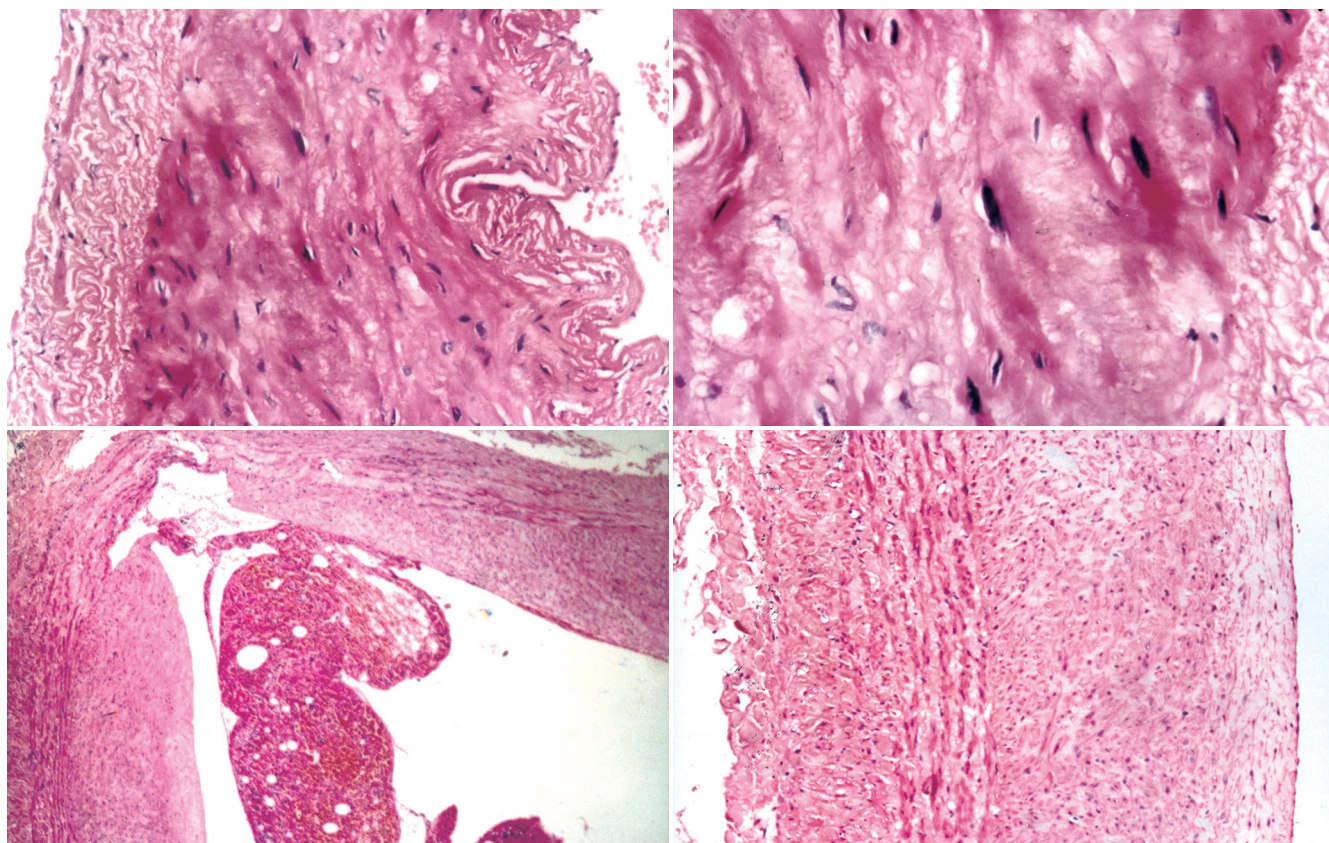


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 5 月 8 日 第 14 卷 第 13 期 (Volume 14 Number 13)



13 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授	北京
黄象谦教授	天津
黄志强教授	北京
裘法祖教授	武汉
王宝恩教授	北京
危北海研究员	北京
吴孟超教授	上海
杨春波教授	福州
周殿元教授	广州

名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

副总编辑

陈士葆教授	上海
房殿春教授	重庆
姜洪池教授	哈尔滨
王苑本教授	天津
吴云林教授	上海
徐克成教授	广州
杨思凤教授	吉林
姚希贤教授	石家庄
岳茂兴教授	北京
张万岱教授	广州
周学文教授	沈阳

常务编委

程英升副教授	上海
高毅主任医师	广州
江学良副主任医师	上海
李岩教授	沈阳
刘连新教授	哈尔滨
吕宾教授	杭州
罗和生教授	武汉
聂青和副教授	西安
王小众教授	福州

编委

白爱平主治医师	广州
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨

蔡淦教授	上海
曹洁副教授	上海
陈海龙教授	大连
陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川

韩天权教授	上海
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆
洪天配教授	北京
侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李奇林教授	广州
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆

世界华人消化杂志®

编辑委员会

刘铁夫教授	哈尔滨	孙学英教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江
刘正稳教授	西安	邵升副教授	哈尔滨	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	谭学瑞教授	汕头	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	唐采白副教授	徐州	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	唐芙爱教授	郑州	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	唐霓副研究员	重庆	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	姚登福教授	南通
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	姚树坤教授	石家庄
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	阴赅宏研究员	北京
梅林教授	北京	万军教授	北京	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	汪思应教授	安徽	于颖彦教授	上海
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	郁宝铭教授	上海
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	喻荣彬副教授	南京
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	张柏和教授	上海
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	张方信主任医师	兰州
潘秀珍教授	福州	王鲁副教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭波副教授	西安	王效民教授	厦门	张锦生教授	上海
彭吉润主任医师	北京	王学美研究员	北京	张军教授	西安
彭曦副研究员	重庆	王正康教授	北京	张青云研究员	北京
彭心宇教授	石河子	王志刚副主任医师	上海	张群华教授	上海
彭志海教授	上海	王忠裕教授	大连	张水军教授	郑州
秦波教授	重庆	卫洪波教授	广州	张绪清副教授	重庆
秦成勇教授	济南	魏经国教授	西安	张学教授	北京
秦环龙教授	上海	魏来教授	北京	张宗明教授	北京
钱建民教授	上海	闻勤生教授	西安	赵桂珍教授	沈阳
秦仁义教授	武汉	吴德全教授	哈尔滨	赵景民教授	北京
卿三华教授	广州	吴建国教授	武汉	赵连三教授	成都
邱双健副教授	上海	吴君主任医师	贵阳	赵平副教授	上海
任超世研究员	天津	吴萍主任医师	徐州	郑民华教授	上海
任建安教授	南京	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
任建林教授	厦门	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
邵成浩讲师	上海	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
邵先玉教授	泰安	肖恩华教授	长沙	周国雄主任医师	南通
邵永孚教授	北京	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
沈洪教授	南京	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
沈琳副教授	北京	许春舫主任医师	苏州	周晓东研究员	广州
沈薇教授	重庆	徐存拴教授	新乡	朱春兰主任医师	哈尔滨
施瑞华教授	南京	徐大华副主任医师	北京	朱立元教授	深圳
石统东副教授	重庆	徐德忠教授	西安	朱人敏教授	南京
宋振顺教授	西安	徐列明教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
孙诚谊教授	贵阳	徐小元教授	北京	左国营副主任药师	昆明
孙家邦教授	北京	许玲副教授	上海		
孙秀发教授	武汉	许文燮教授	上海		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2006 年 5 月 8 日

第 14 卷

第 13 期

(总第165期)

述 评

1241 近20年来药用植物成分体外抗HBV活性的研究进展

左国营, 刘树玲, 徐贵丽

基 础 研 究

1247 食管鳞癌细胞系EC-109中缺氧诱导因子-1 α 的表达意义

杜琰萍, 施瑞华, 肖斌, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 郝波

1252 艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜HSP70蛋白及mRNA表达的影响

常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁

1257 Stat5反义寡核苷酸联合5-氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖与凋亡的影响

马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣

1262 NS-398联用AG-041R对胃癌细胞的协同抑制作用机制

朱峰, 孙为豪, 李淑德, 李兆申

1267 肝癌组织IGF- II 表达与HBV DNA复制及病理学特征的关系

邱历伟, 姚登福, 吴信华, 吴玮, 苏小琴, 邹黎

1272 复方中药益肝康抑制肝星状细胞增殖的作用机制

张亚平, 姚希贤, 刘晓玲, 赵霞

1277 美洛昔康对结肠癌细胞VEGF和angiopoietin-2表达的影响

陶凯雄, 张宁, 王国斌, 吴相柏

1283 中药肠炎清治疗小鼠葡聚糖硫酸钠所致结肠炎的机制

吕永慧, 胡品津, 陈文红, 毕向军, 庞瑞萍

临 床 研 究

1288 低剂量乙肝免疫球蛋白与拉米夫定长期联用预防肝移植后HBV复发

夏念信, 傅志仁, 邱宝安, 王正昕, 李先兴, 白刚, 杨英祥, 王昆

1294 EBV相关胃癌ras基因突变及法尼基转移酶 β -亚单位基因的表达

孙佰秀, 殷凡, 朱伟, 高玉, 孙淑红, 罗兵

1300 胃癌及癌前病变中P27和Cyclin E蛋白的表达意义

孔郁, 朴熙绪, 张媛, 朴东明

1305 肝癌经肝动脉栓塞化疗后VEGF和CD44v6表达的意义

李兴睿, 杨志芳, 易继林

1309 蒙、汉族人群小肠脂肪酸结合蛋白基因Ala54Thr多态性的频率

王振辉, 常晓彤, 侯小平, 董明纲, 王洪涛, 张利, 李桂喜

文 献 综 述

1314 炎症性肠病及其干细胞移植再生修复

魏亚明, 聂玉强, 李瑜元, 沙卫红

临 床 经 验

1318 复方甘草酸苷对暴发性肝衰竭患者的保护作用

于仲青, 杨宝山, 王岩, 陈立艳, 毕蔓茹, 王福祥, 马英骥

1323 延边地区朝、汉族慢性乙型肝炎患者血清标志物与HBV DNA定量的关系

沈哲式, 金仁顺, 朴东明, 张英哲

1326 罗格列酮治疗非乙醇性脂肪肝的疗效与脂联素相关

崔克勤, 赵翔伟, 张耀, 康小红, 孟杰, 陈贤标

1330 原发性十二指肠肿瘤诊治8例

张宗明, 李刚, 高原, 邢海林, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 杨俊雄

附 录	1333 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	1338 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	1251 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1256 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 1266 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 1271 更正与说明专栏、专家门诊 1282 第八届中西医结合实验医学研讨会 1293 NERD及相关疾病国际研讨会 1313 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1317 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会 1322 第十一届全国普通外科学术会议征文通知
封面故事	Tao Li, Ji-Yuan Ni, Yan-Wu Qi, Hai-Yang Li, Tong Zhang, Zhen Yang. Splenic vasculopathy in portal hypertension patients. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(17): 2737-2741 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/2737.asp
国际会议	Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006 XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2006-05-08
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张海宁
电子编辑 张敏 李琪 韩江燕
本期审读 王瑾晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wjgd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

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

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

May 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 13

EDITORIAL	1241 Progress in anti-hepatitis B virus activity of vegetable ingredients <i>in vitro</i> <i>Zuo GY, Liu SL, Xu GL</i>
BASIC RESEARCH	1247 Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha in esophageal squamous cancer cell line EC-109 <i>Du YP, Shi RH, Xiao B, Zhu H, Ling TS, Zhang GX, Hao B</i> 1252 Effects of moxibustion on expression of HSP70 protein and mRNA in stress-induced gastric ulcer of rats <i>Chang XR, Peng N, Yi SX, Peng Y, Yan J</i> 1257 Effects of Stat5 antisense oligonucleotide combined with 5-fluorouracil on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells <i>Ma XT, Yu LW, Wang S, Du RY, Cui ZR</i> 1262 Synergistic inhibitory effect of NS-398 combined with AG-041R on gastric cancer cells <i>Zhu F, Sun WH, Li SD, Li ZS</i> 1267 Correlations of insulin-like growth factor-II expression with hepatitis B virus DNA replication and clinical pathological characteristics in human hepatocellular carcinoma <i>Qiu LW, Yao DF, Wu XH, Wu W, Su XQ, Zou L</i> 1272 Inhibition of <i>Yigankang</i> on proliferation of rat hepatic stellate cells induced by interleukin-1β <i>Zhang YP, Yao XX, Liu XL, Zhao X</i> 1277 Effects of meloxicam on vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 expression in colon carcinoma cell line HT-29 <i>Tao KX, Zhang N, Wang GB, Wu XB</i> 1283 Therapeutic mechanism of <i>Changyanqing</i> in treatment of colitis induced by dextran sulfate sodium <i>Lü YH, Hu PJ, Chen WH, Bi XJ, Pang RP</i>
CLINICAL RESEARCH	1288 Low-dose intra-muscular hepatitis B immunoglobulin combined with lamivudine for long-term prophylaxis of hepatitis B recurrence after liver transplantation <i>Xia NX, Fu ZR, Qiu BA, Wang ZX, Li XX, Bai G, Yang YX, Wang K</i> 1294 <i>Ras</i> mutation and expression of farnesyltransferase β mRNA in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma <i>Sun BX, Yin F, Zhu W, Gao Y, Sun SH, Luo B</i> 1300 Expression and significances of P27 and Cyclin E protein in gastric carcinoma and precancerous lesion <i>Kong Y, Piao XX, Zhang Y, Piao DM</i> 1305 Expression of CD44v6 and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial chemoembolization <i>Li XR, Yang ZF, Yi JL</i> 1309 Investigation of Ala54Thr polymorphism in intestinal fatty acid binding protein in Han and Mongoloid populations <i>Wang ZH, Chang XT, Hou XP, Dong MG, Wang HT, Zhang L, Li GX</i>
REVIEW	1314 Inflammatory bowel disease and its repair with hematopoietic stem cell transplantation <i>Wei YM, Nie YQ, Li YY, Sha WH</i>

CLINICAL PRACTICE	1318 Protective effect of Stronger Neo-Minophagen C on patients with fulminant liver failure <i>Yu ZQ, Yang BS, Wang Y, Chen LY, Bi MR, Wang FX, Ma YJ</i> 1323 Relationship between hepatitis B virus serum markers and hepatitis B virus DNA quantities in Korean and Han patients with chronic hepatitis B in Yanbian area <i>Shen ZS, Jin RS, Piao DM, Zhang YZ</i> 1326 Efficacy of rosiglitazone in treatment of nonalcoholic fatty liver disease and its relations with adiponectin <i>Cui KQ, Zhao XW, Zhang Y, Kang XH, Meng J, Chen XL</i> 1330 Experience in diagnosis and treatment for 8 cases of primary duodenal tumor <i>Zhang ZM, Li G, Gao Y, Xing HL, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX, Yang JX</i>
APPENDIX	1333 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	1338 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Li T, Ni JY, Qi YW, Li HY, Zhang T, Yang Z.</i> Splenic vasculopathy in portal hypertension patients. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(17): 2737-2741 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/2737.asp
INTERNATIONAL MEETINGS	Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006 XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date May 8, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

近20年来药用植物成分体外抗HBV活性的研究进展

左国营, 刘树玲, 徐贵丽

左国营, 刘树玲, 徐贵丽, 成都军区昆明总医院药剂科 云南省昆明市 650032

左国营, 博士, 1984年四川医学院本科毕业, 2001年中国科学院昆明植物研究所博士毕业。现任成都军区昆明总医院药剂科天然药物研究室主任, 副主任药师, 硕士生导师, 副教授, 全军中药专业委员会委员, 主要从事药用植物抗病毒活性成分研究, 发表论文40余篇。

国家自然科学基金资助项目, No. 30472147

通讯作者: 左国营, 650032, 云南省昆明市, 成都军区昆明总医院药剂科. zuoguoying@263.net

电话: 0871-4074793

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-13

摘要

我国具有庞大的乙型肝炎患者群, 同时又是药用植物资源十分丰富的国家。从药用植物中筛选具有抗乙肝病毒(HBV)活性的天然目标化合物, 对以开发出抗病毒的高效价廉药物, 对控制乙肝流行具有非常重要的意义。本文对近20 a来药用植物的木脂素、多酚、生物碱、萜类、黄酮和香豆素类等70余个化学成分体外抗HBV活性的研究进展进行评述, 以供参考。

关键词: 药用植物; 乙型肝炎; 抗病毒; 活性成分

左国营, 刘树玲, 徐贵丽. 近20年来药用植物成分体外抗HBV活性的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1241-1246
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1241.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个世界性的健康问题。全球20亿人口受过HBV感染, 慢性患者达3.6亿, 每年死亡患者达52万(5万死于急性HBV患者, 47万死于肝硬化和肝癌)。我国HBV人群感染率57.6%, 乙肝表面抗原(HBsAg)阳性者9.75%, 全国现症慢性乙型肝炎(简称慢乙肝)约3000-4000万^[1-2]。抗病毒治疗是病毒性肝炎治疗的关键, 目前公认有效的抗病毒药物是干扰素和拉米夫定等化学合成的核苷类似物, 以核苷类似物为代表的这些合成抗病毒药的结构类型单一, 存在停药后复发率高, 对HBeAg作用不明显, 需长期用药致病毒耐受等问题; 以干扰素为代表的生物类药物治疗乙肝同样复发率较高、不良反应严重而且价格昂贵, 患者经济负担大, 临床难以广泛使用。因此, 研发新型的抗HBV药

物以治疗乙肝, 对传染源的控制及疾病的转归具有极其重要的社会意义和经济意义。

天然药物化合物库的分子结构多样性是找寻新药目标化学实体的源泉, 有多达40%的治疗药物源于传统药用植物等天然资源, 当前国际国内对传统天然药物在抗病毒研究上日趋重视^[3-5]。具有抗HBV作用的植物源天然产物包括木脂素、酚性成分、生物碱、萜类、黄酮和香豆素等类化合物(图1, 2)。针对我国庞大的HBV患者群和丰富的传统中草药植物资源的实际, 从其结构多样的天然化合物中找寻抗HBV潜在的有效目标化合物, 是新药研究工作者的一个重要的方向。为此, 本文就近20 a来药用植物体外抗HBV活性成分的研究进展进行归纳总结, 以供同行参考。

1 具有抗HBV作用植物药成分的结构类型

1.1 木脂素类(lignans)和植物多酚类(plant polyphenols) 自从Thyagaraian *et al*^[6]于1982年首次发现大戟科叶下珠属的苦味叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)具有抗乙肝病毒的活性以后, 形成了一股叶下珠抗HBV研究的热潮。可以说, 在中草药抗HBV的基础和临床应用研究方面, 国内外对叶下珠的研究是最为广泛、持久和深入的, 其提取物对多种HBV指标均呈现一定的抑制作用。研究表明, 叶下珠属植物中所含有的木脂素等多酚类化学成分是其抗HBV活性的关键组分。Huang *et al*^[7]筛选了得自4种叶下珠属植物的25个化合物(其中大部分是多酚类化合物)对人肝癌细胞株MS-G2分泌的HBV抗原HBsAg、HBeAg的抑制作用, 发现在50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 3, 4-亚甲二氧基-3', 4', 5, 9, 9'-五甲氧基木脂素(niranthin, 1)具有最强的抗HBsAg活性(抑制率: 74.3%); 3, 4: 3', 4'-双亚甲二氧基木脂素(hinokinin, 2)具有最强抗HBeAg活性(抑制率: 68.1%)(图1和表1)。但认为其中的黄酮类、槲花酸和短叶苏木酚酸甲酯对两类抗原均无抑制作用。

Kuo *et al*^[8]测定了日本南五味子(*Kadsura*

■研发前沿

针对当前乙型肝炎病毒性肝炎的流行趋势, 借鉴和应用抗病毒化学和生物化学研究的成果, 加强抗乙肝病毒天然有效成分的筛选, 开发抗乙肝天然药物, 是当前药物化学工作者的一项重要任务。

■应用要点

抗病毒治疗是控制乙肝感染的关键,寻找抑制乙肝抗原的特异天然活性先导化合物,深入研究其抗病毒作用的分子机制,可弥补化学合成药物结构单一的不足并克服其耐药性弊端。

japonica)中6种新的C₁₈环辛二烯木脂素(C₁₈-dibenzocycloocta-dienelignans)schizanzirins I, J, K, L, M, N和4种已知C₁₉均木脂素(C₁₉ homolignans)taiwanschirins A, B, C和heteroclitin F对HBV抗原的抑制作用。结果表明taiwanschirins A(12)和B(13)在25 mg/L时对HBsAg具有强抑制作用(抑制率分别为: 52.8%和50.9%),对HBeAg具中等强度抑制作用(抑制率分别为: 42.8%和31.8%)。初步构效关系研究发现在C₉位上无取代基的化合物对HBV呈现抑制作用,而C₉位上有取代基的化合物对HBV无抑制作用。

Huang *et al*^[9]测定了胡椒属植物风藤(*Piper kadsura*)中7种化合物对MS-G2分泌HBV抗原的抑制率为57.8%-76.0%[HBsAg, 以meso-galgravin(14)最大]和6.8%-33.9%[HBeAg, 以(-)-galbelgin(15)最大]。同时发现futoquinol(16)、(-)-galbelgin和meso-galgravin在浓度为25 μmol/L时,能有效抑制HBV表面抗原和e-抗原的产生, piperenone(17)仅在高浓度(50 μmol/L)时抑制e-抗原的产生。

Shin *et al*^[10]研究发现,从叶下珠中得到的鞣花酸(ellagic acid, 18)在体外能有效阻断HepG2.2.15细胞的HBeAg的分泌, IC₅₀为0.07 μg/mL,但是对HBsAg和HBV DNA聚合酶无效。仲英 *et al*^[11]从叶下珠中分离出的多酚类成分去氢诃子次酸甲酯(19)和短叶苏木酚酸甲酯(20)具有抗HBsAg活性。孔庚星 *et al*^[12]报道青果中的没食子酸(21)是抗HBsAg、HBeAg成分之一。李荣芷 *et al*^[13]经特异免疫沉淀法和对2.2.15细胞株的HBsAg, HBeAg的抑制实验,以阿糖腺苷为阳性对照,从104种中草药中优选出单味中药(912)对HBV DNA、HBsAg和HBeAg抑制率高达90%左右,并认为其抗HBV活性与多元酚(鞣质)密切相关。

1.2 生物碱类(alkaloids) 我国科学家对中药苦参(*Sophora flavescens* Ait)治疗乙肝的基础和临床进行了大量的研究工作,已经开发有相关制剂。新近Ding *et al*^[14]比较研究了包括氧化苦参碱(oxymatrine, 22)等11种苦参生物碱,即苦参碱[(+)-matrine (23)], (+)-9α-羟基苦参碱[(+)-9α-hydroxymatrine(24)], 别苦参[(+)-allomatrine (25)], (+)-氧化槐果碱[(+)-oxysophocarpine (26)], (-)-槐果碱[(-)-sophocarpine (27)], (-)-9α-羟基槐果碱[(-)-9α-hydroxysophocarpine (28)], (+)-12α-羟基槐果[(+)-12α-hydroxysophocarpine (29)], (+)-lehmannine (30), (-)-13, 14-去

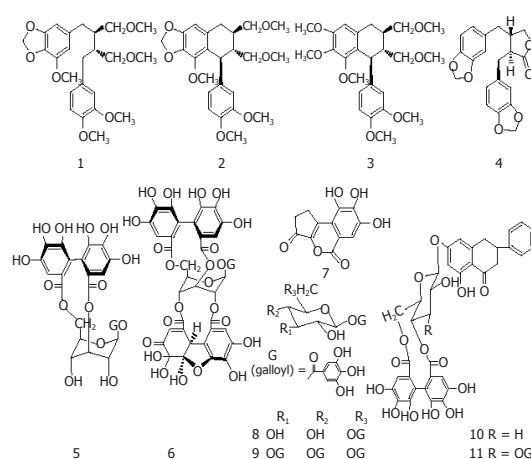


图1 叶下珠属植物中抗HBV木脂素和多酚类化合物。

表1 叶下珠属植物中木脂素和多酚对HBV抗原的抑制活性

化合物	浓度 (μmol/L)	HBsAg (抑制%)	HBeAg (抑制%)	AST ² (IU/L)
1	50.0	s (74.3) ¹	m ¹	14-25
2	50.0	s (69.6) ¹	w ¹	14-25
3	50.0	m ¹	w ¹	14-25
4	50.0	s ¹	s (68.1) ¹	14-25
5	50.0	-	w ¹	14-25
6	50.0	w ¹	m ¹	14-25
7	50.0	m ¹	s (54.0) ¹	14-25
8	50.0	-	w ¹	14-25
9	5.0	细胞溶解	细胞溶解	>25
10	50.0	-	w ¹	14-25
11	5.0	细胞溶解	细胞溶解	>25
INF-α	(1000 kU/L)	51.3	46.2	14-25

