映肿瘤细胞体内侵袭转移能力, 具有重要意义. 在了解 nm23H1 表达与胃癌细胞体内侵袭力关系的基础上, 采用 Boyden 小室法测定了四种胃癌细胞系的体外侵袭力, 并观察了 nm23H1 表达与胃癌细胞体外侵袭力的关系. 本研究采用 RT-PCR 及免疫组化技术分别检测了四种胃癌细胞系 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平, 结果表明 MKN45、BGC823、GT3TKB nm23H1 基因表达与体外侵袭力呈明显负相关. 可见 nm23H1 基因可抑制胃癌细胞体内外侵袭能力. 关于 nm23H1 基因抑制肿瘤细胞侵袭转移的机制, 已为其他学者证实. 将 nm23H1 基因转染口腔鳞状细胞癌细胞系后, 细胞运动能力显著降低, 但转染前后其基质金属蛋白水解酶水平无明显

差异;甲基化抑制剂抑制 nm23H1 基因启动子 CpG 岛甲基化,使乳腺癌细胞中 nm23H1 表达增高,细胞运动能力显著降低,可见 nm23H1 通过抑制细胞运动能力而降低其侵袭转移能力^[34,35]。近期对 nm23 基因的研究不断深入,研究表明 nm23H1 负向调控转移相关基因 Tiam1,抑制体内 Rac1 的激活而发挥抑制侵袭转移的作用^[36];EB 病毒核蛋白 EBNA-3C 逆转 nm23H1 蛋白抑制淋巴瘤细胞和乳腺癌细胞运动的能力^[37];雌激素与其受体相互作用后可激活 nm23H1 基因转录而抑制肿瘤转移^[38]。可见 nm23H1 基因与其他基因之间相互作用而发挥其抑制转移的功能。

本实验还发现胃癌细胞 MKN1 中 nm23H1 基因表达与其体外侵袭力不呈明显相关。分析原因我们认为与其细胞本身的生物学特性有关,因为他具有向腺瘤和鳞状上皮细胞双向分化的潜能,因而其侵袭转移的调控机制更为复杂。另外肿瘤细胞侵袭转移本身受到多种基因的调控,如与其他转移相关基因结合分析,将会更客观地评价肿瘤细胞的侵袭转移能力。总之,我们的研究证明 nm23H1 基因表达在评价胃癌细胞体内外侵袭力方面具有重要价值。

4 参考文献

- 郑建勇,李开宗,窦科峰,李江. 肝细胞癌 p53 及 nm23H1 mRNA 表达的意义. 世界华人消化杂志 1999;7:40-42
- Xiong B, Yuan HY, Hu MB, Zhang F, Wei ZZ, Gong LL, Yang GL. Transforming growth factor- α 1 in invasion and metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:674-678
- Xie Q, Liu KD, Hu MY, Zhou K. SF/HGF-c-Met autocrine and paracrine promote metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:816-820
- Hou L, Li Y, Jia YH, Wang B, Xin Y, Ling MY, Lü S. Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:532-536
- Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
- Jiang YF, Yang ZH, Hu JQ. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol* 2000;6:61-65
- 夏传生,赵行远,吴建平,刘运芳,毛永荣. nm23-H1 基因与 P53 蛋白在结肠肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):22
- 于吉人,郑树森,沈岩,沈倩云. 胃癌淋巴结微转移的临床意义. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):2
- 辛彦,赵凤凯,张素敏,吴东瑛,王艳萍,徐蕾. CD44v6 基因编码蛋白表达与胃癌转移和预后的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:210-214
- Xu L, Zhang SM, Wang YP, Zhao FK, Wu DY, Xin Y. Relationship between DNA ploidy, expression of ki-67 antigen and gastric cancer metastasis. *World J Gastroenterol* 1999;5:10-11
- 张林,付红梅,金树珍,黄周,周成刚. P53 过度表达及细胞外基质与胃癌分化、浸润和转移的关系. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):74
- 夏加增,朱正纲,刘炳亚,燕敏,尹浩然. 免疫组化检测胃癌淋巴结微转移的意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1113-1116
- 王承党,陈玉丽,吴婷,刘豫瑞. 胃癌组织中生长抑素 II 型受体基因低表达与淋巴结转移. 世界华人消化杂志 1999;7:864-866
- Liu F, Zhang Y, Zhang XY, Chen HL. Transfection of the nm23-H1 gene into human hepatocarcinoma cell line inhibits the expression of sialyl Lewis X, α 1,3 fucosyltransferase VII, and metastatic potential. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:189-196
- Jin S, Pan X, Wang Y. Effect of nm23H1 on proliferation, tumor formation and metastasis of hepatocarcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:381-384
- Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Prognostic significance of CD44v6 and nm23 protein immunorexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol* 2002;53:17-24
- Liu H, Mao H, Fu X. Expression of nm23 in breast cancer: correlation with distant metastasis and prognosis. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:224-227
- Huang G, Song Y, He G. mRNA expression and mutation of MTA1 and nm23H1 genes in ovarian carcinoma in relation to lymph node metastasis. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:31-34
- Terasaki-Fukuzawa Y, Kijima H, Suto A, Takeshita T, Iezumi K, Sato S, Yoshida H, Sato T, Shimbori M, Shiina Y. Decreased nm23 expression, but not Ki-67 labeling index, is significantly correlated with lymph node metastasis of breast invasive ductal carcinoma. *Int J Mol Med* 2002;9:25-29
- Huang GW, Mo WN, Kuang GQ, Nong HT, Wei MY, Sunagawa M, Kosugi T. Expression of p16, nm23-H1, E-cadherin, and CD44 gene products and their significance in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2001;111:1465-1471
- Guo C, Wei L, Fu Q. The expression of nm23-H1 genes with clinical prognosis in endometrial carcinoma. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 1999;34:423-425
- Ohta Y, Nozaki Z, Nozawa H, Kamesui T, Tsunetsuka Y, Oda M, Watanabe G. The predictive value of vascular endothelial growth factor and nm23 for the diagnosis of occult metastasis in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:361-366
- Dome B, Somlai B, Timar J. The loss of NM23 protein in malignant melanoma predicts lymphatic spread without affecting survival. *Anticancer Res* 2000;20:3971-3974
- Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Tallada N, Galofre P, Gemar E, Mesa J, Simo R. nm23-H1 immunoreactivity as a prognostic factor in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3975-3980
- Hsu NY, Chow KC, Chen WJ, Lin CC, Chou FF, Chen CL. Expression of nm23 in the primary tumor and the metastatic regional lymph nodes of patients with gastric cardiac cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1752-1757
- 倪灿荣. 胃癌 GST- π , P-gp, Top II 和 nm23H1 表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:897-901
- Kumar Dhar D, Kubota H, Tabara H, Kotoh T, Monden N, Igarashi M, Kohno H, Nagase N. nm23 in the primary and metastatic sites of gastric carcinoma. Relation to AFP-producing carcinoma. *Oncology* 1999;56:122-128
- Nesi G, Palli D, Pernice LM, Saieva C, Paglierani M, Kroning KC, Catarzi S, Rubio CA, Amorosi A. Expression of nm23 gene in gastric cancer is associated with a poor 5-year survival. *Anticancer Res* 2001;21:3643-3649
- Wang CS, Lin KH, Hsu YC. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* 2002;175:121-127
- Iizuka N, Tangoku A, Hazama S, Yoshino S, Mori N, Oka M. Nm23-H1 gene as a molecular switch between the free-floating and adherent states of gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2001;174:65-71
- Wang XL, Wu GX, Zhang MD, Guo M, Zhang H, Sun XF. A favorable impact of preoperative FPLC chemotherapy on patients with gastric cardia cancer. *Oncol Rep* 2000;7:241-244
- Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- Yoo CH, Noh SH, Kim H, Lee HY, Min JS. Prognostic significance of CD44 and nm23 expression in patients with stage II and stage IIIA gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 1999;71:22-28
- Khan MH, Yasuda M, Higashino F, Haque S, Kohgo T, Nakamura M, Shindoh M. nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression. *Am J Pathol* 2001;158:1785-1791
- Hartsough MT, Clare SE, Mair M, Elkahloun AG, Sgroi D, Osborne CK, Clark G, Steeg PS. Elevation of breast carcinoma Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition. *Cancer Res* 2001;61:2320-2327
- Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S. Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:4385-4390
- Subramanian C, Cotter MA 2nd, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:350-355
- Lin KH, Wang WJ, Wu YH, Cheng SY. Activation of antimetastatic Nm23-H1 gene expression by estrogen and its alpha-receptor. *Endocrinology* 2002;143:467-475

利用细菌内重组腺病毒系统构建胃癌MG7-Ag模拟表位疫苗

林涛, 丁杰, 孟繁平, 韩全利, 喻召才, 郭长存, 刘志国, 樊代明

林涛, 丁杰, 孟繁平, 韩全利, 喻召才, 郭长存, 刘志国, 樊代明, 中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化疾病研究所 陕西省西安市 710032
林涛, 男, 1971-11-17生, 吉林省白城市人, 汉族. 1995年山东医科大学本科毕业, 现为第四军医大学西京医院消化病研究所硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫研究.

国家自然科学基金资助, No.398707424

项目负责人: 丁杰, 710032, 陕西省西安市长乐西路15号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化内科. taolt1@fmmu.edu.cn

电话: 029-3375230

收稿日期: 2002-07-23 接受日期: 2002-07-31

Construction and identification of recombinant adenovirus vaccines of gastric cancer MG7-Ag mimotope

Tao Lin, Jie Ding, Fan-Ping Meng, Quan-Li Han, Zhao-Cai Yu, Chang-Cun Guo, Zhi-Guo Liu, Dai-Ming Fan

Tao Lin, Jie Ding, Fan-Ping Meng, Quan-Li Han, Zhao-Cai Yu, Chang-Cun Guo, Zhi-Guo Liu, Dai-Ming Fan, Chinese PLA Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jie Ding, Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. taolt1@fmmu.edu.cn

Received: 2002-07-23 Accepted: 2002-07-31

Abstract

AIM: To develop a cancer vaccine based on MG7-Ag of gastric cancer using recombinant adenovirus as vector.

METHODS: PCR was performed to get fusion gene of the MG7-Ag mimotope and HbcAg. The fusion gene was then subcloned into the pAdTrack-CMV shuttle vector. The resultant plasmid (pAdTrack-CMV-MG7) was cotransduced into *E. coli*. BJ5183 cells with pAdEasy-1 plasmid to undergo homologous recombination. The linearized recombinant plasmid (pAd-MG7) was transfected into 293 cells. The recombinant adenovirus was detected by examining the expression of the green fluorescence protein tag in the 293 cells.

RESULTS: By sequencing, it was confirmed that the PCR product was a fusion gene of MG7-Ag mimotope gene and HbcAg. Restriction endonuclease analysis confirmed the successful cloning of the fusion gene into the pAdTrack-CMV. The recombinants (pAd-MG7) were selected for kanamycin resistance, and recombination was confirmed by restriction endonuclease analysis. Presence of the recombinant adenovirus was confirmed by GFP expression.

CONCLUSION: The Recombinant adenovirus vaccine of the MG7-Ag mimotope was constructed successfully, which is helpful to the further investigation of its potentiality in the immunotherapy of gastric cancer.

Lin T, Ding J, Meng FP, Han QL, Yu ZC, Guo CC, Liu ZG, Fan DM. Construction and identification of recombinant adenovirus vaccines of gastric cancer MG7-Ag mimotope. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):14-17

摘要

目的: 以复制缺陷的腺病毒为疫苗载体, 构建基于胃癌MG7-Ag模拟表位的重组腺病毒疫苗.

方法: 将编码MG7-Ag模拟表位的互补序列设计到上游引物的5'端, 以含有HBcAg全序列的质粒p1.2 II为模板, 通过PCR扩增, 获得MG7-Ag模拟表位与HBcAg的融合基因. 经序列测定证实后, 亚克隆至pAdTrack-CMV穿梭质粒, 再与pAdEasy-1质粒在大肠杆菌BJ5183中进行同源重组. 经抗性筛选及酶切鉴定的重组质粒, 再用导入293细胞进行包装, 利用Adeasy系统上的绿色荧光蛋白标签鉴定病毒表达.

结果: 序列测定证实, PCR产物为胃癌MG7-Ag模拟表位与HBcAg的融合基因片段; 酶切鉴定表明胃癌MG7-Ag模拟表位与HBcAg的融合基因片段插入了pAdTrack-CMV穿梭质粒, 卡那霉素进行抗性筛选及Pac I酶切鉴定证实腺病毒重组质粒构建成功. Pac I酶切线性化的重组质粒导入293细胞3 d后见明显的绿色荧光蛋白表达. 回收病毒, 可重复感染293细胞, 证实有感染能力的病毒颗粒包装成功.

结论: 胃癌MG7-Ag模拟表位的重组腺病毒载体的构建成功, 为进一步研究胃癌MG7-Ag模拟表位诱发抗胃癌免疫打下了基础.

林涛, 丁杰, 孟繁平, 韩全利, 喻召才, 郭长存, 刘志国, 樊代明. 利用细菌内重组腺病毒系统构建胃癌MG7-Ag模拟表位疫苗. *世界华人消化杂志* 2003;11(1):14-17
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/14.htm>

0 引言

肿瘤疫苗是肿瘤基因治疗^[1-10]的一个活跃领域, 目前用于胃癌免疫治疗的有效疫苗较少^[11-13]. 胃癌MG7-Ag是我研究所发现的胃癌特异性标志物^[11-15], 在胃癌组织中表达较高特异性好, 为胃癌疫苗的构建提供了良好的候选靶位^[11-13]. 但从胃癌组织中提取和纯化MG7-Ag难度很大. 最近, 韩全利 et al^[14]利用噬菌体显示文库技术成功筛选得到了胃癌MG7-Ag的模拟表位多肽, 体外实验证实该模拟表位多肽能够较好地模拟原始抗原, 因此是构建胃癌疫苗的理想候选分子. 复制缺陷的重组腺病毒是一种高效的基因转运工具^[16-26], 且因其自身免疫原性强, 能引起较强的细胞和体液免疫反应^[22-26], 其自身可起到佐剂的作用. 本研究利用AdEasy腺病毒细菌内同源重组系统^[21]构建了MG7-Ag

模拟表位与 HBcAg 的融合基因的复制缺陷的重组腺病毒疫苗。

1 材料和方法

1.1 材料 腺病毒细菌内同源重组系统包括 E.coli BJ5183, 穿梭质粒 pTrack-CMV, 及腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1, 由美国 John Hopkins University and the Howard Hughes Medical Institute 的 Bert Vogelstein 博士惠赠。Hind III、Not I、T4 连接酶、胰蛋白胨及酵母提取物购自宝泰克公司。Pme I、Pac I 为 New England Biolabs 公司产品。GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (100-3 000 bp), GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100-10 000 bp) 均为 MBI Fermentas 公司产品, 购自上海生工公司。西班牙产电泳用琼脂糖、Lambda DNA/HindIII Marker 购自华美公司。质粒小量提取试剂盒和小量胶回收试剂盒, 购自上海华舜公司。E.coli DH5 α 及模板质粒 p1.2 II 为本所保存。

1.2 方法

1.2.1 表位基因与载体基因片段 PCR 连接 (1)引物设计: 上游引物 P_{1.1} 的序列为: 5' -TGCCATGGGAAAACCG CACGTTCACTAAAGGTGGTGGTCTCTGGGTGGCTTTGGG GC-3', 含 ATG 及编码 MG7-Ag 模拟表位的序列; 下游引物 P_{1.2} 的序列为: 5' -CCAAGCTTCTAACATT GAGATTCCCG-3' 均由上海博亚公司合成。(2)以质粒 p1.2 II (1 888-2 450 bp) 为模板进行 PCR: 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min。2 个循环后, 再 94 °C 变性 1 min, 65 °C 退火、延伸 3 min, 共 28 个循环, 最后于 72 °C 延伸 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。经鉴定条带的位置正确后, 切下条带, 参照柱式小量胶回收试剂盒操作说明, 进行回收、纯化。

1.2.2 PCR 产物的克隆及测序 将回收并纯化的 PCR 产物, 与载体 pUCm-T 按浓度比 3:1, 用 T4 连接酶连接。以连接产物转化 0.1 mol/l CaCl₂ 制备的 E.coli DH5 α 感受态细菌, 涂布于含氨苄青霉素 (100 mg/L) 并预先涂布了 X-gal 40 μ L (20 g/L) 和 IPTG 4 μ L (200 g/L) 的 90 mm 固体 LB 培养基上, 以蓝白筛选法筛选阳性克隆。随机挑取 4 个白色菌落, 用柱式小量质粒提取试剂盒提取质粒。经 Not I 和 Hind III 双酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察有无 600 bp 左右的条带。将经鉴定的重组阳性克隆, 用 M13/pUC 反向引物, 以 Sanger 双脱氧链终止法, 进行反向序列测定。命名为 pUC-MG7。

1.2.3 MG7-Ag 模拟表位/HbcAg 融合基因亚克隆到 pAdTrack-CMV 穿梭质粒 PCR 产物的亚克隆: 提取测序正确克隆的质粒, 经 Not I 和 Hind III 双酶切及琼脂糖凝胶电泳后, 回收约 600 bp 左右大小的电泳条带。pAdTrack-CMV 穿梭质粒用相同内切酶双酶切, 电泳回收约 9 200 bp 片段。两次回收大、小片段分子浓度比按 1:3, 用 T4 连接酶 16 °C 连接 16 h, 转化 0.1 mol/l CaCl₂

制备的 E.coli DH5 α 感受态细菌, 涂于含卡那霉素 (50 mg/l) 的固体 LB 培养基 37 °C 培养过夜。随机挑取 4 个菌落, 提取质粒, Hind III, Not I 双酶切鉴定阳性克隆的重组质粒。命名为 pAdTrack-CMV-MG7。

1.2.4 细菌内同源重组产生包含 MG7-Ag 模拟表位/HbcAg 融合基因的重组腺病毒质粒 用 10% 的冰浴冷的无菌甘油制备 E.coli BJ5 183 及 E.coli DH5 α 电穿孔感受态菌。提取重组质粒 pAdTrack-CMV-MG7 用 Pme I 酶切线性化, 电泳回收约 9 800 bp 片段。与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 等浓度比混合, 在 2 500 V, 200 Ω , 25 μ F 条件下, 电穿孔共转化 20 μ l BJ5 183 感受态菌, 卡那霉素 (50 mg/l) 固体 LB 培养基筛选, 16 h 后随机挑取 4 个克隆, 提质粒。挑选电泳鉴定大小与 pAdEasy-1 相似的质粒, 将其电穿孔转化 E.coli DH5 α 菌, 提取质粒, 用 Pac I 酶切鉴定阳性克隆的重组腺病毒质粒。命名为 pAd-MG7。

1.2.5 293 细胞中产生重组腺病毒 转染前 24 h, 在 25 cm² 塑料培养瓶中接种 2×10^6 的 HEK293 细胞。转染当天, 将 4 μ g pAd-MG7 质粒用 Pac I 酶切线性化, 用 20 μ l Lipofectamine 2 000 按说明转染 293 细胞, 2 d 后用荧光显微镜观测绿色荧光蛋白的表达, 7-10 d 后收集细胞。反复冻融 3-4 次, 取 1/3 病毒提取上清再感染 293 细胞扩增, 3-4 d 后收集细胞, PBS 重悬, 反复冻融, 最后离心, 取上清收集病毒, 保存于 -80 °C。

2 结果

2.1 表位基因与载体基因片段的 PCR 连接 以质粒 p1.2 II (1 888-2 450 bp) 的序列为模板, 将 MG7-Ag 模拟表位基因和编码 HBcAg 的基因设计于引物中, 用 PCR 方法将表位基因与该段载体基因连接在一起。扩增产物为 600 bp 左右的片段, 与预计的结果相符 (图 1)。

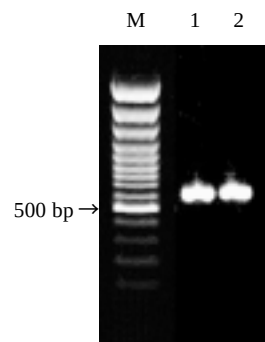


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
M: DNA marker (100-3 000 bp); 1-2: the PCR product.

2.2 PCR 产物的克隆与测序 将纯化的 PCR 产物克隆于载体 pUCm-T 中, 转化 E.coli DH5 α 感受态细菌。通过蓝白筛选, 随机挑取 4 个白色菌落提取质粒, 用 Nco I 和 Hind III 双酶切后, 均切出 600 bp 左右的片段。再用 M13 反向引物, 将 4 号克隆以 Sanger 双脱氧链终止

法进行反向测序.结果表明,PCR产物为目的基因和载体基因的融合片段,两端分别含有 Nco I 和 Hind III 的酶切位点.

2.3 MG7 - Ag 模拟表位 /HbcAg 融合基因亚克隆到 pAdTrack - CMV 穿梭质粒 提取含有 MG7 - Ag 模拟表位/HbcAg 融合基因的阳性克隆的重组质粒,用 Not I 和 Hind III 双酶切后回收600 bp左右的片段.将其与用相同酶切回收的 pAdTrack - CMV 穿梭质粒大片段连接,转入宿主菌 E.coli DH5 α , 用 Not I 和 Hind III 双酶切阳性克隆中的重组质粒,可切出 600 bp 大小的片段,与 pUCm - MG7 双酶切释放的目的片段大小相符,而无目的片段的 pAdTrack - CMV 相同双酶切,无片段释放(图 2).

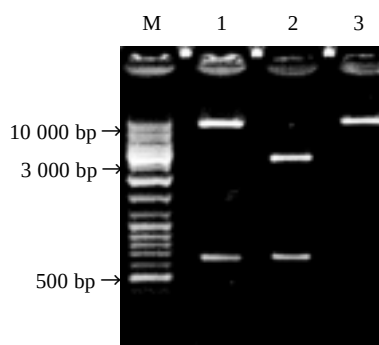


图2 pAdTrack - CMV - MG7 用 Not I 和 Hind III 双酶切鉴定结果
M: DNA marker(100-10 000 bp); 1 pAdTrack - CMV - MG7. 2. pUC - MG73 pAdTrack - CMV

2.4 细菌内同源重组产生包含 MG7 - Ag 模拟表位/HbcAg 融合基因的重组腺病毒质粒 将重组质粒 pAdTrack - CMV - MG7 用 Pme I 酶切线性化,与等浓度的腺病毒骨架粒 pAdEasy - 1 电穿孔共转化 20 μ l BJ5183 感受态菌,进行同源重组.将阳性克隆转化电穿孔转化 E.coli DH5 α 菌,提取阳性克隆质粒,用 Pac I 酶切鉴定能释放约 4.5 kb 大小片段,而 pAdEasy - 1 用相同的酶切未释放片段,从而证明为重组的腺病毒质粒(如图 3).

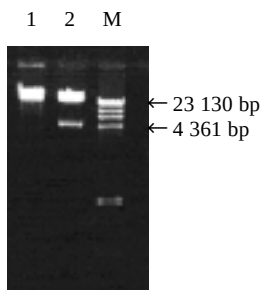


图3 重组的腺病毒质粒用 Pac I 酶切鉴定结果
M: Lambda DNA HindIII Marker 1. pAdEasy - 1 2. pAd - MG7

2.5 在 293 细胞中包装出重组腺病毒 把重组的腺病毒质粒 pAd - MG7, 用 Pac I 酶切线性化转染 293 细胞, 2 d 后即可通过荧光显微镜观察到 GFP 表达.(如图 4)取 1/3 病毒提取上清可再感染 293 细胞扩增.说明有感染能力的病毒颗粒包装成功.

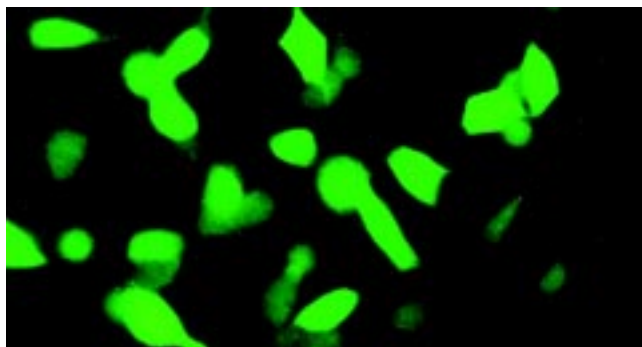


图4 荧光显微镜观察重组的腺病毒在 293 细胞中表达的绿色荧光蛋白.

3 讨论

随着分子免疫学的发展,免疫治疗在肿瘤治疗中的作用日益突出.而寻找肿瘤特异性或相关抗原成为关键的一环.我研究所利用低分化胃癌细胞株成功的制备了抗胃癌的单克隆抗体 MG 系列,其中 MG7 的特异性最强,在胃癌组织中高表达^[11-15].实验证实, MG7 抗原与已知的胃癌抗原不同,推测是一种新的胃癌相关抗原,其抗原决定簇表达在糖链上^[11-14].所以从肿瘤组织中提取、纯化的 MG7 - Ag 十分困难.本研究所利用抗 MG7 - Ag mAb 筛选噬菌体随机肽文库,得到了 MG7 - Ag 的模拟表位基因,其结合抑制试验效果肯定^[14].

腺病毒因其具有安全性较好,感染能力强,可感染各细胞周期的细胞;蛋白表达量高;不整合到宿主的染色体中,没有插入性突变;成为基因转染和治疗常用的载体^[16-21],又因其具有较强的免疫原性,能激发机体的体液及细胞免疫,因而是疫苗的常用载体^[22-26].

本研究中选用的腺病毒表达系统是由构建的一种新型的重组腺病毒系统^[21].他利用 E.coli BJ5 183 内高效的同源重组系统,进行腺病毒的同源重组,提高了病毒的重组效率,缩短了病毒包装所需的时间;在腺病毒包装前就可检验目的片段是否装入重组的腺病毒质粒中;并带有绿色荧光蛋白标记,可直接观测转染的效率和病毒感染的情况;是高效便捷的腺病毒重组系统,在基因治疗中有很好的前景.

病毒样颗粒能在表面合适的位置规则的排列所需的肽,使其成为理想的免疫分子载体.而无传染性的 HbcAg 为最佳选择^[27],其由 183 个氨基酸组成,能形成 20 面体微粒,在外源性的蛋白插入时,仍可形成对称性颗粒.使插入的外源性抗原具有较好的免疫活性,能明显刺激 B 细胞及 T 细胞产生免疫反应,是一种很有潜力的疫苗载体^[27-30].

本研究成功构建含有 MG7 - Ag 模拟表位基因的胃癌重组腺病毒疫苗,希望能够利用腺病毒的高效表达系统及 HbcAg 和腺病毒刺激免疫的作用,使其能产生强而持久的免疫.为进一步研究 MG7 - Ag 模拟表位在诱发抗胃癌免疫中的作用,打下基础.

4 参考文献

- 1 Zhang SN, Yuan SZ. Gene therapy for pancreatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:269-270
- 2 Meng ZH, He ZP. Current situation of gene therapy studies in inhibition of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:350-352
- 3 Dai YM. Targeting chemo_therapy: a new focus in gene therapy research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:469-472
- 4 Yu WL, Huang ZH. Progress in studies on gene therapy for gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:887-889
- 5 Leng JJ, Chen YQ, Leng XS. Genetic therapy for pancreatic neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:916-918
- 6 Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC27721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 7 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- 8 Chen B, Zhang XY, Zhang YJ, Zhou P, Gu Y, Fan DM. Antisense to cyclin D1 reverses the transformed phenotype of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:18-21
- 9 Zhang XY. Some recent works on diagnosis and treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:1-3
- 10 Zhang FX, Zhang XY, Fan DM, Deng ZY, Yan Y, Wu HP, Fan JJ. Antisense telomerase RNA induced human gastric cancer cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:430-432
- 11 Meng FP, Ding J, Yu ZC, Han QL, Guo CC, Fan DM. Development and preliminary identification of the attenuated Salmonella typhimurium vaccine expressing the gastric cancer MG7-Ag mimotope. *Xibao Yu Fenzhi Mianyxue Zazhi* 2002;18:138-143
- 12 Guo CC, Ding J, Yu ZC, Han QL, Meng FP, Liu N, Fan DM. Development of oral DNA vaccine based on MG7-Ag mimotope of gastric cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:110-113
- 13 Ning XX, Wu KC, Shi YQ, Wang X, Zhao YQ, Fan DM. Construction and expression of gastric cancer MG7 mimic epitope fused to heat shock protein 70. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:892-896
- 14 Han QL, Ding J, Yu ZC, He FT, Fan DM. Selection of mimic epitope of gastric cancer associated antigen by using peptide library. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 2000;21:1162-1164
- 15 Ren J, Chen Z, Juan SJ, Yong XY, Pan BR, Fan DM. Detection of circulating gastric carcinoma-associated antigen MG7-Ag in human sera using an established single determinant immunopolymerase chain reaction technique. *Cancer* 2000;88:280-285
- 16 Chen JP, Lin C, Xu CP, Zhang XY, Fu M, Deng YP, Wei Y, Wu M. Transduction efficiency, biologic effects and mechanism of recombinant RA538, antisense C-myc adenovirus on different cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:266-270
- 17 Lu JG, Lin C, Huang ZQ, Wu JS, Fu M, Zhang XY, Liang X, Yao X, Wu M. Inhibitory effects of human cholangiocarcinoma cell line by recombinant adenoviruses p16 with CDDP. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:641-645
- 18 Chen JP, Lin C, Xu CP, Zhang XY, Wu M. The therapeutic effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000;6:855-860
- 19 Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- 20 Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen HP, Zhang LS. Morphological study on colonic ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000;6:861-865
- 21 He TC, Zhou SB, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Bert V. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- 22 Timmerman JM, Caspar CB, Lambert SL, Syrengelas AD, Levy R. Idiotypic encoding recombinant adenoviruses provide protective immunity against murine B-cell lymphomas[J]. *Blood* 2001;97: 1370-1377
- 23 Bruce CB, Akrigg A, Sharpe SA, Hanke T, Wilkinson GW, Cranage MP. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice. *J Gen Virol* 1999;80:2621-2628
- 24 Flanagan B, Pringle CR, Leppard KN. A recombinant human adenovirus expressing the simian immunodeficiency virus Gag antigen can induce long-lived immune responses in mice. *J Gen Virol* 1997;78:991-997
- 25 Li W, Berencsi K, Basak S. Human colorectal cancer (CRC) antigen CO17-1A/GA733 encoded by adenovirus inhibits growth of established CRC cells in mice. *J Immunol* 1997;159:763-769
- 26 He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW, Cheng J, Xiang ZQ, Giles-Davis W, Ertl HC. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology* 2000;270:146-161
- 27 Ulrich R, Nassal M, Meisel H, Kruger DH. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv Virus Res* 1998; 50:141-82
- 28 Koletzki D, Biel SS, Meisel H, Nugel E, Gelderblom HR, Kruger DH, Ulrich R. HBV core particles allow the insertion and surface exposure of the entire potentially protective region of Puumala hantavirus nucleocapsid protein. *Biol Chem* 1999;380:325-333
- 29 Karpenko LI, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 2000;18:329-337
- 30 Pumpens P, Razanskas R, Pushko P, Renhof R, Gusars I, Skrastina D, Ose V, Borisova G, Sominskaya I, Petrovskis I, Jansons J, Sasnauskas K. Evaluation of HBs, HBc, and frCP Virus-Like Particles for Expression of Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Epitopes. *Intervirology* 2002;45:24-32

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志® 注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001071 号。

World Journal of Gastroenterology® 注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001158 号。

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-18)

胃癌耐药相关抗体 MGr1 筛选文库获得的基因 MGr1-Ag1 在胃癌组织中表达的研究

尹芳,时永全,陈彩平,乔泰东,陈宝军,苗继延,樊代明

尹芳,时永全,乔泰东,陈宝军,苗继延,樊代明,中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032
陈彩平,中国人民解放军第四军医大学西京医院小儿科 陕西省西安市 710032
尹芳,女,1973-05-11 生,重庆市人,汉族.1997 年西安交通大学医学院毕业,2000 年第四军医大学硕士研究生毕业,讲师.主要从事胃癌多药耐药性的研究.国家自然科学基金资助课题, No.30030140 和 30024002
项目负责人:樊代明,710032,陕西省西安市长乐西路15号,中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化病研究所. fandaim@fmmu.edu.cn
电话:029-3375221 传真:029-2539041
收稿日期:2002-04-13 接受日期:2002-06-19

Expression of cDNA fragment encoding MGr1-Ag1 detected by MDR related antibody MGr1 in gastric cancer

Fang Yin,Yong-Quan Shi,Cai-Ping Chen,Tai-Dong Qiao,Bao-Jun Chen, Ji-Yan Miao,Dai-Ming Fan

Fang Yin,Yong-Quan Shi, Tai-Dong Qiao, Bao-Jun Chen, Ji-Yan Miao, Dai-Ming Fan, Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Cai-Ping Chen, Department of pediatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30030140 and 30024002
Correspondence to: Dai-Ming Fan, Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 15 Changle West Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. fandaim@fmmu.edu.cn
Received:2002-04-13 Accepted:2002-06-19

Abstract

AIM:To analyze the distribution and significance of the possible cDNA fragments encoding MGr1-Ag1 in human gastric cancer.

METHODS:We investigated MGr1-Ag1 expression in gastric cancer using *in situ* hybridization (ISH) techniques in 42 cases of gastric carcinomas in cryostatic sections collected from Xijing Hospital.

RESULTS:MGr1-Ag1 mRNA was positive in cytoplasm of gastric glandular epithelia with intensive staining in 50.00 % (21/42) cases with gastric cancer, and 71.42 % (30/42) cases in paracancerous gastric tissues. Eleven of 16 (68.75 %) cases were well differentiated, 8/14(57.14 %) cases were moderately differentiated and 1/10(10.00 %) cases were poorly differentiated. The positive rate of MGr1-Ag1 mRNA in gastric cancer was significantly different from that in paracancerous gastric tissues (71.42 %). There was no significant difference in positive rate of MGr1-Ag1 mRNA among normal, paracancerous gastric tissues, well and moderately differentiated tissues, but the positive rate in the poorly

differentiated tissues was low, being significantly different from that in well or moderately differentiated tissues.

CONCLUSION:MGr1-Ag1 mRNA is mainly localized in epithelial cells, and the level of its expression is correlated with the tumor differentiation.

Yin F, Shi YQ, Chen CP, Qiao TD, Chen BJ, Miao JY, Fan DM. Expression of cDNA fragment encoding MGr1-Ag1 detected by MDR related antibody MGr1 in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):18-21

摘要

目的:为研究肿瘤的多药耐药现象,应用胃癌耐药相关的单克隆抗体MGr1筛选肿瘤耐药细胞表达文库获得的一个稳定阳性克隆的 cDNA 片段 MGr1-Ag1,检测 MGr1-Ag1 在胃癌组织中的分布及表达水平.

方法:利用原位杂交技术,对 MGr1-Ag1 mRNA 在胃癌组织中的分布进行了检测,以了解其在胃癌中的表达情况及意义.

结果:MGr1-Ag1 mRNA 定位在胃腺体细胞的胞质中,为蓝色小颗粒,呈弥漫性分布. MGr1-Ag1 mRNA 在 SGC7901/VCR 阳性信号明显高于 SGC7901,胃癌与癌旁组织相比, MGr1-Ag1 mRNA 的阳性表达率均有显著差异($P < 0.05$). MGr1-Ag1 mRNA 在胃癌(50.00%)、癌旁组织(71.42 %)、高分化腺癌(68.75 %)和中分化腺癌组织(57.14 %)中的阳性表达率无显著差别,但高分化组和中分化组都与低分化腺癌组织(10.00 %)差别显著 ($P < 0.05$).此外, MGr1-Ag1 mRNA 还分布于小肠及大肠腺体内,因例数偏少,未做统计.

结论:MGr1-Ag1 与胃癌的分化程度有关,随着组织的分化程度增高, MGr1-Ag1 mRNA 的阳性表达率增加.

尹芳,时永全,陈彩平,乔泰东,陈宝军,苗继延,樊代明.胃癌耐药相关抗体 MGr1 筛选文库获得的基因 MGr1-Ag1 在胃癌组织中表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(1):18-21

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/18.htm>

0 引言

肿瘤多药耐药现象(multidrug resistance, MDR)是肿瘤治疗的热点和难点.但目前的已知机制并不能充分解释肿瘤多药耐药性的发生,而与耐药有关的分子和机制不断的被提出^[1-9].为扩充肿瘤细胞产生 MDR 的机制,以耐

长春新碱人胃癌细胞 SGC7901/VCR 为免疫原制备了一株与胃癌耐药相关的单克隆抗体 MGr1^[10], 利用 MGr1 筛选肿瘤耐药细胞表位文库, 获得了一个稳定阳性克隆 MGr1 - Ag1, 携带长约 262 bp 的 cDNA 片段, 但其中 218 bp 的序列与定位于人染色体 7p22-p21 的部分基因组序列完全相同^[11]. 为分析 MGr1 - Ag1 片段可能的意义及功能, 利用 mRNA 分子原位杂交等技术, 对 MGr1 抗体筛选的 cDNA 片段 MGr1 - Ag1 在胃癌的表达情况进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 42 例胃癌组织及其癌旁组织取自第四军医大学西京医院于 1999-08/1999-12 间行胃癌切除术的患者, 正常胃黏膜标本 25 例取自胃镜活检. 所有标本均于离体后 30 min 内完成取材并置于液氮中保存. 制备 8 μ m 冰冻切片, 40 g/L 多聚甲醛固定、干燥, -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存. 所有病理标本均经病理科两位以上医师诊断. 胃癌细胞 SGC7901 和胃癌耐长春新碱 SGC7901/VCR 为我所保存的细胞. 胰酶和小牛血清为 Sigma 公司产品. RPMI1640 和 BSA 为 Gibco BRL 产品. 多聚赖氨酸胶购于武汉博士德公司. 限制内切酶、DNA 纯化试剂盒及其他常规试剂购于华美生物工程公司. DIG DNA Labeling and Detection Kit 购于德国 Boehringer Mannheim 公司.

1.2 方法

1.2.1 组织切片准备 培养细胞在多聚赖氨酸处理的盖玻片上进行培养, 培养液为 80 ml/L 小牛血清 RPMI1640. 细胞长好后 10 mol/L PBS(pH7.4) 洗 3 $\times$ 2 min. 细胞爬片和冰冻切片在 40 g/L 多聚甲醛室温固定 10 min. 10 mol/L PBS(pH7.4) 洗 3 $\times$ 2 min. 干燥后冰冻保存.

1.2.2 探针的制备和标记 MGr1 - Ag1 cDNA 片段克隆在 pSPORT1 载体 Sal I 和 Not I 位点之间, 两侧有 BamH I 和 Kpn I 的位点. BamH I 和 Kpn I 消化质粒. 将酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 得到约 0.3 kb cDNA 片段. 试剂盒纯化回收 cDNA 片段并定量. 取 1-3 μ g cDNA 煮沸 10 min, 冰水中冷却. 用地高辛 DNA 标记试剂盒进行标记和纯化.

1.2.3 mRNA 原位杂交 切片于 70 $^{\circ}$ C 2 $\times$ SSC 预热 15 min, PBS 洗切片 2 min. 切片上滴加 0.5 mol/L TBS (pH7.2-7.6) 稀释的 1:1 000 Proteinase K, 37 $^{\circ}$ C 消化 2-15 min, 暴露 mRNA 核酸片段. 置 4 $^{\circ}$ C 预冷的 40 g/L 多聚甲醛中平衡 5 min, PBS 洗 2 $\times$ 2 min. 2 $\times$ SSC 洗 2 $\times$ 2 min. 逐级乙醇脱水. 每张切片上加适量预杂交液, 湿盒 70 $^{\circ}$ C 孵育 8 min, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h. 将标记的 cDNA 探针放入 95-100 $^{\circ}$ C 水中煮沸 5-10 min 后, 迅速冷却 3 min. 按 0.5-1.0 μ g/mL 在杂交液加入标记探针. 37 $^{\circ}$ C 湿盒中杂交 16-24 h 后, 室温 2 $\times$ SSC 洗 20 min, 1 $\times$ SSC 洗 20 min, 43 $^{\circ}$ C 0.5 $\times$ SSC 洗 20 min, 室温 0.5 $\times$ SSC 洗 20 min. Buffer I 室温振洗 1 $\times$ 5 min, 1 $\times$ 30 min, Buffer II 作用 5 min,

加抗地高辛抗体 - AP 复合物 (1:500), 37 $^{\circ}$ C 2 h. Buffer I 浸洗 2 $\times$ 15 min, 振洗 1 $\times$ 5 min, Buffer III 浸洗 5 min, 加显色液显色 0.5-12 h. 染色理想时终止反应. 上述所用试剂和材料均经去 RNA 酶处理.

1.2.4 结果判定 显微镜下选取染色结果较理想部位, 于高倍镜下, 每视野统计 200 个细胞数. 阳性细胞数比率 <10 % 或无阳性着色为阴性 (-); 阳性细胞数比率 <50 % 为弱阳性 (+); 阳性细胞数比率 >50 % 为阳性 (++); 阳性细胞数比率 >75 % 为强阳性 (+++).

统计学处理 采用 SPSS9.0 统计软件进行 χ^2 检验, 以 P < 0.05 确定为有统计学意义.

2 结果

2.1 MGr1 - Ag1 cDNA 片段的鉴定 用 BamH I 和 Kpn I 酶消化 pSPORT1 质粒, 得到一长约 0.3 kb 片段, 携带 262 bp 的 MGr1 - Ag1 cDNA 片段.

2.2 MGr1 - Ag1 mRNA 在胃癌组织及细胞系中的表达 MGr1 - Ag1 mRNA 在胃癌耐药细胞系 SGC7901/VCR 中的表达强度明显高于 SGC7901. MGr1 - Ag1 mRNA 定位在 SGC7901/VCR 和 SGC7901 细胞的胞质中, 为蓝色小颗粒, 呈弥漫性分布 (图 1、图 2). 在胃组织中, MGr1 - Ag1 的 mRNA 定位在胃腺体细胞, 在胃癌组织中阳性率为 50.00 %; 在癌旁胃黏膜中的阳性表达率为 71.42 %; 在正常胃黏膜的阳性表达率为 68.00 %. 胃癌与癌旁组织相比, MGr1 - Ag1 mRNA 的阳性表达率有显著差异 (P < 0.05) (表 1).

表 1 在胃癌、癌旁组织和正常胃黏膜中的表达

Group	No	MGr1 - Ag1				T	R(%)
		-	+	++	+++		
GC	42	21	9	10	2	21	50.00
PC	42	12	12	15	3	30	71.42
NT	25	8	5	9	3	17	68.00

NT: normal gastric tissue; GC: gastric cancer; PC: paracancerous gastric mucosa
Pearson Chi-Square Tests: $\chi^2 = 4.043$; $df = 1$; $P = 0.044$ < 0.05; GC vs PC.

表 2 MGr1 - Ag1 mRNA 的表达和胃癌分型

Group	No	Grade of intensity				T	R(%)
		-	+	++	+++		
WD	16	5	5	5	1	11	68.75
MD	14	6	3	4	1	8	57.14
PD	10	9	1	0	0	1	10.00
MC	2	1	0	1	0	1	50.00

MC: mucous carcinoma including mucous adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma

WD: well differentiated adenocarcinomas

MD: moderately differentiated adenocarcinoma

PD: poorly differentiated adenocarcinoma

Fisher's Exact Test: $P = 0.005$ < 0.05 WD vs PD; $P = 0.033$ < 0.05 MD vs PD

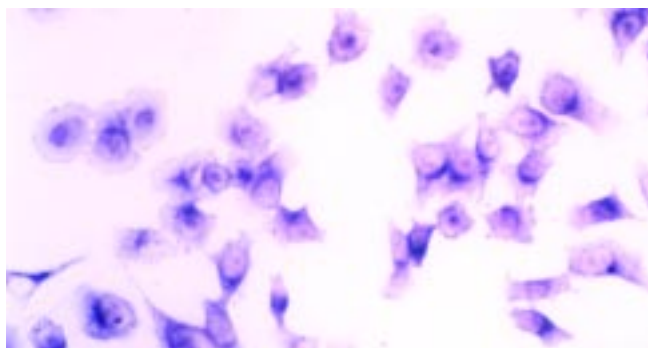


图1 原位杂交显示, MGr1-Ag1 mRNA 在人胃癌耐长春新碱细胞 SGC7901/VCR 胞质中呈强阳性表达 NBT/BCIP 显色 $\times 400$.

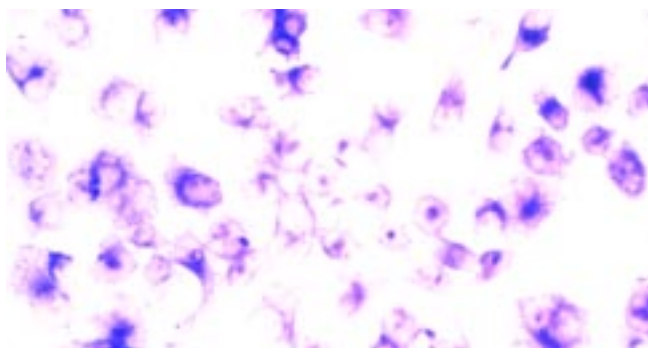


图2 原位杂交显示, MGr1-Ag1 mRNA 在人亲本胃癌细胞 SGC7901 胞质中呈阳性表达, 其阳性信号明显弱于 SGC7901/VCR 细胞 $\times 400$.

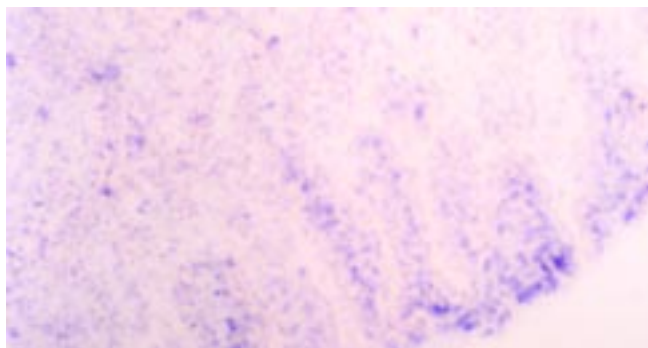


图3 原位杂交显示, 正常胃黏膜中 MGr1-Ag1 mRNA 呈阳性表达, 阳性信号分布于上皮细胞的胞质中 $\times 200$.

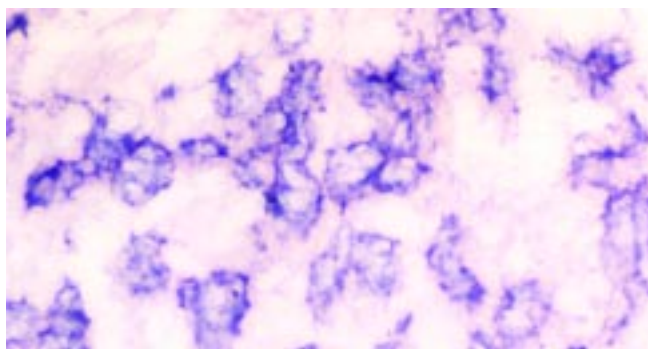


图4 原位杂交显示, 高分化腺癌中 MGr1-Ag1 mRNA 呈阳性表达, 阳性信号分布于腺体细胞的胞质中 $\times 400$.

2.3 MGr1-Ag1 mRNA 的表达与胃癌的关系 MGr1-Ag1

mRNA 的表达水平在癌旁组织、正常胃黏膜组织、高分化腺癌(68.75%)和中分化腺癌(57.14%)的阳性表达率无显著差别(图3、图4),但高分化组和中分化组与低分化腺癌(10.00%)的阳性表达率差别显著($P < 0.05$)(表2).此外, MGr1-Ag1 mRNA 还分布于小肠及大肠腺体内, 因例数偏少,未做统计.

3 讨论

胃癌对化疗药物的反应性通常很差^[12,13],肿瘤细胞可通过各种途径产生对化疗的抵抗性,其机制复杂多样.肿瘤细胞能通过 P-糖蛋白和 MRP 增加药物的外排^[14-18];位于胞质的 MRP1 和肺耐药蛋白能改变细胞内药物的分布^[19-23];GST 通过催化 GSH 与抗肿瘤药物结合增强细胞解毒功能^[24-26];Topo II 发生改变,可引起以其为靶点的药物诱导的 DNA 稳定断裂复合物形成减少, DNA 双链断裂减少,细胞产生耐药性^[27,28].此外一些代谢酶类及涉及凋亡和信号转导的分子也参与耐药性的形成^[29-33].

我所采用大剂量间歇诱导法以长春新碱诱导人胃癌细胞 SGC7901,获得了人胃癌耐药细胞株 SGC7901/VCR,该细胞具有 MDR 表型,耐受 5-氟尿嘧啶、顺铂、柔红霉素等多种结构不同的药物.以 SGC7901/VCR 为免疫原,采用杂交瘤技术制备了胃癌细胞耐药相关性单克隆抗体,命名为 MGr1^[10].MGr1 抗原在 SGC7901/VCR 的胞膜上和胞质中表达,且显著高于亲本细胞 SGC7901.Western blot 结果表明 MGr1 抗原分子量大约为 40 KDa.MGr1 抗体能部分逆转 SGC7901/VCR 对阿霉素、长春新碱和 5-氟尿嘧啶的耐药性,显著增加 SGC7901/VCR 细胞内阿霉素的滞留,说明 MGr1 是肿瘤耐药相关性抗体.为了克隆 MGr1 抗原的编码基因,研究 MGr1 抗原的分子结构和功能,利用 MGr1 抗体筛选肿瘤耐药细胞表达文库,获得了一个稳定阳性克隆 MGr1-Ag1.MGr1-Ag1 mRNA 的表达水平在癌旁组织、正常胃黏膜组织、高分化腺癌和中分化腺癌的阳性表达率无显著差别,但与低分化腺癌的阳性表达率差别显著($P < 0.05$),提示 MGr1-Ag1 与胃癌的分化程度有关,随着组织的分化程度增高, MGr1-Ag1 mRNA 的阳性表达率也增加,该结果与利用免疫组化和 MGr1 抗体检测 MGr1-Ag 在胃癌组织中的表达分布情况基本一致.

我们将继续用 MGr1 抗体筛选肿瘤 cDNA 文库,采用 RACE 技术克隆 MGr1-Ag1 全长 cDNA,并通过基因转染分析 MGr1-Ag1 在胃癌 MDR 中的作用,从而判断 MGr1-Ag1 是否与肿瘤细胞耐药现象有关,并最终获得 MGr1-Ag 的编码基因,为充实胃癌 MDR 机制和从基因水平寻找新的耐药逆转措施奠定良好的基础.

4 参考文献

- 1 Duesberg P, Stindl R, Hehlmann R. Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: Chromosome reassortments catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad*

- Sci USA 2001;98:11283-11288
- 2 Um JH, Kang CD, Lee BG, Kim DW, Chung BS, Kim SH. Increased and correlated nuclear factor-kappa B and Ku autoantigen activities are associated with development of multidrug resistance. *Oncogene* 2001;20:6048-6056
- 3 Yang JM, Vassil AD, Hait WN. Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene through the Raf-MAPK pathway. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 674-680
- 4 Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000;14:467-473
- 5 Baron JM, Holler D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001;116:541-548
- 6 Wang X, Lan M, Shi YQ, Lu J, Zhong YX, Wu HP, Zai HH, Ding J, Wu KC, Pan BR, Jin JP, Fan DM. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:54-59
- 7 Carobbio S, Realini C, Norbury CJ, Toda T, Cavalli F, Spataro V. Sequence of Crm1/exportin 1 mutant alleles reveals critical sites associated with multidrug resistance. *Curr Genet* 2001;39: 2-9
- 8 Lage H, Perlitz C, Abele R, Tampe R, Dietel M, Schadendorf D, Sinha P. Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *Febs Lett* 2001;503:179-184
- 9 Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 2000;113:2011-2021
- 10 李明峰,樊代明,周绍娟.胃癌细胞耐药相关性单克隆抗体的制备及初步鉴定.现代肿瘤医学 1995; 31:143-145
- 11 时永全,肖冰,苗继延,李明峰,乔泰东,陈宝军,陈峥,韩军良,周绍娟,樊代明.MGr1 抗体筛选文库获得胃癌耐药相关的新基因片段.华人消化杂志 1998;6:656-669
- 12 Alexander D, Yamamoto T, Kato S, Kasai S. Histopathological assessment of multidrug resistance in gastric cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, and lung-resistance protein. *Surg Today* 1999;29:401-406
- 13 Endo K, Maehara Y, Kusumoto T, Ichiyoshi Y, Kuwano M, Sugimachi K. Expression of multidrug-resistance-associated protein (MRP) and chemosensitivity in human gastric cancer. *Int J Cancer* 1996;68: 372-377
- 14 Grandjean F, Bremaud L, Verdier M, Robert J, Ratinaud MH. Sequential gene expression of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP) and lung resistance protein: functional activity of P-gp and MRP present in the doxorubicin-resistant human K562 cell lines. *Anticancer Drugs* 2001;12: 247-258
- 15 Kong XB, Yang ZK, Liang LJ, Huang JF, Lin HL. Overexpression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma and its clinical implication. *World J Gastroenterol* 2000;6:134-135
- 16 Van der Kolk DM, de Vries EG, Noordhoek L, van den Berg E, van der Pol MA, Muller M, Vellenga E. Activity and expression of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;15:1544-1553
- 17 Bagrij T, Klokouzas A, Hladky SB, Barrand MA. Influences of glutathione on anionic substrate efflux in tumour cells expressing the multidrug resistance-associated protein, MRP1. *Biochem Pharmacol* 2001;62:199-206
- 18 Young LC, Campling BG, Cole SP, Deeley RG, Gerlach JH. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin Cancer Res* 2001;7:1798-1804
- 19 Han K, Kahng J, Kim M, Lim J, Kim Y, Cho B, Kim HK, Min WS, Kim CC, Lee KY, Kim BK, Kang CS. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia. *Acta Haematol* 2000;104:174-180
- 20 Coley HM. Drug resistance studies using fresh human ovarian carcinoma and soft tissue sarcoma samples. *Keio J Med* 1997;46: 142-147
- 21 Rimsza LM, Campbell K, Dalton WS, Salmon S, Willcox G, Grogan TM. The major vault protein (MVP), a new multidrug resistance associated protein, is frequently expressed in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1999;34:315-324
- 22 Siva AC, Raval_Fernandes S, Stephen AG, LaFemina MJ, Scheper RJ, Kickhoefer VA, Rome LH. Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance. *Int J Cancer* 2001;92:195-202
- 23 Liu ZM, Shou NH, Jiang XH. Expression of lung resistance protein in patients with gastric carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:433-434
- 24 倪灿荣.胃癌 GST- π , P-gp, Top- II 和 nm23H1 表达的意义.世界华人消化杂志 2001;9:892-896
- 25 Russo D, Marie JP, Zhou DC, Faussat AM, Melli C, Damiani D, Michelutti A, Michieli M, Fanin R, Baccarani M. Evaluation of the clinical relevance of the anionic glutathione-S-transferase (GST pi) and multidrug resistance (mdr-1) gene coexpression in leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1994;15:453-468
- 26 Morrow CS, Smitherman PK, Diah SK, Schneider E, Townsend AJ. Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1- and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 20114-20120
- 27 王少东,张振书,张杏泉,周殿元.CPP32在阿霉素诱导的胃癌耐药细胞的凋亡中的作用.世界华人消化杂志 2001;9:1152-1156
- 28 Zheng W, Xie Z, Tang G. Study on the relationship between DNA topoisomerase II activity and multidrug resistance in leukemic cells. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 1998; 19: 470-472
- 29 Yin F, Shi YQ, Zhao WP, Xiao B, Miao JY, Fan DM. Suppression of P-gp induced multiple drug resistance in a drug resistant gastric cancer cell line by overexpression of Fas. *World J Gastroenterol* 2000; 6:664-670
- 30 Xiao B, Shi YQ, Zhao YQ, You H, Wang ZY, Liu XL, Yin F, Qiao TD, Fan DM. 1998. Transduction of Fas gene or Bcl-2 antisense RNA sensitizes cultured drug resistant gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 421-425
- 31 Liu XL, Xiao B, Yu ZC, Guo JC, Zhao QC, Xu L, Shi YQ, Fan DM. Down-regulation of Hsp90 could change cell cycle distribution and increase drug sensitivity of tumor cells. *World J Gastroenterol* 1999; 5:199-208
- 32 Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, Triche TJ, Reynolds CP. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 2001;61:6185-6193
- 33 Keshelava N, Zuo JJ, Waidyaratne NS, Triche TJ, Reynolds CP. p53 mutations and loss of p53 function confer multidrug resistance in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:563-568

根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中bax蛋白表达的影响

刘海峰,刘为纹,房殿春,王国安,滕小春

刘海峰,刘为纹,房殿春,王国安,滕小春,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038
刘海峰,男,1965-11-06生,河北省景县人,汉族.1988年毕业于第三军医大学,1994年和1998年分别获得第三军医大学医学硕士和医学博士学位,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,目前主要从事胃癌的发病机制及其防治研究,发表论文52篇,获军队科技进步二等奖1项,主编医学专著1部,参编医学专著6部.
军队医药卫生“九五”重点课题资助项目, No.96Z047及重庆市应用基础研究基金资助项目.
项目负责人:刘海峰,400038,重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号,中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科. hfliuwz@163.net
电话:023-65318301 转 73055
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-16

Effect of *Helicobacter pylori* infection on bax protein expression in patients with gastric precancerous lesions

Hai-Feng Liu, Wei-Wen Liu, Dian-Chun Fang, Guo-An Wang, Xiao-Chun Teng

Hai-Feng Liu, Wei-Wen Liu, Dian-Chun Fang, Guo-An Wang, Xiao-Chun Teng, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the fund for Key Projects in the Army Medical and Health 9th 5-year Plan, and by the fund for Chongqing applied base research.
Correspondence to: Dr. Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 30 Gaotanyan Zhengjie, Shapingba District, Chongqing 400038, China. hfliuwz@163.net
Received: 2002-07-31 Accepted: 2002-08-16

Abstract

AIM: To evaluate the effect of *Helicobacter pylori* (Hp) infection on bax protein expression, and explore the role of Hp in the development of gastric carcinoma.

METHODS: Hp was examined by rapid urease test and Warthin-Starry method, and bax protein was examined by immunohistochemical staining in 72 patients with pre-malignant lesions.

RESULTS: Bax protein was expressed with different degree in intestinal metaplasia and gastric dysplasia, its positive rate being 63.9%. The positive rate of Bax protein expression in Hp-positive gastric precancerous lesions (72.3 %) was significantly higher than that in Hp-negative gastric precancerous lesions (48.0 %, $\chi^2=4.191$, $P<0.05$). Hp infection was correlated well with the expression of Bax protein in gastric precancerous lesions ($r=0.978$, $P<0.01$). After eradication of Hp, the positive rate of bax protein expression was significantly decreased in Hp-positive gastric precancerous lesions ($\chi^2=5.506$, $P<0.05$). In the persistent Hp infected patients, the positive rate of Bax protein expression was not changed.

CONCLUSION: Hp is involved in the expression of Bax gene. Hp infection increases the expression of Bax protein, this

may be one of the mechanisms of Hp infection in the induction of gastric epithelial cell apoptosis. Hp might act as a tumor promoter in the genesis of gastric carcinoma. Eradication of Hp could inhibit the formation and development of gastric carcinoma.

Liu HF, Liu WW, Fang DC, Wang GA, Teng XC. Effect of *Helicobacter pylori* infection on bax protein expression in patients with gastric precancerous lesions. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):22-24

摘要

目的:研究Hp感染及根除治疗对胃癌前病变组织中促凋亡基因Bax蛋白表达的影响,探讨Hp的致病机制及其在胃癌发生中的作用.

方法:采用快速尿素酶试验、Warthin-starry银染色检测Hp;采用免疫组织化学SP法检测72例胃癌前病变组织中Bax蛋白的表达情况,以及Hp阳性患者Hp根除前后胃癌前病变Bax蛋白表达的变化.

结果:Bax蛋白在肠上皮化生及不典型增生组织中均有不同程度的表达,其阳性表达率为63.9%.Hp阳性胃癌前病变组Bax蛋白阳性表达率(72.3%)显著高于Hp阴性胃癌前病变组(48.0%, $\chi^2=4.191$, $P<0.05$), Hp感染与Bax阳性表达及分级呈正相关($r=0.978$, $P<0.01$).经三联治疗根除Hp后,Bax蛋白阳性表达率(70.3%)较治疗前显著降低(43.2%, $\chi^2=5.506$, $P<0.05$),而Hp仍为阳性者Bax蛋白阳性表达率则无变化.

结论:Hp感染可以促进促凋亡基因Bax蛋白的表达,这可能是Hp感染诱导胃黏膜上皮细胞凋亡的主要机制之一,从而导致细胞凋亡和增生的调节紊乱,使胃黏膜上皮不稳定性增加,使其具有较高的癌变易感性.根除Hp感染可纠正Bax基因表达的异常,对预防或减缓胃癌的发生可能具有重要意义.

刘海峰,刘为纹,房殿春,王国安,滕小春.根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中bax蛋白表达的影响.世界华人消化杂志 2003;11(1):22-24

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/22.htm>

0 引言

大量的流行病学资料表明,胃癌发生率与当地的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染率呈正相关, Hp感染者发生胃癌的危险性较非感染者高6倍^[1-10].从慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠上皮化生及异型增生到胃癌的演变过程已经明确.Hp感染为慢性胃炎的主要病

因, 因此有理由认为 Hp 感染是胃癌发生的危险因素之一^[11-18], 但其确切的致病机制尚不完全清楚. 已有研究表明, Hp 可能通过某些环节造成胃黏膜组织癌基因的突变、细胞信号转导异常等导致胃黏膜细胞发生癌前变化. 但通过研究胃癌前病变组织中 Hp 感染及根除治疗对 Bax 蛋白表达的影响来探讨 Hp 致病机制的报道少见. 为进一步探讨 Hp 在胃癌发生过程中的作用, 我们对 Hp 根除前后胃癌前病变组织中 Bax 表达的变化进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 我院 1994/1996 年胃镜活检标本 72 例. 其中肠上皮化生 51 例, 中、重度异型增生 21 例. 胃镜活检标本均取自胃窦部. 组织标本经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚连续切片, 并经 HE 染色病理诊断证实. Hp 检测采用快速尿素酶试验和 Warthy-starry 银染色, 两项均阳性者为 Hp 阳性, 两项均阴性者为 Hp 阴性, 单项阳性者退出试验. 对 Hp 阳性者给予有机铋剂、羟氨苄青霉素、灭滴灵三联药物进行治疗, 疗程为 2 wk. 治疗结束后复查胃镜, 停药 4 wk 后 Hp 仍保持阴性者为 Hp 根除.

1.2 方法 Bax 蛋白表达的检测采用 SP 法. Bax 多克隆抗体为美国 Dako 公司产品, 免疫组化试剂盒 (Immunostain SP Kit) 为美国 Santa Cruz 公司产品. 染色程序按 SP 法操作常规进行. 以 PBS 代替一抗为阴性对照, 以已知 Bax 蛋白阳性的胃癌组织为阳性对照. 光镜下观察 Bax 蛋白免疫组化染色切片的显色反应, 数 5 个以上高倍视野, 不少于 400 个胃黏膜上皮细胞. Bax 结合染色反应深度及阳性细胞数分为 0-3 四级: (-) 无阳性反应细胞、阳性细胞 <10 % 或背景同空白对照者; (+) 10-25 % 细胞明显阳性, 或大多数细胞弱阳性; (++) 26-50 % 的细胞明显阳性; (+++) >50 % 的细胞明显阳性.

统计学处理 Stata 软件包的 χ^2 检验, Fisher 精确检验, 有序的 Logistic 回归. $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

在 51 例肠化生组织中, Hp 阳性 35 例, Hp 阴性 16 例, Hp 感染率为 68.6 %. 21 例中、重度异型增生组织中, Hp 阳性 12 例, Hp 阴性 9 例, Hp 感染率为 57.1 %. 肠化生与异型增生组织中 Hp 感染率无显著性差异.

Bax 蛋白阳性反应物质呈棕黄色, 主要位于腺上皮细胞质内, 偶可伴胞核着色 (图 1). Bax 蛋白在肠化生和异型增生组织中均有不同程度的表达, 其阳性表达率为 63.9 %. Hp 阳性组胃癌前病变 Bax 蛋白阳性表达率为 72.3 %, 显著高于 Hp 阴性组 (48.0 %, $P < 0.05$). Hp 感染与 Bax 阳性表达及分级呈正相关 ($P < 0.01$, Logistic 回归分析, 表 1). 47 例 Hp 阳性患者经前述三联药物治疗后, 37 例 Hp 被根除, 10 例仍为 Hp 阳性. Hp 根除组胃癌前病变 Bax 蛋白阳性表达率为 43.2 %, 较治疗前显著降低

(70.3 %, $P < 0.05$), 而 Hp 仍为阳性组胃癌前病变 Bax 蛋白阳性表达率 (40.0 %) 与治疗前无变化.

表 1 Hp 感染与胃癌前病变 Bax 蛋白表达的关系

Hp	n	Bax 阳性分级				Bax 阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
阳性	47	13	15	10	9	72.3 ^a
阴性	25	13	6	4	2	48.0

^a $P < 0.05$, vs Hp 阴性组.

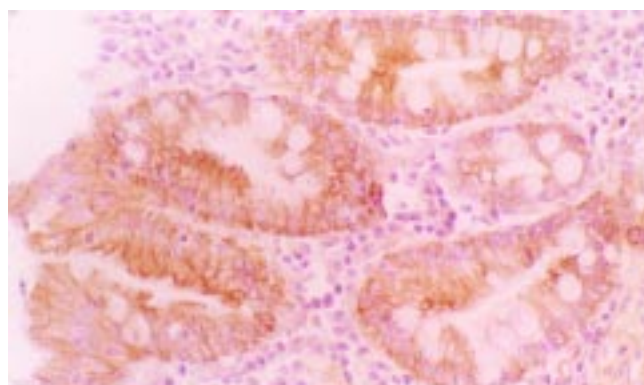


图 1 肠化生组织, Bax 蛋白阳性反应物质呈棕黄色 SP $\times 200$.

3 讨论

胃癌发生发展过程中不仅存在细胞的过度增生, 而且存在细胞凋亡的异常, 细胞凋亡与细胞增生平衡失调是胃癌发生的病理学基础^[19-28]. Hp 是胃癌的第一类致病因子, 其在胃癌发生中的作用已被广泛关注^[1,2,8-14]. 我们以往的研究工作发现, Hp 感染不仅可以刺激胃黏膜上皮细胞过度增生, 也可以诱导胃黏膜上皮细胞凋亡, Hp 感染是引起胃黏膜上皮细胞增生和凋亡异常的重要机制之一; Hp 感染后使胃黏膜上皮细胞增生和凋亡均明显增加, 必然会导致胃黏膜上皮细胞增生与凋亡的调节紊乱, 使胃黏膜上皮细胞不稳定性增加, 从而增加患胃癌的危险性^[20,23,24,28]. 但是, Hp 感染诱导胃黏膜上皮细胞凋亡及促进胃黏膜上皮细胞过度增生的机制目前尚不清楚.

Bax 是编码 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 的基因. Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白有 21 % 的同源性, 具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用. 研究发现 Bcl-2/Bax 两蛋白之间的比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素, 因此认为 Bax 是重要的促细胞凋亡基因之一^[29,30]. Hp 感染是否通过影响 Bax 基因的表达调控胃黏膜上皮细胞增生和凋亡, 是一个值得探讨的问题, 因此, 我们对胃癌前病变组织中 Hp 感染与 Bax 蛋白表达的关系进行了研究. 研究发现, Bax 蛋白在肠化生和异型增生组织中均有不同程度的表达, Hp 阳性组胃癌前病变组织中 Bax 蛋白表达阳性率显著高于 Hp

阴性组,Hp感染与Bax阳性表达及分级呈正相关;Hp根除组胃癌前病变Bax蛋白阳性表达率较治疗前显著降低,而Hp仍为阳性组胃癌前病变Bax蛋白阳性表达率与治疗前无变化.表明Hp感染可以促进Bax蛋白的表达,这可能是Hp感染诱导胃黏膜上皮细胞凋亡的主要机制,导致胃黏膜上皮细胞增生与凋亡的调节紊乱,从而使胃黏膜上皮细胞易于向恶性转化.其原因可能是Hp感染继发炎症过程中释放多种细胞因子、自由基和一氧化氮,这些物质可引起染色体损伤、基因突变;也可能是Hp自身及其代谢产物有潜在的致癌活性^[31-34].

本研究结果提示,对有Hp感染的胃癌前病变患者,应积极抗Hp治疗,可能会促使Bax基因异常表达的逆转,从而纠正细胞凋亡、细胞增生的异常,可能具有降低患胃癌的危险性,预防或减缓胃癌发生的重要作用.以上推论尚需临床观察验证.

4 参考文献

- 1 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 2 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Wang GA, Teng XC. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric precancerous: a follow-up study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:912-915
- 3 Ji WS, Hu JL, Qiu JW, Peng DR, Shi BL, Zhou SJ, Wu KC, Fan DM. Polymorphism of flagellin A gene in *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2001;7:783-787
- 4 Xu KQ, Zhang WD, Wang JD, Li ZX, Zhou DY, Zhang YL, Huang WF, Jiang B, Sun Y. Cytotoxin of *Helicobacter pylori* promotes IL-8 secretion of gastric mucosa *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:907-911
- 5 Peng XN, Fan XG, Huang Y, Wang ZM, Cheng YP. The study on relationship between helicobacter infection and primary liver carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:902-906
- 6 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H. pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 7 Miehke S, Kirsch C, Dragosics B, Gschwantler M, Oberhuber G, Antos D, Dite P, Luter J, Labenz J, Leodolter A, Malfertheiner P, Neubauer A, Ehninger G, Stolte M, Bayerdrffer E. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: current status of the Austrian-Czech-German gastric cancer prevention trial (PRISMA-Study). *World J Gastroenterol* 2001;7:243-247
- 8 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Changle County, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376
- 9 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H. pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 10 Yao YL, Xu B, Song YG, Zhang WD. Overexpression of cyclin E in Mongolian gerbil with *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:60-63
- 11 Matsukura N. Relation between *Helicobacter pylori* and diseases: knowledge for clinician. *J Nippon Med Sch* 2002;69:200-2004
- 12 Miwa H, Go MF, Sato N. *H. pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1106-12
- 13 Wang GT. Progress in studies of mechanism of gastric precancerous lesions, carcinogenesis and their reversion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 1-4
- 14 Zhuang XQ, Lin SR. Progress in research on the relationship between *Hp* and stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:206-207
- 15 Yang Y, Deng CS, Yao XJ, Liu HY, Chen M. Effect of *Helicobacter pylori* on morphology and growth of gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 500-504
- 16 Zhang ZW, Michael JG. Farthing. Molecular mechanisms of *H. pylori* associated gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:369-374
- 17 Zhang XY. Some recent works on diagnosis and treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:1-3
- 18 Han FC, Yan XJ, Su CZ. Expression of the CagA gene of *H. pylori* and application of its product. *World J Gastroenterol* 2000; 6:122-124
- 19 Jang TJ, Kim JR. Proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 2000; 35: 265-271
- 20 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Yang SM, Wang RQ. Bax gene expression and its relationship with apoptosis in human gastric carcinoma and paracancerous tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:665-668
- 21 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of *H. pylori* associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001; 7:779-782
- 22 Chan AO, Wong BC, Lam SK. Gastric cancer: past, present and future. *Can J Gastroenterol* 2001;15:469-474
- 23 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 15-17
- 24 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Liu FX, He GY. Clinical significance of Fas antigen expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 90-91
- 25 Maeda S, Yoshida H, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:771-778
- 26 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of sulindac on human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 27 Hamajima N, Matuo K, watanabe Y, Suzuki T, Nakamura T, Matsuura A, Yamao K, Tominaga S. A pilot study to evaluate stomach cancer risk reduction by *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 2002;97:764-765
- 28 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Gao JH, Wang ZH. Apoptosis and proliferation induced by *Helicobacter pylori* and its association with p53 protein expression in gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9:1265-1268
- 29 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:771-778
- 30 El-Rifai W, Powell SM. Molecular biology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002;12:128-140
- 31 Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Rev Cancer* 2002;2:28-37
- 32 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burji I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 33 Ebert MP, Leodolter A, Malfertheiner P. Novel strategies in the prevention of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1569-1571
- 34 El-Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric cancer and *H. pylori*: Host genetics open the way. *Gastroenterology* 2001;121:1002-1004

选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利抑制胃癌细胞株 SGC7901 端粒酶的活性

胡国勇,于皆平,冉宗学,余保平,罗和生

胡国勇,于皆平,冉宗学,余保平,罗和生,武汉大学人民医院消化内科
湖北省武汉市 430060
胡国勇,男,1977-09-29生,湖北省天门人,汉族.2000年湖北医科大学本科毕业,现武汉大学人民医院消化内科硕士,主要从事胃肠道肿瘤的病因及防治研究.湖北省自然科学基金资助课题, No.301130558
项目负责人:余保平,430060,湖北省武汉市紫阳路5号,武汉大学人民医院消化内科. yubaoping62@yahoo.com.cn
电话:027-88041911-8469
收稿日期:2002-05-18 接受日期:2002-08-03

Nimsulide suppresses the telomerase activity of SGC7901 gastric cancer cell line

Guo-Yong Hu, Jie-Ping Yu, Zong-Xue Ran, Bao-Ping Yu, He-Sheng Luo

Guo-Yong Hu, Jie-Ping Yu, Zong-Xue Ran, Bao-Ping Yu, He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 301130558
Correspondence to: Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubaoping62@yahoo.com.cn
Received:2002-05-18 Accepted:2002-08-03

Abstract

AIM:To investigate whether nimsulide, a COX-2-specific inhibitor, could inhibit the proliferation viability and the telomerase activity of SGC7901 gastric cancer cell line.

METHODS:After SGC7901 was treated with different concentrations of nimsulide (0, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$, respectively), the cellular proliferation was evaluated by MTT assay and the telomerase activity was detected by PCR-ELISA assay. And the cell morphology and growth manner were observed under phase contrast microscope.

RESULTS:Nimsulide could inhibit the growth of SGC7901 gastric cancer cell line in the time and dose-dependent manner; and the telomerase activity of SGC7901 was significantly lower in the 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$ groups than that in the control group, their absorbance values were $2.12 \pm 0.11, 1.54 \pm 0.08, 1.13 \pm 0.09, 0.79 \pm 0.12$ vs 2.76 ± 0.06 ($P < 0.01$), respectively.

CONCLUSION:COX-2-specific inhibitor could inhibit the telomerase activity of gastric cancer cell line, which provides a new pathway of COX-2-specific inhibitor in inhibiting the growth of gastric cancer.

Hu GY, Yu JP, Ran ZX, Yu BP, Luo HS. Nimsulide suppresses the telomerase activity of SGC7901 gastric cancer cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):25-28

摘要

目的:探讨选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利对胃癌细胞株 SGC7901 细胞增生及端粒酶活性的影响,为选择性 COX-2 抑制剂应用于胃癌的防治提供新的理论依据.

方法:用不同浓度的尼美舒利(0, 50, 100, 200 及 400 $\mu\text{mol/L}$)处理 SGC7901 胃癌细胞株后,采用 MTT 比色试验和 PCR-ELISA 半定量法检测细胞的增生和端粒酶活性,同时用相差显微镜动态观察细胞形态及生长方式上的改变.

结果:尼美舒利呈时间剂量依赖性抑制 SGC7901 细胞的生长,同时他也能显著抑制 SGC7901 细胞的端粒酶的活性,50, 100, 200 及 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的尼美舒利实验组的吸光度值分别为 $2.12 \pm 0.11, 1.54 \pm 0.08, 1.13 \pm 0.09, 0.79 \pm 0.12$ vs 2.76 ± 0.06 ($P < 0.01$),并呈剂量依赖关系.

结论:选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利能抑制胃癌细胞株 SGC7901 的端粒酶活性,进而抑制其细胞生长,这也可能是选择性 COX-2 抑制剂抗肿瘤作用的又一新的机制.