¹抑制活性级别: 强(s): 50%-65%; 中(m): 35%-50%; 弱(w): 20%-35%; (-): <20%。INF-α浓度为1000 kU/L。 ²AST为细胞毒性指标, >25即可引起细胞损害。

氢槐果碱[(-)-13, 14-dehydrosophoridine(31)]和(-)-anagyrine (32)的体外抗HBV活性。在0.2 μmol/L时, 化合物26, 27, 30, 31具有明显的抗HBV活性, 对HBV表面抗原(HBsAg)分泌的抑制强度为48.3%-63.4%, 对e-抗原(HBeAg)分泌的抑制强度为24.6%-34.6%。这些化合物的活性多强于拉米夫定(3TC), 并讨论了其构效关系。研究发现化合物26-27和29-31的抗HBsAg活性(0.2 μmol/mL)比现用的苦参碱和氧化苦参碱强的多(表2)。Chang *et al*^[15]从*Zanthoxylum schinifolium*中得到的oxynitidine (33)的HBID₅₀为30.8 μg/mL。

杨国红^[16]测定了两面针中的异喹宁生物碱6-甲氧基-5, 6-二氢两面针碱(6-methoxy-5,

■同行评价

当前国际我国对传统天然药物在抗病毒研究上日趋重视, 本文较新, 有意义。

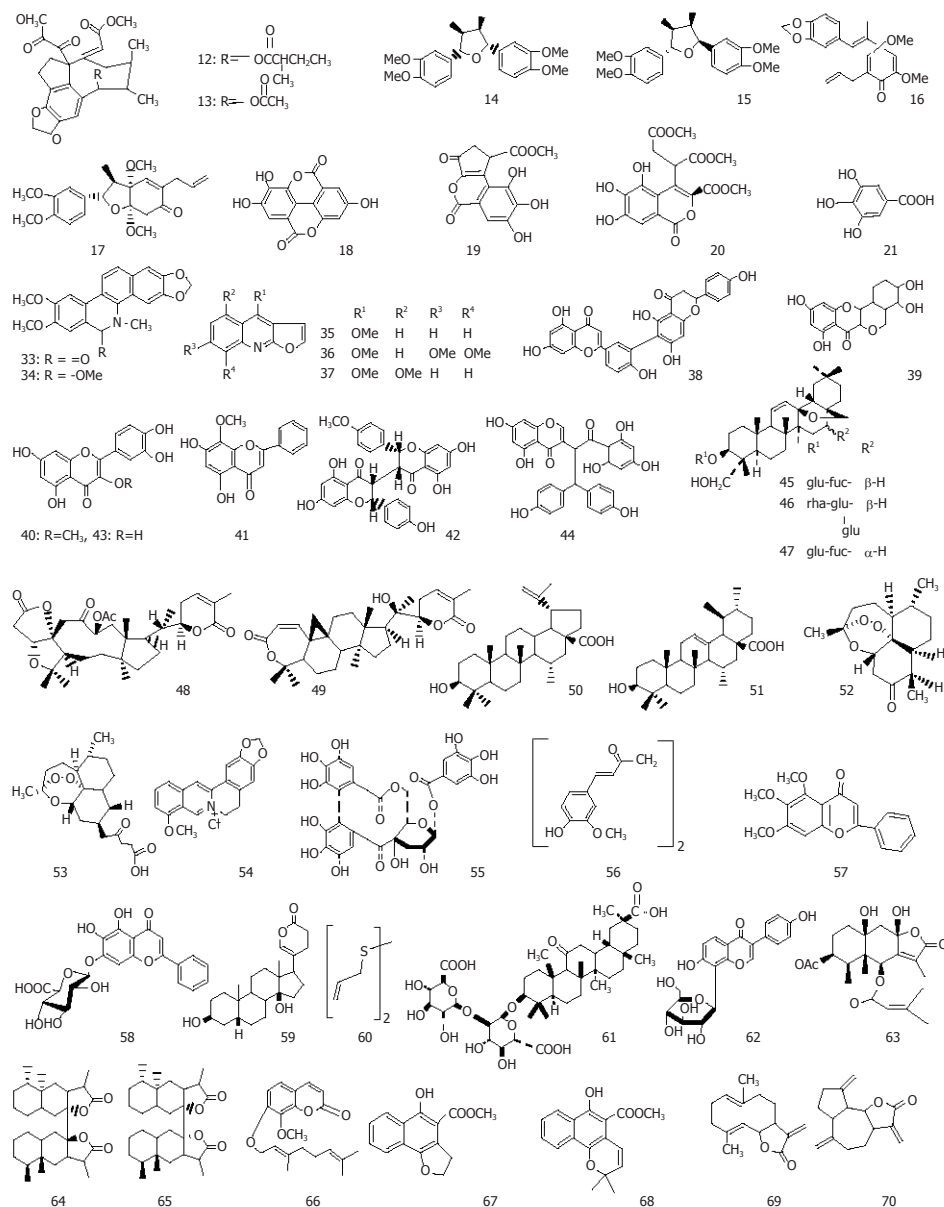


图 2 各类活性成分的结构.

6-dihydro-nitidine, 34)和三种呋啉宁生物碱白藜碱(dictamnine, 35)、茵芋碱(skimmianine, 36)、5-甲氧基-白藜碱(5-methoxy-dictamnine, 37)的抗HBV活性, 其中HBsAg的抑制率在18.6%-49.3%, HBeAg的抑制率在6.81%-43.2%, 以5-甲氧基-白藜碱(5-methoxy-dictamnine)的活性最大, 母核上甲氧基的位置和个数对活性有较大影响。

1.3 黄酮类(flavonoids) Zembower *et al*^[17]发现自漆树科野漆(*Rhus succedameu*)分离得到的双黄酮(Robustatlavone, 38)具有强烈抑制HBV DNA复制作用, 其半数有效浓度为(EC₅₀)0.25 μmol/L, 选择性指数(SI, IC₅₀/EC₅₀)153. 其六醋酸酯的EC₅₀为0.73 μmol/L. 与拉米夫定(lamivudine, 3TC)和喷昔洛韦(penciclovir)具有明显协同

抗HBV作用. 由Lin *et al*^[18]得自*Ophioglossum petiolatum*的黄酮类化合物Ophioglonol (39)和槲皮素-3-O-甲醚(40)在25 μmol/L时具有轻微抑制MS-G2肝癌细胞HBsAg的作用(抑制率在25%-35%之间). Huang *et al*^[19]通过测定对该细胞的HBV DNA聚合酶的作用, 认为黄芩(*Scutellaria baicalensis*)中的汉黄芩素(wogonin, 41)能抑制HBsAg.

杨国红^[16]测定了瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme*)中的黄酮类化合物雁皮素A(sikokianin, 42)、槲皮素(quercetin, 43)和狼毒色原酮(chamaechromone, 44)对HepG2 2.2.15细胞分泌的HBsAg的抑制率较高, 分别为71.9%、64.3%、34.0%(3TC为29.6%), 但是对HBeAg的

抑制率较低,其中雁皮素无作用,后二者分别25.8%和5.84%(3TC为35.4%).

1.4 萜类(terpenoids)

1.4.1 皂苷(saponins) Chiang *et al*^[20]测定了柴胡属(*Bupleurum*)植物的柴胡皂苷a(45), c(46)和d(47)的细胞毒及其抗HBV活性. 除a、d外, c具有明显减低HBeAg的作用, c还能抑制HBV DNA的复制, 其作用与细胞毒无关; d虽有细胞毒作用, 但是不能抑制HBV DNA的复制, 所以, c具有抗HBV作用而d具有强烈细胞毒作用. 考察三种皂苷的结构发现, 在D-环上的羟基为反式者(d)具有细胞毒作用, 而抗HBV活性与连在A-环上的糖链结构有关. 蔡光明 *et al*^[21]研究表明, 鹅绒委陵菜总皂苷具有明显抑制HBsAg、HBeAg和HBV DNA作用. 高士奇 *et al*^[22]用丁香总皂苷作用于2.2.15细胞, 发现对分泌的HBsAg和HBeAg有抑制作用. 刘厚佳^[23]测得齐墩果酸对HBsAg、HBeAg(80 mg/L)和HBV DNA(20 mg/L)的抑制率分别为47.7%、15.6%和29.3%.

1.4.2 三萜及三萜内酯 Shen *et al*^[24]测定了kadsuphilactone A(48)和B(49)的细胞毒和抗HBV作用. 体外B抑制HBsAg的IC₅₀是6 mg/L. 陈斌^[25]测定了白桦脂酸(50)和熊果酸(51)对HepG细胞分泌HBV抗原在浓度为0.0125 mmol/L时的抑制率分别为47.0%和39.9%.

1.4.3 二萜和倍半萜 朱宇同 *et al*^[26]研究指出对得自云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)的紫杉烷二萜类化合物TD-1在体内外具有抑制HBsAg作用(IC₅₀为4.24 mg/L), 但对HBeAg无效.

Romero *et al*^[27]考察了得自传统中药青蒿中青蒿素(artemisinin, 52)、其衍生物(artesunate, 53)和包括上述多种结构类型的中药成分对HBV的抗病毒活性. 将药物(0.01-100 μmol/L)与转染细胞HepG2 2.2.15接触21 d后, 测定了该细胞产生的HBV标志物HBsAg、HBV DNA和药物对寄主细胞的毒性. 结果分为(1)无效: 即药物对病毒产生无效, 包括(daidzein, daidzin, isonardosinon, nardofuran, nardosinon, tetrahydronardosinon和quercetin); (2)低效: 能明显减低病毒产生, 但是对寄主有细胞毒作用, 包括小檗碱(berberine, 54)和单宁酸(tannic acid, 55)或是对寄主无细胞毒作用但对病毒产生有中等效果(curcumin, baicalein, baicalin, bufalin, diallyl disulphide, glycyrrhizic acid和puerarin, 56-63); (3)高效: 对寄主无细胞毒浓度下能对病毒产生强抑制效果(artemisinin和artesunate). 另外,

表 2 苦参生物碱对HBV抗原的抑制活性

化合物	HBsAg (抑制%)	HBeAg (抑制%)
22	39.7	17.1
23	30.9	2.7
24	31.6	19.5
25	27.7	10.8
26	48.3	24.6
27	57.2	34.6
28	24.5	5.7
29	40.8	4.6
30	52.6	25.4
31	63.4	6.8
32	19.8	0
3TC	29.6	35.4

artesunate与拉米夫啉(lamivudine)合用有协同抗HBV作用. Li *et al*^[28]从千里光属植物*Senecio tsoongianus*中分离得到的倍半萜内酯(64-66)在浓度为250 μmol/L以上有抑制HBsAg、HBeAg的作用, 结果还提示与其他抗病毒药有协同作用.

1.5 香豆素类(coumarins) Chang *et al*^[15]测定了花椒属植物*Zanthoxylum schinifolium*中的萜基取代香豆素collinin(67)的抗HBV活性, 其对HBV DNA复制的50%抑制率(HBID₅₀)为17.1 mg/L.

1.6 其他^[28-29] Ho *et al*^[29]得自钩毛茜草(*Rubia cordifolia*)根的两个蒽氢醌类成分furomollugin(68), mollugin(69)对人肝癌Hep3B细胞分泌的HBsAg具有强抑制活性, 其IC₅₀均为2.0 mg/L, 且只有轻微细胞毒性. 构效关系揭示C6位羟基及呋喃或吡喃环与抑制活性有关. Chen *et al*^[30]得自凤毛菊属植物(*Saussurea lappa*)根中的两个内酯成分costunolide(70)和dehydrocostus lactone(71)对Hep3B细胞的HBsAg有抑制而细胞毒轻微, 其IC₅₀分别为1.0 和 2.0 μmol/L. 刘厚佳 *et al*^[31]测定了原儿茶酸对HBsAg、HBeAg和HBV DNA的抑制率(70 μg/mL)分别为38.2%、47.2%和46.5%. 一些植物多糖的抗HBV活性也有过报道.

2 讨论

虽然早在1980年初就有印度学者报道植物药叶下珠的抗HBV作用, 但其后的10余年抗HBV植物药成分的筛选并未有多大进展, 这可能与研究者对于抗爱滋病毒HIV药物的研究更为重视有关, 也可能是由于缺乏可行的活性筛选模型. 如Perez总结了1950-2000 40 a植物抗病毒活性

成分共344种, 其中多数为抑制HIV成分, 仅有wogonin等少数成分涉及肝炎病毒^[32]. 自1990年代初开始, 国内郑明实 *et al* 率先将2.2.15细胞模型用于对我国中草药提取物的广泛筛选, 其后的近10 a来, 特别是进入新世纪后, 我国学者的抗HBV天然药物活性成分研究取得了可喜的进步. 尽管如此, 药用植物抗HBV作用的基础与临床研究的广度和深度还远远不够, 我国1万多种药用植物中仅对少数品种如叶下珠、水飞蓟(*Silybum marianum*)、苦参、甘草(*Glycyrrhiza glabra*)、柴胡、绿茶(*Camellia sinensis*)等作过系统的研究^[33-34]. 充分应用植物化学技术, 并结合植物化学分类学的观点和现代生物技术, 研究新型筛选模型, 从植物次生代谢产物中筛选高效、低毒的抗HBV活性成分、扩大药源, 其前景是非常广阔的.

由上述可见, 与目前临床上所用的以核苷类似物为主的单一抗病毒药物结构类型相比, 业已证明常见结构类型的药用植物次生代谢产物都具有抗HBV活性. 从体外筛选方法来看, 肝癌转染细胞系HepG 2.2.15细胞由于具有稳定分泌HBV颗粒的特性而被广泛采用. HBV感染的源头(表面抗原和e-抗原)就存在于病毒颗粒中, 所以, 研究能清除HBV抗原的有效药物就显得至关重要. 与其他病毒一样, HBV没有独立的细胞结构, 其在宿主体内的复制需要借助宿主细胞才能完成. 植物药有效成分抗HBV的实用价值必须首先排除对宿主的细胞毒性. 上述各类抗HBV活性成分均没有细胞毒性或毒性轻微. 考虑到病毒生长复制的一些共同特征, 借鉴抑制HIV等其他病毒活性成分研究的成果, 有助于筛选抗HBV活性目标化合物和开发新的治疗药物. 如最初以抑制HIV逆转录酶为目的的拉米夫定, 后来发现对HBV逆转录酶更为有效并成为治疗乙肝的药物.

除抑制HBV抗原外, 植物药抗HBV的机制还有抑制HBV DNA聚合酶、抑制HBV DNA等. HBV感染宿主细胞主要经过吸附、穿入、脱壳、基因及蛋白的复制、装配和释放等过程, 理论上凡能阻断这些过程中任何一个环节, 均具有抗HBV作用^[35]. 另外, 针对共价闭环环状DNA(cccDNA)的目标化合物的发现将有利于克服当前抗HBV药物的耐药性, 减少复发. 药用植物复杂而特殊的化学成分使其除了对HBV直接的抑制作用外, 还能对HBV感染后导致的肝脏

功能和器质性病变有多重作用, 如调节机体免疫功能、保肝降酶、抑制肝纤维化、抗氧化和清除自由基等. 上述成分类别中的皂苷、生物碱、黄酮、木脂素和多酚等成分均具有此作用^[36]. Liu *et al*^[37]认为传统中药的许多生物活性与其中存在的皂苷和多酚类成分有很大关系, 其抗HBV作用也不例外. 植物抗HBV活性成分与化学合成抗HBV药物的协同作用也为中西药联合治疗乙肝提供了依据, 这有助于克服西药副作用大、机制单一和耐药性的缺点. 由于生物种属差异和机体内环境的复杂性, 体外抗病毒有效的活性成分在体内作用也存在各种差异, 同时, 单一植物成分的提取分离工艺复杂、提纯量有限, 造成体外筛选的有效成分进行体内验证的困难. 探索新的高效提取分离方法, 研究有效成分组如总皂苷、总黄酮、总生物碱、总木脂素及研究高活性成分的化学合成与结构改造等, 加强抗HBV体内外研究的结合, 将更利于植物抗HBV活性成分的开发利用.

3 展望

经过自然界漫长的生存竞争, 作为一种特殊的病原体, 虽然HBV巧妙地寄生于人体肝细胞, 给人类健康带来了棘手的难题. 但是, 大自然同时也赋予人类抵抗HBV有用的药用植物资源. 充分重视植物次生代谢产物抑制HBV的基础与临床研究, 从药用植物中获取抗病毒有效成分并开发抗HBV药物, 其前途应该是可行的和乐观的.

4 参考文献

- 1 EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol* 2003; 38: 533-540
- 2 姚希贤, 崔东来. 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1645-1649
- 3 Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 2001; 109 Suppl 1: 69-75
- 4 Jassim SAA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microb* 2003; 95: 412-427
- 5 刘厚佳, 胡晋红, 蔡溱, 刘涛. 中药及其有效成分抗乙型肝炎病毒的研究进展. *解放军药学报* 2000; 16: 265-267
- 6 Thyagarajan SP, Thiruneelakantan K, Subramanian S, Sundaravelu T. *In vitro* inactivation of HBsAg by *Eclipta alba* Hassk and *Phyllanthus niruri* Linn. *Indian J Med Res* 1982; 76 Suppl: 124-130
- 7 Huang RL, Huang YL, Ou JC, Chen CC, Hsu FL, Chang C. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus *in vitro*. *Phytother Res* 2003; 17: 449-453

- 8 Kuo YH, Wu MD, Huang RL, Kuo LM, Hsu YW, Liaw CC, Hung CC, Shen YC, Ong CW. Antihepatitis activity (anti-HBsAg and anti-HBeAg) of C19 homolignans and six novel C18 dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura japonica*. *Planta Med* 2005; 71: 646-653
- 9 Huang RL, Chen CF, Feng HY, Lin LC, Chou CJ. Anti-hepatitis B virus of seven compounds isolated from *piper kadsura* (choisy) ohwi. *J Chin Med* 2001; 12: 179-190
- 10 Shin MS, Kang EH, Lee YI. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. *Antiviral Res* 2005; 67: 163-168
- 11 仲英, 左春旭, 李凤琴, 丁杏苞, 姚庆强, 吴克霞, 张琴冈, 王志玉, 周玲, 王菊, 兰静, 王晓静. 叶下珠化学成分及其抗乙肝病毒活性的研究. *中国中药杂志* 1998; 23: 363-364
- 12 孔庚星, 张鑫, 陈楚城, 段文军, 夏志祥, 郑民实. 青果中抗HBsAg/HBeAg成分的研究. *解放军医学高等专科学校学报* 1998; 26: 5-7
- 13 李荣芷, 李霞, 何为江. 中草药中抗HBV多元酚类活性成分的研究. *北京医科大学学报* 1994; 26: 134-135
- 14 Ding PL, Liao ZX, Huang H, Zhou P, Chen DF. (+)-12 α -Hydroxysophocarpine, a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens*. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 1231-1235
- 15 Chang CT, Doong SL, Tsai IL, Chen IS. Coumarins and anti-HBV constituents from *zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* 1997; 45: 1419-1422
- 16 杨国红. 瑞香狼毒等三种药用植物的生物活性成分. 复旦大学博士学位论文 2005; 81-84
- 17 Zembower DE, Lin YM, Flavin MT, Chen FC, Korba BE. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Res* 1998; 39: 81-88
- 18 Lin YL, Shen CC, Huang YJ, Chang YY. Homoflavonoids from *Ophioglossum petiolatum*. *J Nat Prod* 2005; 68: 381-384
- 19 Huang RL, Chen CC, Huang HL, Chang CG, Chen CF, Chang C, Hsieh MT. Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med* 2000; 66: 694-698
- 20 Chiang LC, Ng LT, Liu LT, Shieh DE, Lin CC. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum* species. *Planta Med* 2003; 69: 705-709
- 21 蔡光明, 赵燕玲, 袁海龙, 张新全, 刘峰群, 贺承山, 汤春玲, 李壮. 鹅绒委陵菜有效部位(总皂苷)的分离与抗鸭乙肝病毒(DHBV-DNA)作用. *中南药学* 2003; 1: 17-21
- 22 高士奇, 迟宝荣, 王峰, 刘晓东, 金镇勋, 贺红. 丁香多总皂对HBV转染细胞表达功能的影响. *第四军医大学学报* 2003; 24: 1234-1235
- 23 刘厚佳, 胡晋红, 孙莲娜, 蔡湊, 石晶, 刘涛. 木瓜中齐墩果酸抗乙型肝炎病毒研究. *解放军药学报* 2002; 18: 272-274
- 24 Shen YC, Lin YC, Chiang MY, Yeh SF, Cheng YB, Liao CC. Kadsuphilactones A and B, Two Novel Triterpene Dilactones from *Kadsura philippinensis*. *Org Lett* 2005; 7: 5348
- 25 陈斌. 蓝桉果实活性成分的研究. 第二军医大学博士学位论文 2002: 65-66
- 26 朱宇同, 胡英杰, 邓学龙, 刘妮, 沈小玲, 方宏勋, 容秉培, 王新华, 郭兴伯, 李国桥. 紫杉烷二萜化合物抗乙型肝炎病毒作用的实验研究. *中华医学杂志* 1999; 79: 384-385
- 27 Romero MR, Efferth T, Serrano MA, Castano B, Macias RI, Briz O, Marin JJ. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system. *Antiviral Res* 2005; 68: 75-83
- 28 Li HB, Zhou CX, Zhou LF, Chen Z, Yang LX, Bai H, Wu XM, Peng H, Zhao Y. In vitro antiviral activity of three enantiomeric sesquiterpene lactones from *Senecio* species against hepatitis B virus. *Antiviral Chem Chemother* 2005; 16: 277-282
- 29 Ho LK, Don MJ, Chen HC, Yeh SF, Chen JM. Inhibition of hepatitis B surface antigen secretion on human hepatoma cells. Components from *Rubia cordifolia*. *J Nat Prod* 1996; 59: 330-333
- 30 Chen HC, Chou CK, Lee SD, Wang JC, Yeh SF. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res* 1995; 27: 99-109
- 31 刘厚佳, 胡晋红, 孙莲娜, 蔡湊, 石晶, 刘涛. 原儿茶酸等化合物对HBV DNA转染人肝癌细胞株的作用. *第二军医大学学报* 2001; 22: 661-663
- 32 Perez GRM. Antiviral activity of compounds isolated from plants. *Pharm Biol* 2003; 41: 107-157
- 33 Luper SND. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. *Altern Med Rev* 1998; 3: 410-421
- 34 Luper SND. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. *Altern Med Rev* 1999; 4: 178-189
- 35 王娟, 倪虹, 陈力, 宋文芹. 中草药抑制HBV作用机制的研究进展. *现代中西医结合杂志* 2003; 12: 2010-2012
- 36 程书权, 孔淑敏. 中草药活性成分治疗慢性肝病的现代研究. *国外医学中医中药分册* 2004; 26: 209-213
- 37 Liu J, Henkel T. Traditional Chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr Med Chem* 2002; 9: 1483-1485

电编 张敏 编辑 张海宁

食管鳞癌细胞系EC-109中缺氧诱导因子-1 α 的表达意义

杜琰萍, 施瑞华, 肖斌, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 郝波

杜琰萍, 施瑞华, 肖斌, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 郝波, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029
杜琰萍, 南京医科大学第一附属医院消化科在读硕士.
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2005153
通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化科, ruihuashi@126.com
电话: 025-83718836-6032
收稿日期: 2006-02-28 接受日期: 2006-03-15

Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α in esophageal squamous cancer cell line EC-109

Yan-Ping Du, Rui-Hua Shi, Bin Xiao, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Guo-Xin Zhang, Bo Hao

Yan-Ping Du, Rui-Hua Shi, Bin Xiao, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Guo-Xin Zhang, Bo Hao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2005153

Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2006-02-28 Accepted: 2006-03-15

Abstract

AIM: To investigate expression and significance of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in human esophageal squamous cancer cell line EC-109.

METHODS: Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were performed to detect the expression of HIF-1 α mRNA and protein in esophageal squamous cancer cell line EC-109 exposed to normal oxygen or hypoxia condition.

RESULTS: HIF-1 α mRNA was over-expressed in esophageal squamous cancer cell line EC-109 under hypoxia condition ($P < 0.05$), and reached the peak at 24 h. However, HIF-1 α protein had no significant up-regulation in hypoxia ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Hypoxia can induce high expression of HIF-1 α at mRNA level, but not at

protein level.

Key Words: Hypoxia; Hypoxia inducible factor-1 α ; Esophageal squamous cell carcinoma; Gene expression regulation

Du YP, Shi RH, Xiao B, Zhu H, Ling TS, Zhang GX, Hao B. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α in esophageal squamous cancer cell line EC-109. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1247-1251

摘要

目的: 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在食管鳞癌细胞系EC-109中的表达及其意义。

方法: 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot分别检测HIF-1 α mRNA和蛋白在常氧及缺氧状态下在食管鳞癌EC-109细胞中的表达。

结果: HIF-1 α mRNA在缺氧食管鳞癌EC-109细胞中过表达($P < 0.05$), 在缺氧24 h时HIF-1 α mRNA表达最高, 其后随时间延长表达下降; HIF-1 α 蛋白水平在缺氧食管鳞癌EC-109细胞中无明显上调($P > 0.05$)。

结论: 低氧可诱导食管鳞癌EC-109细胞中HIF-1 α mRNA的过度表达, 缺氧状态下HIF-1 α 蛋白水平较常氧时无明显增加。

关键词: 缺氧; 缺氧诱导因子-1 α ; 食管鳞癌; 基因表达调控

杜琰萍, 施瑞华, 肖斌, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 郝波. 食管鳞癌细胞系EC-109中缺氧诱导因子-1 α 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2006;14(13):1247-1251

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1247.asp>

0 引言

我国是食管癌高发区, 食管癌校正死亡率达20.4/10万, 居世界首位, 主要为食管鳞状细胞癌, 占全部食管癌的95%左右. 食管癌总的疗效和预后较差, 对人们健康构成极大威胁. 近年来国内外学者对食管鳞癌进行了大量的基础研

■背景资料

我国是食管癌高发区, 对人们健康构成极大威胁. 近年来学者对食管鳞癌进行了大量的基础研究, 我们进一步研究了体外培养食管鳞癌细胞EC-109中HIF-1 α 在缺氧状态下的表达及其意义.

■创新盘点

国内外对食管鳞癌中HIF-1 α 的研究较少,本实验在既往研究的基础上观察了缺氧状态下食管鳞癌细胞EC-109中HIF-1 α 的表达意义。

究,特别是血管再生在食管癌发病机制中的作用。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIFs)是调节血管生成的重要活性调节因子。施瑞华 *et al*^[1-3,18]对HIF-1 α 的表达及其多态性与食管鳞癌临床病理特征的关系进行了研究,结果提示HIF-1 α 可能与食管鳞癌血管生成、浸润能力、淋巴结转移和TNM分期有关;我们进一步研究了体外培养食管鳞癌细胞EC-109中HIF-1 α 在常氧及缺氧状态下mRNA和蛋白水平的表达,以探讨HIF-1 α 在食管鳞癌发生、发展中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞系EC-109购自中国科学院上海细胞所。小牛血清购自杭州四季青公司; RPMI 1640培养液购自Gibco公司; RNA提取试剂Tri-Blue购于上海申能博彩公司; RT-PCR试剂盒购于Fermentas公司; 鼠抗人的HIF-1 α 单抗为Chemicon公司生产; HRP标记的羊抗鼠的二抗为Rockland公司产品; 鼠抗人的Tubulin单抗为Sigma公司产品; PVDF膜(微孔性的聚偏乙烯双氟化物膜)购自Roche公司。其余试剂均为分析纯。食管鳞癌EC-109细胞呈贴壁生长,培养于含100 mL/L小牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中,置于含50 mL/L CO₂的37℃培养箱中。1-2 d换液1次, 3-4 d用2.5 g/L胰酶消化传代1次。缺氧处理: 将细胞置于一密封袋中,持续充以混合气体(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 100 mL/L H₂, 800 mL/L N₂)模拟低氧环境,缺氧时间分别为3, 6, 12, 24, 48, 72 h; 相应设置空白对照组。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测HIF-1 α mRNA的表达 Tri-Blue试剂一步法提取细胞总RNA, 按照试剂盒说明书完成各个样本RNA的抽提纯化和cDNA的合成。取总RNA 5 μ L用MMLV逆转录酶进行逆转录, PCR扩增HIF-1 α , 同时扩增 β -actin作为内参照。每个样本至少重复3遍。HIF-1 α 引物用Primer-5软件根据引物设计要求自己设计, 上游引物为5'-GCAAGACTTTCCTCAGTCGACACA-3', 下游引物为5'-GCATCCTGTACTGTCCTGTGGTGA-3', 扩增片段长度为207 bp; β -actin引物参照文献[4]设计, 上游引物为5'-AGCGGGGAAATCGTGCGTG-3', 下游引物为5'-CAGGGTACATGGTGGTGCC-3', 扩增片段为287 bp; 引物合成于Invitrogen公司。PCR反应条件: 95℃预变性

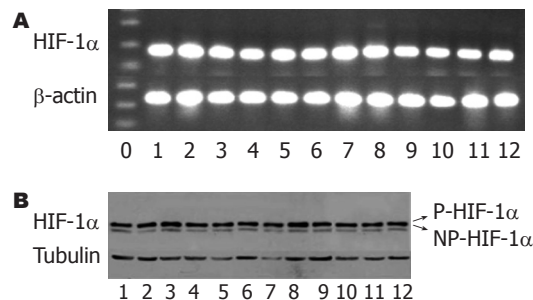


图1 食管鳞癌细胞系EC-109中HIF-1 α 表达。A: RT-PCR。0: DNA marker DL2000; 1-6: 缺氧3, 6, 12, 24, 48, 72 h; 7-12: 非缺氧3, 6, 12, 24, 48, 72 h; B: Western blot。P-HIF-1 α : 磷酸化-HIF-1 α ; NP-HIF-1 α : 去磷酸化-HIF-1 α 。

3 min, 94℃变性30 s, 60℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸8 min。产物于4℃保存。10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.2.2 Western blot检测HIF-1 α 蛋白的表达 取 3×10^5 EC-109细胞加细胞裂解液[20 mmol/L Tris(pH 7.5), 4 mmol/L EDTA(pH 8.0), 20 g/L SDS]150 μ L裂解细胞制备总蛋白。超声破碎后12 000 r/min, 离心10 min, 取上清, 用BSA标准蛋白检测蛋白浓度, 取总蛋白40 μ g上样, 行稳流SDS-PAGE电泳, 稳压冰浴电转至PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h后TBST漂洗3 $\times$ 5 min加入鼠抗人HIF-1 α 单抗(工作浓度1: 500)4℃孵育过夜。TBST漂洗3 $\times$ 5 min后再加HRP标记的羊抗鼠二抗(工作浓度为1: 10 000)室温孵育1 h, TBST漂洗3 $\times$ 5 min。ECL化学发光法显影, 以Tubulin(工作浓度为1: 4000)为内参照。

统计学处理 数据以mean $\pm$ SD表示, 两组数据比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。Tanon Gis软件对凝胶电泳条带和感光胶片条带进行灰度值分析, 以目的条带与内参照条带的比值代表目的基因mRNA和蛋白的表达水平。

2 结果

2.1 HIF-1 α mRNA在食管鳞癌细胞EC-109中的表达 EC-109细胞中HIF-1 α mRNA水平在缺氧组较常氧组明显升高($P < 0.05$), 而且在缺氧24 h时HIF-1 α mRNA水平最高, 其后随缺氧时间延长而表达下降(图1A, 2A-B)。

2.2 HIF-1 α 蛋白在食管鳞癌细胞EC-109中的表达 EC-109细胞中HIF-1 α 蛋白水平在缺氧状态下随时间延长也有增加, 在缺氧24 h时水平最高, 但是与常氧状态下相比差异无统计学意义; 结果还提示不管在常氧还是缺氧状态下HIF-1 α 蛋

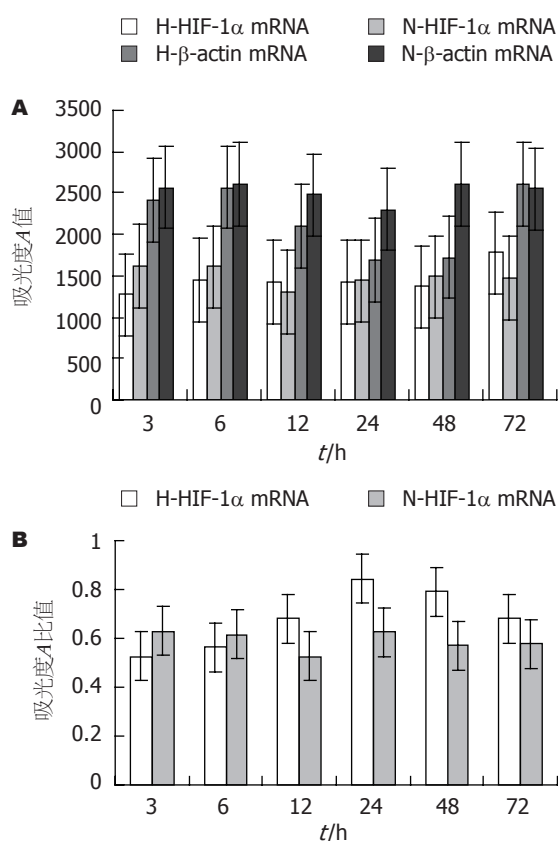


图2 缺氧状态下EC-109细胞中HIF-1 α mRNA表达水平. H: Hypoxia; N: Non-hypoxia.

白的表达均存在磷酸化及去磷酸化两种形式(图1B, 3A-B).

3 讨论

肿瘤增生过快造成肿瘤微环境始终处于相对缺氧和代谢紊乱状态, 这是恶性肿瘤的生长特点之一, 实体肿瘤一般可有10%-35%的缺氧细胞^[5]. 研究表明缺氧可触发机体产生一系列应激性保护反应, 新生血管形成和细胞无氧代谢增加是肿瘤细胞得以在缺氧环境下免受损伤或死亡, 继续生长、增殖的重要途径^[6-9]. 其中缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的表达和活性增强是肿瘤细胞适应缺氧环境的重要原因. HIF-1是缺氧状态下广泛存在于哺乳动物及人体内的一种核转录因子. 由HIF-1 α 和HIF-1 β 两个亚基组成同源二聚体, HIF-1 α 是主要的氧调节亚基和功能亚基. 因为HIF-1 α 在常氧下迅速降解而在缺氧时稳定表达并活化^[10-11], 所以其在细胞适应缺氧途径中是连接上下游基因激活的重要调节因子. 常氧时HIF-1 α 尽管表达, 但很快被泛素-蛋白酶体降解, 因此几乎检测不到; 缺氧时 α 亚单位降解被阻断, 得以在核内蓄积, 并与HIF-1 β 结合形成有活性的HIF-1, 从而启动50多

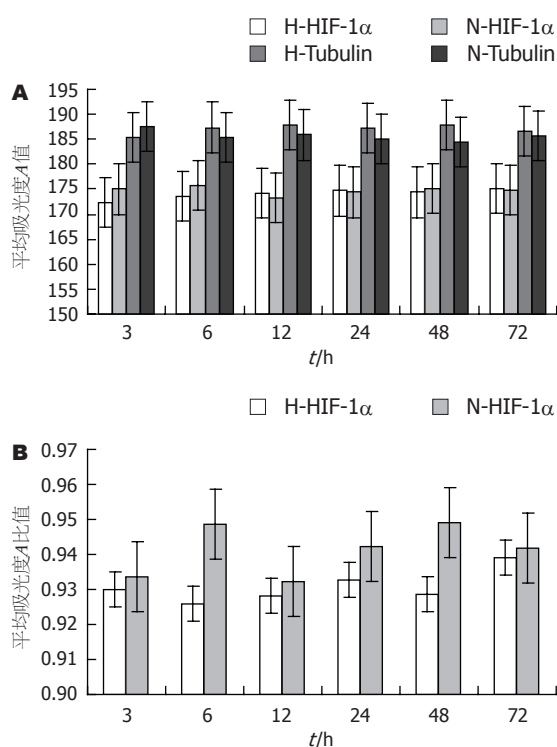


图3 缺氧状态下EC-109细胞中HIF-1 α 蛋白表达水平. H: Hypoxia; N: Non-hypoxia.

种下游靶基因, 如EPO, VEGF, 血红素氧合酶-1, 葡萄糖转运因子1、3, 转铁蛋白及糖酵解酶类等的转录活化, 涉及肿瘤细胞能量代谢、血管生成、肿瘤转移、离子代谢和儿茶酚胺代谢等方面. 施瑞华 *et al*^[1-2]的研究提示HIF-1 α 在食管鳞癌病理组织标本过表达而在正常食管上皮中无表达, 提示HIF-1 α 与食管鳞癌的血管生成、TNM分期、转移能力有关; 在本研究中我们也观察到体外培养的食管鳞癌EC-109细胞中无论在常氧还是缺氧状态下HIF-1 α 均有表达, 而且在缺氧状态下过表达(图1, 2A-B), 这也提示HIF-1 α 可能在食管鳞癌的发生、发展中发挥一定作用. 这与在人类其他恶性疾病如肺、肾、膀胱、前列腺、乳腺、胃、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌、垂体腺瘤等多种肿瘤及局部和远处转移灶中HIF-1 α 过表达^[4-5,9,12,19-26], 而且其表达水平与肿瘤的发生演变过程、浸润能力、多药耐药及预后判断有关系^[9,27-30], 但在大部分正常组织中无表达的研究结果一致.

缺氧对HIF-1 α 活性的调节可以发生在转录、磷酸化、蛋白稳定等多个水平上. 我们的研究表明, 食管鳞癌EC-109细胞在缺氧状态下HIF-1 α mRNA过表达, 但HIF-1 α 蛋白水平上调不明显, 提示其活性调节可能发生在转录水平(图2B, 3B). 这与有研究认为缺氧可上调HIF-1 α

■应用要点

本文进一步研究了HIF-1 α 的表达意义, 对今后的研究有一定的借鉴作用.

同行评价

本文题目切题, 研究背景与目的明确, 设计合理, 结论有一定科学意义。文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国或国际食管癌基础研究的先进水平。

转录水平^[13]结果一致, 也有认为缺氧时HIF-1 α 的调节主要发生在蛋白而非转录水平^[4,14-15]。在缺氧及常氧状态下食管鳞癌EC-109细胞中HIF-1 α 蛋白均有磷酸化及非磷酸化两种形式存在。最近的研究表明, HIF-1 α 的两种不同存在形式决定了他们的不同活性, 磷酸化的HIF-1 α 与 β 亚基结合, 而去磷酸化的HIF-1 α 与p53结合, 从而引起不同的效应^[17]。这也提示我们HIF-1 α 蛋白的活性调节可能与其空间构象而非蛋白表达量有关, 可能存在2条途径, 但这尚需大量的实验研究证实。我们还观察到, 食管鳞癌EC-109细胞中HIF-1 α 水平随缺氧时间延长其表达上升, 在缺氧24 h时达高峰, 其后随缺氧时间延长表达下降(虽然mRNA明显过表达而蛋白水平无统计学意义), 这提示可能存在两种效应机制。近来发现, 随缺氧严重程度不同, HIF-1 α 具有促进凋亡和抗凋亡两种不同的效应。细胞轻度缺氧时, HIF-1 α 能与 β 亚基结合, 通过活化其靶基因的转录, 降低**bax/bcl-2**比例, 降低caspase3活性等途径抑制细胞凋亡。而细胞缺氧严重时, HIF-1 α 与p53结合, 使p53稳定并发挥促进细胞凋亡的效应; p53与HIF-1 α 结合后还能通过抑制HIF-1 α 对靶基因的转录激活及促进HIF-1 α 的蛋白酶性降解两种方式调节HIF-1 α 的表达^[16]。

总之, 缺氧状态下HIF-1 α 在食管鳞癌细胞EC-109中有过表达, 主要表现在转录水平; 提示HIF-1 α 可能与食管鳞癌EC-109细胞适应缺氧环境有关系; 蛋白水平的活性调节机制尚需进一步研究。

参考文献

- 施瑞华, 朱宏, 张国新, 凌亭生, 郝波, 王红娣, 张智弘, 张伟明. 缺氧诱导因子1 α 、2 α 和血管内皮生长因子在食管鳞癌中的表达. 胃肠病学 2004; 9: 335-339
- 朱宏, 施瑞华, 张国新, 凌亭生, 郝波, 张智弘, 张伟明. 食管鳞癌发生过程中缺氧诱导因子1 α 和血管内皮生长因子的表达变化. 中华消化杂志 2004; 24: 755-756
- 凌亭生, 施瑞华, 于莲珍, 朱宏, 张国新, 郝波. 缺氧诱导因子1 α 的多态性对食管鳞癌血管生成的影响. 南京医科大学学报(自然科学版) 2005; 7: 495-499
- 兰梅, 时永全, 魏茂富, 王淑兰, 韩者艺, 潘阳林, 王晋, 乔泰东, 樊代明. 缺氧诱导因子HIF-1 α 在胃癌细胞系中的表达和意义. 现代肿瘤医学 2005; 13: 21-23
- Fan LF, Diao LM, Jiang CQ, Tang ZJ, Xia D, Liu MQ, Liu ZS, Ai ZL. Expression and pathobiological implication of hypoxia-inducible factor-1 α in human colorectal carcinoma. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2004; 33: 242-246
- Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 2004;

- 64: 1765-1772
- Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47
- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 4010-4015
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-861
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-5514
- Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 α enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 2001; 8: 638-645
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480
- Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 29-37
- Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH. Hypoxia-inducible factor-1 α is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int* 1997; 51: 560-563
- Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 889-892
- Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 α as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 2001; 20: 5779-5788
- Ling TS, Shi RH, Zhang GX, Zhu H, Yu LZ, Ding XF. Common single nucleotide polymorphism of hypoxia-inducible factor-1 α and its impact on the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 155-158
- Kondo Y, Hamada J, Kobayashi C, Nakamura R, Suzuki Y, Kimata R, Nishimura T, Kitagawa T, Kunimoto M, Imura N, Hara S. Over expression of hypoxia-inducible factor-1 α in renal and bladder cancer cells increases tumorigenic potency. *J Urol* 2005; 173: 1762-1766
- Yao K, Gietema JA, Shida S, Selvakumaran M, Fonrose X, Haas NB, Testa J, O'Dwyer PJ. *In vitro* hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile *in vivo*. *Br J Cancer* 2005; 93: 1356-1363
- Jubb A, Hillan K. Expression of HIF-1 α in human tumours. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1344
- Griffiths EA, Pritchard SA, Welch IM, Price PM, West CM. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? *Eur J Cancer* 2005; 41: 2792-2805
- Yoshida D, Kim K, Yamazaki M, Teramoto A. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and cathepsin D in pituitary adenomas. *Endocr Pathol*

- 2005; 16: 123-131
- 24 Kim K, Yoshida D, Teramoto A. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2005; 16: 115-121
- 25 Kuijper A, van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and its downstream targets in fibroepithelial tumors of the breast. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R808-R818
- 26 Palit V, Phillips RM, Puri R, Shah T, Bibby MC. Expression of HIF-1 α and Glut-1 in human bladder cancer. *Oncol Rep* 2005; 14: 909-913
- 27 Zhu H, Chen XP, Luo SF, Guan J, Zhang WG, Zhang BX. Involvement of hypoxia-inducible factor-1- α in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 565-574
- 28 Belozerov VE, Van Meir EG. Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 901-909
- 29 Kimura S, Kitadai Y, Kuwai T, Tanaka S, Hihara J, Yoshida K, Toge T, Chayama K. Expression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinoma: relation to hypoxia-inducible factor-1 α , angiogenesis and apoptosis. *Pathobiology* 2005; 72: 179-185
- 30 Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 523-530

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知

本刊讯 为了进一步推动华北地区(北京、天津、河北、山西和内蒙)的消化学术交流与发展、帮助广大消化专业工作者全面了解国内外消化基础和临床研究进展,提高消化疾病诊治和研究水平.第十二届华北地区消化学术会议,将于2006-10-27/29在河北省石家庄举办.会议由北京、天津、河北、山西和内蒙医学会消化病学分会联合主办,河北省医学会消化病学分会承办.本次会议将就近年来国内外消化领域的研究进展、诊断和治疗方面的新技术、新方法进行广泛的学术交流,大会将邀请国内著名消化病学专家作专题学术报告.欢迎消化界各位专家和同仁积极投稿参会,参会者可获得国家级I类继续教育学分.会务费:500元(含餐费及资料费),交通住宿费自理.

1 征文内容

- (1)消化系统疾病流行病学、发病机制、诊断和治疗的研究进展;
- (2)消化系统肿瘤的发病机制、诊断和治疗以及预防的进展;
- (3)消化内镜的应用现状及内镜下诊断和治疗的表演;
- (4)慢性肝病及肝癌近年来的发病情况治疗研究进展;
- (5)当前医源性疾病在消化疾病方面的表现与现状;
- (6)消化疾病在当前临床研究中热点、难点,需要解决的问题.

2 征稿要求

来稿要求是未在国内外刊物上公开发表过的论文,800字摘要一份,摘要应包括:目的、材料和方法、结果和结论4个部分.来稿一律使用A4纸打印、WORD格式,并附软盘或发电子邮件至: huabeixiaohua@yahoo.com.cn.

截稿日期: 2006-08-30,以当地邮戳为准.请务必在信封右上角注明“华北区消化会议”字样.

会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室

联系人: 河北省医学会学术会务部(邮政编码050011) 徐辉 电话: 0311-85988457; 河北医科大学第二医院(邮政编码050000)蒋树林 电话: 0311-87222301; 0311-87222951

艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜HSP70蛋白及mRNA表达的影响

常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁

■背景资料

热休克蛋白(HSPs)是一种细胞保护蛋白, 他参与重要的细胞生理活动, 是保护细胞的物质基础, 已成为胃黏膜保护机制的一个研究热点。故设法寻找一种没有毒副作用的HSPs诱导剂或方法, 诱导HSPs合成, 增加机体对细胞的保护过程, 已成为国内外研究的活跃领域。

常小荣, 易受乡, 严洁, 湖南中医药大学针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007
彭娜, 彭艳, 湖南中医药大学针灸推拿学院2003级硕士 湖南省长沙市 410007
常小荣, 湖南中医学院教授, 针灸学教研室主任, 针灸重点学科学术带头人, 主要从事针灸经络及针灸治病机理的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30572310
湖南省自然科学基金资助项目, No. 05JJ 40028
通讯作者: 常小荣, 410007, 湖南省长沙市韶山路113号, 湖南中医药大学针灸推拿学院. xrchang1956@sina.com
电话: 0731-5381163 传真: 0731-5557891
收稿日期: 2006-02-28 接受日期: 2006-03-15

Effects of moxibustion on expression of HSP70 protein and mRNA in stress-induced gastric ulcer of rats

Xiao-Rong Chang, Na Peng, Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Jie Yan

Xiao-Rong Chang, Na Peng, Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Jie Yan, Acupuncture and Massage College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572310, and the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 05JJ 40028

Correspondence to: Xiao-Rong Chang, Acupuncture and Massage College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. xrchang1956@sina.com

Received: 2006-02-28 Accepted: 2006-03-15

Abstract

AIM: To explore the mechanism of moxibustion on the acupoints of Foot-Yangming Meridian in protecting gastric mucosa by observing the effects of moxibustion pretreatment at Zusanli (ST36) and Liangmen (ST21) on HSP70 protein and mRNA expression in the stress-induced gastric ulcer of rats.

METHODS: Sixty Sprague Dawley rats were averagely randomized into blank group (A), model group (B), Zusanli and Liangmen-moxibustion group (C) and control group (D). The expression of HSP70 protein and mRNA of gastric mucosa were determined by immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction

(RT-PCR). The content of endothelin (ET) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in gastric mucosa were detected by radioimmunoassay.

RESULTS: The ulcerative index (UI) was significantly different between group B and group A, C ($P = 0.000$, $P = 0.001$), as well as between group D and group A, C ($P = 0.001$). Moxibustion on Zusanli and Liangmen relieved gastric mucosal injury obviously. The content of PGE₂ was markedly lower in group A than that in group B and D ($P = 0.011$, $P = 0.028$), but it was notably higher in group C ($P = 0.020$, $P = 0.048$). PGE₂ content was up-regulated after Moxibustion pretreatment. Meanwhile, Moxibustion lowered the content of ET (C vs B, $P = 0.020$), significantly. The expression of HSP70 protein and mRNA were increased in stress-induced gastric ulcer of rats ($P = 0.039$, $P = 0.008$), but Moxibustion pretreatment enhanced the up-regulated expression of HSP70 distinctly (C vs B, D: $P = 0.003$, $P = 0.035$; $P = 0.000$, $P = 0.001$ for protein and mRNA, respectively).

CONCLUSION: Moxibustion on Zusanli and Liangmen can protect gastric mucosa through inducing high expression of HSP70 protein and mRNA, with the relative specificity of the acupoints.