胡国勇,于皆平,冉宗学,余保平,罗和生.选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利抑制胃癌细胞株 SGC7901 端粒酶的活性.世界华人消化杂志 2003;11(1):25-28
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/25.htm>

0 引言

胃癌在我国最常见^[1-4],临床上就诊的患者多属中晚期、治疗效果差^[5-7].因此提供一条有效的胃癌防治措施显得尤为迫切.环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX2)参与了多种肿瘤的发生发展过程.COX-2 抑制剂-非甾体消炎药(NSAID)对大肠癌有预防作用^[8-10],能明显降低患胃癌的危险度^[11],阿司匹林在体外可诱导胃癌细胞凋亡^[12].胃癌组织也有 COX-2 高表达现象^[13,14],同时胃癌组织中端粒酶阳性率高达 90%,且与肿瘤的恶性程度和预后密切相关^[15-18].我们应用选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利作用于胃癌细胞株 SGC7901,观察其对胃癌细胞增生和端粒酶活性的影响,并探讨其可能的分子机制,进一步阐明选择性 COX-2 抑制剂的抗肿瘤机制,为胃癌的防治提供新的方法和理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株 SGC7901 购自中国科学院上

海细胞生物研究所细胞库,RPMI1640培养基和胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司,MTT、DMSO 和尼美舒利购自 Sigma 公司, Telomerase PCR-ELISA 试剂盒由 Roche 公司提供,恒温 CO₂ 培养箱(Sheldon 公司),倒置显微镜(重庆光学仪器厂),酶联免疫检测分析仪为 Digiscan.胃癌细胞株 SGC7901 细胞培养于含 100 ml/L 灭活的胎牛血清(FBS)、100 mg/L 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI1640 培养液中,培养条件为 37 °C、50 ml/L CO₂、饱和湿度,每隔 2-3 d 用 2.5 g/L 胰酶 /0.2 g/L EDTA 消化,以 1:3-1:5 传代 1 次.

1.2 方法 相差显微镜下动态地观察 SGC7901 细胞和不同浓度(50,100,200,400 μmol/L)的尼美舒利处理后的 SGC7901 细胞在大小、形态及生长方式上的改变.细胞增生活性的检测用 MTT 比色试验.用 0.25 % 胰蛋白酶消化单层培养细胞 SGC7901,制备成单细胞悬液.以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板(每孔 200 μL),37 °C、50 ml/L CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 孵箱中培养 24 h 后,加入不同浓度的尼美舒利 (50,100,200,400 μmol/L).并设不接种细胞的空白对照和只加等体积溶剂 DMSO 的对照组,每一浓度每个时间点重复 6 孔.然后于培养 24、48、72 h 后各组取 6 孔,每孔加入 MTT 液(5 g/L)20 μL,37 °C 孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,轻轻振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在 490 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,并计算细胞存活率(%)=实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值×100 %.将细胞悬液接种到 25 cm² 的培养瓶中,待细胞生长到对数生长期(细胞密度约占 2×10^8 /L)时,将不同浓度的尼美舒利(50,100,200 及 400 μmol/L)加入到 SGC7901 细胞中,并设只加等体积溶剂 DMSO 为对照组,每一浓度重复 4 瓶,培养 72 h 后,采用 Telomerase PCR-ELISA 试剂盒检测其端粒酶的活性,具体操作按说明书标准程序进行,在 450 nm/690 nm 波长下检测各组的吸光度值,以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并计算端粒酶抑制率(%)=(1- 实验组平均吸光度值 / 对照组平均吸光度值)×100 %

统计学处理 以上实验数据采用 SPSS10.0 统计分析软件进行 t 检验分析,所有数值以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, P < 0.05 为有统计学意义.

2 结果

2.1 SGC7901 细胞形态学 尼美舒利处理组 SGC7901 细胞体积略有增大,呈圆形或多边形,核浆比例减少,异性性降低,且细胞只能呈单层生长,在长至 100 % 汇合后恢复接触抑制和密度抑制,在用药第 3 天后 400 μmol/L 组大部分细胞已脱壁、老化及死亡;而对照组 SGC7901 细胞大小形态不一,能叠加成堆生长,丧失接触抑制和密度抑制的特性.

2.2 尼美舒利对 SGC7901 细胞体外生长的影响 尼美

舒利呈时间、剂量依赖性抑制胃癌 SGC7901 细胞的生长(图 1).

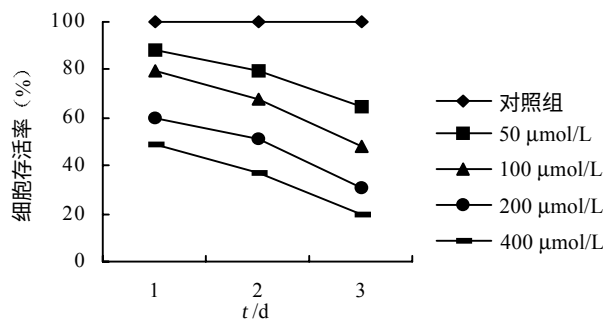


图 1 不同时间、不同浓度的尼美舒利对 SGC7901 细胞体外生长的影响

2.3 尼美舒利对 SGC7901 细胞端粒酶活性的影响 尼美舒利处理组(0, 50,100,200 及 400 μmol/L)SGC7901 细胞的端粒酶活性呈剂量依赖性降低,吸光度值分别为 2.76 ± 0.06 , 2.12 ± 0.11 , 1.54 ± 0.08 , 1.13 ± 0.09 , 0.79 ± 0.12 (P < 0.01),其抑制率分别为 23.2 %,44.3 %,59.1 % 和 71.4 %.

3 讨论

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素合成的关键酶,至今发现他至少有二种同工酶: COX-1 和 COX-2. COX-1 为结构型酶,广泛分布于多种细胞和组织中,正常情况下保持稳定水平,以保证细胞的正常生理活动; COX-2 为诱导型酶,静息时不表达,当细胞受到各种刺激时迅速合成,表达增加.近年来, COX-2 在消化道肿瘤中所起的作用日益受到重视.越来越多的证据表明, COX-2 在消化道肿瘤的发生机制中扮演了重要的角色^[13,14, 19-26].传统 NSAIDs 因抑制 COX-1 活性而引起胃肠道黏膜损害,而选择性 COX-2 抑制剂副作用小,临床应用广阔.因此选择性 COX-2 抑制剂有望成为胃癌防治的一条新的途径.尽管选择性或非选择性 COX-2 抑制剂能够抑制多种肿瘤包括胃癌细胞的生长和增生^[24-32],然而这些抗肿瘤效应的分子基础还未完全阐明.一些 COX-2 抑制剂能诱导细胞凋亡,而有些 COX-2 抑制剂却能诱导细胞周期的停滞.此外,不同 COX-2 抑制剂可能在不同类型的肿瘤细胞中发挥着不同的作用.因此,每一种 COX-2 抑制剂在不同类型的肿瘤中的作用可能具有特异性,探讨每种 COX-2 抑制剂在不同类型的肿瘤中的作用机制,对 COX-2 抑制剂在临床上应用于肿瘤的防治有重要的意义.

端粒酶是一种核蛋白酶,由人端粒酶 RNA(hTR)、端粒酶相关蛋白(hTP1)和端粒酶催化亚单位(hTERT)三部分组成.近年来大量研究表明,人类 85 % 以上的恶性肿瘤都有端粒酶活性表达,而正常体细胞及良性肿瘤中端粒酶活性表达极低或无表达^[33,34].在胃癌细胞中端粒酶活性普遍呈高表达,提示端粒酶激活可能是肿瘤细胞增生的决定性因素^[15-18],端粒酶的激活可能是细胞癌变的一条共同通路.因此,许多研究以抑制端粒酶的

活性作为肿瘤基因治疗的切入点.目前对端粒酶调节的分子机制尚未完全明了,认为端粒酶活性的调节可在基因表达与转录、翻译后修饰和蛋白-蛋白相互作用等多个水平进行.选择性COX-2抑制剂尼美舒利是否也能直接或间接地调节端粒酶的活性,目前国内外相关研究较少.Lonnroth et al^[35]发现消炎痛和磺化舒林酸能降低结肠癌细胞系中的端粒酶活性.然而,选择性COX-2抑制剂能否也降低所有高COX-2表达的肿瘤细胞(如胃癌)的端粒酶活性,目前还未完全证实.我们应用选择性COX-2抑制剂尼美舒利作用于胃癌细胞株SGC7901后发现,SGC7901细胞的增生能力明显受到抑制,从形态学和生长方式上,SGC7901细胞的恶性表型有所逆转,这一结果与文献[24,25,32]报道和我们以前的研究是一致的.同时我们还首先发现尼美舒利能抑制胃癌细胞系SGC7901端粒酶的活性,并且呈剂量依赖关系.尼美舒利抑制SGC7901细胞的生长与降低端粒酶活性有关,这提示选择性COX-2抑制剂除通过诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制细胞的增生、影响生长因子的表达和减少肿瘤血管的生成外,降低端粒酶活性可能也是其抗肿瘤作用的又一新的机制.然而选择性COX-2抑制剂是如何抑制肿瘤细胞端粒酶活性的具体机制仍旧不清楚.Counter et al^[36]研究表明,端粒酶的活性受端粒酶催化亚单位(hTERT)调节,hTERT磷酸化是端粒酶活性的必要条件.新近研究表明,蛋白激酶B(PKB)可通过磷酸化hTERT来增加端粒酶的活性^[37],而选择性COX-2抑制剂又能抑制蛋白激酶B的磷酸化^[38].因此,从我们的实验结果中可推测,选择性COX-2抑制剂抑制胃癌细胞株SGC7901端粒酶的活性可能与阻碍蛋白激酶B通路有关,这有待于进一步的研究.

4 参考文献

- Chen B, Zhang XY, Zhang YJ, Zhou P, Gu Y, Fan DM. Antisense to cyclin D1 reverses the transformed phenotype of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:18-21
- Zou SC, Qiu HS, Zhang CW, Tao HQ. A clinical and long term follow up study of peri operative sequential triple therapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:284-286
- He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomerase expression, Hp infection and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:505-508
- Zhou XW. Current status and prospect of clinical studies on TCM treatment of precancerous lesions of stomach. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:277-279
- Wu K, Liu BH, Zhao DY, Zhao Y. Effect of vitamin E succinate on expression of TGF- α 1, c-jun and JNK1 in human gastric cancer SGC 7901 cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:83-87
- Pan X, Ke CW, Pan W, He X, Gao GW, Qi ZT. Killing effect of DT/VEGF system on gastric carcinoma cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:393-396
- Wang GT, Zhu JS, Xu WY, Wang Y, Zhou AG. Clinical and experimental studies on fuzheng anti-cancer granula combined with chemotherapy in advanced gastric cancer. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:214-218
- Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995;333:609-614
- Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 2000;60:5040-5044
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- Akre K, Ekstrom AM, Signorello LB, Hansson LE, Nyren O. Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden. *Br J Cancer* 2001;84:965-968
- Wong BC, Zhu GH, Lam SK. Aspirin induced apoptosis in gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 1999;53:315-318
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- Gao HJ, Yu LZ, Sun L, Miao K, Bai JF, Zhang XY, Lu XZ, Zhao ZQ. The expression of Cox-2 Proteins in gastric cancer tissue and accompanying tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:578-579
- Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995;55:3258-3262
- Zhu ZH, Xia ZS, He SG. The effects of ATRA and 5Fu on telomerase activity and cell growth of gastric cancer cells in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:669-673
- Guan JL, Zhang JP, Zhou TH. Relationship between telomerase *Helicobacter pylori* and stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:910-911
- Zhan WH, Ma JP, Peng JS, Gao JS, Cai SR, Wang JP, Zheng ZQ, Wang L. Telomerase activity in gastric cancer and its clinical implications. *World J Gastroenterol* 1999;5:316-319
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-1188
- Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miao K, Lu XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H. pylori* infection, Histological and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59:198-204
- Shen ZX, Cao G, Sun J. The clinical and pathology effect of COX-2 mRNA expression in colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1082-1084
- Weaver SA, Russo MP, Wright KL, Kolios G, Jobin C, Robertson DA, Ward SG. Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:1117-1127
- Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu J. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- Li JY, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Huang JA. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the proliferation and cyclooxygenase activity of gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:262-265
- Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-1112
- Mann M, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, DuBois RN. Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology* 2001;120:1713-1719
- Wight NJ, Gottesdiener K, Garlick NM, Atherton CT, Novak S, Gertz BJ, Calder NA, Cote J, Wong P, Dallob A, Hawkey CJ. Rofecoxib, a COX-2 inhibitor, does not inhibit human gastric mucosal prostaglandin production. *Gastroenterology* 2001;120:867-873

- 29 Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 2000;119: 706-714
- 30 Zhang Z, DuBois RN. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinomacells. *Gastroenterology* 2000; 118:1012-1017
- 31 Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology* 2000;118:487-496
- 32 Uefuji K, Ichikura T, Shinomiya N, Mochizuki H. Induction of apoptosis by JTE-522, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in human gastric cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20:4279-4284
- 33 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015
- 34 Fu JM, Yu XF, Shao YF. Telomerase and primary liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:461-463
- 35 Lonnroth C, Andersson M, Lundholm K. Indomethacin and telomerase activity in tumor growth retardation. *Int J Oncol* 2001; 18:929-937
- 36 Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 1998;16:1217-1222
- 37 Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 1999;274: 13085-13090
- 38 Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 2000;275:11397-11403

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到2002年7月,中国被著名检索系统SCI收录的科技期刊数从63种增加到了67种.从制作SCI的美国ISI(美国科学情报所)发布的JCR(期刊引证报告)上的数据看,有指标数据的59种我国科技期刊中,80%以上的期刊影响因子呈上升趋势;约90%的总被引频次都提高了.

在2001年的JCR中,总被引频次超过1000次的中国科技期刊有4个,他们是《高等学校化学学报》(中文版)(1959次),《科学通报》(1628次),《物理学报》(中文版)(1227次),《中国物理快报》(1215次).首次有两个中国科技期刊的影响因子超过1,他们是《细胞研究》(2.102)和《世界胃肠病学杂志》(1.445),这两种期刊均为中国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看,进入SCIE的我国科技期刊,有8个期刊排在本学科的中上水平,他们是《力学学报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国物理》,《中国物理快报》,《科学通报》,《中国科学B》,《中国科学E》,《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中,我国有10个期刊被引频次位于中上水平的.他们是:《科学通报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国科学A》,《物理学报》(中文版),《中华医学杂志》,《化学学报》(中文版),《中国物理快报》,《中国有色金属学报》(英文版),《中国科学B》,《中国药理学报》.

在SCI网络版收录的中国科技期刊中,有25个期刊是由中国科学出版社出版的,其中在JCR中有指标的期刊有18个.

另外,除SCI系统外,中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势.例如,在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统(EI)(工程索引)中,中国被收录的科技期刊从最少时的40种,增加到了2000年的104种.这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部中国科技信息研究所,每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析,定期出版《中国科技期刊引证报告》.以2000年数据看,我国科技期刊的平均影响因子由上一年的0.208上升到0.240,其中影响因子超过1的有20个;总被引频次的平均值达到了192.2次,总被引频次超过1000次的期刊有25个,其中《科学通报》的总被引频次达到了2979次.

目前,我国科技期刊数量已达到4600余种,已经形成了一定的规模,而且门类相对齐全,为我国基础研究的发展和科研成果转化为生产力做出了重要的贡献,但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距.随着中国加入WTO,对于中国的科技期刊,既是机遇又是挑战.我们相信,通过我国学术界和编辑部门的共同努力,一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)

热盐水所致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜HSP及p53蛋白的表达

贾长河,张 沥, 张玲霞, 徐俊荣, 江 梅,张宁霞,曹广周

贾长河,张沥,张玲霞,徐俊荣,江梅,张宁霞,曹广周,西安市中心医院消化科
陕西省西安市 710003
贾长河,男,1972-01-02生,河南省上蔡县人,汉族,1995年河南医科大学医学
系本科毕业,现为西安交通大学医学院 2000 级在读硕士研究生。
项目负责人:张沥,710003,陕西省西安市中心医院消化科。
电话:029-7268355 转 3063
收稿日期:2002-07-08 接受日期:2002-07-22

Expressions of HSP and p53 protein in gastric mucosa of atrophic gastritis induced by high-salt hot water in rats

Chang-He Jia, Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Jun-Rong Xu,
Mei Jiang, Ning-Xia Zhang, Guang-Zhou Cao

Chang-He Jia, Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Jun-Rong Xu, Mei Jiang,
Ning-Xia Zhang, Guang-Zhou Cao, Department of Gastroenterology
of Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Li Zhang, Department of Gastroenterology of
Xi'an central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China.
Received: 2002-07-08 Accepted: 2002-07-22

Abstract

AIM: To study the relationship between hot high-salt diet and chronic atrophic gastritis (CAG) and gastric cancer, and detect the expression of HSP60, HSP 70 and HSP 90 α and p53 protein in the rat gastric mucosa of atrophic gastritis induced by high-salt hot water.

METHODS: Rat CAG models were firstly established by intragastrical feeding with 15 % 55 °C salt water for 12 weeks. Some rats were killed to detect HSP60, HSP 70, HSP 90 α and p53 protein every 4 weeks by immunohistochemical method in the control group (intragastrically fed with 25 °C distilled water for 12 weeks) and the experimental group.

RESULTS: The expression of HSP60, HSP70 and HSP90 α was low in gastric mucosal tissue cells of rats at 4 weeks and 8 weeks. There was no significant difference between the experimental and the control group ($P > 0.05$). The expression rates were significantly higher in the rats of experimental group at 12 weeks when CAG had formed than those in the control group ($P < 0.01$). The expression rates of HSP 70 were the highest (33 %) among these proteins, the expression rates of HSP90 α were moderate (24 %), and the expression rates of HSP60 were the lowest (6 %). The p53 protein was not detected in normal group rats as well as in rats of the model group at 4 weeks and 8 weeks, but it was detected at 12 weeks in the CAG rats of the model group with an expression rate of 15.5 %, which was significantly associated with the expression of HSP70 and HSP90 α , especially, the former which had no association with the expression of HSP60.

CONCLUSION: Long time high-salt hot diet can induce CAG,

and may even promote the development of gastric cancer. HSP70/HSP90 α and p53 proteins might have combined effect in the development from CAG to gastric cancer.

Jia CH, Zhang L, Zhang LX, Xu JR, Jiang M, Zhang NX, Cao GZ. Expressions of HSP and p53 protein in gastric mucosa of atrophic gastritis induced by high-salt hot water in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):29-32

摘要

目的:应用热盐水灌胃方法制作大鼠慢性萎缩性胃炎(CAG)模型,并检测热盐水所致大鼠慢性萎缩性胃炎(CAG)胃黏膜组织细胞中与CAG癌变有关的基因蛋白(HSP60, 70, 90 α , p53)表达情况,以探讨长期热咸饮食与CAG及胃癌发生的关系。

方法:(1)采用55 °C, 15 %的盐水对大鼠连续灌胃12 wk,制作成大鼠CAG模型,在灌胃期间每隔4 wk处死一批大鼠。(2)应用免疫组化方法检测对照组(蒸馏水灌胃12 wk)及模型组灌胃4 wk、8 wk、12 wk的大鼠胃黏膜组织细胞HSP60, 70, 90 α 及p53蛋白表达情况。

结果:模型组大鼠4 wk、8 wk时胃黏膜组织细胞HSP60, 70, 90 α 仅有少量表达,与对照无明显差异($P > 0.05$)。至第12周出现萎缩时表达量较对照组明显增加,差异有显著意义($P < 0.01$),其中HSP70表达率最高(33 %),HSP60最低(6 %),HSP90居中(24 %)。对照组大鼠胃黏膜组织细胞p53蛋白未见表达,模型组大鼠4 wk、8 wk时p53蛋白未见表达,至第12周时呈现一定水平的表达(15.5 %),并与HSP70、HSP90 α 的表达呈相关性,以前者相关性最强;与HSP60没有相关性。

结论:这些结果说明长期过热过咸饮食可以导致萎缩性胃炎,并有可能诱发癌变。HSP70、HSP90 α 与p53在CAG癌变的演变过程中可能起相关作用。

贾长河,张沥,张玲霞,徐俊荣,江梅,张宁霞,曹广周.热盐水所致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜HSP及p53蛋白的表达.世界华人消化杂志 2003;11(1):29-32

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/29.htm>

0 引言

慢性萎缩性胃炎属癌前状态,与胃癌的发生有十分密切的关系.流行病学研究发现胃癌多发于高纬度地区,这些地区多为高原和中温带气候,受寒冷因素的影响这里的居民常年喜食高盐热烫食物,我国胃癌高发区居民绝大多数有进食高盐食品的习惯.我们以人类饮食中不可缺少的两大因素 - 食物的热度与咸度,创建了快速

建立慢性萎缩性胃炎动物模型的方法,并从分子水平证实应用热盐水造出的大鼠CAG模型已存在癌变倾向。

1 材料和方法

1.1 材料 100只7周龄健康、性成熟的二级♂SD大鼠,体质量200-250g由第四军医大学动物实验中心提供;SABC即用型试剂盒,HSP60、HSP70、HSP90 α 及p53一抗,生物素化的二抗均购自武汉博士德公司;余化学试剂均购自第四军医大学。

1.2 方法 大鼠萎缩性胃炎模型采用55℃,150g/L的盐水连续灌胃12wk^[1],对照组采用等量的蒸馏水灌胃12wk,在灌胃期间每隔4wk处死一批大鼠,至12wk时全部处死。收集制模阶段的大鼠胃黏膜石蜡包埋标本(其中包括热盐水灌胃4wk的大鼠胃黏膜标本16例,8wk的标本18例,12wk的标本34例及对照组标本32例)进行免疫组织化学检测。采用SABC即用型试剂盒,切片常规脱蜡水化,经30ml/L过氧化氢-90ml/L甲醇封闭内源性过氧化物酶20min,微波修复抗原10min,山羊血清孵育25min后加一抗(HSP60,HSP70,HSP90 α ,p53),4℃冰箱过夜,次日加对应的生物素化二抗,37℃,30min;ABC复合物,37℃,30min。之后用DAB显色。以上各步骤除血清孵育后电干血清直接加一抗外,均间以PBS洗涤3次,每次3-5min。阴性对照以PBS代替一抗,阳性对照分别为已知HSP60,HSP70,HSP90 α 及p53阳性的胃癌标本。显微镜下观察DAB显色满意后自来水冲洗5min;苏木素复染5s,自来水冲洗5min;最后脱水,透明,中性树胶封片。细胞质出现棕黄染色,或伴有胞核棕黄色颗粒者为阳性细胞,p53仅为胞核染色。高倍镜下选取5个有代表性的视野计数,每个视野观察100个细胞,计算阳性细胞的平均表达率。未被染色或阳性细胞数<5%的视野视为阴性。

统计学处理 样本均数的比较采用t检验,两样本相关的分析采用直线相关分析,相关性用r表示。

2 结果

热盐水灌胃4wk,8wk时大鼠胃黏膜组织切片无萎缩性胃炎的表现,灌胃至12wk时即出现胃黏膜腺体明显缩小,腺上皮萎缩,腺管腔变大等CAG表现,而对照组无此表现。模型组大鼠灌胃4wk,8wk时胃黏膜组织细胞HSP60,70,90 α 有少量表达,与对照组比较无显著差异($P>0.05$),灌胃至12wk出现CAG时表达量较对照组明显增加,差异有显著性($P<0.01$)。对照组细胞p53蛋白未见表达,模型组大鼠灌胃4wk,8wk p53蛋白未见表达,灌胃至12wk呈现一定量的表达(15.5%)。同一CAG标本中,可见HSP与p53共同表达,经相关性检验发现HSP70,HSP90 α 与p53具有相关性。其中HSP70与p53相关性最强, $r=0.81$;HSP90 α 与p53相关性次之, $r=0.62$;HSP60和p53无相关性。以上几种蛋白阳性表达主要见于主细胞,壁细胞(表1,图1)。

表1 大鼠胃黏膜组织HSP60,HSP70,HSP90 α 及p53表达(% , $\bar{x} \pm s$)

分组	n	HSP60	HSP70	HSP90 α	p53
对照组	32	1.4 $\pm$ 1.38	23 $\pm$ 6.04	12 $\pm$ 4.50	0
模型4wk	16	1.2 $\pm$ 0.77	20 $\pm$ 5.36	10 $\pm$ 3.54	0
模型8wk	18	1.4 $\pm$ 0.84	25 $\pm$ 6.28	12 $\pm$ 2.38	0
模型12wk	34	6 $\pm$ 3.27 ^b	33 $\pm$ 8.32 ^b	24 $\pm$ 10.38 ^b	15.5 $\pm$ 6.83 ^b

^b $P<0.01$, vs 对照组。

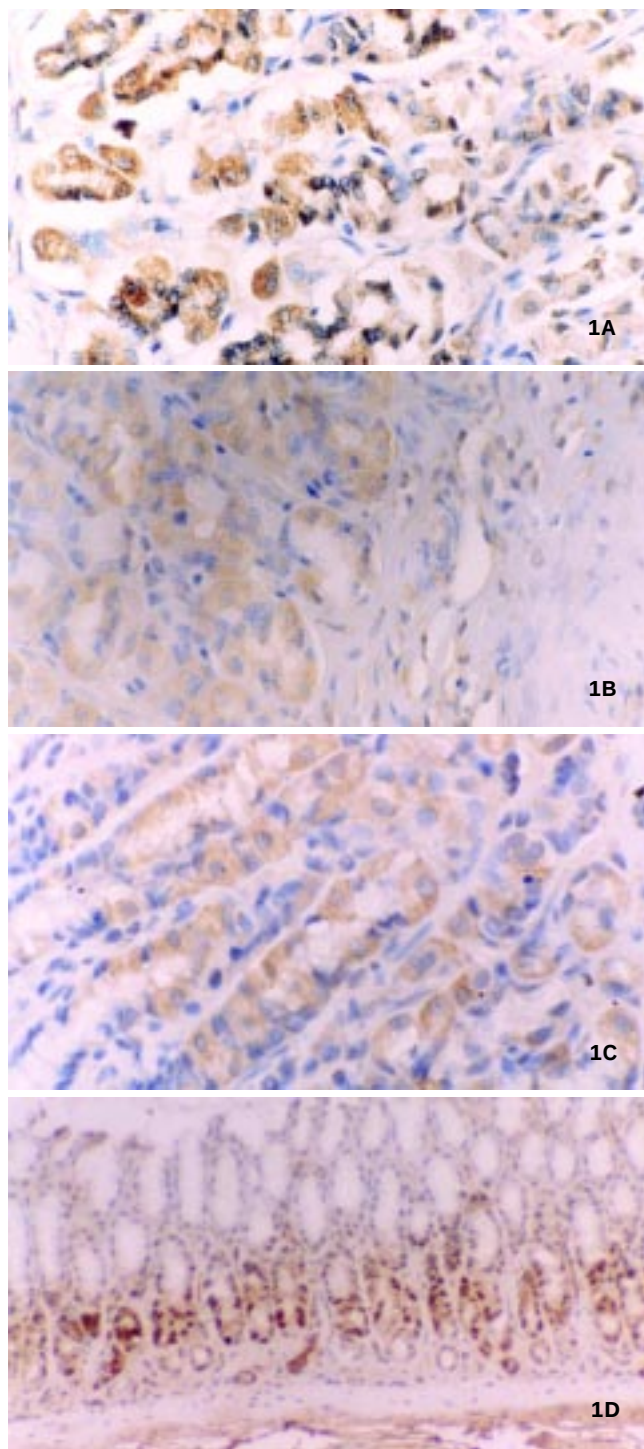


图1A HSP60阳性着色(胞质)×400
图1B HSP70阳性着色(胞质)×400
图1C HSP90 α 阳性着色(胞质)×400
图1D p53阳性着色(胞核)×200

3 讨论

CAG 常见与胃癌的发生有十分密切的关系^[2-22], WHO 将之定为胃癌前状态. 近年来流行病学研究表明^[23], 长期高盐饮食可以导致 CAG, 甚至诱发癌变. 本研究先以热盐水诱导大鼠产生 CAG, 然后通过观察 CAG 大鼠所发生的分子水平变化, 进一步探讨热咸饮食 - CAG - 胃癌之间的关系. 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 是细胞受到各种理化因素刺激后诱导产生的一组保护性蛋白, 具有维持细胞蛋白自身稳定及结合受体调节细胞周期等许多重要功能. HSP 的这些功能主要是通过其分子伴侣作用实现的, 分子伴侣是细胞内一类能介导其他蛋白正确装配, 本身却不具功能的最终装配产物的组成成分. HSP 通过这一作用影响细胞内多种蛋白质的构象, 参与细胞生长繁殖等重要生命过程. 一些癌基因蛋白如 c-myc, Ras, p60^{v-src} 等; 细胞周期 G1/S 转换相关蛋白 p38 和 p30; 类固醇激素受体等均需依赖 HSPs 形成活性. 目前发现的 HSPs 有 40 多种, 一般根据其同源性及分子量大小分为 HSP90, HSP70, HSP60 及小分子量 HSP 4 个家族^[24]. 在结构上, 他们均具有 C-端的 ATP 酶活性区和 N-端的肽结合区; 在功能上, 具有相同、相似或协同作用.

近年来的研究发现, HSP 与细胞的转化和恶变过程密切相关, 癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤细胞系中, HSP 表达增高^[25-27], 提示 HSP 与肿瘤的发生发展、生物学行为及其预后有着较密切的关系^[28,29]. 不同分子量的 HSP 与肿瘤的关系不尽相同. 低分子量的 HSP 在人类肿瘤组织中的表达差异较大, 有报道认为他主要与子宫及乳腺等部位的肿瘤发生有关. HSP60、HSP70 和 HSP90 则广泛见于各种肿瘤组织. 根据是否含谷氨酰胺的片段, HSP90 又分为 HSP90 α 和 HSP90 β 二种, 二者同源性高达 84%. 在病毒转化和化学诱导的肿瘤细胞中, HSP90 α 表达水平明显升高, 而 HSP90 β 基本不变, 所以二者中以 HSP90 α 与肿瘤发生的关系最密切.

p53 基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 定位于 17 号染色体短臂上, 是一个重要的细胞增生周期调节因子. 其中野生型 p53 基因在细胞损伤修复过程中, 监视着基因组 DNA 的完整性. 当细胞受到射线或某些药物作用而发生 DNA 损伤时, p53 基因所编码的蛋白能使细胞分裂停止在 G1/S 期, 使细胞充分修复 DNA 的损伤, 使之恢复正常. 倘不能恢复, 野生型 p53 基因还能启动细胞的凋亡过程从而引导细胞的程序性死亡, 阻止具有癌变倾向的突变细胞出现. 但野生型 p53 基因很容易发生突变, 转变成突变型 p53 基因. 当 p53 基因突变或功能丧失时, p53 介导的细胞周期调节失控, DNA 分子程序紊乱, 发生遗传不稳定性及多倍体, 导致肿瘤发生. 野生型 p53 基因表达的蛋白半衰期甚短, 一般检测方法难以检出, 而当基因发生突变时, 其表达的蛋白质构型发生改变, 半衰期延长,

因此免疫组化测得的 p53 蛋白为突变型蛋白. 正常胃黏膜、慢性胃炎中无突变型 p53 表达, 一旦癌变, 其表达率明显增高.

HSP 能与多种癌基因产物结合形成异源蛋白复合体, 介导癌蛋白构象成熟及转运, 从而参与细胞转化过程^[30]. 大量文献报道肿瘤中常有 HSP 和 p53 的共同表达, HSP 与突变或野生型 p53 结合在调控 p53 功能方面起着重要作用^[31-33]. 在 HSP 中以 HSP70 与 p53 的关系最密切, HSP70 与突变型 p53 能选择性结合形成稳定的复合物, 使核内 p53 蛋白转运到细胞质中, 丧失控制细胞增生的能力. 血清 p53 抗体阳性的肿瘤患者, 其肿瘤组织中存在突变 p53/HSP70 复合物, 提示此复合物可能是肿瘤发生、细胞恶变的机制之一, 并可作为判断预后不良的指标.

本研究对两组实验标本进行检测后发现, 模型组大鼠灌胃 4 wk, 8 wk 时胃黏膜组织细胞 HSP60, HSP70, HSP90 α 蛋白有少量表达, p53 蛋白没有表达, 与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 灌胃至 12 wk 出现 CAG 时表达量较对照组明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$). 这说明热盐水灌胃对大鼠 CAG 的形成及胃黏膜癌变相关基因表达的影响是个逐渐发展的过程. 慢性萎缩性胃炎是胃癌的癌前病变, 现已公认胃黏膜细胞癌变常需经历萎缩性胃炎/伴肠化—不典型增生—胃癌的过程, 在此过程中常常存在一些基因的异常表达. 已有文献^[34]报道 HSP70、p53 在正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎/肠上皮化生、不典型增生及胃癌组织中的表达呈递增形式, 依此推论, 若长期应用热盐水灌胃, 随着大鼠胃黏膜上述基因表达的变化, 很有可能出现肠化、不典型增生甚至胃癌的病理改变. 这表明热盐水所致的动物 CAG 模型已存在癌变的倾向. HSP60, HSP70, HSP90 α 三者进行比较以 HSP70 表达最高, HSP90 α 次之, HSP60 最低, 统计学差异显著, 说明 HSP70、HSP90 α 是主要的细胞周期调节蛋白, 二者在胃黏膜组织细胞中的高表达可能起着与多种癌基因产物结合形成异源蛋白复合体, 介导癌蛋白构象成熟及转运, 从而参与细胞转化过程的作用; HSP60 表达较低, 可能在胃黏膜癌变过程中所起作用较弱. HSP60, HSP70, HSP90 α 三者分别与 p53 进行相关性检验, 以 HSP70 相关性最强, $r = 0.81$; HSP90 α 相关性次之, $r = 0.62$; HSP60 和 p53 之间无相关性. 提示 HSP70/HSP90 α 与 p53 在 CAG 的癌变过程中起协同作用. 以上几种蛋白表达主要见于主细胞和壁细胞. 主细胞及壁细胞主要分泌消化酶和盐酸, CAG 时由于主、壁细胞减少及其内质网、线粒体的变性改变, 分泌功能受损, 为了促进损伤修复, 细胞合成 HSP 及 p53 增加, 如果刺激因素持续存在, 细胞调节就有可能失控, 导致 HSP 过分表达及 p53 突变, 故可见主细胞及壁细胞中以上蛋白表

达较多.这些细胞功能异常,导致胃黏膜泌酸及消化酶的产生发生障碍,表现出一系列消化吸收功能减弱等CAG症状.

4 参考文献

- Zhang L, Zhang LX, Xu JR, Cao GZ, Jiang M, Zhang NX, Jia CH. Rat model of atrophic gastritis induced by high-salt hot water. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:571-574
- Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham DY. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. *Helicobacter* 2001;6:294-299
- Zhong FM, Song J, Yao P, Yin CC. Expression of p53 and Fas in *Hp* positive gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:456-457
- Yao XX, Yin L, Zhang JY, Bai WY, Li YM, Sun ZC. Htert expression and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:508-512
- Kong XD, Zhang SZ, Hu JK, Xiao CY, Sun Y, Xia QJ. Abnormalities of p15 gene and protein expression in gastric cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:513-516
- Cheng SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134
- Chen SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancer lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- Wang B, Shi LC, Zhang WB, Xiao CM, Wu JF, Dong YM. Expression and significance of p16 gene in gastric cancer and its precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:39-42
- Gao MX, Zhang NZ, Ji CX. Estrogen receptor and PCNA in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1117-1120
- Xia JZ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M, Yin HR. Significance of immunohistochemically demonstrated micrometastases to lymph nodes in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1113-1116
- Feng RH, Li JF, Liu BY, Zhu ZG, Yin HR. Htr gene cloning from human gastric cancer cells and the construction of its sense and antisense eukaryotic expression vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1409-1414
- Yang SM, Fang DC, Yang JL, Luo YH, Lu R, Liu WW. Effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase on telomerase activity and expression of apoptosis-associated gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:149-152
- Yu LF, Wu YL, Zhang YP. Reversal of drug resistance in the vincristine-resistant human gastric cancer cell lines MKN28/VCR by emulsion of seminal oil of *Brucea Javanica*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:376-378
- Yin F, Shi YQ, Zhao WP. Suppression of p-gp induced multiple drug resistance in a drug resistant gastric cancer cell line by overexpression of Fas. *World J Gastroenterol* 2000;6:664-670
- Liu ZM, Shou NH, Jiang XH. Expression of lung resistance protein in patients with gastric carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:433-434
- El-Zimaity HM, Ota H, Graham DY, Akamatsu T, Katsuyama T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94:1428-1436
- Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition early and advanced stages of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- Ren J, Dong L, Pan BR, Xu CB, Li MZ. Interactions between human gastric carcinoma cells and vascular endothelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1254-1260
- Luo F, Sun JL, Ren DM, Cai D, Shen M. Effect of hyperthermia on telomerase activity and genes expression in human gastric cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1261-1264
- Liu HF, Liu WW, Fang DC, Gao JH, Wang ZH. Apoptosis and proliferation induced by *Helicobacter pylori* and its association with p53 protein expression in gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1265-1268
- Wan SM, Sun SH, Deng MD, Ge QL, Yang YJ. TGF- α_1 and PDGF-A expression in gastric cancer tissue and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:36-39
- Wang XB, Wang X, Zhang NZ. Inhibition of somatostatin analog Octreotide on human gastric cancer cell MKN45 growth in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:40-42
- Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, King A, Koh TJ, Wang TC. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999;59:4823-4828
- Takeo S, Noguchi T, Kikuchi R, Sato T, Uchida Y, Yokoyama S. Analysis of the survival period in resectable stage IV gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:215-221
- Iaquinto G, Todisco A, Giardullo N, D'Onofrio V, Pasquale L, De Luca A, Andriulli A, Perri F, Rega C, De Chiara G, Landi M, Taccone W, Leandro G, Figura N. Antibody response to *Helicobacter pylori* CagA and heat-shock proteins in determining the risk of gastric cancer development. *Dig Liver Dis* 2000;32:378-383
- Ren HY, Yi CQ, Zhang JK. Expression of PCNA and HSP70 in patients with *Hp* infected gastric mucosa. *Tongji Yikedaxue Xuebao* 1999;28:135-137
- Guo JC, Li JC, Fan DM, Qiao TD, Zhang XY. Regulation of HSP70 expression in human gastric cancer cell line SGC7901 by gene transfection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:773-776
- Qiao HH, Zhao M, Yuan XH. Expression of HSP90 α and its effect on the growth of tumor in mice. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:19-21
- Iaquinto G, Todisco A, Giardullo N, D'Onofrio V, Pasquale L, De Luca A, Andriulli A, Perri F, Rega C, De Chiara G, Landi M, Taccone W, Leandro G, Figura N. Antibody response to *Helicobacter pylori* CagA and heat-shock proteins in determining the risk of gastric cancer development. *Dig Liver Dis* 2000;32:378-383
- Zylicz M, King FW, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* 2001;20:4634-4638
- Quenneville LA, Trotter MJ, Maeda T, Tron VA. p53-dependent regulation of heat shock protein 72. *Br J Dermatol* 2002;146:786-791
- Fan Y, Zhao M, Huang C. Preliminary study of effect of antisense hsc70 effect on the stability of mutant p53 protein. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:376-378
- Gaidon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 2001;21:1874-1887
- Cheng SB, Hong JQ, Wang YH. Expression and significance of heat shock protein 70 and p53 protein in gastric carcinoma. *Shiyong Aizheng Zazhi* 2000;15:241-242

胃癌组织中一氧化氮合酶的表达与血管形成的机制

陶文惠,邓长生,朱尤庆

陶文惠,邓长生,朱尤庆,武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
陶文惠,女,1970-12-21生,湖北省武汉市人,汉族.1993年湖北医科大学本科毕业,2002年武汉大学医学院硕士研究生毕业,主治医师.主要从事消化系统疾病的临床及基础研究.
项目负责人:陶文惠,430071,湖北省武汉市东湖路169号,武汉大学中南医院消化内科. yushutaozi@sina.com
电话:027-88017539 传真:027-88017539
收稿日期:2002-07-12 接受日期:2002-07-25

Expression of inducible nitric oxide synthase and angiogenesis in gastric cancer

Wen-Hui Tao, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu

Wen-Hui Tao, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Correspondence to: Wen-Hui Tao, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. yushutaozi@sina.com
Received: 2002-07-12 Accepted: 2002-07-25

Abstract

AIM: To investigate the expression of inducible NOS (iNOS) in human gastric cancer and its relationship with the angiogenesis in gastric cancer and lymphocyte metastasis.

METHODS: The expression of iNOS in 50 patients with gastric cancer was studied by immunohistochemical SP method with anti-iNOS. Microvessel density (MVD) of human gastric cancer was also determined with anti-CD34 as the labels.

RESULTS: The expression rate of iNOS in 50 cases was 70 %, and the rates of node negative and node positive in gastric cancer were 54.2 % and 84.6 %, respectively, with significant difference ($P < 0.01$). There was a significant difference of MVD ($P < 0.01$) among groups with different expression of iNOS.

CONCLUSION: The expression rate of iNOS in human gastric cancer is high, and it is closely related to the carcinoangiogenesis and metastasis.

Tao WH, Deng CS, Zhu YQ. Expression of inducible nitric oxide synthase and angiogenesis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):33-35

摘要

目的: 研究诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在人胃癌组织中的表达及其与胃癌微血管形成的关系,以及和淋巴结转移的关系。

方法: 采用免疫组化SP法检测50例原发性胃癌中iNOS的表达,同时检测微血管密度(microvessel density, MVD,

以抗CD₃₄标记)。

结果: iNOS阳性表达率为70 %,在淋巴结阴性组和阳性组分别为54.2 %和84.6 %,两组间的差异有统计学意义($P < 0.01$);在iNOS阴性表达组MVD均值为 11.8 ± 5.9 ,在iNOS阳性表达(+), (++)、(+++)组中MVD均值分别为 18.7 ± 6.3 , 24.5 ± 5.6 , 30.1 ± 9.4 , iNOS阴性组和阳性组MVD均值差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

结论: iNOS在胃癌组织中有高表达(70 %),与癌瘤微血管形成,淋巴结转移有关系。

陶文惠,邓长生,朱尤庆. 胃癌组织中一氧化氮合酶的表达与血管形成的机制. 世界华人消化杂志 2003;11(1):33-35
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/33.htm>

0 引言

一氧化氮(nitric oxide, NO)是生物体内信息传递的重要调节因子,并与许多疾病的发生发展有密切的关系^[1-10].在体内, L-精氨酸和分子氧在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化下生成L-瓜氨酸和NO. NO作为一种递质,在形成有致癌作用的亚硝酸盐和DNA损伤的基因突变方面具有重要作用. NOS作为NO合成的关键限速酶,其表达直接影响NO的生成, NOS分为结构型NOS和诱导型NOS. Maeda和Akaike最近指出,大多数实验性癌瘤组织均可见iNOS的升高,产生的NO可增加血管通透性,加速癌瘤组织营养供应而促进其快速生长^[11]. 为此,我们用免疫组化技术检测人胃癌组织中iNOS和血管密度的标记物抗CD₃₄,探讨iNOS与胃癌微血管形成之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 武汉大学中南医院1999-2001年住院的胃癌患者50例,均经病理证实,年龄19-64(平均54.6)岁,有淋巴结转移者26例. iNOS, CD₃₄, SP试剂盒均购自北京中山试剂公司。

1.2 方法 所有标本均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,5 μ m厚度连续切片各3片,脱蜡至水, PBS缓冲液漂洗3 min $\times$ 2; 组织抗原修复15 min (用pH6 0.01mol柠檬酸缓冲液), PBS漂洗3 min $\times$ 2; 过氧化酶阻断剂孵育10 min, PBS漂洗3 min $\times$ 3; 非免疫性动物血清孵育10 min, 弃液,滴加一抗,室温下60 min; PBS漂洗3 min $\times$ 3; 生物素标记二抗孵育10 min; PBS漂洗3 min $\times$ 3; 链

亲和素一氧化物酶溶液孵育 10 min ; PBS 漂洗 3 min $\times$ 3; DAB 显色 ; 苏木素浅染 , 脱水 , 封片 , 镜下观察 . iNOS 染色的阳性信号为胞质和胞膜上出现棕黄色颗粒 . 综合染色强度和阳性细胞数量进行分级 , 按着色程度分为 : 基本未着色、染色与背景相似者为 0 分 ; 着色浅、略高于背景者为 1 分 ; 中度着色、明显高于背景者为 2 分 ; 强染、着色深者为 3 分 . 阳性细胞 $<10\%$ 为 0 分 , $25-50\%$ 为 1 分 , $51-75\%$ 为 2 分 , $>75\%$ 为 3 分 . 两项相加后分 4 级 : 0-1 分为 (-) , 2 分为 (+ , 图 1) , 3-4 分为 (++) , 图 2) , 5 分以上为 (+++ , 图 3) . 血管密度计数 (MVD) 参照 Weidner 法 , 先在低倍镜下观察全片 , 寻找 “ 热点 ” (即新生血管最密集区) , 然后在高倍镜下 ($\times 200$ 倍 , 图 4) 以任一棕色内皮细胞或细胞丛作为一个血管 , 只要结构不相连 , 其分支结构也作为一个血管计数 . 记录 5 个视野内的微血管数 , 取其平均数作为该病例的 MVD .

统计学处理 胃癌中淋巴结阴性与阳性组间 iNOS 表达的比较用秩和检验 , 淋巴结阴性与阳性组间 MVD 表达的比较用 t 检验 , 各 iNOS 表达组间 MVD 的比较用 F 检验 . 所有数据均用 SPSS 软件进行统计分析 .

2 结果

2.1 胃癌中的 iNOS 的表达 胃癌 iNOS 阳性表达 35 例 , 其中 (+) 12 例 , (++) 16 例 , (+++) 7 例 , 阳性率为 70 % . 无淋巴结转移组 24 例 , (+) 6 例 , (++) 5 例 , (+++) 2 例 , 阳性表达率为 54.2 % . 有淋巴结转移组 26 例 , (+) 6 例 , (++) 11 例 , (+++) 5 例 , 阳性表达率为 84.6 % , 经 t 检验 , 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) .

2.2 胃癌中的 MVD 计数 最高值为 42 , 最低值为 6 , 平均值为 20.2 ± 9.8 . 有淋巴结转移 26 例的平均 MVD 为 27.4 ± 6.5 , 无淋巴结转移 24 例的平均 MVD 为 15.3 ± 4.7 , 经 t 检验两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$) .

2.3 胃癌中的 iNOS 表达与微血管密度 (MVD) 的关系 在 iNOS 表达 (-) - (++) 组中 MVD 平均值分别为 11.8 ± 5.9 , 18.7 ± 6.3 , 24.5 ± 5.6 , 30.1 ± 9.4 , 经方差分析 , 各组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$) .

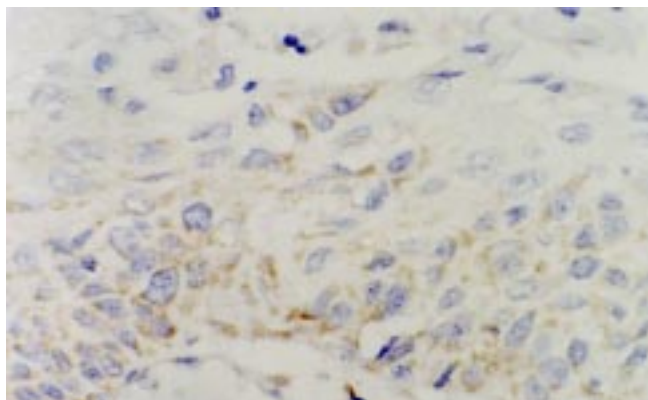


图 1 胃癌组织中 iNOS(+) 表达 ($\times 400$)

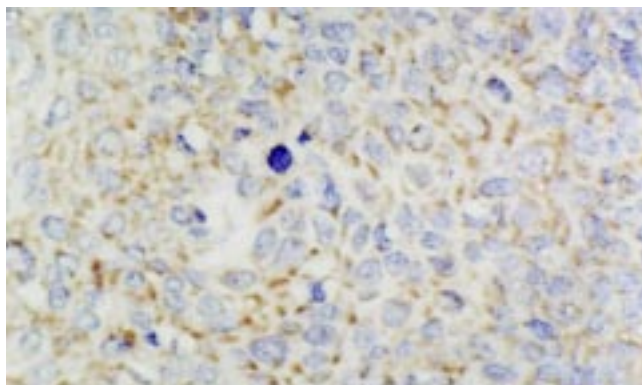


图 2 胃癌组织中 iNOS(++) 表达 ($\times 400$)

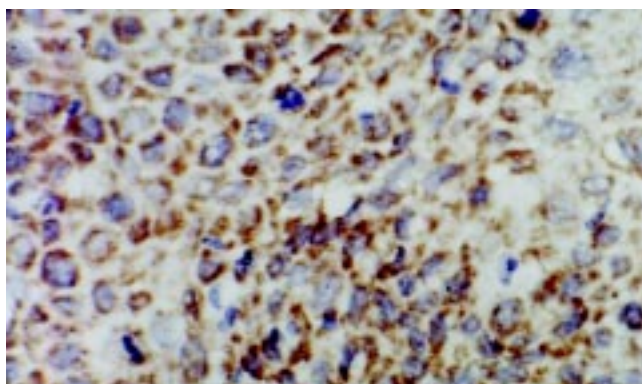


图 3 胃癌组织中 iNOS(+++) 表达 ($\times 400$)

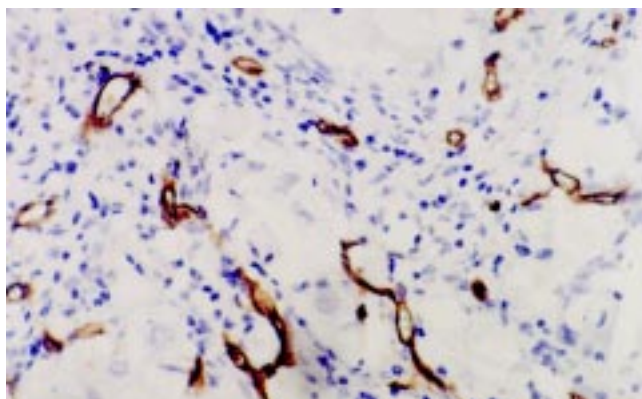


图 4 胃癌组织中 MVD (CD₃₄ 标记) ($\times 200$)

3 讨论

内源性 NO 由 NOS 催化 L- 精氨酸末端胍基中的一个氮原子氧化而生成 , 是一种活性很强的无机自由基气体 , 其化学性质不稳定 , 体内半衰期仅 3-5 s , 难以直接测定 . 而 NOS 是 NO 产生的关键限速酶 , 故可通过检测 NOS 的表达间接反应 NO 在体内的含量 . 在体内 , 根据存在的部位及作用机制 , NOS 可分为结构型 NOS (constitutive NOS, cNOS) 和诱导型 NOS (inducible NO synthase, iNOS) 二类^[12] . cNOS 主要存在于神经细胞和内皮细胞中 , 合成及释放的 NO 量少 , 而 iNOS 存在于几乎所有组织的细胞中 , 以巨噬细胞和血管平滑肌细胞内含量最多 , 能持续大量释放 NO . 多项研究表明 ,

慢性炎症中 NOS 过度表达可产生致突变的基因毒作用,巨噬细胞表达 iNOS 可使 DNA 脱氨基,诱导 NO 产生的淋巴细胞,也可引起各种 DNA 病变^[13].近年来研究表明 iNOS 与肿瘤关系密切^[14-24].而且在胃癌组织中表达明显高于正常组织,在胃癌发展中起重要作用^[25].我们的研究也显示 iNOS 在胃癌组织中有高表达(70 %).

癌瘤的生长和转移依赖于新生血管形成,癌瘤内微血管密度与其侵袭性有关^[26-28].NO 作为癌瘤细胞信号转导途径中重要的信使分子,调节与细胞增生相关基因的表达,增加癌瘤血供和血管形成,促进其生长、侵袭、转移.Jenkins et al^[29]将转染 iNOS 基因的结肠腺癌 DLD-1 细胞接种裸鼠皮下,发现癌瘤生长速度快于野生型及转染空白质粒 DLD-1 细胞,而且瘤体中有大量新生血管形成,分泌 NO 的 DLD-1 细胞形成的癌瘤侵袭性强.Gallo et al^[30]将高 NOS 表达的癌瘤细胞移植入兔角膜中有大量新生血管形成,用 L-NAME(NOS 抑制剂)处理时血管形成明显减少.在我们的研究中,胃癌组织中 iNOS 的表达及 MVD 均值与淋巴结转移有密切关系.而且, iNOS 的表达程度不同, MVD 值也不同,随着 iNOS 表达的逐步增强 MVD 均值也逐渐增高,淋巴结转移组的 iNOS 阳性率、MVD 均值均高于无淋巴结转移组,提示 iNOS 表达与胃癌血管形成及淋巴转移有相关性.癌瘤血管壁结构与正常血管不同,其通透性的增加是通过血管内皮生长因子(VEGF)促进血管通透性的,而且在 NO 作用下 VEGF 增加血管通透性的作用被增强,NO 还可以通过与缓激肽、TNF- α 、IL-2 等相互作用增加癌瘤血管通透性.NO 通过增加血管通透性不但为癌瘤细胞提供了营养物质和 O₂,而且通过血管内物质外渗,促进了血管内皮细胞的增生、移行及癌瘤细胞的转移.

血管的形成在癌瘤的形成与发展中起重要作用,我们的研究表明胃癌组织中 iNOS 表达与微血管密度及淋巴结转移有相关性,利用 iNOS 抑制剂作为抗癌瘤血管形成的药物,为肿瘤治疗提供了一条新思路.

4 参考文献

- 1 彭曦,汪仕良.一氧化氮与胃肠运动.世界华人消化杂志 1998;6:445-446
- 2 陈玺华,李正中,鲍民生,郑绘霞.一氧化氮在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用.世界华人消化杂志 1999;7:295-297
- 3 Yun J,Guo F,Ebert MPA,Malfetheriner P. Expression of inducible nitric oxide synthase in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:430-431
- 4 黄颖秋,王昕,李骢,刘丽.一氧化氮在食管反流病发病机制中的作用.

- 世界华人消化杂志 2000;8:253-255
- 5 黄颖秋,王昕,李骢,刘丽.糖尿病患者一氧化氮水平与食管内 pH 值及食管动力变化的临床意义.世界华人消化杂志 2000;8:374-376
- 6 乐桥良,文晓冬.大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用.世界华人消化杂志 2000;8:815-816
- 7 沈忠英,沈文英,陈铭华,洪超群,沈健.氧化砷诱导食管癌细胞凋亡的变化.世界华人消化杂志 2000;8:1101-1104
- 8 郭津生,古永亮,王吉耀,曹之宪.结构型与诱导型一氧化氮合酶在大鼠胃溃疡模型中的表达和活性变化.世界华人消化杂志 2001;9:288-292
- 9 Zhou JF,Cai D,Zhu YG,Yang JL,Peng CH,Yu YH. A study on relationship of nitric oxide,oxidation,peroxidation, lipoperoxidation with chronic cholecystitis. *World J Gastroenterol* 2000;4:501-507
- 10 王玉梅,冯国和,赵桂珍,乔光彦.肿瘤坏死因子- α 及一氧化氮对暴发性肝衰竭肝损害的作用.世界华人消化杂志 2002;10:646-649
- 11 Maede H, Akaike T.Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry(Mosc)* 1998;63:854-865
- 12 Pignatelli B, Bancel B, Esteve J. Inducible nitric oxide synthase, antioxidant enzymes and Helicobacter pylori infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:439-447
- 13 Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanake M. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999;70:222-229
- 14 林震,陈仕平,杨发端,林秀芳.一氧化氮合酶在膀胱癌中的表达及临床意义.临床泌尿外科杂志 2002;17:74-76
- 15 王永忠,冯振卿,曹友清.食管癌和癌旁组织中诱导型一氧化氮合酶的表达及临床意义.南京医科大学学报 2002;22:152-153
- 16 Wink DA, Vodovotz Y. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:711-721
- 17 陈伟良,曾曙光,李海刚.舌鳞癌组织 iNOS mRNA 表达及其意义.癌症 2002;21:314-318
- 18 刘剑仑,于文胜,李超,杨南武,刘剑勇.iNOS 在肝细胞癌中的表达及与肿瘤血管生成的关系.广西医科大学学报 2001;18:466-467
- 19 王永忠,查小英.一氧化氮合酶在常见消化道恶性肿瘤中的检测及意义.江苏大学学报 2002;12:13-14
- 20 姜涛,刘玉林,李晨,程庆书.肺癌组织 NOS 活性与 MVD 的关系及临床意义.第三军医大学学报 2002;24:459-460
- 21 王东,仲召阳,陈俐,李增鹏.骨肉瘤 iNOS 过度表达与血管生成及预后的关系.第三军医大学学报 2000;22:776-778
- 22 姜军梅,李明,李学会.原发性肝癌和癌旁组织中 iNOS 的表达.中华肝脏病杂志 1998;6:147-149
- 23 张苏展,彭佳萍,叶锋,郑树.一氧化氮合酶在乳腺癌中的表达及其与血管形成机制的探讨.癌症 2001;20:762-765
- 24 邹益友,冯德云,伍赶球,郑晖.一氧化氮合酶 mRNA 在胃癌细胞内的表达.中华消化杂志 1999;19:213-214
- 25 Son HJ, Kim YH, Park DI, Kim JJ. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:383-388
- 26 买玲.肿瘤微血管密度与转移.河南医学研究 1999;8:378-379
- 27 李伟.肿瘤微血管密度的研究进展.实用肿瘤学杂志 1999;13:159-161
- 28 杨健,陈增良.血管新生与肿瘤生长的研究进展.浙江大学学报 2001;30:190-192
- 29 Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL. Role of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4392-4396
- 30 Gallo O, Emanuela M, Lucia M. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-597

胃癌 P-糖蛋白表达与化疗效果相关

陈春燕, 朱兆华

陈春燕, 朱兆华, 中山大学附属第二医院消化内科 广东省广州市 510120
陈春燕, 女, 1974-04-14 生, 福建省福州市人, 汉族. 1999 年中山医科大学本科毕业, 2002 年硕士毕业, 从事胃肠疾病的研究.
项目负责人: 朱兆华, 510120, 广东省广州市沿江西路 107 号, 中山大学附属第二医院消化内科.
电话: 020-81332390
收稿日期: 2002-07-16 接受日期: 2002-07-30

Relationship between expression of P-glycoprotein and efficacy of chemotherapy in gastric cancer

Chun-Yan Chen, Zhao-Hua Zhu

Chun-Yan Chen, Zhao-Hua Zhu, Department of Gastroenterology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Correspondence to: Zhao-Hua Zhu, Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, 107 Yan Jiang lu, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China.
Received: 2002-07-06 Accepted: 2002-07-30

Abstract

AIM: To investigate the significance of the expression of P-glycoprotein and the relationship between its expression and the efficacy of chemotherapy in patients with gastric cancer.

METHODS: P-glycoprotein was examined by immunohistochemical staining in 101 specimens of paraffin embedded gastric cancer tissues.

RESULTS: The expression rates of P-glycoprotein in normal gastric mucosa, paracancerous tissues and gastric cancer tissues were 13 %, 22 % and 43 %, respectively ($P < 0.05$). The expression rates of P-glycoprotein in the highly and moderately differentiated tumors (58 % and 80 %, respectively) were significantly higher than those in the lowly and poorly differentiated tumors (36 % and 25 %, respectively) ($P < 0.01$). The postoperative cumulative survival rate of the patients receiving chemotherapy was significantly higher than that of the patients without chemotherapy in P-glycoprotein-negative patients with gastric cancer ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of P-glycoprotein was correlated with the degree of tumor differentiation and influenced the efficacy of postoperative chemotherapy.

Chen CY, Zhu ZH. Relationship between expression of P-glycoprotein and efficacy of chemotherapy in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua ZaZhi* 2003;11(1):36-38

摘要

目的: 分析 P-糖蛋白表达的临床意义, 其表达与化疗疗效的关系, 通过检测 P-糖蛋白的表达而指导临床对胃癌患者的化疗.

方法: 应用 SP 免疫组化方法检测 101 例胃癌石蜡标本, 79 例胃癌旁组织, 15 例正常胃组织.

结果: P-糖蛋白在正常胃黏膜、胃癌旁组织、胃癌组织中的表达分别为 13 %, 22 %, 43 %, $P < 0.05$. P-糖蛋白的表达在高分化、中分化胃癌中 (58 %, 80 %) 显著高于低分化、未分化胃癌 (36 %, 25 %), $P < 0.05$. P-糖蛋白阴性组有化疗患者和无化疗患者两组的术后累积生存率有显著差异, $P < 0.01$.

结论: P-糖蛋白的表达与胃癌的分化程度有关, 影响术后化疗疗效.

陈春燕, 朱兆华. 胃癌 P-糖蛋白表达与化疗效果相关. *世界华人消化杂志* 2003;11(1):36-38

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/36.htm>

0 引言

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是导致胃癌对抗肿瘤药物产生耐药的重要原因之一^[1-5]. 他编码的 P-糖蛋白 (p-glycoprotein, P-gp) 是一种能量依赖性药物排出泵, 通过 ATP 提供能量, 可将抗肿瘤药物由胞内泵出胞外, 使其细胞毒作用减弱或消失而出现耐药性^[6-10]. 我们检测 P-gp 在胃癌中的表达, 分析表达的临床意义, 表达与化疗疗效的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 随机抽取胃癌石蜡标本 101 例, 胃癌旁组织 79 例, 其中 88 例胃癌患者已知其生存期. 再随机抽取正常胃组织标本 15 例作为对照.

1.2 方法 采用 SP (streptavidin - peroxidase, 链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶) 方法. DAB 染色, 用 PBS 代替一抗作阴性对照, 已知 P-gp 阳性结肠癌标本作为阳性对照. P-gp 单抗购自福州迈新公司, 结果判断以细胞膜上和 (或) 细胞质内出现棕黄色染色为阳性细胞, 整张切片中阳性细胞数占 $\geq 5\%$ 即为阳性.

统计学处理 计数资料率的比较使用 χ^2 检验, 计量资料两组均数的比较使用 t 检验, 累积生存率的比较使用 Log-rank 检验.

2 结果

胃癌组织 P-gp 阳性率显著高于正常胃黏膜 (42.6 % vs 13.3 %, $P < 0.01$) 和胃癌旁组织 (42.6 % vs 21.5 %, $P < 0.05$) 但在正常胃黏膜与胃癌旁组织间无显著差异 (13.3 % vs

21.5 %, $P > 0.05$). P-gp 的表达与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、大体类型无关 ($P > 0.05$). 2.1 P-gp 与 TNM 分期、肿瘤病理的关系 P-gp 的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期无关 ($P > 0.05$). P-gp 的表达与胃癌病理学类型无关 ($P > 0.05$, 表 1), 但与肿瘤分化程度相关 ($r = 0.24, P < 0.01$). 即分化程度差的胃癌其 P-gp 表达率降低.

表 1 P-gp 与肿瘤病理学关系

病理	n	P-gp		
		阳性	阴性	阳性率 %
管状腺癌	22	15	7	68
低分化腺癌	59	22	37	37
黏液细胞癌	5	1	4	20
黏液腺癌	11	4	7	36
未分化癌	4	1	3	25
肿瘤分化				
高	12	7	5	58 ^b
中	10	8	2	80
低	75	27	48	36
未	4	1	3	25

^b $P < 0.01$, vs 组内.

2.2 P-gp 与术后化疗的关系 有术后化疗者共 58 例, 使用化疗药物以氟脲嘧啶类化疗药 (包括 5-Fu, UFT, FTL, FT207) 与生化调节剂醛氢叶酸为主, 其余化疗药包括阿霉素、丝裂霉素、铂类等. 经 Log-rank 检验, 显示 P-gp 阴性组有化疗和无化疗两组术后累积生存率有显著差异 ($P < 0.01$, 表 2). 有化疗组术后累积生存率高于无化疗组. P-gp 阳性组有化疗和无化疗两组术后累积生存率无显著差异 ($P > 0.05$).

表 2 P-gp 与术后累积生存率 (%)

T/mo	P-gp 阴性		P-gp 阳性	
	化疗组 (n=27)	无化疗组 (n=21)	化疗组 (n=31)	无化疗组 (n=9)
12	59 ^b	24	39	42
24	44 ^b	12	25	21
36	27 ^b	6	17	14
48	13 ^b	6	8	0

^b $P < 0.01$, vs 无化疗组.

3 讨论

我们发现 P-gp 在胃癌中的表达高于正常胃黏膜及胃癌旁组织, 其表达与胃癌的生物学行为无关, 与文献 [11-13] 报道相符, P-gp 的表达与分化程度相关, 高、中分化胃癌表达高于低、未分化 [14-16]. 此种现象可以说明, 对于分化差的胃癌患者化疗较敏感, 而分化较好的胃

癌患者化疗不敏感 [15]. P-gp 的表达是导致胃癌产生耐药的原因之一, 我们通过对胃癌组织切片 P-gp 的检测, 发现 P-gp 阴性组有术后化疗患者的术后累积生存率显著高于无术后化疗组, 而 P-gp 阳性组的术后化疗患者与无术后化疗患者的术后累积生存率无显著差异. 由此推测不表达 P-gp 的患者由于对化疗较敏感, 所以化疗能提高生存率, 而 P-gp 阳性的患者由于已存在原发性耐药, 对化疗药物不敏感, 所以即使进行术后化疗, 亦不能提高生存率 [16-21]. 同理, 对于不表达 P-gp 的患者, 在术后化疗过程中是否会产生继发性耐药? 如果我们能对胃癌患者在化疗前后行 P-gp 检测则能进一步说明这个问题.

当 P-gp 表达阳性者, 是否就不予化疗? 近年来对 P-gp 研究的深入, 发现能逆转 P-gp 的耐药方法有: (1) 抑制 P-gp 的功能, 使其作用下降或不能发挥作用, 包括钙通道阻滞剂 [22,23], 抗雌激素药 [24,25], 环孢霉素 [26], 或用免疫治疗的方法, 如用某种 P-gp 抗体封闭 P-gp, 从而改变 MDR 细胞对化疗药物的主动外排功能, 逆转细胞的耐药性 [27]. (2) 降低蛋白的合成, 如调节蛋白激酶 PKA 的活性, 抑制 mdm 的转录, 使 P-gp 合成降低 [28, 29]. (3) 针对转录水平, 即 mRNA 水平, 如用反义核酸在 mRNA 水平减少相应蛋白质的表达, 或用核酶直接切割靶 RNA, 阻断其表达, 达到抑制蛋白产物产生的目的 [30-32]. 钙通道阻滞剂维拉帕米 (VER) 已被用于临床 [33]. 但其心血管系毒副作用, 限制了他的用量以及在临床中的应用 [34]. 尽管 P-gp 的表达影响化疗的效果, 但多药耐药的机制是多样且复杂的.

4 参考文献

- 俞丽芬, 吴云林. 消化道肿瘤与多药耐药基因的临床相关性研究进展. 华人消化杂志 1998;6:915-916
- Shi YQ, Xiao B, Miao JY, Zhao YQ, You H, Fan DM. Construction of eukaryotic expression vector pBK-fas and MDR reversal test of drug-resistant gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:309-312
- Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, Schrappe M, Buchner T, Schoch C, Haferlach T, Harbott J, Rate R, Dorken B, Ludwig WD. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica* 2000;85:711-721
- DeGeorge JJ, Ahn CH, Andrews PA, Brower ME, Giorgio DW, Goheer MA, Lee Ham D Y, McGuinn WD, Schmidt W, Sun CJ, Tripathi SC. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;41:173-185
- Chen GK, Lacayo NJ, Duran GE, Wang Y, Bangs CD, Rea S, Kovacs M, Cherry AM, Brown JM, Sikic BI. Preferential expression of a mutant allele of the amplified MDR1 (ABC1) gene in drug-resistant variants of a human sarcoma. *Br J Cancer* 2002;86:1578-1585
- Meijer GA, Schroeijers AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP, Scheper RJ. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP / MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J Clin Pathol* 1999;52:450-454
- Hoffmann J, Schmidt Peter P, Hansch W, Naundorf H, Bunge A, Becker M, Fichtner I. Anticancer drug sensitivity and expression of multidrug resistance markers in early passage hu

- man sarcomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2198-2204
- 8 Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG, Suurmeijer AJ. Drug resistance associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2798-2805
- 9 Ruiz Gomez MJ, Gil L, Souviron A, Martinez Morillo M. Multidrug resistance increment in a human colon carcinoma cell line by colchicine. *J Physiol Biochem* 2000;56:33-38
- 10 Maraldi NM, Zini N, Santi S, Scotlandi K, Serra M, Baldini N. P-glycoprotein subcellular localization and cell morphology in MDR1 gene transfected human osteosarcoma cells. *Biol Cell* 1999;91:17-28
- 11 Ni CR. Expression significance of GST- π , P-gp, Topo-II and nm23H1 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:897-901
- 12 Liu ZM, Shou NH. Expression significance of mdr1 gene in gastric carcinoma tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:145-146
- 13 赵行远, 夏传生, 吴建平, 侯 炜, 刘运芳. MDR1 产物 P-gp 在结肠肿瘤中表达的意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:991
- 14 Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Serpico R, Rubini C, Fioroni M, Fanali S, Piattelli A. The human multidrug resistance gene (MDR-1): immunocytochemical detection of its expression in oral SCC. *Anticancer Res* 2000;20:2891-2897
- 15 Tokunaga Y, Hosogi H, Hoppou J, Nakagami M, Tokuka A, Ohsumi K. Effects of MDR1/P-glycoprotein expression on prognosis in advanced colorectal cancer after surgery. *Oncol Rep* 2001;8:815-819
- 16 Xie ZJ, Yang XF, Gu ZY, Wu QL. P-glycoprotein expression in squamous cell carcinoma of the oral and maxillofacial region. *Chin J Dent Res* 2000;3:23-26
- 17 Galani E, Sgouros J, Petropoulou C, Janinis J, Aravantinos G, Dionysiou-Asteriou D, Skarlos D, Gonos E. Correlation of MDR-1, nm23-H1 and H Sema E gene expression with histopathological findings and clinical outcome in ovarian and breast cancer patients. *Anticancer Res* 2002;22:2275-2280
- 18 Tafuri A, Gregorj C, Petrucci MT, Ricciardi MR, Mancini M, Cimino G, Mecucci C, Tedeschi A, Fioritoni G, Ferrara F, Di Raimondo F, Gallo E, Liso V, Fabbiano F, Cascavilla N, Pizzolo G, Camera A, Pane F, Lanza F, Cilloni D, Annino L, Vitale A, Vegna ML, Vignetti M, Foa R, Mandelli F, Group. MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:974-981
- 19 Soni S, Pande P, Shukla NK, Ralhan R. Coexpression of Ets-1 and p53 in oral carcinomas is associated with P-glycoprotein expression and poor prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;28:336-342
- 20 Liang JA, Shiau YC, Yang SN, Lin FJ, Kao A, Lee CC. Prediction of chemotherapy response in untreated malignant lymphomas using technetium-99m methoxyisobutylisonitrile scan: comparison with P-glycoprotein expression and other prognostic factors. A preliminary report. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:140-145
- 21 Damiani D, Michelutti A, Michieli M, Masolini P, Stocchi R, Geromin A, Ermacora A, Russo D, Fanin R, Baccarani M. P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;116:519-527
- 22 Moins N, Cayre A, Chevillard S, Maublant J, Verrelle P, Finat Duclos F. Effects of MDR reversing agent combinations on the 3H-daunomycin accumulation in drug sensitive and drug-resistant human cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20:2617-2623
- 23 Dale IL, Tuffley W, Callaghan R, Holmes JA, Martin K, Luscombe M, Mist ry P, Ryder H, Stewart AJ, Charlton P, Wentym PR, Bevan P. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by XR9051, a novel diketopiperazine derivative. *Br J Cancer* 1998;78:885-892
- 24 Lucci A, Han TY, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC. Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug resistant cancer cells. *Cancer* 1999;86:300-311
- 25 Nathan FE, Berd D, Sato T, Mastrangelo MJ. Paclitaxel and tamoxifen: An active regimen for patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2000;88:79-87
- 26 Mealey KL, Barhoumi R, Burghardt RC, McIntyre BS, Sylvester PW, Hosick HL, Kochevar DT. Immunosuppressant inhibition of P-glycoprotein function is independent of drug-induced suppression of peptide-prolyl isomerase and calcineurin activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44:152-158
- 27 Parasrampur DA, Lantz MV, Birnbaum JL, Vincenti FG, Benet LZ. Effect of calcineurin inhibitor therapy on P-gp expression and function in lymphocytes of renal transplant patients: a preliminary evaluation. *J Clin Pharmacol* 2002;42:304-311
- 28 Parissenti AM, Gannon BR, Villeneuve DJ, Kirwan-rhude AF, Chadderton A, Gluck S. Lack of modulation of MDR1 gene expression by dominant inhibition of cAMP-dependent protein kinase in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 1999;82:893-900
- 29 Han Y, Shi YQ, Zheng Y, Nie YZ, Zhang HB, Zhang ML, Pan BR, Fan DM. Protein kinase C is related to multidrug resistance induced by MGR1-Ag. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:517-521
- 30 Prakash TP, Kawasaki AM, Johnston JF, Graham MJ, Condon TP, Manoharan M. Antisense properties of 2'-O-dimethylaminooxyethyl (2'-O-DMAOE) oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:829-832
- 31 Aoyagi S, Narlikar G, Zheng C, Sif S, Kingston RE, Hayes JJ. Nucleosome remodeling by the human SWI/SNF complex requires transient global disruption of histone-DNA interactions. *Mol Cell Biol* 2002;22:3653-3662
- 32 Rackstraw BJ, Stolnik S, Davis SS, Bignotti F, Garnett MC. Development of multicomponent DNA delivery systems based upon poly(amidoamine)-PEG co-polymers. *Biochim Biophys Acta* 2002;1576:269-286
- 33 Benderra Z, Morjani H, Trussardi A, Manfait M. Role of the vacuolar H⁺-ATPase in daunorubicin distribution in etoposide resistant MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance associated protein. *Int J Oncol* 1998;12:711-715
- 34 马强, 张振书, 王群英. 大肠癌多药耐药性的逆转. *世界华人消化杂志* 2001;9:822-825

胃癌组织三叶肽因子2表达与幽门螺杆菌感染的相关性

李慕琦,余保平,胡国勇,罗和生,于皆平,冉宗学

李慕琦,余保平,胡国勇,罗和生,于皆平,冉宗学,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
李慕琦,女,1977-11-10生,湖北省武汉人,汉族.2001年湖北医科大学本科毕业,现武汉大学人民医院消化内科住院医师,主要从事胃癌的病因及防治研究.项目负责人:余保平,430060,湖北省武汉市解放路238号,武汉大学人民医院消化内科. yubaoping62@yahoo.com.cn
电话:027-88041911-8469
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-02

TFF2 expression and *H.pylori* infection in gastric cancer tissues

Mu-Qi Li, Bao-Ping Yu, Guo-Yong Hu, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu, Zong-Xue Ran

Mu-Qi Li, Bao-Ping Yu, Guo-Yong Hu, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu, Zong-Xue Ran, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238# Jiefang Street, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubaoping62@yahoo.com.cn
Received: 2002-07-23 Accepted: 2002-08-02

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the expression of TFF2 and *H.pylori* infection in human gastric precancerous lesions and gastric cancer, and to explore the role of TFF2 and *H.pylori* in human gastric precancerous lesions and gastric cancer.

METHODS: The expression of TFF2 was immunohistochemically analyzed in paraffin-embedded samples obtained by endoscopic biopsy and subtotal gastrectomy specimens from 119 patients including chronic superficial gastritis (CSG, 16), chronic atrophic gastritis (CAG, 16), intestinal metaplasia (IM, 35), gastric epithelial dysplasia (GED, 23) and gastric cancer (CA, 25), and conditions of *H.pylori* infection were detected by means of Warthin-Starry staining.

RESULTS: TFF2 was located in the cell plasma of gastric mucous neck cells. The expressions of TFF2 were 100 %, 100 %, 0 %, 56 % and 0 % in CSG, CAG, IM, GED and CA, respectively. The density of TFF2 positive cells was higher in CSG with *H.pylori* infection than that without *H.pylori* infection (52.9 ± 7.3 vs 46.5 ± 13.0 , $P > 0.05$); but it was significantly lower in CAG and GED with *H.pylori* infection than that without *H.pylori* infection (18.2 ± 4.1 vs 37.9 ± 13.8 , $P < 0.01$ and 14.4 ± 9.3 vs 24.8 ± 10.2 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The high expression of TFF2 is associated with the protective mechanism after the gastric mucosal injury, the low expression of TFF2 in CAG might attribute to the decreased number of gastric gland cells secreting TFF2; but the re-expression of TFF2 in GED suggests that TFF2 is involved with the initiation of gastric cancer. The effect of

H.pylori on the expression of TFF2 depends on the status of gastric mucosa.

Li MQ, Yu BP, Hu GY, Luo HS, Yu JP, Ran ZX. TFF2 expression and *H.pylori* infection in gastric cancer tissues. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):39-42

摘要

目的:观察三叶肽因子2(trefoil peptide 2, TFF2)在胃癌及癌前病变中的表达状况及其与Hp感染的关系,初步探讨TFF2与Hp感染在胃癌及癌前病变中的作用及意义。

方法:应用免疫组化方法测定16例慢性浅表性胃炎,20例慢性萎缩性胃炎,35例肠上皮化生,23例胃上皮不典型增生和25例胃癌中TFF2的蛋白表达情况,同时应用Warthin-Starry法检测幽门Hp情况。

结果:(1)在慢性浅表性胃炎,慢性萎缩性胃炎,胃上皮不典型增生中均有TFF2的阳性表达,其阳性率分别为100 %, 100 %和56.5 %。而在肠上皮化生和胃癌组织内无TFF2的阳性表达,但在肠上皮化生周围的正常腺体有TFF2阳性表达。慢性浅表性胃炎TFF2的染色评分明显高于慢性萎缩性胃炎组。(2)在浅表性胃炎中,Hp感染阳性病例TFF2的阳性细胞密度值高于Hp感染阴性者(52.9 ± 7.3 vs 46.5 ± 13.0),但无统计学意义($P > 0.05$)。而在胃黏膜萎缩及胃黏膜上皮不典型增生中,Hp感染者TFF2的阳性细胞密度值又低于Hp感染阴性者,差异有显著性(18.2 ± 4.1 vs 37.9 ± 13.8 , $P < 0.01$ 和 14.4 ± 9.3 vs 24.8 ± 10.2 , $P < 0.05$)。

结论: TFF2在慢性浅表性胃炎中的高表达与黏膜损伤后所诱导的保护机制有关;慢性萎缩性胃炎TFF2的表达相对减少可能与分泌TFF2的胃黏膜腺体减少有关;但在不典型增生中TFF2的再表达可能参与了胃癌发生的早期阶段;Hp感染对TFF2表达的影响可能取决于胃黏膜病变的状态。

李慕琦,余保平,胡国勇,罗和生,于皆平,冉宗学.胃癌组织三叶肽因子2表达与幽门螺杆菌感染的相关性.世界华人消化杂志 2003;11(1):39-42
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/39.htm>

0 引言

三叶肽因子2(trefoil factor family 2, TFF2),又名解痉多肽(spasmolytic polypeptide, SP),是三叶肽家族成员之一。正常情况下,胃TFF2主要由胃体和胃窦的胃腺上皮黏液颈细胞合成与分泌^[1,2]。当胃肠道在不同的病理条件下时,TFF2基因表达迅速被上调,参与胃肠道

上皮的重建和修复过程.在 Hp 感染的慢性胃黏膜病变演化过程中,黏膜的损伤与修复是一持续存在的过程.TFF2 作为一种黏膜保护因子,可能在此过程中发挥了一定的作用.目前关于 TFF2 在胃癌及癌前病变中的表达情况的研究较少,与 Hp 感染的关系尚不清楚,我们通过免疫组织化学和 Warthin-Starry 染色法系统地回顾性检测胃癌及癌前病变中 TFF2 的蛋白表达和 Hp 感染情况,并探讨二者的相互关系,进一步阐明 TFF2 与 Hp 感染在胃癌及癌前病变中的作用及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 武汉大学人民医院2000-03/2001-03期间存档的胃镜活检及手术切除后标本 119 例.其中浅表性胃炎 16 例,萎缩性胃炎 20 例,胃黏膜肠上皮化生 31 例,胃上皮不典型增生 20 例及胃癌(均含癌旁黏膜)25 例.男 72 例,女 40 例,中位数为 35 岁.所有标本均用 40 g/L 甲醛固定,常规脱水,透明,浸蜡,制成 4 μ m 厚连续切片.鼠抗人 TFF2 单克隆抗体原液(novocastra Ltd),以 1:35 稀释后待用;S-P 试剂盒购自福州迈新公司;DAB 购自 Dako 公司;

1.2 方法 石蜡切片染色前常规脱蜡至水,微波炉抗原修复 20 min,染色采用 SP 法, DAB 显色,具体操作过程按 SP 试剂盒说明书完成.并设立阳性对照和阴性对照(以 TBS 缓冲液代替一抗).免疫组化完成后 24 h 内光镜下阅片, TFF2 染色评分标准:每张切片随机选取 5 个 100 $\times$ 视野,阳性细胞数 <5 % 为(-), 5-25 % 为(+), 25-75 % 为(++), >75 % 为(+++).同时采用全自动彩色图像分析仪, HPIAS2000 型图像分析软件检测阳性细胞密度值,用此间接反映 TFF2 蛋白的表达量.组织片常规脱蜡至水, 0.2 mol/L 醋酸缓冲液洗 2 次,入 10 g/L 硝酸银液内约 1 h,立即浸入显影液内 2-3 min, 56 $^{\circ}$ C 蒸馏水洗 1-2 min, 蒸馏水洗 1 次,依次脱水,透明,中性树胶封片,油镜下观察.见到胃黏膜表面和(或)胃小凹及肿瘤性腺腔中,棕褐色弯曲棒状或圆颗粒状小体,则为 Hp 感染阳性,无 Hp 检出者为 Hp 感染阴性.

统计学处理 以上数据均采用 SPSS10.0 统计分析软件进行 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 TFF2 在胃黏膜病变演化中的表达 TFF2 阳性表达于胃黏膜上皮近基底部的胃腺上皮的细胞质内,呈棕褐色,在慢性浅表性胃炎,慢性萎缩性胃炎,胃上皮不典型增生中均有 TFF2 的阳性表达,其阳性率分别为 100 %, 100 % 和 56.5 % (见图 1-3).而在肠上皮化生和胃癌组织内无 TFF2 的阳性表达,在肠上皮化生周围的正常腺体有 TFF2 阳性表达(见图 4,5).慢性浅表性胃炎 TFF2 的染色评分高于慢性萎缩性胃炎组(见表 1).

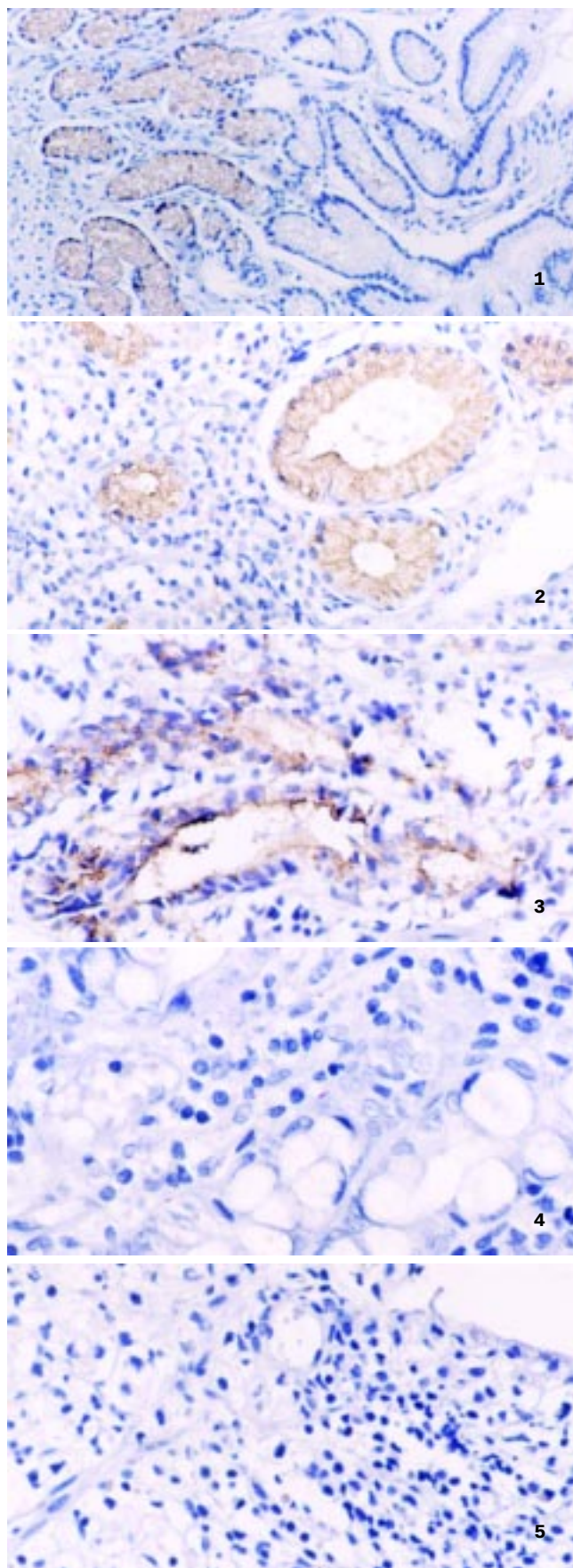


图1 TFF2 在慢性浅表性胃炎中的表达 阳性染色于细胞质(SP $\times$ 100)
图2 TFF2 在慢性萎缩性胃炎中的表达 阳性染色于细胞质(SP $\times$ 200)
图3 TFF2 在胃上皮不典型增生中的表达 阳性染色于细胞质(SP $\times$ 200)
图4 TFF2 在肠上皮化生中无表达 在周围正常腺体中有表达(SP $\times$ 400)
图5 TFF2 在胃癌中的无表达(SP $\times$ 200)

表 1 TFF2 在不同胃黏膜病变中的表达模式

分类	n	TFF2				阳性率%
		—	+	++	+++	
浅表性胃炎	16	0	1	5	10	100
萎缩性胃炎	20	0	5	11	4	100
肠上皮化生	35	35	0	0	0	0
不典型增生	23	10	9	2	2	56.5
胃腺癌	25	25	0	0	0	0

2.2 TFF2 的表达与 Hp 感染的关系 本组胃黏膜 Hp 的总检出率为 53.8 %,浅表性胃炎为 50 %,萎缩性胃炎为 60.0 %,胃黏膜肠上皮化生为 45.7 %,胃黏膜不典型增生为 52.5 %,胃癌为 64 %。在浅表性胃炎中, Hp 感染阳性病例 TFF2 的阳性细胞密度值高于 Hp 感染阴性者, 但无统计学意义(52.9 ± 7.3 vs 46.5 ± 13.0 , $P > 0.05$)(考虑原因: (1)病历数少; (2)肉眼观察 Hp 染色可能存在偏差)。而在胃黏膜萎缩及胃黏膜上皮不典型增生中, Hp 感染者 TFF2 的阳性细胞密度值又低于 Hp 感染阴性者, 差异有显著性, (18.2 ± 4.1 vs 37.9 ± 13.8 , $P < 0.01$ 和 14.4 ± 9.3 vs 24.8 ± 10.2 , $P < 0.05$)。

3 讨论

大量研究表明^[3-7], TFF2 可能通过增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向黏膜损伤表面迁移覆盖, 阻止质子对黏液层的渗透, 或与黏液中的糖蛋白相互作用, 加强黏液凝胶层抵抗黏膜表面有害物质的损伤等多种途径来保护胃黏膜。我们发现, TFF2 在所有的慢性浅表性胃炎和萎缩性胃炎中均高表达, 进一步说明了 TFF2 的表达是胃黏膜损伤所诱导的一种黏膜修复和保护机制。慢性萎缩性胃炎 TFF2 的染色评分低于慢性浅表性胃炎, 可能与分泌 TFF2 的胃黏膜腺体的数量因萎缩减少有关。在肠上皮化生和胃癌组织内无 TFF2 的阳性表达, 但在肠上皮化生周围和癌旁正常腺体却有 TFF2 阳性表达, 提示 TFF2 的表达可能与胃腺上皮细胞的分化表型有关。Machado et al^[8]研究发现, 在 96 例胃癌中有 10 例表达 TFF2(10.4 %), 而本组 25 例胃癌中却未发现 TFF2 的表达, 可能与我们收集的胃癌病例较少有关。我们发现, 在不典型增生中 TFF2 又重新获得表达, 而不典型增生正是胃癌的癌前病变形式, 这似乎提示 TFF2 可能在胃癌的发生早期起一定作用。早在 1999 年, Schmidt et al^[9]就发现, 一种表达 TFF2 的化生细胞系 SPEM(SP-expressing metaplastic lineage)出现在 91 % 的胃腺癌中, 且典型的 SPEM 细胞位于癌组织和不典型增生邻近的黏膜区域。随后, Yamaguchi et al^[10]也发现 SPEM 细胞出现在残胃癌组织的周围黏膜和胃癌手术切除活检的标本中。以上均提示 SPEM 细胞与胃癌的发生有明显的相关性, 但 TFF2 与胃癌的关系尚无定论。最近 Farrell et al^[11]研究发现, 在 TFF2 缺陷鼠模型实验中, 实验鼠的胃黏膜

增生减低, 胃酸相应增加, 暗示 TFF2 通过刺激黏膜增生和降低胃酸分泌起到提高黏膜修复的功能。但在另一方面, TFF2 的刺激黏膜增生和降低胃酸分泌的作用又将增加胃癌发生的风险。

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一^[12-20], Hp 感染又是导致胃黏膜病变最常见的致病因子之一^[21-40]。TFF2 作为一种黏膜保护因子, 是否 Hp 感染会影响 TFF2 的表达呢? 已有研究报道^[9,41,42], 在 Hp 感染的患者和伴有胃黏膜癌前和癌性病变的 Hp 感染小鼠中, 都发现表达 TFF2 的胃黏液颈细胞的数量有增加, 这似乎提示 Hp 感染可能引起胃黏液细胞的增生, 从而增加 TFF2 的表达。为了进一步阐明 TFF2 在 Hp 感染性胃黏膜病变中的作用, 我们又回顾性的检测了 Hp 的感染情况, 发现在浅表性胃炎中, Hp 感染阳性病例 TFF2 的阳性细胞密度值高于 Hp 感染阴性者, 虽无统计学意义($P > 0.05$), 但提示 Hp 感染的早期是刺激或诱导 TFF2 表达的, 可能与 Hp 感染刺激胃黏液细胞增生有关。而在胃黏膜萎缩及胃黏膜上皮不典型增生中, Hp 感染者 TFF2 的阳性细胞光密度值又低于 Hp 感染阴性者, 我们推测可能是 Hp 感染所导致正常分泌 TFF2 的胃黏膜上皮细胞的大量破坏减少的结果。由上可见, Hp 感染影响 TFF2 表达的变化可能与胃黏膜状态有关, Hp 感染是否直接影响 TFF2 基因的表达, 还须进一步的研究。

4 参考文献

- Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 2001;16:319-334
- Semple JI, Newton JL, Westley BR, May FE. Dramatic diurnal variation in the concentration of the human trefoil peptide TFF2 in gastric juice. *Gut* 2001;48:648-655
- Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulson R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000;47:792-800
- May FE, Semple JI, Newton JL, Westley BR. The human two domain trefoil protein, TFF2, is glycosylated in vivo in the stomach. *Gut* 2000;46:454-459
- Poulsen SS, Thulesen J, Christensen L, Nexø E, Thim L. Metabolism of oral trefoil factor 2 (TFF2) and the effect of oral and parenteral TFF2 on gastric and duodenal ulcer healing in the rat. *Gut* 1999;45:516-522
- Otto WR, Patel K. Trefoil factor family (TFF)-domain peptides in the mouse: embryonic gastrointestinal expression and wounding response. *Anat Embryol (Berl)* 1999;199:499-508
- Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 1999;103:R31-R38
- Machado JC, Nogueira AM, Carneiro F, Reis CA, Sobrinho-Simoes M. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J Pathol* 2000;190:437-443
- Schmidt PH, Lee JR, Joshi V, Playford RJ, Poulson R, Wright NA, Goldenring JR. Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. *Lab Invest* 1999;79:639-646
- Yamaguchi H, Goldenring JR, Kaminishi M, Lee JR. Identification of spasmodic polypeptide expressing metaplasia (SPEM)

- in remnant gastric cancer and surveillance postgastrectomy biopsies. *Dig Dis Sci* 2002;47:573-578
- 11 Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002;109:193-204
 - 12 Cai L, Yu SZ, Zhan ZF. Cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism and gastric cancer in Changle, Fujian rovince. *World J Gastroenterol* 2001;7:792-795
 - 13 Xiao HB, Cao WX, Yin HR, Lin YZ, Ye SH. Influence of L-methionine-deprived total parenteral nutrition with -fluorouracil on gastric cancer and host metabolism. *World J Gastroenterol* 2001;7: 698-701
 - 14 He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR. Expression, deletion [was deletion] and mutation of p16 gene in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:515-521
 - 15 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study. *World J Gastroenterol* 2001;7:506-509
 - 16 Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ, Zhang YQ, Huang QS, Ma WY, Chai YB, Jin M. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:500-505
 - 17 Niu WX, Qin XY, Liu H, Wang CP. Clinicopathological analysis of patients with gastric cancer in 1200 cases. *World J Gastroenterol* 2001;7:281-284
 - 18 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
 - 19 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H.pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
 - 20 Cai L, Yu SZ, Ye WM, Yi YN. Fish sauce and gastric cancer: an ecological study in Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:671-675
 - 21 Lu SY, Pan XZ, Peng XW, Shi ZL, Lin L, Chen MH. Effect of *Hp* infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:386-388
 - 22 Wang DX, Fang DC, Li W, Du QX, Liu WW. A study on relationship between infection of *Helicobacter pylori* and inactivation of antioncogenes in cancer and pre-cancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:984-987
 - 23 Guo CQ, Wang YP, Liu GY, Ma SW, Ding GY, Li JC. Study on *Helicobacter pylori* infection and -p53, c-erbB-2 gene expression in carcinogenesis of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:313-315
 - 24 He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomerase expression, *Hp* infection and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:505-508
 - 25 Lu W, Chen LY, Gong HS. PCNA and c-erbB-2 expression in gastric mucosal intestinal metaplasia with *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:111-113
 - 26 Yang Y, Deng CS, Yao XJ, Liu HY, Chen M. Effect of *Helicobacter pylori* on morphology and growth of gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:500-504
 - 27 Lu SY, Pan XZ, Peng XW, Shi ZL. Effect of *Hp* infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:760-762
 - 28 Liang HJ, Gao JH, Liu WW, Fang DC, Men RP. Longterm effects of concentrated *Helicobacter pylori* culture supernatant on gastric mucosa of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:861-863
 - 29 Gao JH, Liang HJ, Liu WW, Fang DC, Wang ZH. Expression of C-myc gene protein and epidermal growth factor receptor in gastric mucosa pre and post *Helicobacter pylori* clearance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1018-1019
 - 30 Peng ZS, Liang ZC, Liu MC, Ouyang NT. Studies on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis in *Hp* associated gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:218-219
 - 31 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Gao JH, Wang ZH. Apoptosis and proliferation induced by *Helicobacter pylori* and its association with p53 protein expression in gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1265-1268
 - 32 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Yang SM, Zhao L. Gastric epithelial apoptosis induced by *Helicobacter pylori* and its relationship with Bax protein expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:860-862
 - 33 Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Mitsuno Y, Hirata Y, Yamaji Y, Akanuma M, Shiratori Y, Omata M. *H.pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving I kappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology* 2000;119:97-108
 - 34 Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 2001; 121:784-91
 - 35 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H. pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
 - 36 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of *H. pylori* associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001;7:779-782
 - 37 Yao YL, Xu B, Song YG, Zhang WD. Overexpression of cyclin E in Mongolian gerbil with *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:60-63
 - 38 Morgner A, Miehke S, Stolte M, Neubauer A, Alpen B, Thiede C, Klann H, Hierlmeier FX, Ell C, Ehninger G, Bayerdorffer E. Development of early gastric cancer 4 and 5 years after complete remission of *Helicobacter pylori* associated gastric low grade marginal zone B cell lymphoma of MALT type. *World J Gastroenterol* 2001;7:248-253
 - 39 Miehke S, Kirsch C, Dragosics B, Gschwandler M, Oberhuber G, Antos D, Dite P, Lauter J, Labenz J, Leodolter A, Malfertheiner P, Neubauer A, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: current status of the Austrian Czech German gastric cancer prevention trial (PRISMA Study). *World J Gastroenterol* 2001;7:243-247
 - 40 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Changle County, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376
 - 41 Wang TC, Goldenring JR, Dangler C. Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology* 1998;114:675-689
 - 42 Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000;118:36-47

血管生成与胃癌发生之间关系的实验研究

陶厚权, 邹寿椿, 王瑞年, 林言箴

陶厚权, 邹寿椿, 浙江省人民医院外科 浙江省杭州市 310014
王瑞年, 上海第二医科大学病理教研室 上海市 200025
林言箴, 上海第二医科大学瑞金医院外科 上海市 200025
项目负责人: 陶厚权, 310014, 浙江省杭州市, 浙江省人民医院外科.
houquantao@yahoo.com
电话: 0571-85132615 传真: 0571-85131448
收稿日期: 2002-03-29 接受日期: 2002-06-14

Relationship between gastric carcinogenesis and angiogenesis

Hou-Quan Tao, Shou-Chun Zou, Rui-Nian Wang, Yan-Zhen Lin

Hou-Quan Tao, Shou-Chun Zou, Department of Surgery, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China
Rui-Nian Wang, Department of Pathology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Yan-Zhen Lin, Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Correspondence to: Dr. Hou-Quan Tao, Department of Surgery, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China. houquantao@yahoo.com
Received: 2002-03-29 Accepted: 2002-06-14

Abstract

AIM: To study the relationship between gastric carcinogenesis and angiogenesis.

METHODS: Experimental model of gastric precancerous lesions and carcinomas was established in rats by chemical carcinogen, N-methyl-N'-nitro-soguanidine (MNNG). The specimens were collected in groups at different time points from pre-malignant precursor to gastric carcinoma, the sections were stained by HE and angiogenesis was observed. Tissue sections were also immunohistochemically stained for CD34 antigen, a marker for endothelial cells, and the microvessels were counted.

RESULTS: Only a few microvessels were found in the hyperplastic stage of gastric mucosal glands, but angiogenesis was increased markedly and heterogeneously distributed in the dysplastic stage, especially in specimens with moderate and severe degree of dysplasia as well as in the intra-mucosal carcinoma. Profuse vascularity in the frontier of tumor invasion and tumor stroma was found in the infiltrating carcinoma. Comparison of microvessel counts in low grade lesions (hyperplasia and mild dysplasia) with microvessel counts in moderate (26.3 ± 9.6 vs 17.1 ± 5.6 , $P < 0.05$) and severe dysplasia lesions (32.5 ± 11.7 vs 17.1 ± 5.6 , $P < 0.01$) showed a statistically significant increase in the more advanced lesions, but there was no significant difference in vessel count between moderate and severe degree of dysplasia.

CONCLUSION: Angiogenesis is switched on at the early stage of gastric carcinogenesis, and becomes more pronounced with the progress toward more advanced stage. There is a

close relationship between gastric carcinogenesis and angiogenesis.

Tao HQ, Zou SC, Wang RN, Lin YZ. Relationship between gastric carcinogenesis and angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):43-46

摘要

目的: 研究血管生成与胃癌发生之间的关系。

方法: 利用化学致癌剂 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱变建立大鼠胃癌前病变及胃癌模型, 观察胃癌发生过程中不同阶段血管生成情况, 并采用抗 CD34 抗体的免疫组化方法显示不同癌前病变期微血管数量(MVC)变化。

结果: 胃黏膜腺体处于增生期, 血管生成很少, 至异型增生阶段, 尤其是中、重度异型增生阶段或黏膜内癌时, 血管生成明显增多并呈明显的异质性分布, 至浸润性癌期, 浸润前缘周围血管异常丰富, 肿瘤组织间质也有血管生成。与增生期和轻度异型增生相比, 中、重度异型增生的微血管数(MVC)明显增高(26.3 ± 9.6 vs 17.1 ± 5.6 , 32.5 ± 11.7 vs 17.1 ± 5.6) (P 分别 < 0.05 , 0.01), 但中度与重度异型增生的微血管数差别不明显。

结论: 血管生成在胃癌发生早期即已启动, 随着病变损害向进展期发展而愈加明显, 与胃癌的发生发展关系密切。

陶厚权, 邹寿椿, 王瑞年, 林言箴. 血管生成与胃癌发生之间关系的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11(1):43-46
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/43.htm>

0 引言

肿瘤生长和转移依赖于新生血管生成的概念早在 30 a 前就已提出^[1-9], 由肿瘤产生的多种血管生成因子在十几年也相继得以确认^[10-15]. 在一些实体性肿瘤, 新生血管的数目与临床预后有一定的关系, 表明了肿瘤克隆的侵袭性与血管生成之间的相关性^[16-20]. 抗血管生成治疗能明显阻止肿瘤生长和转移的实验性研究进一步提示, 肿瘤的生长需要新生血管生成^[21-32]. Folkman et al 发现在肿瘤发生的早期血管生成即已启动, 血管生成的启动是肿瘤表型的一个独特和必需的成分, 并自始至终陪伴着肿瘤的生长和发展. 由于人体恶性肿瘤发生的早期材料难以获得, 故研究较少, 仅在人乳腺导管内癌和子宫颈癌的活检组织中证实了转基因模型中所见到的现象. 为探索血管生成与胃癌发生的关系, 本研究采用化学致癌剂诱变建立大鼠胃癌模型, 观察

胃癌前病变及胃癌形成过程中不同阶段的血管生成情况,以期阐明血管生成在胃癌发生中的启动及演进。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ wistar 大鼠 50 只,10 周龄,体重 90 ± 5 g,分笼饲养,饲以市售饲料,饮用水按 100 mg/L 加入 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG),隔日换新鲜配制液.根据文献及以往胃癌实验模型制备的经验,饲以 MNNG 6-8 mo 后,大鼠可发生腺胃癌前和癌病变,故自 24-32 wk 期间,分批将大鼠处死,肉眼观察胃肠道病变,全胃壁取材,40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋切片,一份作 HE 染色以观察胃组织病变及血管生成改变,另一份用于免疫组织化学染色进行微血管计数。

1.2 方法 采用抗 CD34 单克隆抗体(1:50, Oncogen Inc.),进行 LSAB 法免疫组织化学染色(LSAB 试剂盒购自 Dako Inc.),方法简述如下:切片经二甲苯脱蜡,各级酒精水化,3 ml/L H_2O_2 /甲醇孵育 30 min,磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤 3 次,0.5 g/L 蛋白酶 K 消化 20 min, PBS 洗涤,1:400 抗 CD34 抗体孵育 2 h, PBS 洗涤,1:400 稀释的生物素标记的第二抗体孵育 1 h, PBS 洗涤,1:400 稀释的过氧化物酶-链酶卵白素孵育 1 h, PBS 洗涤, DAB 显色,苏木素复染.20×10 倍显微镜下,随机分别选择 5 个病变区和邻近的正常胃黏膜组织进行微血管计数(MVC),结果以 5 个区域的均数表示。

统计学处理 血管数(MVC)比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 胃癌发生不同病变期血管生成改变 根据大鼠腺胃的病理变化,将病变分成 4 个阶段:(1)充血反应期:黏膜浅层有不同程度的充血反应,但腺体无明显增生;(2)增生期:胃小凹上皮及腺颈部增生,固有层和黏膜下间质可见少量血管增生(图 1);(3)异型增生期:腺体形状不规则,排列紊乱,且分布稀疏不均,细胞核有不同程度的增大和深染,呈多形性,随异型性程度的加重,血管增生也随病变的发展而增多,突出的表现是血管在黏膜肌下或突破黏膜肌,向异型增生腺体的某一区域生长,但其分布具有明显异质性(图 2);(4)浸润性癌时,腺体极不规则,有的已突破黏膜肌向黏膜下层呈浸润性生长,细胞异型性明显,核深染,核分裂像多见,浸润前缘血管密集,腺体之间的间质中也有较多血管,随着病变发展,出现纤维增生,血管腔被挤压变小(图 3)。

2.2 大鼠不同癌前病变阶段血管数(MVC)的比较 在 50 例大鼠中,6 例呈增生性改变,轻、中度异型增生分别为 5 例和 6 例,9 例呈重度异型增生,其余均呈典型的胃癌组织学改变.在抗 CD34 抗体的 LSAB 染色时,与邻近正常上皮相比,异型增生改变的胃黏膜下方有广泛网状结构的血管生成,这种血管形成的区

域在正常组织和异型增生之间有明显的分界线.增生期和轻度异型增生期的 MVC 与邻近正常组织 MVC 间无明显差别(17.1 ± 5.6 vs 15.6 ± 5.2)($P > 0.05$),而中、重度异型增生的 MVC 与邻近正常组织 MVC 之间有明显差别(26.3 ± 9.6 vs 16.4 ± 5.1 , 32.5 ± 11.7 vs 19.2 ± 7.7)(P 均 < 0.05),至浸润性癌时, MVC 为 39.7 ± 10.3 ,高于邻近正常组织一倍以上($P < 0.001$)(表 1).同样由表 1 可知,新生血管生成的程度随病变趋于严重而增加,

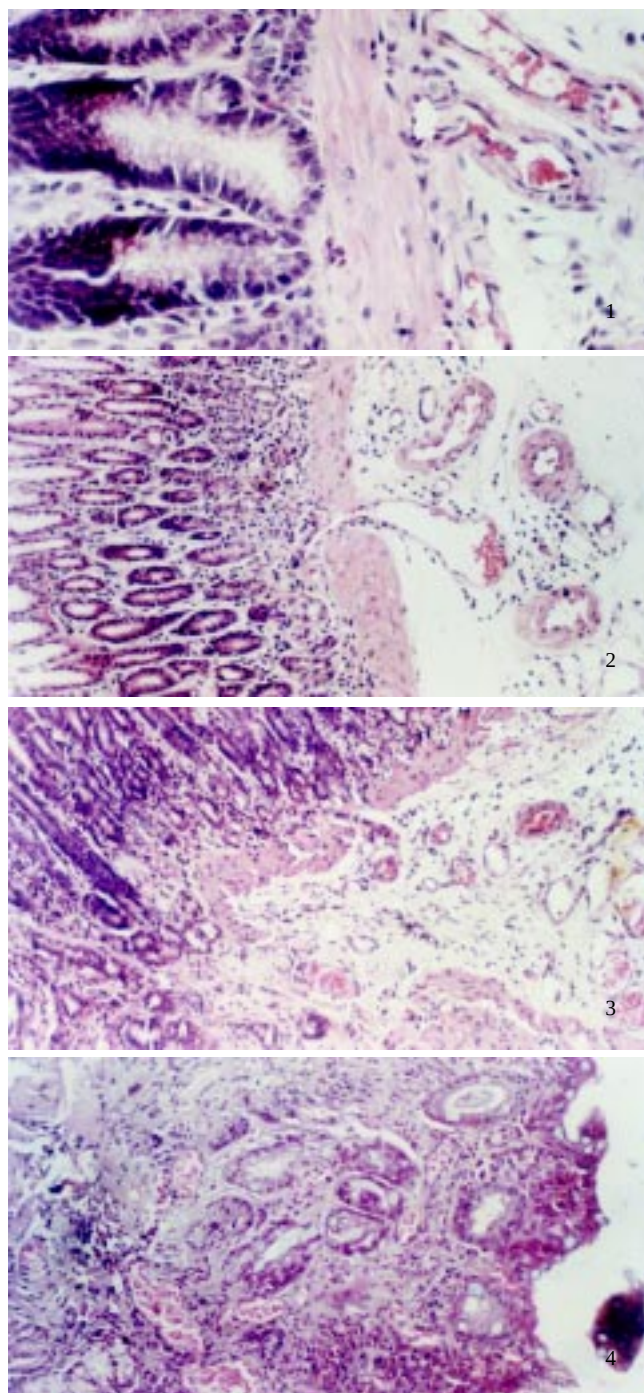


图1 大鼠腺胃腺颈部增生,黏膜肌下微血管增生并突入黏膜肌 HE×200
图2 大鼠腺胃异型增生,固有层及黏膜下层微血管增生,并突破黏膜肌向异型增生区生长 HE×100
图3 大鼠腺胃浸润性腺癌,癌腺体突破黏膜肌,向黏膜下浸润,浸润周围见大量血管增生 HE×100
图4 人胃黏膜活检组织,在肠化及轻度异型增生灶周围有血管增生及充血 HE×100

早期病变(增生期和轻度异型增生)与中、重度异型增生的 MVC 之间差别显著(P 分别 $<0.05, 0.01$), 而中度与重度异型增生的 MVC 之间无明显差别. 这些结果提示, 异型增生的血管形成随着病变损害向进展期发展而愈加明显.

表 1 大鼠不同癌前病变阶段及浸润性癌期血管数变化 ($\bar{x} \pm s$)

病期	n	MC		P
		正常组织区	病变区	
增生期 + 轻度异型增生	10	15.6 $\pm$ 5.2	17.1 $\pm$ 5.6	>0.05
中度异型增生	6	16.4 $\pm$ 5.1	26.3 $\pm$ 9.6	<0.05
重度异型增生	9	19.2 $\pm$ 7.7	32.5 $\pm$ 11.7	<0.05
浸润性癌	25	18.4 $\pm$ 8.2	39.7 $\pm$ 10.3	<0.001

3 讨论

Saito et al 用 MNNG 诱发建立大鼠模型, 对胃癌发生过程胃黏膜病变的演变进行动态观察后认为, 大鼠胃癌的发生分为 3 个阶段: (1) 黏膜的糜烂与增生期 (20 wk 内). (2) 腺瘤样增生期 (20-30 wk, 表现为腺体过度增生). (3) 腺癌发生期 (30 wk 后), 在腺体异型增生的基础上出现腺癌并向黏膜下层、肌层和浆膜层浸润. 本研究大鼠胃黏膜病变发生过程与 Saito 的报告相符. 在此模型上, 我们观察了不同病变期血管生成的改变, 以期阐明血管生成与胃癌发生之间的内在关系. 结果发现, 胃黏膜腺体处于增生期时, 血管生成很少, 当发展至异型增生阶段, 尤其是中、重度异型增生或黏膜内癌时, 血管生成明显增多, 至浸润性癌时, 浸润前缘周围血管异常丰富, 肿瘤间质也有血管生成. 这与 Arbeit^[33] 将 RIP-Tag 转基因小鼠胰岛 β - 细胞分离, 放于含毛细血管内皮细胞的培养液中观察所见现象相似, 在胰岛 β - 细胞高度增生和癌之间有一独特的阶段 - 血管化的胰岛, 即毛细血管内皮细胞呈放射状排列, 向胰岛迁移, 内皮细胞芽萌出和毛细血管腔形成. 同样在用转基因方法制成的小鼠鳞状细胞癌模型, 增生期的真皮下有少量血管生成, 异型增生期血管生成明显增多, 至侵袭性鳞状细胞癌时, 癌细胞突破基底膜向周围浸润, 并高度血管化. 在人类肿瘤如人乳腺导管内癌和子宫颈癌活检组织中也证实了上述的现象, 说明血管生成在肿瘤发生早期就已启动, 并可影响实体肿瘤发展速度的现象是肿瘤发生中的一个普遍规律. 我们在人胃黏膜活检组织中也发现异型增生的胃黏膜腺体周围有血管生成现象 (图 4), 提示人类胃癌的发生与血管生成之间也有同样的关系.

当大鼠胃黏膜腺体出现重度异型增生或黏膜内癌时, 血管生成不但明显增多而且呈明显的异质性分布, 即血管生成主要位于异型增生最明显区域的黏膜肌上下, 并可见新生血管正在穿透黏膜肌, 而附近相同或较轻病变区很少或无血管生成. 人胃黏膜中也可见异型增生腺体由血管围绕 (图 4). 这些结果提示, 在某些情况

下, 血管生成先于浸润性肿瘤的生成. 这种在进行性病变时最明显改变是血管生成的事实提示: (1) 营养血管的增加反映了病变区代谢活动的增强. (2) 新生血管生成是浸润性克隆继发生长的一个重要先决条件. 在鼠纤维肉瘤形成的转基因鼠模型上发现, 癌前病变和癌能产生血管生成因子如碱性成纤维细胞因子 (bFGF) 等, 这些病变仅在发展至肿瘤形成性阶段时才分泌 bFGF, 促进血管生成, 同时由于血管内皮细胞又可分泌生长因子 (如 bFGF) 促进异型增生和癌的生长, 二者相互影响, 促进肿瘤发展^[33], 因此有血管生成的病变区将成为肿瘤进展的中心, 此处黏膜肌常被新生血管突破, 肿瘤常沿血管浸润, 成为肿瘤组织向黏膜下浸润的突破口. 作者认为, 血管生成在胃癌发生的早期就已启动, 并促进异型增生向癌的转变.

异型增生是胃癌发生和发展的有价值模型, 在这一模型上可揭示血管生成与肿瘤发生之间的关系. 血管形成对于异型增生性损害的发生、维持和进展是必需的, 因此, 抗血管生成剂对于异型增生的治疗会有重要意义, 这为治愈胃癌前病变、阻止胃癌发生提供了一个新的方向.

4 参考文献

- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21:505-515
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674
- Detmar M. Tumor angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:20-23
- Compagni A, Christofori G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 2000;83:1-5
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257
- McDonnell CO, Hill AD. Tumour micrometastases: the influence of angiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:105-115
- Wyder L, Vitaliti A, Schneider H, Hebbard LW, Moritz DR, Wittmer M, Ajmo M, Klemenz R. Increased expression of H/T-cadherin in tumor-penetrating blood vessels. *Cancer Res* 2000;60:4682-4688
- Gao GL, Yang Y, Yang SF, He J. Gastric carcinogenesis and reactivity of microvessel induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:109-111
- Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y, Sugimachi K. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000;128:408-416
- Westphal JR, Van 't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruiter DJ, De Waal RM. Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. *Int J Cancer* 2000;86:768-776
- Li Z, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Kawabe A, Mori A, Itami A, Kano M, Watanabe G, Imamura M. TGF- α as well as VEGF, PD-ECGF and bFGF contribute to angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000;17:453-460
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehler JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:1-8
- Moore B. Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J Lab Clin Med* 1998;132:97-103
- Sun HC, Li XM, Xue Q, Chen J, Gao DM, Tang ZY. Study of angiogenesis induced by metastatic and non-metastatic liver

- cancer by corneal micropocket model in nude mice. *World J Gastroenterol* 1999;5:116-118
- 15 Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1061-1065
- 16 Inoue K, Kamada M, Slaton JW, Fukata S, Yoshikawa C, Tamboli P, Dinney CP, Shuin T. The prognostic value of angiogenesis and metastasis-related genes for progression of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Clin Cancer Res* 2002;8:1863-1870
- 17 Liu XP, Song SB, Li G, Wang DJ, Zhao HL, Wei LX. Correlations of microvessel quantitation in colorectal tumors and clinicopathology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:37-39
- 18 Liu XJ, Wang ZR, Zhang YF, Wu SL. The clinical significance of the microvessel density of carcinoma of gallbladder. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:109-110
- 19 Jia L, Chen TX, Sun JW, Na ZM, Zhang HH. Relationship between microvessel density and proliferating cell nuclear antigen and prognosis in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:74-76
- 20 Saito H, Tsujitani S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery* 1999;125:195-201
- 21 Wu J, Fan DM. The tumor angiogenesis and the anti-therapeutics on it. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:316-321
- 22 Pegram MD, Reese DM. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29:29-37
- 23 Madhusudan S, Harris AL. Drug inhibition of angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:403-414
- 24 Schmidt M, Lichtner RB. EGF receptor targeting in therapy-resistant human tumors. *Drug Resist Updat* 2002;5:11-18
- 25 Gingras D, Batist G, Beliveau R. AE-941 (Neovastat): a novel multifunctional antiangiogenic compound. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001;1:341-347
- 26 Felip E, Rosell R. New strategies in the treatment of resectable non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001;1:224-228
- 27 Frankish H. Researchers target tumour blood vessels with antiangiogenic gene therapy. *Lancet* 2002;359:2256
- 28 Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma. *Rinsho Ketsueki* 2002;43:345-348
- 29 Shi WS. Inhibition of renal cell carcinoma angiogenesis and growth by antisense oligonucleotides targeting vascular endothelial growth factor. *Br J Cancer* 2002;87:119-126
- 30 O'Reilly MS. The combination of antiangiogenic therapy with other modalities. *Cancer J* 2002;(Suppl 1):S89-99
- 31 Zhou R, Mazurchuk R, Straubinger RM. Antivasculature effects of doxorubicin-containing liposomes in an intracranial rat brain tumor model. *Cancer Res* 2002;62:2561-2566
- 32 Reiher FK, Volpert OV, Jimenez B, Crawford SE, Dinney CP, Henkin J, Haviv F, Bouck NP, Campbell SC. Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int J Cancer* 2002;98:682-689
- 33 Arbeit JM. Transgenic models of epidermal neoplasia and multistage carcinogenesis. *Cancer Surv* 1996;26:7-24

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版

世界华人消化杂志 (原新消化病学杂志) 从 1993-2002 年的电子版全部出版. 世界华人消化杂志过刊索引: 新消化病学杂志, 1993 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1994 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1995 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1996 (1-12 期); 新消化病学杂志, 1997 (1-12 期); 华人消化杂志, 1998 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 1999 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 2000 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 2001 (1-12 期). 世界华人消化杂志现刊索引: 2002 (1-12 期).

World Journal of Gastroenterology (原中国新消化病学杂志) 从 1993-2002 年的电子版全部出版. 过刊索引: China Natl J New Gastroenterol, 1995 (1 期); China Natl J New Gastroenterol, 1996 (1-4 期); China Natl J New Gastroenterol, 1997 (1-4 期); World J Gastroenterol, 1998 (1-6 期); World J Gastroenterol, 1999 (1-6 期); World J Gastroenterol, 2000 (1-6 期); World J Gastroenterol, 2001 (1-6 期). 现刊索引: World J Gastroenterol, 2002 (1-6 期).

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 的电子版网址如下: 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

基因芯片法筛选萎缩性胃炎相关的差异表达基因

徐俊荣, 崔大祥, 张 沥, 张玲霞, 贾长河, 张宁霞, 江 梅, 曹广周

徐俊荣, 张沥, 张玲霞, 贾长河, 张宁霞, 江梅, 曹广周, 西安市中心医院消化内科 陕西省西安市 710003

崔大祥, 中国人民解放军第四军医大学基因诊断技术研究所 陕西省西安市 710033

徐俊荣, 女, 1970-02-15 生, 陕西省西安市人, 汉族. 1993 年西安医科大学临床医学系本科毕业, 2001 年第四军医大学研究生课程班毕业. 硕士, 主治医师, 主要从事幽门螺杆菌及消化系统疾病研究, 发表论文 7 篇.

项目负责人: 徐俊荣, 710003, 陕西省西安市后宰门 2 号, 西安市中心医院消化内科. xujunrong@netease.com

电话: 029-7582637

收稿日期: 2002-07-08 接受日期: 2002-07-22

Screening of differentially expressed genes associated with atrophic gastritis by high density cDNA microarrays

Jun-Rong Xu, Da-Xiang Cui, Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Chang-He Jia, Ning-Xia Zhang, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao.

Jun-Rong Xu, Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Chang-He Jia, Ning-Xia Zhang, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao, Department of Gastroenterology, Xi'an Municipal Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
Da-Xiang Cui, Institute of Genetic Diagnosis, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jun-Rong Xu, Xi'an Municipal Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China. xujunrong@netease.com

Received: 2002-07-08 Accepted: 2002-07-22

Abstract

AIM: To establish the rat model and to screen differentially expressed genes closely associated with atrophic gastritis.

METHODS: The rat atrophic gastritis model was induced by intragastrically giving hot high salt water, hot water and high salt water. Normal raising group and normal control group were used as control. Total RNAs of specimens were extracted, quantified, and reversely transcribed into cDNA. cDNAs from atrophic gastritis were labeled with Cy5, and cDNAs from the normal control group were labeled with Cy3, which were mixed with cDNAs from the control group with equal quantity, then hybridized with cDNA chips containing 8 248 genes. Chips were washed, scanned and analyzed.

RESULTS: There were atrophic lesions in rat gastric sinus confirmed by pathological examination in the hot high salt water group at the 12th week, but in the high salt water group and the hot water group, there were atrophic lesions at the 24th week. A total of 436 differentially expressed genes were identified by cDNA chip between the hot high salt water group and the normal control group, 145 genes were highly expressed in the hot high salt water group and 291 genes were highly expressed in the normal control group; 398 differentially expressed genes were identified in the hot water group and the normal control group, 98 genes were highly expressed in the hot water group, and 300 genes were highly expressed in the normal control group; and 36 differentially expressed genes were confirmed be-

tween the hot high salt water group and the high salt water group, 23 genes were highly expressed in the hot high salt water group and 13 genes were highly expressed in the high salt water group.

CONCLUSION: Rat atrophic gastritis models were established successfully, differentially expressed genes associated with atrophic gastritis induced respectively by hot high salt water, high salt water and hot water were identified by way of high density cDNA chip.

Xu JR, Cui DX, Zhang L, Zhang LX, Jia CH, Zhang NX, Jiang M, Cao GZ. Screening of differentially expressed genes associated with atrophic gastritis by high density cDNA microarrays. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(1):47-50

摘要

目的: 建立大鼠萎缩性胃炎模型, 用高密度基因芯片筛选萎缩性胃炎相关的差异表达基因.

方法: 采用热盐水、盐水、热水灌胃的方法建立大鼠萎缩性胃炎模型, 并设立正常对照组、正常喂养组作为对照. 提取标本的总 RNA, 定量后并反转录成 cDNA, 萎缩性胃炎标本标记上 Cy5, 正常对照标本标记上 Cy3, 与含有 8248 个大鼠基因的 cDNA 芯片进行杂交, 常规洗片, 扫描, 分析杂交结果.

结果: 热盐水组灌胃 12 wk 的大鼠经病理诊断已存在萎缩性胃炎的特征, 盐水、热水组灌胃的大鼠在 24 wk 时经病理诊断也存在萎缩性胃炎的特征; 热盐水组与正常对照组之间的差异基因共有 436 个, 145 个基因在萎缩性病变组织中呈高表达, 291 个基因在正常组织中呈高表达; 热水组与正常对照组之间的差异表达基因共有 398 个, 98 个基因在萎缩性病变组织中呈高表达, 300 个基因在正常组织中呈高表达; 热盐水组与盐水组之间差异表达基因共有 36 个, 其中 23 个在热盐水组中呈高表达, 13 个基因在盐水对照组中呈高表达.

结论: 成功地建立了大鼠萎缩性胃炎的模型; 筛选出了与热盐水、盐水、热水诱发的萎缩性胃炎发生有关的差异表达基因.

徐俊荣, 崔大祥, 张 沥, 张玲霞, 贾长河, 张宁霞, 江梅, 曹广周. 基因芯片法筛选萎缩性胃炎相关的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2003; 11(1):47-50
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/47.htm>

0 引言

萎缩性胃炎是人类发病率最高的胃癌前病变, 是胃癌

发生过程中的一个非常关键的环节.建立简单可靠的萎缩性胃炎动物模型并阐明其发生机制,对胃癌发生过程的研究具有十分重要的现实意义.我们自1995年以来,一直致力于胃癌早期诊断体系的研究,对癌前病变至胃癌过程的差异表达基因进行了筛选与克隆,初步建立了胃癌早期诊断芯片与预警体系^[1-5].但是,对正常胃黏膜至萎缩性胃炎过程缺少深入研究.我们以人类饮食中不可缺少的两大因素 - 食物的热度与咸度,作为参量,建立大鼠萎缩性胃炎模型,并用含8 248个基因的鼠cDNA芯片对萎缩性胃炎模型的胃窦黏膜组织和正常大鼠胃窦黏膜组织之间的差异表达基因进行了筛选,获取了正常胃黏膜与萎缩性胃炎之间的差异表达基因,为进一步阐明萎缩性胃炎的分子机制奠定了坚实的基础.

1 材料和方法

1.1 材料 体质量为200-250 g、7周龄健康、性成熟的♂ SD大鼠96只及饲料购自第四军医大学动物实验中心;总RNA提取试剂盒采用Promega公司的总RNA提取试剂盒;反转录试剂盒采用Clontech公司的Smart PCR cDNA synthesis kit; Cy3-dUTP, Cy5-dUTP 购自Pharmacia公司;氯化钠等化学试剂购自西安化学试剂公司;含8248个基因的高密度基因芯片M80S购自上海联合基因集团博道公司,基因名称与序列见 <http://www.biodo.com>;芯片扫描采用Affymetrix®公司的428™ Array Scanner;图像采用ImageGene 3.0 Software (BioDiscovery Inc.)进行定量分析.杂交试剂与洗涤芯片试剂按照要求配制.

1.2 方法 采用热盐水、盐水、热水灌胃的方法建立大鼠萎缩性胃炎模型,并设立正常对照组、正常喂养组作为对照.造模方法参见参考文献[6].分别采取灌胃24 wk的盐水组、热水组,灌胃12 wk的热盐水组、正常组大鼠的胃窦部黏膜组织,按照试剂盒说明书提取标本的mRNA,按组混合在一起,紫外线定量,反转录并标记上荧光探针,实验标本mRNA在反转录时标记上Cy5-dUTP,正常对照标本在反转录时标记上Cy3-dUTP.高密度芯片检测实验分为两组.第一组(芯片1)的对照组为盐水组大鼠胃窦部组织mRNA, Cy3标记;实验组为热盐水组大鼠胃窦部组织mRNA, Cy5标记.第二组(芯片2)的对照组为正常组大鼠胃窦部组织mRNA, Cy3标记;实验组为热水组大鼠胃窦部组织mRNA, Cy5标记.把标记的探针在95℃变性5 min,然后把实验组与对照组探针等量混合后,加到芯片上,盖上杂交盖,在42℃杂交17 h.然后,取出芯片,分别在2×SS+2 g/L SDS, 0.1×SSC+2 g/L SDS与0.1×SSC液体中,浸洗10 min,然后在室温自然凉干.芯片杂交结果用芯片扫描仪进行双波长扫描,所获图像采用ImageGene 3.0 Software (BioDiscovery Inc.)进行定量分析,分别计算热水组、Cy5与正常组Cy3比率,计算热盐水组Cy5与盐水组

Cy3比率.实验组与对照组之间的差异表达基因筛选标准: $P < 0.05$, Cut off 值设定为80, Cy5/Cy3比率为 ± 2.0 以上.

2 结果

热盐水灌胃12wk出现胃黏膜萎缩;盐水、热水灌胃12wk,两组大鼠胃黏膜均未见萎缩改变,但延长灌胃至24 wk时可见胃黏膜出现萎缩改变^[6].以正常组胃窦部黏膜组织作为对照,热水组24wk时诱导的萎缩性胃炎病变作为实验组,芯片杂交扫描结果见图1,热水组与正常组杂交信号迭加后强度散点图见图2.根据差异表达基因筛选标准,符合条件的差异表达基因共有398个,98个基因在萎缩性病变组织中呈高表达,300个基因在正常组织中呈高表达,这些基因及对应蛋白与萎缩性胃炎的发生可能密切相关.灌胃12wk热盐水组与正常对照组芯片杂交结果图迭加后,扫描分析结果显示,符合标准的差异表达基因共有436个,145个基因在萎缩性病变组织中呈高表达,291个基因在正常组织中呈高表达.这些基因中包括246个热水组中的差异表达基因,包括了36个热盐水组与盐水组之间差异表达基因,剩下基因可能与盐水组引起的萎缩性胃炎病变有关.灌胃24 wk热盐水组与盐水对照组芯片杂交扫描结果见图3,杂交信号强度散点图见图4.根据差异表达基因筛选标准,两组之间差异表达基因共有36个,其中23个在热盐水组中呈高表达,13个基因在盐水对照组中呈高表达;此结果表明,热盐水诱导的萎缩性胃炎与盐水诱导的萎缩性胃炎发生机制可能存在一定差异,这种差异与这36个基因的功能密切相关.

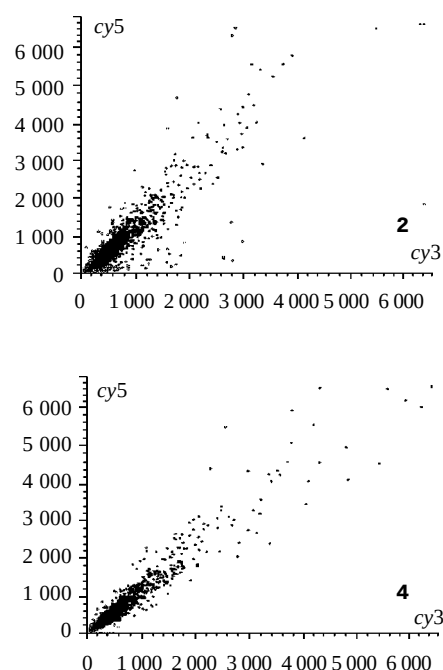
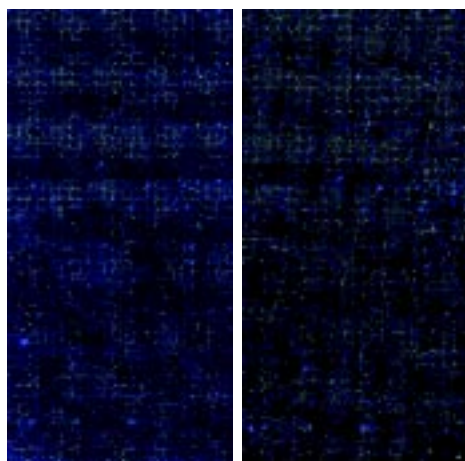
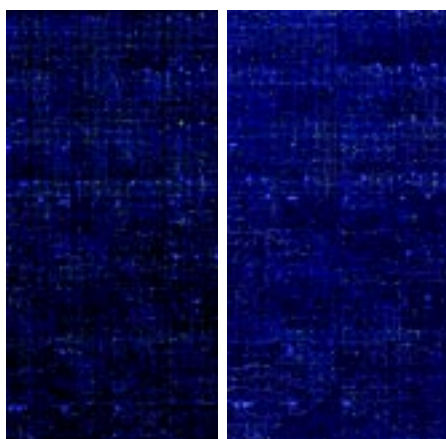


图2 不同组织(热水组+正常组)杂交信号强度散点图.
图4 热盐水组与盐水组杂交信号强度散点图.



正常组杂交扫描图(cy3 标记) 热水组杂交扫描图(cy5 标记)
图1 灌胃至 24 wk 时热水组与正常对照组杂交扫描结果。



热盐水组杂交扫描图(cy5 标记) 盐水组杂交扫描图(cy3 标记)
图3 热盐水组与盐水组芯片杂交扫描结果。

3 讨论

慢性萎缩性胃炎是胃主要的癌前病变之一^[7-28],他的发生发展机制不十分清楚.建立萎缩性胃炎动物模型对研究萎缩性胃炎的发生机制具有十分重要的现实意义^[29,30].我们以大鼠为研究对象,以食物(水)的热度与咸度两种因素单独及共同作用作为影响因素,建立大鼠萎缩性胃炎模型.结果表明,热盐水在短期内(12 wk)即可造成大鼠胃黏膜萎缩,同期实验的正常组、热水组、盐水组均未出现类似现象,证明了水的热度与咸度两种因素共同作用可短期内造成胃黏膜的损伤,引起胃黏膜萎缩.热水组、盐水组在灌胃 24 wk 后,大鼠胃黏膜也出现了萎缩,说明单一因素(热度、咸度)长期作用也可造成胃黏膜的萎缩.

为了进一步探讨大鼠萎缩性胃炎的分子机制,我们采用了含 8 428 个基因的高密度芯片,对这些胃窦部萎缩性胃炎标本进行了与正常胃黏膜之间的差异表达基因的筛选.众所周知,基因芯片技术具有高通量、高效率、高准确性特点,一次可同步监测数以千计的基因的变化,与传统技术相比,具有无比的优越性^[31].本研究结果显示,热水引起的萎缩性胃炎中,存在 398 个

高度差异表达基因,98 个在萎缩性胃炎中呈高表达,300 个在正常胃黏膜组织中呈高表达;在热盐水引起的萎缩性胃炎中,存在 436 个差异表达基因,145 个基因在萎缩性病变组织中呈高表达,291 个基因在正常组织中呈高表达.这些基因中包括 246 个热水组中的差异表达基因,包括了 36 个热盐水组与盐水组之间差异表达基因,剩下基因可能与盐水组引起的萎缩性胃炎病变有关.进一步分析显示,这些基因涉及到原癌基因和抑癌基因、离子通道和运输蛋白、细胞周期蛋白类、外压反应蛋白、细胞骨架和运动、细胞凋亡相关蛋白、细胞受体、免疫相关、代谢、蛋白翻译合成、翻译相关基因等.

我们也进行了盐水引起的萎缩性胃炎与热盐水引起的萎缩性胃炎的差异表达基因的筛选,结果显示仅存在 36 个差异表达基因,进一步分析发现,这些基因与细胞的异常增生关系不大,这说明两组大鼠虽采用不同的方法来灌胃,但由于灌胃至 24 wk 时均有明显的萎缩性胃炎的改变,虽然造成萎缩的因素和时间长短不同,形成萎缩后的差异表达基因虽然存在 36 个,但与实验组及正常对照组比较,差异很小,此结果表明,热盐水与盐水引起的萎缩性胃炎在发生机制上可能存在相同性步骤.本研究结果表明,热水、盐水与热盐水能使正常胃黏膜在一定时间内形成萎缩,在此过程中引起许多基因出现表达水平的变化,这些不同的差异表达基因及其对应蛋白是如何使正常胃黏膜逐渐演变成萎缩性胃炎还不清楚,这些差异表达基因在胃黏膜到胃癌的发生发展过程中究竟扮演何角色,还有待于深入研究.

4 参考文献

- 1 Cui DX, Yan XJ, Wang F, Su CZ. The new strategy of cloning differentially expressed genes. *Shengwu Huaxue He Shengwu Wulixue Jinzhan* 2000;27:362-364
- 2 Yan XJ. Construction of the alarming system of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:96-97
- 3 Cui DX, Yan XJ, Su CZ. Differentially expressed genes were isolated in gastric carcinoma by optimised differential display PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:139-144
- 4 Yan XJ, Su CZ. Application of biological chip in the diagnosis and study of Hp. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:737-739
- 5 Xu JR, Cui DX, Zhang L, Wang F, Yan QJ, Yan XJ. Cloning, sequencing and clinical application of differentially expressed genes in gastric cancer. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 2002;23:148-151
- 6 Zhang L, Zhang LX, Xu JR, Cao GZ, Jiang M, Zhang NX, Jia CH. Rat model of atrophic gastritis induced by high-salt hot water. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:571-574
- 7 Wang B, Shi LC, Zhang WB, Xiao CM, Wu JF, Dong YM. Expression and significance of p16 gene in gastric cancer and its precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:39-42
- 8 Gao MX, Zhang NZ, Ji CX. Estrogen receptor and PCNA in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1117-1120
- 9 Xia JZ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M, Yin HR. Significance of immunohistochemically demonstrated micrometastases to lymph nodes in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1113-1116
- 10 Zhong FM, Song J, Yao P, Yin CC. Expression of p53 and Fas in Hp positive gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:456-457
- 11 Yao XX, Yin L, Zhang JY, Bai WY, Li YM, Sun ZC. Htert expression and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis.

- Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:508-512
- 12 Kong XD, Zhang SZ, Hu JK, Xiao CY, Sun Y, Xia QJ. Abnormalities of p15 gene and protein expression in gastric cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:513-516
- 13 Chen SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancer lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- 14 Feng RH, Li JF, Liu BY, Zhu ZG, Yin HR. Htr gene cloning from human gastric cancer cells and the construction of its sense and antisense eukaryotic expression vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1409-1414
- 15 Yang SM, Fang DC, Yang JL, Luo YH, Lu R, Liu WW. Effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase on telomerase activity and expression of apoptosis-associated gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:149-152
- 16 Yu LF, Wu YL, Zhang YP. Reversal of drug resistance in the vincristine-resistant human gastric cancer cell lines MKN28/VCR by emulsion of seminal oil of *Brucea Javanica*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:376-378
- 17 Cheng SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134
- 18 Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition early and advanced stages of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- 19 Yin F, Shi YQ, Zhao WP. Suppression of p-gp induced multiple drug resistance in a drug resistant gastric cancer cell line by overexpression of Fas. *World J Gastroenterol* 2000;6:664-670
- 20 Liu ZM, Shou NH, Jiang XH. Expression of lung resistance protein in patients with gastric carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:433-434
- 21 Shi XY, Zhao FZ, Dai X, Ma LS, Dong XY, Fang J. Effect of jianpiyiwei capsule on gastric precancerous lesions in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:608-612
- 22 Ren J, Dong L, Pan BR, Xu CB, Li MZ. Interactions between human gastric carcinoma cells and vascular endothelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1254-1260
- 23 Luo F, Sun JL, Ren DM, Cai D, Shen M. Effect of hyperthermia on telomerase activity and genes expression in human gastric cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1261-1264
- 24 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Gao JH, Wang ZH. Apoptosis and proliferation induced by *Helicobacter pylori* and its association with p53 protein expression in gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1265-1268
- 25 Wan SM, Sun SH, Deng MD, Ge QL, Yang YJ. TGF- α_1 and PDGF-A expression in gastric cancer tissue and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:36-39
- 26 Wang XB, Wang X, Zhang NZ. Inhibition of somatostatin analog Octreotide on human gastric cancer cell MKN45 growth in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:40-42
- 27 Yin GY, Zhang WN, Shen XJ, Chen Y, He XF. Ultrastructural and molecular biological changes of chronic gastritis and gastric cancer: a comparative study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:668-672
- 28 Liu HF, Liu WW, Fang DC. Study of the relationship between apoptosis and proliferation in gastric carcinoma and its precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:649-651
- 29 Chen XY, Zou SJ, Fan YL, Deng XR, Wang LH, Yu FH, Wang S, Jin JS. Endocrine changes in combined rat CAG models of syndrome and disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:293-296
- 30 He WB, Gao GL, Hou S, Song G. Relationship between mucosal vascular lesion and gastric carcinoma in chronic atrophic gastritis of mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:130-131
- 31 van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《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》收录.国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,中国生物医学文献光盘数据库,中文科技资料目录医药卫生,解放军医学图书馆CMCC系统,世界消化网数据库,中国医学文摘外科学分册(英文版),中国医学文摘内科学分册(英文版),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995年度,1998年度,1999年度,2000年度2001年度,分别被评为山西省一级期刊.中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468,影响因子3.733,即年指标0.747,他引总引比0.2,海外作者论文比0.012,地区分布数29,基金和资助论文比例0.176,指标综合加权评分76.96.世界华人消化杂志®大16开,128页,月刊,定价24.00元/期,邮发代号82-262.E-mail: wjcd@public.bta.net.cn <http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

早期胃癌内镜下病灶范围估测与手术病理的比较

杨文, 吴云林, 褚晔, 盛红, 何建华, 熊锋宝, 王煜, 程时丹

杨文, 安徽省芜湖市第二人民医院消化内科 安徽省芜湖市 241000
吴云林, 褚晔, 程时丹, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科
上海市 200025
盛红, 何建华, 熊锋宝, 王煜, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科
上海市 200025
杨文, 男, 1963-05-05 生, 安徽省合肥市人, 汉族。皖南医学院本科毕业, 副主任医师。现在安徽省芜湖市第二人民医院消化内科工作。
项目负责人: 吴云林, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科。steiger@sina.com
电话: 021-64370045 传真: 021-34121398
收稿日期: 2002-04-15 接受日期: 2002-06-26

Difference of tumor size between endoscopic estimation and postoperative pathological measurement in early gastric carcinoma

Wen Yang, Yun-Ling Wu, Ye Chu, Hong Sheng, Jian-Hua He, Feng-Bao Xiong, Yu Wang, Shi-Dan Cheng

Wen Yang, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, now in Department of Gastroenterology of Wuhu No.2 Peoples Hospital, Wuhu 241000, Anhui Province, China
Yun-Ling Wu, Ye Chu, Shi-Dan Cheng, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Hong Sheng, Jian-Hua He, Feng-Bao Xiong, Yu Wang, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Correspondence to: Prof. Yun-Lin Wu, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China. steiger@sina.com
Received: 2002-04-15 Accepted: 2002-06-26

Abstract

AIM: To study the difference of tumor size between endoscopic estimation and postoperative pathological measurement in early stage of gastric carcinoma.

METHODS: The size of lesion was estimated by biopsy forceps at endoscopy and by postoperative pathological measurement in 118 patients with early gastric cancer. The correlation between clinicopathological features and measuring errors were analyzed.

RESULTS: Through two different ways of measurement, there was coincidence in 26 of 118 cases (22.0 %), and unconformity in 92 of 118 cases (77.9 %). The size estimated by biopsy forceps at endoscopy was smaller than by postoperative pathological measurement. In histological study, the measuring error rate was higher in the lowly-differentiated type than that in the highly-differentiated type.

CONCLUSION: There were significant measuring errors in tumor size between endoscopic estimation and pathological measurement in depressed and lowly-differentiated type.

The tumor size was smaller in endoscopic estimation than that in the postoperative pathological measurement. This measuring error may be associated with the biological feature of gastric cancer, except the experiences of endoscopists.

Yang W, Wu YL, Chu Y, Sheng H, He JH, Xiong FB, Wang Y, Cheng SD. Difference of tumor size between endoscopic estimation and postoperative pathological measurement in early gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):51-53

摘要

目的: 早期胃癌病灶范围的内镜下活检钳估测与术后病理测量结果差异的研究。

方法: 对118例早期胃癌患者的病灶范围进行内镜下及术后病理测量, 对临床病理特征与测量误差的关系进行相关分析。

结果: 早期胃癌病灶内镜下活检钳测量与手术后病理测量相符的26例(22.0 %), 有误差的92例(77.9 %), 其中活检钳测量小于手术后病理测量的72例(占61.0 %). 大体形态分型中, 凹陷型比隆起型、平坦型测量误差率高。组织类型中, 低分化型比分化型胃癌测量误差率高。

结论: 凹陷型和低分化型早期胃癌, 内镜下活检钳法测量病灶范围与术后病理测量相比常有较大的误差, 一般小于病理测量, 除内镜操作者的经验外, 与癌灶的生物学特性或许有一定关联。

杨文, 吴云林, 褚晔, 盛红, 何建华, 熊锋宝, 王煜, 程时丹. 早期胃癌内镜下病灶范围估测与手术病理的比较. 世界华人消化杂志 2003;11(1):51-53

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/51.htm>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤, 其发生率与死亡率均居各种恶性肿瘤的首位^[1-8]. 胃癌的发生发展是多因素、多阶段、多基因变异的病理过程^[9-12]. 进展期胃癌患者的5a生存率仅为20-40%, 而早期胃癌患者的5a生存期可达90%以上, 因此, 国内外临床工作者均致力于提高早期胃癌的检出率. 目前, 胃镜诊断是检出早期胃癌的主要手段, 正确的病灶范围估测对早期胃癌的治疗方法的选择(内镜下切除还是外科手术治疗)至关重要. 胃镜下对病变范围的估计通常用活检钳测量法. 本文报道内镜直视下肉眼观察联用活检钳测量法估测早期胃癌病变范围与外科手术切除后病理检测的范围作比较研究, 分析发生误差的原因。

1 材料和方法

1.1 材料 1997-01/2002-02 胃镜检查发现并经活检钳测量法估测病灶范围,后经外科手术切除标本病理证实为早期胃癌患者 118 例.男 79 例,女 39 例.年龄 28-87 岁(平均 56 ± 1.2)岁.

1.2 方法 胃镜检查中发现早期胃癌病灶后应用张开的活检钳测量病灶直径,然后多块多方向钳取活组织行病理学检查.病理报告证实胃癌后转外科手术切除.切除标本处理按胃癌病理学检查规范,并测量病灶直径及范围,所测范围与内镜测量结果作比较.内镜估测与切除标本病理检测范围最大直径误差 <1 cm 为+,1-2 cm 为++, >2 cm 为+++.

2 结果

2.1 早期胃癌的大体分型与病理分类 本组 118 例早期胃癌患者形态学上隆起型为主的 21 例,其中 I 型 3 例,II a 型 12 例,II a+II c 型 6 例;属平坦型 6 例;凹陷型为主的 91 例,其中 II c 型 69 例,II c+III 型 7 例,III 型 15 例.将 52 例高分化和中分化的乳头状癌、管状腺癌、黏液癌等归为分化型胃癌,66 例分化差的硬癌、印戒细胞癌、黏液癌等归为低分化胃癌(表 1).

表 1 118 例早期胃癌形态与组织分型

组织类型	n	隆起型	平坦型	凹陷型
分化型胃癌	52	17	2	33
低分化型胃癌	66	4	4	58

表 2 早期胃癌 92 例病灶直径判别误差情况比较

病理情况	n	误差 +	误差 ++	误差 +++
胃癌形态				
I 型	3	1		
II a 型	12	2	2	
II a+II c 型	6	2	3	
II b 型	6	2	2	1
II c 型	69	14	13	29
II c+III 型	7	1	4	2
III 型	15	1	8	5
胃癌组织学				
分化型	40	20	16	4
低分化型	52	3	16	33
胃癌部位				
贲门部	3	2	1	
胃体部	12	5	5	2
胃角部	38	5	18	15
胃窦部	39	11	8	20
胃癌浸润深度				
黏膜层	70	17	22	31
黏膜下层	22	6	10	6

2.2 早期胃癌内镜估测与手术病理测量比较 118 例患者中,内镜测量与手术后病理测量相符的 26 例(22.0 %),与手术后病理测量有误差的 92 例(77.9 %).活检钳测量直径小于手术后病理测量的 72 例(61.0 %),大于术后病理测量的 20 例(16.9 %).误差范围为 0.2-6.5 cm,平均误差 1.689 ± 1.424 cm.其中误差 <1 cm 的 23 例 (25.0 %),1-2 cm 的 32 例(34.7 %), >2 cm 的 37 例(40.2 %,表 2).

3 讨论

胃镜直视下活检钳法测量病灶大小是一种常用的估测方法.本研究与手术后病理测量比较相符合的 26 例(22.0 %),而与术后病理测量有误差的 92 例(77.9 %),其中 72 例(61.0 %)活检钳法测量直径小于手术后病理测量.本组 118 例中早期胃癌凹陷型病变为 91 例(77.1 %),溃疡凹陷的 II c, II c+III 以及 III 型的病灶其测量误差高于隆起 I 型和平坦 II b 型早期胃癌,误差在 1-2 cm 的占 25 例(27.2 %), <2 cm 的病例占 36 例(39.1 %).

曾报道早期胃癌隆起性病变大多为高分化型,而凹陷型则以低分化型为多.溃疡型癌通常由未分化腺癌和印戒细胞癌组成,而隆起型主要由乳头状和管状腺癌组成.而对本组低分化型胃癌与分化型胃癌两组的测量误差进行比较,低分化型的误差率高,且大都误差在 2 cm 以上.

胃癌间质血管的病理改变是肿瘤发生、发展的重要因素^[13,21].Yao et al^[14]报道大多数分化型胃癌黏膜与周围组织相比血管分布相同或较多,而大多数低分化型胃癌黏膜与周围组织相比血管分布较少.由于血管分布无规律性,这就使得低分化型胃癌细胞在生长时需依靠其周围黏膜和黏膜下血供向深部及四周浸润生长.癌细胞生长的这种无序性^[15-19]及深部浸润性^[20,22,23],使得凹陷型病变在内镜肉眼下观察及采用活检钳法对范围进行估测时易于产生误差.

本结果表明,内镜直视下仅凭经验观察早期胃癌病灶的边缘和范围,然后应用活检钳的方法测量病灶的直径显然是不够的.应努力借助于高清晰度的放大内镜,以及使用美兰或靛胭脂等色素剂^[24],以勾勒出病灶清晰的边缘,可观察到常规内镜检查不能发现的细颗粒、小结节、小糜烂及轻度不平整等,并能在局部胃蠕动波中了解到黏膜柔软性及变形性,从而较全面及正确地估测早期胃癌的直径与范围.

此外,应用超声内镜^[25,26]或近红外线电子内镜^[27]检查亦有助于正确估测早期胃癌范围,并能了解浸润深度和有无局部淋巴结转移.最近使用的内镜固有荧光光活检技术^[28-30]可根据组织的固有荧光光谱特征自动识别和诊断,能立即提示被测组织是正常、良性病变还是早期胃癌组织,检测结果阳性符合率高,有助于早期胃癌病变范围的正确评估,对此值得进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Zhang FX, Deng ZY, Zhang XY, Kang SC, Wang Y, Yu XL, Wang H, Bian XH. Telomeric length associated with prognosis in human primary and metastatic gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:153-155
- 2 Cui DX, Yan XJ, Zhang L, Zhao JR, Jiang M, Guo YH, Zhang LX, Bai XP, Su CZ. Screening and its clinical significance of 6 fragments of highly expressing genes in gastric cancer and precancerous mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:770-772
- 3 Wang CD, Chen YL, Wu T, Liu YR. Association between low expression of somatostatin receptor II gene and lymphoid metastasis in patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7: 864-866
- 4 Wang Q, Jin PH, Lin GW, Xu SR. Cost-effectiveness of population-based *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:262-265
- 5 Chen SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134
- 6 Gao MX, Zhang NZ, Ji CX. Estrogen receptor and PCNA in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1117-1120
- 7 Gao P, Jiang XW, Yuan WJ. Effects of gastrin and gastrin receptor antagonist proglumide on gastric cancer line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7: 22-24
- 8 Wu HP, Wu KC, Li L, Yao LP, Lan M, Wang X, Fan DM. Cloning of human cyclooxygenase-2 (COX-2) encoding gene and study of gastric cancer cell transfected with its antisense vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:1211-1217
- 9 Zhou LY, Chen CY, Liang P, Chen LY. ICAM-1 and VCAM-1 expressions on benign gastric mucosa and gastric adenocarcinoma associated with *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:279-281
- 10 Guo CQ, Wang YP, Liou GY, Ma SW, Ding GY, Li JC. Study on *Helicobacter pylori* infection and p53, c-erbB-2 gene expression in carcinogenesis of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7: 313-315
- 11 Wang DX, Fang DC, Liu WW. Study on alteration of multiple genes in intestinal metaplasia, atypical hyperplasia and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:855-859
- 12 Wang RQ, Fang DC, Liu WW. MUC2 gene expression in gastric cancer and preneoplastic lesion tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:285-288
- 13 Gao GL, Yang Y, Yang SF, Ren CW. Relationship between proliferation of vascular endothelial cells and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:282-284
- 14 Yao K, Oishi T, Matsui T, Yao T, Iwashita A. Novel magnified endoscopic findings of microvascular architecture in intramucosal gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2002;56:279-284
- 15 Liang WJ, Ma YJ, Zhang WD, Chen YP. Relationship between classification of spleen syndromes of patients with chronic gastric diseases and gastric carcinoma and cyclin E expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:513-515
- 16 Wang B, Shi LC, Zhang WB, Xiao CM, Wu JF, Dong YM. Expression and significance of p16 gene in gastric cancer and its precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:39-42
- 17 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RF, Wang ZH. Apoptosis and its relationship with Fas ligand expression in gastric carcinoma and its precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7: 561-563
- 18 Li JQ, Wan YL, Chai WY. Biological significance of cyclin E expression in early gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:31-33
- 19 Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 2000;18:2201-2209
- 20 Wang YK, Ma NX, Lou HL, Li Y, Wang L, Pan H, Zhang ZP. Relationship between P53, nm23 protein expression and lymphatic hyperplasia in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7: 34-36
- 21 Zhang YM, Deng CS, Zhu YQ, Mao YR, Zhan K, Yang YP. Correlation between expression of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA and angiogenesis in gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:633-637
- 22 Ninomiya Y, Yanagisawa A, Kato Y, Tomimatsu H. Unrecognizable intramucosal spread of diffuse-type mucosal gastric carcinomas of less than 20 mm in size. *Endoscopy* 2000;32:604-608
- 23 Namieno T, Koito K, Hiigashi T, Takahashi M, Shimanura T, Yamashita K, Kondo Y. Endoscopic prediction of tumor depth of gastric carcinoma for assessing the indication of its limited resection. *Oncol Rep* 2000;7:57-61
- 24 Hiki Y. Endoscopic diagnosis of mucosal cancer. *Semin Surg Oncol* 1999;17:91-95
- 25 Yanai H, Noguchi T, Mizumachi S, Tokiyama H, Nakamura H, Tada M, Okita K. A blind comparison of the effectiveness of endoscopic ultrasonography and endoscopy in staging early gastric cancer. *Gut* 1999;44: 361-365
- 26 Ohashi S, Segawa K, Okamura S, Mitake M, Urano H, Shimodaira M, Takeda T, Kanamori S, Naito T, Takeda K, Itoh B, Goto H, Niwa Y, Hayakawa T. The utility of endoscopic ultrasonography and endoscopy in the endoscopic mucosal resection of early gastric cancer. *Gut* 1999;45:599-604
- 27 Iseki K, Tatsuta M, Iishi H, Sakai N, Yano H, Ishiguro S. Effectiveness of the near-infrared electronic endoscope for diagnosis of the depth of involvement of gastric cancers. *Gastrointest Endosc* 2000;52:755-762
- 28 Bhuncher E, Hatakawa H, Sakai Y, Shibata T. Fluorescein electronic endoscopy : a novel method for detection of early stage gastric cancer not evident to routine endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2002;55:562-571
- 29 Kobayashi M, Tajiri H, Seike E, Shitaya M, Tounou S, Mine M, Oba K. Detection of early gastric cancer by a real-time autofluorescence imaging system. *Cancer Lett* 2001;165:155-159
- 30 Namihisa A, Miwa H, Watanabe H, Kobayashi O, Ogiwara T, Sato N. A new technique: light-induced fluorescence endoscopy in combination with pharmacoscopy. *Gastrointest Endosc* 2001;53:343-348

复方中药健脾丸和保和丸对小鼠胃肠运动的影响

刘欣, 鄧敏, 雷莉, 龚均, 聂丹丽, 陈松盛, 董蕾

刘欣, 鄧敏, 雷莉, 龚均, 陈松盛, 董蕾, 西安交通大学第二医院消化内科
陕西省西安市 710004
聂丹丽, 西安交通大学第二医院中医科 陕西省西安市 710004
刘欣, 女, 1967-09-21 生, 河北秦皇岛市人, 汉族, 医学硕士, 讲师, 主治医师。
国家自然科学基金, No.30170414
项目负责人: 董蕾, 710004, 陕西省西安市西五路 36 号, 西安交通大学第二
医院消化内科, gastrodctor@sohu.com
电话: 029-7276936-29272 传真: 029-7231758
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-11-28

Effects of Chinese herb complex Jianpiwan and Baohewan on gastrointestinal motility in rats

Xin Liu, Min Zhi, Li Lei, Jun Gong, Dan-Li Nie, Song-Sheng Chen, Lei Dong

Xin Liu, Min Zhi, Li Lei, Jun Gong, Dan-Li Nie, Song-Sheng Chen, Lei Dong,
Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Xi'an Jiaotong
University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Supported by Natural Science Foundation of Chian, No. 30170414
Correspondence to: Dr. Lei Dong, Department of Gastroenterology,
The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004,
Shaanxi Province, China. gastrodctor@sohu.com
Received: 2002-10-21 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of Jianpiwan and Baohewan on gastrointestinal motility in rats.