Key Words: Moxibustion; Zusanli; Liangmen; Stress-induced gastric ulcer; HSP70; Expression

Chang XR, Peng N, Yi SX, Peng Y, Yan J. Effects of moxibustion on expression of HSP70 protein and mRNA in stress-induced gastric ulcer of rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(13):1252-1256

摘要

目的: 观察艾灸足三里和梁门穴预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜热休克蛋白70(HSP70)及其基因表达的影响, 探讨艾灸足阳明经穴保护胃黏膜的作用机制。

方法: 将60只大鼠完全随机分为空白组(A)、

模型组(B)、艾灸足三里等穴组(C)和对照组(D)4组, 采用水浸-束缚应激法(WRS)制备应激性溃疡模型. 按Guth法计算胃黏膜损伤指数(UI), 用免疫组织化学法、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法和放射免疫法分别检测处理后大鼠胃黏膜HSP70, HSP70 mRNA的表达和内皮素(ET)、前列腺素E₂(PGE₂)的含量.

结果: SU大鼠胃黏膜损伤指数B组与A、C组($P = 0.000$, $P = 0.001$), D组与A、C组($P = 0.001$)有显著性差异, 艾灸足三里等穴可使SU大鼠胃黏膜损伤指数明显下降. 胃黏膜PGE₂含量A组与B、D组比较差异显著($P = 0.011$, $P = 0.028$), C组与B、D组比较差异显著($P = 0.020$, $P = 0.048$), 经艾灸预处理的大鼠胃黏膜PGE₂含量均有不同程度升高. ET含量B组与A组之间有显著差异($P = 0.040$), 经艾灸预处理的大鼠ET含量下降显著, B组与C组相比差异显著($P = 0.020$). 造模后胃黏膜的HSP70蛋白和mRNA表达均有不同程度的增强, B组与A组相比有显著性差异($P = 0.039$, $P = 0.008$); 经艾灸预处理后HSP70蛋白和mRNA显著增强, C组与B、D组比较有统计学意义(蛋白: $P = 0.003$, $P = 0.035$; mRNA: $P = 0.000$, $P = 0.001$).

结论: 艾灸足三里、梁门穴能通过增强HSP70的蛋白和基因表达, 达到对胃黏膜的保护作用, 并有一定的穴位特异性.

关键词: 艾灸; 足三里; 梁门; 应激性溃疡; 热休克蛋白70; 表达

常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁. 艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜HSP70蛋白及mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1252-1256
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1252.asp>

0 引言

艾灸对胃黏膜具有一定的保护作用^[1-3], 但其机制并未彻底弄清. 目前对胃黏膜保护机制的研究甚多, 一种细胞保护蛋白-热休克蛋白(HSPs)就是一个研究热点, 其中HSP70是胃黏膜保护中一类重要蛋白^[4]. 为了探讨艾灸对胃黏膜的保护是否与HSP70的诱导有关, 我们对艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜HSP70及其基因表达的影响进行了观察研究, 其目的是想进一步阐明艾灸启动内源性保护作用的内在机制, 为证明艾灸防治疾病的科学价值提供实验依据. 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠60只, 雌雄各半, 体质量200-250 g, 由湖南农业大学动物科技学院提供. 完全随机分为4组: A空白组, B模型组, C艾灸足三里等穴组, D对照组, 每组15只.

兔抗大鼠HSP70亲和纯化抗体(武汉博士德公司); 即通用型SP系列检测试剂盒兔SP Kit(北京中山金桥生物技术有限公司); 棕黄色DAB显色试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司); DEPC(武汉博士德公司); Trizol试剂盒(Invitrogen公司); AMV逆转录酶、RNasin、dNTPs、Taq DNA聚合酶、100 bp DNA ladder(Promega公司); ET检测试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所)、PGE₂检测试剂盒(苏州大学血液研究所), 其余试剂均系国产分析纯, “神灸300灸”(苏州东方艾绒厂, 东方一型). 大鼠HSP70上游引物为5'-TTT CTG GCT CTC AGG GTG TT-3', 下游引物为5'-CTG TAC ACA GGG TGG CAG TG-3'. 大鼠GAPDH上游引物为5'-TGC TGA GTA TGT CGT GGA GTC-3', 下游引物为5'-AAG GCC ATG CCA GTG AGC TTC-3', 引物对由Invitrogen生物技术公司合成. TGL16M台式高速冷冻离心机(长沙科威实业有限公司)、Hybaid PCR扩增仪(英国)、恒温水浴箱(中国江苏)、Forma Scientific超低温冰箱(美国)、Scotsman制冰机(意大利)、Syngene凝胶成像系统(美国)、岛津分光光度计(日本).

1.2 方法 穴位定位参考林文注主编《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人比照法. 对照点设在梁门穴旁开1 cm和膝关节内侧与足三里平行的任意非穴处. 所有大鼠捆绑于鼠板, A, B组不作处理; C, D组大鼠取单侧穴位, 定位剪毛, 艾炷黏于穴位或非穴对照点上点燃施灸, 每天每穴或非穴连续灸四壮, 总延时约半小时, 每日左右交替艾灸, 所有处理连续8 d. 艾柱来源于苏州东方艾绒厂(“神灸300灸”, 东方一型). 预处理7 d后, 采用WRS法制作急性应激性溃疡模型^[4]. B, C, D组大鼠于处理第六天禁食不禁水24 h后, 束缚于鼠板上, 置于20℃水中, 水面平胸骨剑突水平, 10 h后取出松绑. 所有动物于造模后24 h, 用100 g/L乌拉坦, 以10 mL/kg ip麻醉. 每组随机抽取5只大鼠, 取胃前, 先将幽门部用线结扎, 然后用注射器抽取40 g/L多聚甲醛3 mL, 自食道注入胃内, 拔出针头结扎贲门. 在两结扎线的两端切断食道及十二指肠, 摘下全胃, 10 min后沿胃大弯剖开, 用冰生理盐水冲洗,

■研究前沿

HSPs、针灸与胃黏膜保护有着密切关系, 据相关文献报道针灸能诱导HSPs的表达. 针灸对胃黏膜的保护是否与HSPs有关, 针灸是否能诱导HSPs的表达, 是本研究的主要目的.

■创新盘点

本研究不仅在于探讨针灸保护胃黏膜是否与HSPs有关,还能进一步阐明针灸启动内源性保护作用的内在机制。既能证明针灸防治疾病的科学价值,还能在中医药宝库中挖掘有效的HSPs诱导方法,激发机体内在抗病潜力,调动整体调节机能,达到防病保健的目的。

表 1 艾灸对胃黏膜UI、ET、PGE₂和HSP70的影响 (mean ± SD)

分组	UI (n = 10)	ET (mg/L) (n = 10)	PGE ₂ (mg/L) (n = 10)	HSP70 (n = 5)	HSP70 mRNA (n = 5)
A组	12.0 ± 5.9 ^f	172.5 ± 70.2 ^c	1108.1 ± 486.2 ^c	0.021 ± 0.010 ^c	0.616 ± 0.023
B组	26.8 ± 9.8 ^b	344.8 ± 284.6 ^b	621.9 ± 169.5 ^b	0.077 ± 0.057 ^a	0.669 ± 0.007 ^b
C组	14.1 ± 5.4 ^{df}	148.3 ± 69.1 ^d	1063.6 ± 437.5 ^{df}	0.133 ± 0.035 ^{ade}	0.799 ± 0.042 ^{bdf}
D组	26.2 ± 7.7	195.8 ± 123.6	692.5 ± 426.1	0.059 ± 0.038 ^a	0.733 ± 0.025 ^{bd}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs A组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs B组; ^eP<0.05, ^fP<0.01 vs D组。

然后放入40 g/L多聚甲醛中4℃固定24 h,石蜡包埋备用。其余大鼠剖腹取胃,沿胃大弯剖开,取胃窦部黏膜一小块(约50 mg),1 g/L DEPC溶液冲洗3遍后速入液氮中冻存,剩余胃黏膜组织用冰生理盐水冲洗胃内残留物,计数胃黏膜损伤指数后分析天平称质量,按3.75 mL/g加入生理盐水,用玻璃匀浆机研磨40-50次,制成胃黏膜组织匀浆,35 000 r/min 4℃离心15 min,取上清液,-20℃低温保存,待测。按GUTH法计算UI。全胃各病灶长度之和为损伤指数,以mm表示。损伤≤1 mm(包括糜烂点)为1分;1 mm<损伤≤2 mm为2分;2 mm<损伤≤3 mm为3分;3 mm<损伤≤4 mm为4分;>4 mm为5分;损伤宽度>2 mm者UI加倍。石蜡块间断连续切片(厚度4 μm)、烤片、常规脱蜡至水,按HSP70试剂盒说明书进行免疫组化检测。用PBS代替一抗作阴性对照,染色结果采用MIAS医学图像分析系统,光镜下10×40倍每张切片随机分析5个视野,计其面密度,取平均值。运用RT-PCR分析大鼠胃黏膜HSP70 mRNA的表达。总RNA的提取:Trizol试剂盒提取大鼠胃组织RNA,取10 μL对RNA样品的完整性进行分析。余下的RNA中,加入1/10体积的3 mol/L醋酸钠(pH 5.2)及3倍体积的无水乙醇于-20℃或-70℃保存。各样本均取3 μg总RNA进行逆转录反应(20 μL反应体系)。20 μL逆转录反应体系含有2 μg RNA,0.5 μg oligo(dT)18引物,20 U Rnasin,10 mmol/L dNTPs,5×RT缓冲液,10 U AMV逆转录酶,42℃反应1 h,获得的逆转录cDNA混合物作为基因PCR反应的模板。该引物对由Invitrogen生物技术公司合成。25 μL PCR反应体系中含2.5 μL 10×PCR反应缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,200 μmol/L dNTPs,2 μL模板cDNA,0.1 μmol/L特异引物,2 U Taq DNA聚合酶,石蜡油覆盖。HSP70 cDNA PCR产物为268 bp。反应条件为94℃ 2 min,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,循环35次。GAPDH cDNA PCR产物为426 bp,PCR反应条件为94℃ 2 min,

94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,循环25次。分别取这两种PCR产物各10 μL进行15 g/L的琼脂糖凝胶电泳,电泳条带光密度扫描值,以HSP70 cDNA/GAPDH cDNA的比值为观测指标。ET、PGE₂按试剂盒说明书进行放射免疫法检测。

统计学处理 实验结果以mean±SD表示,使用SPSS 11.5软件进行数据分析,所用统计方法为单因素方差分析。

2 结果

2.1 艾灸对胃黏膜UI、ET和PGE₂的影响 各组SU大鼠胃黏膜损伤指数B组与A组比较有非常显著性差异($P = 0.000 < 0.01$),说明造模成功;C组与B组比较有非常显著性差异($P = 0.001 < 0.01$);D组与A组和C组比较有非常显著性差异($P = 0.001 < 0.01$)。造模组的PGE₂均有不同程度下降,A组与B组和D组比较有非常显著性差异($P = 0.011$; $P = 0.028 < 0.01$),而与C组比较无显著性差异($P > 0.05$);经艾灸预处理的大鼠胃黏膜PGE₂含量均有不同程度升高,B组与C组比较有非常显著性差异($P = 0.020 < 0.01$);C组与D组比较有非常显著性差异($P = 0.048 < 0.01$)。B组大鼠胃黏膜的ET含量与A组比较有非常显著性差异($P = 0.040 < 0.01$);经艾灸预处理的大鼠胃黏膜ET含量均有不同程度下降,B组与C组比较有非常显著性差异($P = 0.020 < 0.01$,表1);C组与D组比较虽无显著性差异,但前者对ET的调节作用有一定优势。

2.2 艾灸对胃黏膜HSP70和HSP mRNA的影响 免疫组化标记后,HSP70阳性部位位于胞质,呈棕黄色,以胃腺部最明显。通过束缚冷应激造模后,各造模组胃黏膜的HSP70的表达均有不同程度的增强,与A组比较,其他各组均有显著性差异($P = 0.039 < 0.05$);B组与C组比较有非常显著性差异($P = 0.003 < 0.01$);C组与D组比较有显著性差异($P = 0.035 < 0.05$)。与A组比较,其他各组胃黏膜HSP70 mRNA表达增强并有非常显著性差

异($P = 0.008 < 0.01$); B组与C组和D组比较有非常显著性差异($P = 0.000$; $0.002 < 0.01$); C组与D组比较有非常显著性差异($P = 0.001 < 0.01$, 图1)。

3 讨论

经络与脏腑相关是经络学说中的重要内容之一,《灵枢·海论》篇强调:“夫十二经脉者,内属于脏腑,外络于肢节”。足阳明胃经是多气多血之经,他参与十四经脉的循环往复、气血能源的保障供给,在经络学说中起到了举足轻重的作用。胃为“水谷之海”,化生精微、主生营血,脾胃为“后天之本”。“胃经之病,有所谓洒洒振寒者,正以足阳明胃经者阳盛也”。足三里穴是胃之下合穴、胃经之合穴,是治疗胃病的首选穴,《灵枢·四时气》记载“胃气逆则呕苦……取足三里以下胃气逆”,明·徐凤《针灸大全·马丹阳天星十二穴并治杂病歌》也指出足三里“善治胃中寒”,“合治内府”、《四总穴歌》“肚腹三里留”又是对其主治作用的经典概括。足三里穴是针灸治疗胃肠疾病的研究热点。梁门穴也是足阳明胃经的又一重要穴位。本实验研究结果显示,艾灸足三里、梁门穴组大鼠胃黏膜的HSP70蛋白和基因表达均较模型组和艾灸非穴组明显增强($P = 0.003$; $P = 0.035 < 0.01$),增加其胃黏膜PGE₂含量与模型组和艾灸非穴组比较具有非常显著性差异($P = 0.020 < 0.01$),减少ET含量与模型组和艾灸非穴组比较具有非常显著性差异($P = 0.020 < 0.05$),使胃黏膜损伤指数明显下降与模型组和艾灸非穴组比较也具有非常显著性差异($P = 0.001 < 0.01$)。由此可看出,足三里和梁门穴在保护胃黏膜抗应激损伤作用上有一定的穴位特异性,为临床运用针灸治疗消化系统疾患提供了实验依据。

HSPs是一类在进化上高度保守的应激蛋白,对维持机体的自身稳定性有重要作用,其主要功能是提高细胞对应激因素的耐受^[5],使细胞维持正常的生理功能,增加细胞对致死性刺激的防御和适应力^[6]。HSP70在大鼠诱导急慢性胃溃疡、慢性萎缩性胃炎、人胃癌的胃黏膜中均有过度表达,而且以病变部位最明显^[7-9]。这种过度表达,通过增加胃黏膜血流量、促进细胞增殖等机制而达到细胞保护作用以促进溃疡愈合^[10-12]。HSP70在经高热预处理、长期低浓度酒精刺激和长时程给予阿司匹林的胃黏膜中表达明显增多,而使其产生适应性细胞保护作用,能耐受更高温、高浓度酒精和高剂量阿司匹林的

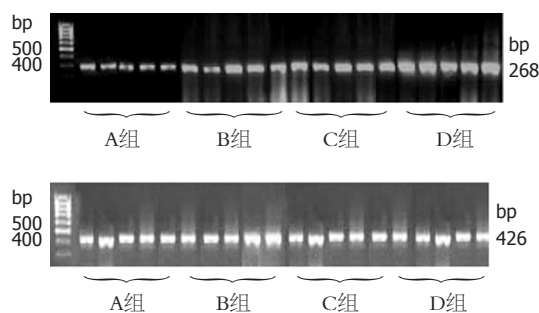


图1 艾灸对胃黏膜HSP70 cDNA, GAPDH cDNA的影响. A: HSP70 cDNA; B: GAPDH cDNA.

刺激^[13-15]。艾灸作为一种生理性温热刺激原,可诱导HSP70的产生,作为免疫源激活免疫系统而治疗一些疾病^[16-17]。从本实验研究结果看,应激后(模型组)大鼠胃黏膜的HSP70蛋白和基因表达均较未应激大鼠(空白组)增强,而经艾灸预处理的大鼠在应激后其表达较模型组更显著。应激性损伤是一些有害因素导致胃黏膜保护机制削弱、损伤因素作用相对增强的结果。内源性前列腺素是对胃黏膜具有细胞保护作用的物质中最重要的一种,主要能促进黏液和碳酸氢盐分泌,增加表面疏水性、调节胃黏膜血流量。而内皮素作为体内最强烈缩血管活性因子,通过其强烈的收缩血管作用导致胃黏膜循环障碍、胃黏膜血流量下降而介导胃黏膜损伤^[18-21]。本实验结果中,艾灸足三里、梁门穴组较模型组PGE₂明显增多,ET明显减少,胃黏膜的损伤程度也明显减轻。说明艾灸预处理能通过增加PGE₂,减少ET含量达到胃黏膜保护作用。本研究证实了艾灸保护胃黏膜与HSP70的诱导有关,进一步阐明了针灸启动内源性保护作用的内在机制,启示我们要在中医药宝库中挖掘有效的HSPs诱导方法,激发机体内在抗病潜力,调动整体调节机能,达到防病保健的目的。但艾灸诱导HSP70是否能保护其他器官组织还有待进一步研究。

4 参考文献

- 邵瑛, 唐纯志. 悬灸足三里对疝积大鼠胃泌素和胃动素及体重的影响. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 112-114
- 江庆洪, 许文波, 杨丹红. 艾灸对大鼠胃黏膜血流量的影响及与胃肠激素的关系. 现代康复 2000; 4: 40-41
- 孙世晓, 王新梅, 张江红. 艾灸猫“足三里”穴增强胃运动的中枢作用机理研究. 针灸临床杂志 2001; 17: 53-54
- Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. J Gastroenterol Hepatol 2000; 15 Suppl: D12-D19
- 聂时南, 李兆申, 许国铭, 湛先保, 屠振兴, 龚燕芳. 肠三叶因子在胃黏膜应激适应性细胞保护中的作用. 中

■应用要点

本研究结果显示艾灸足三里等穴可使应激性溃疡大鼠胃黏膜损伤指数明显下降,增高HSP70蛋白及其基因表达,增加PGE₂含量并减少ET含量。说明艾灸足三里等穴能通过增强HSP70的蛋白和基因表达,达到对胃黏膜的保护作用,并有一定的穴位特异性。

■名词解释

HSPs: 是一类在进化上高度保守的应激蛋白,是生物细胞在受高温、缺血、病原体或其他多种损伤因素的应激刺激后发生热休克反应所产生的一组蛋白质。根据分子量大小和各自的诱导条件不同, HSPs可分为不同家族, HSPs的主要功能是提高细胞对应激因素的耐受,使细胞维持正常的生理功能,增加细胞对致死性刺激的防御和适应力。

■同行评价

本实验从“艾灸足三里等穴→诱导HSP70产生→调节相关因子→保护胃黏膜”的思路出发,通过检测胃黏膜HSP70表达,胃黏膜PGE₂、ET的含量,比较了艾灸足三里等穴与非穴对照点对SU大鼠胃黏膜保护效应的差异,探讨了艾灸预处理保护胃黏膜的内在机制,为艾灸预防和治疗消化道溃疡疾病提供了实验依据。题目表达准确,设计合理,结论可信。

- 6 张红艳, 吕农华. 热休克蛋白与应激后胃黏膜保护. 中华消化杂志 2004; 24: 123-125
- 7 Shichijo K, Ihara M, Matsuu M, Ito M, Okumura Y, Sekine I. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 340-348
- 8 Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, Amagase K, Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 391-406
- 9 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周. 热盐水致胃黏膜细胞凋亡及对热休克蛋白表达影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2038-2040
- 10 Isomoto H, Ohtsuru A, Braiden V, Iwamatsu M, Miki F, Kawashita Y, Mizuta Y, Kaneda Y, Kohno S, Yamashita S. Heat-directed suicide gene therapy mediated by heat shock protein promoter for gastric cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 629-635
- 11 Nam SY, Kim N, Lee CS, Choi KD, Lee HS, Jung HC, Song IS. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2110-2120
- 12 Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udonon H, Murata I, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 198: 219-228
- 13 Itoh YH, Ishiguchi T, Ayakawa Y. Expression of stress protein (HSP 70) in adrenalectomized mice. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2002; 62: 161-167
- 14 Itoh YH, Noguchi R. Pre-treatment with mild whole-body heating prevents gastric ulcer induced by restraint and water-immersion stress in rats. *Int J Hyperthermia* 2000; 16: 183-191
- 15 Oyake J, Otaka M, Matsuhashi T, Jin M, Odashima M, Komatsu K, Wada I, Horikawa Y, Ohba R, Hatakeyama N, Itoh H, Watanabe S. Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sci* 2006
- 16 Wang XP, Liao J, Liu GZ, Wang XC, Shang HW. Co-expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human gastric carcinoma cell line BGC-823. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3601-3604
- 17 Yeo M, Kim DK, Kim YB, Oh TY, Lee JE, Cho SW, Kim HC, Hahm KB. Selective induction of apoptosis with proton pump inhibitor in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8687-8696
- 18 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护—基础与临床. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 4
- 19 彭娜, 常小荣, 易受乡. 针灸保护胃黏膜与热休克蛋白的关系. 中国临床康复 2005; 9: 102-104
- 20 江梅, 张沥, 海春旭, 秦绪军, 陶梅, 张玲霞, 曹广州. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎血清和胃黏膜组织SOD和TAC的变化. 第四军医大学学报 2005; 26: 1768-1769
- 21 谢文松. 药灸并用治疗慢性萎缩性胃炎46例. 河北中医 2000; 22: 916

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3000字及摘要800字各1份, 电脑打印(附软盘), 2006-06-15截稿。

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授; 电话: 13313695959; E-mail: liubingrong@medmail.com.cn.

Stat5反义寡核苷酸联合5-氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖与凋亡的影响

马向涛, 余力伟, 王 杉, 杜如昱, 崔志荣

马向涛, 余力伟, 北京市海淀区医院外科 北京市 100080
王杉, 杜如昱, 崔志荣, 北京大学人民医院外科肿瘤研究室
北京市 100044
马向涛, 2002年北京大学医学博士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤分子生物学研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30271269
通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京市海淀区医院外科. xiangtao_ma@pku.org.cn
电话: 010-82619999-1887 传真: 010-62653601
收稿日期: 2006-02-04 接受日期: 2006-03-20

Effects of Stat5 antisense oligonucleotide combined with 5-fluorouracil on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

Xiang-Tao Ma, Li-Wei Yu, Shan Wang, Ru-Yu Du, Zhi-Rong Cui

Xiang-Tao Ma, Li-Wei Yu, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, Beijing 100080, China
Shan Wang, Ru-Yu Du, Zhi-Rong Cui, Department of Surgery and Division of Surgical Oncology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271269
Correspondence to: Dr. Xiang-Tao Ma, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, 29 Zhongguancun Avenue, Beijing 100080, China. xiangtao_ma@pku.org.cn
Received: 2006-02-04 Accepted: 2006-03-20

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of Stat5 antisense oligonucleotide (Stat5 AS-ON) combined with 5-fluorouracil (5-FU) in the treatment of gastric cancer.

METHODS: Human gastric cancer cell line BGC823 was treated with Stat5 AS-ON and 5-FU, respectively, or in combination. The expression of Stat5, p-Stat5, cyclin D1 and Bcl-xL in the cells were detected by Western blot, and the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry.

RESULTS: After treatment with Stat5 AS-ON and 5-FU for 72 h, the ratio of G₁-phase cells was

up-regulated from 65.7% to 78.2%, and that of S-phase cells was down-regulated from 18.6% to 10.5%; the percentage of apoptotic cells was increased from 7.4% to 21.6%. Stat5 AS-ON and 5-FU synergistically inhibited the growth of gastric cancer cells, induced significant apoptosis of the cancer cells, and they reduced the expression and phosphorylation of Stat5, as well as the expression of cyclin D1 and Bcl-xL.

CONCLUSION: Selective inhibition of specific signaling pathway in the cells may provide a new approach in the treatment of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Signal transduction pathway; Proliferation; Apoptosis

Ma XT, Yu LW, Wang S, Du RY, Cui ZR. Effects of Stat5 antisense oligonucleotide combined with 5-FU on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1257-1261

摘要

目的: 探讨Stat5反义寡核苷酸(Stat5 AS-ON)联合5-氟尿嘧啶(5-FU)治疗胃癌的作用机制。

方法: Stat5 AS-ON、5-FU单用或联用处理胃癌细胞BGC823, Western blot检测Stat5、p-Stat5、cyclin D1与Bcl-xL表达, MTT法检测细胞增殖状态, 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡。

结果: Stat5 AS-ON与5-FU作用于BGC823细胞72 h后, G₁期细胞比率由65.7%上升至78.2%, S期细胞比率分别由18.6%, 下降至10.5%, 凋亡细胞百分比由7.4%增加至21.6%。Stat5 AS-ON与5-FU可以抑制胃癌细胞增殖, 促进胃癌细胞凋亡, 联合应用Stat5 AS-ON与5-FU可以起协同作用, 明显抑制胃癌细胞Stat5信号转导通路活化。

结论: 选择性阻断细胞内信号转导通路可能为治疗胃癌提供新途径。

■背景资料

Stat5在白血病、头颈部鳞癌及乳腺癌等多种肿瘤组织及细胞系中呈持续活化, 但是关于Stat5在调控胃癌细胞凋亡过程中的作用还有待进一步研究。

■研究前沿

Stat5作为上游激酶通过调控靶基因转录而影响肿瘤细胞的增殖与凋亡机制是近期研究的重点。

关键词: 胃癌; 信号转导通路; 增殖; 脱嗜作用

马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. Stat5反义寡核苷酸联合5-氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖与凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1257-1261

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1257.asp>

0 引言

Stat5是转录信号传导子与激活子通路(signal transducers and activators of transcription, STATs)的重要成员, 该通路接受生长因子与细胞因子等细胞外信号刺激, 调节细胞增殖、分化及凋亡^[1]. 目前已发现Stat5在白血病、头颈部鳞癌及乳腺癌等多种肿瘤组织及细胞系中呈持续活化^[2-4], 但是关于Stat5在调控胃癌细胞凋亡过程中的作用还有待进一步研究. 我们应用Stat5反义寡核苷酸与5-氟尿嘧啶处理胃癌细胞, 观察对胃癌细胞增殖和凋亡的影响, 探讨以Stat5信号转导通路为靶点在药物治疗胃癌中的作用.

1 方法

1.1 材料 人胃癌细胞BGC823, 培养于含有胎牛血清(美国HyClone公司)的RPMI 1640培养基(美国Gibco公司). Stat5反义寡核苷酸根据Stat5翻译起始点合成, 同时本研究还设立了正义寡核苷酸链和错配寡核苷酸链作为对照组, 错配链的序列在GenBank数据库进行同源性检索, 未发现同源序列. (1)Stat5反义寡核苷酸序列: 5'CCA CAC AGC CAT GTT TAC CCG 3'; (2)Stat5正义寡核苷酸序列: 5'CGG GTA AAC ATG GCT GTG TGG 3'; (3)Stat5错配寡核苷酸序列: 5'CCA CAG AGC CAT GTT TTC CCG 3'. 以上寡核苷酸由美国Santa Cruz公司合成及纯化. 阳离子脂质体LipofectAmine2000(美国Gibco公司), 转染过程参照Gibco公司手册.

1.2 方法 分为对照组、Stat5 AS-ON组、5-FU组、5-FU+Stat5 AS-ON组. 溶液中含等量乙醇和DMSO, 各组溶液的乙醇或DMSO不超过1 mL/L. 接种细胞于96孔板, 贴壁后, 无血清培养细胞16-24 h, 使细胞同步化. 空白对照组加无血清培养基, 试验组分别加入Stat5 AS-ON和/或5-FU, 0, 24, 48, 72 h分别加入5 g/L MTT(美国Sigma公司), 继续培养4 h, 每孔加入DMSO 200 μ L, 酶标仪测定540 nm吸光度A, 绘制生长曲线. 无血清培养细胞16-24 h, 使同步化, 空白对照组加无血清培养基, 试验组分别加入Stat5 AS-ON和/或5-FU继续培养, 0, 24, 48, 72 h分别

消化细胞, PBS 0.5 mol/L重悬细胞, 700 mL/L冰乙醇固定细胞过夜, 加入RNAase A至终浓度50 mg/L, 37℃恒温水浴1 h, 加入PI(美国Sigma公司)至终浓度50 mg/L, 4℃避光染色1 h, 上流式细胞仪FACScan(美国Becton-Dickinson公司)检测, 资料用Cell Quest细胞周期分析软件处理. 细胞凋亡同步化处理及单细胞悬液制备同前, 应用凋亡检测试剂盒, PBS 0.5 mol/L离心洗涤2次, 200 μ L结合缓冲液重悬, 加入AN-NEXTIN V-FITC至终浓度1 mg/L, 加入PI至终浓度2.5 mg/L, 室温避光染色15 min, 上流式细胞仪FACScan(美国Becton-Dickinson公司)检测. (1)细胞总蛋白提取: 细胞于裂解缓冲液中裂解(150 mmol/L氯化钠; 10 g/L过氧胆酸钠; 10 g/L Triton X-100; 1 g/L十二烷基磺酸钠; 10 mmol/L Tris, pH 7.2; 1 mmol/L正钒酸钠; 1 mmol/L苯甲磺酰氟; 1 mmol/L氟化钠; 0.1 mmol/L抑肽酶, 1 mmol/L亮抑蛋白酶肽). 裂解液在4℃条件下13 000 r/min离心30 min, 收集上清液得到细胞总蛋白; (2)胞质蛋白提取: 收集细胞悬液, 4℃条件下13 000 r/min离心2 min; 胞质缓冲液(20 mmol/L羟乙基哌嗪乙磺酸, pH 7.9; 10 mmol/L氯化钾; 100 mL/L甘油; 1 mmol/L乙二胺四乙酸; 1 mmol/L二硫苏糖醇; 0.1 mmol/L正钒酸钠; 1 mmol/L苯甲磺酰氟)重悬, 裂解产物4℃条件下13 000 r/min离心5 min, 收集上清液得到胞质蛋白. (3)细胞核蛋白提取: 收集细胞悬液, 用低渗缓冲液于冰上裂解细胞10 min; 4℃条件下13 000 r/min离心1 min; 4℃条件下用高盐缓冲液(420 mmol/L氯化钠; 20 mmol/L羟乙基哌嗪乙磺酸, pH 7.9; 10 mmol/L氯化钾; 200 mL/L甘油; 1 mmol/L乙二胺四乙酸; 1 mmol/L二硫苏糖醇; 0.1 mmol/L正钒酸钠; 1 mmol/L苯甲磺酰氟)重悬粗提的细胞核, 振荡30 min; 4℃条件下13 000 r/min离心10 min; 取上清为核提取物, 贮存于-80℃冰箱. 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品, 根据蛋白定量试剂盒(美国Bio-Rad公司)手册绘制蛋白定量标准曲线, 于分光光度计595 nm下测吸光度A值, 计算提取液蛋白浓度. 在进行Western blot之前将蛋白提取物与十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液按1:1混合(125 mmol/L Tris HCl, pH 6.8; 40 g/L十二烷基磺酸钠; 200 mL/L甘油; 100 g/L 2-巯基乙醇)后100℃水浴下加热5 min. 取蛋白样品50 μ g, 75-100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到PVDF膜上. 电泳时在聚丙烯

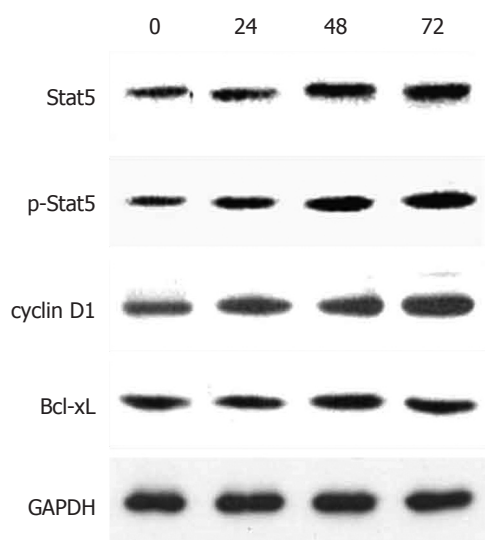


图1 胃癌BGC823细胞增殖过程中Stat5信号转导通路成员表达。

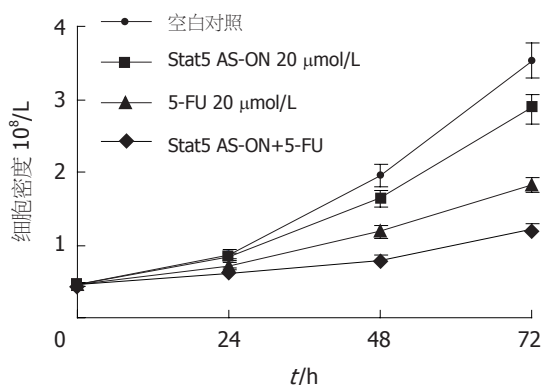


图2 BGC823细胞增殖状态。

烯酰胺凝胶中加入预染标准分子量蛋白作为指示。转膜后用TBST缓冲液(10 mmol/L Tris HCl, pH 7.5, 150 mmol/L 氯化钠, 5 g/L Tween-20)与5 g/L牛血清白蛋白封闭30 min。封闭后, 加入一抗(Stat5, p-Stat5, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Caspase-3, GAPDH)(美国Santa Cruz公司), 工作浓度1:1000; GAPDH作为内参照, 于4℃条件下孵育过夜, 用TBST(每次5 min)洗膜后, 与辣根过氧化物酶结合的二抗(英国Amersham公司)孵育30 min, 工作浓度1:1000。然后用ECL化学发光试剂盒检测杂交信号。细胞核蛋白样品50 μg上样于7.5%的聚丙烯酰胺凝胶经电泳分离后, 电转移至PVDF膜(美国Millipore公司), 封闭后, 辣根过氧化物酶结合的二抗, (英国Amersham公司), 工作浓度1:1000。用ECL(英国Amersham公司)化学发光试剂盒检测杂交信号。用Phospho-Imager图像分析仪(美国Molecular Dynamics公司)测定条带的吸光度A值, 以A值代表蛋白的相

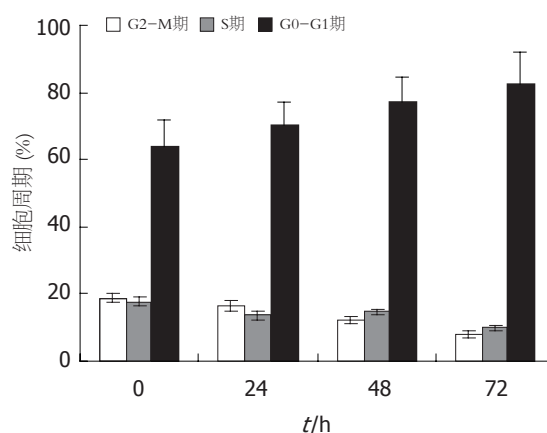


图3 BGC823细胞周期。

■创新盘点

关于Stat5信号转导通路的研究主要集中于血液系统与乳腺肿瘤, 而本文研究的Stat5在胃癌细胞耐药中的作用机制是目前研究发展的趋势。

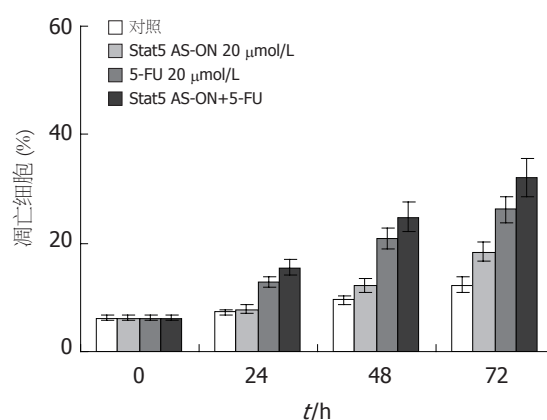


图4 BGC823细胞凋亡。

对表达量。

统计学处理 应用SPSS 12.0统计学软件, 采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 时为有统计学差异。

2 结果

Stat5在胃癌细胞中持续活化(图1)。Stat5 AS-ON与5-FU作用于BGC823细胞后, 细胞增殖水平下降(图2)。Stat5 AS-ON与5-FU作用于BGC823细胞72 h后, G1期细胞比率由65.7%上升至78.2%, S期细胞比率由18.6%下降至10.5%, 细胞增殖受抑制(图3)。Stat5 AS-ON与5-FU作用于BGC823细胞72 h后, 凋亡细胞百分比由7.4%增加至21.6%(图4)。Stat5 AS-ON与5-FU作用于BGC823细胞72 h后, Stat5表达与活性下调, 其靶基因产物Bcl-xL与cyclin D1表达下降(图5)。

3 讨论

STATs信号转导通路与细胞的增殖、分化及凋亡关系密切, 该通路异常活化可导致细胞异常增殖和恶性转化。哺乳动物中STATs家族

■应用要点

本文为研究肿瘤耐药机制提供了新的研究靶点,进一步研究可通过阻断Stat5通路了解肿瘤细胞侵袭等转移相关特征的变化。

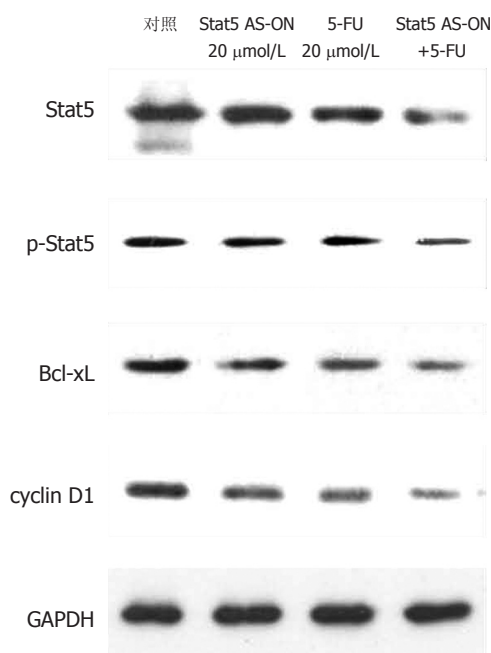


图5 BGC823细胞Stat5信号转导通路成员表达。

由7个成员组成: Stat1-Stat4, Stat5a, Stat5b及Stat6^[2]。Stat5最初被称为泌乳素诱导的乳腺因子(mammary gland factor, MGF),在乳腺上皮细胞增殖与分化中起重要作用^[5]。Stat5包括Stat5a与Stat5b两种异构体,结构上具有95%的同源性。研究证实Stat5表达与活化不仅与乳腺癌发生、发展密切相关,而且在其他肿瘤如髓样白血病、头颈部鳞状细胞癌及前列腺癌中异常表达与活化^[5-10]。其中Stat5作为上游酪氨酸激酶通过调控靶基因而诱导某些关键产物的表达来影响肿瘤的发生,重要的靶基因产物包括影响细胞凋亡的Bcl-2家族成员^[11-14]。Bcl-2家族包括抑凋亡和促凋亡两大类,前者包括Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1等,后者包括Bax, Bak, Bcl-xS等。*bcl-x*基因启动子上存在多个STATs结合位点,STATs可直接与*bcl-x*启动子结合而启动转录^[14-17]。Gutierrez-Castellanos^[18]在研究慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)时发现,CML患者外周血单核细胞中Bcl-xL表达在慢性期下降,而在急变期迅速升高,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)显示在此过程中Bcl-xL转录受到磷酸化Stat5的调控。

本研究结果显示,Stat5通路在胃癌细胞BGC823增殖过程中持续激活,应用Stat5 AS-ON作用于胃癌细胞系BGC823,发现BGC823细胞增殖水平随Stat5 AS-ON作用时间延长而下降,相应空白对照组变化不明显。由于胃癌对化

疗药物属中低度敏感,即使最有效的5-FU其反应率仅有20%-30%,对其耐药机制的研究仍是热点和难点,已经有研究显示STATs信号转导通路异常激活与肿瘤耐药可能有关,但是具体机制尚不清楚^[19-23]。为研究Stat5在介导胃癌药物治疗的作用机制,我们应用Stat5 AS-ON, Stat5 AS-ON+5-FU分别作用于BGC823细胞,发现BGC823细胞增殖水平随药物作用时间延长而下降,以Stat5 AS-ON+5-FU组细胞下降为明显,Stat5 AS-ON+5-FU作用于BGC823细胞72 h后,细胞增殖受抑制,凋亡细胞增加。Western blot显示,BGC823细胞中Stat5, p-Stat5, Bcl-xL及cyclin D1表达水平明显下降,提示胃癌细胞耐药可能与Stat5异常激活有关,Stat5 AS-ON可以协同化疗药物5-FU对胃癌细胞BGC823起治疗作用。

总之,Stat5信号转导通路在胃癌细胞中的转录调控机制尚不清楚,Stat5的异常激活与胃癌细胞凋亡关系还有待于进一步明确^[24-27]。实验动物模型及临床观察中发现:肿瘤细胞耐受化疗与Stat5与Bcl-2成员异常增高有关,阻断Stat5通路可诱导耐药肿瘤细胞凋亡^[28-30]。深入研究Stat5信号转导通路作用机制有可能为治疗胃癌提供新的理论和实验基础^[31-33]。

4 参考文献

- 1 Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 315-324
- 2 Redell MS, Tweardy DJ. Targeting transcription factors for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2873-2887
- 3 Scherr M, Chaturvedi A, Battmer K, Dallmann I, Schultheis B, Ganser A, Eder M. Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 2006; 107: 3279-3287
- 4 Debierre-Grockiego F. Anti-apoptotic role of STAT5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies. *Apoptosis* 2004; 9: 717-728
- 5 Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 4442-4449
- 6 Nikitakis NG, Siavash H, Sauk JJ. Targeting the STAT pathway in head and neck cancer: recent advances and future prospects. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 637-651
- 7 Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 2004; 165: 1449-1460
- 8 Shan L, Yu M, Clark BD, Snyderwine EG. Possible role of Stat5a in rat mammary gland carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88: 263-272
- 9 Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, Ealley EL, Nevalainen

- MT, Rui H. Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 746-760
- 10 Buitenhuis M, Coffey PJ, Koenderman L. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2120-2124
- 11 Li H, Zhang Y, Glass A, Zellweger T, Gehan E, Bubendorf L, Gelmann EP, Nevalainen MT. Activation of signal transducer and activator of transcription-5 in prostate cancer predicts early recurrence. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5863-5868
- 12 Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate* 2006; 66: 135-145
- 13 Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, Ealley EL, Zhang Y, Nurmi M, Singh B, Martikainen PM, Nevalainen MT. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res* 2004; 64: 4774-4782
- 14 Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-8607
- 15 Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 115-123
- 16 Moucadel V, Constantinescu SN. Differential STAT5 signaling by ligand-dependent and constitutively active cytokine receptors. *J Biol Chem* 2005; 280: 13364-13373
- 17 Menon MP, Karur V, Bogacheva O, Bogachev O, Cuetara B, Wojchowski DM. Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest* 2006; 116: 683-694
- 18 Gutierrez-Castellanos S, Cruz M, Rabelo L, Godinez R, Reyes-Maldonado E, Riebeling-Navarro C. Differences in BCL-X(L) expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. *Eur J Haematol* 2004; 72: 231-238
- 19 Gonzalez RJ, Mansfield PF. Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer. *Surg Clin North Am* 2005; 85: 1033-1051
- 20 Lim L, Michael M, Mann GB, Leong T. Adjuvant therapy in gastric cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6220-6232
- 21 Klampfer L. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6: 107-121
- 22 Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8: 409-422
- 23 Adachi S, Leoni LM, Carson DA, Nakahata T. Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol* 2004; 111: 107-123
- 24 To KF, Chan MW, Leung WK, Ng EK, Yu J, Bai AH, Lo AW, Chu SH, Tong JH, Lo KW, Sung JJ, Chan FK. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *Br J Cancer* 2004; 91: 1335-1341
- 25 Pai R, Lin C, Tran T, Tarnawski A. Leptin activates STAT and ERK2 pathways and induces gastric cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 984-992
- 26 Yu LF, Cheng Y, Qiao MM, Zhang YP, Wu YL. Activation of STAT3 signaling in human stomach adenocarcinoma drug-resistant cell line and its relationship with expression of vascular endothelial growth factor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 875-879
- 27 Song H, Sondak VK, Barber DL, Reid TJ, Lin J. Modulation of Janus kinase 2 by cisplatin in cancer cells. *Int J Oncol* 2004; 24: 1017-1026
- 28 Alas S, Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 316-326
- 29 Ma XT, Wang S, Ye YJ, Du RY, Cui ZR, Somsouk M. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1569-1573
- 30 Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 7611-7618
- 31 Wittig I, Groner B. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 449-463
- 32 Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 945-954
- 33 Ma XT, Yu LW, Wang S, Zhang H, Du RY, Cui ZR. Molecular mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitor in inhibition of proliferation of colon cancer cells by modulating Stat5 signal transduction pathway. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 2566-2569

■同行评价

本文内容较新, 结果可信, 对于胃癌细胞耐药机制从信号转导通路角度进行了探讨, 为进一步研究提供了理论与实验基础。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

NS-398联用AG-041R对胃癌细胞的协同抑制作用机制

朱峰, 孙为豪, 李淑德, 李兆申

■背景资料

胃癌是威胁人类生命健康的最常见的恶性肿瘤之一, 近年来国内外的研究表明, COX-2及胃泌素与胃癌的增殖、凋亡有关。最近研究进一步表明胃泌素、COX-2二者间存在内在关联。联合应用特异性COX-2抑制剂和胃泌素受体拮抗剂有无协同抗癌作用, 值得进一步研究。

朱峰, 李淑德, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化科 上海市 200433

孙为豪, 南京医科大学第一附属医院老年医学科 江苏省南京市 210029

朱峰, 第二军医大学2004级在读博士。

通讯作者: 朱峰, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化科。zfyjz@hotmail.com

收稿日期: 2006-02-17 接受日期: 2006-03-07

Synergistic inhibitory effect of NS-398 combined with AG-041R on gastric cancer cells

Feng Zhu, Wei-Hao Sun, Shu-De Li, Zhao-Shen Li

Feng Zhu, Shu-De Li, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Wei-Hao Sun, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Feng Zhu, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. zfyjz@hotmail.com

Received: 2006-02-17 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects and mechanisms of combined treatment of a special COX-2 inhibitor (NS-398) and a special gastric receptor antagonist (AG-041R) on gastric cancer cell line MKN-45.

METHODS: The human gastric cancer cell line MKN-45 was treated with NS398 and AG-041R, respectively, or in combination. The growth of MKN-45 cells was detected by MTT assay; the cell apoptosis was detected by flow cytometry; the expression of c-Myc mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: NS-398 and AG-041R inhibited the growth of MKN-45 cells in a time- and dose-dependent manner (12-72 h; NS-398: 1×10^{-8} - 1×10^{-4} mol/L; AG-041R: 1×10^{-8} - 1×10^{-5} mol/L). AG-041R (1×10^{-6} mol/L) and NS-398 (1×10^{-5} mol/L) inhibited the proliferation of MKN-45 cells at rates of 42.1% and 41.8%, respectively, at 72 h. NS-398 and AG-041R in combination

resulted in a synergistic effect on inhibiting growth, and the inhibition effect was enhanced along with time. When NS-398 (1×10^{-5} mol/L) or AG-041R (1×10^{-6} mol/L) or their combination was used, the rate of apoptosis was $9.57\% \pm 0.60\%$, $10.25\% \pm 0.68\%$ and $20.83\% \pm 1.90\%$, respectively, which was significantly higher than the rate in the controls ($1.67\% \pm 0.76\%$) (all $P < 0.01$), and the agents in combination induced a higher apoptosis rate than either of them did ($P < 0.01$). NS-398 and AG-041R down-regulated the level of c-Myc mRNA, respectively, but their combination down-regulated it more significantly than either of the agents did.

CONCLUSION: Combined treatment of NS-398 and AG-041R synergistically inhibits the growth of MKN-45 cells in a time- and dose-dependent manner, induces the cell apoptosis and down-regulates c-Myc mRNA expression in MKN-45 cells.

Key Words: NS-398; AG-041R; Gastric carcinoma; Cell proliferation; Apoptosis

Zhu F, Sun WH, Li SD, Li ZS. Synergistic inhibitory effect of NS-398 combined with AG-041R on gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1262-1266

摘要

目的: 研究特异性COX-2抑制剂NS-398和CCK-B/胃泌素受体拮抗剂AG-041R对人胃癌细胞的抑制作用机制。

方法: 以人胃癌细胞株MKN-45为研究对象, 采用MTT法、流式细胞仪(FCM)、RT-PCR观察NS-398, AG-041R及联合应用对MKN-45细胞增殖、凋亡百分率及癌基因c-Myc mRNA表达的影响。

结果: NS-398和AG-041R均在一定范围(12-72 h; NS-398: 1×10^{-8} - 1×10^{-4} mol/L; AG-041R: 1×10^{-8} - 1×10^{-5} mol/L)内呈浓度和时间依赖性地抑制MKN-45细胞的增殖, AG-041R(1×10^{-6} mol/L)、NS-398(1×10^{-5} mol/L)作用72 h抑制率分别为42.1%, 41.8%, 二者联

合应用有协同抑制胃癌细胞增殖效应,且随着作用时间延长而增强. FCM显示NS-398(1×10^{-5} mol/L)、AG-041R(1×10^{-6} mol/L)和二者联合作用于MKN-45细胞72 h后,细胞凋亡率分别为 $9.57\% \pm 0.60\%$ 、 $10.25\% \pm 0.68\%$ 和 $20.83\% \pm 1.90\%$,与对照组($1.67\% \pm 0.76\%$)相比细胞凋亡率均显著增高($P < 0.01$),联合用药组细胞凋亡率显著高于单一用药组($P < 0.01$). RT-PCR显示NS-398、AG-041R及联合应用均显著抑制MKN-45细胞c-Myc mRNA的表达,联合用药组抑制效应显著高于单一用药组.