METHODS: Using dextran blue 2000 as a gastrointestinal internal marker its relative remaining rate in stomach and its pushing ratio of the bowel, we observed the effects of Jianpiwan and Baohewan on the emptying of stomach and the driving of bowel in normal and splenic asthenic rats.

RESULTS: Baohewan and Jianpiwan had evidently promoting effect on emptying of stomach in normal and splenic asthenic rats 0.029 ± 0.033 vs 0.059 ± 0.035 ; 0.018 ± 0.010 vs 0.059 ± 0.035 ; 0.036 ± 0.028 vs 0.089 ± 0.042 ; 0.029 ± 0.026 vs 0.089 ± 0.042 ($P < 0.05$). Baohewan had better effect than Jianpiwan on the driving of bowel in normal rats 58.8 ± 11.3 vs 51.6 ± 9.7 ($P < 0.05$). For splenic asthenic rats whose vermiculation was reinforced, Baohewan still had promoting effect 63.5 ± 6.1 vs 54.1 ± 12.3 , ($P < 0.05$) and Jianpiwan can slow the vermiculation and help it recover to normal levels 43.0 ± 7.1 vs 54.1 ± 12.3 ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Baohewan and Jianpiwan have promoting and adjusting effects on gastrointestinal motility in rats.

Liu X, Zhi M, Lei L, Gong J, Nie DL, Chen SS, Dong L. Effects of Chinese herb complex Jianpiwan and Baohewan on gastrointestinal motility in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):54-56

摘要

目的: 观察传统的消食导滞方剂保和丸和健脾丸对小鼠胃肠运动功能的影响。

方法: 以胃肠内标记物葡聚糖蓝-2 000 在胃内色素残留量及小肠推进比指标, 观察各实验组对正常脾虚模型小鼠胃排空及肠推进的影响。

结果: 保和丸、健脾丸对正常小鼠及脾虚模型小鼠的胃排空均起到明显的促进作用 0.029 ± 0.033 vs 0.059 ± 0.035 ; 0.018 ± 0.010 vs 0.059 ± 0.035 ; 0.036 ± 0.028 vs 0.089 ± 0.042 ; 0.029 ± 0.026 vs 0.089 ± 0.042 . ($P < 0.05$); 对正常小鼠的肠推进运动的促进作用, 保和丸则更优于健脾丸 58.8 ± 11.3 vs 51.6 ± 9.7 , ($P < 0.05$). 对肠蠕动功能增强的“脾虚”模型小鼠的肠推进运动, 保和丸仍有促进作用 63.5 ± 6.1 vs 54.1 ± 12.3 , ($P < 0.05$), 而健脾丸则可调节使其减慢而恢复正常 43.0 ± 7.1 vs 54.1 ± 12.3 , ($P < 0.05$).

结论: 保和丸及健脾丸对胃肠运动功能可起到促进及调节作用。

刘欣, 鄧敏, 雷莉, 龚均, 聂丹丽, 陈松盛, 董蕾. 复方中药健脾丸和保和丸对小鼠胃肠运动的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(1):54-56
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/54.htm>

0 引言

保和丸和健脾丸均缘于古代经典名方, 是临床上常用的消食导滞方剂, 对饮食停滞、腹胀、痞满等症均有一定的治疗作用. 我们通过在小鼠实验, 分别观察了保和丸和健脾丸对胃肠运动的影响, 以便指导临床合理用药。

1 材料和方法

1.1 材料 保和丸、健脾丸均选择由传统方剂制成的成药 (西安碑林中药厂提供), 用蒸馏水溶解, 根据动物实验药物计量公式计算, 配成浓度为 120 g/L 的混悬液, 药量相当于成人药量的 6.94 倍. 胃肠内标记物葡聚糖蓝-2 000 (购自于 Pharmacia 公司), 用去离子水配成 20 g/L 的溶液. ICR 品系小鼠, 清洁级, 全雄, 体重 20 ± 2 g, 由西安交通大学动物实验中心提供, 陕医动证字: 08-004 号。

1.2 方法 给予小鼠皮下注射利血平 0.2 mg/kg , 1 次 d^{-1} , 连续 9 d. 小鼠肌注利血平后体重逐渐减轻、活动减少、食量减少、皮毛松散、粪便由颗粒状成为软便, 说明脾虚造模成功^[1]. 取正常小鼠 60 只随机分为保和丸

组、健脾丸组及正常对照组, 每组 20 只. 脾虚模型小鼠 30 只亦随机分为保和丸组、健脾丸组及正常对照组, 每组 10 只. 实验前禁食不禁水 12 h. 中药组分别灌服保和丸、健脾丸溶液, 每只 20 ml/kg (灌服量均按成人体表面积折算). 空白对照组灌服同体积的蒸馏水. 灌服后 30 min 再灌 20 g/L 葡聚糖蓝 - 2 000 0.2 mL, 20 min 后脱颈处死, 剖腹取全胃肠. 自幽门括约肌处取胃, 沿胃大弯侧剪开, 将胃内色素残留物充分洗于 4 mL 去离子水中, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清滤液, 用 721 - A 型分光光度计在 620 nm 处测吸光度为胃内色素残留量, 求出与对照组均值的百分比即为各样本的胃内色素相对残留量. 同时量取幽门括约肌至色素最前段及至盲肠的距离, 以二者之比为小肠推进比.

2 结果

正常小鼠保和丸组及健脾丸组的胃内色素残留量均较对照组显著减少 ($P < 0.05$), 但两组之间无显著性差异 ($P > 0.05$). 两组的小肠推进比均较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而保和丸组则更优于健脾丸组 ($P < 0.05$, 表 1). 脾虚模型小鼠胃内色素残留量较正常小鼠显著增多 ($P < 0.05$), 而小肠推进比较正常小鼠则显著增高 ($P < 0.05$). 脾虚模型小鼠保和丸组及健脾丸组的胃内色素残留量较对照组显著减少 ($P < 0.05$), 小肠推进比保和丸组较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而健脾丸组则降低 ($P < 0.05$, 表 2)

表 1 正常小鼠各组胃内色素残留量及小肠推进比 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

分组	胃内色素残留量(%)	小肠推进比
对照组	0.059 $\pm$ 0.035	44.0 $\pm$ 9.4
保和丸	0.029 $\pm$ 0.033 ^a	58.8 $\pm$ 11.3 ^{ac}
健脾丸	0.018 $\pm$ 0.010 ^a	51.6 $\pm$ 9.7 ^a

^a $P < 0.05$, vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 健脾丸组

表 2 脾虚模型小鼠各组胃内色素残留量及小肠推进比 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	胃内色素残留量(%)	小肠推进比
对照组	0.089 $\pm$ 0.042	541 $\pm$ 123
保和丸	0.036 $\pm$ 0.028 ^a	635 $\pm$ 61 ^a
健脾丸	0.029 $\pm$ 0.026 ^a	430 $\pm$ 71 ^a

^a $P < 0.05$, vs 对照组

3 讨论

由于胃排空及肠蠕动的异常所导致的胃肠功能紊乱性疾病临床上较为常见^[2-19], 目前治疗这些疾病的主要措施是调节胃肠动力^[9,14-26,20-29]. 中医学中虽无胃肠动力的概念, 但实际上已有不少方剂被广泛而有效地用于治疗胃肠动力障碍的各种症状^[1,21-25,30-36,38]. 目前临床应用较多的为具有理气、消食、化湿及泻下作用的中药,

方剂常选择保和丸、健脾丸等. 保和丸缘自《丹溪心法》, 方剂组成为山楂、神曲、半夏、茯苓、陈皮、连翘、莱菔子, 为治疗食积的通用方, 以脘痞腹胀、恶食噎腐为主证, 起到消食化滞、理气和胃之功效. 健脾丸缘自《证治准绳》, 方剂组成为白术、木香、黄连、甘草、白茯苓、人参、神曲、陈皮、砂仁、麦芽、山楂、山药、煨肉蔻, 主治脾虚胃弱、食积化热之证, 起到健脾和胃、消食止泻之功效. 为了从现代医学理论角度进一步研究传统中药方剂的作用机制, 我们选择了最常用的消食导滞方剂中的保和丸、健脾丸观察其对胃肠运动功能的作用. 结果表明: 保和丸、健脾丸对正常小鼠的胃排空及肠推进运动均起到了明显的促进作用, 对胃排空的促进作用二者之间无显著性差异, 而对肠推进运动的促进作用保和丸则更优于健脾丸.

脾虚证为临床常见病证, 表现为胃脘胀痛、纳差、倦怠、消瘦等, 主要是由于脾虚运动功能失司所造成的^[37,40,41]. 研究表明脾虚患者和动物由于多种胃肠激素紊乱而存在明显的胃肠功能障碍^[5-7,36,38-40]. 因此, 调节胃肠功能是治疗脾虚所致的各种疾病尤其是消化系统疾病的重要手段. 脾虚证时因其发展的早、晚期胃肠激素的不同改变, 而出现不同的胃肠功能异常. 早期胃运动功能减弱而肠运动功能增强, 晚期胃运动及肠蠕动功能均减弱^[36]. 因此, 脾虚患者不单是存在肠运动功能降低的病理改变, 还有相当部分患者表现为肠运动功能亢进, 从而出现腹泻、肠鸣等症状表现. 我们所设计的实验中用利血平所致脾虚证小鼠模型, 其胃排空较正常小鼠明显减慢, 小肠推进比较正常小鼠增快, 属脾虚早期模型. 保和丸对其胃排空及肠推进运动均有明显的促进作用. 健脾丸对其胃排空起到一定的促进作用, 而对肠推进功能反而抑制使其减慢, 从而起到调节作用使其恢复正常. 从以上实验可以看出, 保和丸及健脾丸对胃肠的运动功能均可起到促进作用, 但因保和丸中以消导食积滞的药物为主, 故对肠道仅有促进作用, 且优于健脾丸. 健脾丸中由于健脾益气的中药成分占主导作用, 辅以消食导滞的药物, 故对脾虚造成的肠功能紊乱可起到双向调节作用.

4 参考文献

- 1 Ren P, Huang X, Zhang L, Wang LL, Li YC, Chen JZ. Relationship between IMC, gut motility level in Pixu rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:516-519
- 2 Peng X, Feng JB, Yan H, Zhao Y, Wang SL. Distribution of nitric oxide synthase in stomach myenteric plexus of rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:852-854
- 3 Camilleri M. Dyspepsia, irritable bowel syndrome, and constipation: review and what's new. *Rev Gastroenterol Disord* 2001;1:2-17
- 4 Holtmann G, Gschossman J, Neufang-Huber J, Gerken G, Talley NJ. Differences in gastric mechanosensory function after repeated ramp distensions in non-consulters with dyspepsia and health controls. *Gut* 2000;47:332-336
- 5 Zhao WJ, Zhou Y. Forty-five cases of functional dyspepsia with

- anxiety and depress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:596-597
- 6 Liu WX, Hong G, Fu BY, Jiang RL, Liu ZY. Alteration of serum motilin and gastroduodenal motility during MMC of patients with functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:722-724
- 7 Tang HW, Huang YX, Gao W. Relationship between gastric dysmotility and gastrointestinal hormones of functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:694-697
- 8 Ding SP, Li JC, Xu J, Mao LG. Study on the mechanism of regulation on the peritoneal lymphatic stomata with Chinese herbal medicine. *World J Gastroenterol* 2002 ;8:188-192
- 9 Sun SY, Li Y, Zhou Z, Jin Z. Effect of Howei decoction on gastric emptying in patients with dysmotility-like functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:810-812
- 10 Tian F, Shen JX, Li Y, Wang W. Study on relationship of symptoms, gastric emptying and gastro-electricity of dysmotility-like functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:739-741
- 11 Lorena SL, De Souza Almeida JR, Mesquita MA. Orocecal transit time in patients with functional dyspepsia. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:21-24
- 12 Willems M, Quartero AO, Numans ME. How useful is paracetamol absorption as a marker of gastric emptying? A systematic literature study. *Dig Dis Sci* 2001;46:2256-2262
- 13 Cipolla G, Sacco S, Crema F, Moro E, De Ponti F, Frigo G. Gastric motor effects of triptans: open questions and future perspectives. *Pharmacol Res* 2001;43:205-210
- 14 Allescher HD, Bockenhoff A, Knapp G, Wienbeck M, Hartung J. Treatment of non-ulcer dyspepsia: a meta-analysis of placebo-controlled prospective studies. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:934-941
- 15 Panganamamula KV, Fisher RS, Parkman HP. Functional (Nonulcer) dyspepsia. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002;5: 153-160
- 16 Tack J, Bisschops R J, Bisschops R. Dianogosis and treatment of functional dyspepsia. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:503-508
- 17 Qi HB, Luo JY, Zhu YL, Wang XQ. Gastric myoelectrical activity and gastric emptying in diabetic patients with dyspeptic symptoms. *World J Gastroenterol* 2002;8:180-182
- 18 Wang X, Zhong YX, Lan M, Zhang ZY, Shi YQ, Lu J, Ding J, Wu KC, Jin JP, Pan BR, Fan DM. Screening and identification of proteins mediating senna induced gastrointestinal motility enhancement in mouse colon. *World J Gastroenterol* 2002 ;8:162-167
- 19 Liu CY, Chen LB, Liu PY, Xie DP, Wang PS. Effects of progesterone on gastric emptying and intestinal transit in male rats. *World J Gastroenterol* 2002 ;8:338-341
- 20 Rosch W, Vinson B, Sassini I. A Randomised clinical trial comparing the efficacy of a herbal preparation STW 5 with the prokinetic drug cisapride in patients with dysmotility type of functional dyspepsia. *Z Gastroenterol* 2002;40:401-408
- 21 Zhu JZ. Current status of gastrokinetic drugs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1439-1444
- 22 Zhu JZ, Yang GC, Leng ER, Chen DF. Prokinetic effect of chinese herbals on gastrointestinal tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7: 689-690
- 23 Wang J, Hou JY. Effect of granulae Li Wei on gastrointestinal activity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:377-381
- 24 Zhang HX, Ren P, Huang X, Li Y. Regulatory effects of Chinese herbal medicines on gastrointestinal hormone and motility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1141-1144
- 25 Zhu JZ, Zheng W, Leng ER, Chen DF. Effect of Da-Fu-Pi on gastrointestinal AchE and NOS1 innervation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:101-103
- 26 Erstad BL. Dyspepsia: initial evaluation and treatment. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2002;42:460-468
- 27 Hallerback BI, Bommelaer G, Bredberg E, Campbell M, Hellblom M, Lauritsen K, Wienbeck M, Holmgren LL. Dose finding study of mosapride in functional dyspepsia: a placebo-controlled, randomized study. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:959-967
- 28 Veldhuyzen van Zanten SJ, Jones MJ, Verlinden M, Talley NJ. Efficacy of cisapride and domperidone in functional (nonulcer) dyspepsia: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:689-696
- 29 Pan XZ, Cai LM. Present situation of gut hormones research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:464-466
- 30 Zhao BM, Huang YX, Wang QL, Chu ZH, Zhao NX. Effect of electroacupuncture on gastric acid secretion and its relationship with gastrin and epidermal growth factor in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:276-278
- 31 Zhao BM, Huang YX. Pathology of acupuncture on gastric secretion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:318-319
- 32 Qin M, Huang YX. Reseach of pathology of acupuncture on gastric mucous protection *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8: 456-457
- 33 Long QL, Wang ZH, Ren WH. Mechanism of effect of Bai-Shao on dysrhythmia of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:109-110
- 34 Huang YQ. Chinese herbal medicine therapy of gastroparesis syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1166-1167
- 35 Huang YQ. The diagnosis of gastroparesis syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1164-1165
- 36 Yin G, Zhang W, Xu F. Effect of Weikangfu granule on ultra-structure of gastric mucosa in patients of precancerosis with spleen deficiency syndrome *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000; 20:667-670
- 37 Ren P, Huang X, Zhang L, Wang LL, Liu F, Li YC. Effect of Sijunzi decoction on gastric emptying rste in rat model of spleen deficiency syndrome. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:596-598
- 38 Li YM, Huang YX, Zhang J, Wang QL. Effect of electro-acupuncture on gastric emptying of rats treated with lipopolysaccharide and its relationship with serum cytokines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1110-1115
- 39 Lin GZ, Wang XZ, Wang P, Lin J, Yang FD. Therapeutic and immunologic study of Jianpi Yishen decoction in patients with Pixu diarrhoea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:285-287
- 40 Yao YL, Song YG, Zhang WD. Experimental study on relationship between spleen deficiency, enterorrhea and motilin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7: 432-433
- 41 Ren P, Huang X. Relationship between spleen and pharmacokinetics: theorial and experimental bases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1077

急性胰腺炎患者血清IL-15 IL-18和sTNF-1R的变化意义

贺 丽,陈少夫,曹晓辉,张力达,潘丽丽,周 卓

贺丽,沈阳医学院附属第二医院 辽宁省沈阳市 110002
陈少夫,中国医科大学第二临床学院 辽宁省沈阳市 110001
曹晓辉,沈阳急救中心 辽宁省沈阳市 110005
张力达,沈阳医学院附属第二医院 辽宁省沈阳市 110002
潘丽丽,周卓,中国医科大学第二临床学院中心实验室 辽宁省沈阳市 110001
贺丽,女,1972-08-12生,辽宁省沈阳市人,汉族.1996年毕业于大连医科大学,
2002年取得硕士学位,主治医师,主要从事消化系统疾病的临床研究.
项目负责人:贺丽,110002,辽宁省沈阳市和平区北九马路20号,沈阳医学院附
属第二医院.
电话:024-22842260
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-07

Changes of serum level of IL-15, IL-18 and sTNF-1R in patients with acute pancreatitis

Li He, Shao-Fu Chen, Xiao-Hui Cao, Li-Da Zhang, Li-Li Pan, Zhuo Zhou

Li He, Digestive Department, The Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002, Liaoning Province, China
Shao-Fu Chen, Digestive Department, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Xiao-Hui Cao, Shenyang Emergency Center, Shenyang 110005, Liaoning Province, China
Li-Da Zhang, Digestive Department, The Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002, Liaoning Province, China
Li-Li Pan, Zhuo Zhou, Laboratory Center of The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Li He, The Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002, Liaoning Province, China.
Received: 2002-07-31 Accepted: 2002-08-07

Abstract

AIM: To detect the serum level of IL-15, IL-18 and soluble tumor necrosis factor receptor-1 (sTNF-1R) in patients with acute pancreatitis (AP), as well as the correlation among the three factors in AP.

METHODS: According to the clinical diagnosis and criteria for acute pancreatitis, 26 patients with AP were divided into severe acute pancreatitis (SAP) group ($n=7$) and mild acute pancreatitis (MAP) group ($n=19$). Ten normal individuals were used as the control group ($n=10$). The serum level of IL-15, IL-18 and sTNF-1R were detected by ELISA.

RESULTS: IL-15, IL-18 and sTNF-1R in the SAP group was higher than that in the MAP group (IL-15, 42 ± 19 vs 6 ± 2 ng/l, $P < 0.01$; IL-18, 78 ± 15 vs 28 ± 13 ng/l, $P < 0.01$; sTNF-1R, 6327 ± 3655 vs 832 ± 329 ng/l, $P < 0.01$). sTNF-1R in the SAP and MAP group was higher than that in the control group (SAP vs the control group: 6327 ± 3655 vs 545 ± 123 ng/l, $P < 0.01$; MAP vs the control group: 832 ± 329 vs 545 ± 123 ng/l, $P < 0.01$). The results of IL-15 and IL-18 were similar to those of sTNF-1R, those in the MAP group were lower than that in the control group (MAP vs the control group, IL-18: 28 ± 13 vs 66 ± 10 ng/l, $P < 0.01$; IL-15: 6 ± 2 vs 53 ± 13 ng/l,

$P < 0.01$). There was no significant difference between the SAP group and the control group ($P > 0.05$). In the MAP group, there was significant positive correlation between sTNF-1R and IL-18 ($r=0.98$, $P < 0.01$), sTNF-1R and IL-15 ($r=0.823$, $P < 0.01$), IL-18 and IL-15 ($r=0.95$, $P < 0.01$), respectively. In the SAP group, there was significant positive correlation between IL-15 and IL-18 ($r=0.906$, $P < 0.01$), sTNF-1R and IL-15 ($r=0.93$, $P < 0.01$), sTNF-1R and IL-18 ($r=0.953$, $P < 0.01$), respectively.

CONCLUSION: IL-15, IL-18 and sTNF-1R play important roles in the development of acute pancreatitis, and they may be valuable indexes to predict the severity of AP.

He L, Chen SF, Cao XH, Zhang LD, Pan LL, Zhou Z. Changes of serum level of IL-15, IL-18 and sTNF-1R in patients with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1):57-60

摘要

目的: 本实验通过测定急性胰腺炎(AP)患者血清白介素-15(IL-15)、白介素-18(IL-18)及可溶性肿瘤坏死因子受体-1(sTNF-1R)的水平,探讨他们与AP的关系.分析他们之间的相关性.研究对重症急性胰腺炎(SAP)的发生可能有预测作用的指标.探讨炎性递质在急性胰腺炎发病机制中的作用.

方法: 选择AP患者26例,按照急性胰腺炎的临床诊断及分级标准分组,其中SAP患者7例,轻型急性胰腺炎(MAP)患者19例,正常对照组10例.用ELISA法检测血清IL-15、IL-18及sTNF-1R浓度.

结果: 血清中IL-15、IL-18及sTNF-1R浓度在MAP和SAP两组患者之间存在显著差异, SAP组明显高于MAP组, SAP同MAP组比较:IL-18: 78 ± 15 vs 28 ± 13 ng/l, ($P < 0.01$); IL-15: 42 ± 19 vs 6 ± 2 ng/l, ($P < 0.01$); sTNF-1R: 6327 ± 3655 vs 832 ± 329 ng/l, ($P < 0.01$); sTNF-1R在SAP和MAP组显著高于正常对照组, SAP同对照组比较 6327 ± 3655 vs 545 ± 123 ng/l, ($P < 0.01$); MAP同对照组比较 832 ± 329 vs 545 ± 123 ng/l, ($P < 0.01$); IL-15同IL-18有相似的结果,即MAP组显著低于正常对照组, MAP同对照组比较:IL-18: 28 ± 13 vs 66 ± 10 ng/l, ($P < 0.01$); IL-15: 6 ± 2 vs 53 ± 13 ng/l, ($P < 0.01$); SAP组同正常对照组之间无显著性差异($P > 0.05$). 轻型急性胰腺炎患者血清sTNF-1R同IL-18呈显著正相关($r=0.98$, $P < 0.01$); sTNF-1R同IL-15呈显著正相关, ($r=0.823$, $P < 0.01$); IL-18同IL-15呈显著正相关, ($r=0.95$, $P < 0.01$). 重型急性胰腺炎患者血清IL-18同IL-15呈显著正相关, ($r=0.906$, $P < 0.01$); sTNF-1R同

IL-15 呈显著正相关, ($r=0.93, P<0.01$); sTNF-1R 同 IL-18 呈显著正相关, ($r=0.953, P<0.01$).

结论:血清 IL-15、IL-18 及 sTNF-1R 参与了急性胰腺炎的炎症反应过程,可能是预测急性胰腺炎的严重程度的指标.

贺丽,陈少夫,曹晓辉,张力达,潘丽丽,周卓.急性胰腺炎患者血清 IL-15 IL-18 和 sTNF-1R 的变化意义.世界华人消化杂志 2003;11(1):57-60
http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/57.htm

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是常见的消化系统急症,多数属自限性.约 15-30% 成为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP).SAP 死亡率极高^[1].目前的治疗方案不能从根本上降低 SAP 的死亡率及并发症的发生^[2,3].至今,其发病机制仍未完全阐明^[4,5].比较公认的四大机制是胰腺胰酶自身消化^[6],胰腺血循环障碍^[7-10],白细胞过度激活^[11-13]和肠道细菌移居胰腺组织学说^[14-19],炎性因子的产生及其级联瀑布效应(cascade teaction),使得胰腺局限性炎症反应发展为威胁生命的 SAP^[20-22]越来越受到关注.我们检测 AP 患者血清 IL-15, IL-18 和可溶性肿瘤坏死因子受体-1(sTNF-1R)水平间的相关性,探讨炎性递质在 AP 发病机制中的作用,用于指导治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 选择 2001-03/2002-01 中国医大二院及沈医二院消化病房住院治疗的 AP 患者 26 例.包括男性 11 例,年龄 44 ± 19 (范围 24-70) 岁;女性 15 例,年龄 54 ± 16 (范围 20-74) 岁,所有患者均于症状出现后 24 h 内入院.体检健康者 10 名作对照,所有受试者无胃肠、肝胆胰疾病、糖尿病、肿瘤及自身免疫性疾病病史.把 AP 患者分为轻型急性胰腺炎组(mild acute pancreatitis, MAP)和重症急性胰腺炎(SAP)组.血钙浓度 $\leq 1.87 \text{ mmol/L}$, APACHE-II 评分 ≥ 8 分和 Balthazar CT 评分 $\geq \text{II}$ 级者为 SAP 组,低于以上标准者为 MAP 组^[23,24].IL-15、IL-18 和 sTNF-1R 试剂盒均由上海森雄公司提供.酶标仪型号为奥地利 Tecan Sunrise.

1.2 方法 清晨空腹取静脉血 3 mL,提取血清,平均分装于 3 个试管,均冻于 -70°C 冰箱保存,待测血清 IL-15, IL-18, sTNF-1R 浓度.采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法,在 492 nm 处测定吸光度(A值).所有 A 值都应减除空白值后再行计算.绘出标准曲线.根据样品 A 值求出标本中各细胞因子浓度.

统计学处理 所有测定值均用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 Studentt 检验对两个样本均数做显著性检验,用直线回归方程做两因素间相关性分析.统计运用 SPSS 统计软件完成.

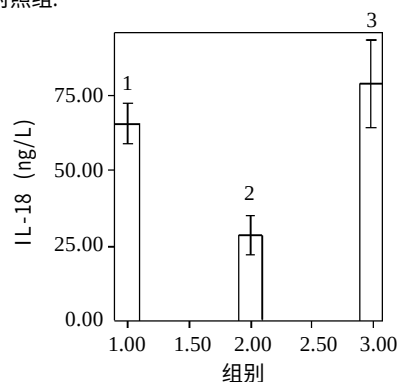
2 结果

血清中 IL-15, IL-18 和 sTNF-1R 浓度在 MAP 和 SAP 两组患者之间存在显著差异, SAP 组明显高于 MAP 组 ($P<0.01$); sTNF-1R 在 MAP 和 SAP 两组显著高于正常对照组 ($P<0.01$); IL-15 同 IL-18 在 MAP 组显著低于 SAP 组和正常对照组 ($P<0.01$); IL-15 在 SAP 略低于正常对照组,而 IL-18 在 SAP 组略高于正常对照组,但两组之间无显著差异 ($P>0.05$, 表 1, 图 1-3). 轻型急性胰腺炎患者血清 sTNF-1R 同 IL-18 呈显著正相关 ($Y=-4.428 \pm 0.0392x, r=0.98, n=19, P<0.01$, 图 4); sTNF-1R 同 IL-15 呈显著正相关 ($Y=1.472 \pm 0.006x, r=0.823, n=19, P<0.01$, 图 5); IL-18 同 IL-15 呈显著正相关 ($Y=1.795 \pm 0.145x, r=0.95, n=19, P<0.01$, 图 6). 重型急性胰腺炎患者血清 IL-18 同 IL-15 呈显著正相关 ($Y=-45.809 \pm 1.123x, r=0.906, n=7, P<0.01$, 图 9); sTNF-1R 同 IL-15 呈显著正相关 ($Y=11.119 \pm 0.004x, r=0.93, n=7, P<0.01$, 图 7); sTNF-1R 同 IL-18 呈显著正相关 ($Y=52.825 \pm 0.004x, r=0.953, n=7, P<0.01$, 图 8).

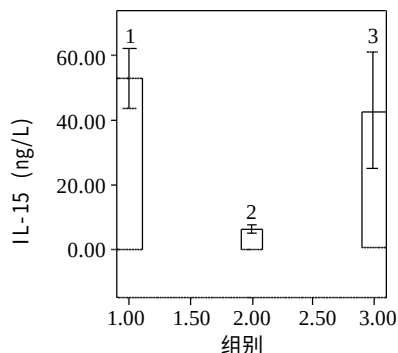
表 1 AP 患者血清 IL-15, IL-18 和 sTNF-1R ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

分组	n	IL-18	IL-15	sTNF-1R
对照组	10	66 ± 10	53 ± 13	545 ± 123
MAP 组	19	28 ± 13^b	6 ± 2^b	832 ± 329^b
SAP 组	7	78 ± 15	42 ± 19	6327 ± 3655^b

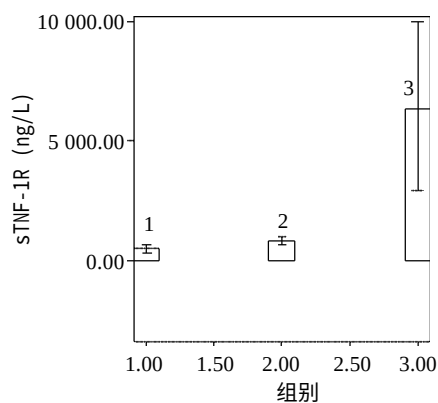
^b $P<0.01$, vs 对照组.



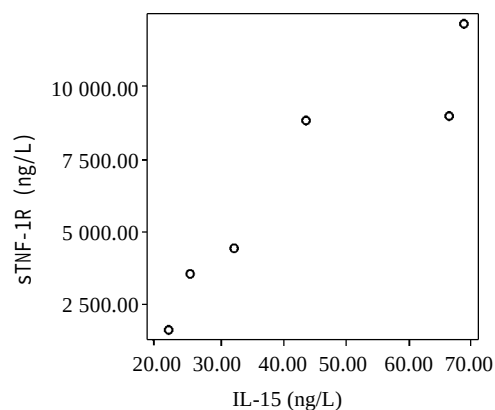
1 组:正常对照组;2 组:MAP 组;3 组:SAP 组
图 1 血清 IL-18 的浓度(ng/L).



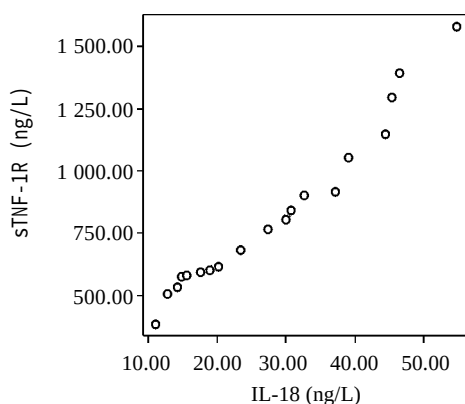
1 组:正常对照组;2 组:MAP 组;3 组:SAP 组
图 2 血清 IL-15 的浓度(ng/L).



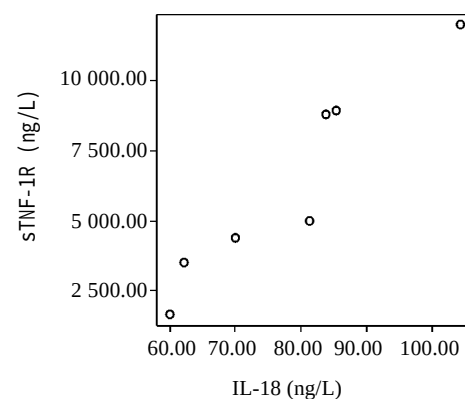
1 组:正常对照组;2 组:MAP 组;3 组:SAP 组
图 3 血清 sTNF-1R 的浓度(ng/L).



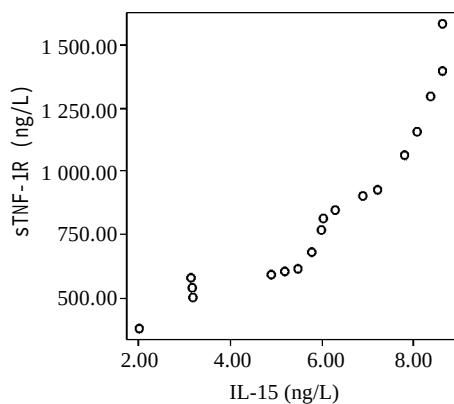
$Y=11.119+0.004X$; $r=0.93$; $n=7$; $P<0.01$
图 7 SAP 组血清 sTNF-1R 和 IL-15 的相关性.



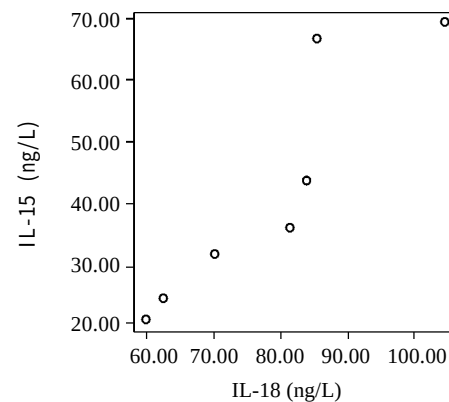
$Y=-4.428+0.0392X$; $r=0.98$; $n=19$; $P<0.01$
图 4 血清 sTNF-1R 和 IL-18 的相关性.



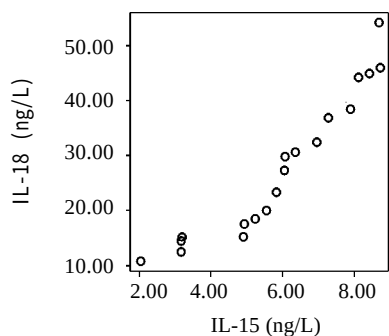
$Y=52.825+0.004X$; $r=0.953$; $n=7$; $P<0.01$
图 8 SAP 组血清 sTNF-1R 和 IL-18 的相关性.



$Y=1.472+0.006X$; $r=0.823$; $n=19$; $P<0.01$
图 5 MAP 组血清 sTNF-1R 和 IL-15 的相关性.



$Y=-45.809+1.123X$; $r=0.906$; $n=7$; $P<0.01$
图 9 SAP 组血清 sTNF-1R 和 IL-18 的相关性.



$Y=1.795+0.145X$; $r=0.95$; $n=19$; $P<0.01$
图 6 MAP 组血清 IL-18 和 IL-15 的相关性.

3 讨论

AP 患者血清中前炎性递质如 IL-1, IL-6, IL-8 和 TNF α 升高,提示免疫学机制参与了 AP 的发病机制^[25].AP 时,胰腺组织和血浆中检测到 TNF α 表达,并与胰腺损伤及炎症程度密切相关,在 AP 早期显著升高.正常对照组 sTNF-1R 相对低水平表达,在人体发生炎症反应时随之升高,MAP 组与正常对照组比较有显著差异($P<0.01$),随着炎症反应进一步加重, SAP 组升高更为显著,与前两组比较均存在显著性差异($P<0.01$).说明随炎症反应的进一步加重,机体的防御体系也在进一步加强,与

疾病的严重程度相关。sTNF-1R 升高提示炎症反应加重。但亦有相反的报道,如患者 sTNF-1R 早期即下降,表明受体消耗过多,导致抗炎能力下降,使得 AP 进一步恶化,故如 sTNF-1R 骤减,提示预后不良。近年来细胞因子参与 AP 发病过程日益受到广泛关注,IL-15 在 AP 中的作用尚不清楚。在本实验中,MAP 组患者血清 IL-15 浓度同正常对照组比较显著降低($P < 0.01$),说明在疾病早期由于存在炎症因子的过度释放,IL-15 呈低浓度表达,发挥其早期保护作用,抑制过多促炎性因子产生,而不抑制抗炎因子的作用,故可防止炎症反应进一步加剧。实验结果同时显示,SAP 组患者血清 IL-15 浓度明显高于 MAP 组。说明随炎症反应进一步加重,IL-15 血清浓度随之增加,呈高浓度表达,增加了促炎因子的产生,加重了高细胞因子血症的恶性循环。SAP 组同 MAP 组血清 IL-15 浓度均低于正常对照组,SAP 组同正常对照组之间无显著性差异。说明血清 IL-15 在急性胰腺炎早期主要发挥其保护作用;另一可能原因是血清 IL-15 在入院后 24 h 内未达到高峰浓度,随着疾病发展,处于动态上升过程。因此,如急性胰腺炎早期血清 IL-15 浓度显著下降,提示预后良好。如急性胰腺炎早期血清 IL-15 浓度下降不明显,或轻度升高,提示预后不良,有恶化倾向。IL-18 在重症急性胰腺炎患者中显著升高,在并发胰腺坏死和远处脏器衰竭中 IL-18 升高与并发症的发生平行。AP 患者血清中一般检测不出 IL-1,可能的原因是 IL-1 半衰期短,临床不易测出;另一方面可能的原因是 IL-1 在检测水平之下发挥其生物学作用。故 IL-18 的检测就显得尤为重要。IL-18 在疾病发生后 1 wk 仍明显升高,故便于跟踪监测。本实验中,SAP 组患者血清 IL-18 浓度显著高于 MAP 组 ($P < 0.01$),说明 IL-18 与疾病严重程度相关。同 Rau et al [26] 结果一致。MAP 组血清 IL-18 浓度显著低于正常对照组 ($P < 0.01$),而 SAP 组仅略高于正常对照组,二者之间无显著性差异。正常人血清中促炎细胞因子和抗炎细胞因子处于动态平衡,在炎症发生早期,促炎细胞因子大量产生同时,也产生抗炎细胞因子,这些抗炎细胞因子具有重要调节功能,能限制炎症反应。考虑 AP 早期血清 IL-18 浓度处于受抑制状态,呈低水平表达,随着炎症反应的加重,促炎细胞因子超过抗炎细胞因子的作用,加速炎症反应的过程,血清 IL-18 浓度随之升高。

已有研究表明血清 sTNF-1R 与 IL-18 浓度在 SAP 时显著升高,我们观察到 sTNF-1R 与 IL-18 呈显著正相关,二者可很好预测急性胰腺炎的严重程度。IL-15 同 IL-18 均由单核巨噬细胞系统产生,与 IFN- γ 产生相关,具有相似的生物学作用,实验结果表明,随着病情加重,二者同时升高,且变化趋势相似,二者呈显著正相关,对 AP 有很好的预测作用。sTNF-1R 为 TNF α 的特异性受体,IL-15 能诱导 TNF α 的产生,sTNF-1R 的产生与 IL-15 水平密切相关,实验结果表

明,二者呈显著正相关,可预测急性胰腺炎的严重程度。

4 参考文献

- 1 Tiscornia OM, Hamamura S, De Lehmann ES, Otero G, Waisman H, Tiscornia-Wasserman P, Bank S. Biliary acute pancreatitis: a review. *World J Gastroenterol* 2000;6:157-168
- 2 汪训实,蔡逊,曹庭嘉,张兆林.不骚扰胰腺手术治疗早期重症胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2000;8:121-122
- 3 王兴鹏.中国胰腺疾病研究的现状与展望. *世界华人消化杂志* 2000;8:843-846
- 4 李军成.重症急性胰腺炎的概念之争. *世界华人消化杂志* 1999;7:1072-1073
- 5 李学雄,陈小丽.重症急性胰腺炎非手术治疗 88 例的意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:719-720
- 6 Wu XN. The mechanism of actions of Octreotide, Bupleurum-Peony Cheng Qi decoction and Salvia Miltiorrhiza in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 1999;5:249-251
- 7 黎沾良.严重感染致多器官功能障碍及衰竭的诊治. *世界华人消化杂志* 1999;7:1074-1076
- 8 董红林.肠道通透性试验及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:562-563
- 9 周亚魁,吴云.急性胰腺炎鼠血液流变学与多器官损害的相关性. *世界华人消化杂志* 2000;8:1055-1057
- 10 吴恺,王冰娴,王兴鹏.宫内菌对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道细菌移居的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:883-886
- 11 Xia Q, Jiang JM, Gong X, Chen GY, Li L, Huang ZW. Experimental study of "Tong Xia" purgative method in ameliorating lung injury in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:115-118
- 12 谢传高,王兴鹏.内毒素与胰腺损伤. *世界华人消化杂志* 2000;8:1039-1041
- 13 Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: An early and sustained response, although unpredictable of death. *Crit Care Med* 1999;27:749-755
- 14 吴承堂,黎沾良.二胺氧化酶在急性坏死性胰腺炎肠道损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:64-65
- 15 De Souza LJ, Sampletre SN, Assis RS, Knowies CH, Leite KR, Jancer S, Monteiro Cunha JE, Machado MC. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2001;5:364-370
- 16 李云,钱家勤,秦仁义,申铭.急性胰腺炎患者的免疫功能变化. *世界华人消化杂志* 2000;8:923-925
- 17 Murphy JO, Mehigan BJ, Keane FB. Acute pancreatitis. *Hosp Med* 2002;63:487-492
- 18 吴承堂,黎沾良,黄祥成,张志凌.中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:525-528
- 19 陈建中,戴植本.急性出血性坏死性胰腺炎细菌移位时肠微循环的改变. *世界华人消化杂志* 1999;7:641
- 20 Gloor B, Schmidtman AB, Worni M, Ahmed Z, Uhi W, Buchler MW. Pancreatic sepsis: prevention and therapy. *J Clin Gastroenterol* 2002;16:379-390
- 21 Hartwig W, Maksan SM, Foitzik T, Schmidt J, Herfarth C, Klar E. Reduction in mortality with delayed surgical therapy of severe pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2002;6:481-487
- 22 王自法,徐军,潘承恩,刘绍浩,董瑞.地塞米松抑制炎症递质改善鼠重症急性胰腺炎的预后. *世界华人消化杂志* 2000;8:239
- 23 罗燕,袁朝新,蒋俊明,代琳,彭玉兰,李永忠.急性胰腺炎胰周液体体积聚的超声动态观察. *世界华人消化杂志* 2000;8:1077-1078
- 24 Osvaldt AB, Viero P, Borges da Costa MS, Wendt LR, Bersch VP, Rohde L. Evaluation of Ranson, Glasgow, APACHE-II, and APACHE-O criteria to predict severity in acute biliary pancreatitis. *Int Surg* 2001;86:158-161
- 25 郑建明,郑唯强,王艳丽,王建军,朱明华,龚志锦.手术后并发急性胰腺炎死亡 9 例尸检分析. *世界华人消化杂志* 2000;8:236-238
- 26 Rau B, Baumgart K, Paszkowski AS, Mayer JM, Beger HG. FACS. Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum IL-18 with pancreatitis necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* 2001;29:1556-1562

碱性成纤维细胞生长因子在胃溃疡愈合中的表达及意义

贺建华, 罗和生

贺建华, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
贺建华, 男, 1970年7月生, 湖北恩施人, 土家族, 1992年武汉大学医学院本科毕业(原湖北医科大学), 目前在湖北恩施自治州中心医院工作, 现为武汉大学人民医院消化内科硕士生。
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科。
luotang@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041919-2135
收稿日期: 2002-08-03 接受日期: 2002-08-23

Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in healing human gastric ulcer

Jian-Hua He, He-Sheng Luo

Jian-Hua He, He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luotang@public.wh.hb.cn
Received: 2002-08-03 Accepted: 2002-08-23

Abstract

AIM: To investigate changes of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the healing of human gastric ulcer.

METHODS: The expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human gastric mucosa: normal (20 cases), active stage of gastric ulcer (24 cases), healing stage of gastric ulcer (26 cases) and scarring stage of gastric ulcer (20 cases) was detected by immunohistochemical methods and computerized image analysis.

RESULTS: The expression intensity of bFGF was different among normal gastric mucosa and mucosa at different stages of gastric ulcer. The expression in normal gastric mucosa was weakly positive, at the active stage of gastric ulcer was positive, at the healing stage and scarring stage was strongly positive. The positive signal of bFGF was localized in granulation tissues, extracellular matrix (ECM), fibroblasts and endothelial cells. There were significant differences in average integral optic density and area density among different stages of gastric ulcer and normal gastric mucosa (0.247 ± 0.042 , 0.321 ± 0.096 , 0.296 ± 0.048 vs 0.125 ± 0.062 , $P < 0.05$; 0.131 ± 0.024 , 0.165 ± 0.031 , 0.162 ± 0.028 vs 0.081 ± 0.008 , $P < 0.05$) They were significantly higher at the healing stage and scarring stage than that at the active stage in average integral optic density and area density (0.321 ± 0.096 , 0.296 ± 0.048 vs 0.247 ± 0.042 , $P < 0.05$; 0.165 ± 0.031 , 0.162 ± 0.028 vs 0.131 ± 0.024 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The changes of bFGF were closely related to the healing of human gastric ulcer, and rational use of bFGF can promote the healing of gastric ulcer.

He JH, Luo HS. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in healing human gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(1): 61-64

摘要

目的: 探讨人胃溃疡愈合过程中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的变化及其作用。

方法: 采用免疫组织化学法, 对正常胃黏膜(20例)、胃溃疡活动期(24例)、愈合期(26例)和瘢痕期(20例)组织的bFGF的表达进行定位观察和图像半定量分析。

结果: bFGF在正常胃黏膜呈弱阳性表达, 在胃溃疡急性期呈阳性表达, 在愈合期和瘢痕期呈强阳性表达。阳性信号主要位于腺上皮、细胞外基质、成纤维细胞和内皮细胞中。bFGF平均光密度值和面密度值在胃溃疡活动期、愈合期、瘢痕期与正常胃黏膜相比均有显著性差异(0.247 ± 0.042 & 0.321 ± 0.096 & 0.296 ± 0.048 vs 0.125 ± 0.062 , $P < 0.05$; 0.131 ± 0.024 & 0.165 ± 0.031 & 0.162 ± 0.028 vs 0.081 ± 0.008 , $P < 0.05$), 在愈合期及瘢痕期组织与活动期溃疡相比也有显著性差异(0.321 ± 0.096 & 0.296 ± 0.048 vs 0.247 ± 0.042 , $P < 0.05$; 0.165 ± 0.031 & 0.162 ± 0.028 vs 0.131 ± 0.024 , $P < 0.05$)。

结论: 在人胃溃疡愈合过程中, 存在着内源性bFGF由弱到强的演变, 说明bFGF与胃溃疡愈合密切相关。临床上合理应用bFGF有助于消化性溃疡愈合。

贺建华, 罗和生. 碱性成纤维细胞生长因子在胃溃疡愈合中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(1):61-64

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/61.htm>

0 引言

消化性溃疡愈合是一个十分复杂的过程, 包括上皮、黏膜肌层和结缔组织的重建。其中会涉及到一系列细胞和分子机制的参与。许多生长因子参与了其愈合过程^[1,2]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)即为其中一种。有研究认为外源性bFGF可促进实验性胃、十二指肠溃疡愈合^[3-5], 但有关人胃溃疡愈合过程中内源性bFGF的变化研究较少。我们采用免疫组织化学方法, 对bFGF在正常胃黏膜、胃溃疡活动期、愈合期和瘢痕期的表达情况进行了研究, 探讨bFGF在胃溃疡愈合中的变化及作用。

1 材料和方法

1.1 材料 全部胃溃疡标本均来源于胃镜取材。胃溃疡分期采用日本学者崎田隆夫倡导的分期法, 将溃疡分为活动期(active stage)、愈合期(healing stage)和瘢痕期(scarring stage)。其中活动期(GA组)24例, 愈合期(GH组)

26例,瘢痕期(GS期)20例,标本均取自溃疡边缘,每例取两块,一块用于免疫组化,一块用于HE染色.另取20例完整胃窦黏膜组织作对照.标本经10%中性甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片后备用.

1.2 方法 (1)组织学观察采用HE染色,光镜下观察溃疡各期组织结构.(2)组织碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达采用免疫组织化学SABC法.bFGF免疫组织化学染色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,操作按试剂盒说明书进行.将石蜡切片脱蜡并进行抗原热修复后系列染色,其中一抗用抗体稀释液按1:100稀释.光镜观察,结果以胞质或/和胞膜着棕色者为阳性.另用PBS代替一抗为阴性对照.在400倍光镜下观察,每个视野观察100个细胞,按染色强度或细胞阳性数确定表达强度.不染色,表达强度即为阴性.染色较弱,每个视野阳性细胞数少于10个为弱阳性;中度染色,每个视野阳性细胞数10-30个为阳性;强染色,每个视野阳性细胞数>30个为强阳性.(3)图像半定量分析应用HPIAS-1000型全自动医学图像彩色分析系统,分别测定正常胃黏膜、胃溃疡活动期、愈合期和瘢痕期中胃组织bFGF的平均积分光密度值和面密度值.每张切片随机选取5个视野,然后取其均值.

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验.

2 结果

2.1 组织学观察 溃疡活动期:主要表现为黏膜变性、坏死,大量中性粒细胞为主的炎性细胞浸润和少量新生肉芽组织;愈合期:各种炎性细胞减少,可见再生的腺体组织、毛细血管、纤维结缔组织;瘢痕期:肉芽组织逐渐纤维化和胶原形成,腺体重构.

2.2 bFGF在正常胃黏膜、溃疡活动期、愈合期和瘢痕期组织的定位及表达 在正常胃窦黏膜, bFGF有弱阳性表达,主要位于腺体组织(图1),在溃疡活动期bFGF呈阳性表达,主要位于腺上皮,细胞外基质及炎性细胞中(图2);在溃疡愈合期和瘢痕期均有强阳性表达,主要位于再生腺体组织,成纤维细胞和内皮细胞中(图3,4).

2.3 胃组织 bFGF 图像半定量分析结果见表1 bFGF平均积分光密度值在胃溃疡各期与正常胃黏膜组相比均有显著差异($P < 0.05$).在胃溃疡愈合期和瘢痕期与活动期相比均有显著差异($P < 0.05$).bFGF平均面密度值在胃溃疡各期与正常胃黏膜组均有显著差异($P < 0.05$),在愈合期和瘢痕期与活动期相比均有显著性差异($P < 0.05$).

表1 正常胃黏膜和胃溃疡各期 bFGF 平均积分光密度值和面密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	积分光密度	面密度
正常胃黏膜(GN)	20	0.125 ± 0.062	0.081 ± 0.008
溃疡急性期(GA)	24	0.247 ± 0.042 ^a	0.131 ± 0.024 ^a
溃疡愈合期(GH)	26	0.321 ± 0.096 ^{ab}	0.165 ± 0.031 ^{ab}
溃疡瘢痕期(GS)	20	0.296 ± 0.048 ^{ab}	0.162 ± 0.028 ^{ab}

^a $P < 0.05$, vs GN 组; ^b $P < 0.05$, vs GA 组.

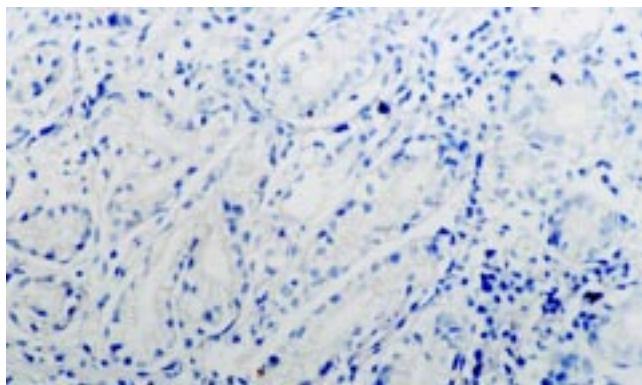


图1 正常胃黏膜:bFGF表达呈弱阳性(ABC×200)

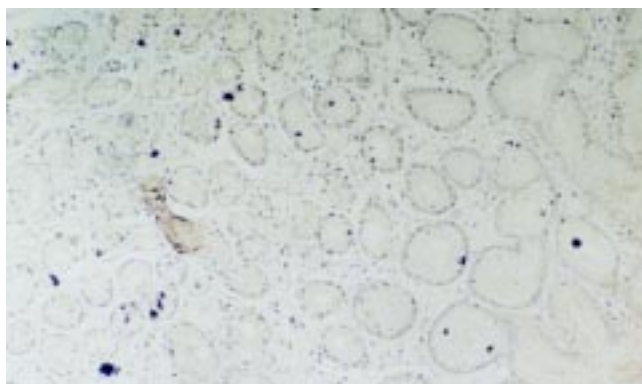


图2 胃溃疡活动期:bFGF呈阳性,主要位于腺体,一些炎性细胞(ABC×100)

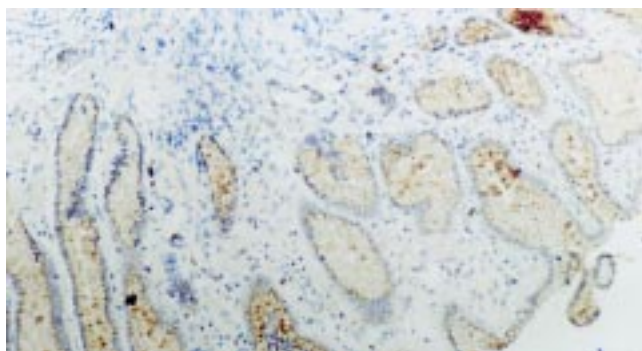


图3 胃溃疡愈合期:bFGF呈强阳性表达,主要位于腺体,成纤维细胞细胞外基质,毛细血管内皮(ABC×100)

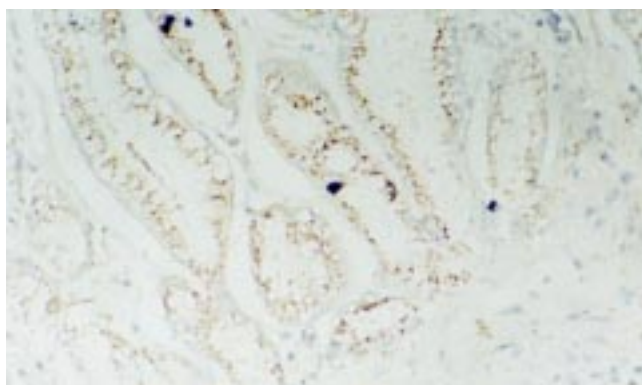


图4 胃溃疡瘢痕期:bFGF呈强阳性表达,主要位于腺体,成纤维结缔组织血管内皮(ABC×200)

3 讨论

损伤修复是多种细胞、生长因子和细胞外基质相互作用的复杂过程,生长因子在损伤修复过程中起着重要作用^[6,7]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种对创伤修复有重要调控作用的细胞因子^[8-12],其参与了调控组织修复的全过程,包括调控炎症反应、诱导毛细血管胚芽形成,促进上皮及肉芽组织生长。早期生长反应素-1(Erg-1)对组织修复有重要作用,而Erg-1的许多作用均依赖于bFGF在组织中的释放和旁分泌。成纤维细胞生长因子主要通过三条途径发挥其促分裂效应:(1)通过受体介导。流式细胞仪检测发现,成纤维细胞生长因子促进细胞增生的作用发生在与受体结合后,可能会促使细胞周期中的G₀期与G₁期细胞减少,S期加速;(2)通过限制性的酶解作用,在酶的作用下使与肝素结合的无活性的FGF变成可溶性的、有活性的FGF;(3)通过FGF结构修饰而发挥作用。此外,成纤维细胞生长因子还具有非促分裂激素样活性,可以趋化炎症细胞与组织修复细胞向创面聚集,发挥抗感染作用和产生生长因子释放的级联效应。

由于胃溃疡是穿透黏膜肌层或其以下的坏死病灶,因而他的愈合过程也十分复杂,包括坏死物的清除、基底部长出肉芽组织,进而形成纤维组织和瘢痕组织及血管的生成,上皮重构等过程。溃疡愈合在形态、发生、衍化和分期上与皮肤伤口愈合特别相似,所以同样也会涉及到一系列细胞和分子机制参与^[13-24]。有研究认为外源性bFGF可加速实验性胃、十二指肠溃疡愈合。Szabo et al利用bFGF可促进慢性伤口血管形成并加速其愈合的特性,把具有酸稳定特性的bFGF(bFGF-CS23)用于治疗鼠十二指肠球部溃疡,结果显示bFGF虽不影响胃酸和胃蛋白酶的分泌,却比西米替丁更有效地促进溃疡面血管形成,加速溃疡愈合。王军志 et al^[3]利用rh-bFGF治疗实验性大、小鼠胃溃疡,发现溃疡边缘再生上皮宽度,肉芽组织内毛细血管密度及瘢痕组织内胶原含量提高,并促进再生腺体成熟与溃疡边缘组织RNA合成。Ernst et al^[4]应用bFGF局部注射治疗小鼠胃溃疡,可加速溃疡愈合。而应用抗bFGF抗体则会使溃疡愈合延迟。许志华 et al^[5]应用rh-bFGF局部注射治疗162例胃、十二指肠溃疡患者,证实其实能明显加快溃疡愈合。

Satoh et al^[25]曾研究发现在小鼠胃溃疡愈合过程中内源性bFGF起很重要的作用。但有关人胃溃疡愈合过程中内源性bFGF变化研究较少。我们采用免疫组织化学方法检测bFGF在人胃溃疡中的表达情况。结果显示:正常胃黏膜中bFGF呈弱阳性表达,活动期胃溃疡呈阳性表达;在愈合期和瘢痕期均呈强阳性表达。阳性信号主要位于腺体组织、成纤维细胞、细胞外基质、内皮细胞中。bFGF平均积分光密度和面密度值,在胃溃疡各期与正常胃黏膜相比均有显著性差异($P < 0.05$),在胃溃疡

愈合期和瘢痕期与胃溃疡活动期相比有显著性差异($P < 0.05$)。从实验结果观察,bFGF存在于正常胃黏膜,在胃溃疡愈合过程中有从弱至强的演变过程,推测可能与溃疡愈合有关。胃黏膜损伤或(和)溃疡可激活编码bFGF及其受体的基因,导致bFGF增加。bFGF增多,可刺激上皮移行、增生,刺激成纤维细胞增生和细胞外基质形成,促进结缔组织形成和新生血管生成^[26,27]。瘢痕期bFGF表达较愈合期有所减少,但仍呈高表达状态,二者无显著差别($P > 0.05$),可能与瘢痕期组织结构仍需改造,还需要bFGF的作用。因为高质量的溃疡愈合应有良好的绒毛结构、完整的腺体和丰富的Goblet细胞,即使溃疡面有肉眼观愈合和上皮形成,但如果缺乏腺体结构或绒毛,标志组织学恢复不良^[28,29]。故推测bFGF在影响溃疡愈合质量方面起重要的调控作用。一些溃疡愈合不良或难治性溃疡可能存在一些生长因子减少或缺乏^[30]。国外学者曾研究认为胃溃疡组织中bFGF表达高于正常胃黏膜^[31]。我们的研究更详细地阐明了溃疡愈合过程中内源性bFGF的变化规律,说明bFGF参与了胃溃疡的修复。为bFGF用于临床治疗消化性溃疡提供了一定的理论依据,将为消化性溃疡的治疗开辟一条新途径。

4 参考文献

- Milani S, Calabro A. Role of growth factor and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech* 2001;53:360-371
- Szabo S, Vincze A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *J Physiol Paris* 2000;94:77-81
- Wang JZ, Wu YJ, Rao CM, Gao MT, Li WG. Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor on stomach ulcers in rats and mice. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 1999;20:763-768
- Ernst H, Konturek PC, Hahn EG, Stosiek HP, Brzozowski T, Konturek SJ. Effect of local injection with basic fibroblast growth factor (bFGF) and neutralizing antibody to bFGF on gastric ulcer healing, gastric secretion, angiogenesis and gastric blood flow. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:377-390
- 许志华, 吕惠政, 邓俊涛, 于万娜, 周建春, 周忠春. 局部注射细胞生长肽并口服法莫替丁治疗消化性溃疡. *世界华人消化杂志* 1999;7:85-86
- 邢峰, 郭宝琛, 付小兵. 生长因子通过调节肠道细胞凋亡来参与肠道的损伤与修复. *世界华人消化杂志* 2002;10:230-233
- Kunimoto BT. Growth factors in wound healing: the next great innovation? *Ostomy Wound Manage* 1999;45:56-64
- Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, Jiang LX, Sun XQ. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor α in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol* 2000;6:353-355
- 蒋礼先, 付小兵, 孙同柱, 杨银辉, 顾小曼. 鼠缺血肠癌基因c-jun活化碱性成纤维细胞生长因子受体表达的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7:498-500
- 杨银辉, 付小兵, 孙同柱, 蒋礼先, 顾小曼. bFGF对缺血再灌注后肠道内源性bFGF和TGF- β 表达的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:793-794
- Fu XB, Shen ZY, Chen YL, Xie JH, Guo ZR, Zhang ML. Randomised placebo-controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second-degree burns. *The Lancet* 1998;352:1661-1664
- Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and transduction pathways. *J Physiol Paris* 2001;95:337-344
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Ernst H, Drozdowicz D, Pajdo R, Hahn EG. Expression of epidermal growth factor and

- transforming growth factor alpha during ulcer healing Time sequence study: *Scand J Gastroenterol* 1997;32:6-15
- 14 Palomino A, Hernandez-Bernal F, Haedo W, Franco S, Mas JA, Fernandez JA, Soto G, Alonso A, Gonzalez T, Lopez-Saura P. A Multicenter, randomized, double-blind clinical trial examining the effect of oral human recombinant epidermal growth factor on the healing of duodenal ulcers. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1016-1022
 - 15 Niki S, Matsubayashi H, Mizoue T, Mizuguchi Y, Sanada J, Takei K, Miwa K, Horibe T, Niido T, Seki T, Kawaguchi M, Saitou T. Study of transforming growth factor alpha expression in duodenal ulcer. *Nippon Shokibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:385-391
 - 16 Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Tomas MG. Coordinated localization of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000;47:792-800
 - 17 Tominaga K, Arakawa T, Kim S, Iwao H, Kobayashi K. Increased expression of transforming growth factor -beta during gastric ulcer healing in rats. *Dig Dis Sci* 1997;42:616-625
 - 18 Hori K, Shiota G, Kawasaki H. Expression of HGF and c-met receptor in gastric mucosa during ulcer healing. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:23-31
 - 19 Kinoshita Y, Kishi K, Asahara M, Matasushima Y, Wang HY, Miyazawa K, Kitamura N, Chiba T. Production and activation of hepatocyte growth factor during the healing of rat gastric ulcers. *Digestion* 1997;58:225-231
 - 20 Szabo S, Vincze A, Sandor Z, Jadus M, Gombos Z, Pedram A, Levin E, Hagar J, Iaquinto G. Vascular approach to gastroduodenal ulceration new studies with endothelins and VEGF. *Dig Dis Sci* 1998;43(Suppl 9):40S-45S
 - 21 Takahashi M, Kawabe T, Ogura K, Maeda S, Mikami Y, Kaneko N, Terano A, Omata M. Expression of vascular Endothelial Growth Factor at the human gastric ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: a new angiogenic factor for gastric ulcer healing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:493-498
 - 22 Jones MK, Kawanaka H, Baatar D, Szabo IL, Tsugawa K, Pai R, Koh GY, Kim I, Sarfeh II, Tarnaski AS. Gene therapy for gastric ulcers with single local injection of naked DNA encoding VEGF and angiopoietin-1. *Gastroenterology* 2001;121:1040-1047
 - 23 陈宝雯, 王洪涛, 刘正新, 贾博琦, 马清钧. 外源性表皮生长因子治疗大鼠慢性胃溃疡对原癌基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:504-506
 - 24 胡义亭, 甄承恩, 邢国章, 张曼利, 张建新, 王鼎鑫, 卢亚敏. 消化性溃疡患者转化生长因子 α 、表皮生长因子和前列腺素E2的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:43-47
 - 25 Satoh H, Shino A, Sato F, Asano S, Murakami I, Inatomi N, Nagaya H, Kato K, Szabo S, Folkman J. Role of endogenous basic fibroblast growth factor in the healing of gastric ulcers in rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;73:59-71
 - 26 Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factor. *Front Biosci* 1999;15:D303-309
 - 27 Akiba Y, Nakamura M, Oda M, Kimura H, Miura S, Tsuchiya M, Ishii H. Basic fibroblast growth factor increases constitutive nitric oxide synthase during healing of rat gastric ulcers. *J Clin Gastroenterol* 1997;25(Suppl):S122-128
 - 28 易超文, 李晓冬, 易粹琼. 消化性溃疡愈合的动力学及影响因素. *华人消化杂志* 1998;6:1007-1009
 - 29 余善强, 周福生, 崔琦珍, 王建华. 溃疡愈合质量研究进展. *华人消化杂志* 1998;6:1010-1011
 - 30 Shih SC, Chien CL, Tseng KW, Lin SC, Kao CR. Immunohistochemical studies of transforming growth factor-beta and its receptors in the gastric mucosa of patients with refractory gastric ulcer. *J Formos Med Assoc* 1999;98:613-620
 - 31 Hull MA, Brough JL, Powe DG, Carter GI, Jenkins D, Hawkey CJ. Expression of basic fibroblast growth factor in intact and ulcerated human gastric mucosa. *Gut* 1998;43:525-536

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单

(2002-07-19)

本刊讯 美国《医学索引》(Index Medicus /MEDLINE, IM) 是世界上公认的重要的医学检索工具, 由世界上最大的医学信息中心 - 美国国立医学图书馆 (National Library of Medicine, NLM) 编辑出版. 2002 年度美国国立医学图书馆收录我国医学期刊 58 种, 分别为法医学杂志 (中), 湖南医科大学学报 (中), 华西口腔医学杂志 (中), 华西医科大学学报 (中) 环境科学 (中), 临床耳鼻咽喉科杂志 (中), 色谱 (中), 生理科学进展 (中), 生理学报 (中) 生物工程学报 (中), 生物化学与生物物理杂志 (中), 生物医学工程学报 (中) 实验生物学报 (中), **世界胃肠病学杂志 (英)**, 同济医科大学学报 (英), 微生物学报 (中) 卫生研究 (中), 细胞研究 (英), 香港医学杂志 (英) 亚洲男科学杂志 (英文版), 亚洲太平洋公共健康杂志 (英), 眼科学报 (中), 药学学报 (中), 遗传学报 (中), 应用生态学报 (中) 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 (中), 中国科学 (C 辑) (英), 中国修复重建外科杂志 (中) 中国药理学报 (英), 中国医疗器械杂志 (中), 中国医学科学院学报 (英), 中国医学科学院学报 (中), 中国应用生理学杂志 (中), 中国中西医结合杂志 (中), 中国中药杂志 (中) 中华病理学杂志 (中), 中华创伤杂志 (英), 中华妇产科杂志 (中), 中华肝脏病杂志 (中) 中华结核和呼吸杂志 (中), 中华口腔医学杂志 (中), 中华内科杂志 (中), 中华烧伤杂志 (中), 中华实验和临床病毒学杂志 (中), 中华外科杂志 (中), 中华血液学杂志 (中), 中华眼科学杂志 (中), 中华医学遗传学杂志 (中), 中华医学杂志 (英), 中华医学杂志 (中), 中华预防医学杂志 (中), 中华整形烧伤外科杂志 (中), 中药材 (中), 中医杂志 (英).

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

CpG 岛甲基化与胃肠道肿瘤

周永宁,徐采朴,房殿春

周永宁,徐采朴,房殿春,中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科全军消化专科中心 重庆市 400038
项目负责人:徐采朴,400038,重庆市沙坪坝区,中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科. yongningzhou@sina.com.cn
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-27

摘要

基因和表遗传性改变是恶性肿瘤发生的主要机制. 表遗传性修饰-DNA甲基化在胃肠道恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用. 细胞周期、DNA修复、血管生成和凋亡等都涉及到相关基因的CpG岛甲基化. CpG岛甲基化导致基因失活的分子机制包括DNA甲基转移酶(DNMTs)、CpG甲基化结合蛋白(MBDs)以及组蛋白去乙酰化酶(HDACs)等相关蛋白.MBD可直接抑制转录,并与HDAC形成复合体.DNMT催化甲基化生成,并与HDAC协同作用导致基因转录失活.与衰老相关的甲基化可影响众多基因CpG岛,是老年人恶性肿瘤发生的主要危险因素;甲基化的另一种方式CpG岛甲基化表型(CIMP)具有肿瘤独特性,P16、hMLH1、E-cadherin等重要肿瘤抑制基因失活与此有关.DNA甲基化的相关深入研究将对揭示包括消化道等恶性肿瘤的发生机制以及未来临床诊断和治疗展示了广阔前景.

周永宁,徐采朴,房殿春.CpG岛甲基化与胃肠道肿瘤.世界华人消化杂志 2003; 11(1):65-71

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/65.htm>

0 引言

恶性肿瘤的生物学特征表现为浸润性生长和转移,其发生机制在于细胞内部基因结构和功能发生了异常改变.现代肿瘤理论认为恶性肿瘤是由遗传基因缺陷以及基因表遗传性(epigenetic)改变而引起.基因缺陷如突变、缺失会导致编码区结构和功能破坏.表遗传性改变尽管不存在DNA序列改变,但通过DNA自身化学修饰方式从转录水平可影响基因的表达,调控DNA功能.表遗传性修饰主要包含两个层面:DNA甲基化和组蛋白去乙酰化^[1,2].最近^[3-6]发现肿瘤抑制基因失活与其启动子区域CpG岛高甲基化状态直接关联.更为重要的是DNA甲基化与组蛋白去乙酰化在导致基因转录抑制方面具有协同作用^[7-9].因此CpG岛甲基化在肿瘤发生、发展过程中可能发挥着关键作用.

1 转录、CpG岛与DNA甲基化

真核细胞染色质分为常染色质和异染色质,前者具有转录能力.染色质的基本单位是一系列紧密排列的核小体,每个核小体由146bp的DNA片段围绕8聚体组蛋

白构成.正常生理条件下基因组部分基因适当转录表达,部分则保持“沉默”(silencing),其调控机制与核小体组蛋白及DNA的化学修饰关联.这种化学修饰称为表遗传性或后生调控模式.组蛋白乙酰化状态是所有真核生物基因转录的调控方式^[10],与此相关的酶分别是组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰基酶(histone deacetylase, HDACs).DNA甲基化是哺乳动物遗传外基因转录的重要调控方式^[11],在基因转录抑制方面可能起关键作用.曾认为DNA甲基化是脊椎动物DNA惟一的自然化学修饰方式,研究^[12-14]证明果蝇亦具有与脊椎动物同源的DNA甲基化模式.迄今已证实^[15-17]有三种与DNA甲基化相关的酶,并已被分别克隆,他们是DNMT1(DNA methyltransferase DNA,甲基转移酶1)、DNMT3a和DNMT3b.生物学甲基化方式可分为新生甲基化(de novo methylation)和持续甲基化(maintenance methylation),据认为^[17-19],DNMT3a和DNMT3b可以催化新生甲基化形成,DNMT1主要在DNA复制时维持其持续甲基化状态.DNMT2也已被克隆,但体外胚胎干细胞实验证明DNMT2不具有甲基转移酶活性^[17,20,21].

DNA甲基化是指由DNMTs介导,在胞嘧啶(C)的第五位碳原子上加上一甲基基团,使之变成5-甲基胞嘧啶(5-mC)的化学修饰过程.这种修饰反应主要发生在CpG二核苷酸的胞嘧啶.哺乳动物基因组中的大部分(70%)CpG二核苷酸存在于重复子(repetitive elements)中,正常情况下这些CpG二核苷酸甲基化是作为一种宿主基因的保护机制^[19-21],因为他会抑制重复子转录以及重复子同源性重组.CpG二核苷酸聚集区域称为CpG岛(CpG island).CpG岛长约0.5-2.0Kb,呈不连续分布.理论上讲,CpG二核苷酸含量应有1/16,但由于生物学上的C-G抑制现象,实际上哺乳动物细胞基因组中C-G含量仅为1%,但C-G抑制现象并不适用于CpG岛.整个基因组中,CpG岛通常位于基因的启动子区域(promoter region)^[22],故亦称5'-CpG岛.与其他CpG二核苷酸不同,正常情况下,CpG岛是以非甲基化形式存在的.CpG岛如此丰富的胞嘧啶,何以未被甲基化,原因尚不清楚.对腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Apart)的研究^[23,24]发现,可能存在的“反作用因子”(trans-acting factor)与DNA的Sp1位点结合,保护Apart基因CpG岛免遭甲基化.CpG岛非甲基化状态的生物学意义非常重要,启动子非甲基化状态是相关基因转录或待转录的先决条件^[11],并通过有丝分裂得以继承和维持,

同时也是恶性肿瘤发生的关键环节.与大多数CpG岛非甲基化状态不同,某些生理性的CpG岛甲基化亦具有重要的生物学意义:(1)哺乳动物胚胎发育时期,DNA甲基化又再更新,以此调节相关基因表达^[17];(2)X-染色体失活;(3)印迹基因(imprinted gene)转录抑制;(4)防御外来入侵的寄生DNA(parasitic DNA)^[19];(5)维护染色体的完整性^[25];(6)控制组织特异性基因表达^[26];(7)调控DNA重组的某些环节^[27].

正常DNA甲基化模式改变,包括DNA过低甲基化和CpG岛高甲基化,他们在肿瘤的发生中都具有重要的意义^[25,28].以往对CpG岛甲基化作用的认识仅限于在细胞有丝分裂时其能抑制基因重组和/或有助于染色体分离^[29].相反对DNA过低甲基化与肿瘤的研究较多.基因组DNA过低甲基化可促进杂和性丢失(LOH)^[30],导致基因组有害基因转录表达,例如激活原癌基因,使癌基因或相关因子得以表达^[31].胚胎干细胞^[29,32]在缺乏DNMT1时基因组过低甲基化,宿主保护机制削弱,有利于基因组重复子同源性重组,从而导致整个基因组不稳定性增加.免疫缺陷性着丝粒不稳定性面部异常综合征(immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies, ICF)与DNMT3b基因突变^[33,34]造成基因组不稳有关.此外,在细胞染色体中心粒周围存在高度密集甲基化区域,如果失去致密的甲基,可导致基因损伤和突变^[35,36].

1980年代发现了结肠肿瘤降钙素基因的5'-CpG岛高甲基化,并由此拓宽了认识肿瘤与CpG岛甲基化研究的广阔视野.随着研究的不断深入,CpG岛甲基化对肿瘤抑制基因失活的关键作用凸现出来,成为当今肿瘤学研究的新热点.如果说胚胎发育时期DNA甲基化的调控能有效阻止有害基因的表达,那么肿瘤抑制基因CpG岛非甲基化状态就能保护体细胞避免发生恶性转化.

2 CpG岛甲基化与转录抑制

CpG岛甲基化导致相关基因失活是不争的事实.最近认为CpG岛甲基化导致基因失活、转录抑制的机制可能有以下几点.

基因启动子区域(包含转录因子结合位点)高甲基化状态,直接阻止基因转录因子与启动子结合^[37,38].

高甲基化的CpG岛通过特异的甲基化结合蛋白(methyl-cpg-binding protein, MeCP),与HDAC协同作用,导致基因失活.目前认为这一间接途径是基因失活的主要机制.MeCP复合体^[39,40]包含MeCP1和MeCP2.MeCP2由甲基化CpG岛结合区(methyl-CpG-binding domain, MBD)和转录抑制区(transcriptional repression domain, TRD)构成^[41].MBDs家族^[42,43]包括MBD1、MBD2、MBD3和MBD4.MBD1^[39,44]为单一蛋白质,可选择性与甲基化DNA结合而抑制转录.MBD2^[45]可能具

有去甲基化酶活性.MBD3和/或MBD2以及HDAC与Mi-2/NuRD(nucleosome remodeling histone deacetylase)构成复合体^[46,47].Mi-2是ATP酶的SWI2/SNF2超家族成员,通过相关蛋白RbAp48增强去乙酰化酶的活性,从而影响组蛋白-DNA的相互作用,使染色质聚集,基因失活.最近^[48,49]发现HDAC和Sin3A直接相互作用与MeCP2构成复合体,Sin3A(一种基因转录抑制因子)活性得到增强.MBD4^[50]与hMLH1关联,参与DNA修复.MBD2和HDAC也是MeCP1复合体的构成部分,MeCP1复合体具有甲基结合活性,至少能与12个对称的甲基化CpG岛结合^[45].HDACs和HATs通过调节组蛋白乙酰化状态^[10],进而调控DNA活性.组蛋白H₃或H₄的氨基末端经HATs催化而乙酰化;在组蛋白去乙酰基酶HDACs催化下去乙酰化.乙酰化时,组蛋白与DNA结合能力降低,基因转录因子容易进入启动子区域;反之基因转录因子就不易进入启动子.CpG岛甲基化,通过MeCP可增强HDAC去乙酰化活性,从而导致基因转录抑制.不难发现MeCP作为“纽带”将DNA甲基化和组蛋白去乙酰化这两种表遗传性化学修饰模式有机地结合起来,较合理的解释了CpG岛甲基化与基因转录抑制之间的因果关系.

DNMTs除具有甲基转移酶活性外,还有抑制基因转录作用.DNMT1的C-端为甲基转移酶催化区,能将S-腺苷甲硫氨酸的甲基基团转移至胞嘧啶^[51].N-端为功能调节区,能将酶靶向于复制位点,并且对半甲基化CpG(hemi-methylated CpGs)二核苷酸有高亲和力,约是非甲基化CpG(unmethylated CpGs)的10-40倍^[52].DNMT1可能通过他的N-端与HDAC相互作用抑制转录,并且这种抑制作用与其本身的催化活性无关.此外,某些因子可能与N-端构成复合体,使DNMT1的转录抑制和/或酶活性具有调控性和靶向性.Robertson et al^[53]发现DNMT1结合pRB(retinoblastoma protein),通过E2F/pRB复合体抑制转录,这种转录抑制似乎也与甲基化无关,因为在启动子未发现甲基化.Rountree et al^[54]证实了一种被称为DNMT1相关蛋白(DNMT1 associated protein 1, DNMP1)的因子与DNMT1的N-端结合,再与TSG101(Tumor Susceptibility Gene 101)结合,后者是一种肿瘤抑制基因,具有强大的转录抑制作用.有关DNMT1/DNMP1相互作用的机制及其功能尚需深入研究.有人^[54,55]认为,DNMT3a和DNMT3b亦具有转录抑制功能,且与HDAC活性有关.这种转录抑制及其与HDAC的相关性主要由N-端类似于ATRX的区域介导.

3 CpG岛甲基化与肿瘤发生

根据经典肿瘤发生的“二次打击理论”(two-hit hypothesis),肿瘤抑制基因失活可因基因突变或缺失引起.但某些恶性肿瘤其DNA序列完整,并未有突变、缺失,“二次打击理论”无法解释肿瘤抑制基

因何以失活. 错配修复系统(MMR)突变导致微卫星不稳(MSI)频繁出现在遗传性非息肉结肠癌(HNPCC), MMR突变主要涉及hMLH1和hMSH2基因. 但发现^[56]10-15%的散发性结肠癌尽管无MMR突变, 但亦表现MSI. 这就表明MMR相关基因失活存在另外一种机制或途径. 基于下列事实: 散发性结肠癌特别是MSI⁺结肠癌出现大量hMLH1基因CpG岛甲基化; p16-^{INK4a}失活的惟一机制^[57]在于CpG岛甲基化; 某些致癌剂影响DNA甲基化方式^[58]; 故普遍认为DNA甲基化是肿瘤发生的第三种机制, 称之为“启动子高甲基化”(promoter hypermethylation)^[59]. Costello et al^[60]证实, 目前已发现的肿瘤细胞基因组中有45 000个CpG岛, 各类癌细胞有近600个CpG岛异常甲基化. 重要的是, CpG岛甲基化异常不是随机事件, 而是具有基因特异性和肿瘤特异性.

DNA甲基化异常在肿瘤形成机制中的确切作用尚不清楚, 然而众多证据表明肿瘤抑制基因CpG岛甲基化、导致基因失活和转录抑制是肿瘤发生的重要机制之一. 肿瘤细胞DNA总体甲基化水平低于正常细胞, 但某些特定基因(如肿瘤抑制基因)CpG岛却处于高甲基化状态, 可能的机制与以下因素有关.

3.1 CpG岛保护因子缺乏 对胚胎细胞Apert基因的研究中发现^[24], Apert基因CpG岛未被甲基化可能与“反作用因子”有关. 故推测, 可能存在如“反作用因子”的保护因素使正常细胞DNA的CpG岛非甲基化. 肿瘤细胞由于某种原因缺乏相应的保护因子, CpG岛被甲基化. 这种推测也得到另一项实验支持^[61]: 在E-cadherin基因启动子甲基化的癌细胞株中, 导入外源性非甲基化启动子, 其E-cadherin的表达明显小于启动子非甲基化的癌细胞株, 表明E-cadherin的完全表达需要CpG岛保护因子.

3.2 DNMT高表达 关于DNMT高表达与CpG岛甲基化之间的关系, 目前尚有争议. Belinsky et al^[4,62]认为, 在恶性肿瘤细胞中DNMT1的表达上调. 但也有报告^[63]指出CpG岛甲基化与DNMT1水平无关. 在人成纤维细胞, 持续DNMT1表达可导致众多基因CpG岛呈时间依赖的高甲基化^[64]. Fos过度表达可使DNMT1表达上调, 在Fos导致的细胞转化中具有某种作用^[65], 如Min小鼠(结肠息肉易感小鼠)在DNMT1杂和性背景下极少发生息肉病变^[66]. 研究发现癌细胞株DNMT1高表达, 并可与p21^{-WAF1}竞争性结合PCNA, 造成p21^{-WAF1}表达上调, 进而影响细胞周期依赖激酶(CDK)活性, 使Rb蛋白磷酸化受到影响, 结果又通过正反馈调节p21^{-WAF1}的表达, 最终导致细胞恶性生长^[67, 68]. 大肠癌细胞株HDT116在Dnmt1基因缺失时, 基因组甲基化水平仅少量减低(20%)^[69], 但CpG岛仍然高甲基化提示可能其他甲基化转移酶维持着这种状态. 有迹象表明DNMT3a和DNMT3b在癌细胞中也少量表达, 由此推测^[70]这三种甲基化转移酶之间的平衡与协调可能具有

重要意义. 有学者^[71,72]进一步指出甲基化模式的维持是由甲基化和去甲基化与组蛋白乙酰化状态之间的动态平衡所决定.

3.3 DNMT复合体调控障碍 DNMT调控障碍或靶向错误可能归咎于DNMT复合体一种或多种因子的缺乏, 如pRB、DNMP1和TSG101等. 几乎所有恶性肿瘤的Rb通路(调控细胞周期)都受到破坏, 所以有理由相信癌细胞CpG岛甲基化与DNMT1/pRB相互作用障碍有关联^[55]. 此外, Dnmp1基因的甲基化修饰位点(methylation modifier locus 1, MEMO1)^[73]位于1号染色体的短臂, 而许多恶性肿瘤频繁发生的LOH就位于这个区域. MEMO1位点的LOH与成神经细胞瘤细胞株的异常甲基化有关^[73]. 目前尚不知DMAP1是否就是MEMO1的位点; 恶性肿瘤细胞异常甲基化是否与LOH有关联.

3.4 复制周期时间错误 细胞分裂增生周期是基因组复制并且表遗传性得以继承的过程. 简言之, 细胞复制时染色体要将遗传信息正确传代, 包括基因组甲基化方式、核小体的装配和定位、组蛋白修饰状态的重建以及其他保证正常转录的相关因子. 为此, 细胞在空间和时间调控基因组的复制以保证染色体正确遗传^[74]. 已证实^[75]增生细胞核抗原(PCNA)对异染色质遗传具有关键作用, 推测^[75,76]PCNA可能给其他相关蛋白结合提供了一个平台, 并且伴随复制再建适宜的表遗传性状态. DNMT1通过与PCNA直接作用而进入细胞复制机制^[76,77], 并维持子代细胞DNA适宜的甲基化方式. 有证据表明DNMT1与相关蛋白在S期形成复合体. Rountree et al^[54]证实, 在整个S期, DNMP1与DNMT1在复制位点形成复合体. 发现^[78]在S期末期, HDAC2又与DNMT1/DMAP1构成复合体, 这一点非常重要, 因为此时正处于转录“休眠”的异染色质复制阶段, 因而也可解释DNA复制后, 新合成的核小体去乙酰化的机制. 最近^[79]研究发现DNMT1在复制启动阶段发挥重要作用, 当细胞开始进入S期时, pRB和E2F定位于复制位点, 也许pRB和DNMT1在这个时期相互作用对于DNA复制启动的时机恰到好处. 已发现^[79]“永生”细胞在S期早期并不存在pRB-SWI/SNF复制位点, 很可能癌细胞有同样缺陷.

如上所述, 基因组复制在S期具有时空性. DNMT1及其相关复合体在S期不同阶段的调控作用是DNA复制正常的重要因素之一, 也是恶性肿瘤发生的重要环节. 由于复制时间错误, 某些基因CpG岛不被甲基化而失去转录抑制(癌基因); 而另一些基因则发生不恰当的甲基化(肿瘤抑制基因). 可以说, 肿瘤抑制基因CpG岛在S期末期甲基化导致基因失活是在错误的时间所发生的错误事件.

4 CpG岛甲基化与胃肠道肿瘤

DNA甲基化方式改变涉及染色体结构、DNA复制以及

基因表达. CpG 岛甲基化与某些遗传性疾病^[80] (如 fragile-X syndrom)、衰老^[81]以及恶性肿瘤^[4]有关.近 50 % 的人类家族性恶性肿瘤细胞发现有肿瘤抑制基因突变^[4]; 但仍有部分癌细胞虽无编码区突变的证据, 肿瘤抑制基因却因 CpG 岛甲基化处于失活状态, 表明 CpG 岛甲基化是癌细胞相关基因失活的重要机制之一.最近^[82-87]发现众多恶性肿瘤不同程度的存在一个或多个肿瘤抑制基因 CpG 岛甲基化, 如乳腺癌、舌癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、胃癌和结肠癌等. 这些相关的肿瘤抑制基因失活涉及多个环节, 从而导致肿瘤的发生和进展^[55] (表1).

表 1 Fundamental pathways altered by DNA methylation in cancer

Pathway affected	Genes silenced by CpG island methylation
Cell cycle control	Rb, p16(INK4a), p15, p14(ARF), p73
DNA damage repair	MLH1, O ⁶ MGMT, GST π , BRCA1
Inhibiting apoptosis	DAP-kinase, Caspase-8, TMS1
Invasion tumor architecture	E-cadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP3, Thrombospondin1
Growth factor response	ER, RAR β , Androgen Receptor, Endothelin B Receptor, RASSF1A

CpG 岛甲基化是胃肠道恶性肿瘤发生的早期事件, 在早癌及癌前病变就存在 CpG 岛甲基化^[88]. 对食管癌检测^[89]发现除食管癌外, 反流性食管炎、Barrett's 食管也出现 ER (雌激素受体)、APC 和 p16 基因 CpG 岛甲基化. Esteller et al^[90]的研究也发现结肠腺瘤 p16 和 p14 基因 CpG 岛甲基化. Kang et al^[91]则证实 DAP-kinase、hMLH1、THBS1 (thrombospondin-1)、TIMP-3 (金属蛋白酶-3) 在胃癌及癌前病变组织 CpG 岛甲基化, 且 THBS1 和 TIMP-3 的 CpG 岛甲基化频率随胃炎→肠化生→腺瘤→胃癌的不同阶段显著上升. 此外也发现肝硬变时染色体 16q22.1 高甲基化^[92].

Issa et al^[58]首先报告, 在正常老年人结肠黏膜细胞 ER 基因 CpG 岛甲基化. Toyota et al^[93,94]采用 MCA (Methylation CpG island amplification) 技术 (同时进行甲基化分析和克隆基因组不同的甲基化 DNA) 对 26 个 DNA 序列的 CpG 岛甲基化与结肠癌的关系作了较为系统的研究. 根据结肠癌不同的 CpG 岛甲基化状况而分为两型: A 型和 C 型. A 型甲基化 (19/26, 73 %) 在结肠癌频繁发生 (30-100 %), 部分正常结肠黏膜尤其是老年人也存在, 称之为“衰老独特性甲基化” (aging-specific methylation). 由此表明^[81,93,94]老年化是结肠癌等恶性肿瘤发生的主要危险因素, 在衰老进程中, 由于基因组 DNA 的 CpG 岛甲基化发生和不断积累, 可引起细胞周期、分化及凋亡调控机制障碍. C 型甲基化 (7/26, 27 %) 在结肠癌的发生频率较低 (30-50 %), 但明显不同于 A 型, 仅出现在癌组织, 亦称“癌独特性甲基化” (cancer-specific methylation). 由于两型甲基化同时都有新生甲基

化异常, 故推测^[94] C 型甲基化机制可能主要在于抗甲基化的保护因子如“反作用因子”的缺乏.

进一步对 50 例结肠癌研究^[94]发现, CpG 岛甲基化状况在两组间明显不同: 第一组 C 型极少见, 平均每个标本 0.3 个位点, 癌肿主要发生在远端; 第二组 C 型甲基化高频率, 平均 5.1 个位点, 且癌肿主要在近端; 两组之间 A 型甲基化无明显差异. 第二组结肠癌因以 C 型甲基化为特征而称为 CpG 岛甲基化表型 (CpG island methylator phenotype, CIMP). 推测 CIMP⁺ 和 CIMP⁻ 结肠癌的发生机制可能不同. 对于多数的 CIMP⁻ 结肠癌而言, 伴随着年龄进展, 结肠黏膜细胞基因组众多基因甲基化, 并不断积累, 影响相关基因表达. 由于细胞周期、分化及凋亡调控机制障碍, 导致细胞处于高增生状态, 最终可能细胞恶性转化. 在此过程中, 环境因素如炎症、病毒感染等也可参与其中. CIMP⁺ 的发生则与细胞转化过程中肿瘤抑制基因失活密切相关, 如 p16-INK4a^[95]、THBS1^[91]、E-cadherin^[96]、hMLH1^[97,98] 及 Cox-2^[99] 等. 已报告胰腺癌^[100]、胃癌^[101] 及乳腺癌^[102] 等亦存在 CIMP.

晚近^[59,103]认为, 在肿瘤演进过程中, 常伴随基因和表遗传性分子复杂交错的多样性改变, 故称“表遗传性-突变表型” (epi-mutator phenotype) 较 CIMP 更为贴切.

Grady et al^[104]发现家族性弥漫型胃癌生殖细胞突变的 E-cadherin 基因存在启动子 CpG 岛甲基化. Machado et al^[105]随后对 23 例散发性胃癌的研究中证实, 16 例弥漫型胃癌中有 9 例存在 E-cadherin 基因突变, 同时免疫组化检测均表达异常. 9 例中仅 1 例 LOH, 即符合经典的“二次打击理论”模式; 但 6 例 CpG 岛甲基化的事实表明在 E-cadherin 基因突变的基础上, 其 CpG 岛甲基化是散发性弥漫型胃癌的“第二次打击”. 这项研究展示出 CpG 岛甲基化在恶性肿瘤发病机制中另一个重要途径或模式.

5 CpG 岛甲基化与临床意义

恶性肿瘤 DNA 甲基化异常具有鲜明特征^[60,106]: 肿瘤特异性, 基因和组织特异性以及可逆性. 因此 DNA 甲基化检测作为一种新的分子生物学手段将会广泛应用于临床诊断、病情监测以及疗效评价. 甲基化检测技术的高敏感性和特异性, 使其优于如微卫星不稳定性及 LOH 等检测方法. PCR 技术更适用于检测标本量较少的组织切片、痰及尿液等, 并能定量分析以此进行临床随访.

DNA 甲基化的可逆性特征为临床抗肿瘤治疗提供了一种新途径. 5-氮-2-脱氧胞苷 (DAC 或 5aza-dc) 是有效的甲基转移酶抑制剂, 大剂量使用时因其细胞毒性而具有抗肿瘤作用, 小剂量 DAC 导致细胞分化可能与去甲基化和调控分化的特异性基因再表达有关^[107,108]. 通过对 ICF 的治疗, 证明 DAC 可增加染色体转录^[36]. 此外, DAC 与组蛋白去乙酰化抑制剂 TSA 协同作用值得

关注. Cameron et al^[109]证实去甲基化药物协同HDAC抑制剂可诱导失活的基因再表达; Zhu et al^[110]亦发现去甲基化药物协同HDAC抑制剂可导致肺癌细胞大量凋亡, 提示与凋亡关联的甲基化基因在去甲基化后, 该基因被激活. 最近 Kim et al^[111]报告对胃 MALT 淋巴瘤抗幽门螺杆菌(Hp)治疗后平均随访 28mo, 发现 3 例(3/7) p16 的 CpG 岛甲基化消失, 提示 Hp 感染与 DNA 甲基化的关系如何? DNA 甲基化检测能否作为胃 MALT 淋巴瘤 Hp 根除治疗的分子生物学指标?

DNA 甲基化是当今肿瘤研究的热点, 其中许多内在机制尚待深入研究, 如甲基化与细胞复制周期、恶性肿瘤 DNA 甲基化和染色质异常改变方式等. 相信对甲基化机制的不断研究将会为认识肿瘤发病机制以及未来临床诊断和治疗展示广阔前景.

6 参考文献

- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 2000; 408: 495-498
- Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 255-259
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-196
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-167
- 朱卫国. DNA 甲基化, 基因调控和癌症. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 680-683
- Leonhardt H, Cardoso MC. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem* 2000; 35: 78-83
- Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21^{WAF1} regulation. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 400-405
- Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20
- Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 339-347
- Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; 70: 5-8
- Roder K, Hung MS, Lee TL, Lin TY, Xiao H, Isobe KI, Juang JL, Shen CJ. Transcriptional repression by Drosophila methyl-CpG-binding proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7401-7409
- Lyko F, Whittaker AJ, Orr-Weaver TL, Jaenisch R. The putative Drosophila methyltransferase gene dDnmt2 is contained in a transposon-like element and is expressed specifically in ovaries. *Mech Dev* 2000; 95: 215-217
- Gowher H, Leisemann O, Jeltsch A. DNA of Drosophila melanogaster contains 5-methylcytosine. *EMBO J* 2000; 19: 6918-6923
- Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 1997; 270: 385-395
- Yoder JA. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 279-284
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257
- Margot JB, Aguirre-Arteta AM, Di-Giacco BV, Pradhan S, Roberts RJ, Cardoso MC, Leonhardt H. Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. *J Mol Biol* 2000; 297: 293-300
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13: 335-340
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998; 20: 116-117
- Bird AP. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 1995; 11: 94-100
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11995-11999
- Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 1994; 8: 2282-2292
- Mummaneni P, Yates P, Simpson J, Rose J, Turker MS. The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse aprt gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5163-5169
- Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174
- Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 80: 1312-1321
- Bender J. Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 252-256
- Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 11-19
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89-93
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2545-2550
- Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer—concepts, misconceptions, and promise. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1460-1461
- Colot V, Rossignol JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 1999; 21: 402-411
- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14412-14417
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402: 187-191
- Ji W, Hernandez R, Zhang XY, Qu GZ, Frady A, Varela M, Ehrlich M. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 1997; 379: 33-41
- Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, Ehrlich M. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 121-128
- Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* 2001; 276: 32282-32287
- Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 226-231
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6538-6547
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-454
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; 69: 905-914
- Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A. A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 1997; 16: 256-259
- Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 2001; 15: 710-723
- Ng HH, Jeppesen P, Bird A. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1394-1406

- 45 Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999; 23: 58-61
- 46 Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 1999; 13: 1924-1935
- 47 Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 62-66
- 48 Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187-191
- 49 Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389
- 50 Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 1999; 401: 301-304
- 51 Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-2402
- 52 Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 33002-33010
- 53 Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000; 25: 338-342
- 54 Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25: 269-277
- 55 Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3156-3165
- 56 Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460
- 57 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530
- 58 Issa JP, Baylin SB, Belinsky SA. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res* 1996; 56: 3655-3658
- 59 Jubb AM, Bell SM, Quirke P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 111-134
- 60 Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su-Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24: 132-138
- 61 Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5195-5199
- 62 Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4045-4050
- 63 Nass SJ, Ferguson AT, El-Ashry D, Nelson WG, Davidson NE. Expression of DNA methyl-transferase (DMT) and the cell cycle in human breast cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 7453-7461
- 64 Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4555-4565
- 65 Bakin AV, Curran T. Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 1999; 283: 387-390
- 66 Laird PW. Mouse models in DNA-methylation research. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 119-134
- 67 Szyf M, Knox DJ, Milutinovic S, Slack AD, Araujo FD. How does DNA methyltransferase cause oncogenic transformation? *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 156-174
- 68 Milutinovic S, Knox JD, Szyf M. DNA methyltransferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21 (WAF1/CIP1/sdi1). *J Biol Chem* 2000; 275: 6353-6359
- 69 Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 2000; 404: 1003-1007
- 70 Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999; 236: 87-95
- 71 Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 40778-40787
- 72 Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-556
- 73 Cheng NC, Beitsma M, Chan A, Op-den-Camp I, Westerveld A, Pronk J, Versteeg R. Lack of class I HLA expression in neuroblastoma is associated with high N-myc expression and hypomethylation due to loss of the MEMO-1 locus. *Oncogene* 1996; 13: 1737-1744
- 74 Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbert A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 2000; 149: 271-280
- 75 Zhang Z, Shibahara K, Stillman B. PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 2000; 408: 221-225
- 76 Shibahara K, Stillman B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 1999; 96: 575-585
- 77 Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997; 277: 1996-2000
- 78 Knox JD, Araujo FD, Bigey P, Slack AD, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M, Szyf M. Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication. *J Biol Chem* 2000; 275: 17986-17990
- 79 Kennedy BK, Barbie DA, Claxson M, Dyson N, Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* 2000; 14: 2855-2868
- 80 Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen SH, Laird CD. Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 571-578
- 81 Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5489-5494
- 82 Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, Graff JR. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4346-4348
- 83 Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001; 91: 2294-2301
- 84 Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8540-8546
- 85 Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 136-139
- 86 Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Wing-Yuen AP. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002; 94: 386-392
- 87 Soria JC, Rodriguez M, Liu DD, Lee J, Hong WK, Mao L. Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers. *Cancer Res* 2002; 62: 351-355

- 88 Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196:1-7
- 89 Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI, Peters JH, DeMeester TR, Danenberg KD, Danenberg PV, Laird PW, Skinner KA. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 5021-5026
- 90 Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-4371
- 91 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- 92 Kanai Y, Ushijima S, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett* 2000; 148: 73-80
- 93 Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 2307-2312
- 94 Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686
- 95 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. P16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duck's staging. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 722-725
- 96 Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 569-573
- 97 Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 2001; 20: 329-335
- 98 房殿春, 罗元辉, 李小安, 凌贤龙, 杨仕明, 方丽, 汪荣泉. 胃癌错配修复基因 hMLH1 突变和启动子甲基化与基因不稳的关系. *中华消化杂志* 2002; 22: 327-330
- 99 Kikuchi T, Iton F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hosokawa M, Imai K. Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 97: 272-277
- 100 Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1835-1839
- 101 Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-5442
- 102 Huang TH, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 459-470
- 103 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-649
- 104 Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000; 26: 16-17
- 105 Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 1525-1528
- 106 Toyota M, Itoh F, Imai K. DNA methylation and gastrointestinal malignancies: functional consequences and clinical implications. *J Gastroenterol* 2000; 35: 727-734
- 107 Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 131-135
- 108 Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 956-962
- 109 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 103-107
- 110 Zhu WG, Dai Z, Ding H, Srinivasan K, Hall J, Duan W, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA. Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 7787-7796
- 111 Kim YS, Kim JS, Jung HC, Lee CH, Kim CW, Song IS, Kim CY. Regression of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: possible association with p16 hypermethylation. *J Gastroenterol* 2002; 37: 17-22

假尿嘧啶核苷与恶性肿瘤

符雪松, 白文元

符雪松, 迁安市人民医院消化病研究室 河北省迁安市 064400
白文元, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
项目负责人: 符雪松, 064400, 河北省迁安市消化病研究室.
收稿日期: 2002-05-24 接受日期: 2002-07-01

摘要

假尿嘧啶核苷是tRNA降解的最终产物, 机体不再重新利用而从尿中排泄. 因在肿瘤患者体内异常增高, 被作为肿瘤标志物用于肿瘤的早期诊断、鉴别诊断、肿瘤进展与复发的监测、疗效和预后的判断.

符雪松, 白文元. 假尿嘧啶核苷与恶性肿瘤. 世界华人消化杂志 2003;11(1):72-73
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/72.htm>

0 引言

假尿嘧啶核苷(pseudouridine, PU)是tRNA降解的最终产物. 1975年 Waalkes et al^[1]发现多种不同疾病, 特别是晚期肿瘤患者的尿中修饰核苷, 尤其是PU增高. Becker et al^[2]经动物实验证明, 在肿瘤组织的tRNA中, 修饰核苷的转化率明显高于正常组织, 二者相差10倍以上. 构成这种现象的分子基础是肿瘤组织中tRNA修饰酶的增多, 致使修饰核苷异常增高^[3, 4]. 近年来国内外学者研究发现, 在甲状腺癌、鼻咽癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、食管癌、以及淋巴细胞性白血病等患者体内PU异常增高, 故将PU作为肿瘤标志物用于肿瘤的早期诊断、鉴别诊断、肿瘤进展与复发的监测、疗效和预后的判断^[5-7].

1 假尿嘧啶核苷的代谢

假尿嘧啶核苷是尿嘧啶核苷的异构体^[8]. 尿嘧啶核苷是戊糖的1位碳原子(C-1)与尿嘧啶1位氮原子(N-1)相连接, 而PU则是戊糖的1位碳原子(C-1)与尿嘧啶5位氮原子(N-5)相连接. PU是众多修饰核苷的一种, 主要存在于RNA中, 特别是tRNA中. 尿嘧啶及核糖在核苷磷酸化酶的作用下, 生成尿嘧啶核苷, 再经磷酸激酶生成尿嘧啶核苷酸. tRNA-假尿嘧啶核苷合成酶将tRNA分子链中某些位置上的尿嘧啶核苷转变成PU^[9]. PU是tRNA降解的最终产物, 因为无代谢途径可使其重新利用, 所以只能直接从尿中排泄. 正常人血清中PU浓度为(2.2 ± 0.4) nmol/ml, 每日尿中排泄量较为恒定 (23.8 nmol/μmol肌酐), 婴幼儿每日尿中排泄量略高于成人. 性别之间无明显差异.

2 假尿嘧啶核苷的测定方法

PU的测定方法, 现在有直接测定法、荧光分析法、

气相色谱法和高效液相色谱(HPLC)法. 目前多采用HPLC法, 因为他具有灵敏、准确、迅速等特点. 实际操作一份样品预处理和上机分析, 只需2 h左右即可得到准确结果. 因为PU带有顺式-OH功能团, 能在C₁₈Spherisorb色谱柱中通过键合反应使PU较好地分离. 基本过程及条件是: 将样品精确注入色谱柱顶部, 用0.01 mol/L NH₄H₂PO₄:CH₃OH(94:6, v:v, pH4.7-5.0)作为流动相, 流速1.0 ml/min. 在恒定的压力和柱温下, PU可迅速地色谱柱中被洗脱. 继之将洗脱液送入紫外光谱仪中检测, 通过比较血、尿及标准品中PU的保留时间和吸收率进行定性. PU在紫外光263 nm波长吸收最好, 故测定263 nm下的峰面积可以计算出PU的含量. 灵敏度在0.1 AUFS. 因PU主要从尿中排出, 加上肾脏的浓缩作用, 使尿中PU浓度比血中高. 又因尿样取材方便, 故常测定尿中PU. 但尿样本有时易受外界因素影响, 不如血PU精确. 故认为^[5], 血、尿PU联合测定较单相指标有益.

3 假尿嘧啶核苷测定的临床意义

PU作为肿瘤标志物用于肿瘤的早期诊断、鉴别诊断、肿瘤进展与复发的监测、疗效和预后的判断, 具有很好的应用价值.

3.1 用于肿瘤的诊断、鉴别诊断 Colonna et al^[10]报道, 70-90%肝癌患者血清AFP升高. 近年来随着医学影像诊断技术的发展及其他检测手段的提高, 使得亚临床肝癌的检出率增多. 目前多数学者报告肝癌患者AFP阳性率仅在50%左右, 而且在其他良性肝病(如急、慢性肝炎、肝硬化)患者中也可有不同程度的升高. 因此, 寻找一种特异性高的肿瘤标志物, 用于发现早期肝癌, 区别良性是非常重要的.

Zhou et al^[11]应用HPLC法对肝癌、肝良性占位病变、肝硬化和健康人血清PU进行对比研究. 他们测定了74例肝癌患者PU, 阳性率为71.6%, 而血清PU与AFP无相关性, 血清AFP阴性的患者中, PU阳性率反而更高. 因此, 血清PU的测定能弥补AFP的不足, 二者联合应用可使肝癌诊断阳性率提高到84.5%. 他们认为, 血清PU可作为诊断、监测肝癌的标志物. 应用HPLC测定了腹水和血清中PU, 以区分肝癌与肝硬化腹水. 试验采用双盲法, 肝硬化54例, 肝癌17例, 作为研究对象. 结果表明: 两组患者血清、腹水中的假尿嘧啶核苷平均含量和血清/腹水PU的比值有明显差异(P<0.01), 可用以区分开这两组的大多数病例. Prankel

et al^[12]通过化学致癌剂诱发肝癌,也观察到类似现象.他认为连续1次/mo测定肝硬化患者血清PU,能早期发现肝癌、区别肝癌和其他良性肝病.因此,他们认为腹水PU是区别肝癌腹水和肝硬化腹水的最好标志物. Evans et al^[6]也发现乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌、食管癌、大肠癌和淋巴细胞性白血病等患者的血、尿PU浓度明显高于正常人,且具有统计学意义($P < 0.05$),对肿瘤的诊断有应用价值.

3.2 用于对肿瘤进展与复发的监测、肿瘤疗效和预后的判断 血清PU的浓度随着肿瘤的发生、发展而逐步升高.有学者作随访观察发现^[13]:31例血清PU阳性的肝癌患者,进行肿瘤切除后,29例血清PU浓度在术后2wk降至正常,临床症状也随之好转.2例血清PU浓度未降至正常者,是因为肿瘤过大,不能彻底切除的缘故.进一步随访该2例患者,血清PU持续阳性,在术后5mo时分别死于肝癌转移和肝癌复发肝功能衰竭.而术后2wk血清PU降至正常的29例肝癌患者,术后3mo复查的20例,其中2例血清PU再度阳性,被证实为肝癌复发.

Castaldo et al^[14]对15例肝癌患者行肝动脉栓塞治疗,同时测定了栓塞前后血清AFP和PU的变化,栓塞前血清AFP $>400 \mu\text{g/L}$ 者4例,AFP低浓度6例,栓塞后均有下降.栓塞前PU阳性者11例,栓塞后10例PU浓度下降,症状好转,部分患者影像学检查可见肿瘤缩小.定期测定血清PU的浓度能较早地发现肿瘤的复发或再发,并能判断肿瘤的治疗反应和预后.

江晓肖 et al^[15]应用HPLC法检测了不同病理分期和不同分化程度胃癌患者的尿PU浓度,发现胃癌患者尿PU的排泄水平与胃癌的生物学行为存在一定的联系.实验表明:晚期胃癌患者尿PU水平与早中期胃癌患者尿PU比较呈明显上升趋势,且具有统计学意义($P < 0.05$).说明PU的水平与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移可能有关,随着浸润深度的增加,远处转移的出现,PU水平呈上升趋势,其升高的程度可能与肿瘤的负荷,即疾病的阶段相关,反映了患者的病情状态.而低分化未分化胃癌患者的PU水平较高中分化胃癌患者的PU水平也有明显差异($P < 0.05$),推测原因可能与分化较差的胃癌细胞具有较高tRNA转化以及修饰性活动增强有关.

总之,假尿嘧啶核苷作为一种肿瘤标志物用于多

种恶性肿瘤的诊断、鉴别诊断、监测发生发展、疗效和预后的判断具有一定价值,同时检测血清、尿及/或肿瘤组织中PU浓度,并联合应用一些相应的肿瘤标记物测定,可明显地提高其诊断率,尤其是早期诊断率.随着其应用的不断广泛与深入,对于进一步认识肿瘤,以推测其生物学行为,从而为肿瘤的诊治提供依据.

4 参考文献

- 1 Waalkes TP, Cehrke CW, Zumwalt RW, Chang SY, Lakings DB, Tormey DC, Ahmann DL, Moertel CG. The urinary excretion of nucleosides of ribonucleic acid by patients with advanced cancer. *Cancer* 1975;36:390-398
- 2 Becker HF, Motorin Y, Sissler M, Florentz C, Grosjean H. Major identity determinants for enzymatic formation of ribot hymidine and pseudouridine in the T psi-loop of yeast tRNAs. *J Mol Biol* 1997;12: 505-518
- 3 Newby MI, Greenbaum NL. A conserved pseudouridine Modification in eukaryotic U2 snRNA induces a change in branch-site architecture. *RNA* 2001;7: 833-845
- 4 Hellmuth K, Grosjean H, Motorin Y, Deinert K, Hurt E, Simos G. Cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* tRNA: pseudouridine synthase Pus1p. *Nucleic Acids Res* 2000;28:4604-4610
- 5 Peng Z, Wang C, Li C. Simultaneous determination of creatinine, pseudouridine and uric acid in serum and urine by high performance liquid chromatography. *Se Pu* 1998;16:146-148
- 6 Evans MD, Perrett D, Lunec J, Herbert KE. Analysis of urinary pseudouridine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Ann Clin Biochem* 1997;34:527-533
- 7 张建华, 徐铃. 腹水假尿苷含量可用于肝癌与肝硬化腹水的鉴别. 国外医学临床生物化学与检验学分册 1998;19:45-46
- 8 Chen J, Patton JR. Mouse Pseudouridine synthase1: gene structure and alternative splicing of pre-mRNA. *Biochem J* 2000; 352 (Suppl 2): 465-473
- 9 Chen J, Patton JR. Pseudouridine synthase 3 from mouse modifies the anticodon loop of tRNA. *Biochemistry* 2000;39:12723-12730
- 10 Colonna A, Guadagnino V, Maiorano A, Stamile E, Costa C. Pseudouridine for monitoring interferon treatment of patients with chronic hepatitis C. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34: 697-700
- 11 Zhou J, Yuan Y, Xu D. Determination of ucin acid, creatinine and pseudouridine in human urin by high performance capillary zone electrophoresis. *Se Pu* 1998;16:176-177
- 12 Prankel BH, Clemens PC, Burmester JG. Urinary excretion of nucleosides varies with age and protein metabolism. *Clin Chim Acta* 1995;31:181-183
- 13 Rasmuson T, Bjork GR. Urinary excretion of pseudouridine and prognosis of patients with malignant lymphoma. *Acta Oncol* 1995; 34:61-67
- 14 Castaldo G, Intrieri M, Calcagno G, Cimino L, Budillon G, Sacchetti L, Salvatore F. Ascitic pseudouridine discriminates between hepatocarcinoma derived ascites and cirrhotic ascites. *Clin Chem* 1996;42:1843-1846
- 15 江晓肖, 黄怀德, 曾贤铭, 陈剑, 彭杰. 高效液相色谱法检测胃癌假尿苷的研究. 医学研究通讯 1997;26:36-37

K-ras 12密码子点突变在胰腺癌早期诊断中的意义

周国雄,李兆申,许国铭

周国雄,南通医学院附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
李兆申,许国铭,中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科
上海市 200433
项目负责人:周国雄,226001,江苏省南通市西寺路20号,南通医学院附属医院
消化内科. zhoughuoxiong@pub.nt.jsinfo.net
收稿日期:2002-04-04 接受日期:2002-08-16

摘要

胰腺癌的早期诊断相当困难,众多的研究已证实 K-ras 12 密码子点突变与胰腺癌相关性最好.选择敏感的检测方法检测多种途径获取的标本中 K-ras12 密码子点突变,为胰腺癌的早期诊断提供了可能.本文综述了近年来由胰腺细针穿刺(FNA)、胰液、十二指肠液、外周血和粪便等获取的标本中 K-ras12 密码子点突变的检测及对胰腺癌早期诊断的价值.

周国雄,李兆申,许国铭.K-ras 12 密码子点突变在胰腺癌早期诊断中的意义.
世界华人消化杂志 2003;11(1):74-77
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/74.htm>

0 引言

胰腺癌的发病率在国内外均逐年升高,但由于解剖位置关系以及缺乏特异有效的检查手段,胰腺癌的早期诊断仍相当困难.然而,许多近期研究已显示出分子生物学特征在胰腺癌发生发展中起着重要作用,其中 K-ras12 密码子点突变见于 90 % 左右的胰腺癌,远远高于在其他肿瘤的突变发生率^[1-8].采用 PCR 和直接测序法分析由胰腺细针穿刺(FNA)、胰液、十二指肠液、外周血和粪便等获取的标本中 K-ras12 密码子点突变,为胰腺癌的早期诊断提供了可能.本文综述了胰腺癌中 K-ras12 密码子点突变的临床意义.

1 ras 基因结构、功能及其与肿瘤的关系

ras 基因是人体肿瘤中常见的致癌基因,ras 基因家族由 K-ras、H-ras 和 N-ras 组成,其转变为活动性致癌基因的主要部位是第 12、13 和 61 密码子的突变,K-ras 基因激活在胰腺癌的发生中已有肯定的研究,其中以 K-ras12 密码子点突变最常见.ras 基因家族的成员相互间同源性可达 85 %,ras 基因编码的蛋白质是 P²¹ 蛋白,分子量为 21KD,由 188-189 个氨基酸组成,称之为 P²¹ 高度相关蛋白,位于细胞膜的内表面,参予传导细胞增生信号的调控系统.P²¹ 是一个 GTP 结合蛋白,影响细胞中信号传递.ras 基因突变时,在 GTPase 的作用下,GTP-P²¹ 转化成 GDP-P²¹ 被阻滞,导致活化型 GTP-P²¹ 增加和持续信号传递.因此,P²¹ 直接或间接增强或抑制许多其他基因^[9].

K-ras 基因的突变率在不同的肿瘤组织中并不相同,Bos et al^[10]分析了人体肿瘤中 K-ras 基因点突变的发生率,胰腺癌 82 %,结肠癌 43 %,肺癌 30 %,甲状腺癌 29 %,膀胱、肝、肾和子宫癌 10 % 或低于 10 %.可见 K-ras 点突变仅在胰腺癌中发生率最高.进一步研究胰胆管系统中 K-ras 点突变的发生率,其中胰腺癌 88 %,低位胆管癌 47 %,壶腹癌 19 %,高位胆管癌 9 %,中位胆管癌 0 %^[11].

K-ras 点突变检测的方法有:寡聚核苷酸探针杂交法^[12] (allele-specific oligonucleotide hybridization, PCR-ASO),DNA 直接测序法^[13] (PCR-direct sequencing,PCR-DSM),单链构象多态性分析法^[14] (single strand conformation polymorphism,PCR-SSCP),限制性片段长度多态性分析法^[15, 16] (restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP),杂交保护分析法^[17, 18] (hybridization protection assay,PCR-HPA).各种检测方法其敏感性变化较大,肿瘤细胞标本取样不同也影响其检测突变率,且突变率随着标本中正常细胞和间质细胞增加而降低.因此,测定出的 K-ras 点突变率与其使用的检测方法有一定关系.

2 K-ras 基因在胰腺癌中突变及其对早期诊断的价值

2.1 胰腺组织中 K-ras 基因点突变 1988 年 Almoguera et al^[19] 首先发现胰腺癌中存在 K-ras 基因点突变,其突变率为 95 % (21/22),这一报道引起极大注意.随后众多学者对其进行了广泛研究.Kimura et al^[9] 最近复习了 30 份文献,发现胰腺癌 K-ras 基因点突变率为 70-100 %,平均为 80.5 % (560/696),尽管检测方法不一,大部分为甲醛固定石蜡包埋组织,部分为冰冻组织,但这些研究已充分表明胰腺癌中 K-ras 基因点突变率要高于其他肿瘤.

产黏蛋白的胰腺肿瘤(mucin-producing tumor,MPT)是发生于胰管内的分泌大量黏液的乳头状肿瘤,被认为是低度恶性肿瘤.Satoh et al^[20]报道产黏蛋白的胰腺肿瘤 K-ras 点突变率为 55 % (11/20),并随上皮不典型增生的程度而增加.Hoshi et al^[21]报道其 K-ras 点突变率为 100 %,由此认为 K-ras 点突变是产黏蛋白的胰腺肿瘤重要的生物学特征.有研究报道发现胰腺导管内乳头状肿瘤 K-ras 点突变率为 60 % (3/5),其突变率与细胞不典型增生的程度无关,而与肿瘤的大小有关^[22].Yanagisawa et al^[23] 也发现,3/5 例腺瘤和 2/3 例腺癌获阳性结果,在同时存在腺瘤的腺癌标本中其突变方式是一样的.值得

注意的是有研究表明在胰腺增生上皮中K-ras点突变率可达24%(19/74),显示K-ras点突变不仅出现在胰腺癌中,也可见于胰腺癌形成之前的胰腺增生上皮中^[24].因此认为这些病灶可能为癌前期病变,而K-ras点突变是胰腺癌发生的早期事件.更有学者报道1例经手术证实的胰腺癌患者,3 a前ERCP仅显示主胰管极轻度狭窄而不足以诊断为胰腺癌,但胰液中已检测到胰液K-ras12密码子点突变,因此胰液K-ras12密码子点突变早于影像学表现^[25].

B超、CT或超声内镜引导下经皮细针穿刺(FNA)细胞学已在临床普遍开展,但对胰腺小病灶其诊断价值有限.临床上对疑有胰腺癌患者经皮细针穿刺检测K-ras12密码子点突变可进一步提高其诊断正确率.Evans et al^[26]对25例可疑胰腺病灶经皮细针穿刺行K-ras12密码子点突变检测其中21例有K-ras点突变.Ihalainen et al^[27]检测了21例可疑胰腺疾病FNA穿刺标本,K-ras点突变率为82%(14/17),常规细胞学阳性率为78%.Pinto et al^[28]研究发现FNA细胞学诊断敏感性为76%,K-ras12密码子点突变检测则为82%,而细胞学加上K-ras12密码子点突变检测其诊断敏感性可提高到94%,提示K-ras12密码子点突变分析可增强胰腺癌FNA细胞学诊断敏感性.

2.2 胰管脱落上皮细胞K-ras基因点突变

2.2.1 胰液及胰管刷取液中K-ras基因点突变

90%以上胰腺肿瘤多起源于胰管上皮,故有可能在胰液中找到脱落的肿瘤细胞或癌前期病变,应用K-ras基因点突变检测提高肿瘤诊断的敏感性.1993年Tada et al^[29]首先在6例胰腺癌的胰液中检测K-ras点突变均获阳性结果,从而为胰腺癌的早期诊断带来了希望.有人总结了11份文献,导管细胞癌胰液中K-ras点突变率为50-100%,平均突变率为72%(98/137),产粘蛋白胰腺肿瘤突变率为53%(8/15).最近有学者分析了12例胰腺管内乳头状产粘蛋白肿瘤(intraductal papillary mucinous tumors IPMT),包括8例腺癌和4例腺瘤,其胰液中K-ras点突变率为100%^[30].Van Laethem et al^[31]采用PCR-RFLP和直接测序法分析胰管刷检标本K-ras12密码子点突变并与常规细胞学检查进行比较,结果胰腺癌K-ras12密码子点突变率为83%,常规细胞学阳性率为54%,K-ras基因突变敏感性、特异性、准确性分别为83%、100%、90%,而常规细胞学则为76%、83%、58%.Ochi et al^[32]还报道1例患者,ERP细胞学检查阴性,B超和CT检查也无异常发现,而K-ras12密码子点突变阳性,随访18 mo后发现主胰管狭窄,手术证实为12 mm的胰腺癌.这为基因检测诊断小胰癌提供了一个有趣的线索.Boadas et al^[33]报道胰腺癌胰液中K-ras突变率为44%,其中1例为早期胰腺癌,慢性胰腺炎胰液中K-ras突变率为16%,其中有1例后发展为胰腺癌.Queneau et al^[34]也报道慢性胰腺炎胰液中K-ras突变率为27.8%(10/36),其

中有2例在分别在随访7和17 mo后诊断为胰腺癌.但是检测到K-ras12密码子点突变是否意味着就是肿瘤和恶性病灶的存在仍有不同看法.Furuya et al^[35]分析了慢性胰腺炎胰液中K-ras12密码子点突变,其阳性率为37%(20/57),突变类型为GAT 7例,GTT 11例,TGT 2例,随访78 mo,无1例发展为胰腺癌,故认为胰液中K-ras12密码子点突变检测对胰腺癌的诊断与鉴别诊断作用不大.因而Kimura et al^[9]提出:(1)应当分析胰液中K-ras12密码子点突变的氨基酸序列;(2)联合检测胰液中其他参数如肿瘤标记物;(3)同时检测其他标本的K-ras12密码子点突变.Tada et al^[22]发现在胰腺癌和增生病灶中K-ras基因从GGT(甘氨酸)突变成GAT(天门冬氨酸)、GTT(缬氨酸)和CGT(精氨酸),在增生病灶中仅突变成TGT(半胱氨酸)或AGT(丝氨酸),这些发现提示在胰液中检测K-ras点突变氨基酸序列可提供更为精确的诊断,而不仅仅是检测他的存在.联合检测胰液K-ras点突变与端粒酶活性及肿瘤标记物也可提供更为精确的诊断,胰液中CEA在鉴别胰腺良、恶性病灶是有价值的,其分界值为50 ng/ml,检测胰液中P53突变也可能是诊断胰腺癌一个有用的工具^[36-41].

2.2.2 十二指肠液中K-ras基因点突变

由于胰液收集较为困难,而十二指肠液标本的收集相对简单安全.有人采用富集PCR-SSCP法分析了十二指肠液中K-ras12密码子点突变,阳性率63%(12/19),包括10例导管腺癌,2例导管内乳头状腺癌.突变类型包括GAT(4例)、GTT(3例)、CGT(1例)、GTT和GAT双突变(3例)、GAT和CGT(1例),4例良性胰腺疾病中,仅1例慢性胰腺炎检测到其突变.Wilentz et al^[42]研究发现,61例胰腺良、恶性病变患者中有7例其十二指肠液标本中DNA不扩增,13份标本(占十二指肠液标本里有DNA扩增54份的24%,并占总数61份标本的21%)中在K-ras基因12密码子有激活突变的位点,9例胰腺良性疾病的双十二指肠液标本里虽有DNA扩增现象,但从中未检出1份基因突变(特异性100%).最近,Nakamura et al^[43]进一步研究了胰腺癌十二指肠灌洗液(duodenal lavage fluid DLF)中K-ras12密码子点突变的诊断价值,将ERCP术前收集的十二指肠灌洗液定为DLF₁,术后收集的定为DLF₂,并与纯胰液(PPJ)进行比较,结果发现DLF₁中K-ras12密码子点突变率为60.9%(14/23),DLF₂中为76.2%,PPJ中为70.0%(14/20),在非癌性胰腺疾病中DLF₁为9.5%(2/21),DLF₂为36.8%(7/19),提示十二指肠灌洗液可提供一个新的有用的标本供分析K-ras12密码子点突变.有望成为胰腺癌早期诊断新方法的基础,值得进一步研究.

2.2.3 粪标本中K-ras基因点突变

早期研究发现在胰腺癌粪便标本中检测到K-ras12密码子点突变,他们认为粪便标本中K-ras点突变来源于胰腺癌或胰腺增生上皮经胰液排入肠腔,是筛选胰腺癌的有效方法.但有

文献报道也可以在结直肠癌粪便标本中检测到K-ras12密码子点突变^[44].Caldas et al^[45]报道胰腺癌患者粪便标本中K-ras12密码子点突变率54.5%(6/11),慢性胰腺炎为33.3%(1/3),Berndt et al^[46]报道胰腺癌和慢性胰腺炎患者粪便标本中K-ras点突变率分别为40%(10/25),33%(2/6).最近,Wenger et al^[47]也分析了胰腺疾病粪便标本中K-ras点突变,结果导管癌阳性率为20%(7/36),慢性胰腺炎为40%(2/5),敏感性仅为20%.最近国内有文献报道粪便标本中K-ras点突变率88.0%(66/75),胰腺良性病变为51.1%(24/47)^[48].因此,粪便标本中K-ras点突变检测对鉴别胰腺癌与慢性胰腺炎价值有限,其特异性仍有待于进一步研究.

2.3 外周血中K-ras基因点突变 近年来研究证实,在正常人的血浆中存在极微量的DNA,其浓度大约10 ng/ml,而肿瘤患者血浆DNA浓度常常超过100 ng/ml,这种DNA来源于恶性肿瘤细胞,其中胰腺癌患者血浆DNA含量高达650 ng/ml,有可能通过敏感的PCR方法检测到其中突变的K-ras基因.有报告用PCR法分析了15例胰腺癌K-ras12密码子点突变,其中6例阳性,术后持续阳性预后差,4例慢性胰腺炎和5例正常对照均为阴性^[49].Mulcahy et al^[50]进一步采用简单、快速的DNA提取技术从外周血中提取DNA,应用两步PCR-RFLP法分析胰腺癌K-ras12密码子点突变,阳性率为81%(17/21),其突变方式与肿瘤组织中K-ras突变方式一致,其中4例在临床诊断为胰腺癌5-14 mo之前就检测到K-ras突变,而2例慢性胰腺炎和5名健康对照无1名阳性.表明这是一种较敏感的方法,而且标本易于获得,极大地促进了K-ras12密码子点突变检测的临床应用,有助于提高胰腺癌术前定性诊断水平,但由于血浆DNA含量很少,高敏感的DNA提取技术和K-ras突变检测方法将成为今后研究的方向.

总之,早期发现、早期诊断、早期治疗是提高胰腺癌诊治水平的关键,目前影像诊断及血清肿瘤标记物对胰腺癌早期诊断仍令人失望,胰腺肿块术前定性尚无良策,而众多的研究已证实K-ras12密码子点突变对胰腺癌早期诊断具有较高的价值,但目前报道均限于回顾性分析,缺乏前瞻性的研究.同时在胰腺非恶性疾病中也存在K-ras12密码子的点突变,是否属癌前病变仍有待于进一步研究.因此,进一步探索高敏感的检测方法和选择多种标本联合检测可望提高胰腺癌早期诊断水平.

3 参考文献

- 1 徐选福,王兴鹏.胰腺癌诊断新认识.世界华人消化杂志 2000;8:1034-1036
- 2 刘江伟,李开宗.胰腺癌与癌基因及抑癌基因.世界华人消化杂志 2001;9:72-73
- 3 孙诚谊,张延龄,施达仁,陆洪珍.胰腺癌ras癌基因及p53抑癌基因表达的临床意义.世界华人消化杂志 1998;6(特刊7):237-239
- 4 Liu XL,Dai CC,miao Y,Du JH,Zhang ZS,Chen SZ.Detection of K-ras gene point mutation in fine needle aspiration and pancre-

- atic juice by sequence special primer method and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:917-919
- 5 徐永泉,刘香,夏玉亭.胰腺癌组织c-Ki-ras基因点突变分析.世界华人消化杂志 2001;9:1329-1330
- 6 陈建锋,俞金龙,汪爽,高毅.胰腺癌组织p16蛋白表达的意义.世界华人消化杂志 2001;9:237
- 7 周国雄,李兆申,许国铭,屠振兴.胰腺癌DPC4/Smad4基因突变及表达.世界华人消化杂志 2002;10:328-332
- 8 Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KALL gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
- 9 Kimura W, Zhao B, Futakawa N, Muto T, Makuuchi M. Significance of K-ras codon 12 point mutation in pancreatic juice in the diagnosis of carcinoma of the pancreas. *Hepato Gastroenterol* 1999;46:532-539
- 10 Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689
- 11 Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T, Negata Y, Urano T, Shiku H. Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirsten-ras oncogene. *Ann Surg* 1991;214:657-662
- 12 Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H. Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of C-Ki-ras gene in pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:135-140
- 13 Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991;100:233-238
- 14 Iguchi H, Sugano K, Fukayama N, Ohkura H, Sadamoto K, Ohkoshi K, Seo Y, Tomoda H, Funakoshi A, Wakasugi H. Analysis of K-ras codon 12 mutations in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1996;110:221-226
- 15 Watanabe H, Sawabu N, Songur Y, Yamaguchi Y, Yamakawa O, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Wakabayashi T. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* 1996;12:18-24
- 16 Berthelemy P, Bonisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Pradayrol L. Identification of K-ras mutation in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1995;123:188-191
- 17 Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T, Tsuji Y, Sawabu N. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay: A simple method for determination of the type of point mutation. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:466-474
- 18 Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T, Sawabu N. Quantitative determination of K-ras mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* 1998;17:341-347
- 19 Almoguera C, Shibats D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549-554
- 20 Satoh K, Sawai AW T, Shimosegawa T, Koizumi M, Yamazaki T, Mochizuki F, Toyota T. The point mutation of c-K-ras at codon 12 in carcinoma of the pancreatic head region and in intraductal mucin-hypersecreting neoplasm of the pancreas. *Int J Pancreatol* 1993;14:135-143
- 21 Hoshi T, Imai M, Ogawa K. Frequent K-ras mutations and absence of P53 mutations in mucin-producing tumor of the pancreas. *J Surg Oncol* 1994;55:84-91
- 22 Tada M, Omata M, Oto M. Ras gene mutations in intraductal papillary neoplasms of the pancreas. *Cancer* 1991;67:634-637
- 23 Yanagisawa A, Kato Y, Ohtake K, Kitagawa T, Ohashi K, Hori M, Takagi K, Sugano H. c-Ki-ras point mutations in duct ectatic-type mucinous cystic neoplasms of pancreas. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:1057-1060
- 24 Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, Yoshida H, Machinami R, Kishi K, Omata M. Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 1996;110:227-231
- 25 Wakabayashi T, Sawabu N, Watanabe H, Morimoto H, Sugioka

- G, Takita Y. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice collected 3 years and 6 months before the clinical diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1848-1851
- 26 Evans DB, Frazier ML, Charnsangavej C, Katz RL, Larry L, Abbruzzese JL. Molecular diagnosis of exocrine pancreatic cancer using a percutaneous technique. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 241-246
- 27 Ihalainen J, Taavitsainen M, Salmivaara T, Palotie A. Diagnosis of pancreatic lesions using fine needle aspiration cytology: Detection of K-ras point mutations using solid phase minisequencing. *J Clin Pathol* 1994; 47:1082-1084
- 28 Pinto MM, Emanuel JR, Chaturvedi V, Costa J. Ki-ras mutations and the carcinoembryonic antigen level in fine needle aspirates of the pancreas. *Acta Cytol* 1997; 41:427-434
- 29 Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993; 53:2472-2474
- 30 Kaino M, Kondoh S, Okita S, Hatano S, Shiraishi K, Kaino S, Okita K. Detection of K-ras and P53 gene mutations in pancreatic juice for the diagnosis of intraductal papillary mucinous tumors. *Pancreas* 1999; 18:294-299
- 31 Van Laethem JL, Vertongen P, Deviere J, Van Rampelberg J, Rickaert M, Cremer M, Robberecht P. Detection of c-Ki-ras gene codon 12 mutations from pancreatic duct brushings in the diagnosis of pancreatic tumours. *Gut* 1995; 36:781-787
- 32 Ochi K, Hasuoka H, Mizushima Y, Matsumura N, Harada H. A case of small pancreatic diagnosed by serial follow-up studies promptly by a positive K-ras point mutation in pure pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:1366-1368
- 33 Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cusó X, Capella G, Lluís F, Farré A. Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13:1153-1159
- 34 Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Mantion G, Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a k-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:700-704
- 35 Furuya N, Kawa S, Akamatsu T, Furihata K. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology* 1997; 113:593-598
- 36 Myung SJ, Kim MH, Kim YS, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Wan Seo D, Lee SK, Min YI, Kim JY. Telomerase activity in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer may be complementary to K-ras Mutation. *Gastrointest Endosc* 2000; 51:708-713
- 37 Uehara H, Nakaizumi A, Tatsuta M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Iishi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Okada S, Kakizoe T. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: Compare with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2513-2518
- 38 Urgell E, Puig P, Boadas J, Capella G, Queralto JM, Boluda R, Antonijuan A, Parre A, Lluís F, Gonzalez-Sastre F, Mora J. Prospective evaluation of the contribution of K-ras mutational analysis and CA19-9 measurement to cytological diagnosis in patients with clinical suspicion of pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36:2069-2075
- 39 Futakawa N, Kimura W, Yamagata S, Zhao B, Ilsoo H, Inoue T, Sata N, Kawaguchi Y, Kubota Y, Muto T. Significance of K-ras mutation and CEA level in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2000; 7:63-71
- 40 Usui H, Otani T. Detection of K-ras and p53 gene mutation in pancreatic juice for the of intraductal papillary mucinous tumors. *Pancreas* 2001; 22:108-109
- 41 Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with k-ras mutation. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1147-1153
- 42 Wilentz R, Chung CH, Sturm PDJ, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ, Yeo CJ, Hruban RH, Slebos RJ. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 96-103
- 43 Nakamura Y, Onda M, Uchida E. Analysis of K-ras codon 12 point mutations using duodenal lavage fluid for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* 1999; 18:133-140
- 44 Doolittle BR, Emanuel J, Tuttle C, Costa J. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001; 70:289-301
- 45 Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54:3568-3573
- 46 Berndt C, Haubold K, Wenger F, Brux B, Muller J, Bendzko P, Hillebrand T, Kottgen E, Zanow J. K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases. *Clin Chem* 1998; 44:2103-2107
- 47 Wenger FA, Zieren J, Peter FJ. K-ras mutations in tissue and stool samples from patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384:181-186
- 48 陆星华, 徐彤, 钱家鸣, 陈元方, 温小恒, 伍东升. 检测胰液和粪便中 k-ras 和 p53 基因突变对胰腺癌早期诊断的价值. *中华医学杂志* 2001; 81:1050-1053
- 49 Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N, Sugimoto K, Akagi K, Fujiwara Y, Nishisho I, Sakon M, Gotoh M, Monden M. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1527-1532
- 50 Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ, Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4:271-275

胃食管反流病并发Barrett食管及食管腺癌的分子生物学基础

王 雯

王雯,南京军区福州总医院消化内科 福建省福州市 350025
项目负责人:王雯,350025,福建省福州市,南京军区福州总医院消化内科.
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

摘要

胃食管反流病及其并发的 Barrett 食管、食管腺癌的发病率近年明显升高,其发生机制尚未完全明了,本文综合阐述了此系列疾病发生过程中相关基因变化等分子生物学基础.

王雯.胃食管反流病并发Barrett食管及食管腺癌的分子生物学基础.世界华人消化杂志 2003;11(1):78-81
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/78.htm>

0 引言

胃食管反流病(GERD)是常见的消化道动力障碍性疾病,其并发的 Barrett 食管(BE)、食管腺癌(EA)的发病率近年明显升高^[1],已引起国内外广泛重视. GERD 食管炎→BE→异型增生→恶变是公认的 EA 发病过程,但其确切机制目前尚未完全明了,可能与多种基因的改变及异常表达造成食管上皮细胞增生与分化失常有关.本文对此系列疾病发生的分子生物学基础方面的研究进展作一综述.

1 DNA 含量

DNA 含量即 DNA 倍性,正常细胞为二倍体,而当细胞内出现多倍体或非整倍体(即 DNA 含量异常)时即为细胞增生异常或恶变的表现. DNA 倍性可用流式细胞仪检测,计算机辅助图像分析病理切片亦可用来检出非整倍体的细胞,他可根据核的大小和染色程度算出 DNA 含量,并同时直接观察细胞核的形态,从而鉴别 BE 与异型增生或肿瘤细胞. Montgomery et al^[2]发现 20 例食管腺癌 DNA 含量全部为非整倍体,10 例 BE 中有 2 例为非整倍体 DNA,而反流性食管炎无 1 例为非整倍体 DNA. Reid et al^[3]的研究显示无并发症的反流性食管炎患者的食管黏膜倍性正常,良性的化生 Barrett 黏膜即可见 DNA 含量异常,而癌前性 Barrett 化生上皮此种改变常见得多,非整倍体性或 G₂/四倍体组分的升高是恶性变的独立危险因素.推测 BE 恶变为 BE 中单个的异常祖细胞发生克隆扩张,使同样非整倍体性的细胞占据黏膜的大部分.

2 染色体异常

非整倍体为含大量染色体的 DNA 含量总体异常,而许多研究发现一些 BE 及 EA 有个别染色体变化,包括 Y 染色体缺失或呈三倍体变化以及 7 号和 11 号染色体易

位.另有文献报道 BE 起源的腺癌及其周围的良性化生上皮中均可见 8 号染色体过多,17 号染色体缺失以及 Y 染色体缺失^[4],说明有些染色体异常发生于 BE 癌变早期.

3 细胞增生周期的调控基因

细胞增生异常是所有肿瘤组织的基本特征.广义说来调节细胞生长、转化的诸多因子如激素、生长因子、细胞因子等都要通过调节细胞增生周期起作用.细胞周期中各因子相互作用形成级联调控网络,其核心是依赖于细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的活性发挥,而 CDK 活性发挥又取决于其正向调节因子细胞周期蛋白及负向调节因子 CDK 抑制蛋白(CDK-inhibitor,CKI)的水平.在 GERD 并发的 BE、EA 中,这些基因的改变及表达异常研究很多.

3.1 细胞周期蛋白 细胞周期蛋白分为 A、B、C、D、E 五种,在细胞周期的不同时相不同的细胞周期蛋白水平顺序性升高,分别与相应的 CDK 结合形成复合物,使细胞内多种蛋白磷酸化及去磷酸化,从而调节 DNA 的合成及有丝分裂,使细胞完成各个时相转换.根据调控细胞周期时相的不同细胞周期蛋白分为 G₁ 期和 M 期两类.前者包括 C、D、E 三种,可促进 DNA 合成,在 G₁/S 交界处发挥作用并启动细胞周期.其中细胞周期蛋白 D 研究较多,他在 G₁ 中期开始合成增多,与 CDK₄、CDK₆ 结合后作用于其底物 Rb 蛋白(视网膜母细胞瘤基因编码的蛋白),后者磷酸化失活并释放转录因子 E₂F, E₂F 启动进入 S 期必需的酶蛋白基因的转录从而完成 G₁ 至 S 过度.由于其在多种肿瘤组织中过度表达,且具有强促细胞增生的作用,现在细胞周期蛋白 D 已被看作癌基因.细胞周期蛋白 E 与 CDK₂ 结合,亦作用于 G₁/S 期,机制尚不明了,细胞周期蛋白 C 研究更少.动物实验显示亚硝基甲基苄胺(NMBA)致大鼠食管癌变过程中,细胞周期蛋白 D 和细胞周期蛋白 E 的表达逐渐增强,癌前病变及癌灶内均较正常黏膜明显为高^[5];对人类 Barrett 食管及 EA 的研究^[6]亦发现,46 % 的 BE 及 63 % 的 EA 中细胞周期蛋白 D 表达增强(基因扩增或转录增加),BE 癌变过程与细胞周期蛋白 D 高表达有密切关系.说明细胞周期蛋白表达增强可能为食管癌变过程中较早期发生的分子事件.还有研究发现 BE 癌变过程中细胞周期蛋白 D 基因突变及重排. M 期细胞周期蛋白包括 A、B 两种,在 G₂/M 交界处发挥作用,诱导细胞分裂,与肿瘤的关系亦很密切,但与食管

炎及 BE、EA 的关系研究很少。

3.2 CDK 为一类丝氨酸/苏氨酸激酶,目前发现的主要有 1-6 六种,分别与不同的细胞周期蛋白结合而起作用。其中 CDK₄、CDK₆ 及 CDK₂ 与肿瘤的发生关系最为密切,在一些肿瘤中出现过度表达,但在食管疾病中的研究较少。目前尚未发现 CDK 存在突变现象。

3.3 CKI CKI 通过与 CDK、细胞周期蛋白或细胞周期蛋白-CDK 复合物的结合而抑制 CDK 的活性,根据其结构特征分为两个家族,一类为 Ink4 家族,包括 p15、p16、p18、p19 等,可特异性抑制 CDK₄/CDK₆ 的活性;另一类为 Kip 家族,包括 p21、p27、p57,可抑制各种细胞周期蛋白-CDK 复合物。两类 CKI 蛋白的结构和功能各自有高度相似性,均属肿瘤抑制基因,细述如下。

4 肿瘤抑制基因

肿瘤抑制基因的失活、缺失、突变等也为 BE 相关的食管腺癌发生的重要机制。

4.1 p53 基因 p53 基因的抗癌作用已为人们熟知,他是最先被发现的与 BE 引起的肿瘤相关的肿瘤抑制基因。p53 基因位于 17p,其杂合性缺失(LOH)、突变及过度表达可导致肿瘤的发生。正常野生型 p53 蛋白半衰期仅 20 min,而突变型 p53 蛋白却延长达几小时以上,这导致核内 p53 蛋白积聚。Kim et al^[7] 对人食管的研究显示 36% 的 BE、30% 的低度异型增生、85% 的高度异型增生及 90% 的 EA 中出现 p53 蛋白积聚,说明 p53 蛋白积聚发生于 BE 癌变的早期;发现联合检测 p53、PCNA (增生细胞核抗原) 和 C-erbB-2 的表达用来诊断 BE 发生高度异型增生或癌的敏感性达 100%,特异性达 81%,总准确度为 83%。BE、异型增生及 EA 中常发生 p53 关键的外显子如外显子 5-9 突变,最常见鸟嘌呤转换为腺嘌呤,用 PCR-SSCP (聚合酶链反应-单链构象多态性分析) 及 DNA 测序进行检测常可用于检出 Barrett 上皮异型增生^[8]。内镜下多点活检取食管组织并经流式细胞仪筛选后进行基因突变检测,发现 GERD 并发的 BE 中 p53 突变率高达 50%^[9]。动物实验亦发现食管致癌过程 p53 基因突变率很高。GERD 并发 BE 及 EA 过程中 p53 除表达异常和突变外,杂合性缺失(17p LOH)也较常见, Gonzalez et al^[10] 发现 EA 中 p53 的 LOH 率为 90%,若先用流式细胞仪检出 DNA 含量异常的细胞,再对核 DNA 进行检测发现 17p 的 LOH 发生率更高。Fein et al^[11] 对无 p53 基因的小鼠和正常基因型的小鼠进行食管空肠吻合术以造成胃肠内容物食管反流,发现所有小鼠均出现反流性食管炎,但 p53 基因缺失小鼠中 50% 发生 BE 及 EA,100% 发生上皮异型增生,而正常基因型小鼠无 1 例出现这些病变,证实 p53 基因在反流性食管炎并发 BE 及 EA 的过程中起非常重要的作用。

4.2 p16 基因 p16 基因(MTS1、CDKN2、INK4)是 1993 年发现的一个比 p53 更直接与正常细胞癌变有关的肿瘤抑制基因,定位于人类染色体 9p21,其缺失和突变与多种肿瘤的发生有关,又称为多瘤抑制基因。p16 蛋白能与细胞周期蛋白 D 竞争结合 CDK₄、₆ 而使后者失活, G₁-S 期过渡取决于细胞周期蛋白 D 与 p16 蛋白的相对活性。研究发现食管癌中 p16 不表达或低水平表达。用 Southern blot 法测定发现食管癌 p16 基因纯合性缺失发生率极高(92%),其他研究发现食管腺癌中还可见 p16 基因突变及 LOH, p16 LOH 在 EA 中发生率为 89%^[10],但在 BE 及异型增生中较少见,说明 p16 LOH 在 BE 癌变过程中较晚出现。

4.3 p21 基因 p21(CIP1, WAF1)基因定位于染色体 6p21.2,启动区含有与 p53 及 TGF- β 等结合的特异序列,可被 p53 诱导并介导 p53 的抑癌功能,其 mRNA 的表达是受 p53 或其他外源性因子在转录水平调控的,主要功能在于参与 p53 介导的 DNA 损伤后细胞周期抑制及损伤修复^[12]。p21 还可不依赖 p53 而广泛地抑制各种细胞周期蛋白-CDK 复合物,其 C 末端可与 PCNA 结合,使 PCNA 不能与 DNA 聚合酶 δ 形成复合物,抑制 DNA 复制,从而使细胞周期停滞,以量的方式调节细胞周期和细胞分化。Khare et al^[13] 用半定量 RT-PCR 及免疫组化的方法研究了大鼠食管癌变过程中 p21 的表达,发现癌前病变中 p21 表达比正常上皮少 1.6 倍,而乳头状瘤中减少 3.1 倍。用免疫组化法研究人食管癌中 p21 表达发现 44% 有不同程度的阳性;同时发现所有 p53 突变的病例 p21 表达均阴性,而 18 例无 p53 突变的病例中 11 例有 p21 表达;研究 p21 与肿瘤分化程度的关系发现高分化的食管癌出现 p21 阳性表达,而低分化癌则 p21 表达阴性;p21 阳性的病例凋亡细胞明显更多,说明人食管癌中 p21 的表达受 p53 诱导,影响癌细胞的凋亡和分化^[14,15]。

4.4 其他 食管腺癌中的抑癌基因变化常与食管鳞癌中所见相平行,还包括位于染色体 5q 的 APC 基因, 13q 的 Rb 基因及 18q 的 DDC 基因。APC (adenomatosis polyposis coli) 基因的 LOH 在 80% 的 EA 中可观察到, Rb 基因的 LOH 率为 50%。Zhuang et al^[16] 研究 12 个手术切除的含正常食管上皮、胃食管交界上皮、Barrett 上皮、异型增生及癌肿的食管标本,发现正常组织及远离异型增生的 Barrett 上皮中未发现 APC 杂合性缺失,与异型增生相邻的 Barrett 上皮以及异型增生和肿瘤中都可测定出 LOH,说明 APC 的 LOH 是 BE 恶变的早期事件。Blount et al^[17] 研究了 14 例 BE 伴高度异型增生或腺癌的患者,发现与同时有 17p(p53) 和 5q(APC) LOH 的细胞相邻的黏膜内可散见仅有 17p 等位基因缺失的细胞,但 17p 等位基因完整的细胞内不出现 5q 杂合性缺失,说明 BE 癌变过程中 17p 等位基因缺失先于 5q 发生,这与结肠癌中 5-17p 等位基因缺失的顺序相反。Rb

蛋白在 CDK- 细胞周期蛋白复合物的作用下于细胞周期的关键点 G_1/S 和 G_2/M 而起调节作用, 他又反过来调节细胞周期蛋白和 p16 的转录. Rb 的失活与细胞周期蛋白 D 激活在食管癌中可共同存在, 食管癌的分子发病机制可能涉及 CDK₄/ 细胞周期蛋白 D₁、Rb 和 p16 负反馈调节通路的异常^[18].

5 PCNA 和 Ki-67 抗原

二者均为调节细胞周期存在于细胞核内的蛋白, 其表达与细胞的增生周期有关. PCNA 为 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白, 在正常细胞中与细胞周期蛋白、CDK 及 p21 组成复合物调节细胞由 G_1 期向 S 期过渡, 而 Ki-67 则在 G_1/S 及 G_2/M 转换期都可检测到变化, 为 BE 和异型增生、EA 时细胞增生的有用指标. Kim et al^[7] 的前瞻性研究发现 PCNA 在食管 BE 高度异型增生上皮中阳性率最高, 其次为低度异型增生, 无异型增生的 BE 中 PCNA 表达水平最低. Kimura et al^[19] 的研究亦表明 PCNA 在癌前病变 BE 组表达高于良性 BE 组, 而食管腺癌组又明显高于前两组. 正常食管复层鳞状上皮中仅基底细胞具增生性, 正常胃黏膜的增生区限于腺体底部, 而 BE 上皮的腺泡及腺管下部均有 PCNA 和 Ki-67 的表达, Ki-67 阳性细胞百分率较正常胃黏膜高 (33.5 % 对 12.8 %) ^[20], 而随 BE 的异型增生程度的加重, PCNA 和 Ki-67 阳性的增生细胞逐渐向腺管上部发展以至达上皮表面.

6 癌基因

癌基因与食管癌的发生关系研究大部分是关于食管鳞状细胞癌. 在对 EA 的研究中, Meltzer et al^[21] 在 mRNA 水平检测癌基因 c-Ha-ras 发现在正常食管或 BE 上皮内均检测不到他的表达, 其他研究亦证实 ras 基因家族突变并不发生于 BE 及其相关的肿瘤中, 说明在结肠癌内高度表达的 c-Ha-ras 基因是高度组织特异性的, 癌基因在 BE 相关的肿瘤中作用不大. Kim et al^[7] 用免疫组织化学的方法检测出 c-erbB-2 癌基因在高度异型增生的 BE 内 (31 %) 及 AE 中 (10 %) 的表达; 另一研究却发现 c-erbB-2 蛋白过度表达仅发生在 EA 中 (11 %), 且与 EA 的预后差有关, 而其周围的异型增生及 BE 上皮内均无表达^[22]. c-src, c-ras, c-jun 及 c-fos 等在食管化生上皮及 EA 中的检测研究很少见.

此外, 还有许多基因的改变及表达异常亦与 GERD 发生化生及恶变有关, 如表皮生长因子及其受体表达的增多, 转化生长因子的过度表达^[23], 细胞黏附分子 (如 E- 钙黏蛋白) 表达的减少或缺失也可确定 BE 处于向肿瘤进展的危险阶段. 目前 EA 预后很差, 5 a 生存率低于 15 %, 手术后平均生存期少于 2 a, 但经监测发现的较早期 EA 预后明显改善, 治愈率可达 80 - 100 %^[23], 5a 生存率达 65 - 80 %. 故应对高危的 GERD、BE 患者, 尤伴异型增生者进行监测, 分子生物学指标监测及辅

助诊断因其简便、痛苦少、易重复等优点具有广泛前景. 亦可据此研究抗癌的生物化学治疗.

总之, GERD 并发 BE、EA 是多基因改变及表达异常的综合结果. 分子水平研究对 BE、异型增生及 EA 的早期准确的发现、监测、治疗及预后判断均有重要意义.