结论:联合应用NS-398和AG-041R剂量、时间依赖性地抑制MKN-45细胞增殖,促进MKN-45细胞凋亡,抑制癌基因c-Myc mRNA的表达,具有协同作用.

关键词: NS-398; AG-041R; 胃癌; 细胞增殖; 凋亡

朱峰, 孙为豪, 李淑德, 李兆申. NS-398联合AG-041R对胃癌细胞的协同抑制作用机制. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1262-1266
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1262.asp>

0 引言

近来研究表明, COX-2表达在人胃癌组织中异常增高^[1-2]. Hu *et al*^[3]证实COX-2抑制剂塞来昔布能有效降低大鼠胃癌的发病率,抑制胃癌的生长. 胃泌素是最常见的胃肠道肽类激素之一,其在胃癌的发生中是一个重要的生长因子^[4]. Hur *et al*^[5]发现胃癌患者中胃癌组织的胃泌素及CCK-B受体的表达较正常胃黏膜组织异常增高. 胃泌素对胃肠道肿瘤有显著促生长作用,胃泌素受体拮抗剂则能有效抑制实验动物大肠癌的发生^[6-8].

Konturek *et al*^[9]研究发现,胃泌素可诱导人胃癌KATOIII细胞株COX-2蛋白和mRNA表达增加. Colucci *et al*^[10]表明胃泌素通过CCK-B受体诱导COX-2表达及PGE2产生,促进肿瘤细胞的生长;该效应可被CCK-B受体拮抗剂L-365,260;GV150013阻断. 表明COX-2可能为胃泌素的一下游目标. 我们研究NS-398和AG-041R对人胃腺癌细胞系MKN-45增殖、凋亡的影响,以明确二者对胃癌有无协同抗癌作用并初步探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 MKN-45人胃腺癌细胞系东南大学遗传中心实验室所赠. Trizol试剂、RT-PCR试剂盒、RPMI 1640培养基和小牛血清购于Gibco公

司. 胰蛋白酶为美国Amresco公司产品. β -actin引物:上海申能博彩生物技术有限公司; c-Myc引物:上海生物工程有限公司. 选择性COX-2抑制剂NS-398和胃泌素受体拮抗剂AG-041R为美国Cayman公司产品. 人胃腺癌细胞株MKN-45采用RPMI 1640细胞培养基,含100 mL/L小牛血清,常规培养于含50 mL/L CO₂的37℃温箱中. 待其贴壁生长至70%-80%融合时,用2.5 g/L胰酶消化传代培养. NS-398、AG-041R均用DMSO溶解(培养液中DMSO浓度不超过1 g/L),pH调节至7.2,过滤,4℃保存备用.

1.2 方法

1.2.1 体外药物敏感实验 采用MTT法. 实验设空白组(仅含培养液和等体积的DMSO),对照组(MKN-45细胞的单细胞悬液+等体积的DMSO),实验组为NS-398、AG-041R的不同浓度梯度组,其中NS-398为5个浓度梯度(1×10^{-8} - 1×10^{-4} mol/L),AG-041R为5个浓度梯度(1×10^{-9} - 1×10^{-5} mol/L),每组设6个复孔. 取对数生长期的MKN-45细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^7 /L,接种于96孔培养板内,培养24 h细胞全部贴壁后,加入不同浓度的药物分别培养12, 24, 48, 72 h,然后每孔加入5 g/L MTT液20 μ L,继续培养4 h,吸去上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,轻轻震荡10 min,使结晶物充分溶解,于570 nm波长酶联免疫检测仪上测定每孔吸光度(A)值,结果以每组6孔的mean $\pm$ SD表示,实验重复3次以上. 抑制率(%)=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times$ 100%.

1.2.2 流式细胞仪检测 收集NS-398(1×10^{-5} mol/L)、AG-041R(1×10^{-6} mol/L)及联合(其中NS-398、AG-041R浓度和单用时相同)应用72 h后的MKN-45细胞 1.0×10^9 /L, PBS洗涤,胰蛋白酶消化后,1000 r/min离心5 min,去上清,用预冷的700 mL/L乙醇固定,-20℃过夜后,离心除去乙醇,加入10 g/L TritonX-100摇匀后静置10 min,离心5 min. 弃上清液后加入0.1 g/L RNA酶消化10 min后离心5 min. 弃上清液后加入0.05 g/L的碘化丙啶(PI)染色15 min,用300目丝网过滤后上机收集分析. 资料经ModFit LT软件分析.

1.2.3 RT-PCR检测c-Myc基因表达 取对数生长期的MKN-45细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^7 /L,接种于6孔培养板内,分对照组和各药物组,培养24 h待细胞全部贴壁后更换培养基,药物组分别加入NS-398(1×10^{-5} mol/L)、AG-041R(1×10^{-6} mol/L)及联合应用药

■ 研发前沿

COX-2与胃癌密切相关,特异性COX-2抑制剂有望成为胃癌防治的一类新药. 流行病学调查显示长期服用NSAIDs的人群发生大肠癌的危险性降低40%-50%,长时间加用NSAIDs可明显降低肿瘤的发生率. 胃癌细胞表面存在胃泌素受体,在其细胞内有胃泌素基因的表达,胃泌素通过其受体介导细胞内一系列信号传导,促进细胞分裂和DNA合成,对胃癌细胞有促生长作用.

■创新盘点

联合应用特异性COX-2抑制剂和CCK-B/胃泌素受体拮抗剂有无协同抗癌作用及其机制,目前国内外未见报道.

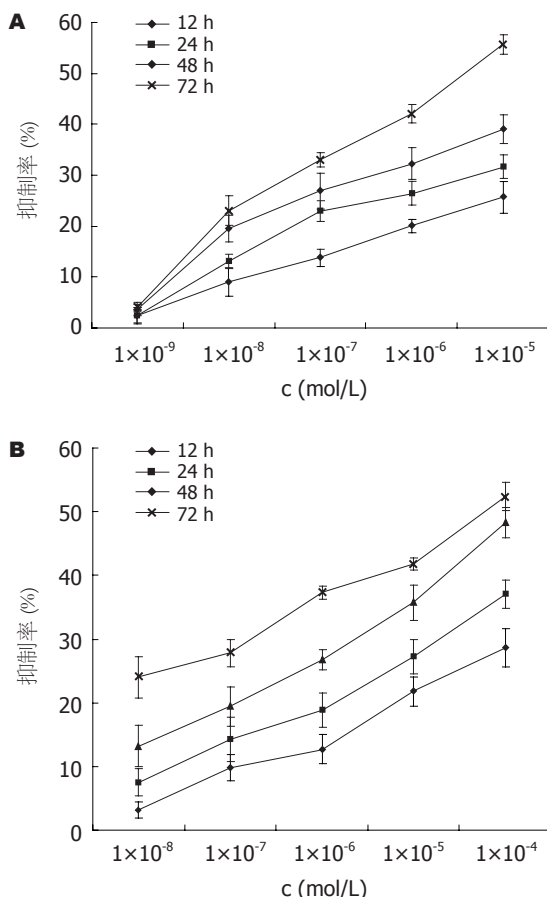


图1 AG-041R和NS-398对MKN-45的抑制率. A: AG-041R; B: NS-398.

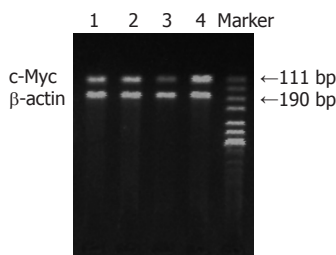


图2 AG-041R, NS-398及联合作用对MKN-45细胞c-Myc表达的影响. 1: 1×10^{-5} mol/L NS-398作用72 h后; 2: 1×10^{-6} mol/L AG-041R作用72 h后; 3: 联合用药组作用72 h后; 4: 对照组作用72 h后; β -actin为184 bp; c-Myc为111 bp.

物100 μ L, 继续培养72 h. 用Trizol试剂提取细胞总RNA. 所提取RNA经电泳后证实28, 18, 5 s条带清晰可见, 28 s与18 s荧光强度之比为2:1. 取RNA 5 μ g, 加入引物oligo(dT)₁₂₋₁₈及逆转录酶合成cDNA链. 取cDNA链5 μ L作为模板, 分别加入c-Myc引物(s)、c-Myc引物(a)各2 μ L, 加入MgCl₂ 3.5 μ L、Taq酶0.5 μ L, 总体积为50 μ L的反应体系中, 经过94 $^{\circ}$ C变性3 min后进入循环, 包括94 $^{\circ}$ C变性30 s, 50 $^{\circ}$ C退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共40个循环. 以 β -actin作为内参照. 各引

表1 AG-041R联合NS-398作用MKN-45细胞的抑制率(mean $\pm$ SD), %

t/h	NS-398	AG-041R	联合用药	q
24	24.3 $\pm$ 4.8	25.7 $\pm$ 2.6	51.7 $\pm$ 5.2 ^b	1.18
48	30.1 $\pm$ 3.9	35.4 $\pm$ 2.2	66.5 $\pm$ 2.9 ^b	1.21
72	37.9 $\pm$ 3.7	37.5 $\pm$ 3.6	78.2 $\pm$ 1.6 ^b	1.28

^b $P < 0.01$ vs AG-041R和NS-398.

物序列分别为: c-Myc: 上游5'-ggatgaagtacatgaactagggc-3', 下游5'-ggctttgaatctgctggattg-3'; β -actin: 上游5'-caattccatcatgaagtgtgac-3', 下游5'-ccacacagagtacttgcgctc-3'. 取5 μ L PCR终产物及DNA Marker, 用1%琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L的溴化乙锭)电泳, 自动凝胶成像系统摄影.

统计学处理 MTT和流式细胞仪测定数据的统计处理采用统计软件SPSS 11.5, 显著性检验采用单因素方差分析. 判断均数差异显著性, $P < 0.05$ 统计学有显著性差异.

2 结果

2.1 MKN-45细胞生长 一定浓度(NS-398: 1×10^{-8} - 1×10^{-4} mol/L; AG-041R: 1×10^{-8} - 1×10^{-5} mol/L)和时间范围(12-72 h)内NS-398, AG-041R对MKN-45细胞的抑制率呈浓度、时间依赖性; AG-041R(1×10^{-6} mol/L), NS-398(1×10^{-5} mol/L)作用72 h抑制率分别为42.1%, 41.8%, 接近半数抑制量, 本实验进一步选择 1×10^{-6} mol/L AG-041R联合 1×10^{-5} mol/L NS-398作用于MKN-45细胞, 初步观察二药的相互作用. 药物相互作用结果判断用金正均^[11]方法: 在量效曲线线性区内, 用如下公式计算q值: $q\text{值} = \frac{\text{两药合用的抑制率}}{\text{两单药预计抑制率}} = \frac{E_{A+B}}{E_A + (1 - E_A) \times E_B}$, $q\text{值} > 1.15$ 时, 两药有协同作用. 结果: $q_{24\text{ h}} = 1.18$, $q_{48\text{ h}} = 1.21$, $q_{72\text{ h}} = 1.28$ (图1, 表1).

2.2 凋亡结果 流式细胞术显示: NS-398(1×10^{-5} mol/L), AG-041R(1×10^{-6} mol/L)和二者联合作用于MKN-45细胞72 h后, 细胞凋亡率分别为9.57% $\pm$ 0.60%, 10.25% $\pm$ 0.68%和20.83% $\pm$ 1.90%, 与对照组1.67% $\pm$ 0.76%相比, 细胞凋亡率均显著增高($P < 0.01$), 联合用药组细胞凋亡率显著高于单一用药组($P < 0.01$, 表2).

2.3 RT-PCR结果 1×10^{-6} mol/L AG-041R, 1×10^{-5} mol/L NS-398单独及联合作用MKN-45细胞72 h后, 明显抑制癌基因c-Myc mRNA的表达, 高于对照组, 差异有显著性($P < 0.01$); 联合用药

表 2 AG-041R, NS-398及联合作用后MKN-45细胞的凋亡率和c-Myc表达 (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

分组	细胞凋亡率 (%)	c-Myc/ β -actin
对照	1.67 $\pm$ 0.76	0.918 $\pm$ 0.042
NS-398	9.57 $\pm$ 0.60 ^b	0.690 $\pm$ 0.029 ^b
AG-041R	10.25 $\pm$ 0.68 ^b	0.723 $\pm$ 0.011 ^b
联合用药	20.83 $\pm$ 1.90	0.300 $\pm$ 0.017

^b $P < 0.01$ vs 对照和联合用药.

组高于各单独用药组, 差异有显著性($P < 0.01$, 图2, 表2).

3 讨论

环氧合酶-2(COX-2)的过度表达在消化道肿瘤中的作用日益得到重视, Sawaoka *et al*^[12]研究发现, COX-2在胃癌细胞中高度表达并促进肿瘤细胞增殖, NS-398能有效发挥其抗肿瘤作用. Uefuji *et al*^[13]报道, COX-2抑制剂JTE-522通过阻断胃癌细胞的细胞周期、抑制c-Myc蛋白表达从而抑制肿瘤细胞增殖.

胃泌素刺激人胃癌生长是由CCK-B受体介导的, 通过对胃癌及邻近黏膜表达胃泌素受体差异的研究显示, 胃癌较周围黏膜易于表达高含量的胃泌素受体, 其表达与肿瘤的部位和分期相关^[14]. Lee *et al*^[15]证实多数胃癌组织中高表达CCK-B受体. 而给予CCK-B/胃泌素受体拮抗剂YF476能抑制胃癌的形成^[16].

最近研究进一步表明胃泌素、COX-2二者间存在关联. Yao *et al*^[17]表明胃泌素在体内外剂量依赖性地促进肿瘤细胞的增殖, 预先给予NS-398则能逆转其促增殖作用. Slice *et al*^[18]证实胃泌素促进CCK-B受体阳性表达的Swiss3T3细胞PGE₂的释放, 且呈剂量、时间依赖性地诱导COX-2蛋白的表达; 预先给予CCK-B受体拮抗剂L-365260则能抑制胃泌素诱导的上述效应. 提示COX-2可能为胃泌素的一下游目标.

胃癌组织中高表达c-Myc是胃癌细胞高度增殖的原因之一^[19]. Wang *et al*^[20]发现胃癌细胞株IEC-6在胃泌素作用下c-Myc mRNA表达增加, 最高为正常的7.5倍. Kishimoto *et al*^[21]研究发现: NS-398能够引起大鼠肿瘤c-Myc表达的降低.

我们利用胃泌素受体阳性且高度表达COX-2的人MKN-45胃癌细胞株作为研究对象, 采用MTT法观察NS-398, AG-041R及联合应用对MKN-45细胞增殖的影响. 结果证实: NS-398

和AG-041R剂量、时间依赖性地抑制MKN-45细胞增殖; 两者联合应用具有协同作用. 为进一步探讨其机制, 我们应用RT-PCR法观察药物对人胃癌细胞MKN-45癌基因c-Myc表达的影响, 证实NS-398, AG-041R均明显抑制人胃癌细胞MKN-45癌基因c-Myc的表达, 联合用药抑制作用显著增强, 高于单一给药组. 初步提示二者联用对抑制胃癌细胞增殖的协同效应可能部分与此相关. 我们应用FCM也发现NS-398, AG-041R可明显促进MKN-45细胞凋亡, 二者联用后对MKN-45细胞凋亡的诱导作用显著高于单一给药组, 但其具体机制尚需进一步明确.

4 参考文献

- 1 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Increased expression of interleukin-1 α and cyclooxygenase-2 in human gastric cancer: a possible role in tumor progression. *Anticancer Res* 2005; 25: 3225-3230
- 2 Yasuda H, Yamada M, Endo Y, Inoue K, Yoshida M. Elevated cyclooxygenase-2 expression in patients with early gastric cancer in the gastric pylorus. *J Gastroenterol* 2005; 40: 690-697
- 3 Hu PJ, Yu J, Zeng ZR, Leung WK, Lin HL, Tang BD, Bai AH, Sung JJ. Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats. *Gut* 2004; 53: 195-200
- 4 Henwood M, Clarke PA, Smith AM, Watson SA. Expression of gastrin in developing gastric adenocarcinoma. *Br J Surg* 2001; 88: 564-568
- 5 Hur K, Kwak MK, Lee HJ, Park do J, Lee HK, Lee HS, Kim WH, Michaeli D, Yang HK. Expression of gastrin and its receptor in human gastric cancer tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 85-91
- 6 Rengifo-Cam W, Singh P. Role of progastrins and gastrins and their receptors in GI and pancreatic cancers: targets for treatment. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2345-2358
- 7 Szabo I, Rumi G, Bodis B, Nemeth P, Mozsik G. Gastrin and pentagastrin enhance the tumour proliferation of human stable cultured gastric adenocarcinoma cells. *J Physiol Paris* 2000; 94: 71-74
- 8 Fontana MG, Moneghini D, Villanacci V, Donato F, Rindi G. Effect of cholecystokinin-B gastrin receptor blockade on chemically induced colon carcinogenesis in mice: follow-up at 52 weeks. *Digestion* 2002; 65: 35-40
- 9 Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, Ocker S, Hahn EG, Konturek SJ. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 17-32
- 10 Colucci R, Blandizzi C, Tanini M, Vassalle C, Breschi MC, Del Tacca M. Gastrin promotes human colon cancer cell growth via CCK-2 receptor-mediated cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 production. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 338-348
- 11 金正均. 合并用药中的相加. *中国药理学报* 1980; 1: 70-76
- 12 Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Hori M. Effects of NSAIDs on proliferation of

■应用要点

化疗和放疗在杀伤胃癌细胞的同时, 也损伤正常的组织细胞, 其严重的不良反应使患者难以耐受. 化疗药物的另一个主要问题是多数肿瘤细胞具有遗传不稳定性, 易于突变而产生耐药. 非细胞毒药物可抑制肿瘤的生长甚至转移, 不良反应轻, 有一定的应用前景.

■同行评价

胃泌素受体拮抗剂抑制人胃癌细胞的研究较少,用COX-2抑制剂和胃泌素受体拮抗剂联合应用抑制人胃癌细胞有较好的创新性,联合应用有其理论依据,设计科学,研究方法和技术可行,结果可靠,有一定研究价值,能较好地反映我国胃肠病学基础研究的先进水平。

- gastric cancer cells *in vitro*: possible implication of cyclooxygenase-2 in cancer development. *J Clin Gastroenterol* 1998; 27 Suppl 1: S47-S52
- 13 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
- 14 李孟军, 黄广建, 乐竹琴, 张延龄. 胃癌及邻近黏膜表达胃泌素受体的差异及其意义. *中华胃肠外科杂志* 2001; 4: 50-52
- 15 Lee HK, Lee HJ, Hur K, Lee HS, Kim WH, Michaeli D, Choe KJ, Yang HK. Growth effect of gastrin on gastric cancer and its clinical implications for gastric cancer surgery. *Oncol Rep* 2005; 14: 383-388
- 16 Takaishi S, Cui G, Frederick DM, Carlson JE, Houghton J, Varro A, Dockray GJ, Ge Z, Whary MT, Rogers AB, Fox JG, Wang TC. Synergistic inhibitory effects of gastrin and histamine receptor antagonists on *Helicobacter*-induced gastric cancer. *Gastroenterology* 2005; 128: 1965-1983
- 17 Yao M, Song DH, Rana B, Wolfe MM. COX-2 selective inhibition reverses the trophic properties of gastrin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 574-579
- 18 Slice LW, Hodikian R, Zhukova E. Gastrin and EGF synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in Swiss 3T3 fibroblasts that express the CCK2 receptor. *J Cell Physiol* 2003; 196: 454-463
- 19 Ishii HH, Gobe GC, Pan W, Yoneyama J, Ebihara Y. Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: associations with c-myc and p53 protein expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 966-972
- 20 Wang JY, Wang H, Johnson LR. Gastrin stimulates expression of protooncogene c-myc through a process involving polyamines in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 1995; 269: C1474-C1481
- 21 Kishimoto Y, Yashima K, Morisawa T, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J. Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on APC and c-myc expression in rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. *J Gastroenterol* 2002; 37: 186-193

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

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

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

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

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

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

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

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

肝癌组织IGF- II 表达与HBV DNA复制及病理学特征的关系

邱历伟, 姚登福, 吴信华, 吴玮, 苏小琴, 邹黎

邱历伟, 姚登福, 吴信华, 吴玮, 苏小琴, 邹黎, 南通大学附属医院临床分子生物学中心 江苏省南通市 226001
邱历伟, 南通大学肿瘤学硕士生, 主要从事肿瘤早期诊断及分子机制研究。

江苏省卫生厅项目, No. H200523

南通市社会发展科技计划, No. S5053

通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床分子生物学中心. yaodf@ahnmcc.com

收稿日期: 2006-03-03 接受日期: 2006-03-11

Correlations of insulin-like growth factor-II expression with hepatitis B virus DNA replication and clinical pathological characteristics in human hepatocellular carcinoma

Li-Wei Qiu, Deng-Fu Yao, Xin-Hua Wu, Wei Wu, Xiao-Qin Su, Li Zou

Li-Wei Qiu, Deng-Fu Yao, Xin-Hua Wu, Wei Wu, Xiao-Qin Su, Li Zou, Research Center of Clinical Molecular Biology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by the Grants from the Medical Science Project of Health Department of Jiangsu Province, No. H200523, and the Science and Technology Project for Social Development of Nantong, China, No. S5053

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Molecular Biology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmcc.com

Received: 2006-03-03 Accepted: 2006-03-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) in hepatocellular carcinoma (HCC) as well as its correlations with the pathogenesis, development and prognosis of HCC.

METHODS: IGF-II expression was detected by immunohistochemistry in 30 HCC and their corresponding non-cancerous tissues. Liver HBV DNA was detected by *in situ* molecular hybridization technique and the relationship was analyzed between IGF-II expression and HBV replication or the clinical pathological characteristics.