7 参考文献

- Locke GR, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-1456
- Montgomery EA, Hartmann DP, Carr NJ, Holterman DA, Sobin LH, Azumi N. Barrett esophagus with dysplasia: Flow cytometric DNA analysis of routine, paraffin-embedded mucosal biopsies. *Pathology* 1996;106:298-304
- Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: Prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992;102:1212-1219
- Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Sridhara R. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992;52: 6525-6530
- Wang QS, Sabourin CL, Wang H, Stoner GD. Overexpression of Cyclin D1 and Cyclin E in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1996;17: 1583-1588
- Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, Mapstone N, Briggs JA, Forman D, Wild CP. Prospective study of Cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1316-1321
- Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and C-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997;42:2453-2462
- Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Laurent-Puig P, Fekete F, Thomas G. TP53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994;107:1012-1018
- Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ. p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1999;59: 4784-4787
- Gonzalez MV, Artinez ML, Rodrigo L, Rodrigo L, Lopez-Larrea C, Menendez MJ, Alvarez V, Perez R, Fresno MF, Perez MJ, Sampedro A, Coto E. Mutation analysis of the p53, APC, and p16 genes in the Barrett's oesophagus, dysplasia, and adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1997;50: 212-217
- Fein M, Fuchs KH, Stopper H, Diem S, Herderich M. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis: analysis of duodenal juice in a rodent model of cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:2079-2084
- Deiry WS. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;227:121-137
- Khare L, Sabourin CL, DeYoung BR, Wagner BA, Stoner GD. Alterations in the expression of alpha6beta4 integrin and p21/Waf1/Cip1 in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 1998;21:185-193
- Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arc* 1997;430:389-395
- Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999;86: 756-763
- Zhuang Z, Vortmeyer AO, Mark EJ, Odze R, Emmert-Buck MR, Merino MJ, Moon H, Liotta LA, Duray PH. Barrett's esophagus:

- Metaplastic cells with loss of heterozygosity at the APC gene locus are clonal precursors to invasive adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996;56:1961-1964
- 17 Blount PL, Meltzer SJ, Yin J, Huang Y, Krasna MJ, Reid BJ. Clonal ordering of 17p and 5q allelic losses in Barrett's dysplasia and adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3221-3225
- 18 Fong LY, Nguyen VT, Farber JL, Huebner K, Magee PN. Early deregulation of the p16ink4a-cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4-retinoblastoma pathway in cell proliferation-driven esophageal tumorigenesis in zinc-deficient rats. *Cancer Res* 2000; 60: 4589-4595
- 19 Kimura H, Konishi K, Maeda K, Yabushita K, Kuroda Y, Tsuji M, Miwa A. Flow cytometric analysis and immunohistochemical staining for the p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in submucosal carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999;46:285-289
- 20 Gray MR, Hall PA, Nash J, Ansari B, Lane DP, Kingsnorth AN. Epithelial proliferation in Barrett's esophagus by proliferating cell nuclear antigen immunolocalization. *Gastroenterology* 1992;103: 1769-1776
- 21 Meltzer SJ, Yin J, Manin B, Rhyu MG, Cottrell J, Hudson E, Redd JL, Krasna MJ, Abraham JM, Reid BJ. Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's associated esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1994;54:3379-3382
- 22 Flejou JF, Paraf F, Muzeau F, Fekete F, Henin D, Jothy S, Potet F. Expression of c-erbB-2 oncogene product in Barrett's adenocarcinoma: Pathological and prognostic correlations. *J Clin Pathol* 1994;47:23-26
- 23 Wang QS, Sabourin CL, Bijur GN, Robertson FM, Stoner GD. Alterations in transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor expression during rat esophageal tumorigenesis. *Mol Cell Carcinog* 1996;15:144-153

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 www.wjgnet.com 上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 www.wjgnet.com 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。

山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响

董满库, 崔彦, 周立艳, 施靖华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥

董满库, 崔彦, 周立艳, 王平, 吉敏, 李晓鸥, 中国人民解放军第306医院肝胆外科 北京市 100101
施靖华, 王强, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院 上海市 200003
项目负责人: 董满库, 100101, 北京市安翔北里9号, 中国人民解放军第306医院肝胆外科. cuiyan@public.fhnet.cn.net
收稿日期: 2002-09-13 接受日期: 2002-10-03

摘要

目的: 探讨山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响作用.

方法: 选用♂ Wistar 大鼠 160 只, 随机分为正常对照组、缺血再灌注组、生理盐水组和山莨菪碱组, 观察了肝脏缺血 60 min 再灌注 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 后血浆和 / 或肝组织中内皮素 - 1 (ET-1)、谷丙转氨酶 (ALT)、丙二醛 (MDA) 和再灌注 1 h 后肝细胞内游离 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 含量变化以及肝组织病理学变化.

结果: 肝脏缺血再灌注后血浆和 / 或肝组织中 ET-1、ALT、MDA 和肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量均显著升高. 肝脏缺血再灌注前应用山莨菪碱后, 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量明显降低, 肝组织中 MDA 也有不同程度的降低, 同时肝酶的漏出减少, 肝组织病理学损害明显减轻.

结论: 山莨菪碱可以减少肝脏缺血再灌注后氧自由基的生成, 对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用.

董满库, 崔彦, 周立艳, 施靖华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥. 山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(1):82-84
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/82.htm>

0 引言

肝脏缺血再灌注损伤是肝脏和创伤外科疾病中常见的病理过程, 许多疾病均涉及到这一过程, 如严重的肝外伤、广泛的肝叶切除、肝移植以及休克、感染等. 导致肝脏缺血再灌注损伤的原因众多, 机制复杂. 研究发现, 氧自由基在肝脏缺血再灌注损伤中起了重要作用^[1-5], 我们在实验中选用山莨菪碱, 以探讨其对肝脏缺血再灌注后氧自由基生成的影响及其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物与试剂 本实验选用♂ Wistar 大鼠, 重约 210-250 g, 由第二军医大学实验动物中心提供; ET-1 试剂盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供; MDA 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供; Fura-

2/AM, Triton-x-100 和 EGTA 购自美国 sigma 公司; 山莨菪碱由江苏连云港东风制药总厂提供.

1.1.2 动物模型制作及分组 实验动物术前 12 h 禁食, 自由进水, 以 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 取上腹正中切口, 显露第一肝门部, 按 Nauta et al^[6] 的方法制作肝脏缺血再灌注模型 (此模型可造成约 70% 的肝脏缺血, 但不影响门静脉血液回流). 动物随机分为 4 组: (1) 正常对照组 (A 组): 只行假手术; (2) 缺血再灌注组 (B 组): 阻断入肝血流 60 min 后松开无创动脉夹, 恢复入肝血流, 于所需时相点处死动物取材; (3) 生理盐水组 (C 组): 阻断入肝血流前 10 min 自尾静脉注射生理盐水 1 ml, 其他同 B 组; (4) 山莨菪碱组 (D 组): 阻断入肝血流前自尾静脉注射稀释成 1 ml 的山莨菪碱约 0.5 mg (2.0 mg/kg), 其余同 B 组.

1.2 方法

1.2.1 血浆和肝组织中 ET-1 含量的测定 血浆 ET-1 含量的测定: 采取血液约 1 ml, 加入 10 μ l 10% EDTA 二钠和 20 μ l 抑肽酶, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 肝组织中 ET-1 含量的测定: 切取活肝组织约 100 mg, 加入 1 ml 1 mmol HCl 碾磨, 随后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 匀浆, 4 $^{\circ}$ C 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 测定前将标本置于冷水中复融, 再次离心, 取上清液按 ET-1 试剂盒说明书所述方法用放射免疫法测定血浆和肝组织中 ET-1 含量.

1.2.2 肝组织中 MDA 含量的测定 切取活肝组织约 100 mg, 加入 1 ml 1 mmol HCl 碾磨, 随后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 匀浆, 4 $^{\circ}$ C 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 测定前将标本置于冷水中复融, 再次离心, 取上清液, 按 MDA 试剂盒说明书所述方法用硫代巴比妥酸比色法测定肝组织中 MDA 含量.

1.2.3 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量的测定 将新鲜肝组织制成细胞悬液, 浓度调至 1×10^6 /L, 离心去上清液, 加 Fura-2/AM 及适量负载液, 混均, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中共温浴 45 min, 并持续均匀轻振, 使 Fura-2/AM 进入细胞内并充分反应. 温浴后离心去上清液, 用悬浮液 (负载液中加入 $CaCl_2$) 冲洗 2 次, 然后再加适量悬浮液, 保持 37 $^{\circ}$ C 1 h 内测完. 将样品移入 10 nm 石英比色池内, 设定激发光栅 5 nm, 发射光栅 10 nm, 发射波长 500 nm, 以 300-500 nm 激发光谱扫描测定荧光值 F; 加 Triton-x-100 (1 g/L) 破坏细胞膜, 测定 F_{max} ; 再加 EGTA (6 mmol/L) 测定 F_{min} . 结果计算: $[Ca^{2+}]_i = kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$, 其中 kd 是 Fura-2 和 Ca^{2+} 反应的解离常数, 为 314 nmol/L.

1.2.4 血浆 ALT 含量的测定 血浆 ALT 含量用常规生化方法测定。

1.3 肝组织病理学变化的观察 采取新鲜肝组织用质量浓度为 100 g/L 的甲醛溶液固定 24 h,按病理学常规制片, H-E 染色, 光学显微镜观察。

统计学处理 实验所得数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 Student's t 检验。

2 结果

2.1 血浆和肝组织中各检测指标含量的变化

2.1.1 血浆和肝组织中 ET-1 含量的变化 肝脏缺血再灌注后, 血浆和肝组织中 ET-1 含量均显著升高, 于再灌注后第3小时达到高峰, 此后缓慢下降, 与 A 组比较, 其他各组均有明显的统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 应用山莨菪碱后, ET-1 略有下降, 但与 B、C 组无明显统计学意义, 见表 1, 表 2。

2.1.2 血浆 ALT 含量的变化 血浆 ALT 于缺血再灌注后第6小时达高峰, 再灌注后 24 h 仍维持在较高水平, 与 A 组比较, 其他各组均有统计学意义 ($P < 0.01$); 应用山莨菪碱后, 血浆 ALT 含量明显下降, 与 B、C 组比

较有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.1.3 肝组织中 MDA 含量的变化 肝脏缺血再灌注后, 肝组织中 MDA 含量增加, 第6小时达高峰, 第24小时基本接近正常水平, 与 A 组比较, B、C 组有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), D 组与 B、C 组相比, 部分时相点有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.1.4 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量的变化 肝脏缺血再灌注后, 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量升高, 与 A 组 (154 ± 12 nmol/L) 比较, B 组 (384 ± 16 nmol/L)、C 组 (368 ± 15 nmol/L) 均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 D 组 (218 ± 14 nmol/L) 与 B、C 组比较也有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 肝组织病理学变化 光镜下正常对照组肝细胞和肝窦内皮细胞均正常。缺血再灌注组和生理盐水组肝脏瘀血明显, 以门静脉为中心向周边呈放射状排列, 同时, 肝细胞可见不同程度的浊肿变性和空泡状变性, 偶尔可见点状坏死; 晚期主要以肝细胞局灶性及片状坏死为主。山莨菪碱组再灌注后早期肝脏的瘀血明显减轻, 细胞变性坏死不明显, 晚期偶尔可观察到点状坏死, 无成片状细胞坏死。

表 1 血浆 ET-1 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

再灌注时间	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B 组	5.2 ± 1.3^a	12.8 ± 1.2^a	5.6 ± 1.6^a	4.8 ± 0.8^a	4.1 ± 0.8^a
C 组	4.8 ± 0.3^a	11.5 ± 0.6^a	7.3 ± 0.4^a	4.5 ± 1.8^a	4.2 ± 0.6^a
D 组	4.2 ± 1.6^a	9.3 ± 0.8^a	5.2 ± 1.2^a	4.0 ± 0.8^a	3.9 ± 0.4^a

^a $P < 0.01$ vs A 组 (1.1 ± 0.5).

表 2 肝组织中 ET-1 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, ng/100 mg)

再灌注时间	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B 组	314 ± 34^b	650 ± 82^a	381 ± 68^a	325 ± 65^b	206 ± 25
C 组	302 ± 25^b	570 ± 48^a	385 ± 56^a	302 ± 60^b	210 ± 30
D 组	284 ± 20^b	582 ± 60^a	360 ± 48^a	310 ± 58^b	198 ± 31

^a $P < 0.01$ vs A 组 (164 ± 30), ^b $P < 0.05$ vs A 组。

表 3 血浆 ALT 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, u/L)

再灌注时间	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B 组	137 ± 32^a	144 ± 33^a	182 ± 36^a	162 ± 28^a	148 ± 32^a
C 组	140 ± 35^a	148 ± 38^a	176 ± 28^a	152 ± 42^a	150 ± 36^a
D 组	$82 \pm 12^{a,b}$	$88 \pm 15^{a,b}$	$102 \pm 14^{a,b}$	$91 \pm 25^{a,b}$	$90 \pm 18^{a,b}$

^a $P < 0.01$ vs A 组 (19 ± 4), ^b $P < 0.05$ vs B、C 组。

表 4 肝组织中 MDA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, nmol/g)

再灌注时间	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B 组	7.9 ± 1.2^b	8.2 ± 1.0^b	11.2 ± 1.6^a	10.2 ± 1.4^a	6.5 ± 0.6
C 组	7.4 ± 0.8^b	9.4 ± 0.6^a	10.4 ± 1.8^a	9.6 ± 2.0^a	6.0 ± 0.4
D 组	6.0 ± 0.4	6.2 ± 0.8	6.0 ± 1.2^c	5.2 ± 0.3^c	4.4 ± 0.6

^a $P < 0.01$ vs A 组 (4.0 ± 1.1); ^b $P < 0.05$ vs A 组; ^c $P < 0.05$ vs B、C 组。

3 讨论

我们在实验中观察到,肝脏缺血再灌注后血浆 ET-1、ALT 和肝组织中 ET-1、MDA、肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量均显著增加,说明肝脏缺血再灌注后导致了肝细胞损伤.研究发现^[7,8],在肝血管平滑肌细胞和肝窦贮脂细胞膜上存在 ET_A 和 ET_B 受体,ET-1 可作用于 ET_A 受体,使平滑肌细胞和贮脂细胞收缩,最终导致肝脏微循环障碍,使入肝血流量减少^[9].肝脏缺血缺氧时,ATP 生成减少甚至停止,同时 ATP 分解加速,ATP 的减少可降低 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶的活性,Na⁺ 和 Ca²⁺ 便在细胞内蓄积,导致细胞水肿和细胞内 Ca²⁺ 超载.细胞内 Ca²⁺ 超载可激活 Ca²⁺ 依赖性蛋白水解酶,在 ATP 降解产物代谢过程中,可促进活性氧自由基的生成^[9].ET-1 还可刺激兴奋性氨基酸的释放,促进中性粒细胞的黏附,活化释放蛋白酶产生氧自由基^[10,11].氧自由基可导致脂质过氧化反应,使细胞膜和膜酶损伤,同时,非自由基的醛式代谢产物还能带着自由基的损伤潜能,从其生成的部位如内质网扩散到线粒体、核糖体和其他细胞成分,导致细胞和细胞组分的损伤.

肝脏缺血再灌注前应用山莨菪碱,可使肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和肝组织中 MDA 的含量明显下降,以及肝酶的漏出减少,说明山莨菪碱可以减轻肝细胞内 Ca²⁺ 超载并降低氧自由基的产生.山莨菪碱可嵌入细胞膜脂质双层,增加膜的流动性,有利于细胞膜发挥其功能^[12-14].山莨菪碱还具有稳定细胞内溶酶体膜,保护线粒体和提高细胞利用氧的能力,同时还可以增强线粒体固定 Mg²⁺ 的能力,从而减少 Mg²⁺ 的丢失^[15].由于应用山莨菪碱后细胞膜和细胞器膜受到了较好的保护,同时 Mg²⁺ 的丢失减少,故可以减轻肝细胞和线粒体内 Ca²⁺ 超载.研究发现,山莨菪碱还可通过蛋白激酶 C 系统阻断 Ca²⁺ 内流,从而减轻肝窦内皮细胞和肝细胞的损伤.细胞内 Ca²⁺ 超载的减轻,可以减少 Ca²⁺ 依赖性蛋白水解酶的激活,减少黄嘌呤脱氢酶向黄嘌呤氧化酶的转化,从而可使氧自由基的生成减少.由此可见,山莨菪碱可以减少氧自由基的生成,对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用.

4 参考文献

- 1 Yamaguchi Y, Matsumura F, Liang J, Okabe K, Ohshiro H, Ishihara K, Matsuda T, Mori K, Ogawa M. Neutrophil elastase and oxygen radicals enhance monocyte chemoattractant protein- expression after ischemia / reperfusion in rat liver. *Transplantation* 1999; 68:1459-1468
- 2 Gasbarrini A, Pasini P, Nardo B, De Notariis S, Simoncini M, Cavallari A, Roda E, Bernardi M, Roda A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:211-216
- 3 Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:49-55
- 4 王万铁, 林丽娜, 徐正 介, 王宗敏. 中性粒细胞在肝缺血再灌注损伤中的作用及川芎嗪的保护效应. *世界华人消化杂志* 1998; 6:774-775
- 5 陈玺华, 鲍民生, 李正中. 大鼠肝缺血腺苷预处理的作用机制. *世界华人消化杂志* 1999; 7:298-299
- 6 Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 171:120-125
- 7 Yokoyama Y, Baveja R, Sonin N, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Altered endothelin receptor subtype expression in hepatic injury after ischemia / reperfusion. *Shock* 2000; 13:72-78
- 8 Sonin NV, Garcia-Pagan JC, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia / reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1999; 11:175-179
- 9 Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiouraea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1998; 10:20-25
- 10 Manika A, Trinh T, Lagace G, Dugas MA, Proulx F, Lepage G, Champagne J, Lavoie JC, Cousineau J, Russo P, Chartrand C, Yandza T. N-acetylcysteine in pig liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1999; 68:327-330
- 11 Soejima Y, Yanaga K, Nishizaki T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Sugimachi K. Effect of specific neutrophil elastase inhibitor on ischemia / reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res* 1999; 86:150-154
- 12 Wang LZ, Liu YQ, Cui YH, Zhu FH, Wang BS, Lun N. Effects of dexamethasone, cyproheptadine, anisodamine, and dinoprostone on TNF alpha production in endotoxic shock. *Chung Kuo Yaoli Hsueh Pao* 1999; 20:171-174
- 13 董满库, 陈昌玮, 崔彦, 施靖华, 徐冠南, 王平, 杨飞, 肖广生. 山莨菪碱对再灌注后肝细胞保护作用的实验研究. *世界华人消化杂志* 2000; 8:925-927
- 14 Zhang X, Yan J, Hong S. An experimental study on the treatment of fetal rabbits with intrauterine growth retardation. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1996; 31:97-99
- 15 Wang WC, Lee YN. Effects of anisodamine and atropine on the microvasculature of liver, skeletal muscle and foot-pad skin in anesthetized rats. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1992; 27:385-387

银杏制剂对大鼠急性肝损伤保护的作用及机制

杜东红,袁凤仪,何云,任渝江

杜东红,袁凤仪,何云,任渝江,中国人民解放军第44医院消化内科
贵州省贵阳市 550009
贵州省科委资助课题, No.1157(1998)
项目负责人:杜东红,250022,山东省济南市槐荫区济兗路57号,山东省皮肤病医院. thq@hotmail.com
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-29

摘要

目的:探讨银杏制剂对大鼠急性肝损伤的保护作用及机制。

方法:♂ Wistar 大鼠,随机分为:对照组、模型组、银杏制剂低、中、高三个剂量治疗组及齐敦果酸阳性药对照组。D-氨基半乳糖胺(D-GalN)致大鼠急性肝损伤模型。测定大鼠血清血小板活化因子(PAF)、丙氨酸转氨酶(ALT)、丙二醛(MDA),并光镜下观察肝脏病理变化。

结果:模型组血清PAF、ALT、MDA显著高于正常组($P < 0.01$)。光镜:肝细胞大块或亚大块坏死,肝小叶及肝细胞消失,肝脏病理学分级与正常组有显著差异($P < 0.01$)。银杏各剂量组血清PAF、ALT、MDA及阳性对照组ALT、MDA则均明显低于模型组($P < 0.01$),肝细胞坏死明显减轻,范围缩小,并可见肝小叶结构,其中尤以银杏高剂量组疗效较佳($P < 0.05$),其他各治疗组效果无明显差异($P > 0.05$)。

结论:银杏制剂对D-GalN所致大鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能是通过清除氧自由基、拮抗PAF,改善肝脏微循环实现的。他有望成为临床治疗急性重型病毒性肝炎的有效药物之一。

杜东红,袁凤仪,何云,任渝江.银杏制剂对大鼠急性肝损伤保护的作用及机制.
世界华人消化杂志 2003;11(1):85-87
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/85.htm>

0 引言

急性肝衰竭(AHF),在我国发病率较高,且起病急、症状重、并发症多、死亡率高.近年发现,PAF在AHF

的发病机制中具有重要作用,尤其在内毒素-细胞因子所致肝损害中可能起“中心”和“放大”致病作用^[1,2].银杏提取物中的银杏苦内脂BN52021是强效的特异性PAF拮抗剂,可与PAF竞争受体,发挥保肝作用^[3].但其价格昂贵,临床尚难广泛应用.银杏制剂含有BN52021(含量占6%),其提取工艺稳定、成本低廉;其另一种主要成分银杏总黄酮(含量占24%),可捕获氧自由基、抗脂质过氧化,对急性肝损伤也具保护作用^[4],故治疗AHF应具良好疗效.而将此药用于AHF保肝治疗尚未见报道.为此,我们利用D-GalN致AHF大鼠模型,用齐敦果酸作为阳性对照,观察银杏制剂对大鼠血清PAF、MDA、ALT的影响及肝脏病理学改变,以明确他的保肝作用,探讨其机制,为应用于临床提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar 大鼠,60只,体质量 300 ± 80 g,贵阳医学院动物中心提供,D-GalN1,重庆医科大学化学教研室提供,用时配成100 g/L的溶液,并用1 mmol/L NaOH调pH为7.4.银杏制剂,由江苏扬子江药业有限公司提供,为一散装粉末状中药制剂,用时配成20 g/L的混悬液,灌胃前摇匀.齐敦果酸片,重庆制药七厂,用时配成6 g/L的混悬液,灌胃前摇匀.TDL-80-2B型台式低速离心机和LG-3型多用冰冻干燥机,宁波市生化仪器厂制造.TYXN-96多功能智能血液凝集仪,上海通用机电技术研究所制造.TG328A全机械加码电光分析天平(可精确至 10^{-4}),北京医用天平厂制造。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 大鼠分笼饲养,保持适宜环境(室温:16-25 °C),按体质量均衡法,将动物随机分为总体质量相近的6个实验组,每组10只,给予治疗性药物(银杏制剂)及阳性药对照剂(齐敦果酸),1次/d,共8 d,于第7天上午,给予D-GalN造模,第8天,末次给药1 h后断头取血(表1)。

表1 各组大鼠的处理情况

	动物数只	用药方法、剂量(mL/100g 鼠体质量)、次数	
		ip D-GalN × 1次	ig 药物 × 8次
正常组	10	生理盐水(0.7 mL/100 g)	生理盐水(0.5 mL/100 g)
D-GalN组	10	100 g/L D-GalN(0.7 mL/100 g)	生理盐水(0.5 mL/100 g)
D-GalN组+银杏低剂组	10	100 g/L D-GalN(0.7 mL/100 g)	20 g/L 银杏制剂(0.25 mL/100 g)
D-GalN组+银杏中剂组	10	100 g/L D-GalN(0.7 mL/100 g)	20 g/L 银杏制剂(0.5 mL/100 g)
D-GalN组+银杏高剂组	10	100 g/L D-GalN(0.7 mL/100 g)	20 g/L 银杏制剂(1 mL/100 g)
D-GalN组+齐敦果酸组	10	100 g/L D-GalN(0.7 mL/100 g)	6 g/L 齐敦果酸(1 mL/100 g)

齐敦果酸实际用量为:60 mg/kg;(相当于正常人剂量10倍);银杏制剂低、中、高剂量组的实际用量分别为:50、100、200 mg/kg 鼠体质量(中剂量组相当于正常人剂量10倍);D-GalN的实际用量为:700 mg/kg 鼠体质量。

1.2.2 观测指标及检测方法 每只鼠断头取血 7-10 mL, 离心(1 560 g × 10 min)取血清,置 4 °C 冰箱保存,备测。(1)PAF 的检测:血浆中 PAF 脂质的提取:按 Croft et al^[5]报道的方法.洗涤兔血小板的制备^[6]。(3)血小板聚集功能测定及 PAF 计算:用血小板多功能聚集仪按说明书操作步骤测试 PAF 标准品或样品,得出 PAF 标准品致血小板聚集的量效曲线。据此曲线,计算出相应 PAF 含量(以百分比浓度表示)。(2) ALT:用 Beckman 全自动生化分析仪检测;(3) MDA:采用硫代巴比妥比色法检测;(4) 病理学观察:光镜观察。病理学判断标准:0 级:肝细胞正常;1 级:肝细胞仅有水肿变性或点状坏死;2 级:肝细胞灶或片状坏死,但坏死程度小于整个肝组织切片的 25 %;3 级:肝细胞坏死量占整个切片的 25-50 %;4 级:肝细胞坏死量大于肝组织切片的 50 % 以上。

统计学处理 实验数据,先经方差齐性检验,方差齐,则用单因素方差分析进行组间比较分析,并用 q 检验进行组间两两比较;方差不齐以及等级分类资料用秩和检验。所有数据均经 SAS 统计学软件包处理。

2 结果

2.1 血清 PAF、ALT、MDA 结果 不同剂量的 PAF 标准品引起的血小板聚集率,呈良好的线性量效关系(图1)。据此曲线,计算出各组大鼠血清 PAF 含量(表 2)。

表 2 各组大鼠血清 PAF、ALT、MDA 的变化情况

	PAF(μg/L)	ALT(U/L)	MDA(nmol/L)
正常组	1.09 ± 0.18 ^b	55.8 ± 6.38 ^b	5.86 ± 2.70 ^b
模型组	4.6 ± 0.33	1092.7 ± 88.50	16.43 ± 3.78
银杏低剂量组	2.74 ± 0.28 ^{ab}	498 ± 73.03 ^{ab}	9.37 ± 2.47 ^{ab}
银杏中剂量组	2.65 ± 0.22 ^{ab}	501.7 ± 45.04 ^{ab}	8.62 ± 2.33 ^{ab}
银杏高剂量组	2.33 ± 0.20 ^b	350.6 ± 66.77 ^b	5.39 ± 2.27 ^b
齐墩果酸组	4.53 ± 0.45 ^b	508.8 ± 58.91 ^{ab}	8.78 ± 2.98 ^{ab}

^aP < 0.05, vs 银杏高剂量组; ^bP < 0.01, vs 模型组。

2.2 病理学观察结果 (表 3、图 2-5)

表 3 光镜下肝组织病理学变化情况

大鼠数		病理改变分级(只数)				vs 模型组	vs 高剂量组
		+	++	+++	++++		
正常组	10	0	0	0	0		
模型组	10	2	5	3			
银杏制剂低剂量组	10	3	5	1		P < 0.01	P < 0.01
银杏制剂中剂量组	10	7	3	0		P < 0.01	P < 0.01
银杏制剂高剂量组	10	9	1	0		P < 0.01	
齐墩果酸组	10	6	4	0		P < 0.01	P < 0.01

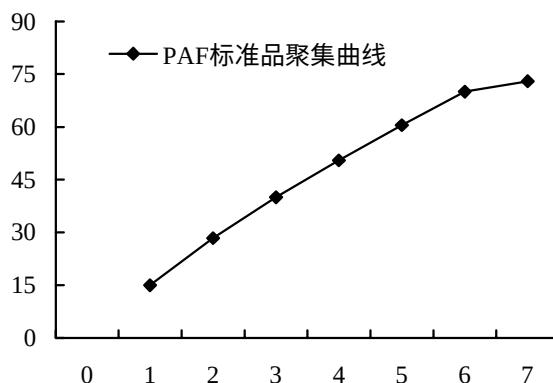


图 1 PAF 对兔血小板的聚集作用

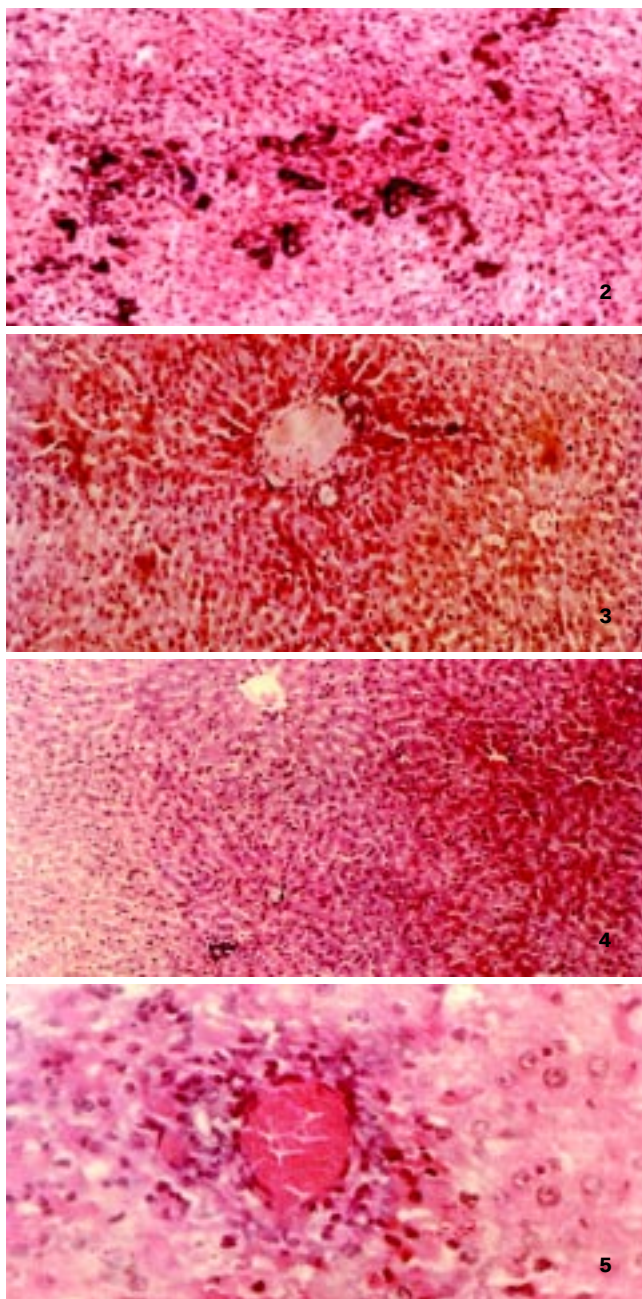


图 2 模型组 肝弥漫性坏死 病理分级 IV 级 HE × 50

图 3 银杏制剂中剂量组 肝细胞点状坏死 汇管区血管高度扩张 病理分级 II HE × 200

图 4 银杏制剂高剂量组, 肝细胞点状坏死, 病理分级 I 级, HE × 100

图 5 齐墩果酸组 肝细胞灶状坏死, 汇管区炎性细胞浸润, 肝淤血明显, 病理分级 II HE × 400

3 讨论

3.1 PAF的致病作用 造成AHF肝坏死的机制^[7]:(1)原发性损伤,包括免疫病理反应和HBV本身的作用;(2)继发性损伤,即以TNF- α 为核心的细胞因子等炎症递质对肝脏的致伤效应.已证实,PAF在原发性和继发性损伤中均具有一定作用.本试验中模型组PAF较正常组显著升高($P < 0.01$),亦证实:PAF参与了AHF的致病过程.

3.2 银杏制剂对AHF的保护作用

3.2.1 银杏制剂对血清PAF的影响 各银杏制剂组血清PAF含量明显低于模型组(4.6 ± 0.33)($P < 0.01$),齐敦果酸组则与模型组无显著性差异($P > 0.05$),说明银杏制剂可通过其中的PAF拮抗剂拮抗PAF,降低血清PAF水平,发挥抗炎保肝作用;齐敦果酸不具有拮抗PAF的作用.

3.2.2 对ALT的影响 血清转氨酶是肝细胞损害的敏感指标,在一定程度上反映了细胞损害和坏死程度,而ALT活性反应肝损害更具有特异性.本试验,模型组血清ALT活性(1092.2 ± 88.5) U/L明显高于正常对照组(55.8 ± 6.58) U/L($P < 0.01$),说明D-GalN导致了大鼠大量肝细胞坏死,血清转氨酶升高.而各治疗组转氨酶活性明显低于模型组,提示银杏制剂及齐敦果酸均有降酶保肝作用,尤以银杏制剂高剂量组作用最显著ALT(350.6 ± 66.77)U/L($P < 0.01$);银杏中(501 ± 45.04)U/L、低(498 ± 73.03)U/L剂量组与齐敦果酸组之间,降酶作用无显著性差异($P > 0.05$).

3.2.3 对MDA的影响 导致肝细胞坏死损伤的重要因素之一是氧自由基(OFR),氧毒性集团主要是通过氧化细胞蛋白质DNA及生物膜脂质,导致肝细胞坏死,并形成脂质过氧化终产物MDA,而MDA也可使膜蛋白发生交联反应,导致肝细胞破坏,因此,测定血清MDA,可间接反应OFR对肝细胞的损害程度.本结果显示:各治疗组血清MDA含量明显低于模型组(16.43 ± 3.78)nmol/L($P < 0.01$),说明各银杏制剂和齐敦果酸均具有清除OFR,减少脂质过氧化产物产生的作用,从而防止肝细胞破坏.疗效以银杏高剂量组效果最好($P < 0.05$).

3.2.4 对病理学改变的影响 D-GalN诱发大鼠肝损伤模型,因其病理变化与人类病毒性肝炎相似而被广泛应用^[8].后又证实,D-GalN复制出的大鼠AHF模型,与临床暴发性肝衰竭(FVH)患者所表现出的机体变化、病理改变及生化指标变化基本相同.本试验病理学观察显示:正常组肝组织正常;而模型组可见融合成片的肝细胞坏死,或有不同程度亚大块坏死,肝小叶结构破坏,肝细胞消失,网状支架塌陷,在门管区周围肝小叶周边偶见狭窄的肝实质和稀疏的水肿变性肝细胞,毛细胆管中有胆汁淤积,肝窦内普遍含有稀疏的慢性炎症细胞、肥大的Kupffer细胞和巨噬细胞,其内常见色素沉着,门管区有不同程度的小胆管增生(图2),与正常组有显著性差异;而治疗组病理学改变与模型组比较具有显著性差异($P < 0.01$),表现为肝细胞

点状或灶状坏死,程度明显减轻,甚至有的仅有肝细胞变性和点状坏死,肝小叶结构正常.说明:银杏制剂和齐敦果酸,均具有防止肝细胞坏死的作用,但前者除清除OFR外,还拮抗PAF,故作用较后者好,且以银杏高剂量组效果最好($P < 0.01$), (图3-5).

3.3 银杏制剂的保肝作用机制 根据本试验结果可得出,银杏制剂的保肝作用机制有:(1)清除氧自由基.银杏制剂中的银杏总黄酮^[4]和银杏苦内酯均具有这种作用.(2)拮抗PAF.银杏制剂中的银杏苦内酯BN52021,具有拮抗PAF生物学活性,防止单核-巨噬细胞系统激活,从而阻止了粒细胞活化、炎症递质、溶酶体酶释放及Ca²⁺超载等连锁反应所致的肝细胞坏死^[9-14].

银杏制剂通过上述作用机制,发挥良好的治疗效果,有望成为临床上治疗AHF的有效药物之一.然而AHF的发病机制非常复杂,银杏制剂并不能清除内毒素对肝脏的直接毒性作用,仅能遏制内毒素-细胞因子网络的某一致病环节,防止各种毒素通过PAF而介导肝损害的发生.因此对于AHF的治疗,应根据其多种发病机制,应用多种药物综合治疗,才能达到良好治疗效果.

4 参考文献

- 1 Tieg G, Wolter M, Wendel A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol* 1989;38: 627-631
- 2 Nagakawa I, Hishinuma I, Hirota K, Miyamoto K, Yamanaka T, Tsukidate K, Katayama K, Yamatsu I. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. *Gastroenterology* 1990;99: 758-765
- 3 何云,王宇明,顾长海,郝飞.血小板活化因子在D-氨基半乳糖引起的急性肝损害中的作用. *中华传染病杂志* 1997;15:25-29
- 4 吴东方,罗顺德,冯小东,冷腊英,徐玲君.银杏叶黄酮对肝脏MDA生成的影响. *中国中药杂志* 1997;22:51-52
- 5 Croft KD, Sturm MJ, Codde JP, Vandongen R, Beilin LJ. Dietary fish oils reduce plasma levels of platelet activating factor precursor (Lyso-PAF) in rats. *Life Sci* 1986; 36:1875-1879
- 6 何云,王宇明,何燕,袁凤仪,丁健.血小板活化因子对体外肝细胞的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:894-895
- 7 顾长海,王宇明主编.急性肝衰竭.第1版.四川:四川科学技术出版社, 1997:11-12
- 8 陈爽,贾长恩,杨美娟,王德福.芍药甙防止大鼠肝细胞体外损伤形态学及生物化学研究. *中西医结合肝病杂志* 1997;7:219
- 9 Todoroki H, Higure A, Okamoto K, Okazaki K, Nagafuchi Y, Takeda S, Katoh H, Itoh H, Ohsato K, Nakamura S. Possible role of platelet-activating factor in the in vivo expression of tissue factor in neutrophils. *J Surg Res* 1998;80:149-155
- 10 Kasirga E, Coker I, Aydogdu S, Yagci RV, Taneli B, Gousseinov A. Blood levels of leukotrienes (LTC4, D4, E4, B4) and synthesis of leukotriene B4 by peripheral leukocytes in children with acute A and B hepatitis. *Turk J Pediatr* 1999;41:457-465
- 11 Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Goshima M, Kuroda Y. Pancreatitis-associated ascitic fluid increases intracellular Ca(2+) concentration on hepatocytes. *J Surg Res* 2000;93:171-176
- 13 Sakaguchi T, Nakamura S, Suzuki S, Oda T, Ichiyama A, Baba S, Okamoto T. Participation of platelet-activating factor in the lipopolysaccharide-induced liver injury in partially hepatectomized rats. *Hepatology* 1999;30:959-967
- 14 Libert C. Acute phase proteins as protective factors against the toxicity of tumor necrosis factor. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1997; 59:515-523

mu、kappa 受体在泻剂结肠大鼠离体肠肌条收缩反应中的作用

刘宝华,莫平,张胜本

刘宝华,张胜本,中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042

莫平,成都军区昆明总医院普通外科 云南省昆明市 650032

项目负责人:刘宝华,400042,重庆市大坪长江支路10号,中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科. lbh57268@163.com
收稿日期:2002-07-08 接受日期:2002-07-22

摘要

目的:探讨 mu、kappa 阿片受体激动剂和拮抗剂对泻剂结肠大鼠离体肌条收缩反应的作用。

方法:以泻剂复制大鼠泻剂结肠模型,采用电刺激离体肌条收缩反应实验,观察 mu、kappa 阿片受体激动剂和拮抗剂对“泻剂结肠”大鼠离体肌条的收缩反应的影响。

结果:与对照组相比,外源性不同浓度的 mu、kappa 阿片受体激动剂明显抑制电刺激泻剂结肠离体肌条收缩反应,收缩波幅非常明显降低对照组(8.50,6.24,3.35 vs 11.40 mm, $P < 0.01$; 8.98,6.89,4.43 vs 11.40 mm, $P < 0.01$)。与对照组相比,不同浓度的 mu 阿片受体拮抗剂显著加强电刺激泻剂结肠离体肌条收缩反应(13.18,15.87,19.46 vs 11.40 mm, $P < 0.01$)。kappa 阿片受体拮抗剂无明显的作用。

结论:mu、kappa 阿片受体参与了泻剂结肠的动力学的调节。

刘宝华,莫平,张胜本. mu、kappa 受体在泻剂结肠大鼠离体肠肌条收缩反应中的作用.世界华人消化杂志 2003;11(1):88-89

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/88.htm>

0 引言

慢传输性便秘病因、发病机制目前还不清楚,众多的神经递质在慢传输性便秘发病的作用越来越引起人们的重视。我们采用泻剂结肠模型,探讨抑制性神经递质阿片肽对泻剂结肠大鼠离体肌条收缩反应的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 大黄粉由重庆市中药厂提供,酚酞粉由重庆市东风试剂厂提供.mu、kappa 阿片受体拮抗剂 naloxone 和 norbni, mu、kappa 阿片受体激动剂 damgo 和 U50488 购自美国 Sigma 公司.Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,体重(230-270)。将大黄和酚酞组作为泻剂结肠组。对照组 10 只,大黄和酚酞组各 20 只,雌雄各 10 只。动物模型的建立^[1]:各组的雌雄大鼠分笼喂养,饲养环境温度 18-28℃,相对湿度 40-80%。对照组饲以普通

软饲料。大黄组添加大黄粉,起始剂量每天 200 mg/Kg,递增至每天 1 000 mg/Kg 时约半数动物出现稀便,维持此剂量直到稀便消失,再按每天 200 mg/Kg 递增,如此保持半数动物有下泻作用饲养 3 mo,大黄组的终剂量为每天 2 400 mg/Kg。酚酞组添加酚酞,起始剂量每天 200 mg/Kg,半数致泻量为每天 1 400 mg/Kg,终剂量为每天 3 200 mg/Kg。大黄组动物饲养 3 mo,后约 40% 出现脱肛、血便。

1.2 方法 击昏动物,腹正中切口进腹,快速取回盲部 5 cm 处的结肠,置于 Krebs 液平皿中。用 Krebs 液冲洗肠内容物,然后将肠管套在一玻璃棒上,用湿棉球沿肠管纵轴擦几次,擦破浆膜,用湿棉球轻轻向两侧剥离,用眼科手术剪剪开肠管,制成 2×2 cm 肌条。用外科缝线在肌条的两端各缝扎一细线,一端固定在标本支持棒上,另一端挂于压力传感器。肌条置于盛有恒温(37±0.5℃)、持续通气(95 mol/L O₂, 5 mol/L CO₂) 10 ml Krebs 液浴槽中。Krebs 液包括:NaCl 112.08 mmol, KCl 5.90 mmol, CaCl₂ 1.97 mmol, MgCl₂ 1.18 mmol, NaH₂PO₄ 1.22 mmol, NaHCO₃ 25.0 mmol, Glu 11.49 mmol, PH 7.2-7.4。银丝电极一对平行放置在肌条的上下端,持续的电刺激,刺激强度:电压 70V,频率 10 Hz,波宽 4 ms。每次实验开始,调节肌肉静息张力 1 g,平衡 1 h,肌力变化通过压力传感器记录在二道生理记录仪上,灵敏度为 0.5,走纸速度为 1 mm/s,纵坐标每一小格代表一个收缩单位(相当于 1 g 的拉力)。平衡 1 h 后,在浴槽分别加入不同浓度的阿片受体激动剂或拮抗剂,记录观察各种药物对电刺激离体肌条影响,绘制浓度依赖曲线。对电刺激离体肌条变化,在单位时间内,测定所有收缩波的振幅,计算平均振幅及单位时间内振幅变化的百分数。振幅变化的百分数=(实验组单位时间振幅-对照组单位时间振幅)÷对照组单位时间振幅×100%。

统计学处理 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 Student's t 检验统计分析。

2 结果

在大多数的挂条实验(70%)中,电刺激离体肌条收缩反应表现为典型的正弦样曲线,因各种电生理影响因素,30%的肌条表现为杂乱无规律的波形。泻剂结肠组电刺激离体肌条收缩波的振幅降低,收缩肌力减弱,

与对照组相比,振幅下降27.43 %。不同剂量的mu阿片受体激动剂 damgo 明显抑制电刺激泻剂结肠离体肌条收缩反应,收缩波的振幅显著低于用药前基础收缩波的振幅($P < 0.01$)。与 0.05 μmol 组收缩波振幅相比,0.10 和 1.00 μmol 组的收缩波振幅显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1)。不同剂量的mu阿片受体拮抗剂 naloxone 显著加强电刺激泻剂结肠离体肌条收缩反应,与用药前基础收缩波的振幅,振幅明显升高 ($P < 0.01$)。与 0.05 μmol 组收缩波振幅相比,0.10 和 1.00 μmol 组的收缩波振幅显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1)。U50488H 是一种高选择性、强效的 kappa 阿片受体激动剂,对电刺激泻剂结肠离体肌条收缩反应呈明显的抑制作用,收缩波的振幅显著低于用药前基础收缩波的振幅($P < 0.01$)。与 0.05 μmol 组收缩波振幅相比,0.10 和 1.00 μmol 组的收缩波振幅显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1)。使用大剂量 kappa 阿片受体拮抗剂 norbni 不改变电刺激泻剂结肠离体肌条收缩波的振幅。

表1 mu, kappa 阿片受体激动剂和拮抗剂对电刺激泻剂结肠离体肌条收缩波振幅的影响(mm, $\bar{x} \pm s$)

药物名称	药物浓度(μmol)			
	0	0.05	0.10	1.00
用药前	11.40 $\pm$ 0.21			
Damgo		8.50 $\pm$ 0.89 ^a	6.24 $\pm$ 0.91 ^{ab}	3.35 $\pm$ 0.64 ^{ac}
Naloxone		13.18 $\pm$ 0.93 ^a	15.87 $\pm$ 0.98 ^{ab}	19.46 $\pm$ 0.79 ^{ac}
U50488H		8.98 $\pm$ 0.69 ^a	6.89 $\pm$ 0.71 ^{ab}	4.43 $\pm$ 0.99 ^{ac}

^a $P < 0.01$ vs 用药前; ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs 0.05 μmol 组。

3 讨论

阿片肽广泛分布于胃肠道,通过肠道内的 mu、kappa、delta 阿片受体,抑制兴奋性神经递质的释放起到抑制肠道运动的作用^[2,3]。我们观察到外源性的 mu、kappa 阿片受体激动剂明显抑制泻剂结肠大鼠离体肌条收缩反应,收缩波振幅显著低于用药前基础收缩波的振幅,上述抑制作用与剂量负相关。Mu阿片受体拮抗剂则明显加强电刺激泻剂结肠大鼠离体肌条收缩反应。Kappa 阿片受体拮抗剂则无明显作用。结果表明, mu阿片受体在泻剂结肠大鼠肠道动力调控中起重要的作用,其次是 kappa 阿片受体。也进一步说明阿片肽能使结肠的神经肌肉的传动推动性蠕动减弱,参与慢传输性便秘的发生和发展。

Kreek et al 曾提出:阿片肽活性的变化是慢传输便秘的发病的一个重要因素,并用 mu阿片受体拮抗剂纳洛酮治疗 2 例慢传输性便秘获得成功。我们通过观察阿片受体的激动剂和拮抗剂对泻剂结肠离体肌条的作用,为用阿片受体拮抗剂治疗慢传输性便秘提供了理论依据。进一步提示研究阿片受体的亚型、结合位点和全面的临床研究,有可能为治疗慢传输性便秘提供新的途径,也可能较全面的阐明慢传输便秘的发病机制。

4 参考文献

- 1 刘宝华,张胜本,莫平. Mu、Kappa 受体激动剂、拮抗剂对大鼠肠道传输功能的影响. 大肠肛门病外科杂志 2002;8:14-16
- 2 刘宝华. 便秘的诊断及治疗. 第1版. 北京: 军事医学科学院出版社, 2002:174-182
- 3 Sengupta JN, Snider A, Su X, Gebhart GF. Effects of kappa opioids in the inflamed rat colon. *Pain* 1999;79:175-185

世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*)申报的2002年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会委会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801)。资助期限2年,2003 - 2004年,资助强度每年8万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报 (英),计算数学 (英),理论物理通讯 (英) 中国物理快报 (英),力学学报 (英),分析化学,高等学校化学学报,化学学报,化学通报,中国化学工程学报 (英),**世界胃肠病学杂志 (英)**,作物学报,中国农业科学,中国中西医结合杂志,中国药理学报 (英),生物化学与生物物理学报,细胞研究 (英),植物学报 (英),大气科学进展 (英),地球物理学报,地质学报 (英),金属学报,稀土学报 (英),材料科学技术 (英),稀有金属材料与工程,电力系统自动化,计算机科学技术学报 (英),管理科学学报,中国科学 (中、英),科学通报 (中、英)。

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

食管癌及其癌前病变组织 p16 蛋白表达的研究

王立峰,张丽红,刘 明,张 伟,王吾如,王洪平,刘伯齐,金玉生,靳玉兰,韩志楷,曲 平,刘 义,丁镇伟,林培中

王立峰,王吾如,哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科

黑龙江省哈尔滨市 150001

张丽红,哈尔滨医科大学第一临床医学院放射科

黑龙江省哈尔滨市 150001

刘明,哈尔滨医科大学第三临床医学院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150040

张伟,王洪平,刘伯齐,金玉生,靳玉兰,韩志楷,曲平,刘义,丁镇伟,林培中,中国医学科学院肿瘤医院 北京市 100021

国家九五攻关项目资助课题, No.96-906-01-02

国家自然科学基金资助课题, No.39870838

项目负责人:张伟,100021,北京市朝阳区潘家园 中国医学科学院肿瘤医院. zhangwe@public.bta.net.cn

收稿日期:2002-10-08 收受日期:2002-10-21

摘要

目的:探讨 p16 蛋白表达与食管癌发生发展的关系。

方法:应用免疫组织化学方法检测了79例食管癌(原位癌30例,浸润性鳞状细胞癌19例,腺癌30例)及其116例增生性病变(单纯增生30例,不典型增生轻31例、中31例、重24例)和28例正常食管黏膜上皮组织中p16蛋白表达情况。

结果:p16蛋白表达的阳性率分别为侵袭性鳞状细胞癌21.1%(4/19)、原位癌50%(15/30)、重度不典型增生83.3%(20/24)、中度不典型增生64.5%(20/31)、轻度不典型增生67.7%(20/31)、单纯增生80%(24/30)、正常组织60.7%(17/28)。

结论:p16蛋白表达的缺失可能与食管癌的发生发展有关。

王立峰,张丽红,刘明,张伟,王吾如,王洪平,刘伯齐,金玉生,靳玉兰,韩志楷,曲平,刘义,丁镇伟,林培中. 食管癌及其癌前病变组织p16蛋白表达的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(1):90-91

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/90.htm>

0 引言

研究表明,在多种细胞系和实体瘤中存在 p16 蛋白的缺失,提示 p16 可能与多种肿瘤的发生、发展有关^[1]。为探讨 p16 蛋白在食管癌发生、发展中的作用及其表达的改变,我们对 218 例食管内窥镜活检组织和 5 例食管癌手术后切除的标本,包括正常食管黏膜、单纯增生、不典型增生食管上皮、原位癌和侵袭癌组织中 p16 蛋白的表达情况进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 河北磁县 1997 年食管癌普查中患者的活检组织 203 例。经病理诊断:侵袭性鳞状细胞癌 19 例,腺癌 10 例,原位癌 30 例,重、中、轻度不典型增生分别为 24 例、31 例、31 例,单纯性增生 30 例,正常食管鳞状上皮 28 例;哈医大一院 1997/1998 年食管腺癌 20 例,其中活检组织 15 例,食管癌术后切除标本 5 例。抗 p16

蛋白的单克隆抗体(鼠)sc-1661 为 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 产品,工作浓度为 1:50;SP-Streptavidin/Peroxidase kit 由北京中山生物技术有限公司提供。

1.2 方法 辣根过氧化物酶标记的 SP 法。即:石蜡切片常规脱蜡至水,30% ml/L 过氧化氢—甲醇封闭 5 min, PBS (pH 7.2)漂洗后置柠檬酸(pH 6.0)中,微波炉抗原修复 10 min, PBS 漂洗后依次滴加一抗 4℃过夜,二抗 37℃ 15 min, 辣根酶标记的链霉卵白素工作液 15 min 及显色底物,于显微镜监视下显色,自来水充分冲洗终止反应,苏木素复染,脱水,透明,封片。>10% 的病变细胞的细胞核出现棕黄色颗粒定为阳性。设有阳性和阴性对照(以 PBS 代替一抗为阴性对照)

统计学处理 χ^2 检验。

2 结果

各组病变的食管组织 p16 蛋白免疫组化染色结果见表 1。

表 1 各组病变食管组织 p16 蛋白免疫组化染色结果

组织学类型	n	+	-	阳性率(%)
正常组	28	17	11	60.7
单纯增生	30	24	6	80
不典型增生				
轻度	31	21	10	67.7
中度	31	20	11	64.5
重度	24	20	4	83.3
癌				
原位癌	30	15	15	50
侵袭癌	19	4	15	21.1

经 χ^2 检验,正常组与侵袭性鳞状细胞癌组、重度不典型增生与侵袭性鳞状细胞癌组 p16 蛋白的表达有显著性差别($P < 0.01$),其他各二组 p16 蛋白的表达无显著性差别($P > 0.01$)。

对 30 例食管腺癌 p16 蛋白免疫组化染色的结果显示:12 例腺癌细胞胞质呈现棕黄色颗粒。

3 讨论

研究认为,肿瘤发生的根本原因在于基因组的不稳定性,细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 和 $G_2 \rightarrow M$ 期这两个“关卡”的失控,有可能使本来应停止增生或生理性 DNA 受损或 DNA 复制发生错误的细胞不停地进入细胞周期,造成细胞恶性增生,细胞周期调节失控是癌变的重要原因。

p16 蛋白能使细胞阻滞于 G₁ 期, 对细胞周期进行有序调控, 确保基因组 DNA 的稳定性. p16 的缺失或失活都有可能促使细胞癌变, 导致肿瘤的发生发展和恶化^[2-6].

自 Kamb et al^[3]发现 p16 基因位于 9p21 以来, 许多实验和多种人类肿瘤的研究证实存在 p16 基因的异常表达和缺失^[7-10]. 用 p16 转染有 p16 缺失的肿瘤细胞株, 肿瘤细胞的生长受到抑制^[11].

本研究结果发现: p16 蛋白在正常食管黏膜鳞状上皮中表达为散在弱阳性, 在单纯增生和不典型增生中 p16 蛋白表达多为散在阳性和强阳性, 即表达强度逐渐增加; 但在侵袭性鳞癌中表达强度减弱或呈现阴性. 这说明鳞状上皮发生增生性改变时, p16 蛋白的表达也随之发生变化. 由此可见, p16 蛋白对细胞增生起着重要的抑制作用, 而这种抑制作用的减弱, 最终导致细胞发生癌变. p16 蛋白缺失可能是食管不典型增生向食管鳞状细胞癌过渡的重要环节. 在食管腺癌中, p16 的阳性表达出现在细胞质, 且阳性表达的肿瘤细胞多分化不好, 这可能由于 p16 蛋白在细胞质的积聚和肿瘤的分化程度有关, 而与 p16 基因的改变无关. 因此开展对 p16 基因的研究, 对揭示肿瘤的发生发展规律有重要意义.

4 参考文献

- 1 郭山春, 廖松林. 多肿瘤抑制基因与肿瘤. 国外医学生理病理与临床分册 1997;17:160-162
- 2 Sherr CJ. Mammalian G₁ cyclins. *Cell* 1993;73:1059-1065
- 3 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshan K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genes of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440
- 4 Serrano M, Hanno GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin-CDK₄. *Nature* 1993;366:704-707
- 5 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitor come of age. *Cell* 1994;79:573-582
- 6 Marx J. New tumor suppressor may rival p53. *Science* 1994;264:344-345
- 7 Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 1998;34:396-403
- 8 Kratzke RA, Otterson GA, Lincoln CE, Ewing S, Oie H, Geradts J, Kaye FJ. Immunohistochemical analysis of the p16INK4 cyclin-dependent kinase inhibitor in malignant mesothelioma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1870-1875
- 9 Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JW, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995;55:2713-2718
- 10 Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, Hommura F, Kawakami Y. Altered p16INK4 and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1996;56:5557-5562
- 11 Arap W, Nishikawa R, Furnari FB, Cavenee WK, Huang HJ. Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 1995;55:1351-1354

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因素、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度“百种中国杰出学术期刊”称号.

内镜下胃癌活检标本 PCNA 的表达及意义

吴华星 赵玉兰 潘林娜 武春龙 冯占军

吴华星,潘林娜,武春龙,哈尔滨医科大学第三临床医院腔镜室
黑龙江省哈尔滨市 150040
赵玉兰,冯占军,哈尔滨医科大学第三临床医院病理科
黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人:吴华星,150040,黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学第三临床医院腔镜室.
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-21

摘要

目的:探讨内镜下胃癌活检标本增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear/PCNA)的表达及其对判断胃癌进展与预后的意义.

方法:55例胃癌患者胃镜下活检标本进行免疫组化染色法检测 PCNA.

结果:PCNA 标记指数与肿瘤浸润深度之间有显著性差异 ($P < 0.05$),与组织学类型、淋巴结转移之间均无显著性差异 ($P > 0.05$).PCNA 与胃癌 pTNM 分期之间有显著性差异 ($P < 0.05$),与胃癌胃镜下 Borrmann 分型之间无显著性差异 ($P > 0.05$).PCNA 低表达者术后 5 a 生存率为 68.4 % (13/19),显著高于 PCNA 高表达者术后 5 a 生存率 33.3 % (12/36) ($P < 0.05$).

结论:本研究结果提示 PCNA 与胃癌浸润深度、器官转移和肿瘤分期具有相关性,是一种有效判断胃癌的预后指标.

吴华星,赵玉兰,潘林娜,武春龙,冯占军.内镜下胃癌活检标本 PCNA 的表达及意义.世界华人消化杂志 2003;11(1):92-93
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/92.htm>

0 引言

胃癌是最常见的癌肿之一,据统计占我国消化道恶性肿瘤的第一位,目前多数研究均基于手术切除的胃癌标本,不能对术前和失去手术机会的胃癌患者作出相应的预后判断.我们探讨内镜下胃癌活检标本 PCNA 的表达情况,为术前评估胃癌的预后,为临床确定手术范围及合理的治疗方案提供理论根据.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌患者 55 例,男 44 例,女 11 例,29-80 岁,以 50-60 岁为最多,占 67.3 % (37/55).此 55 例胃癌患者均在术前做胃镜检查,并取活检,并且均进行了手术切除.

1.2 方法 本实验采用北京中山生物技术有限公司提供的 SP 试剂盒,全称为过氧化物标记的链霉卵白素 (streptavidin/peroxidase) 染色试剂盒.采用常规 SP 免疫组化法测量 PCNA. 结果观察:PCNA 的阳性着色区域常位于细胞核的边缘,呈偏心分布.采用 PCNA 标记指数 (PCNA Labeling index, PCNA LI) 对胃癌的生

物学行为和增生活性进行判断.PCNA LI 是计数 1 000 个肿瘤细胞中阳性细胞所占的百分比.结果判断标准:PCNA 阳性细胞 1-25 % 为 " - ", 26-50 % 为 " + ", > 51 % 为 " ++ ".

统计学处理 PCNA 数据采用 χ^2 检验进行统计学分析.胃癌患者生存曲线采用 Kaplan-Meier 法绘制.

2 结果

2.1 55 例胃癌患者免疫组化染色结果 PCNA 阳性细胞 1-25 % 为 " - ", 本组 7 例;26-50 % 为 " + ", 本组 13 例; > 51 % 为 " ++ ", 本组 35 例.

2.2 PCNA 与胃癌的浸润深度、组织学类型、淋巴结转移、pTNM 分期、胃镜下 Borrmann 分型之间的关系 PCNA 标记指数与肿瘤浸润深度之间有显著性差异 ($P < 0.05$),与组织学类型之间无显著性差异 ($P > 0.05$),与淋巴结转移之间无显著性差异 ($P > 0.05$);PCNA 与胃癌 pTNM 分期之间有显著性差异 ($P < 0.05$),与胃癌胃镜下 Borrmann 分型之间无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1).

表 1 胃癌肿瘤浸润深度、组织学类型、淋巴结转移、pTNM 分期、胃镜下 Borrmann 分型与 PCNA 的关系

	n	PCNA			高表达率 (%)	χ^2	P
		-	+	++			
浸润深度							
黏膜层	3	0	2	1	33.3		
浅肌层	6	1	3	2	33.3		
深肌层	18	2	4	12	66.7		
浆膜层 / 浆膜外	28	4	4	20	71.4	6.27	<0.05
组织学类型							
高分化腺癌	1	0	1	0	0		
中分化腺癌	16	0	3	13	81.2		
低分化腺癌	34	6	8	20	58.8		
黏液腺癌	4	1	1	2	50.0	7.59	>0.05
淋巴结转移							
N ₀	18	2	6	10	55.5		
N ₁	2	1	1	0	0		
N ₂	19	2	3	14	73.7		
N ₃	16	2	3	11	68.8	1.49	>0.05
pTNM 分期							
I	11	0	7	4	36.4		
II	12	3	2	7	58.3		
III	16	2	3	11	68.8		
IV	16	2	1	13	81.3	15.0	<0.025
胃镜下 Borrmann 分型							
I	1	0	0	1	100		
II	13	2	2	9	69.2		
III	26	4	7	15	57.7		
IV	13	1	2	10	76.9	5.32	>0.05

2.3 PCNA 与胃癌远处转移之间的关系 肝、腹膜等远处转移者 12 例, 其中“++”11 例,“-”1 例, PCNA LI 指数高表达阳性率为 91.7% (11/12).

2.4 PCNA 与胃癌的预后的关系 PCNA 低表达(<50%) 术后 5 a 生存率为 68.4% (13/19), 显著高于 PCNA 高表达者(>50%) 术后 5 a 生存率 33.3% (12/36) ($P < 0.05$) (图 1).

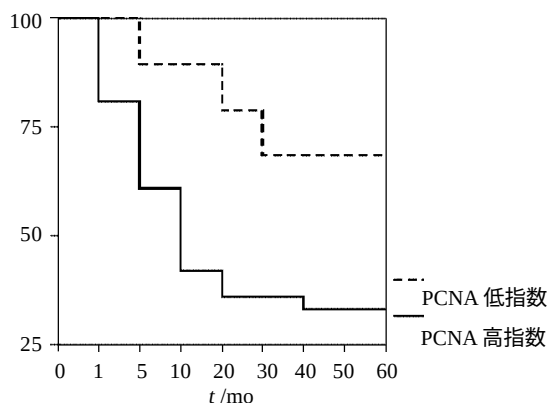


图 1 55 例胃癌患者生存曲线(kaplan - meier 法)

3 讨论

PCNA 是与细胞增生周期有关的周期蛋白, 是一种较好的判断细胞增生状态的标记^[1]. PCNA 在增生细胞中的含量变化有明显的周期性, 在 G_0 期基本无表达, G_1 晚期开始增加, 至 S 中期达到高峰, G_2 -M 期迅速降低^[2]. 因此, 检测 PCNA 主要反映细胞处于 S 期(DNA 合成期)的情况, PCNA 表达状况是反映细胞增生能力的重要指标^[2].

Maeda et al^[3]报道, 在对 189 例胃癌的检测中, 有肝转移、腹膜转移、淋巴结转移和血管浸润者的 PCNA LI 均显著高于无肝转移、腹膜转移、淋巴结转移和血管浸润者, 并观察到随胃癌浸润深度的增加, PCNA LI 呈明显上升趋势. Maeda et al^[4]又对 108 例行胃癌根治术患者标本进行免疫组化研究, 结果表明浆膜浸润者(42 例)平均 PCNA LI(48.5%)显著高于无浆膜浸润者(66 例, 35.5%). 本实验研究显示 PCNA 标记指数与肿瘤浸润深度之间有显著性差异($P < 0.05$) (表 1), 与这些研究相一致. 提示随着胃癌浸润深度的增加, PCNA 呈明显上升趋势. Yonemura et al^[5]对 121 例胃癌术前内窥镜下活检标本进行研究表明, 腹膜转移、浆膜浸润、淋巴结转移和肿瘤 ≥ 6 cm 者 PCNA LI 均显著高于无腹膜转移、浆膜浸润、淋巴结转移和肿瘤 < 6 cm 者. 本实验结果显示肝、腹膜等远处转移者 12 例, 其中 PCNA 高表达者“++”11 例,“-”1 例, PCNA LI 指数高表达阳性率为 91.7% (11/12), 与文献相符. 认为 PCNA LI 的增高与肿瘤的增长速度有关, 其结果提示了病变的进展程度.

PCNA LI 与胃癌的预后明显相关, 较高的 PCNA LI 倾向于较差的预后. Jain et al^[6]对 93 例胃癌术后标本进行免疫组化研究, 结果表明, 高 PCNA LI 组(高于 40%)与低 PCNA LI 组(低于 40%)的 5 a 生存率分别为 26%

和 65% ($P < 0.02$). Mori et al^[7]对 138 例胃癌进行研究表明, 高 PCNA LI 组 5 a 生存率 (5.8%) 低于低 PCNA 组 (66.2%) ($P < 0.01$). Maeda et al^[3]对 152 例行胃癌切除术胃癌患者进行分析表明, 高 PCNA 组(LI 大于 50%)患者预后显著差于低 PCNA 组(LI 大于 50%), 低 PCNA 组 5 a 生存率为 90.5%, 而高 PCNA 组 5 a 生存率为 40.0%. Maeda et al^[4]又对 108 例胃切除术患者进行分析表明, 低 PCNA 组(LI 低于 42%)患者 5 a 生存率为 86.9% (53/61), 高 PCNA 组(LI 高于 42%)患者 5 a 生存率为 55.8% (26/47), 二者差异显著($P < 0.01$). 国内学者也证实, 胃癌低 PCNA 组(小于 35.6%)患者 5 a 生存率(78.0%)显著高于高 PCNA 组(大于 35.6%) 5 a 生存率(11.3%) ($P < 0.01$)^[8]. 本实验结果显示 PCNA 低表达(<50%) 术后 5 a 生存率为 68.4% (13/19), 显著高于 PCNA 高表达者(>50%) 术后 5 a 生存率 33.3% (12/36), 二者差异显著($P < 0.05$) (图 1). 以上这些结果表明, 胃癌的预后与肿瘤自身的增生活性有关. 因而, 认为 PCNA 是一种有用的预后标记物, 能反映肿瘤细胞的生物恶性程度.

Inada et al 对 107 例胃腺癌进行免疫组化研究表明, PCNA 与胃癌的组织类型无明显关系, 但与其分化程度有关. Jain et al^[6]对 93 例胃癌进行免疫组化研究表明, PCNA LI 与肿瘤组织类型和分化程度无明显关系. Maeda et al^[3]对 189 例经胃镜、病理活检证实为胃癌的标本进行免疫组化研究, 结果表明 PCNA LI 与胃癌组织类型和分化程度无明显的关系. 本实验结果显示 PCNA LI 与胃癌组织类型和分化程度无明显的关系, 与文献相符.

总之, PCNA 作为一个内源性增生细胞的标记物, 与胃癌组织的生长活性, 胃癌的转移及预后关系密切, PCNA 可作为一种预测指标用于胃癌的动态观察及预后判定, 具有重要意义.

4 参考文献

- 1 Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997; 14: 629-640
- 2 戴林. 增生细胞核抗原与胃癌. 国外医学 消化系统疾病分册 1996; 16: 3-5
- 3 Maeda K, Chung YS, Onoda N, Kato Y, Nitta A. Proliferating cell nuclear antigen labeling Index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special Reference to prognosis. *Cancer* 1994; 73: 528-533
- 4 Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indications in gastric carcinoms. *Br J Cancer* 1995; 72: 319-323
- 5 Yonemura Y, Kimura H, Fushida S, Tagawa K, Nakai Y. Analysis of proliferative activity using Anti-proliferating cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopic biopsy. *Cancer* 1993; 71: 2448-2453
- 6 Jain S, Filipe MI, Hali PA, Waseem N, Lane DP, Levison DA. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1991; 44: 655-659
- 7 Mori M, Kakeji Y, Adachi Y. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in clinical gastric cancer. *Surgery* 1993; 113: 683-690
- 8 季峰, 彭清壁, 朱有法, 周初, 黄怀德. 胃癌中 c-erbB-2 及 PCNA 的表达. 临床实验病理学杂志 1998; 14: 207

幽门螺杆菌感染者胃上皮细胞凋亡与维生素C 之间的关系

晏楠,吕农华,陈江

晏楠,北京市263医院消化内科 北京市 101149
吕农华,陈江,江西医学院第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
项目负责人:晏楠,101149,北京市,北京263医院消化内科. yn1992@sohu.com
收稿日期:2002-08-06 接受日期:2002-10-03

摘要

目的:研究幽门螺杆菌(Hp)感染者细胞凋亡与胃液维生素C (VitC) 含量之间的关系。

方法:用切口末端标记法(TUNEL)对Hp阳性的十二指肠球部溃疡(DU)、胃溃疡(GU)、癌前病变、胃癌患者以及组织学上正常的Hp阴性者各10例的胃黏膜活检组织进行细胞凋亡检测,并测定其胃液中的 VitC 含量。

结果:细胞凋亡从Hp阳性的十二指肠溃疡→胃溃疡→癌前病变→胃癌→Hp阴性的正常组织逐渐减少,凋亡指数分别为17.5%、15.1%、9.2%、5.1%、2.5%。除胃溃疡与球部溃疡之间无统计意义外($P > 0.05$),其他各组之间相互比较的差别均有统计学意义($P < 0.05$)。VitC含量从正常组织(34.8 ug/ml)→十二指肠溃疡(18.6 ug/ml)→胃溃疡(16.5 ug/ml)→癌前病变(11 ug/ml)→胃癌(6.2 ug/ml)逐渐下降;除DU与GU组之间无统计意义外,其他各组之间相互比较的差别均有统计学意义($P < 0.01$)。HP根除以后细胞凋亡显著下降, VitC 含量明显增高至正常水平。HP阳性的十二指肠溃疡、胃溃疡细胞凋亡指数与VitC含量呈显著负相关($P < 0.05$),而癌前病变组和胃癌组,细胞凋亡指数与VitC含量之间均无显著相关性($P > 0.05$)。

结论:上述结果提示(1) Hp感染可能诱导胃上皮细胞凋亡,并使胃液 VitC 含量减少,使机体失去对 VitC 的保护作用,这可能是 Hp 导致胃癌的机制之一,补充 VitC 可能有助于预防胃癌的发生;(2)在Hp感染早期,胃液 VitC 含量的减少可能促进胃上皮细胞凋亡。因此,根除 Hp 使胃腔 VitC 浓度升高,以减少细胞凋亡可能有助于预防胃癌的发生。

晏楠,吕农华,陈江.幽门螺杆菌感染者胃上皮细胞凋亡与维生素C 之间的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(1):94-96
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/94.htm>

0 引言

目前有多项研究认为 Hp 感染能诱导胃上皮细胞的凋亡,但其机制目前尚不十分清楚,有证据表明 Hp 感染能引起胃液 VitC 含量的减少,而胃液 VitC 的减少被认为胃癌发生的重要机制之一。在目前有关 Hp 感染中二者是否有关的国内外研究甚少,本研究旨在探讨二

者之间的关系,并分析其在胃癌发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验组为 Hp 阳性的胃癌患者10例、Hp 根除前后的十二指肠球部溃疡和胃溃疡各10例、病理证实有萎缩性胃炎伴不完全大肠化生或者不典型增生等癌前病变者共10例,对照组为胃黏膜组织学正常的 Hp 阴性者10例。所有病例在进入实验前1 mo 内均未接受抗生素或其他非甾体类抗炎药物的治疗。Hp的根除治疗采用三联疗法(洛塞克 20 mg 1次/d、阿莫仙 0.5 g 3次/d、灭滴灵 0.2 g 3次/d 共2 wk),停药至少4 wk 后复查胃镜。

1.2 方法

1.2.1 组织标本 经胃镜取胃窦部黏膜活检组织作 Hp 的检测,如尿素酶试验均阳性,细菌培养和组织学检查(Giemsa 染色)2项至少1项阳性者判断为 Hp 感染,3项检查均为阴性者判断为 Hp 根除。同时在活检前取胃液5 mL 作 VitC 等检测,如混有血液或有胆汁反流者弃用。胃液离心 20 min, 3 000 rpm, 取上清液置 -20 °C 待测。

1.2.2 细胞凋亡检测采用切口末端标记法(TUNEL) 试剂为德国原装进口宝灵曼产品(Cat.No.1684817)具体操作按说明书。细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。每张切片至少观察5个连续视野,每个视野计数100个上皮细胞中的凋亡细胞数,以平均数为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.2.3 VitC 的测定 试剂为南京建成生物工程研究所产品。操作步骤按说明。

统计学处理 方差分析,配对 t 检验, Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 Hp 感染与细胞凋亡

2.1.1 实验组与对照组细胞凋亡指数比较 与 Hp 阴性的正常者相比, Hp 阳性的 DU、GU、癌前病变及胃癌患者的细胞凋亡指数明显增加(表1)。

表1 Hp 阳性的实验组与 Hp 阴性的对照组 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AI
十二指肠球部溃疡组	10	17.5 ± 5.2 ^b
胃溃疡组	10	15.1 ± 4.4 ^b
癌前病变组	10	9.2 ± 3.2 ^b
胃癌组	10	5.1 ± 1.6 ^a
正常对照组	10	2.5 ± 0.7

组间比较 $F = 36.7, P < 0.01$, 进一步 q 检验结果:与对照组比较, $q > 7.6, {}^b P < 0.01$, $q = 3.42, {}^a P < 0.05$. 各实验组两两比较 $q > 4.48, P < 0.01$.

2.1.2 Hp 根除前后 AI 比较 Hp 根除以后细胞凋亡指数有显著下降(表 2).

表 2 Hp 根除前后 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗后
十二指肠球部溃疡组	17.5 $\pm$ 5.2	3.3 $\pm$ 1.0 ^b
胃溃疡组	15.1 $\pm$ 4.4	3.7 $\pm$ 1.1 ^b
癌前病变组	9.2 $\pm$ 3.2	3.9 $\pm$ 1.8 ^b

根除后 $t > 6.5$, $P < 0.01$.

2.2 Hp 感染与 Vit C

2.2.1 Hp 阳性的各实验组与 Hp 阴性的正常对照组 Vit C 水平比较 Hp 阳性的各实验组 VitC 水平明显低于 Hp 阴性的正常对照组(表 3).

表 3 各实验组与对照组 VitC 水平($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

组别	VitC 浓度
十二指肠溃疡组	18.6 $\pm$ 5.3
胃溃疡组	16.5 $\pm$ 4.2
癌前病变组	11.0 $\pm$ 2.4
胃癌组	6.2 $\pm$ 2.9
正常对照组	34.8 $\pm$ 7.8

各组间比较 $F = 48.87$, $P < 0.01$, 进一步 q 检验结果:与对照组比较, $q > 10.4$, P 均 < 0.01 .

2.2.2 Hp 根除前后胃液 Vit C 浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)比较 Hp 根除以后 VitC 浓度明显恢复到接近正常水平(表 4).

表 4 Hp 根除前后胃液 VitC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)浓度之间的相互比较

组别	治疗前	治疗后
十二指肠溃疡组	18.6 $\pm$ 5.3	33.5 $\pm$ 7.4
胃溃疡组	16.5 $\pm$ 4.2	31.4 $\pm$ 9.4
癌前病变组	11.0 $\pm$ 2.4	26.5 $\pm$ 10.8

根除前后比较, $t > 4.58$, $P < 0.01$.

2.3 Hp 阳性的各实验组 AI 与 VitC 之间的关系 在 Hp 感染的十二指肠溃疡组、胃溃疡组 AI 与 VitC 呈显著负相关($r = -0.7$ 及 -0.75 , $P < 0.05$),而癌前病变组和胃癌组 AI 与 VitC 之间无明显相关性($r = -0.55$ 及 -0.55 , $P > 0.05$).

3 讨论

3.1 Hp 感染与细胞凋亡之间的关系 从慢性胃炎 $\rightarrow$ 肠化 $\rightarrow$ 不典型增生 $\rightarrow$ 胃癌的演变过程是肠型胃癌发生的规律,而 Hp 感染可能是这一过程的始动因子^[1]. Hp 的感染在其他致癌因素(如宿主因素及多种环境因素等)共同作用下促使正常胃黏膜细胞向癌细胞转化.近年来

的研究表明肿瘤的发生不但与细胞的过度增生有关,而且与细胞的过度抑制有关,多数学者认为 Hp 引起的胃黏膜上皮细胞动力学改变即细胞凋亡和增生变化可能在胃十二指肠疾病的发生过程中起着非常重要的作用.