RESULTS: The stronger expression of IGF-II

was found in liver cancer tissues. The positive rate of IGF-II expression was 83.3% in HCC, and 46.7% in non-cancerous liver tissues ($P < 0.01$), respectively. The expression of IGF-II was significantly higher in HCC with moderate or low differentiation than that with well differentiation (90.0%, 100% vs 42.9%, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). IGF-II expression was markedly lower in HCC without serosa invasion than that with serosa invasion (95.0% vs 60.0%, $P < 0.05$). IGF-II expression was also correlated with tumor size (< 5 cm vs ≥ 5 cm: 58.3% vs 100%, $P < 0.01$), but with tumor number ($P > 0.05$). The level of IGF-II expression in HBV DNA-positive HCC was significantly higher than that in HBV DNA-negative ones (94.7% vs 63.6%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: IGF-II is highly expressed in HCC, and the aberrant expression of IGF-II is correlated with the degree of differentiation, invasion and tumor size, and it may be used as a marker for development and prognosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Insulin-like growth factor-II; Immunohistochemistry; HBV DNA

Qiu LW, Yao DF, Wu XH, Wu W, Su XQ, Zou L. Correlations of insulin-like growth factor-II expression with hepatitis B virus DNA replication and clinical pathological characteristics in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1267-1271

摘要

目的: 分析胰岛素样生长因子- II (IGF- II) 在人肝细胞性肝癌(HCC)及非癌组织中的表达, 并探讨其与肿瘤发生、发展及预后的关系。

方法: 采用免疫组织化学方法, 分别检测30例HCC癌灶组及其自身对照的非癌组IGF- II 的表达, 并以生物素标记的HBV DNA探针检测肝癌组织中HBV DNA, 并分析IGF- II 表达与HBV复制及其临床病理学特征的关系。

结果: 肝癌IGF- II 均呈较高表达, 在肝癌癌灶为83.3%及非癌组表达46.7%, 存在显著差别($P < 0.01$)。HCC的癌灶组中IGF- II 阳性表达与

■背景资料

我国为肝癌高发区, 对肝癌的早期诊断是治疗的重点和难点。近年来, 通过监测癌基因或癌相关基因以提高肝癌早期诊断率的研究成为国际上的热点。IGF- II 作为胰岛素样生长因子类癌基因家族成员之一, 其在肝癌发生、发展过程中的作用机制及通过监测IGF- II 以诊断肝癌的方法探索也日益受到关注。

■ 研发前沿

目前,通过监测肝癌患者血清中IGF-Ⅱ水平以阐明其在肝癌发生、发展过程中的意义及其作为早期诊断肝癌标志物的可行性的研究较为深入,但直接检测肝癌组织中IGF-Ⅱ蛋白表达,分析其在乙肝-肝硬化-肝癌过程中的作用机制及其与肝癌多种病理指标及HBV DNA关系的研究尚较少见。

肿瘤分化程度(高 vs 中、低: 42.9% vs 90.0%, 100%, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)、是否侵及浆膜(是 vs 否: 60.0% vs 95.0%, $P<0.05$)以及肿瘤大小($<5\text{ cm}$ vs $\geq 5\text{ cm}$: 58.3% vs 100%, $P<0.01$)显著相关,而与肿瘤数目无关($P>0.05$); HBV DNA阳性肝癌组织中IGF-Ⅱ表达显著高于HBV DNA阴性组(94.7% vs 63.6%, $P<0.05$)。

结论: IGF-Ⅱ在肝细胞性肝癌中过度表达,且与HCC的分化程度和大小有关,可作为肝癌早期诊断及预后判断的标志。

关键词: 肝细胞癌; 胰岛素样生长因子; 免疫组织化学; HBV DNA

邱历伟, 姚登福, 吴信华, 吴玮, 苏小琴, 邹黎. 肝癌组织IGF-Ⅱ表达与HBV DNA复制及病理学特征的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1267-1271

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1267.asp>

0 引言

肝癌(HCC)是由病毒、化学致癌物等多病因作用^[1-3], 因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些酶基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控而致癌变, 经启动、促进、演变多阶段的发病过程, 其中基因的调控和表达、多种生长因子的活性等均与肝癌的发生、发展密切相关^[4-6]. 胰岛素样生长因子(IGF)是一个生长因子家族, 包括IGF-Ⅰ、IGF-Ⅱ, 属于类癌基因^[7]. IGF-Ⅱ是与胰岛素同源的多肽, 并具有胰岛素样活性, 引起不同类型细胞的有丝分裂. HCC发生、发展具有多病因、多中心和多阶段的特征, 其病原学因素主要为乙肝病毒(HBV)或丙肝病毒(HCV)感染. HCC患者中90%伴HBV感染, 乙肝或丙肝的持续感染导致肝硬化, 最终发展为肝癌, 其间也可不经过肝硬化阶段. 但在肝癌发生过程中, IGF-Ⅱ异常表达机制及与HBV复制间的关系尚不清楚^[8-9]. 我们以免疫组织化学方法分析了IGF-Ⅱ在肝癌癌灶、非癌组织的表达, 并探讨了IGF-Ⅱ表达与HBV复制、肝癌分化程度、浸润与否等病理学特征的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2003/2005, 按自身配对法收取南通大学附属医院肝癌患者(男24例, 女6例)术后新鲜组织, 分别留取癌灶、非癌组织(距癌灶边缘5 cm)各30份(约200 mg), 除部分作病理学检查

外, 其余置-85℃保存. 其中原发性肝癌30例(含 $<5.0\text{ cm}$ 肝癌12例), 年龄28-73(平均 45.6 ± 12.1)岁. 30例标本组织学类型均为肝细胞肝癌, 其中高、中、低分化分别为7、10及13例; 肿瘤单发者20例, ≥ 2 个者10例. 所有病例均有完整随访资料, 按全国肝癌防治协作组制定的标准核实诊断. 兔抗人IGF-Ⅱ多克隆抗体及SP免疫组化试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司. 肝组织标本经40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 制成4 μm 厚切片, 经HE染色组织学观察。

1.2 方法

免疫组织化学以SP法进行, DAB显色, 以PBS代替第一抗体作阴性对照, 以组织中显示棕黄色颗粒为IGF-Ⅱ表达阳性. IGF-Ⅱ在非癌组织及HCC组织中的表达均采用免疫组织化学SP法, 石蜡标本4 μm 厚连续切片, 经DAB显色, 苏木素复染, 无水乙醇脱水、中性树胶封片. 以0.01 mol/L PBS液(pH 7.5)分别替代一抗、二抗和SP试剂作为每次染色的阴性对照, 已知表达IGF-Ⅱ的乳腺癌组织作阳性对照. 肝组织中IGF-Ⅱ表达强度, 以阳性细胞数 $\geq 10\%$ 作为阳性判断标准, 进而根据阳性细胞百分率分为弱阳性(+): 阳性细胞数为10%-25%; 阳性(++): 阳性细胞数为26%-75%; 强阳性(+++): 阳性细胞数 $>75\%$. 另取组织切片, 脱蜡水化, 蒸馏水冲洗, 37℃温箱烘干, 蛋白酶K(20 mg/L)室温下消化30 min, 脱水, 37℃温箱烘干, 加生物素标记的HBV DNA探针, 加盖玻片, 加热(95℃)10 min(变性), 放入孵育盆进37℃温箱过夜, 加蛋白阻断液, 37℃温箱5 min, 滴加羊抗鼠生物素IgG, 37℃孵育20 min, 37℃的增强洗液冲洗, 甩干; 加羊抗鼠IgG, 37℃孵育20 min, 37℃的增强洗液冲洗, 甩干; 加入碱性磷酸酶标记的结合物(SAP), 37℃孵育20 min, 37℃的增强洗液冲洗, 甩干; 加入BCIP/NBT染色, 蒸馏水冲洗, 复染封片。

统计学处理 采用百分率和Fisher精确概率法处理和分析数据, 以 $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 肝癌组织IGF-Ⅱ的表达 IGF-Ⅱ阳性表达物呈棕黄色颗粒, 定位于胞质, 少数细胞出现胞核着色, 胞膜未见着色, 在癌组织中阳性细胞的分布呈较明显的异质性(图1A). 30例肝癌组织中IGF-Ⅱ表达阳性率为83.3%(25/30), 非癌组织中的表达阳性率为46.7%(14/30), 肝癌组织中IGF-

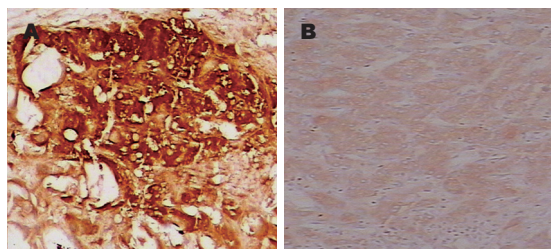


图 1 肝组织中IGF-Ⅱ表达(SP × 400). A: 癌灶; B: 非癌.

Ⅱ表达阳性率明显高于非癌组织($P < 0.01$).

2.2 IGF-Ⅱ表达的临床病理学特征 IGF-Ⅱ在中、低分化肝癌中的阳性表达率均高于高分化肝癌($P < 0.05$, $P < 0.01$); IGF-Ⅱ在侵及浆膜的肿瘤中阳性表达率高于未侵及浆膜者($P < 0.02$); 瘤直径 ≥ 5 cm者IGF-Ⅱ阳性表达率高于直径 < 5 cm者($P < 0.01$)(表1); 但IGF-Ⅱ阳性表达率与肿瘤数目无关($P > 0.05$).

2.3 IGF-Ⅱ表达与HBV复制的关系 肝癌中IGF-Ⅱ阳性表达率在HBV阳性肝癌中为94.7%, 而在HBV阴性肝癌中为63.6%($P < 0.05$). 在HBV阳性肝癌组中IGF-Ⅱ的表达强度: 18例阳性中, 2+以上为17例; HBV阴性肝癌组中IGF-Ⅱ的表达强度: 7例阳性中, 2+以上仅为4例(表2). 可见IGF-Ⅱ的表达强度在HBV阳/阴性肝癌组中差异显著.

3 讨论

体内IGF-Ⅱ是肝细胞癌变过程中发挥重要作用的生长因子, 他通过IGF-Ⅰ受体上的酪氨酸激酶途径合成与活化^[10-12]. IGF-Ⅱ的活化与表达过程, 已在化学诱癌鼠、转基因鼠和肝炎病毒慢性感染的实验动物及肝组织中得到证实^[13-14]. 转基因鼠中若持续表达IGF-Ⅱ, 则肝细胞癌和淋巴瘤的发病频率增加. 在肝细胞癌变过程中, 胚胎型IGF-Ⅱ基因活化, 使IGF-Ⅱ呈高水平状态^[15]. 肝细胞癌变过程中IGF-Ⅱ呈高度表达的机制尚不十分清楚, 可能与IGF-Ⅱ通过自分泌或旁分泌作用促进细胞转化有关^[16]. 本研究以免疫组织化学法分析了肝癌组织的不同部分IGF-Ⅱ的表达与变化、HBV DNA复制关系及临床病理学特征. 对慢性肝炎、肝硬化、肝癌和癌旁组织表达IGF-Ⅱ及其作用受体的研究, 发现肝细胞癌变时IGF-Ⅱ基因呈胚胎型过量表达, 该特征揭示肝细胞发生异常增殖和分化的阶段, IGF-Ⅱ基因产生胚胎表型的逆转^[17], 这可能与自分泌生长刺激机制对肝细胞的分化调节方式有关^[18]. 本研究中肝癌组织中IGF-Ⅱ表达阳性率明显高于非癌组织,

表 1 肝癌组织中IGF-Ⅱ表达的临床病理学特征

临床病理	n	IGF-Ⅱ表达				
		阳性 (%)	-	+	++	+++
肝癌	30	25 (83.3)	5	4	8	13
高分化	7	3 (42.9)	4	2	1	0
中分化	10	9 (90.0) ^a	1	1	3	5
低分化	13	13 (100) ^b	0	1	4	8
侵及浆膜	20	19 (95.0)	1	2	7	10
未侵及浆膜	10	6 (60.0) ^a	4	2	1	3
肿瘤直径						
< 5 cm	12	7 (58.3)	5	2	1	4
≥ 5 cm	18	18 (100) ^b	0	2	7	9
单发	20	18 (90.0)	2	3	5	10
多发	10	7 (70.0)	3	1	3	3

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

表 2 肝癌组织HBV复制与IGF-Ⅱ表达的关系

HBV DNA	n	IGF-Ⅱ表达				
		阳性 (%)	-	+	++	+++
阳性	19	18 (94.7) ^a	1	1	5	12
阴性	11	7 (63.6)	4	3	3	1

^a $P < 0.05$ vs 阴性.

且其表达水平与肿瘤分化程度、浆膜浸润与否及肿瘤直径大小等指标密切相关, 证实IGF-Ⅱ在肝细胞癌变的发生、发展过程中均具有重要作用. 其主要机制可能为HBV等肝炎病毒反式激活IGF-Ⅱ, 而IGF-Ⅱ基因的异常激活和过量表达, 促使具有高增殖活性状态的癌前肝细胞转化, 最终导致肝癌发生, 同时IGF-Ⅱ的表达水平亦同步反映了肝脏病变的程度^[19].

我国为HBV重感染区及肝癌高发区, HBV感染与肝癌发生关系密切, 特别是HBV基因编码的X蛋白(17 kDa)与肝癌形成的关系更为密切^[20-21]. HBV DNA是病毒复制和传染性的直接标志, 其测定对于判断HBV复制、传染性大小, 抗病毒药物疗效, 病情变化和预后, 为调整抗病毒药物剂量、确定疗程提供可靠依据. 在慢性肝炎、肝硬化和肝癌患者中HBV和IGF-Ⅱ异常表达关系已得到研究证实^[22]. Lee *et al*^[14]分析了IGF-Ⅱ中P₄活化与HBV基因产物间的关系, 证实HBV-X蛋白增加, 导致内皮性IGF-Ⅱ表达增加^[23]. 对IGF-Ⅱ中多种启动子的分析显示, HBV基因产物对IGF-Ⅱ基因转录具有正向调节作用. HBV-X抗原对IGF-Ⅱ基因的4种启动子有直接

■创新盘点

关于IGF-Ⅱ水平与肝癌关系的研究目前大都集中在血清学检测方面. 本文则从蛋白质水平, 以免疫组化方法对IGF-Ⅱ表达与肝癌病理学指标的关系及其在乙肝发展至肝癌这一过程中可能的作用机制做了一定研究.

应用要点

本文为进一步探讨IGF-II在乙肝发展至肝癌过程中的作用机制及其与肝癌病理指标的关系提供了新的研究思路和方法,今后可从基因水平对IGF-II的表达做进一步的研究。

作用,并与Sp1结合位点有关。对HBV DNA复制与IGF-II表达关系的研究,有助于探讨肝细胞发生癌变的分子机制。

HBV对IGF-II转录具有正向调节功能,这一功能是通过Sp1这一直接靶目标而发挥作用^[24-25]。HBV-X抗原使Sp1磷酸化增加与DNA的结合力,可能是调节IGF-II基因转录和表达的重要机制,从而在细胞癌变过程中促进细胞的分裂^[26-28]。在本研究中,HBV DNA阳性肝癌组织中IGF-II的表达率明显高于HBV DNA阴性肝癌组织,提示HBV感染患者体内的HBV-X抗原可能诱导IGF-II的自分泌或旁分泌机制,在HBV所致肝癌的发生、发展过程中起重要作用。本文利用组织化学技术对肝癌组织IGF-II表达进行了定位,并分析其表达率与各种病理指标的相关性,提示肝癌组织中IGF-II的表达分析有助于预测肝癌的发展和预后^[29-30]。

参考文献

- 1 Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390-395
- 2 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 3717-3726
- 3 Ji GZ, Wang XH, Miao L, Liu Z, Zhang P, Zhang FM, Yang JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 644-648
- 4 Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 761-769
- 5 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
- 6 Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 220-226
- 7 Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54: 138-144
- 8 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660
- 9 Kim KW, Bae SK, Lee OH, Bae MH, Lee MJ,

- Park BC. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 348-351
- 10 Aihara T, Noguchi S, Miyoshi Y, Nakano H, Sasaki Y, Nakamura Y, Monden M, Imaoka S. Allelic imbalance of insulin-like growth factor II gene expression in cancerous and precancerous lesions of the liver. *Hepatology* 1998; 28: 86-89
 - 11 Huynh H, Chow PK, Ooi LL, Soo KC. A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ* 2002; 13: 115-122
 - 12 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 303-307
 - 13 Zhang N, Siegel K, Odenthal M, Becker R, Oesch F, Dienes HP, Schirmacher P, Steinberg P. The role of insulin-like growth factor II in the malignant transformation of rat liver oval cells. *Hepatology* 1997; 25: 900-905
 - 14 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001; 283: 167-177
 - 15 Fiorentino M, Grigioni WF, Baccarini P, D'Errico A, De Mitri MS, Pisi E, Mancini AM. Different *in situ* expression of insulin-like growth factor type II in hepatocellular carcinoma. An *in situ* hybridization and immunohistochemical study. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 59-65
 - 16 Bae MH, Lee MJ, Bae SK, Lee OH, Lee YM, Park BC, Kim KW. Insulin-like growth factor II (IGF-II) secreted from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity. *Cancer Lett* 1998; 128: 41-46
 - 17 Wang Z, Ruan YB, Guan Y, Liu SH. Expression of IGF-II in early experimental hepatocellular carcinomas and its significance in early diagnosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 267-270
 - 18 Zhang J, Chan EK. Autoantibodies to IGF-II mRNA binding protein p62 and overexpression of p62 in human hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 146-153
 - 19 Seo JH, Kim KW, Murakami S, Park BC. Lack of colocalization of HBxAg and insulin like growth factor II in the livers of patients with chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 1997; 12: 523-531
 - 20 Orito E, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 408-412
 - 21 Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
 - 22 Su JJ, Qin GZ, Yan RQ, Huang DR, Yang C, Lotlikar PD. The expression of insulin-like growth factor II, hepatitis B virus X antigen and p21 in experimental hepatocarcinogenesis in tree shrews. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28: 62-66
 - 23 Chen GG, Li MY, Ho RL, Chak EC, Lau WY, Lai PB. Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 34: 7-12

- 24 Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 58-66
- 25 Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2006; 208: 372-380
- 26 Kang-Park S, Lee YI, Lee YI. PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Lett* 2003; 545: 203-208
- 27 Sedlacek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. *Br J Cancer* 2003; 88: 733-739
- 28 Scharf JG, Ramadori G, Dombrowski F. Analysis of the IGF axis in preneoplastic hepatic foci and hepatocellular neoplasms developing after low-number pancreatic islet transplantation into the livers of streptozotocin diabetic rats. *Lab Invest* 2000; 80: 1399-1411
- 29 Sohda T, Iwata K, Soejima H, Kamimura S, Shijo H, Yun K. *In situ* detection of insulin-like growth factor II (IGF2) and H19 gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Hum Genet* 1998; 43: 49-53
- 30 Uchida K, Kondo M, Takeda S, Osada H, Takahashi T, Nakao A, Takahashi T. Altered transcriptional regulation of the insulin-like growth factor 2 gene in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 1997; 18: 193-198

■同行评价

论文采用的样本是非常宝贵的, 相关研究很有价值. 文章研究内容虽然简单, 但是能说明一些问题, 有一定的可读性.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

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

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

复方中药益肝康抑制肝星状细胞增殖的作用机制

张亚平, 姚希贤, 刘晓玲, 赵霞

■背景资料

HSC为肝脏ECM产生的主要细胞,其活化、增殖是肝纤维化发生的中心环节。

张亚平, 姚希贤, 赵霞, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

刘晓玲, 沧州市中西医结合医院内科 河北省沧州市 061001
张亚平, 2003级河北医科大学博士生, 副主任医师, 目前主要从事肝纤维化研究。

通讯作者: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科, gracezhangyaping@yahoo.com.cn

电话: 0311-87814356

收稿日期: 2006-02-16 接受日期: 2006-03-20

Inhibition of *Yigankang* on proliferation of rat hepatic stellate cells induced by interleukin-1 β

Ya-Ping Zhang, Xi-Xian Yao, Xiao-Ling Liu, Xia Zhao

Ya-Ping Zhang, Xi-Xian Yao, Xia Zhao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Xiao-Ling Liu, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. gracezhangyaping@yahoo.com.cn

Received: 2006-02-16 Accepted: 2006-03-20

Abstract

AIM: To study the mechanism of *Yigankang* in the proliferation inhibition of rat hepatic stellate cells (HSCs).

METHODS: The activation of JNK pathway was detected by Western blot, while the proliferation of HSCs was induced by interleukin-1 β (IL-1 β). The effect of JNK inhibitor SP600125 was measured by cell counting kit-8 (CCK-8) and AP-1 activity was evaluated by electrophoretic mobility shift assay.

RESULTS: Interleukin-1 β up-regulated the proliferation of HSCs. After stimulation of IL-1 β for 24 h, HSC proliferation increased significantly as compared with that in the controls (1.573 ± 0.026 vs 1.390 ± 0.073 , $P = 0.000$). After treatment with different concentrations of SP600125 (10 $\mu\text{mol/L}$, 1.427 ± 0.113 ; 20 $\mu\text{mol/L}$, 0.772 ± 0.093 ; 40 $\mu\text{mol/L}$, 0.675 ± 0.074), HSC proliferation induced by

IL-1 β decreased significantly in comparison with that in the controls (1.560 ± 0.110) ($P = 0.03$; $P = 0.000$; $P = 0.000$). IL-1 β activated JNK pathway in a time-dependent manner in rat HSCs. After stimulation of IL-1 β for 0, 5, 15, 30, 60 and 120 min, the JNK activities were 0.982 ± 0.299 , 1.501 ± 0.720 , 2.133 ± 0.882 , 3.360 ± 0.452 , 2.181 ± 0.789 , 1.385 ± 0.368 , respectively. In comparison with those in the cells without IL-1 β , JNK activities differed significantly at 15, 30 and 60 min ($P = 0.002$, $P = 0.000$, $P = 0.001$). *Yigankang* inhibited the activities of JNK (1.610 ± 0.242 vs 3.360 ± 0.452 , $P = 0.000$) and AP-1 (342.43 ± 85.77 vs 597.70 ± 83.96 , $P < 0.01$) obviously.

CONCLUSION: IL-1 β can stimulate the proliferation of rat HSCs, and JNK signaling pathway was involved in the process. *Yigankang* can inhibit HSC proliferation induced by IL-1 β through JNK/AP-1 pathway.

Key Words: *Yigankang*; JNK/AP-1 signal transduction; Interleukin-1 β ; Hepatic stellate cells; Proliferation

Zhang YP, Yao XX, Liu XL, Zhao X. Inhibition of *Yigankang* on proliferation of rat hepatic stellate cells induced by interleukin-1 β . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1272-1276

摘要

目的: 探讨活血化瘀复方中药益肝康抑制大鼠肝星状细胞(HSC)增殖的作用机制。

方法: 采用IL-1 β 激活HSC, 应用Western blot检测JNK的活化程度; 应用活细胞计数试剂盒-CCK-8检测HSC增殖并观察JNK特异性阻断剂SP600125对IL-1 β 促HSC增殖的影响。应用凝胶电泳移动抑制法测定AP-1的活性。

结果: IL-1 β 有明显促大鼠HSC增殖作用, IL-1 β 作用培养的HSC 24 h后, 吸光值明显高于对照组(1.573 ± 0.026 vs 1.339 ± 0.073 , $P = 0.000$); 经JNK特异性阻滞剂SP600125预处理后, IL-1 β 促HSC增殖作用受到抑制, SP600125浓度为10, 20及40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 吸光值分别为

1.427±0.113, 0.772±0.093, 0.675±0.074, 与对照组(1.560±0.110)相比其增殖反应均明显降低($P=0.03$; $P=0.000$; $P=0.000$); IL-1 β 可激活大鼠HSCs JNK信号蛋白, 并呈现出一定的时相变化. IL-1 β 作用HSCs后0, 5, 15, 30, 60及120 min, JNK活性分别为0.982±0.299, 1.501±0.720, 2.133±0.882, 3.360±0.452, 2.181±0.789, 1.385±0.368. 与0(未加IL-1 β)相比, 15 min, 30 min及60 min均有显著差异($P=0.002$, $P=0.000$, $P=0.001$). 益肝康可抑制IL-1 β 诱导的HSCs JNK活性(1.610±0.242 vs 3.360±0.452, $P=0.000$); 益肝康可抑制IL-1 β 诱导的HSCs AP-1活性, 经益肝康预处理HSCs 1 h后, AP-1活性明显受到抑制(342.43±85.77 vs 597.70±83.96, $P=0.005$).

结论: IL-1 β 可刺激HSC增殖, 细胞内JNK信号转导通路参与了IL-1 β 促HSC增殖作用; 益肝康可通过阻滞JNK/AP-1通路, 抑制HSC增殖.

关键词: 益肝康; JNK/AP-1信号转导通路; 白细胞介素-1 β ; 肝星状细胞; 增殖

张亚平, 姚希贤, 刘晓玲, 赵霞. 复方中药益肝康抑制肝星状细胞增殖的作用机制. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1272-1276 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1272.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)为产生肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要细胞, 其活化、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[1]. 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路在转导细胞外信号入核的过程中发挥重要作用, 目前已证实, 在哺乳动物中有ERK, JNK, P38, ERK5等4个MAPK家族成员^[2-5]. 其中JNK能被多种炎性刺激因子所激活, 并对炎症的发生、发展起重要作用^[6-7]. 激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是具有多向性调节作用的核转录因子, 广泛参与许多基因, 特别是免疫炎症相关基因的转录调节. 许多研究均已证实, 以丹参等活血化瘀药为主组方的益肝康可通过抑制HSC活化, 增殖而发挥抗肝纤维化作用^[8-11]. 我们以白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)为刺激因子, 通过测定益肝康对体外培养的大鼠HSC JNK, AP-1活性的影响, 进一步阐明该药抗肝纤维化的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 IL-1 β 购自英国PeproTech公司, JNK特

异性阻断剂SP600125购自美国Sigma公司, 小鼠抗人P-JNK mAb购自美国Santa Cruz公司, 兔抗人多克隆 β -actin抗体购自北京中衫金桥生物公司, HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体、山羊抗兔IgG抗体及ECL发光试剂盒均购自北京中山生物技术公司, 活细胞计数试剂盒-CCK-8(cell counting kit-8)试剂购自日本株式会社同仁化学研究所, LightShift Chemiluminescent EMSA kit购自美国Pierce公司, RPMI 1640培养基购自Gibco公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司. 中药购自石家庄市乐仁堂大药房. 益肝康由丹参、当归、赤芍、黄芪等9味中药组成, 生药浸泡过夜, 文火煮3次, 药液离心去杂质, 置于旋转蒸发仪上蒸去水分. 浓缩药液再次离心去杂质后按1:3体积比加入950 mL/L乙醇4℃沉淀过夜, 去除蛋白成分, 将上清药液再置于旋转蒸发仪上蒸去乙醇和水制成中药浸膏. HSC细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠, 其表型为活化的HSCs. 将冷冻保存于液氮中的HSC细胞株复苏后接种于含100 mL/L新生牛血清、100 kU/L青霉素、100 kU/L链霉素、4 mmol/L谷氨酰胺及1 mmol/L HEPES的RPMI 1640培养液中, 37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养. 培养箱中孵育至细胞80%-90%汇合时, 弃培养液, 换不含血清的RPMI 1640培养液继续培养12 h, 使细胞基本同步于G₀期后进行实验.