本研究证实:Hp 阴性者细胞凋亡的发生很少,且仅见于胃黏膜的浅层,而 Hp 感染者细胞凋亡显著增加,不仅见于黏膜浅层,而且在黏膜深层甚至固有层也可发生.这与国内外的研究一致^[2-4]. Hp 根除以后细胞凋亡的发生显著减少,从胃十二指肠溃疡 $\rightarrow$ 肠化或不典型增生 $\rightarrow$ 胃癌细胞凋亡指数呈现逐渐减少的趋势,这一结果符合胃癌发生的理想模式,提示 Hp 感染与胃上皮细胞凋亡增加有关,大量的细胞凋亡可能是 Hp 感染致胃十二指肠疾病的形成机制^[5].胃黏膜上皮细胞增生和凋亡的失衡^[6,7]以及宿主在 Hp 感染时的胃酸分泌状态可能决定 Hp 感染后的最终结果^[8,9].如果细胞凋亡活跃,细胞增生减少,宿主胃酸分泌高,则可能形成十二指肠溃疡,若此时宿主胃酸分泌低则可能形成萎缩性胃炎、胃溃疡,如果细胞增生活跃,凋亡减少,宿主胃酸分泌过低, DNA 复制错误增多则易发生细胞累积性疾病如恶性病变.随着 Hp 的根除,细胞凋亡明显减少,溃疡愈合速度明显加快,而 Hp 未根除者细胞凋亡无明显改变,溃疡愈合率明显降低.通过对 Hp 进行干预性治疗以减少细胞凋亡的发生,可能有利于提高 Hp 相关性胃十二指肠疾病的治愈率,降低其复发率,最终可能减少胃癌的发生.

我们对 200 多例 Hp 感染的十二指肠溃疡、胃溃疡、萎缩性胃炎伴肠化或不典型增生患者使用三联疗法根除 Hp,其总的根除率为 80 %,与国内外报道基本一致^[10-12].对于经济条件不发达地区把洛赛克 20 mg 2 次/d 减为 1 次/d,同时适当延长抗生素的用药时间也不失为一种有效而经济的根除 Hp 的治疗方案.对 Hp 阳性的 10 例胃癌患者的凋亡指数进行进一步的分析,发现 3 例分化程度较好的患者比 7 例分化程度差的患者的细胞凋亡指数高(平均凋亡指数为 6.8 % vs 4.4 %),这可能反映分化好的胃癌细胞自然生长缓慢的特征,分化差的胃癌可能存在着细胞凋亡逃避机制^[13-16].

3.2 Hp 感染与 VitC 之间的关系 VitC 是一种重要的抗氧化剂,他对胃黏膜具有抗氧化性保护作用.研究表明,人的正常胃黏膜具有分泌 VitC 的生理功能,使其胃液浓度高于血浆浓度,而 Hp 感染可能抑制胃黏膜分泌 VitC,使胃液 VitC 的浓度减少^[17-20].

本研究表明,在 Hp 阴性的正常组织其胃液 VitC 的浓度较高,而在 Hp 阳性的十二指肠溃疡、胃溃疡、癌前病变以及胃癌患者中, VitC 浓度很低且依次递减, Hp 根除以后 VitC 浓度基本恢复至正常水平.这一结果提示胃液 VitC 的减少与 Hp 感染有关,胃液 VitC 的减少可能是胃癌发生的重要因素. Hp 感染何以使胃液 VitC

减少的机制目前尚不十分清楚,有研究表明 CagA+ 菌株感染者胃液 VitC 的浓度明显低于 CagA- 菌株感染者^[22,23],这可能由于 CagA + 菌株致胃炎程度较重所致。由于 Hp 感染可能使空腹胃酸减少,又可引起中性粒细胞、巨噬细胞的浸润,从而使抗坏血酸氧化能力增强,这可能是 Hp 致胃液 VitC 减少的重要机制。在 Hp 根除以后,随着空腹胃酸的增高、炎症反应的减轻, VitC 浓度逐渐恢复到正常水平,可能有利于胃黏膜的修复过程,甚至有可能预防胃癌的发生。

3.3 细胞凋亡与 VitC 之间的关系 由于 VitC 是一种重要的抗氧化剂,可以与亚硝酸盐反应阻止内源性 N-硝基化合物的形成,从而阻止氧化 DNA 的损伤和突变,因此有可能阻止细胞凋亡的发生。

本研究发现 Hp 阳性的十二指肠溃疡、胃溃疡患者中细胞凋亡与 VitC 的浓度呈负相关 (r 值分别为 -0.7、-0.75),而癌前病变和胃癌患者其细胞凋亡与 VitC 之间无明显相关性 ($P > 0.05$)。我们推测在 Hp 感染的早期, VitC 浓度的减低使胃黏膜失去 VitC 的保护作用而使受损的 DNA 增多,从而引起细胞凋亡显著增加,随着病理演变进一步发展,由于机体免疫机制遭到破坏,抗凋亡蛋白增多,细胞增生加强,受损的细胞可能逃避细胞凋亡机制,而使细胞凋亡呈代偿性减少。通过根除 Hp 以提高胃液 VitC 的浓度有望逆转或阻断胃黏膜细胞的恶性转化。有研究表明单用 VitC 可能减少细胞凋亡的发生^[24,25]。因此,我们认为在 Hp 根除时适当补充 VitC 可能有利于减少 DNA 的损伤,有助于机体免疫功能的恢复,补充 VitC 可作为抗 Hp 的辅助治疗措施^[26]。

总之,通过 Hp 的成功根除,胃黏膜上皮细胞的凋亡显著减少,而胃液 VitC 的浓度恢复至正常水平,因此我们有理由认为根除 Hp 对预防胃癌的发生有着潜在而重要的作用。

4 参考文献

- Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric Carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19:S37-43
- 卢世云,潘秀珍,彭孝伟,施作霖. 幽门螺杆菌感染与胃上皮细胞增生和凋亡. *世界华人消化杂志* 1999;7:760-762
- 姚金锋,姚希贤. 慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌感染的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:1042-1045
- Kato K, Ohara S. Alteration of cellular turnover in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2002;35:312-314
- Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implication in gastric Carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:16-26
- Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharis S, Karameris A, Raptis S. Relationship of *Helicobacter pylori* Cag A status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig Dis Sci* 1999;44:487-493
- Anti M, Armuzzi A, Iacone E, Valenti A, Lippi ME, Covino M, Vecchio FM, Pierconti F, Buzzi A, Pignataro G, Bonvicini F, Gasbarrini G. Epithelial-cell apoptosis and proliferation in *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:153-159
- McColl KE, El-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:687-703
- McColl KE, El-Omar E, Gillen D. Interactions between *Helicobacter pylori* infection, gastric-acid secretion and anti-secretory therapy. *Bri Med Bull* 1998;54:121-138
- Kiyota K, Habu Y, Sugano Y, Inokuchi H, Mizuno S, Kimoto K, Kawai K. Comparison of 1-week and 2-week triple therapy with omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin in peptic ulcer patients with *Helicobacter pylori* infection: results of a randomized controlled trial. *J Gastroenterol* 1999;34(supple 11):76-79
- Houben MH, Hensen EF, Rauws EA, Hulst RW, Hoff BW, Ende AV, Kate FJ, Tytgat GN. Randomized trial of omeprazole and clarithromycin combined with either metronidazole or amoxicillin in patients with metronidazole-resistant or susceptible *Helicobacter pylori* strains. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:883-889
- Savarino V, Zentilin P, Bisso G, Pivari M, Mele MR, Mela GS, Mansi C, Vigneri S, Termini R, Celle G. Head-to-head comparison of 1-week triple regimens combining ranitidine or omeprazole with two antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13: 643-649
- 林静,王超,景燕,庞有成,杨红,乔进朋,陈勃,姚希贤. 胃癌组织中内分泌细胞的表达及与细胞凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1054-1055
- 申兴斌,赵晓明,胡建功,金小平,王军. 胃癌组织中细胞凋亡及 PCNA 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1050-1052
- 刘海峰,刘为纹,房殿春. 胃癌前病变及胃癌中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:649-651
- Masutani M, Suzuki J, Matsuda T, Dochin A, Sadaoka K, Nomura A, Ohira K, Takahashi K, Yamazaki K, Dosaka A, Kita H, Nishimura M, Kawakami Y. Increased apoptosis associated with depressed type of early intestinal gastric cancer. *Jhn J Cancer Res* 2001;92:1214-1219
- Phullp S, Price AB, White KL, Schorah CJ, Jacyna MR. Gastrointestinal mucosal vitamin C levels in *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:361-366
- Woodward M, Tunstallpedoe H, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection reduces systemic availability dietary vitamin. *C Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:233-237
- Zhang ZW, Patchett SE, Perret D, Katelari S, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric Vitamin C concentrations, mucosal histology and cag A seropositivity in human stomach. *Gut* 1998; 43:322-32
- Kockar C, Ozturk M, Bavbek N. *Helicobacter pylori* eradication with beta-carotene, ascorbic acid and allicin. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2001;44:97-100
- Reed PI. Effects of high dose vitamin C treatment on *Helicobacter pylori* infection and total vitamin C concentration in gastric juice. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:449-454
- Zhang ZW, Patchett SE, Perrett D, Katelari S, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric vitamin C concentrations, mucosal histology, and Cag A seropositivity in human stomach. *Gut* 1998;43:322-326
- Rokkas T, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Karameris A, Ladas SD, Raptis SA. Relationship of *Helicobacter pylori* Cag+ status to gastric juice vitamin C levels. *Eur J Invest* 1999;29:56-62
- Zhang ZW, Abdullahi M, Farthing MJ. Effect of physiological concentrations of vitamin C on gastric cancer cells and *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:165-169
- Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Eonathan ETH, Mera R, Miller MJL, Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter Pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* 1996;56: 3238-3243
- Safranow K, Korzone KM, Szmatloch E, Rzeuski R, Sulzy C, Bielicka V. Vitamin C and uric acid concentrations in plasma and gastric mucosa in patients regularly consuming vegetables, fruits and fruit juices. *Pol Arch Med Wewn* 2001;105:383-389

综合法 X 线造影在数字胃肠检查中的应用

何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文

何发清, 官泳松, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041
王小林, 郭兵文, 射洪县人民医院放射科 四川省射洪县 629200
项目负责人: 官泳松, 610041, 四川省成都市国学巷 37 号, 四川大学华西医院.
yongsongguan@yahoo.com
收稿日期: 2002-09-13 接受日期: 2002-10-18

摘要

目的: 介绍和评价综合法 X 线造影在数字胃肠检查中的应用.

方法: 563 例有上消化道症状的患者, 采用本法获得一放射学诊断, 然后通过随访观察、电子胃镜和 / 或外科手术及病理结果对此诊断进行验证.

结果: 总阳性检出率 90.9 %, 有恶性肿瘤、溃疡、炎症等. 上消化道癌检出率 25.4 %.

结论: 综合法 X 线造影在数字胃肠检查中的应用特别是对于早癌的检出具有重要价值.

何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文. 综合法 X 线造影在数字胃肠检查中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(1):97-98
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/97.htm>

0 引言

我们使用大型数字胃肠机, 运用综合法 X 线造影检查 563 例上消化道患者, 效果良好.

1 材料和方法

1.1 材料 563 例, 年龄 7-84 岁. 主要症状: 轻重不一的上腹部疼痛不适、腹胀, 部分病例有吞咽梗阻或呕血、黑便史. 日立 TU-130XF 80 kw 数字胃肠机, 柯尼卡 Li-10A 激光像机, DF-3 硫酸钡剂, 产气剂, 激光胶片.

1.2 方法

1.2.1 检查方法 患者作胃肠道准备后, 取产气粉 3 g 用 10 mL 温开水服下, 15-20 s 后, 以左或右前站立位取 200-220 %W/V 硫酸钡混悬剂 20 mL 分二次吞下, 平置床台, 嘱患者快速翻身旋转 3-5 wk, 使钡液快速、反复涂抹黏膜表面, 较均匀地分布于黏膜及病变表面, 然后选择不同的体位进行分段、分区摄像, 取得良好双对比影像后, 于 20-30 min 后再口服 120-150 %W/V 的钡剂 50-80 mL 后作传统胃肠检查(充盈、加压法), 可在摄多帧图像后, 通过计算机进行数字化处理, 调节窗宽、窗位取得良好影像对比度和分辨率, 同时对病灶进行局部放大、大小测定、标识等处理, 进行选择打印(6-12 帧).

1.2.2 诊断标准^[1,2] 早癌, 依据日本 1972 年规定, 其定义为: 癌肿仅浸润黏膜及黏膜下层. 早期食管癌应无淋巴转移. 而胃早癌的癌肿大小、范围不受限制, 也不论有无淋巴转移. 国内有学者提出早癌病灶在 2 cm 以内, 无淋巴转移. 依浸润情况分为上皮癌(EP 癌)、黏膜癌(MM 癌)及黏膜下层癌(SM 癌), 大体病理分为 3 类: 平坦型、凹陷型、隆起型. 中晚期癌, 其定义: 癌肿侵入肌层或全层, 有周围组织浸润或和不同程度淋巴转移. 中晚期食管癌 X 线分型: 髓质型、蕈伞型、溃疡型、缩窄型、腔内型, 中晚期胃癌 X 线分型: 蕈伞型、溃疡型、浸润型、混合型.

2 结果

2.1 综合法 X 线造影征像 正常征像: 钡池、皱襞吻触、轨道现象、黏膜小区、黏膜像; 病变征像: 近地壁隆起 25 例、环圈征 57 例、雾滴征 21 例、多边征(白、毛、僵) 97 例、环圈征(远地壁溃疡)及近地壁溃疡(满、空穴相)即穴壁征 113 例、重叠白线 15 例、靶征 34 例、公牛眼征 17 例、悬滴白雾状影 15 例、坚板征 14 例、龛影 136 例、充缺 84 例、半月综合征 25 例等. 在 4 例早期胃小弯癌中发现双对比相中病灶局部黏膜皱襞破坏、消失、展平, 仅少量薄层钡剂涂布, 呈青石板样, 我们称之为“青石板征”.

2.2 综合法 X 线造影的检出率 在 563 例中, 正常或 / 和无器质改变 51 例, 上消化道癌 143 例, 其中早癌 23 例, 中、晚期癌 117 例, 多重原发 3 例, 溃疡 102 例, 息肉 18 例, 其他肿瘤 33 例^[3], 其他病变 43 例, 炎症 173 例, 总阳性检出率达 90.9 %, 上消化道癌检出率 25.4 %^[4,5].

2.3 性能指标 射洪县人民医院 1997 年以前一直作传统钡餐检查, 1997 年后开展双对比检查^[6,7]. 回顾性总结 1996 年度传统钡餐检查与 1999 年度双对比造影检查诊断结果, 对上消化道癌, 传统法检出率约为 10.9 %, 双对比为 22.4 %, 综合法为 25.4 %, 其中早癌在癌中检出率分别为 0 %、12.3 %、16.1 %, 说明双对比造影较传统钡餐检查对早期、细小病变的诊断有明显优势, 而综合法集二者之优点, 有效互补, 从而进一步提高诊断准确率.

欧美及日本等国^[8-12]由于经济发达, 已经开展精细法胃肠道检查, 其早癌检出率在临床手术中占 34.4 %, 而我国上海尚克中 et al^[13]已采取三步普查法: 电脑初筛、胃缩影检查、内镜活检, 在 17 623 例中, 检出 36 例癌, 其检出率为 2.04 %, 其中早癌 11 例, 占 30.56 %, 而

我们运用综合法诊断出23例经镜检、病理及手术证实的早癌,在143例癌肿中占16.1%^[14-16]。

3 讨论

仅侵及黏膜或黏膜下层的早期癌肿,其X线表现有时仅限于局部的黏膜及微小皱襞改变。本文所述数字胃肠机运用计算机数字化成像系统,对图像进行数字化处理,能够提高影像清晰度、分辨率,并可对病灶局部进行10倍放大,更能显示出细微改变,同时可多体位摄像,利于病变显示,从而提高了早癌的诊断率。本组诊断并得到临床手术及镜检病理证实的早癌共23例,其中2例漏诊病例属于早癌平坦型^[17],经内镜活检发现。在早癌诊断中,内镜有其优势,可相互弥补。

内镜^[18,19]对发现和诊断仅侵及黏膜的病变有较高的诊断价值,但对侵及黏膜下的病变、器官形态结构改变、功能改变及受腔外病变影响的改变等方面综合法更能作出定位、定形、定质、定性诊断,有利于临床治疗方案选择及定位。

我们在检查中对硫酸钡剂的浓度及剂量进行了对比研究,发现浓度在200~220%W/V、剂量控制在20mL为宜。因为钡剂较多则不能形成满意的双对比像及微小黏膜像,易掩盖细微病变,而这对于早期肿瘤^[20]的诊断却具有极高的价值。并且由于剂量过大,很快到达十二指肠,易于胃区重叠,造成假像,不利于诊断。而在产气剂的应用中,如何控制产气量大小对于囊腔扩张度的影响有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993:503-504
- 2 Kobayashi O, Sugiyama Y, Konishi K, Kanari M, Cho H, Tsuburaya A, Sairenji M, Motohashi H, Yoshikawa T. Benefit of screening for gastric cancer—a comparison of symptomatic and screened patients who underwent gastrectomy. *Gan Kagaku Ryoho* 2002;29:1753-1758
- 3 Perez MT, Cabello-Inchausti B, Castellano-Sanchez A, Kottiech S, Davila E, Willis I, Barkin J. Primary gastroesophageal-Ileal hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1534-1537
- 4 Abdullah BA, Gupta SK, Croffie JM, Pfefferkorn MD, Molleston JP, Corkins MR, Fitzgerald JF. The role of esophagogastroduodenoscopy in the initial evaluation of childhood inflammatory bowel disease: a 7-year study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:636-640
- 5 Peluso I I, Campolongo P, Valeri P, Romanelli L, Palmery M. Intestinal motility disorder induced by free radicals: a new model mimicking oxidative stress in gut. *Pharmacol Res* 2002;46:533-538
- 6 Culpan DG, Mitchell AJ, Hughes S, Nutman M, Chapman AH. Double contrast barium enema sensitivity: a comparison of studies by radiographers and radiologists. *Clin Radiol* 2002;57:604-607
- 7 Civelli EM, Gallino G, Mariani L, Cozzi G, Biganzoli E, Salvetti M, Gallo R, Belli F, Bonfanti G, Bertario L, Andreola S, Leo E. Double-contrast barium enema and computerised tomography in the pre-operative evaluation of rectal carcinoma: are they still useful diagnostic procedures? *Tumori* 2000;86:389-392
- 8 Egawa T, Hasuike Y, Takata N, Okamoto S, Okamura J, Igarashi T. Leiomyoma of the duodenum—a case report. *Hepatogastroenterology* 1991;38(Suppl 1):76-78
- 9 Van Eeden S, Quaedy PF, Taal BG, Offerhaus GJ, Lamers CB, Van Velthuisen ML. Classification of low-grade neuroendocrine tumors of midgut and unknown origin. *Hum Pathol* 2002;33:1126-1132
- 10 Adams S, Baum RP, Adams M, Wenisch HJ, Schumm-Draeger PM, Encke A, Usadel KH, Hor G. Clinical value of somatostatin receptor scintigraphy. Studies of pre- and intraoperative localization of gastrointestinal and pancreatic tumors. *Med Klin* 1997;92:138-143
- 11 Diculescu M, Iacob R, Iacob S, Croitoru A, Becleanu G, Popeneciu V. The importance of histopathological and clinical variables in predicting the evolution of colon cancer. *Rom J Gastroenterol* 2002;11:183-189
- 12 Rezzo R, Scopinaro G, Gambaro M, Michetti P, Anfossi G. Radioguided occult colonic lesion identification (ROCLI) during open and laparoscopic surgery. *Tumori* 2002;88:S19-22
- 13 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995:53-54
- 14 Gorman B, Reading CC. Imaging of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Semin Ultrasound CT MR* 1995;16:331-341
- 15 Kotsis T, Voros D, Paphiti A, Frangou M, Mallas E. Duodenal gangliocytic paraganglioma as a radiological moving defect. *Dig Surg* 2000;17:636-640
- 16 Chetty R, Sitti CW. Gastric adenocarcinoma—a perspective from Durban, KwaZulu-Natal. *S Afr J Surg* 2000;38:7-8
- 17 Tsuda S, Veress B, Toth E, Fork FT. Flat and depressed colorectal tumours in a southern Swedish population: a prospective chromoendoscopic and histopathological study. *Gut* 2002;51:550-555
- 18 Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med* 2002;346:1781-1785
- 19 Swaroop VS, Larson MV. Colonoscopy as a screening test for colorectal cancer in average-risk individuals. *Mayo Clin Proc* 2002;77:951-956
- 20 Muszbek N, Koncz T, V Hajdu P, Adany R. Economic evaluation of population-based mass screening for the early detection of cancer: a systematic review. *Magy Onkol* 2002;46:119-129

电子内镜、X线联合应用对恶性十二指肠梗阻的内支架介入治疗 5 例

武春龙, 吴华星, 潘林娜

武春龙, 吴华星, 潘林娜, 哈尔滨医科大学第三临床医学院
黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 武春龙, 150040, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第三临床医学院.
收稿日期: 2002-05-07 接受日期: 2002-06-25

摘要

目的: 探讨电子内镜、X线联合应用对恶性十二指肠梗阻患者行十二指肠内支架介入治疗的临床效果。

方法: 采用 CV-200 系列电子胃镜, 在 X 线的协助下对 5 例恶性十二指肠梗阻的患者行十二指肠内支架介入治疗。

结果: 采用胃镜介入治疗的 5 例患者中, 成功 4 例, 失败 1 例, 成功率 80 %。

结论: 电子内镜、X线联合应用对恶性十二指肠梗阻患者行内支架介入治疗, 是一种有效的治疗手段, 尤其适用于老年人及单纯 X 线下介入治疗失败的患者。

武春龙, 吴华星, 潘林娜. 电子内镜、X线联合应用对恶性十二指肠梗阻的内支架介入治疗 5 例. 世界华人消化杂志 2003; 11(1): 99
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/99.htm>

0 引言

近十年来, 内镜技术在胰腺疾病治疗中日益成熟, 具有安全、简便, 并发症少等优点, 已成为胰腺疾病治疗的重要手段之一, 使胰腺疾病的微创治疗进入一个新阶段. 2001-03/2002-04, 共收治 5 例十二指肠降部恶性梗阻患者, 行内镜、X 线下联合内支架介入治疗. 现报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 5 例患者中, 男 4 例, 女 1 例, 52-68 岁, 平均 62.6 岁. 其中胰腺癌伴十二指肠梗阻患者 3 例. 壶腹癌伴梗阻性黄疸患者 2 例, 其中 1 例于 6 mo 前行 PTCD 术成功植入胆道内支架. 此 5 例患者单纯 X 线下十二指肠内支架介入治疗均失败.

1.2 方法 我们采用 Olympus CV-200 系列电子内镜, 患者术前阿托品 1 mg 肌注, 10 g/L 地卡因口腔喷雾麻醉后, 经口腔进入胃、幽门达十二指肠降部, 见降部肠腔几乎被肿物完全阻塞. 从活检孔道注入造影剂碘海醇 10 ml, 在 X 线下显影确定后, 从活检孔道插入超长蓝斑马导丝, 在 X 线下见导丝成功通过狭窄段后, 进导丝, 退镜, 在 X 线下确认导丝没有滑出后, 沿导丝送入进

口十二指肠内支架输送器至梗阻部位后, 退导丝, 释放支架, X 线下见支架成功送入梗阻部位。

2 结果

经胃镜介入治疗的 5 例患者中, 成功 4 例, 失败 1 例, 成功率 80 %。

3 讨论

胰腺癌晚期可出现梗阻性黄疸, 胰管梗阻性疼痛及十二指肠梗阻等并发症^[1]. 十二指肠梗阻是胰腺癌晚期常见并发症之一, 也是患者加速死亡的原因. 外科分流并发病较多, 发生率达 20-30 %. 内镜下放置十二指肠内支架治疗不仅安全有效, 而且免除手术带来的创伤. 1994 年德国率先报道 1 例采用自膨式金属支架解除十二指肠梗阻, 取得良好效果. 最近报道自膨式金属支架治疗 8 例恶性十二指肠梗阻, 其中胰腺癌 5 例, 原发十二指肠癌 1 例, 转移癌 2 例, 支架均植入成功, 仅 1 例 30 d 后死于肺炎. 十二指肠内支架植入可作为晚期胰腺癌姑息治疗的辅助手段^[1].

本文共收治 5 例患者, 失败 1 例. 作者认为失败原因有以下几点: (1) 植入导丝后, 为防止导丝滑出, 退镜进入导丝时, 导丝在胃大弯侧呈螺旋状弯曲, 当植入十二指肠内支架输送器时, 必须拉直导丝, 容易使导丝脱出. (2) 因导丝较软, 放置内支架输送器接近幽门时, 支撑力容易使导丝滑出. (3) 操作时对患者刺激可诱发呕吐, 易使导丝滑出.

我们认为, 为提高成功率, 可采取: (1) 增加导丝硬度. (2) 当输送器进入胃内后, 压迫患者上腹部, 并经常变换体位. (3) 可在输送器前端栓一手术线, 用内镜活检钳夹住手术线导引至十二指肠梗阻处. (4) 可应用大口径内镜, 从活检孔道置入输送器.

总之, 胰腺疾病的内镜治疗效果正被医学界所承认. 随着内镜技术的日益普及, 内镜下介入治疗以其微创性、可重复性、并发症少、费用低等优点, 正逐步取代部分外科手术, 成为胰腺疾病治疗的一个方向. 内镜下放置内支架已成为晚期胰腺癌所致十二指肠梗阻首选的姑息治疗方法, 特别是内镜引入对单纯在 X 线下行支架介入治疗失败的患者得以成功治疗。

4 参考文献

- 1 李兆申. 胰腺疾病内镜治疗研究进展. 中华消化杂志 2001; 21: 171-173

自身 CD3AK 细胞过继免疫治疗乙型肝炎 47 例

刘军权,陈复兴,金义生,陈子鉴,张春平,俞 谨,周忠海

刘军权,陈复兴,周忠海,中国人民解放军第 97 医院实验科
江苏省徐州市 221004
金义生,陈子鉴,张春平,俞谨,中国人民解放军第 97 医院传染科
江苏省徐州市 221004
项目负责人:刘军权,221004,江苏省徐州市铜山路226号,中国人民解放军97
医院实验科. lxuming@pub.xz.jsinfo.net
收稿日期:2002-01-11 接受日期:2002-01-17

摘要

目的:CD3AK(Anti-CD3 antibody induced activated killer, CD3AK)细胞具有增生快、杀瘤活性强和杀瘤谱广的特点. 本文旨在评估用CD3AK细胞过继回输治疗乙型肝炎的疗效.

方法:用淋巴细胞分离液分离乙型肝炎患者末梢血单个核细胞,然后将末梢血单个核细胞加入含有 IFN- α 、IL-2 和 CD3 单抗的培养基中进行培养扩增,将经培养后的 CD3AK 细胞回输给患者;患者一个疗程接受 CD3AK 细胞总数在 $(0.8-7) \times 10^{10}$.

结果:在 47 例接受治疗者中,治疗结束后 HBeAg+HBV-DNA 转阴率为 53.2 %.总有效率(HBeAg 和/或 HBV-DNA 转阴)为 74.5 %.CD3 和 CD8T 淋巴细胞绝对值在 CD3AK 细胞治疗后均增加在 85 %以上.

结论:用自身 CD3AK 细胞过继回输治疗能明显提高乙型肝炎患者细胞免疫功能,治疗结束后 HBeAg+HBV-DNA 转阴率达 53.2 %.且无毒副作用,对乙型肝炎是一种安全有效的治疗方法.

刘军权,陈复兴,金义生,陈子鉴,张春平,俞谨,周忠海.自身 CD3AK 细胞过继免疫治疗乙型肝炎 47 例.世界华人消化杂志 2003;11(1):100-102
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/100.htm>

0 引言

随着分子生物学与细胞免疫学的发展和对乙型肝炎的发病机制的研究表明,生物治疗正成为治疗乙型肝炎的一种重要手段.在生物治疗中,细胞过继免疫治疗是临床应用较多的一种治疗方法,其治疗效果的关键,是输注细胞的数量和质量.因而探寻在体外培养出大量高质量的抗病毒效应细胞一直是大家所关注的问题.为此我们采用患者自身外周血单个核细胞(PBMC)经体外用鼠抗人 CD3 单克隆抗体和白介素 2 等细胞因子联合诱导,回输治疗 47 例乙型肝炎病毒(HBV)感染患者.现将治疗结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 47 例为本院 1997-01/2000-01 住院与门诊患

者,按 1995 年全国病毒性肝炎诊断标准,其中慢性乙型肝炎 33 例,乙型肝炎病毒携带者 14 例.男 37 例,女 10 例,年龄 14-50 岁.47 例中 44 例 HBeAg 及 HBV-DNA 均阳性,3 例仅 HBV-DNA 阳性;1 a 内均未行抗病毒治疗.试剂:鼠抗人 CD₃ 单克隆抗体(CD3mAb)购自北京邦定生物公司;人重组白介素 2(rhIL-2)由南京军事医学科学研究所提供;人重组 α -干扰素(rhIFN- α)购自上海生物制品研究所;RPMI1640 完全培养液(包括 RPMI 1640 和 10 %胎牛血清),购自 Gibico 公司;T 淋巴细胞亚群试剂盒,购自武汉生物制品研究所.

1.2 方法 (1)CD3AK 细胞诱导方法:抽患者外周血 200 mL,先离心分离出血浆备用,再吸出富含白细胞层的细胞约 10 mL,悬浮于等量患者自身血浆中,用淋巴细胞分离液分离,收集单个核细胞.剩余红细胞用生理盐水补充至原体积后回输给患者.单个核细胞用无菌生理盐水洗涤 3 次,将细胞按 $2 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 数量悬浮于 RPMI-1640 完全培养基中,加入经抗 CD3mAb 包被的 6 孔细胞培养板,每孔 6 mL,加入终含量为 $5 \times 10^4 u \cdot L^{-1}$ rhIL-2 和 $1 \times 10^6 u \cdot L^{-1}$ rhIFN- α 37 °C,50 mL $\cdot L^{-1}$ CO₂ 条件下培养,每 2 d 半量换培养基 1 次,并调整细胞密度至 $2 \times 10^9 \cdot L^{-1}$. 培养 7 d 后,经细菌和霉菌培养阴性后再收集细胞,用无菌生理盐水洗 3 次,将细胞悬浮于自身血浆中,加入 $5 \times 10^4 u$ rhIL-2,用输血器回输给患者,2 h 内输完.(2) CD3AK 细胞表型测定:用流式细胞仪(美国 B. D 公司的 FACSCalibur, 分析软件为 Simul SET)测定和分析,每次获取 15 000 个细胞,用 HP 彩色打印机打印结果.(3) T 细胞亚群和 T 细胞亚群绝对值测定:患者在 CD3AK 细胞治疗前后用法国 Hemacell plus 全自动血细胞分析仪做全血细胞计数.同时测定患者外周血 T 淋巴细胞亚群,并将各亚群百分数乘以淋巴细胞总数即得 T 细胞亚群绝对值.(4) 疗效判断:显效: HBeAg 与 HBV-DNA 均转阴;有效: HBeAg 与 HBV DNA 有一项转阴;无效: HBeAg 与 HBV DNA 无变化.有肝功能异常者先给予常规护肝药物治疗,待肝功能正常后,回输 CD3AK 细胞;肝功能正常者仅行回输治疗.回输前常规应用地塞米松 2.5 mg,2 次/wk,(8-12)次为 1 疗程.回输细胞总数为 $(0.8-7) \times 10^{10}$. 治疗前后行 T 细胞亚群和绝对值测定.治疗前后及随访时检查 HBV-DNA、HBeAg 和肝功能.

统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示.用 t 检验比较各组间均数差异的显著性.

2 结果

2.1 CD3AK 细胞表型 正常成人 PBMC 在培养前细胞的 CD25 和 CD95 的测定结果为 9.09 % 和 35.35 %。而培养 7 d 时则为 86.65 % 和 66.64 %。

2.2 乙型肝炎患者经 CD3AK 细胞治疗前后 T 细胞亚群及其绝对值测定结果 47 例患者有 41 例检测了 T 细胞亚群和绝对值。经 CD3AK 细胞治疗后, CD3、CD8T 细胞百分率及其绝对值比治疗前显著增高, CD4T 细胞百分率及其绝对值也比治疗前明显增高。结果见表 1。

表 1 经 CD3AK 细胞治疗前后 T 细胞亚群及其绝对值变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	治疗前	治疗后
CD3T 细胞	41	0.57 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.11 ^b
CD3T 细胞绝对值	41	1539.7 $\pm$ 216.7	2905.7 $\pm$ 335.3 ^b
CD4T 细胞	41	0.33 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.06 ^a
CD4T 细胞绝对值	41	989.6 $\pm$ 151.3	1330.3 $\pm$ 176.6 ^a
CD8T 细胞	41	0.27 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.13 ^b
CD8T 细胞绝对值	41	729.7 $\pm$ 121.4	1645.7 $\pm$ 110.3 ^b

^aP < 0.05, vs 治疗前; ^bP < 0.01, vs 治疗前。

2.3 治疗后血清中 HBeAg 和 HBV - DNA 转阴情况 治疗前 44 例 HBeAg 阳性者, 治疗后有 29 例 HBeAg (65.9 %) 转阴。47 例 HBV - DNA 阳性者治疗后有 31 例转阴, 转阴率为 66.0 %。按疗效判断标准, 显效 53.2 % (25/47), 有效 21.3 % (10/47), 无效 25.5 % (12/47), 总有效率为 74.5 %。

2.4 随访结果 经 3 mo - 2 a 随访, HBeAg 转阴者由治疗结束时的 25 例增至 29 例, 转阴率为 65.9 % (29/44), HBV - DNA 转阴者由 15 例增至 31 例, 转阴率为 66.0 % (31/47)。有 2 例患者治疗结束时 HBeAg 与 HBV - DNA 仍为阳性, 随访期间曾出现低度 ALT 增高, 未作治疗, 经休息自行复常, 且 HBeAg 和 HBV DNA 转阴, 表明本疗法具有治疗后效应。

2.5 副作用 47 例总计回输 489 次。仅有 6 例次于回输结束后 30 min 出现体温 37.8 - 38.5 °C 的发热。未经处理, 约 2 h 后体温自行恢复正常。全部患者血常规均无明显变化。

3 讨论

CD3AK 细胞是一种较新型的肿瘤效应细胞, 已用于治疗各种恶性肿瘤^[1], 但用于慢性乙型肝炎临床治疗的报告较少。由于病毒和癌基因产物的抗原提呈大都属内源性抗原提呈途径, 因此人们尝试用 LAK 细胞治疗病毒性疾病。其治疗效果令人鼓舞^[2-7]。我们的疗效比单用 IL - 2 和 LAK 细胞治疗的效果好。

CD3AK 细胞治疗乙型肝炎病毒感染的确切机制尚不清楚, 可能与以下机制有关。(1) CD3AK 细胞是异质性细胞群, 末梢血单个核细胞中的 CD8⁺ 和部分 CD4⁺T

细胞以及少量其他细胞随着在体外培养时间的延长, 这些细胞比例在不断的改变, 尤其是 CD8⁺T 细胞增高最为明显。由于乙型肝炎病毒感染者体内可存在乙肝病毒特异性 T 细胞, 而这些细胞主要为 CD8⁺T 细胞。因此, 从患者血中分离出的这种淋巴细胞在体外被扩增后激活, 回输体内即可杀伤被乙型肝炎病毒感染的靶细胞^[8]。我们的研究表明, 正常成人 PBMC 经培养后 CD95⁺、CD25⁺CD45RO 细胞明显增加^[9]; 大多数患者经过一个疗程治疗后, 血中 CD3⁺、CD8⁺T 细胞百分数及其绝对值显著增加。(2) CD3AK 细胞可分泌 IFN - α 、IL - 2 和 TNF 等细胞因子, 已知这些细胞因子能抑制病毒的复制^[10-17]。(3) 由于肝炎患者的肝细胞既表达 Fas 又表达 FasL。而 CD3AK 细胞也可以表达 Fas 与 FasL^[18]。许多实验结果表明, 肝炎患者 T 细胞上 Fas 分子在用 CD3mAb 激活后明显增加, 回输的 CD3AK 细胞可以较好地作用于乙型肝炎病毒感染的肝细胞, 使其发生凋亡^[19,20]。(4) 我们的实验表明, 乙型肝炎感染患者的淋巴细胞在用 CD3mAb 激活后, 淋巴细胞 CD25 比激活前明显增加, 回输后的 T 细胞可以在体内增生, 本法治疗后效应可能与此有关。

本文有部分患者一个疗程后未能达到治疗效果, 可能与以下因素有关。(1) 回输的 CD3AK 细胞数量不够; (2) CD3AK 细胞质量上存在一些问题。在培养中发现, 这些患者用 CD3mAb 激活后细胞增生缓慢, CD25 表达增加不明显。当然还可能与病毒变异、某些细胞黏附分子如 MHC - I 类分子和 ICAM - I 表达缺陷有关^[21]。

有关过继性免疫治疗尚无统一方案。我们认为回输细胞总数应大于 1×10^{10} 可能才能具有治疗作用。将 CD3AK 细胞回输治疗与其他药物应用相结合, 适当调整 CD3AK 细胞亚群的比例, 增加细胞和某种细胞因子 (如干扰素、IL - 2)^[22,23] 用量及某些药物如拉米夫定等联合应用可能会取得更好效果。

4 参考文献

- 1 赵志泉, 沈斌, 吕秀珍, 徐顺福, 孙宏训. CD₃AK 细胞体外对 SMMC - 7721 人肝癌细胞株杀伤作用的实验研究. 中华消化杂志 1997; 17:239-240
- 2 周岳进, 许雪延, 胡素琴, 胡操寒, 孔晓彩, 金伟虎, 池月志. 基因工程干扰素 $\alpha - 2b$ 加 CD₃AK 治疗慢性乙型肝炎. 临床肝胆病杂志 1997; 13:198-202
- 3 董寒梅, 张瑞阳. 自体与异体 LAK 细胞治疗慢性肝炎 130 例. 新消化杂志 1997; 5:313-314
- 4 方蕾, 陈复兴. 抗原的加工和提呈. 国外医学分子生物学分册 1994; 16:231-234
- 5 张言超, 吴文漪, 陈明, 韩方正. 慢性中重型肝炎自体 LAK 细胞回输治疗效果的细胞免疫分析. 华人消化杂志 1998; 6:826-827
- 6 张树林, 刘敏, 朱江, 柴宁莉. Th₁ 优势应答与 HBV 慢性感染. 世界华人消化杂志 1999; 7:513-515
- 7 Penna A, Prete GD, Cavalli A, Bertoletti A, Sorrentino MMDR, Damato M, Boni C, Pilli M, Fiaccadori F. Predominant T-Helper1 cytokine profile of hepatitis B viral nucleocapsid-specific T cell in acute self-limited hepatitis B. Hepatology 1997; 25:1022-1027
- 8 Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. Annu Rev Immunol 1995; 13:545-586
- 9 陈复兴, 刘军权, 王涛, 黄健, 骆晓梅. 人 PBMC 经数种活化剂活化后的

- 表型变化.中国肿瘤生物治疗杂志 1999;6:186-187
- 10 Riddell SR, Greenberg PD. Therapeutic reconstitution of human viral immunity by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocyte clones. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;189:9-34
- 11 蒋道荣,姚登福,孟宪镛.乙型肝炎患者外周血 T 细胞亚群和可溶性 IL-2R 的研究.新消化病学杂志 1997;5:98-99
- 12 南月敏,王麟士,吴文娟,谢永富,庞英.乙型肝炎及原发性肝癌患者 sIL-2R 的变化.新消化病学杂志 1997;5:319-320
- 13 靖大道,邱德凯.乙型肝炎硬变患者外周血 IL-2, IL-2R 与肝功能的关系.华人消化杂志 1998;6:900-901
- 14 王九平,李新红,朱勇,王爱莲,连建奇,贾战生,谢玉梅.慢性乙型肝炎患者 T 细胞亚群, mL-2R, sIL-2R, IL-6, IL-8, TNF- α 变化及意义.世界华人消化杂志 2000;8:763-766
- 15 刘军权,陈复兴,陈子鉴,王涛,张春平.IL-2 不同注射途径对慢性乙型肝炎患者 T 细胞功能的影响.世界华人消化杂志 2001;9:352-353
- 16 游晶,庄林,唐宝璋,杨惠,杨微波,李武,张宏丽,张艳梅,张禄,严绍明.干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎.世界华人消化杂志 2001;9:388-391
- 17 Wang J, Hargrove ME, Ting CC. IL-2 and IL-4 mediate through two distinct kinase pathways for the activation of α CD3-induced activated killer cells. *Cellular Immunol* 1996; 174 :138-146
- 18 施广霞,程一耀,钱振超.抗 CD3 单抗和 rIL-2 共刺激诱导的 PBL 增生与凋亡共存现象的研究.中国免疫学杂志 1995:44-46
- 19 郎振为,王海舰,孟忻,李俊强,张士杰.乙型肝炎患者肝组织中 Fas 配体的表达.中华内科杂志 1997;36:655-657
- 20 甘华山,陈友琴.细胞凋亡与病毒性肝炎.世界华人消化杂志 2001;9:579-581
- 21 陈复兴,武建国.病毒性疾病的 T 细胞免疫治疗.国外医学病毒学分册 1997;20:46-43
- 22 杜清友,王福生,徐东平,刘洪,雷周云,刘明旭,王业东,陈菊梅,吴祖泽.新型免疫活性细胞 CIK 体外对肝癌细胞的杀伤.世界华人消化杂志 2000;8:863-866
- 23 Ting CC, Hargrove ME. Anti-CD3 antibody-induced activated killer cells: Cytokines as the additional signals for activation of killer cells in effector phase to mediate slow lysis. *Cellular Immunol* 1991; 135:273-284

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

盘点中国科技论文:14 种医药卫生期刊影响因子超过 1

健康报 2002-12-11 报道 12 月 10 日,中国科学技术信息研究所在北京发布了 2001 年度中国科技论文统计结果.按照国际论文数量排序,我国位居世界第 6 位.

据介绍,这次国际论文数据依然取自 3 种在国际上颇具影响的检索工具:《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP).我国作者论文共 64526 篇,比 2000 年增加 14848 篇,增长率为 29.9%,占世界论文总数的 4.4%.位于我国之前的 5 个国家是:美、日、英、德、法.

国内论文数据取自《中国科技论文与引文数据库》,2001 年度收录了中国科技期刊 1447 种,其中 342 种医药卫生期刊入选.全国影响因子超过 1 的期刊有 26 种,医药卫生期刊占 14 种.在各学科影响因子总排序前 50 位中,医药卫生期刊有 25 种,占了半壁江山,特别是《世界华人消化杂志》以 3.733 的影响因子排在各学科之首,《世界胃肠病学杂志》和《解放军医院管理杂志》的影响因子均超过了 2.今年还首次评出中国百种杰出学术期刊,20 种医药卫生期刊入选其中.

分类统计还对高等学校、科研机构以及医疗机构发表论文和被引用情况的前 20 位进行了排序.在 SCI 统计的医疗机构论文数中,解放军总医院论文名列第一,第四军医大学西京医院在国内论文数中名列榜首.

(张荔子)

转化生长因子 β_1 在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨

李清华,秦成勇,劳 萍

李清华,青岛市立医院消化内科 山东省青岛市 266011
秦成勇,劳萍,山东省立医院 山东省济南市 250021
项目负责人:李清华,266011,山东省青岛市,青岛市立医院消化内科.
收稿日期:2002-04-08 接受日期:2002-07-10

摘要

目的:探讨转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)在人肝纤维化组织中的分布和作用.

方法:采用放射免疫方法检测36例慢性乙型肝炎患者血清中PCIII、IV-C、HA、LN水平,同时采用原位杂交和免疫组化的方法检测其肝组织中TGF- β_1 mRNA及蛋白表达情况,并对蛋白表达结果进行半定量分析.

结果:TGF- β_1 mRNA和蛋白表达于肝纤维化活跃的汇管区、纤维间隔、Disse间隙及肝细胞变性坏死处,随肝纤维化程度的加重,TGF- β_1 蛋白表达着色积分增加(S_0 期 1.4 ± 0.8 , S_1 期 1.7 ± 0.9 , S_2 期 2.9 ± 1.0 , S_3 期 4.8 ± 1.5 , S_4 期 6.8 ± 1.5);并且与血清PCIII, IV-C, HA及LN水平呈明显的正相关($r=0.39$, $P<0.05$; $r=0.436$, $P<0.05$; $r=0.63$, $P<0.01$; $r=0.40$, $P<0.05$).

结论:TGF- β_1 与胶原蛋白沉积密切相关,在人肝纤维化的形成和发展中起关键性的作用.

李清华,秦成勇,劳萍.转化生长因子 β_1 在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨.世界华人消化杂志 2003;11(11):103-105
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/103.htm>

0 引言

转化生长因子- β_1 (transforming growth factor-beta 1,TGF- β_1)是一种具有同源双链的多肽细胞因子,具有调节细胞生长和分化的作用,是组织修复过程的重要因素^[1, 2].近来研究认为TGF- β_1 是最重要的肝纤维化递质,细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的合成和降解主要由TGF- β_1 调控^[1-4].我们采用原位杂交、免疫组化技术检测慢性乙型病毒性肝炎患者肝组织中TGF- β_1 的存在、定位,并同时检测其血清中PCIII、IV-C、HA及LN的水平,以期探讨TGF- β_1 与肝纤维化的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 住院和门诊的慢性乙型病毒性肝炎患者36例,男20例,女16例,年龄21-65岁.所有病例均经肝活检病理学证实.诊断依据1995年全国传染病寄生虫病会议修订的标准.正常组织对照4例,男3例,女

1例,年龄32-50岁.正常血清标本对照取自健康献血员15名,年龄17-52岁,男9名,女6名.所有对照者HAV-HEV的血清学标志均为阴性,并且肝功能、肾功能检查均在正常范围.静脉空腹取血3 mL,分离血清,抽血后3 d内进行肝穿刺和外科手术获得肝组织标本,1份入甲醛液固定;另一份用OTC包埋后置液氮冻存.

1.2 方法 检测血清PCIII、IV-C、HA及LN水平,采用放射免疫法,试剂盒为重庆肿瘤研究所和上海海军医学研究所提供,操作按说明书严格进行.免疫组化按常规ABC方法进行,检测用试剂盒为武汉博士德公司提供,用PBS代替一抗作阴性对照.半定量积分判定方法参照文献[5]方法,略加以修改,将门静脉及小叶着色面积积分5个等级,分别赋予0-4分,选取一张片子上5个显微镜下视野计算着色总积分为两者着色面积积分之和.原位杂交采用武汉博士德公司提供的TGF- β_1 原位杂交检测试剂盒,操作按说明书严格进行,最后DAB显色,苏木素复染,中性树脂封片.所有标本均进行Mallory三色染色,胶原纤维呈蓝色染色.

统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和直线相关分析的方法.

2 结果

2.1 血清PCIII、IV-C、HA、LN的水平,随 S_0 - S_3 期肝纤维化加重,4个指标依次升高,除 S_1 期PCIII,IV-C及LN水平,各期指标与 S_0 期比较均显著升高, S_2 - S_4 期PCIII、IV-C及HA水平还显著高于 S_1 期,且 S_3 期和 S_4 期HA水平亦明显高于 S_2 期,见表1.

表1 不同肝纤维化分期慢乙肝患者血清PCIII、IV-C、HA及LN水平

肝纤维化分期	n	PCIII(μ g/L)	IV-C(μ g/L)	HA(ng/L)	LN(ng/L)
S_0	7	102 ± 8	42 ± 7	77 ± 41	116 ± 38
S_1	11	132 ± 19	69 ± 40	158 ± 68.82^a	174 ± 60
S_2	8	179 ± 46^d	141 ± 67^c	407 ± 197^d	180 ± 40^b
S_3	6	239 ± 67^d	185 ± 98^d	681 ± 151^e	221 ± 77^a
S_4	4	226 ± 60^d	146 ± 89^c	753 ± 236^f	192 ± 97^a

^a $P<0.05$ vs S_0 期; ^c $P<0.05$ ^d $P<0.01$ vs S_1 期; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ vs S_2 期.

2.2 免疫组化结果 正常肝组织中活性TGF- β_1 免疫组化染色表明在中央静脉、肝动脉、门静脉及胆管管壁均见阳性染色.Mallory染色示,胶原纤维尚未见明显增加的慢肝病变组织中的小叶内和汇管区的炎症细胞浸润、灶性坏死区的多量炎细胞、成纤维细胞及

窦旁细胞却已见 TGF- β_1 阳性染色.随着肝病的发展, Mallory 染色发现 ECM 的明显沉积增加, 慢性肝病变肝组织的炎症坏死区、中央静脉周围、门管区见图 1, 及肝窦周 Disse 间隙的 ECM 沉积处见图 2, 亦见明显的 TGF- β_1 阳性染色.肝硬化及慢性肝炎病变肝组织的纤维间隔及硬化结节边缘可见强阳性的 TGF- β_1 染色, 与 Mallory 染色示胶原纤维沉积部位相一致.在各种病变肝组织尤其是毗邻以上部位亦可见极少数肝细胞质有 TGF- β_1 阳性染色.活性 TGF- β_1 着色积分随肝纤维化加重明显增加.活性 TGF- β_1 着色积分除 S_0 期 (1.4 ± 0.8) 和 S_1 期 (1.7 ± 0.9)、 S_3 期 (4.8 ± 1.5) 和 S_4 期 (6.8 ± 1.5) 之间, 各期之间均有显著差异 ($P < 0.01$).且组织活性 TGF- β_1 着色积分与血清 PCIII、IV-C、HA 及 LN 水平亦呈明显的正相关 ($r = 0.39, P < 0.05$; $r = 0.436, P < 0.05$; $r = 0.630, P < 0.01$; $r = 0.40, P < 0.05$).

2.3 原位杂交结果 反映 TGF β_1 mRNA 分布, TGF β_1 杂交结果表明:正常肝组织在背景染色基础上,见少数肝细胞及中央静脉、门静脉、肝动脉、胆管的管壁处可探及较多的杂交信号, 分布均匀.肝硬化及慢肝患者肝组织的假小叶周边、纤维间隔见图 3、汇管区及间质与实质交界处炎性活动病变区及周围的成纤维细胞、炎细胞见图 4, 增生胆管壁基底膜见图 3, 及 ECM 沉积处见图 4, 有明显的杂交信号, 毗邻以上部位处肝细胞亦见明显杂交信号, 分布不均匀, 呈灶状; 但肝硬化肝组织的肝细胞中极少.另外肝小叶的肝 Disse 间隙及 Disse 腔内的窦旁细胞见图 3、图 5、图 6, 亦见明显阳性杂交信号.

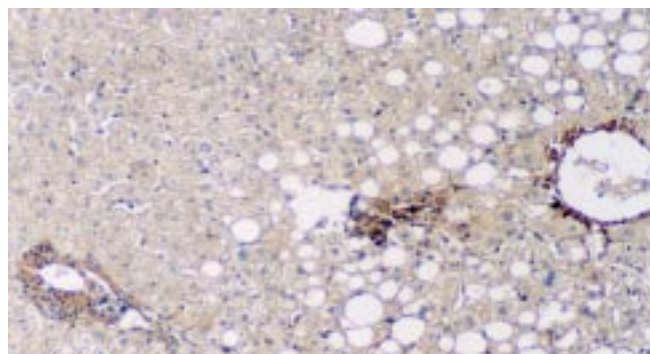


图 1 慢性乙肝组织:中央静脉管壁及周围细胞、汇管区、肝细胞变性坏死区 ECM 沉积处见棕黄色的 TGF- β_1 阳性染色增多(免疫组化 DAB 法 10×10)

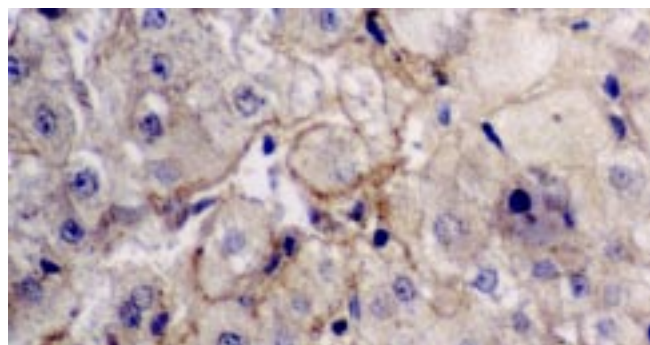


图 2 慢性乙肝组织:肝血窦周间隙见棕黄色的 TGF- β_1 阳性染色增多(免疫组化 DAB 法 40×10)

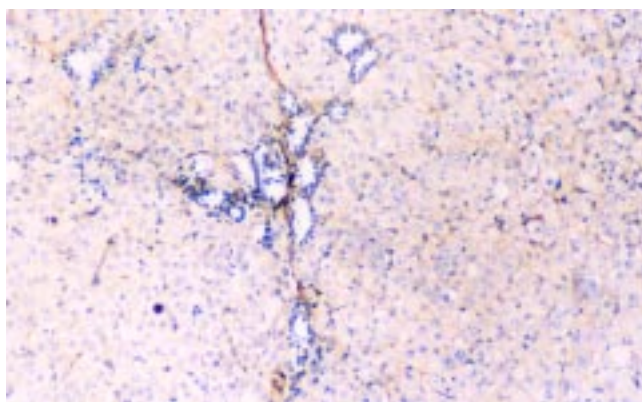


图 3 肝硬化组织:小叶内纤维间隔内成纤维细胞、小叶内窦旁细胞、增生的胆管基底膜均见棕黄色明显增多的阳性 TGF- β_1 mRNA 杂交信号, 肝细胞质内未见明显的杂交信号(原位杂交 DAB 法 10×10)

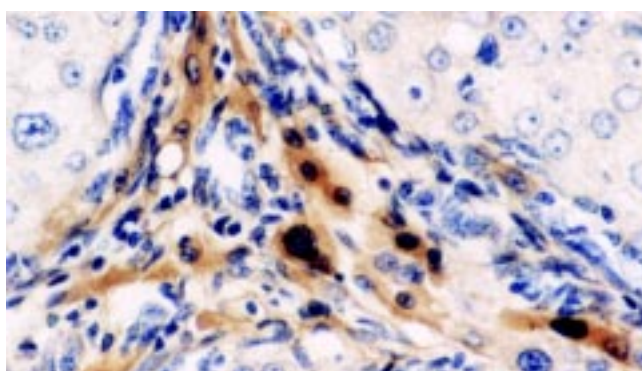


图 4 肝硬化组织:汇管区内成纤维细胞、炎性细胞及 ECM 沉积处可见棕黄色明显增多的阳性 TGF- β_1 mRNA 杂交信号(原位杂交 DAB 法 40×10)

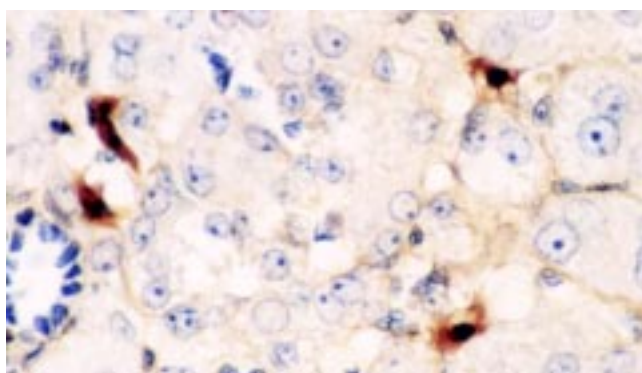


图 5 肝硬化组织:小叶内星状或梭形的窦旁细胞见棕黄色的阳性 TGF- β_1 mRNA 杂交信号(原位杂交 DAB 法 40×10)

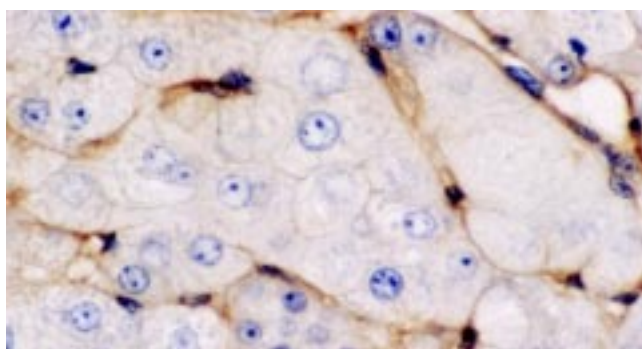


图 6 肝硬化组织:小叶内肝窦周细胞见棕黄色的阳性 TGF- β_1 mRNA 杂交信号(原位杂交 DAB 法 40×10)

3 讨论

TGF- β_1 能促进各种ECM成分及受体的产生,抑制基质降解蛋白酶的合成及促进基质降解蛋白酶抑制剂(PAI, TIMP等)合成^[1-4].本实验研究了正常人、慢性乙肝及肝硬化患者肝组织中TGF- β_1 的表达.以前大多数研究为单独进行原位杂交或免疫组化,但是单原位杂交检测mRNA,不能反映蛋白质表达或转录后激活过程,而且激活过程是TGF- β_1 起作用的关键;而单进行免疫组化的研究,TGF- β_1 阳性亦可能是由于肝细胞摄入引起.我们的结果表明:不论TGF- β_1 mRNA还是活性TGF- β_1 蛋白于ECM沉积处,如汇管区、纤维间隔、假小叶周边、肝窦Disse间隙、中央静脉管壁及炎症坏死区均见明显的阳性染色.与胶原纤维沉积部位相一致.另外肝纤维化早期,主要是炎症坏死处及肝纤维化中、晚期,主要为纤维间隔内的炎细胞、成纤维细胞、窦旁细胞及毗邻以上部位的极少数肝细胞亦见阳性染色.TGF- β_1 阳性染色分布不均匀,呈灶状.并且免疫组化示活性TGF- β_1 染色积分随肝纤维化加重亦明显增加.Ito细胞是合成ECM最主要的间质细胞,他主要位于肝窦周Disse间隙和纤维间隔^[6].活动性肝病肝组织的Disse间隙、汇管区、炎细胞浸润变性坏死处、纤维间隔及肝硬化结节周边均为肝纤维化活动最活跃的地方.表明活性TGF- β_1 同肝纤维化密切相关,且发生在分子水平,同以往的报道相一致^[5, 7-9],证明这些地方是肝纤维化时增多的TGF- β_1 的来源之处.肝纤维化早期,肝损因子(如病毒)导致炎细胞及其他间质细胞浸润增多,分泌适量的TGF- β_1 ,其通过自分泌和旁分泌机制又作用于间质细胞,增加基质成分的合成^[2-4, 6, 10],由于TGF- β_1 对炎细胞及成纤维细胞均有趋化作用,从而使肝纤维化程度不断加重.同时证明了临床上用各种方法保护慢性肝炎患者肝细胞不受损害,抑制炎症反应,是防治肝纤维化的重要措施.

肝纤维化时异常沉积的ECM,包括胶原蛋白(I, II, IV, V, VI),糖蛋白(FN, LN, VN等),蛋白多糖(HA等).众多研究已表明血清中PCIII, IV-C, HA, LN水平可反映肝内其含量及肝纤维化程度和活性^[11-15].我们的实验亦表明这4个指标的水平随着病情和肝纤维

化程度的加重明显增加.而且肝活性TGF- β_1 着色积分同血清中4个指标的水平呈明显的正相关.进一步证明了TGF- β_1 与ECM的合成、代谢、胶原蛋白的沉积密切相关,肝中活性TGF- β_1 染色可反映肝纤维化程度及活动情况,提示亦可作为肝纤维化的诊断指标.

4 参考文献

- 1 李谦,吴梧桐.转化生长因子 β_1 .药物生物技术 2001;8:227-229
- 2 陈修熙,来茂德.转化生长因子TGF- β 研究进展.世界华人消化杂志 2000;8:1405-1409
- 3 刘芳,刘金星.转化生长因子 β_1 在肝纤维化中的作用.世界华人消化杂志 2000; 8:86-88
- 4 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Role of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- 5 Inuzuka S, Ueno T, Torimura T. The significance of colocalization of plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin in hepatic fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1052-1060
- 6 Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002;160:1705-1715
- 7 严家春,陈文笔,马勇,田瑞霞,丁体龙,徐长江.转化生长因子 β_1 与乙型肝炎肝血管病变的关系.世界华人消化杂志 2001;9:751-754
- 8 Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nakayama H, Hara T. High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. *Br J Haematol* 2001;115:472-475
- 9 Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2001;158:1239-1244
- 10 向德栋,魏永利,李奇芬.转化生长因子 β_1 对Ito细胞作用的分子机制.世界华人消化杂志 1999;7:980-981
- 11 Luo RH, Yang S, Xie J, Zhao Z, He Y, Yao J. Diagnostic value of five serum markers for liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:148-150
- 12 常克宏,程书权,张自富,钱梅艳.血清HA,PLD,PCIII,IV-C联合检测对慢性肝病诊断价值的探讨.世界华人消化杂志 2000; 8(特刊8):45-46
- 13 张春兰,石亚玲,易俊卿.肝纤维化指标与疾病程度、病毒含量及病理的关系.世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):14
- 14 刘芳,刘金星,曹治宸,李兵顺,赵采彦,孔丽,甄真.慢性肝病患者血清TGF- β_1 与肝纤维化指标和肝组织病理的关系.世界华人消化杂志 1999;7:519-521
- 15 Stickel F, Urbaschek R, Schuppan D, Poeschl G, Oesterling C, Conradt C, McCuskey RS, Simanowski UA, Seitz HK. Serum collagen type IV and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:2025-2032

慢性乙型肝炎肝脂肪变性的组织学特点

任星峰,葛 娅,杨 群,赵甫涛

任星峰,葛娅,杨群,赵甫涛,广州军区武汉总医院感染内科
湖北省武汉市 430070
项目负责人:任星峰,430070,湖北省武汉市洪山区广州军区武汉总医院感染内科.
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-09

摘要

目的:了解慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B;CHB)肝脂肪变性的组织学特点.

方法:回顾性观察 652 例 CHB 肝活检组织,就脂肪变性的程度、类型与肝组织炎性活动及纤维化 Ishak 计分进行对照分析.

结果:652 例 CHB 肝组织并发肝脂肪变性的有 125 例(19.2%).脂肪变性细胞以肝腺泡 III 带分布为主者占 93.6%(117/125).肝脂肪变性轻、中、重度患者,小泡性脂肪变的构成比分别为 80.3%(53/66)、71.1%(27/38)、52.4%(11/21),三者差异显著($\chi^2=6.36$, $P<0.05$).肝组织炎性活动及纤维化 Ishak 计分在肝脂肪变性无、及轻、中、重患者之间无显著差异(F 分别为 1.61、0.75, P 均 >0.05),而小泡性患者较大泡性显著升高(t 分别为 2.48、2.43, P 均 <0.05).

结论:CHB 肝脂肪变性发生率近 20%,脂肪变性细胞主要分布在肝腺泡 III 带.脂肪变性类型以小泡性为主.小泡性脂肪变可能为大泡性脂肪变的早期表现.肝组织病理损害程度与肝脂肪变性的类型密切相关,而与肝脂肪变性的程度无关.

任星峰,葛娅,杨群,赵甫涛.慢性乙型肝炎肝脂肪变性的组织学特点.世界华人消化杂志 2003;11(1):106-107
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/106.htm>

0 引言

近年来肝脂肪变与病毒性肝炎的关系日渐受到重视.本文回顾性观察了经临床和病理确诊的 652 例 CHB 肝组织切片,并就合并肝脂肪变性患者的组织学特点进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 1996-12/2002-06 部分住院的 652 例 CHB 患者.临床及病理诊断分型依据 2000-09 全国病毒性肝炎防治方案.男 402 例,女 45 例,年龄 10-67 岁,平均 29.8 岁.

1.2 方法 全部病例入院后 1-4 wk 行肝穿刺活检,10%的甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,常规 HE 及银浸染色,病理片双人盲阅,进行改良 Ishak 计分^[1].肝组织脂肪变性程度以光镜下每单位面积脂肪变性细胞所占比

例划分:轻度: $<10\%$,中度 10-20%,重度 20-30%.肝组织脂肪变性类型分小泡性及大泡性.

统计学处理 数据均输入电脑,用 SPSS8.0 软件计算均值、标准差,并进行 t 检验.多组间均数比较采用方差分析 (ANOVA),多个样本率的比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 肝脂肪变性的程度与类型的关系 125 例 CHB 肝组织并发脂肪变性,发生率为 19.2%(125/652);其中轻、中、重度分别为 66、38 及 21 例,构成比分别为 52.8%、30.4% 及 16.8%.肝脂肪变性小泡性、大泡性分别为 91 及 34 例,构成比分别为 72.8% 及 27.2%.肝脂肪变性程度愈轻,小泡性脂肪变愈明显(表 1).125 例肝脂肪变性患者中,117(93.6%)例脂肪变性细胞分布在腺泡 III 带,仅 2 例(1.6%)分布在 II 带,6 例(4.8%)全小叶混合分布.

表 1 肝脂肪变性程度与类型(%)的关系

脂肪变性程度	<i>n</i>	小泡性型	大泡性型
轻	66	53(80.3)	13(19.7)
中	38	27(71.1) ^a	11(28.9)
重	21	11(52.4) ^b	10(47.6)

^a $P<0.05$ vs 轻度组; ^b $P<0.05$ vs 中度组.

2.2 肝脂肪变性程度与肝组织病变程度的关系 肝脂肪变性无及轻、中、重度患者,肝组织炎性活动 Ishak 计分分别为 7.0 ± 5.1 、 6.4 ± 4.6 、 7.4 ± 4.3 、 8.5 ± 6.0 ,无显著差异($F=1.61$, $P>0.05$);纤维化 Ishak 计分分别为 2.3 ± 1.7 、 2.2 ± 1.9 、 2.7 ± 1.7 、 2.5 ± 1.6 ,无显著差异($F=0.75$, $P>0.05$).

2.3 肝脂肪变性类型与肝组织病变程度的关系 小泡性、大泡性肝脂肪变性患者肝组织炎性活动 Ishak 计分分别为 7.8 ± 5.0 、 5.2 ± 4.3 ,肝组织纤维化 Ishak 计分分别为 2.8 ± 1.8 、 1.8 ± 1.7 ,小泡性组较大泡性组炎性活动度及纤维化 Ishak 计分有显著差异 (t 分别为 2.48、2.43, P 均 <0.05).

3 讨论

肝脏在脂类代谢中起着十分重要的作用.任何原因所致的甘油三酯合成不平衡,以及 VLDL 在多个阶段的分泌失调,均可导致脂肪在肝内贮积,形成脂肪肝(光

镜下每单位面积肝脂肪变性细胞 $>1/3$ 。少数肝细胞内虽有脂滴沉积,但未达脂肪肝诊断标准者(光镜下每单位面积肝脂肪变性细胞 $<1/3$),则称之为肝脂肪变性。

肝脂肪变性是丙型肝炎的特征,但本资料显示CHB并非罕见,其发生率高达20%。原因可能是CHB患者肝组织存在不同程度炎性细胞浸润及肝细胞坏死,此不仅可影响脂蛋白的合成,而且可影响甘油三酯与脂蛋白的结合,从而引起肝内VLDL合成、排泄障碍,甘油三酯在肝内堆积而发生肝脂肪变性。部分患者过分强调高糖、高热量的饮食和限制体力活动亦促进了此过程的发生。

一般认为各种病因所致的肝脂肪变性细胞在小叶内分布的范围不一,但通常首先累及肝腺泡III带,随病变的加重,渐累及腺泡I带^[2],本文与此相符,90%以上的个例肝脂肪变性细胞主要围绕肝腺泡III带,呈灶性分布。但本病例组肝组织脂肪变性程度与肝组织炎症

活动度及纤维化进程并无明显相关关系。

据肝细胞内脂滴的直径可将肝细胞脂肪变性分为小泡性(微脂滴, microvesicular steatosis)和大泡性(大脂滴, macrovesicular steatosis)两大类型,前者可为后者的早期表现。肝细胞微脂滴的形成亦反映了肝细胞代谢功能的障碍,特别是线粒体功能障碍。本资料显示轻度肝脂肪变性患者,脂肪变的类型以小泡性为主;随脂肪变性程度的加重,大泡性脂肪变明显增强。小泡性肝脂肪变性患者较大泡性患者有更高的炎性活动及纤维化 Ishak 计分。因此小泡性脂肪变的出现往往提示肝组织炎性反应活跃,肝细胞持续损害。

4 参考文献

- 1 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De-Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699
- 2 范建高.肝活检在脂肪肝中的作用.中华肝病杂志 2000;8:116

30种学术期刊受重点资助

科学时报 2002-10-24 报道 国家自然科学基金委员会日前在京公布了“2002—2003年度自然科学基金重点学术期刊”的评审结果,包括《世界胃肠病学杂志》、《细胞研究》、《中国物理快报》和《化学通报》在内的30种期刊榜上有名。

国家自然科学基金委员会自1999年设立重点学术期刊专项基金。2002年度共有55种学术期刊申请该项基金。经过评审,30种期刊获得资助,资助总经费达700万元。其中《中国物理快报》等15种期刊获得连续资助。

据国家自然科学基金委员会杂志部副主任祖广安介绍,本年度期刊平均受资助的强度为每年10万元,期限2年。与上一年度相比,本次受资助期刊的数量上升了25%。

乳果糖对亚临床肝性脑病的作用研究

邢全台,刘连水

邢全台,山东大学齐鲁医院消化内科 山东省济南市 250012
刘连水,济阳县人民医院内科 山东省济阳县 251400
项目负责人:邢全台,250012,山东省济南市文化西路44号,山东大学西校区
259号信箱. xqt1230629@sina.com
收稿日期:2002-06-17 接受日期:2002-07-06

摘要

目的:探讨乳果糖对亚临床肝性脑病的治疗作用。

方法:具有慢性肝硬化病史,符合亚临床肝性脑病诊断条件的门诊或住院患者48例随机分为两组,每组24例,实验组给予乳果糖20 ml,2次/d,另加复合维生素B、益肝灵常规口服;对照组给予复合维生素B2片、益肝灵2片,口服3次/d,1 mo为1疗程,治疗前后分别进行数字连接实验、语言智商、操作智商检查,脑电图检查,血、尿、大便常规及肝功能检查。

结果:实验组23例、对照组22例完成治疗并随访,实验组在数字连接实验、语言智商、操作智商方面有显著改善,而对照组无明显改善,实验组脑电图恢复正常12例,无效11例;对照组用药前后脑电图无显著变化。

结论:乳果糖治疗亚临床肝性脑病有效。

邢全台,刘连水.乳果糖对亚临床肝性脑病的作用研究.世界华人消化杂志 2003;11(1):108-109
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/108.htm>

0 引言

近年来,有学者提出亚临床肝性脑病的概念,即一些肝硬化患者在临床上无肝性脑病的表现,但在接受严格的心理测试、智能测试或大脑诱发电位检查时表现异常^[1]。我们采用乳果糖口服液治疗亚临床肝性脑病23例,取得明显疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 45例患者为2000-02/2002-03住院或门诊患者,两组资料具可比性,见表1。

表1 两组患者一般临床资料

	年龄(岁)	性别		原发病类型			慢肝病史(mo)
		男	女	乙肝后肝硬化	酒精性肝硬化	其他类型	
治疗组	33.6 ± 9.6	16	7	15	5	3	56.3 ± 14.6
对照组	38.5 ± 6.8	14	8	16	4	2	64.2 ± 16.1

1.2 方法 治疗组采用乳果糖口服液(辽宁丹东康复制药

厂生产,每10 ml含乳果糖5 g),20 ml/次,口服2次/d,另加复合维生素B2片、益肝灵2片,口服3次/d;对照组仅给予复合维生素B2片、益肝灵2片,3次/d口服,连续服用1 mo为1疗程。用药前后分别进行数字连接实验、语言智商和操作智商检查,脑电图检查,血氨、三大常规及肝肾功能检查。数字连接实验系采用李瑜元、贾林提供的测试图案,让患者按顺序用连线的方式将数字连接起来,并记录所需的连接时间,语言智商和操作智商系采用龚耀先修订韦氏成人智力量表检测患者的语言智商和操作智商,并算出总智商。

统计学处理 数据资料采用t检验。

2 结果

用药前后两组患者数字连接实验、语言智商和操作智商、脑电图、血氨检查的结果见表2。

表2 实验组和对照组疗效比较

		字连接实验	语言智商和操作智商	脑电图异常	血氨
实验组	用药前	93.6 ± 31.5	95.6 ± 20.4	23(100%)	60.1 ± 10.2
	用药后	66.8 ± 24.6	115.9 ± 18.6	12(52%)	38.5 ± 12.6
	t ₁	2.28	2.15	3.2	2.5
	P ₁	< 0.05	< 0.05	< 0.005	< 0.02
对照组	用药前	88.9 ± 25.6	89.7 ± 24.5	20(91%)	58.3 ± 12.5
	用药后	86.8 ± 28.1	88.6 ± 28.6	20(91%)	55.6 ± 10.6
	t ₂	1.30	1.21	0	10.9
	P ₂	> 0.10	> 0.20	> 0.50	> 0.20
两组治疗	t ₃	2.10	2.40	2.67	2.22
后比较	P ₃	< 0.05	< 0.05	< 0.02	< 0.05

生化及血、尿、便常规结果,两组患者治疗前后血、尿、便常规、肝肾功能均无明显变化。实验组用药后大便次数明显增加,平均每日大便4.3次,最多达每日12次。

3 讨论

1978年据坚 et al^[1]对一些无肝性脑病临床症状的肝硬化患者进行了严格的心理学测试发现异常,以后渐有类似报道,并提出亚临床肝性脑病的概念。亚临床肝性脑病无明显临床表现和生化异常,心理测验是检测方法之一^[2],有时可能通过简单的床边实验如数字连接实验及拼接图案实验得以发现^[3]。随着诊断方法的不断进步及对该病认识的提高,亚临床肝性脑病在临床上

的诊断率逐渐提高.国外报道肝硬化患者的亚临床肝性脑病发病率为 10-70 %^[4],国内李瑜元 et al^[5]的调查研究发现,肝硬化患者发生亚临床肝性脑病的机率为 50.7 %,肝功能损害越严重,其发生率越高.血氨升高是亚临床肝性脑病最主要的发病机制^[3],酸化肠道,保持大便通畅都有利于减少氨的吸收,从而使血氨降低^[6,7].

乳果糖是一种人工合成的不吸收含酮双糖,在肠道内不被吸收,但可被肠道内细菌分解成乳酸和醋酸,使肠道 pH 降至 6 以下,并有利于某些有益细菌,如乳酸杆菌、双歧杆菌的生长,同时抑制大肠杆菌等使蛋白质分解的细菌生长,从而使肠道产氨减少,起到降低血氨的作用.近年来,口服或保留灌肠治疗肝性脑病均取得较好的疗效^[8-10].据上海市丹尼-乳果糖粉临床协作组的研究,乳果糖粉能使肝性脑病患者的大便 pH 值及血氨水平明显下降,对肝性脑病苏醒的总有效率达 90.6 %^[11].近年有学者将乳果糖应用于亚临床肝性脑病的治疗,发现其可减轻亚临床肝性脑病,并延缓肝性脑病的发生.高月求 et al^[12]通过动物实验研究证明:乳果糖可降低血氨,改善肝脏病理,使实验鼠 Y 型电迷宫实验错误次数明显低于模型对照组,应用于临床可明显改善肝硬化患者临床症状、体征,明显降低血氨和数字连接实验的时间以及画线实验的时间及错误次数.李瑞军 et al^[13]通过家兔进行的实验研究也证明,乳果糖在急性肝功能衰竭的发生、发展过程中可以起到预防及减轻肝性脑病/亚临床肝性脑病的作用.其他一些临床研究报道也有类似结论^[14,15].

我们的研究表明,国产乳果糖口服液能有效降低亚临床肝性脑病患者的血氨水平,使部分患者脑电图恢复正常,部分患者数字连接实验、语言智商和操作智商恢复正常,无 1 例发生肝性脑病,而对照组 2 例在治疗期间发生肝性脑病.因此,对亚临床肝性脑病患者,可常规服用乳果糖口服液预防肝性脑病的发生.

4 参考文献

- 1 据坚,杨晋辉,李兆福,余曙光,张德芳,常江,胥莹,傅燕,胡琰. 亚临床肝性脑病诊断标准探讨. 云南医药 1999;20:255-256
- 2 钟碧慧,何瑶,陈旻湖,周列文,袁育红,胡品津. 亚临床肝性脑病的诊断研究. 新医学 1998;29(增刊 II):64-65
- 3 Narayanan M, Kamath PS. Managing the Complications of cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75:501-509
- 4 陈旻湖. 亚临床肝性脑病. 临床内科杂志 2001;18:93-94
- 5 李瑜元, 聂玉强, 沙卫红, 平丽, 杨富英, 余庆珠, 吴惠生. 亚临床肝性脑病的发病率调查. 中华内科杂志 2000;39:625
- 6 周海, 康海鸿. 培菲康口服加白醋灌肠辅助治疗肝性脑病 21 例临床观察. 宁夏医学杂志 2001;23:289
- 7 韩凤云. 亚临床肝性脑病患者的观察与护理. 齐鲁护理杂志 2001;7:437-438
- 8 刘朝阳, 魏素云. 双歧杆菌乳果糖口服液保留灌肠治疗肝性脑病 31 例疗效分析. 中国煤炭工业医学杂志 2001;4:813
- 9 陶秀成. 乳果糖保留灌肠治疗肝性脑病 64 例. 南通医学院学报 2001;21:40
- 10 林之莓, 周秋霞, 胡和平, 李兆申, 林庚金, 张清波, 张新年. 乳果糖治疗肝性脑病 28 例临床观察. 上海医学 1999;22:178-179
- 11 上海市丹尼-乳果糖粉临床协作组. 乳果糖粉治疗肝性脑病的临床初步报告. 中华内科杂志 1997;36:254-255
- 12 高月求, 陈建杰, 王灵台. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的实验及临床研究. 河北医学 2001;7:113-115
- 13 李瑞军, 杨昭徐. 乳果糖对临床及亚临床肝性脑病预防作用的实验研究. 胃肠病学 2000;5:214-254
- 14 吴满惠, 杨平, 薛发轩. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的疗效观察. 中国冶金工业医学杂志 2001;18:227-228
- 15 相龙云. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病. 中国新药与临床杂志 2000;19:523-524

《胆道外科疑难危重症学》修订本出版发行

本刊讯 郭振武教授是华北煤炭医学院开滦医院外科教授,河北省中西医结合肝胆病研究所所长,他编著的《胆道外科疑难危重症学》1999 年出版以来,受到广大医务界的赞誉和欢迎.2000 年获美国第五届世界传统医学大会著作一等奖国际金奖.随着医学科学的进步和知识更新的需要,重新又作了修订,增加新的内容和新的科研成果,以适应时代的需要,修订本由中国工程院院士吴咸中教授,中国工程院院士黄志强教授,香港大学医学中心玛丽医院肝胆胰外科范上达教授分别作序,给予该书高度评价,修订本由第一版的 84 万字,增至 100 余万字,插图 280 余幅,并有彩图 30 多幅,内容丰富,条理清晰,系统概述了国内外胆道外科疑难危重症中西医的基础理论和诊治方法的新进展,既收集了大量信息资料,又体现了作者的临床经验与学术思想,具有很高的学术水平和实用价值,是广大临床医生,护理工作者的重要参考书与继续教育的新教材.该书由天津科技翻译出版公司出版,全国新华书店发行,精装本定价 98 元.

(2002-11-08)

P16 蛋白与 C-erbB-2 在胰腺癌组织中表达意义

徐永泉,王艳军,林 艳,刘 香

徐永泉,王艳军,林艳,中国医科大学第二临床学院消化内科
辽宁省沈阳市 110004
刘香,沈阳市中心医院消化内科 辽宁省沈阳市 110024
项目负责人:徐永泉,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学第二临床学院消化内科.
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-12-08

摘要

目的:分析胰腺癌组织中 C-erbB-2、P16 蛋白表达的临床意义,探讨诊治胰腺癌的有效方法。

方法:40 例胰腺癌石蜡包埋标本连续 5 μ m 切片, HE 染色确定肿瘤分化程度,应用 S-P 法进行免疫组化染色, PBS 代替一抗做阴性对照。

结果: C-erbB-2 在胰腺癌组织中的阳性率为 47.5 % (19/40)。在高、中、低分化肿瘤中阳性率分别为 38.89 %、50.00 % 和 60.00 %。经检验无显著性差异 ($P > 0.05$), 但各级阳性表达率呈逐渐增高趋势。P16 蛋白在胰腺癌组织中的缺失率为 55 %, 在高、中、低分化肿瘤中缺失率分别为 27.78 %、66.67 % 和 90.00 %, 经检验有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。P16 蛋白和 C-erbB-2 蛋白的表达具有负相关性 ($P < 0.05$)。

结论:检测胰腺癌组织中 P16 蛋白及 C-erbB-2 蛋白的表达可作为胰腺癌诊断的分子生物学手段, C-erbB-2 蛋白的表达与肿瘤的恶性度有关; P16 蛋白的表达可反映胰腺癌的恶性度, 且同一肿瘤有多基因表达。

徐永泉,王艳军,林艳,刘香.P16 蛋白与 C-erbB-2 在胰腺癌组织中表达意义.
世界华人消化杂志 2003;11(1):110-111
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/110.htm>

0 引言

胰腺癌是消化系统恶性肿瘤中较难早期诊断的癌肿,预后较差.近年来本症发病率有增高倾向.应用免疫组化方法分析胰腺癌组织中 P16 蛋白, C-erbB-2 表达,探讨其临床意义及应用,指导临床治疗及对于预后的估计,提高胰腺癌诊断的准确性,改善本症存活率有着重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院外科 1997-1999 年手术切除并经病理证实为胰腺癌的标本 40 例,男 29 例,女 11 例,年龄 24-72 岁,平均年龄 (57.33 $\pm$ 11.98) 岁. HE 染色确定其分化程度,其中高分化 18 例,中分化 12 例和低分化 10 例。

1.2 方法 采用 S-P 法,每例标本切片 3 张,其中 2 张列入实验组(加单抗 C-erbB-2 和 P16 多抗),另 1 张列入空白对照组(PBS 代替一抗,余步骤同实验组).抗 P21 单克隆抗体、兔抗 P16 多克隆抗体和鼠抗 C-erbB-2 多克隆抗体均为 Santa Cruz 公司的产品,工作浓度分别为 1:70, 1:50 和 1:100. S-P 试剂盒 (Kit-9302) 为 Maxin 公司产品。

1.3 结果判断 染色阳性标记为棕黄色.染色程度按以下标准划分:每张切片分别观察 10 个高倍视野,每个高倍视野计数 100 个肿瘤细胞内的免疫染色阳性细胞数,计算出每张切片的阳性细胞百分数,按阳性细胞百分数分为 4 个等级,低于 1 % 为阴性 (-), 1-10 % 为 (+), 11-50 % 为 (++) , 51 % 以上为 (+++)。

统计学处理 采用 χ^2 检验、秩和检验。

2 结果

2.1 C-erbB-2 和 P16 蛋白的表达 C-erbB-2 蛋白的表达位于胰腺癌细胞的细胞质和胞膜,呈灶状和弥漫分布; P16 蛋白的表达位于胰腺癌细胞质内,呈弥漫性或颗粒性分布,偶见细胞核内着色. C-erbB-2、P16 蛋白在癌组织中的阳性率分别为 47.5 % (19/40) 和 45.0 % (18/40)。

2.2 癌基因蛋白的表达与病理组织学分级的关系 胰腺癌组织中 C-erbB-2 蛋白在高、中、低分化肿瘤中阳性率经 χ^2 检验无显著性差异 ($P > 0.05$), 但各级阳性表达率呈逐渐增高趋势. 40 例胰腺癌中有 22 例 P16 蛋白表达缺失, 将高、中、低分化肿瘤中的 P16 蛋白缺失率比较, 有非常显著性差异 (秩和检验, $P < 0.01$)。

表 1 胰腺癌中 C-erbB-2 的表达与病理分级的关系

病理分级	n	C-erbB-2 的表达				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
高分化	18	11	2	3	2	38.89
中分化	12	6	3	1	2	50.00
低分化	10	4	2	1	3	60.00

表 2 胰腺癌中 P16 的表达与病理分级的关系

病理分级	n	C-erbB-2 的表达				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
高分化	18	5	5	6	2	27.78
中分化	12	8	2	1	1	66.67
低分化	10	9	1	0	0	90.00

2.3 胰腺癌组织中 P16 蛋白与 C-erbB-2 表达的关系
P16 蛋白与 C-erbB-2 表达呈负相关性 ($P < 0.05$), 说明同一肿瘤有多基因的表达。

3 讨论

癌基因的活化与表达是肿瘤发生与发展中主要的病理基础, 肿瘤的发生是多病因参与的多阶段过程, 各种肿瘤应有 1 个癌基因谱的参与, 不同肿瘤有所差异。目前发现的细胞癌基因都是单拷贝结构基因, 都有编码产物, 细胞癌基因通过其编码产物引起细胞增生。胰腺癌的发生、发展与原癌基因、抑癌基因的异常有关, 本研究检测胰腺癌组织中 C-erbB-2、P16 蛋白的表达, 证实了肿瘤的发生是多基因表达的癌基因谱的概念。

C-erbB-2 癌基因又称为 neu 或 HER-2, 编码分子量为 185 Ku 的穿膜蛋白, 与表皮生长因子同源, 该蛋白可抑制酪氨酸激酶的活性。C-erbB-2 的激活一般是通过基因扩增实现的, 可见于多种肿瘤, 其表达部位位于肿瘤细胞或非肿瘤细胞胞质和胞膜上。也有人认为 P185 蛋白表达以细胞膜型为主, 尤其在乳腺肿瘤、胰腺癌及肺癌。根据肿瘤部位不同, P185 阳性表达率差异较大, 胰腺癌为 47%。几次大规模的实验均表明其过量表达与肿瘤的发生、分化程度和核分级密切相关^[1]。本结果阳性率为 47.5%。C-erbB-2 的表达与病理分级无关, 但表达率随病理分级逐级提高而有明显增高趋势, 提示与肿瘤的恶性度有关。

P16 蛋白由 P16 基因编码的 16KD 蛋白分子, P16 基因是近年发现的一种肿瘤抑制基因, 又称 MTS1, INK4, CDK4, CDK2 基因。P16 蛋白的主要作用是抑制依赖细胞激酶(cyclin-dependent kinase CDK)的活性。细胞进入增生周期, 有赖于 CDK 的活性, 而 CDK 必须与细胞周期蛋白(cyclin)结合形成cyclin复合体后才能被活化, 后者使 Rb 蛋白产物 P110Rb 蛋白磷酸化, 从而促进细胞进入增生周期的 G1-S 期。P16 基因对细胞的生长起着十分重要的负调节作用, 防止细胞的生长失控^[2-4]。当 MTS1 基因缺失或突变而不能正常表达时, P16 蛋白就不能竞争结合 CDK4 阻止细胞进入有丝分裂, 会增加周期蛋白 D 与 CDK4 的结合而增加 CDK4

的活性, 促进细胞的有丝分裂, 从而使细胞生长失控, 导致进一步癌变^[5,6]。有报道胰腺癌 P16 蛋白的表达与胰腺癌的组织学分级无显著关系, 但与胰腺癌有无淋巴结转移关系密切 ($P < 0.01$), 提示 P16 蛋白可能是预测胰腺癌患者预后的一个重要指标^[1]。也有报道癌组织中的 P16 基因变异与临床分期密切相关, 提示 P16 基因在原发性胰腺癌的发生、发展过程中发挥着非常重要的作用^[7]。本研究 P16 蛋白的缺失率为 55.0%, 且在不同分化程度的肿瘤中缺失率有明显差异, 肿瘤分化程度越低, 其缺失率越高, P16 蛋白的表达可反映肿瘤的恶性度, 其可以与病理诊断同时进行, 从而提供一种辅助诊断的方法, 并且为估计患者的预后提供帮助。借助于 P16 基因及其产物的检测, 可判断胰腺癌发展及评估其预后。P16 靶基因治疗可能是治疗原发性胰腺癌的一条有效途径^[8,9]。P16 蛋白和 C-erbB-2 蛋白之间表达存在的负相关性, 说明胰腺癌的发生、发展与 P16 和 C-erbB-2 基因均有关系。

4 参考文献

- 1 纪小龙, 施作霖主编. 诊断免疫组织化学. 第 1 版. 军事医学科学出版社, 1997:70
- 2 Norbori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-756
- 3 Marx J. A challenge to p16 gene as a major tumor suppressor. *Science* 1994; 24:1846
- 4 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulator motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366:634
- 5 Dreyling MH, Bohlander SK, Le Beau MM, Olopade OI. Refined mapping of genomic rearrangements involving the short arm of chromosome 9 in acute lymphoblastic leukemias and other hematologic malignancies. *Blood* 1995; 86:1931-1938
- 6 Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Henglein B, Jansen-Durr P. Activation of the E2F transcription factor by cyclin D1 is blocked by P16INK4, the product of the putative tumor suppressor gene MTS1. *Oncogene* 1994; 9: 3475-3482
- 7 陈建锋, 俞金龙, 汪爽, 高毅. 胰腺癌组织 P16 蛋白表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:237
- 8 郑世曦, 李孝圭, 周利军, 朱兴族. P16 真核表达载体的构建及其对肝癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2000;8:49-51
- 9 鲁建国, 林晨, 黄志强, 吴金生. 腺病毒介导的 P16 和顺铂的联合应用对胆管癌细胞系 QBC939 的生长抑制作用. 世界华人消化杂志 2000;8:641-645

大剂量维生素 C 辅助治疗急性胰腺炎的临床疗效观察

杜卫东,沈达明,袁祖荣,黄春锦,唐健雄,郑松柏

杜卫东,沈达明,袁祖荣,黄春锦,唐健雄,上海市华东医院普外科
上海市 200040
郑松柏,上海市华东医院消化内科 上海市 200040
项目负责人:杜卫东,200040,上海市延安西路 221 号,上海市华东医院.
duzhuyi@sh163.net
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-18

摘要

目的:观察大剂量维生素C(Vit. C)对急性胰腺炎的辅助治疗作用。

方法:将 84 例胰腺炎患者随机分为治疗组和对照组。治疗组应用 Vit. C 10 g 稀释于 5 % 葡萄糖 500 mL 中静脉滴注, 1 次 / $\times$ 5 d; 对照组应用 Vit. C 1 g 稀释于 5 % 葡萄糖 500 mL 中静脉滴注, 1 次 / $\times$ 5 d。观察两组患者临床症状和体征、血淀粉酶、尿淀粉酶、白细胞的变化、住院天数、并发症、死亡率, 治疗前后血浆维生素 C (P-VC), 细胞因子 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP 水平的变化。

结果:治疗组病例体温恢复快, 呕吐症状消失早, 血淀粉酶、尿淀粉酶和白细胞恢复正常时间短, 治愈率高, 并发症发生率低, 住院时间明显缩短; 治疗后 5 d 的血清 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 明显低于对照组, 而两组病例血清 CRP 无显著差异。

结论:大剂量维生素C对急性胰腺炎有一定的辅助治疗作用。

杜卫东,沈达明,袁祖荣,黄春锦,唐健雄,郑松柏.大剂量维生素C辅助治疗急性胰腺炎的临床疗效观察.世界华人消化杂志 2003;11(1):112-114
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/112.htm>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的治疗一直是外科的一大难题, 急性重症胰腺炎病情危重, 临床上常常并发全身炎症反应综合征(system inflammatory response syndrome, SIRS), 并可能因此发展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction, MODS).研究表明, 白细胞过度激活及其释放的细胞因子, 体内自由基释放和清除机制的失衡等诸多因素所导致的一系列病理生理改变均可能在发病过程中起重要的作用.血浆抗坏血酸即维生素C(ascorbic acid, Vit. C)是重要的抗氧化剂和抗氧化酶, 能保护机体免受炎症侵害.我们将 84 例 AP 患者随机分成常规 Vit. C 对照组和大剂量 Vit. C 治疗组, 观察大剂量维生素 C 静脉滴注治疗在 AP 治疗中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 参照中华医学会外科学会胰腺外科组急性胰

腺炎的诊断标准(1996 年第 2 方案制定纳入标准和排除标准), 随机选择我院 1996-2001 年 84 例 AP 患者, 男 53 例, 女 31 例. 年龄 25-71 岁(42 ± 13)岁. 除外心、脑、肺、肝、肾等主要脏器疾病、消化性疾病、糖尿病、自身免疫性疾病和肿瘤等. 根据分级标准 1996 年第 2 次方案, 轻型急性胰腺炎(MAP)70 例, 重症胰腺炎(SAP)14 例. 治疗组 40 例, 其中男 25 例, 女 15 例, 年龄 27-69 岁(40 ± 12 岁), MAP 33 例, SAP 7 例. 对照组 44 例, 其中男 28 例, 女 16 例, 年龄 25-71 岁(43 ± 14 岁), MAP 37 例, SAP 7 例. 两组在年龄、性别和分级方面均无显著差异($P > 0.05$). 40 人为健康志愿体检者作为对照, 其中男 26 人, 女 14 人, 年龄 28-66 岁(47 ± 14 岁), 年龄、性别与病例对照组和治疗组在统计学上无显著差异($P > 0.05$).

1.2 方法 两组患者均采用抑制胰酶分泌、解痉、镇痛、维持水电解质平衡、防治感染及各种并发症等常规治疗. 根据病情予禁食和胃肠减压等. 治疗组加用 Vit. C 10 g 稀释于 5 % 葡萄糖 500 mL 中静脉滴注, 1 次 / $\times$ 5 d; 对照组应用 Vit. C 1 g 稀释于 5 % 葡萄糖 500 mL 中静脉滴注, 1 次 / $\times$ 5 d. (1) 观察指标: 腹痛、发热、呕吐等症状消失时间, 血淀粉酶、尿淀粉酶、白细胞计数恢复时间、住院天数及治疗前和治疗 5 d 后次日早晨空腹肘静脉采血, 测定血浆 Vit. C (P-VC)、SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 CRP 水平. (2) 测量方法: P-VC 采用亚铁嗉显色分光光度比色法, 单位为 $\mu\text{mol/L}$; SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 采用 ELISA 法检测, 试剂盒均由瑞士 Roche 公司提供, 单位为 pmol/L ; CRP 采用快速免疫消浊比浊法测定, 单位为 mg/L . 临床治愈: 腹痛、呕吐、发热等症状消失, 血、尿淀粉酶及白细胞计数恢复正常, 影像学检查正常. 好转: 临床症状减轻或消失, 实验室检查基本正常. 无变化: 临床症状、体征及实验室检查同入院前. 恶化: 病情加重, 出现严重并发症或死亡。

统计学处理 各指标测定结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 采用 SPSS10.0 统计软件包分析处理数据, 假设检验方法包括 t 检验 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 患者组与健康组 P-VC、SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 CRP 检查结果(表 1) AP 患者与正常人群相比较 P-VC 的平均含量明显降低, 而血清 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 CRP 的水平明显增高, 有显著

差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 大剂量 Vit. C 治疗组和常规剂量对照组临床症状和实验室检查结果比较(表 2、表 3) 治疗组较对照组除腹痛症状缓解和呕吐症状消失无显著差异外, 其余各项临床症状缓解快, 消失快.实验室检查指标恢复正常时间短, 住院时间短.治疗 5 d 后, 治疗组较对照组的治愈率高, 恶化率低, 且均存在显著差异($P < 0.05$)。

2.3 两组治疗前后 P-VC、SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 CRP 变化结果比较(表 4) 两组治疗前 P-VC、SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP 的平均含量无显著差异($P > 0.05$)。5 d 治疗后, 治疗组的 P-VC 平均含量较治疗前明显增高, 且与对照组存在显著差异($P < 0.05$), 但仍然低于正常人群的指标($P > 0.05$);治疗组血清 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平较对照组明显降低, 均有统计学意义($P < 0.05$), 而 CRP 水平虽较对照组降低, 但无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 患者组与健康组 P-VC、SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 CRP 水平

	患者组 ($n=84$)	对照组 ($n=40$)	P
P-V($\mu\text{mol/L}$)	38.23 $\pm$ 9.12	55.12 $\pm$ 13.24	<0.05
SIL-2R (pmol/L)	213.42 $\pm$ 54.68	72.34 $\pm$ 23.17	<0.01
TNF- α (pmol/L)	3.67 $\pm$ 1.01	0.58 $\pm$ 0.15	<0.01
IL-6 (pmol/L)	92.43 $\pm$ 25.67	29.57 $\pm$ 11.64	<0.01
IL-8 (pmol/L)	267.58 $\pm$ 121.88	60.49 $\pm$ 25.35	<0.01
CRP (mg/L)	18.30 $\pm$ 7.35	8.34 $\pm$ 4.17	<0.01

表 2 两组 AP 临床症状和实验室检查指标结果比较 ($\bar{x} \pm s$, h)

	治疗组 ($n=40$)	对照组 ($n=44$)	P
体温恢复正常	65.75 $\pm$ 14.26	89.71 $\pm$ 16.25	<0.05
腹痛缓解	23.43 $\pm$ 5.66	25.31 $\pm$ 6.37	>0.05
腹痛消失	55.23 $\pm$ 10.08	54.23 $\pm$ 11.73	>0.05
呕吐消失	43.19 $\pm$ 12.65	51.67 $\pm$ 10.93	<0.05
血淀粉酶恢复	79.14 $\pm$ 19.64	91.45 $\pm$ 10.45	<0.05
尿淀粉酶恢复	100.22 $\pm$ 19.22	122.38 $\pm$ 13.56	<0.05
白细胞恢复	69.59 $\pm$ 15.41	81.34 $\pm$ 14.05	<0.05

表 3 两组 AP 临床疗效比较 (% , d)

	<i>n</i>	治愈	好转	无效	恶化	住院
治疗组	40	30(75.00)	4(10.00)	4(10.00)	2(5.00)	9.34 $\pm$ 4.24
对照组	44	18(40.91)	10(22.73)	6(13.64)	6(13.64)	13.45 $\pm$ 3.21
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 两组 AP 治疗前后各检测指标变化结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

	治疗组 ($n=40$)		对照组 ($n=44$)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
P-VC(μmol)	36.25 $\pm$ 10.12	52.06 $\pm$ 12.11 ^a	37.55 $\pm$ 9.15	41.77 $\pm$ 11.21
SIL-2R (pmol/L)	221.67 $\pm$ 87.30	118.37 $\pm$ 43.68 ^a	196.52 $\pm$ 63.28	178.84 $\pm$ 30.56
TNF- α (pmol/L)	3.65 $\pm$ 1.25	1.52 $\pm$ 0.78 ^b	3.99 $\pm$ 1.34	2.46 $\pm$ 1.04
IL-6 (pmol/L)	95.58 $\pm$ 18.64	39.53 $\pm$ 10.36 ^b	89.22 $\pm$ 12.03	59.83 $\pm$ 9.48
IL-8 (pmol/L)	273.49 $\pm$ 88.50	127.35 $\pm$ 49.86 ^a	261.47 $\pm$ 64.97	198.31 $\pm$ 28.50
CRP (mg/L)	19.19 $\pm$ 9.37	8.70 $\pm$ 4.65	17.56 $\pm$ 5.62	9.42 $\pm$ 5.84

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 治疗后。

3 讨论

AP 的发生和发展与体内自由基的释放和清除机制的紊乱, 从而导致体内氧化 - 抗氧化损伤机制失衡有密切的关系^[1]. 通常机体在新陈代谢中产生的自由基, 能被抗氧化防御系统迅速清除. 自由基的抗氧化系统包括抗氧化酶类和抗氧化剂^[2]. 这些抗氧化剂和抗氧化酶主要通过捕捉和清除机体内过量的自由基, 阻止一系列自由基连锁反应的病理性加剧和抗氧化动态平衡失调而发挥作用^[3]. Vit. C 是人体最重要的抗氧化剂和抗氧化酶, 在抗感染中起着十分重要的作用, 能有效地捕捉和清除人体内过量的自由基, 阻断和防止一系列自由基连锁反应病理性加剧, 保护细胞免受氧化和过氧化损伤^[4]. 研究表明, 病理状态下过量的自由基可造成组织和细胞损伤^[5], 自由基参与 AP 时胰腺水肿的形成过程, 并可能参与胰腺的坏死进程^[5]. AP 发生时, Vit. C 首先消耗, 很快与超阴离子、氢过氧基和羟自由基发生反应, 生成 Vit. C 自由基, 可阻止氧化剂破坏 DNA, 能保护脂质膜免受自由基的过氧化损害^[6]. AP 患者体内 Vit. C 有不同程度的下降^[7], 下降的低峰一般出现在发病 1-5 d 内, 并且 Vit. C 的水平与病情严重性相关^[8, 9]. 同时 AP 发生时常伴有细胞因子的升高, 而升高的幅度与病情的严重程度有密切关系^[10, 11]. MAP 进展为 SAP 是由于促炎因子所产生的一系列连锁反应和放大反应, 即瀑布效应, 导致 SIRS 和 MODS^[12, 13]. 因此, 细胞因子 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP 的水平检测可作为 AP 治疗的疗效和病情恢复的观察指标^[14-16].

本实验结果显示 AP 患者的 P-VC 平均含量明显低于正常人群, 发现早期大剂量应用 Vit. C 有助于及时提高 P-VC 水平, 使其在清除机体有害自由基方面发挥作用, 保护细胞免受自由基的损害. AP 患者的 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP 的水平明显高于正常人群, 大剂量 Vit. C 治疗后, 患者的 SIL-2R、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著降低, 且明显低于对照组. 治疗组患者的发热、恶心、呕吐等临床症状改善时间短, 血淀粉酶、尿淀粉酶和白细胞数量

等实验室检查恢复正常时间明显短于对照组,治疗效果亦明显优于对照组.因此我们认为应用大剂量 Vit. C 辅助治疗 AP 有充分的理论依据和一定的临床实用价值.

4 参考文献

- Schulz HU, Niederau C, Klonowski Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H. Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2736-2750
- Tsai K, Wang SS, Chen TS, Kong CW, Chang FY, Lee SD, Lu FJ. Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis. *Gut* 1998; 42:850-855
- Braganza JM, Scott P, Bilton D, Schofield D, Chaloner C, Shiel N, Hunt LP, Bottiglieri T. Evidence for early oxidative stress in acute pancreatitis. Clues for correction. *Int J Pancreatol* 1995;17: 69-81
- Siemiakowska W, Dabrowski A, Jedynak M, Gabryelewicz A. Oxidative stress as an early prognostic factor in acute pancreatitis (AP): its correlation with serum phospholipase A2 (PLA2) and plasma polymorphonuclear elastase (PMN-E) in different-severity forms of human AP. *Pancreas* 1998;17:163-168
- Scott P, Bruce C, Schofield D, Shiel N, Braganza JM, McCloy RF. Vitamin C status in patient with acute pancreatitis. *Br J Surg* 1993; 80: 750-754
- Kruse P, Anderson ME, Loft S. Minor role of oxidative stress during intermediate phase of acute pancreatitis in rats. *Free Radic Biol Med* 2001;30:309-317
- Bonham MJ, Abu-Zidan FM, Simovic MO, Sluis KB, Wilkinson A, Winterbourn CC, Windsor JA. Early ascorbic acid depletion is related to the severity of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1999;86: 1296-1301
- Cartmell MT, Kingsnorth AN. Acute pancreatitis. *Hosp Med* 2000;61:382-385
- Nonaka A, Manabe T, Tobe T. Effect of a new synthetic ascorbic acid derivative as a free radical scavenger on the development of acute pancreatitis in mice. *Gut* 1991;32:528-532
- Lipsett PA. Serum cytokines, proteins, and receptors in acute pancreatitis: mediators, markers, or more of the same? *Crit Care Med* 2001;29:1642-1644
- Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okajima T, Okamoto K, Ogawa M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2000;21:141-146
- Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000;47:546-552
- Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. *Crit Care Med* 1999;27:749-755
- Berney T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, Vermeulen B, Morel P. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:371-377
- Chen CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:213-218
- Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, Ohara H, Yamada T, Yamada H, Iida M, Nakazawa T, Ogasawara T, Uchida A, Hasegawa C, Miyaji M, Takeuchi T. Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 1997;14:1-8

《胃肠道 CT 诊断学》出版发行

本刊讯 本刊编委张晓鹏教授编著的《胃肠道 CT 诊断学》于 2001 年由辽宁科学技术出版社出版,全国新华书店发行.

自 1972 年 CT 应用于临床以来,影像诊断学发生了巨大变化.新技术设备的开发与应用为我们提供了探求、获得和更新知识的有利条件.

胃肠道 X 线造影检查经历了由单对比向双对比发展的变化过程,双对比造影理论与实践研究,为胃肠道影像学发展奠定了坚实基础.

利用 CT 进行胃肠道影像诊断学研究,有助于提高我们的认识,对于进一步丰富胃肠道影像学内容也能起到一定作用.

本书是在总结我们工作经验的基础上,参考国内外先进经验编写而成.书中 CT 照片均为我们临床工作中的病例,考虑到胃肠道解剖与病理学特点,尽可能将重点病例连续层面图像展示给读者,以便客观、全面、立体地理解胃肠道 CT 影像学表现.

结肠癌患者血中sICAM-1和sVCAM-1变化的临床意义

陈春生,张 宏,丛进春,尚 羿

陈春生,张宏,丛进春,中国医科大学第二临床学院普外四科
辽宁省沈阳市 110004
尚羿,沈阳市第一人民医院普外科 辽宁省沈阳市 110042
辽宁省自然科学基金资助课题, No.962276
项目负责人:陈春生,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学
第二临床学院普外四科.
收稿日期:2002-10-07 收审日期:2002-10-29

摘要

目的:探讨结肠癌患者血中可溶性细胞黏附分子-1(sICAM-1)和可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)的变化及临床意义.

方法:双抗体夹心ELISA法对46例结肠癌患者血中sICAM-1和sVCAM-1进行了测定.

结果:结肠癌患者血中sICAM-1和sVCAM-1均高于正常对照组,结肠癌转移组升高更为明显.

结论:sICAM-1和sVCAM-1在结肠癌的发病过程中具有重要作用,并可以作为结肠癌病情变化的监测指标之一.

陈春生,张宏,丛进春,尚羿.结肠癌患者血中sICAM-1和sVCAM-1变化的临床意义.世界华人消化杂志 2003;11(1):115-116
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/115.htm>

0 引言

细胞黏附分子-1(sICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)等细胞表面黏附分子对细胞间的相互作用具有重要意义^[1,2],近年在肿瘤发生、发展中的作用日益引起重视^[3,4].研究通过对46例结肠癌患者血中上述二种物质的检测,探讨其在结肠癌发病及诊断中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌患者46例,均为我院住院患者,男29例,女17例,年龄35-63岁,平均47.6岁.全部患者均经手术病理检查证实.其中腺癌41例,黏液癌3例,未分化癌2例.病程3-15 mo.其中伴有不同程度转移者16例(淋巴结或肝转移).正常对照20名,均为正常献血员.男女各10名,年龄25-48岁,平均32.9岁.

1.2 方法 受试对象晨起抽取静血6 mL,离心后取血清置于-80℃冰箱保存,全部标本统一检测.检测方法为双抗体夹心ELISA法.试剂购于北京岳泰生物制品公司.检测操作严格按试剂盒要求进行.

统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用t检验.

2 结果

2.1 结肠癌患者血中sICAM-1和sVCAM-1的变化 二者均有增高,以sICAM-1增高明显,与对照组比较差异显著.(表1).

表1 结肠癌患者血中sICAM-1和sVCAM-1的变化($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	sICAM-1	sVCAM-1
正常对照	20	259.34±31.87	537.15±07.32
结肠癌	46	447.89±3.06 ^a	668.72±165.73 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

2.2 将转移组与非转移组患者血中上述二种物质的变化进行分析 sVCAM-1在结肠癌转移组增加更为明显(表2).

表2 结肠癌患者转移组与非转移组血中sICAM-1和sVCAM-1的变化($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	sICAM-1	sVCAM-1
癌非转移组	30	402.8±39.44 ^b	611.34±105.23 ^a
癌转移组	16	538.96±63.02 ^b	804.81±213.27 ^b
对照组	20	259.34±31.87	537.15±107.32

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

3 讨论

黏附分子是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间黏附作用的膜表面糖蛋白.他们在胚胎的发育和分化,正常组织结构的维持,炎症与免疫应答,伤口修复,凝血以及肿瘤的进展和转移等多种生理、病理过程中均具有重要作用.

sICAM-1属黏附分子中免疫球蛋白家族成员,他由ICAM-1膜外部分脱落入血而成,通过降低自然杀伤细胞的活性,增加肿瘤细胞浸润及转移功能,在正常人体内, sICAM-1含量较低,但在许多肿瘤患者血中,sICAM-1明显增高.在结肠癌患者,更是如此^[5],本研究再次证明了这一点.结肠癌患者血中sICAM-1明显高于正常对照组,即使在无转移的相对早期的结肠癌患者血中,也表现为明显增高,因此,其在结肠癌的诊断,特别是早期诊断中具有重要意义.随着病情进展, sICAM-1在癌转移组增高更明显.所以,他在反映疾病进展程度上具有更重要的临床意义.

sVCAM-1也称诱导性细胞黏附分子,在脑脊液及滑

膜液中可检出 sVCAM-1. 肿瘤与炎症患者血中 sVCAM-1 可增高. 其主要作用除反映肿瘤患者体内细胞免疫功能紊乱外, 也反映肿瘤存在时某些特殊物质的释放, 导致肿瘤的不断扩展, 浸润, 肿瘤内外血管的增生变化, 微血管改变的存在^[6]. 虽然在结肠癌无转移患者血中 sVCAM-1 有增加, 但他的主要增高仍表现在癌症转移组, 这进一步说明了 sVCAM-1 与 sICAM-1 一样, 他同样可以随肿瘤病情的变化而变化, 特别在反映肿瘤出现转移时更有实际意义. 将 sICAM-1 和 sVCAM-1 的检测结合起来, 可能对结肠癌的早期诊断及转移的判断提供有用指标.

4 参考文献

- 1 Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;345:425-434
- 2 Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-20101
- 3 贾卫国, 安振国. 可溶性黏附分子 -1. *华西医学* 1997;12:465-466
- 4 Tsujisaki M, Imai K, Hirata H, Hanzawa Y, Masuya J, Nakano T, Sugiyama T, Matsui M, Hinoda Y, Yachi A. Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant disease. *Clin Exp Immunol* 1991;85:3-8
- 5 Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, Hall NR, Jones M, Wyatt J, Miller K, Ward U, Almaskatti J, Singh SM, Finan PJ, Ambrose NS, Primrose JN, Sel PJ. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1857-1863
- 6 Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Wildi S, Muller C, Grabe H, Schilling M, Buchler MW. Overexpression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 1998;79:76-81

《中华影像医学·消化分册》出版发行

本刊讯 我国著名胃肠放射学家尚克中教授主编的《中华影像医学·消化分册》已于今年6月由人民卫生出版社出版. 该书是《中华影像医学》系列丛书中的消化部分, 也是总结我国消化影像医学成果, 反映当今国际消化影像医学发展最新动态的一本高级参考书.

该书由全国22位著名的老专家、知名中青年专家共同编写, 主要反映当代消化影像学发展的新水平, 对于已经或即将用于临床的各种成像技术、检查方法、新征象、新理论以及新治疗方法, 则以我国学者自己的资料为主加以较为详尽的介绍. 在叙述消化疾病的影像学表现时, 考虑疾病的共性和个性的关系, 以使读者能正确地把握疾病的影像学一般规律. 该书在介绍常见病、多发病的基础上, 对罕见、少见病也作简要介绍. 全书25万字, 近400幅图; 文字简明、扼要、通顺, 叙述层次结构合理, 具有逻辑性、连贯性; 名词术语规范统一, 具有较强的可读性. 该书的内容具有科学性、先进性、权威性和实用性的特点, 是一本高层次、高品位和高水平的消化影像医学重点参考书. 特此推荐给消化内科、消化外科、胃肠专科、放射科等临床各级医师, 同时也适合实习同学、进修医师、研究生等各类人员作为学习用的教科书或参考书. 需要该书者请到全国各大新华书店购买. (程英升 2002-11-08)

直肠上动脉灌注美蓝指导全直肠系膜切除

陈远光,陈道瑾,金钦文,吴君晖,钱立元

陈远光,陈道瑾,金钦文,吴君晖,钱立元,中南大学湘雅三医院普外科
湖南省长沙市 410013
项目负责人:陈远光,410013,湖南省长沙市岳麓区桐子坡路,中南大学湘雅三医院普外科. chenylg69@163.com
收稿日期:2002-08-24 接受日期:2002-10-03

摘要

目的:探讨经直肠上动脉灌注美蓝对全直肠系膜切除的指导意义。

方法:25例直肠癌术中经直肠上动脉灌注美蓝后行全直肠系膜切除,观察术中、术后解剖病理所见、出血量、手术时间、淋巴结检查情况等,并与20例未行动脉灌注美蓝者对照。

结果:经直肠上动脉灌注美蓝后,包裹在盆筋膜脏层内的直肠及其系膜染色明显,与不染色的盆筋膜脏层外的组织易于区分,直肠筋膜囊能完整保持,平均出血量、手术时间、淋巴结检出数目分别为 96.81 ± 50.12 mL、 $3.71\text{h} \pm 0.76\text{h}$ 、 21.44 ± 9.07 个,而对照组分别为 250.24 ± 80.64 mL、 $5.07 \pm 1.25\text{h}$ 、 12.75 ± 5.93 个,两组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

结论:直肠上动脉灌注美蓝降低了全直肠系膜切除的手术难度,有指导意义。

陈远光,陈道瑾,金钦文,吴君晖,钱立元.直肠上动脉灌注美蓝指导全直肠系膜切除.世界华人消化杂志 2003;11(11):117-119
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/117.htm>

0 引言

手术切除是最明确的对直肠癌有治疗效果的方法,直肠癌的治疗是以手术为主的综合治疗^[1, 2],但传统根治手术有较高的局部复发率,1982年 Heald et al 提出全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME),大量研究证明该手术可以明显降低复发率,目前已经成为直肠癌根治手术的金标准,但是该手术存在着解剖难度大、出血多、耗时长等问题^[1, 3-11].我们近来采用术中经直肠上动脉灌注美蓝染色后行TME,解决了以上问题,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 两组共45例直肠癌患者,灌注美蓝组25例,对照组为20例,均无远处转移,两组的一般资料见表1。

1.2 方法

1.2.1 美蓝灌注方法 灌注美蓝组行TME前按照我们曾

报道的方法经动脉灌注美蓝^[12, 13],首先分离直肠上动脉,头皮针穿刺成功后缓慢注入美蓝8 ml,然后结扎直肠上动、静脉。对照组行TME前未行经直肠上动脉穿刺灌注美蓝。

1.2.1 TME操作 两组均按照 Heald et al 介绍的方法进行^[3, 4],直视下在骶前间隙、盆筋膜脏层与壁层间锐性分离,保持包裹直肠后脂肪及淋巴血管的盆筋膜脏层完整无损,肿瘤远端直肠系膜切除不少于5 cm,肠段切除2 cm以上。

1.2.3 术后标本的淋巴结检出 将标本平铺,从血管结扎处开始,按照肠系膜下动脉→直肠上动脉→直肠上动脉分支的顺序沿血管依次剪开系膜,将分布于血管旁的淋巴结一一挑出,送常规组织学检查^[13, 14]。

统计学处理 数据应用SPSS10.0软件处理。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异性比较用t检验。计数资料的比较用 χ^2 检验。

表1 两组的一般资料

	灌注组	不灌注组	P 值
性别			
男	16	13	
女	9	7	0.94
平均年龄(岁)	56.44 ± 11.63	54.20 ± 11.08	0.516
位置			
上段	3	2	
中段	15	13	
下段	7	5	0.941
浸润深度 pT ₁	3	2	
pT ₂	10	7	
pT ₃	12	11	0.18

表2 两组手术时间、失血量及淋巴结检出情况

	灌注组	不灌注组	P 值
平均手术时间(h)	3.71 ± 0.76	5.07 ± 1.25	<0.01
平均失血量(ml)	96.81 ± 50.12	250.24 ± 80.64	<0.01
平均每例淋巴结检出数目(个)	21.44 ± 9.07	12.75 ± 5.93	<0.01
转移病例平均阳性淋巴结数目(个)	4.15 ± 2.30	2.57 ± 1.51	0.121
转移率(转移病例数与病例总数之比)	68 % (17/25)	50 % (9/20)	0.12

2 结果

2.1 术中所见 经直肠上动脉穿刺灌注美蓝后,直肠及其系膜染成蓝色,而周围组织不染色,两者分界明显,以此分界为标志,很容易分离,尤其在腹膜反折以上更为显著(图1)。在骶前间隙分离时可见骶前筋

膜不染色(图2),仔细分离至直肠两侧下部时尚可见白色的神经丛.分离侧韧带时,也可见直肠筋膜囊内染蓝色,与筋膜囊外不染色的组织区分明显,在侧韧带根部剪断之,只需压迫或一次结扎直肠下动脉止血.检查切除的标本,见直肠筋膜囊完整,系膜内的淋巴结为美蓝染成蓝色,与周围脂肪组织区分明显,便于检查(图3).

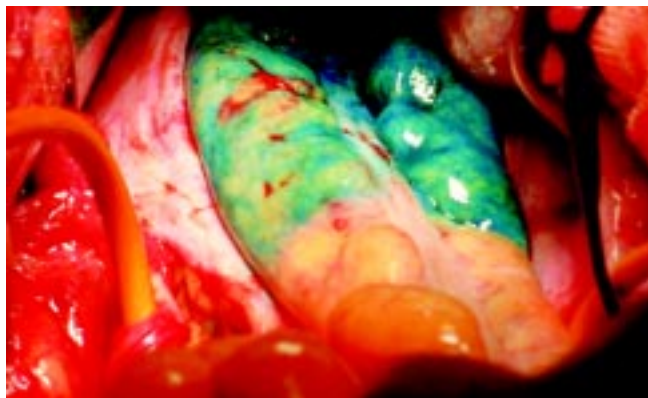


图1 直肠及其系膜与周围组织分界明显

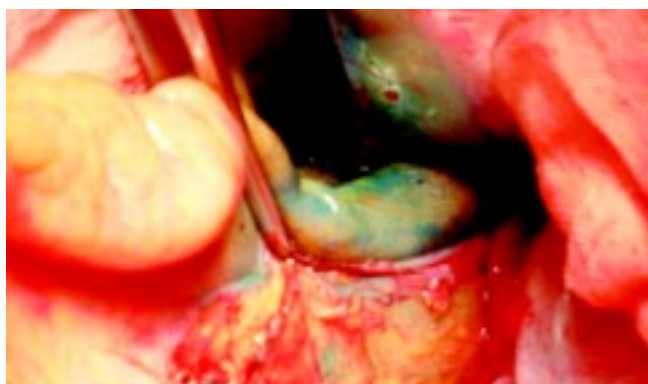


图2 骶前间隙分离时透见直肠系膜呈蓝色



图3 切除的标本上直肠筋膜囊完整,淋巴结蓝染

2.2 灌注组的手术时间和失血量均较不灌注组明显减少,术后标本淋巴结检出数目增加(表2).

2.3 两组标本的远切端及系膜切缘均无癌,均无吻合口瘘.

3 讨论

研究证实,TME 可以将直肠癌的复发率降低,提高生存率,目前已经成为直肠癌根治手术的金标准,但是TME 手术仍然存在着解剖难度大、出血多、耗时长、易发生吻合口瘘等缺点^[1,3-11],故现在TME 未能在临床广泛应用,尤其是未能在基层医院推广.我们认为其根本原因是术中缺乏一个明显标志,以区分包裹在盆筋膜脏层内的直肠系膜和包裹在盆筋膜脏层外的周围组织.

从解剖上看,在直肠周围脂肪和盆壁之间存在着一个后间隙,分别被盆筋膜脏层和壁层所覆盖,盆筋膜脏层包裹的直肠周围脂肪、血管、淋巴管构成直肠系膜^[15,16].直肠上动脉主干经乙状结肠系膜的两层间进入盆腔,到达直肠后壁中部后分为左右两支,以后再分数支穿直肠壁达黏膜下,其终末支相互吻合,并与直肠下动脉、肛门动脉的分支在齿线上下有吻合.直肠上动脉及其分支是直肠系膜的主要供应血管^[16].因此,从直肠上动脉灌注美蓝,盆筋膜脏层内的直肠系膜染成蓝色,而由于盆筋膜的分隔作用,盆筋膜脏层外的周围组织如盆筋膜壁层及其下的自主神经不能染色.在TME 术中,经直肠上动脉灌注美蓝,可以提供一个清晰的区分手术范围的标记,降低了手术难度.这在本研究中得到了证实,灌注组的手术时间和失血量均较不灌注组明显减少($P<0.01$,表2).

术后标本淋巴结的检出数目同时,经直肠上动脉灌注美蓝后,术后标本淋巴结的检出数目增加($P<0.01$),转移病例的阳性淋巴结数目和转移率也增加(见表2),与我们以前的研究一致^[13,14,17].这一结果也提示,经直肠上动脉灌注美蓝可能更有利于术中淋巴清扫提高手术的根治性.

我国自1990年代初引进TME 技术,但是现在TME 未能在临床广泛应用,尤其是未能在基层医院推广.这与通常TME 手术未能规范化有关.最近,欧洲癌症研究及治疗组织消化组主席Bernard Nordlinger指出,TME 具有一定难度,规范化的手术才能提高疗效^[18].本研究提示从直肠上动脉灌注美蓝指导TME 手术,由于术中始终有一个明显的颜色标志区分包裹在盆筋膜脏层内的直肠系膜和包裹在盆筋膜脏层外的周围组织,使TME 在不影响根治性的同时由繁变简,也容易规范化,便于临床广泛应用,尤其是能在基层医院推广.

总之,经直肠上动脉灌注美蓝指导TME,由于有明显的颜色标志,手术操作更为简便,易规范化,值得进一步研究.

4 参考文献

- 1 郑树.直肠癌诊治进展.中华外科杂志 2001;39:19-20
- 2 张振书,张亚历.中国大肠癌研究进展.世界华人消化杂志 2001;9:489-494
- 3 Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery—the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982;69:613-616
- 4 Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total

- mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986;1:1479-1482
- 5 Reynolds JV, Joyce WP, Dolan J, Sheahan K, Hyland JM. Pathological evidence in support of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Br J Surg* 1996;83:1112-1115
- 6 Enker WE. Total mesorectal excision—the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Ann Med* 1997;29:127-133
- 7 Goldberg S, Klas JV. Total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer: a view from the USA. *Semin Surg Oncol* 1998;15:87-90
- 8 Wiig JN, Carlsen E, Soreide O. Mesorectal excision for rectal cancer: a view from Europe. *Semin Surg Oncol* 1998;15:78-86
- 9 Law WL, Chu KW. Strategies in the management of mid and distal rectal cancer with total mesorectal excision. *Asian J Surg* 2002;25:255-264
- 10 Wibe A, Moller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig JN, Heald RJ, Langmark F, Myrvold HE, Soreide O. Norwegian rectal cancer group. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer—implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum* 2002;45:857-866
- 11 周建平.全直肠系膜切除术.中国现代手术学杂志 2000;4:157-159
- 12 陈道瑾,张茂祖,聂晚频,黄飞舟.动脉灌注美蓝标记淋巴结的临床应用.临床肿瘤学杂志 1996;1:13-14
- 13 Chen DJ, Chen YG, Yang YH. Lymph nodes harvesting: using the dyeing method. *Rom J Gastroenterol* 2000;9:21-24
- 14 陈道瑾,陈远光,钱立元,龙光辉.术中动脉灌注美蓝标记淋巴结12例标本观察.中国实用外科杂志 1998;8:457
- 15 Havenga K, DeRuiter MC, Enker WE, Welvaart K. Anatomical basis of autonomic nerve-preserving total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996;83:384-388
- 16 张东铭主编.大肠肛门局部解剖与手术学.第1版.合肥.安徽科学技术出版社, 1999:1-65
- 17 陈远光,陈后清,陈道瑾,杨元华.大肠癌切除标本淋巴结检查最小数目研究.中国普通外科杂志 2000;9:332-334
- 18 王颖刚.全直肠系膜切除术必须规范化.中国医学论坛报 2002;28:2

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

北京肿瘤分子生物学重点实验室

北京肿瘤分子生物学实验室于 1992 年 12 月建立,由北京市科委资助,依托单位北京市肿瘤研究所,主管部门北京市卫生局,第一任实验室主任董志伟教授,现任实验室主任兼首席专家吕有勇教授。

1 研究方向和发展目标

北京肿瘤分子生物学实验室以人才、条件技术和管理的优势,从分子水平上阐明肿瘤发生、发展的规律,深入开展癌基因、抗癌基因、肿瘤相关抗原及基因工程抗体的研究,获得新的肿瘤相关基因和标志物.在取得实验室研究成果的基础上,开展肿瘤基因诊断的临床应用,建立规范的基因诊断技术,强化基础研究和临床的结合,为改善和提高肿瘤的诊治水平提供新的有效手段.在开展实验室研究工作的同时,将形成人才和技术的集成优势,在肿瘤基因鉴定、克隆、基因结构与功能研究、肿瘤基因诊断的临床应用和肿瘤基因治疗基础研究领域形成优势,将促进北京市和我国肿瘤研究整体水平和国际竞争能力的提高。

2 实验室的科技能力

利用已有的实验研究体系,在过去研究工作进展的基础上,集中实验室人力、财力和管理的优势,特别是疾病基因克隆、鉴定技术的优势,克隆与胃粘膜细胞癌变和肿瘤发生、发展相关的癌基因、抑癌基因、肿瘤相关抗原基因片段和基因全长.在得到新基因的基础上开展基因定位、基因功能的研究.同时进一步研究这些基因与胃癌发生、发展的规律,寻找具有重要生物学功能、有临床应用价值的基因.深入开展基因诊断的研究与应用,建立规范的基因诊断技术并逐步用于临床.在克隆基因的基础上,进一步开展杂交瘤技术标准化和抗体工程的研究,逐步形成规模效益,进一步开展基因工程抗体技术的研究与应用,完善鼠单抗人源化的实验研究体系,研制有应用价值的人单抗,为临床肿瘤防治预后判断提供分子水平的标志物.实验室承担国家 863 计划项目课题四项,国家杰出青年基金二项,国家自然科学基金项目四项,国家重大基础研究规划项目一项.北京肿瘤分子生物学实验室以人才和科学管理的优势进入我国科研国家队的行列。

3 实验室的条件

实验室现有使用面积 1000 平方米,包括一个仪器设备中心(所中心实验室)和八个课题组:分子肿瘤学、分子遗传、肿瘤抗原、抗体工程、基因诊断技术研究与运用、生物技术研发与医药资源收集.以上课题组为中心组成五个技术功能组:基因鉴定、基因载体构建表达、染色体分析和基因定位、细胞及抗体制备和仪器与医药资源收集.在开展研究工作的同时逐步形成技术优势并对外开放。

4 科研成果

高室所属课题组的研究人员在国内外核心期刊发表论文 100 余篇,参加国内外学术会议 60 人次.在全国性学术会议上做大会专题报告 15 人次.在胃癌发病机制和分子调控机制方面取得了重要的进展,先后获北京市科技进步一等奖一项、二等奖六项、三等奖四项,申报专利五项.实验室将研究工作向临床应用扩展,负责组建北京基因诊断实验室,开展基因诊断的临床应用研究.近二年来发表 SCI 论文的数量明显增加,已在 JBC, NAR, Cancer Res, 科学通报, WJG 等学术刊物发表了一批学术论著.目前实验室在完成原始积累的基础上,正向更高的目标,即学术研究国际化,应用研究产权化的目标努力奋进。

5 主要科研人员情况

实验室把工作的重点放在人才建设方面,组织并形成了一支以中青年为主的科研队伍.现任实验室主任和八名课题组长均在 50 岁以下,其中研究员 5 人,4 人为博士导师,获国家杰出青年基金资助 2 人,主要成员有 3 人获得北京市科技新星计划基金资助,研究生学历人数占 80% 以上,平均年龄 30 岁.实验室核定人员 20-30 人,其中研究人员 10-15 人,技术人员 10-15 人.课题组根据研究任务聘请客座研究人员和招收研究生.实验室将形成以博士研究生和博士后研究人员为主力的研究队伍。

6 国内外科技合作

实验室已建立了良好的国内外合作关系,为国家重大基础研究规划肿瘤项目建立了以高通量基因突变筛查的 DHPLC 技术平台和肿瘤蛋白表达分析的组织阵列技术.与医科院肿瘤医院,第四军医大学消化病中心,中国医科大学,科学院基因组生物信息中心建立了良好的合作关系.与美国国立癌症研究所,美国 FOX CHASE 癌症研究中心,美国佛罗里达大学肿瘤研究所等院校进行学术和人员交流并积极促进我国开放实验室网络的建立。

7 封面图片

A 求实创新是科学的生命,实验室部分人员合影;B 利用组织芯片技术进行高通量组织蛋白表达水平分析;C 仔细观察是科学发现的基本功;D 科学需要密切合作,研究生在认真分析实验结果。

8 通讯地址

100034,北京市西城区大红罗厂街 1 号,北京大学临床肿瘤学院,北京市肿瘤研究所. yonglyu@public.bta.net.cn

电话:010-6616-3061 传真:010-6617-5832

改良淋巴结显示液在大肠癌标本中的应用价值

向开敏,陈道瑾,陈远光

向开敏,陈道瑾,陈远光,中南大学湘雅三医院普外科 湖南省长沙市 410013
项目负责人:陈道瑾,410013,湖南省长沙市桐梓坡路,中南大学湘雅三医院普外科.

收稿日期:2002-08-03 接受日期:2002-08-23

摘要

目的:探索改良淋巴结显示液是否能更快更多发现更小淋巴结.

方法:20例大肠癌标本作为自身对照,先按传统法摘取系膜淋巴结得出检查结果后,再与用改良淋巴结显示液处理后的结果进行对照,结果用配对t检验进行统计学分析.

结果:改良淋巴结显示液法处理标本检出的淋巴结总数,小淋巴结数,阳性淋巴结数明显多于传统法,并改变部分标本的分期.

结论:改良淋巴结显示液法比传统法在大肠癌标本中能检出更多、更小淋巴结,能更准确地评估患者的分期,指导治疗,改善预后.

向开敏,陈道瑾,陈远光.改良淋巴结显示液在大肠癌标本中的应用价值.世界华人消化杂志 2003;11(1):120-122

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/120.htm>

0 引言

大肠癌是消化系统较常见的恶性肿瘤,其分期是决定其预后及治疗方案的重要指标,而分期的重要依据之一就是有无转移的淋巴结及转移淋巴结的多少.有淋巴结转移者5a生存率大大降低,且淋巴结转移数目愈多,预后愈差.常规手工法检测常有小淋巴结遗漏,直接影响着临床分期的准确性.预后预测及辅助治疗的选择.本实验目的是用改良淋巴结显示液(MLNRS)处理大肠癌手术切除标本,以探索此显示液是否能更快更多地发现小淋巴结.改良淋巴结显示液(专利申请号01119427.8)是在淋巴结显示液(LNRS)中加入美蓝少许而制成,他的根据是美蓝对淋巴结的亲合力及预实验的结果.

1 材料和方法

1.1 材料 中南大学湘雅三院普外科2001-06/2001-12期间共20例大肠癌根治术后标本,其中男11例,女9例.年龄从38-68岁,平均55.35岁,结肠癌13例,直肠癌7例.均为结直肠癌经手术完整切除原发灶肠段及其系膜.MLNRS溶液的成份95%无水酒精、乙醚、松节油、冰醋酸、缓冲甲醛、磷酸二氢钠、美蓝粉剂混合均匀,配成MLNRS液1000ml,用密封性较好的容器装好备用.

1.2 方法 采用自身对照法,因而每一标本都先后进行传统法和MLNRS法的分别处理.传统法即将手术后新鲜标本用10%甲醛浸泡24h后由同一病理科医师用肉眼、手摸法将标本系膜组织中淋巴结取出,记下数目及直径,再将其进一步包埋、染色、切片、镜检.MLNRS法即将传统法处理后的标本之系膜从标本上剔除下来,用3倍于系膜体积的MLNRS液浸泡6-12h,然后取出标本,流水冲洗,尽量洗去系膜的染色,此时可见淋巴结呈深蓝色,在浅蓝色的脂肪背景下对比鲜明,便于挑拣.检出淋巴结再做病理切片检查.观察指标:分别观察传统法及MLNRS法检出的淋巴结数目、直径大小,分别记录下两法淋巴结转移数目(阳性淋巴结).

统计学处理 采用SPSS软件进行配对t检验 $\alpha < 0.05$

2 结果

本组20例标本用传统法检出淋巴结共205枚,其中直径 < 5 mm有37枚, > 5 mm有168枚.此标本进一步用MLNRS法处理后多检出220枚淋巴结,其中直径 < 5 mm有191枚,直径 > 5 mm有29枚.经过两次处理后20例大肠癌标本共检出淋巴结425枚,其中直径 < 5 mm共228枚,直径 > 5 mm共197枚.本组20例标本用传统法在常规镜检下检出24枚阳性,淋巴结阳性率为11.1%(24/205枚).总共有4例发生转移,为Dukes' C期,转移率为20%(4/20例),Dukes' B期共16例.在进一步用MLNRS法处理后,多检出56枚阳性,淋巴结阳性率为25.5%(56枚/220枚),多发现6例阳性标本,6例分期从B期变为C期.两步汇总后(经传统法和MLNRS法后)共发现阳性淋巴结80枚,总淋巴结为425枚,总阳性率为18.8%(80/425),总共有10例阳性,转移度为50%(10/20).

表1 传统法与MLNRS法的统计学分析

	检测淋巴结数		阳性淋巴结数(枚)	病理分期(C期)
	< 5 mm	> 5 mm		
传统法	37	168	24	4
MLNRS	228	197	80	10
t值	-7.90	10.02	-0.65	-2.08
P值	0.00 003	0.52	0.00 005	0.0451

3 讨论

淋巴结显示液是由Koren et al^[1-3]提出并广泛应用于各种肿瘤标本中以寻找淋巴结,在实际应用中证明其可

以显著提高检出正常的和转移的淋巴结数目,因而可以辨认出更小淋巴结.(其中酒精可溶解美蓝并渗透入组织;乙醚有渗透、助染及对抗组织收缩作用;松节油有脱水并透明、硬化淋巴结作用;冰醋酸可助染及对抗组织收缩;甲醛为固定组织作用;磷酸二氢钠为溶液缓冲剂)用LNRS处理标本后,淋巴结呈白垩状,在黄色背景下清晰可见.我们在预实验中,将2例经传统法处理后的系膜标本再用其3倍体积的LNRS浸泡6 h,将标本用流水冲洗后,切成小片,可再检出淋巴结分别为8个和9个,直径为3-7 mm.此2例系膜标本再进一步置入MLNRS中6 h后同样用流水冲洗,仍又可分别检出4个和3个小淋巴结,直径1-4 mm,而且发现淋巴结与背景的对比更加明显,更易辨认,可检出小至1 mm的淋巴结.因此我们在正式实验中在LNRS中加入一种染色剂美蓝(methylene blue 亚甲蓝)少许后,就制成改良淋巴结显示液(MLNRS).美蓝与淋巴结有很强的亲和力^[4-6],染色后长时间冲洗浸泡也不易脱色;而周围的脂肪组织不易着色,且容易冲洗褪色,这样淋巴结被染成深蓝色,与周围浅蓝色的系膜背景对比明显,淋巴结更易被辨认,即使被包在系膜中.

从前面的结果可以看出MLNRS法较传统法有明显的优势,首先是可以发现更多更小的淋巴结,尤其是直径<5 mm的淋巴结.本组20例标本中用传统法共发现205枚,平均每例10.3枚.用MLNRS法后总共发现425枚,平均每例21.25枚,配对t检验 $P < 0.01$,有显著性差异.对于直径<5 mm的淋巴结,用传统法共找出37枚,占总205枚的18.05%.用MLNRS法后又找出直径<5 mm的淋巴结191枚,占MLNRS法多找出淋巴结数220枚的86.8%,配对t检验 $P < 0.01$,有显著性差异,说明MLNRS法可找出更多小淋巴结.用MLNRS法后两步总共找出直径<5 mm的淋巴结228枚,占总425枚的53.65%,说明经MLNRS法后找出的淋巴结大约一半为小淋巴结.对于直径>5 mm的淋巴结,用传统法共找出168枚占传统法总数205枚的82%, $P > 0.05$ 说明传统法可以找出大部分直径>5 mm的淋巴结.用MLNRS法后又找出29枚,只占13.2%,说明对于大淋巴结来说,MLNRS法与传统法比较并无太多的明显优势;另外也说明一些大淋巴结隐藏在较深厚的脂肪当中,用手指不易触摸出来,而用MLNRS法后,染色的淋巴结与周围的脂肪组织色彩对比分明,更易分辨出来.事实上,我们甚至发现MLNRS法可以辨认出<1 mm的结节.

在传统法确认为C期的有4例,传统法分别找出阳性淋巴结6个、4个、2个、12个共24个,用MLNRS法后这4例又分别找出8个、9个、8个、3个阳性淋巴结,共28个,用传统法确定为C期的用MLNRS法又都找出新的阳性淋巴结.另外,在传统法确定为B期的16例标本中,用MLNRS法找到6例有阳性淋巴结,分别找出5枚、3枚、4枚、8枚、4枚,共

24枚.那么在传统法确定为B期的这6例标本用MLNRS法可确定为C期, $(P < 0.05)$ 说明传统法有一定的漏诊.而我们可看出MLNRS法多找出的淋巴结中直径<5 mm的占相当大部分86.8%(191/220).因此我们用MLNRS法多找出的阳性淋巴结多为直径<5 mm的小淋巴结,而小淋巴结的转移率是比较高的^[7-10],据文献报道可达11%,不容忽视.

大肠癌是一种高发性的恶性肿瘤,复发率及死亡率都很高,对于大肠癌的分期、预后、术后辅助性治疗来说,准确地了解淋巴结的状况都是非常重要的.据报道,无淋巴结转移的患者多数可获治愈,5 a生存率可达70%,而有淋巴结转移者5 a生存率大大降低,不足30%.而淋巴结转移数目愈多,预后愈差,1-5个阳性淋巴结者5 a生存率为24%,而6-10个阳性者则降为9%.对于大肠癌标本应该采集的淋巴结数目,不同的资料有不同的说法,Scott Caplin et al认为少于6个将导致分期降低,可能造成转移淋巴结的漏诊.而法国人Jean Maurel et al作的研究结论认为至少要有8个淋巴结才能减少错误分期和分期过低的风险.

Scott et al认为如果Dukes' B期标本检出淋巴结少于13个时建议用脂肪清除法(fat clearance)来增加检出数,因为少于13个将导致约4.8%的阳性淋巴结漏诊. Jan h Wang则认为要将切除的结直肠癌标本区别T2或T3至少要14个才比较准确.而国内有研究者作过相当深入的研究,认为每例标本检出不小于16枚淋巴结时,从统计学意义上来讲就可以足够准确地分期了.因而从上述的资料,我们认为16个以上淋巴结是比较理想的,当然,从本实验结果以及新的TNM分期系统对N(淋巴结)的描述更为具体这两点来说,可以认为检出淋巴结数目多多益善,即使已确定为三期的患者,转移淋巴结的多少对于进一步分出亚期有好处,因而可以更准确地判断其预后及辅助治疗的价值,如1-5个阳性淋巴结的患者5 a生存率(24%)与多于6个阳性淋巴结者(9%)明显不同.从本实验结果看来,平均21.25枚/例的检出数说明MLNRS法是完全符合条件的.

对于大肠癌标本淋巴结检出的直径大小来看,显而易见,用传统法即眼看手摸法找到的大部分为直径>5 mm的大淋巴结,对于直径<5 mm的淋巴结且又藏在周围脂肪组织中显然无能为力.从本实验数据看,MLNRS所检出的大部分为<5 mm的淋巴结,占新检出总数的86.8%(191/220),MLNRS法可辨认出1 mm大小的淋巴结.本实验MLNRS法检出淋巴结平均直径<5 mm.据报道^[11],对LNRS法作了大量深入研究的Koren et al检验膀胱癌标本时,用传统法检出淋巴结平均直径为7.96 mm,而用LNRS法为3.81 mm.而Ustum et al^[12]在检测一组膀胱癌、乳癌及大肠癌标本的淋巴结时,传统法检出淋巴结平均直径为6.8 mm,而LNRS法为4.2 mm.由此可以看出LNRS法在检出小淋巴结时有明显的优

势,这就为进一步镜检查出小淋巴结的微转移灶提供了可能.

4 参考文献

- 1 Koren R, Kyzer S, Paz A, Veltman V, Klein B, Gal R. Lymph node revealing solution: a new method for detecting of minute axillary lymph nodes in breast cancer specimens. *Am J Surg Pathol* 1997;21:1387-1390
- 2 Koren R, Siegal A, Klein B, Halpern M, Kyzer S, Veltman V, Gal R. Lymph node revealing solution: Simple new method for detecting minute lymph nodes in colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997;40:407-410
- 3 Koren R, Kyzer S, Levin I, Klein B, Halpern M, Rath-wolfson L, Paz A, Melloul MM, Mishalim, Gal R. Lymph node revealing solution: a new method for lymph node sampling: results in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep* 1998;5:341-344
- 4 Simmons RM, Smith SM, Osborne MP. Methylene blue dye as an alternative to isosulfan blue dye for sentinel lymph node localization. *Breast J* 2001;7:181-183
- 5 Sanchez W, Lana-Perez P, Alvarado I, Labastida S, Herrera L. Modified clearing technique to identify lymph node metases in post-irradiated surgical specimens from rectal adenocarcinoma. *Arch Med Res* 1996;27:31-36
- 6 Kobayashi O, Motohashi H. A study of lymph node metastasis in gastric cancer—a new method for fixing resected specimens with methylene blue formalin. *Gan No Rinsho* 1987;33:1783-1788
- 7 Jan YJ, Huang PC, Chen JT, Ho WL. Lymph node revealing solution and traditional 10 % buffered formaldehyde for detecting lymph nodes in colorectal carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 2000;63:131-137
- 8 Koren R, Shvero J, Yaniv E, Veltman V, Konichesky M, Groushko I, Sador R, Feinmesser R, Gal R. Neck-dissection surgical specimens treated by lymph node revealing solution. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:72-75
- 9 Andreola S, Leo E, Belli F, Bufalino R, Tomasic G, Lavarino C, Baldini NT, Meroni E. Manual dissection of adenocarcinoma of the lower third of the rectum specimens for detection of lymph node metastase smaller than 5mm. *Cancer* 1996;77:607-612
- 10 Pworak O. Number and size of lymph node and node metastases in rectal carcinomas. *Surg Endosc* 1989;3:96-99
- 11 Koren R, Paz A, Lask D, Kyzer S, Klein B, Schwartz A, Gal R. Lymph-node revealing solution: a new method for detecting minute lymph node in cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997;80:40-43
- 12 Ustun MO, Onal B, Tugyan N, Rezanko T. Lymph node revealing solution: is it effective on detecting minute lymph node? *Adv Clin Path* 1999;3:135-138

《临床肝胆系病学》出版发行

本刊讯 由WJG编委、著名肝病专家巫协宁教授主编,曾民德、邱德凯教授副主编的新版《临床肝胆系病学》于2002年9月由上海科学技术文献出版社出版.

全书105万字,16开,精装,定价85元.全书分12篇72章,详尽介绍了肝胆系的实用解剖、肝脏的凝血与代谢功能、组织学、病理学、免疫学、肝再生、细胞凋亡、肝脏与细胞因子以及各种检查方法、各种疾病的诊断和治疗等.肝胆系疾病包括感染,病毒性肝炎,肝纤维化、肝硬化及其并发症,肝肿瘤,胆汁郁积,遗传性、先天性、小儿、妊娠期肝胆系疾病,最后还介绍了人工肝、肝移植、肝干细胞移植治疗.全书在各个方面都反映了肝胆系疾病诊断和治疗的国内外最新研究进展,执笔者都是国内著名的专家、院士、教授.

本书重点突出、深入浅出,可作为肝病科、消化内科、外科、儿科、传染科各级临床医师的实用高级参考书.欲购买者请汇款至:200030,上海市武康路2号上海科学技术文献出版社发行科.联系电话:021-64313128 (2002-11-08)

结肠放线菌病 8 例

周仁荣,殷广福,李祥周,王 琴

周仁荣,殷广福,李祥周,王琴,南京八一医院 南京市 210002

项目负责人:周仁荣,210002,南京市,南京八一医院.

收稿日期:2002-05-07 接受日期:2002-06-25

摘要

目的:更好的认识结肠放线菌病的临床特点.

方法:收集了国内7所医院共8例(本院2例)个案进行了分析.

结果:本病少见,病程长,以腹部包块就诊,肠镜与CT易疑为结肠恶性肿瘤,剖腹所见硫磺样颗粒是其特征,病理学方能确定诊断.

结论:本病为良性经过,青霉素治疗好,愈后佳.

周仁荣,殷广福,李祥周,王琴.结肠放线菌病8例.世界华人消化杂志 2003;11(1):123-124

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/123.htm>

0 引言

放线菌病在临床罕见,而结肠放线菌病更为少见.本院近

2 a相继收治2例结肠放射菌病,且均误为结肠恶性肿瘤.为提高对本病的诊治水平,我们复习了国内1974年以来的文献,共计8例,现就有关特点简报如下.

1 材料和方法

从中国生物医学文献数据库检索,主题词为结肠+放线菌病.检索时间从1974-2000-12,结合我院收治2例,共计8例结肠放线菌病.他们分布在我国5个省区.8例中5例女性,3例男性.年龄均为中老年.病程达24 mo 2例,>6 mo的3例.7例行外科手术探查,术前都疑诊为结肠或盆腔恶性肿瘤.8例中3例在病程中有不同程度的发热.6例有间歇性腹痛,2例腹痛伴有腹泻.3例除腹痛外伴有放射痛.8例查体均发现腹部有包块且质地硬.1例发现有腹水.7例剖腹后发现肠壁有散在硫磺样颗粒.包块组织行病理活检发现放线菌并有脓肿形成.8例中5例病变在右下腹.全部病例术前未明确诊断.

2 结果

8例结肠放线菌病的临床与相关实验一览表见表1、2.

表1 8例结肠放线菌病临床与相关实验

序号	性别	年龄	病程 (mo)	进行性 消瘦	病程中T >37.5℃	间歇 腹痛	间歇 腹泻	腹部 包块	包块质 地硬	放射 痛	钡灌肠	肠镜	腹部CT	大小(cm)	临床诊断
1	男	64	6	无	-	+	-	(右下)	+	-	升结肠新生物	结肠肝曲隆起	右侧腹腔占位	6×6×5	恶淋、平滑肌瘤
2	女	64	10	无记载	-	+	-	(右下)	+	-	回盲部占位	乙状结肠不规则狭窄	无记载	6×5×4	结肠癌
3	女	51	1	无记载	-	+	+	(左下)	+	+	乙状结肠不规则狭窄	-	无记载	10×6×4	乙状结肠癌
4	女	54	1	无记载	-	+	-	(右下)	+	-	结肠炎性改变	-	B超示右下腹占位	15×12×9	横结肠癌
5	男	37	1	无记载	+	+	-	(右下)	+	-	盲肠恶性肿瘤	-	B超示横结肠占位	5×5×4	回盲部恶性肿瘤
6	女	48	24	无	+	+	+	(左下)	+	+	乙状结肠狭窄 子宫体后占位	乙状结肠不规则狭窄	盆腔恶性肿瘤累及结肠	4.6×3.9×3.8	盆腔恶性肿瘤
7	女	39	24	无	-	-	-	(左下)	+	-	乙状结肠狭窄	乙状结肠不规则狭窄	盆腔恶性肿瘤,累及结肠	9×8×9	盆腔恶性肿瘤 结肠癌
8	男	41	8	无记载	+	-	-	(右下)	+	+	无记载	-	腹腔占位累及右肾	无记载	结肠肿瘤腹膜肿瘤

表2 8例结肠放线菌病临床与相关实验

序号	腹水	手术证实病变部位	手术中包块与周围粘连	结肠表面有无硫磺样颗粒	镜检炎症细胞浸润	镜检找到放线菌	黏膜之间有无形成脓肿	病理诊断	报告时间	报告单位	作者姓名
1	-	回盲部	+	+	+	+	+	右半结肠放线菌病伴脓肿形成	98	北京301医院	纪小龙 ^[3]
2	-	回盲部	-	+	+	+	+	右半结肠放线菌病	97	保定市立医院	刘力 ^[2]
3	+	左侧附件及回盲部	+	+	+	+	+	结肠放线菌病累及大网膜、肠系膜、卵巢及乙状结肠	96	天津空军医院	王云南 ^[6]
4	-	横结肠	+	-	+	+	+	结肠放线菌病伴广泛肠粘连及肠管内瘘形成	97	天津医大附院	齐清会 ^[4]
5	-	回盲部	+	+	+	+	+	结肠放线菌病	95	新疆医学院附院	王振华 ^[5]
6	-	乙状结肠及部分降结肠	+	+	+	+	+	结肠放线菌病(乙状结肠)	2000	南京81医院	周仁荣 ^[1]
7	-	乙状结肠	+	+	+	+	+	结肠放线菌病(乙状结肠)	2001	南京81医院	周仁荣
8	-	右髂窝道腹壁肿物活检	未手术	-	+	+	+	腹部放线菌病	94	北京友谊医院	崔红义 ^[7]

+ 表示有; - 表示无.

3 讨论

1845年Langenbeek首先叙述了放线菌病.我国1904年首次在宜昌发现牛放线菌病,1911年报告颜面部放线菌病.此菌为革兰氏阳性菌.病理特点为化脓性炎症、瘻管形成和瘢痕化.本菌常侵犯机体各种组织器官,包括内脏、脑、骨骼组织,但累及结肠少见.本病临床报告少且误诊率极高,尤其是结肠放线菌病常误为结肠恶性肿瘤.本院2例,临床均以腹部包块就诊,术前肠镜均提示结肠占位性病变,术中无法确定肿瘤性质,术后病理找到放线菌.使用大剂量青霉素包块明显缩小,预后佳.本组主要特点:(1)好发于中老年,女性多于男性;(2)病程迁延,一般无发热,3例有记载者均无进行性消瘦史;(3)主诉下腹部隐痛,以右下腹多见;(4)就诊时查体均发现腹部包块,且包块较大,质地偏硬;(5)钡灌肠拟为回盲部占位(5例)或乙状结肠处狭窄;(6)4例行肠镜者发现肠腔环形狭窄伴有炎性改变;(7)7例术前均诊断为结肠恶性肿瘤,术中粘连显著,同时均发现硫磺样颗粒;(8)4例行CT者提示结肠占位性病变,

恶性可能性大;(9)术中包块良恶无法区分;(10)病理组织检查到放线菌方才确诊,且组织黏膜中存在脓肿形成;(11)青霉素治疗疗效好.通过本组病例我们不难看出,结肠放线菌病在临床不但少见且诊断较为棘手,尤其是对于下腹部具有包块、无进行性消瘦者,即使CT、钡灌肠或肠镜疑为恶性肿瘤,但仍应与结肠放线菌病感染所致的包块相鉴别,必要时可使用大剂量青霉素试验治疗,以便甄别.

4 参考文献

- 1 周仁荣,殷广福,许正昌.结肠放线菌病误诊为乙状结肠癌1例.中华消化杂志 2001;21:746
- 2 刘力,王建中,刘力亚.结肠放线菌病1例.中国医师杂志 1999;1:53
- 3 申明识,纪小龙.酷似肿瘤的结肠放线菌病1例.华人消化杂志 1998;6:566
- 4 齐清会,尤胜义,孙保存.横结肠放线菌病1例.中华消化杂志 1997;17:161
- 5 王振华,昌红,柴敏秀.结肠放线菌病1例.新疆医学 1995;25:121
- 6 王云南,胡建平.腹腔放线菌病误诊为乙状结肠癌1例.中外医学放射技术 1996;67
- 7 崔红义,许元弟,王宇.腹部放线菌病1例.中华外科杂志 1994;32:231