1.2 方法 (1)IL-1 β 对大鼠HSC增殖的影响. 根据预实验结果, 加入IL-1 β (10 μ g/L)培养, 于24 h后检测HSC增殖情况, 并与对照组比较; (2)IL-1 β 作用大鼠HSC时JNK活性的时相观察及益肝康对JNK活性的影响; 加入IL-1 β (10 μ g/L)培养, 0, 5, 15, 30, 60, 120 min分别检测p-JNK及 β -actin活化程度. 益肝康组预先用益肝康浸膏(2 g/L)预处理1 h后再加入IL-1 β (10 μ g/L)培养, 30 min后检测p-JNK及 β -actin活化程度; (3)SP600125抑制IL-1 β 促HSC增殖作用的观察: 先予不同浓度SP600125(10, 20, 40 μ mol/L)预孵育30 min后, 再加入IL-1 β (10 μ g/L)培养24 h后, 检测HSC增殖情况, SP600125配制方法参照文献[12]. 对照组预先加入SP600125溶剂-10 g/L二甲基亚砜(DMSO)预孵育30 min, 再加入IL-1 β (10 μ g/L)培养24 h后, 检测HSC增殖情况; (4)益肝康对IL-1 β 作用大鼠HSC后AP-1活性的影响: 分对照组、IL-1 β 组及益肝康+IL-1 β 组, 益肝康+IL-1 β 组预先用益肝康浸膏(2 g/L)预处理1 h, 后与IL-1 β 组同时加入IL-1 β (10 μ g/L)培养, 2 h后3组均

■ 研发前沿

IL-1在促进HSC活化、增殖等过程中发挥重要作用. IL-1作用于HSC后如何使之激活并促进HSC增殖, 信号分子在细胞内如何转导是当前学者们研究的热点问题之一.

■创新盘点

本文通过测定胞内信号分子JNK及核转录因子AP-1, 阐明IL-1在HSC中的信号转导通路, 并阐述“益肝康”抗肝纤维化的机制。

检测AP-1活性.

1.2.1 活细胞计数试剂盒-CCK-8检测HSC增殖于96孔板培养HSC, 24 h后每孔加入CCK-8试剂10 μ L, 继续培养3 h后在酶标仪上读取450 nm的吸光度. 用吸光值(absorbance value, A value)表示. 每组设6个重复孔, 另设空白孔调零^[13].

1.2.2 Western blot检测JNK及 β -actin活性 培养于培养瓶中的HSC细胞达到实验要求后, 用细胞刮刀收集细胞, 4 $^{\circ}$ C 3000 r/min离心10 min. 弃上清, 加入200 μ L改良的RIPA裂解缓冲液, 混合器上充分振荡后, 冰上静置30 min, 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min离心10 min, 取上清并用考马斯亮蓝试剂盒进行蛋白定量. 取含80 μ g不同体积的蛋白, 100 g/L SDS-PAGE电泳后转膜至硝酸纤维素膜, 封闭液中4 $^{\circ}$ C过夜. TPBS洗膜后加入小鼠抗人p-JNKmAb(1:200)或兔抗人 β -actin多克隆抗体(1:200), 置摇床室温5 h. TPBS振摇洗膜后, 再分别用HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体、山羊抗兔IgG抗体, 室温摇动孵育2 h. 洗膜后, 暗室中加入ECL发光剂作用适当时间后, X线胶片曝光30 s-数分钟, 进一步显影、定影后即可见成像条带. 每组实验均重复6次. 采用Gel-Pro凝胶分析软件对Western印迹结果进行半定量分析, 读取各电泳条带的吸光度代表蛋白质的含量, 以磷酸化JNK1、JNK2表示JNK的活化产物, β -actin为内参照, JNK1、JNK2的平均值与 β -actin的比值(p-JNK/ β -actin)代表JNK的活化程度.

1.2.3 凝胶电泳移动抑制实验测定AP-1活性 PBS洗涤细胞后, 测量压紧后细胞沉淀体积(pressed cell volume, PCV), 用5倍PCV的buffer A(10 mmol/L HEPES pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 5 g/L NP-40)裂解细胞, 1850 r/min低温离心10 min. 将细胞沉淀重悬于3倍原PCV的buffer B中(成分同buffer A, 但无NP-40), 冰浴10 min, 3000 r/min低温离心15 min沉淀细胞核. 测量离心后压紧的细胞核沉淀体积(pressed nuclear volume, PNV), 用2/3 PNV的buffer C(20 mmol/L HEPES pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 mL/L甘油, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF)和1/3 PNV的buffer D中(成分同buffer C, 但KCl为400 mmol/L)重悬细胞核, 冰浴震荡60 min, 15 000 r/min低温离心30 min, 收集上清即细胞核蛋白. 用考马斯亮蓝G250试剂盒测定蛋白浓

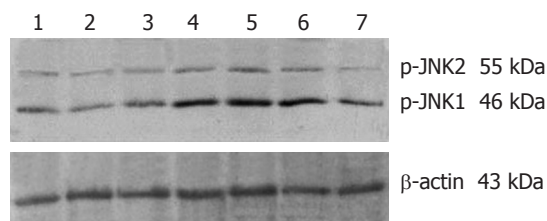


图1 益肝康抑制IL-1 β 诱导的HSC JNK活性 (Western blot). 1: 益肝康+IL-1 β ; 2: 对照组; 3: IL-1 β 5 min; 4: IL-1 β 15 min; 5: IL-1 β 30 min; 6: IL-1 β 60 min; 7: IL-1 β 120 min.

度. 生物素标记的AP-1同源寡核苷酸片段(北京赛百盛生物有限公司)为: 5'-TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG-3'; 3'-AAG GCC GAC TGA GTA GTT CGC-5'. 取10 μ g核蛋白按LightShift Chemiluminescent EMSA kit说明书进行结合反应、60 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜. 暗室中加入发光剂作用适当时间后, X线胶片曝光30 s-数分钟, 进一步显影、定影后即可见成像条带. 每组实验均重复3次. 采用Gel-Pro凝胶分析软件对电泳条带进行半定量分析, 读取各电泳条带的吸光度代表AP-1的相对活性.

统计学处理 数据用mean $\pm$ SD表示, 利用SPSS 11.0软件进行统计分析. 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 有显著差异者进一步用最小显著差值法进行两两比较.

2 结果

2.1 IL-1 β 促进大鼠HSC增殖 IL-1 β (10 μ g/L)作用培养的HSC 24 h后, 应用CCK-8检测, 吸光值(1.573 $\pm$ 0.026)明显高于对照组(1.339 $\pm$ 0.073), 统计学处理有极显著性差异($P=0.000<0.01$).

2.2 益肝康抑制IL-1 β 激活大鼠HSC JNK通路 IL-1 β (10 μ g/L)刺激5 min后, 即见JNK活化增强(1.501 $\pm$ 0.720), 但无统计学意义, 15 min时明显增强(2.133 $\pm$ 0.882), 30 min时达到高峰(3.360 $\pm$ 0.452), 随后有所降低, 60 min时仍保持较高的活化状态(2.181 $\pm$ 0.789), 120 min后则基本恢复正常水平(1.385 $\pm$ 0.368), 与对照组(0.982 $\pm$ 0.299)相比, 15, 30及60 min均有显著性差异($P=0.002<0.01$, $P=0.000<0.01$, $P=0.001<0.01$). 益肝康组JNK活性明显受到抑制(1.610 $\pm$ 0.242), 与5相比有显著性差异($P=0.000<0.01$, 图1).

2.3 SP600125抑制IL-1 β 促HSC增殖 经SP600125预处理后, IL-1 β 促HSC增殖作用受到抑制, SP600125浓度为10, 20及40 μ mol/L时, 吸光值分别为1.427 $\pm$ 0.113, 0.772 $\pm$ 0.093, 0.675 $\pm$

0.074, 与对照组(1.560 ± 0.110)相比其增殖反应均明显降低($P = 0.03 < 0.05$, $P = 0.000 < 0.01$, $P = 0.000 < 0.01$).

2.4 益肝康对HSC AP-1活性的影响 EMSA结果显示, 正常对照组HSC内有低水平的AP-1活化, IL-1 β (10 μ g/L)作用HSC 2 h后, AP-1与寡核苷酸探针结合的滞后带较前明显增粗(597.70 ± 83.96 vs 290.03 ± 30.77 , $P = 0.002 < 0.01$), 提示IL-1可诱导HSC AP-1活性增强; 而用益肝康预处理的HSC AP-1滞后带较IL-1 β 组显著变浅(342.43 ± 85.77 vs 597.70 ± 83.96 , $P = 0.005 < 0.01$), 抑制率为42.71%(图2).

3 讨论

多种损害肝脏因素如病毒、药物、酒精以及机械性损伤等导致肝损伤, 在肝细胞炎症、坏死刺激下, 相关细胞分泌多种细胞因子, 如转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、TNF、IL-1、IL-6等, 这些细胞因子所蕴涵的信息, 需通过HSC胞内信号转导系统传递, 在某些转录因子的作用下, 转导信号入核, 从而启动DNA复制、转录及翻译表达过程, 实现HSC活化、增殖、转型并分泌ECM, 最终导致肝纤维化的发生^[14-17]. 早期肝纤维化是一个可逆的过程, 不少研究表明中药复方抗肝纤维化具有多途径、多层次、多靶点的综合药理学作用^[18-19], 我们探讨益肝康是否能通过干预HSC胞内或核内的信号转导过程, 达到抑制肝纤维化发生、发展的目的. 本设想的证实将为抗肝纤维化研究提供新思路.

IL-1为一种具有多种生物学功能的强有力的促炎细胞因子, 几乎作用于所有体内细胞, 调节炎症及多种反应^[20-23]. 本结果显示, IL-1 β 作用于HSC后, HSC增殖反应明显增强(1.573 ± 0.026 , $P < 0.01$). 表明IL-1 β 具有促HSC活化增殖作用, 为肝纤维化发生的重要致病因子. MAPK是生物体内重要的信号转导系统之一, 参与介导细胞生长、分裂、增殖等多种过程. 在哺乳动物细胞中已成功克隆了ERK, JNK/SAPK, p38MAPK, ERK5/BMK1四个MAPK亚族. 这些MAPK亚族能被多种炎性刺激所激活, 并对炎症的发生、发展起重要作用^[24-27]. 本研究显示, IL-1 β 可在短时间内激活JNK通路, 刺激5 min后, JNK开始活化, 30 min时达到高峰, 随后逐渐降低, 2 h后基本恢复正常水平. 而IL-1 β 作用24 h后, HSC才明显增殖; 应用特异性JNK阻断剂SP600125预处理

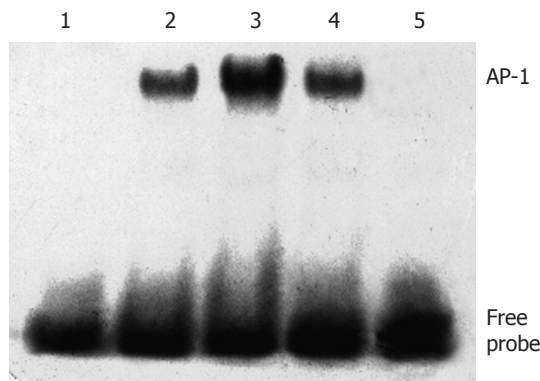


图2 益肝康抑制IL-1 β 诱导的HSC AP-1活性 (EMSA). 1: 阴性对照; 2: 对照组; 3: IL-1 β ; 4: 益肝康+IL-1 β ; 5: 竞争实验.

HSC后再给予IL-1 β 进行刺激, 结果显著抑制了IL-1 β 的促HSC增殖作用, 且SP600125浓度越高, 抑制HSC增殖作用愈加明显. 表明JNK活化受到阻断后, IL-1 β 的促HSC增殖作用明显受到抑制, 进一步说明JNK信号转导通路在IL-1 β 促HSC增殖中发挥重要作用.

AP-1作为转录调节蛋白, 将细胞外刺激信号传导至细胞核, 激活AP-1位点的靶基因转录. AP-1为Jun家族成员(c-jun, JunB, JunD)组成的同源二聚体, 或Jun家族与Fos家族(c-fos, FosB, Δ FosB, Fra1, Fra2)组成的异源二聚体^[28]. 许多基因(如转化生长因子- β 、纤维连接蛋白、层连蛋白、TIMP)的启动子中均存在与AP-1结合的DNA序列. AP-1与之结合即可调节该基因的转录. 因此AP-1活化在细胞增殖、转化及ECM合成中发挥重要作用^[29-30]. 我们发现, IL-1 β 刺激HSC后AP-1活性明显增高, 表明IL-1 β 可通过激活AP-1发挥生物学作用.

中药复方益肝康系重用丹参, 辅以当归、赤芍等活血化瘀, 并用黄芪等益气健脾药而成. 大量临床与实验研究表明, 该药具有消除症状、改善肝功能等作用. 并可抑制HSC活化增殖, 促进HSC凋亡, 并有抗脂质过氧化、保护肝细胞等功能^[31-33]. 此前我们的研究也发现, 益肝康全方、拆方及丹参单味药对IL-1 β 诱导的HSC增殖均具有明显的抑制作用, 但抑制作用逐渐递减^[34]. 说明丹参是益肝康全方中抑制HSC增殖的主要成分, 可能系主药. 而全方对HSC增殖具有更为显著的抑制作用, 可能与药物科学配伍后的相辅相乘作用使抗肝纤维化有效成分增加有关, 充分体现了中医基础理论君臣佐使的优势. 为进一步探讨其作用机制, 我们观察了益肝康对IL-1 β 作用后HSC JNK通路及AP-1活性的影响. 结果表明益肝康可明显抑制体外培养的

■应用要点

本研究发现阻断HSC的JNK/AP-1通路可抑制HSC增殖, 此有助于抗肝纤维化新药的研发.

■名词解释

君臣佐使: 为中医基础理论中中药合理配伍的原则, 即中药组方讲究根据药性药效配合, 这样就会达到单味药所不及的特殊功效, 以发挥中药的强大疗效.

同行评价

本文应用免疫学和分子生物学方法探讨活血化瘀中药复方益肝康抑制肝星状细胞增殖、抑制肝脏纤维化的分子生物学和免疫学机制,对肝脏纤维化的临床中医药研究和治疗有一定指导意义。论文题目合理,切题,实验方法简单可靠,结论可信。

HSC中JNK的活性,并减弱AP-1的活化。以上表明益肝康可通过JNK/AP-1通路抑制IL-1 β 诱导的HSC增殖。

参考文献

- 1 姚希贤,徐克成. 肝纤维化的基础与临床. 第1版. 上海: 上海科技教育出版社, 2003: 9-21
- 2 Fan JM, Huang XR, Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism *in vitro*. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 820-831
- 3 Parker LC, Luheshi GN, Rothwell NJ, Pinteaux E. IL-1 beta signalling in glial cells in wildtype and IL-1RI deficient mice. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 312-320
- 4 Zhang YP, Yao XX, Zhao X. Interleukin-1 beta up-regulates tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and phosphorylation of c-jun N-terminal kinase and p38 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1392-1396
- 5 李涌泉,余学清,李晓艳,祝胜郎,郑勋华. 白细胞介素1 β 通过p38信号通路上调系膜细胞表达白细胞介素6. 中国免疫学杂志 2004; 20: 389-395
- 6 Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, Su B. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 2004; 5: 98-103
- 7 Zhang B, Perpetua M, Fulmer M, Harbrecht BG. JNK signaling involved in the effects of cyclic AMP on IL-1beta plus IFNgamma-induced inducible nitric oxide synthase expression in hepatocytes. *Cell Signal* 2004; 16: 837-846
- 8 姚希贤,唐有为,姚冬梅,修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠 I, III 型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 263-267
- 9 姚欣,姚希贤,修贺明,高君萍,张玉琢. 活血化淤中药益肝浓缩煎剂对大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2002; 10: 544-548
- 10 唐有为,姚希贤,修贺明. 益肝煎剂对肝星状细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 347-348
- 11 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 511-514
- 12 Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13681-13686
- 13 Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagy R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 731-740
- 14 Han YP, Zhou L, Wang J, Xiong S, Garner WL, French SW, Tsukamoto H. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem* 2004; 279: 4820-4828
- 15 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
- 16 姚希贤,房红梅,王军民. 拆方益肝康与药物血清对肝星状细胞PDGF及受体表达的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1412-1416
- 17 张亚平,姚希贤. 白细胞介素-1激活肝星状细胞信号转

导机制的研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 321-323

- 18 Yao XX, Lv T. Effects of pharmacological serum from normal and liver fibrotic rats on HSCs. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2444-2449
- 19 Wang JM, Yao XX, Li XT, Yang SL, Su Z. Effects of Radix Salviae Miltiorrhizae on Ca²⁺ in hepatic stellate cells. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2005; 36: 221-224
- 20 Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 415-428
- 21 Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003; 2003: re3
- 22 Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 2005; 29: 159-168
- 23 Fernandez L, Mosquera JA. Interleukin-1 increases fibronectin production by cultured rat cardiac fibroblasts. *Pathobiology* 2002; 70: 191-196
- 24 蒋明德,马洪德,解方为. ERK信号传导通路与肝星状细胞周期调控. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1037-1039
- 25 马洪德,蒋明德,钟显飞,解方为,曾维政. PD98059对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1182-1184
- 26 Marra F, Delogu W, Petrai I, Pastacaldi S, Bonacchi A, Efsen E, Aleffi S, Bertolani C, Pinzani M, Gentilini P. Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G18-G26
- 27 Wang ZQ, Wu DC, Huang FP, Yang GY. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2004; 996: 55-66
- 28 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
- 29 Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazzi M, Mann J, Mann DA. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 24414-24421
- 30 Poulos JE, Weber JD, Bellezzo JM, Di Bisceglie AM, Britton RS, Bacon BR, Baldassare JJ. Fibronectin and cytokines increase JNK, ERK, AP-1 activity, and transin gene expression in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1997; 273: G804-G811
- 31 蒋树林,姚希贤,吕涛. 丹参抑制大鼠肝纤维化线粒体脂质过氧化. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1253-1256
- 32 Yao XX, Jiang SL, Tang YW, Yao DM, Yao X. Efficacy of Chinese medicine Yi-gan-kang granule in prophylaxis and treatment of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2583-2590
- 33 Yao XX, Cui DL, Sun YF, Feng LY, Sun ZM, Song M. Study on the anti-liver fibrosis effect of benefit liver granule and its mechanism in rats. *Chin J Integr Med* 2002; 8: 118-122
- 34 赵霞,姚希贤,张亚平,郑文明. 益肝康等活血化瘀中药抑制IL-1 β 刺激的HSC增殖及TIMP-1的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 173-178

电编 张敏 编辑 潘伯荣

美洛昔康对结肠癌细胞VEGF和angiopoietin-2表达的影响

陶凯雄, 张宁, 王国斌, 吴相柏

陶凯雄, 张宁, 王国斌, 吴相柏, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科中心 湖北省武汉市 430022

陶凯雄, 医学博士, 外科学副教授、副主任医师, 硕士研究生导师, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科中心副主任, 主要从事消化道恶性肿瘤的靶向诊治以及微创治疗。

国家863计划, No. 2001AA22218051

湖北省科技攻关计划, No. 2005AA304B09

通讯作者: 陶凯雄, 430022, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科中心. kaixgtao@public.wh.hb.cn

电话: 027-85726405 传真: 027-85756343

收稿日期: 2006-01-26 接受日期: 2006-03-20

Effects of meloxicam on vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 expression in colon carcinoma cell line HT-29

Kai-Xiong Tao, Ning Zhang, Guo-Bin Wang, Xiang-Bai Wu

Kai-Xiong Tao, Ning Zhang, Guo-Bin Wang, Xiang-Bai Wu, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China, No. 2001AA22218051, and the Key Science and Technology Research and Development Program of Hubei Province, No. 2005AA304B09

Correspondence to: Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. kaixgtao@public.wh.hb.cn
Received: 2006-01-26 Accepted: 2006-03-20

Abstract

AIM: To investigate the effect of meloxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin-2 (Ang-2) in colon carcinoma cell line HT-29.

METHODS: The cultured HT-29 cells were treated with different concentrations of meloxicam (100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$) for different time. The proliferation of HT-29 cells was detected by Cell Counting Kit 8 (CCK8). Cell cycle was detected by flow cytometry. The levels of VEGF and Ang-2 protein in the supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of VEGF and Ang-2 mRNA in HT-29 cells were examined

by real-time quantitative reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Meloxicam inhibited the proliferation of HT-29 cells in a concentration- and time-dependent manner ($P = 0.000 \rightarrow 0.029$; $0.000 \rightarrow 0.043$), and the proliferating activity was decreased with the increase of concentration and prolonging of action time. Meloxicam changed the cycles of HT-29 cells in a concentration-dependent manner, and the number of cells at G_0/G_1 phase was significantly increased ($P = 0.000 \rightarrow 0.015$). The levels of VEGF and Ang-2 protein in supernatants were reduced gradually with the increase of concentration or action time ($P = 0.000 \rightarrow 0.018$; $0.000 \rightarrow 0.028$). The expression of COX-2, VEGF and Ang-2 mRNA were also reduced with the increase of Meloxicam concentration ($P = 0.000 \rightarrow 0.025$).

CONCLUSION: Meloxicam can reduce the expression of VEGF and Ang-2 at the levels of protein and mRNA in colon carcinoma cell line.

Key Words: Meloxicam; Colon carcinoma cell line; Vascular endothelial growth factor; Angiopoietin-2

Tao KX, Zhang N, Wang GB, Wu XB. Effects of meloxicam on vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 expression in colon carcinoma cell line HT-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1277-1282

摘要

目的: 研究COX-2选择性抑制剂美洛昔康(meloxicam)对结肠癌细胞HT-29生长及血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素-2(angiopoietin-2, Ang-2)表达的影响。

方法: 分别用100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$ 美洛昔康对细胞进行干预后, 采用CCK-8活细胞计数法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期, ELISA测定细胞培养上清液中VEGF, Ang-2的蛋白含量, 实时荧光定量PCR检测细胞COX-2, VEGF, Ang-2 mRNA含量。

结果: 美洛昔康作用不同时间后, 对HT-29细胞具有细胞毒作用, 细胞增殖活性随浓度增

■背景资料

大肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率呈逐年增高的趋势, COX-2被认为与大肠癌的早期发病及发生、发展, 包括肿瘤血管生成有密切关系。随着对大肠癌发病机制从细胞、分子水平上的进一步认识, 一些针对肿瘤的靶点药物不断出现, COX-2选择性抑制剂即为其中之一。VEGF和Ang-2可以特异性作用于血管内皮细胞, 目前对于COX-2和VEGF关系的研究相对较多, 而与Ang-2关系研究相对较少。

■研究前沿

目前在对大肠癌的研究中,分子靶向治疗已成为人们关注的热点。大致可分为:以肿瘤区域新生血管为靶向的治疗,以肿瘤细胞为靶向的治疗,信号传导抑制剂(COX-2选择性抑制剂属于其中之一)及其他如以RAS蛋白、Raf激酶、基质金属蛋白酶、p53等为靶点的靶向治疗。

加、时间延长逐渐降低(P 值: $0.000 \rightarrow 0.029$; $0.000 \rightarrow 0.043$),呈现量-效、时-效关系。并且美洛昔康呈浓度依赖性改变细胞周期分布, G_0/G_1 期细胞比例增加(P 值: $0.000 \rightarrow 0.015$)。上清液中VEGF和Ang-2蛋白含量明显降低,存在时间和浓度依赖性(P 值: $0.000 \rightarrow 0.018$; $0.000 \rightarrow 0.028$)。细胞COX-2, VEGF和Ang-2 mRNA表达亦明显降低(P 值: $0.000 \rightarrow 0.025$),也存在浓度依赖性。

结论: 美洛昔康能够在蛋白、核酸水平上抑制结肠癌细胞分泌VEGF和Ang-2,从而抑制肿瘤血管生成。

关键词: 美洛昔康; 结肠癌; 环氧合酶2; 血管内皮生长因子; 血管生成素-2

陶凯雄, 张宁, 王国斌, 吴相柏. 美洛昔康对结肠癌细胞VEGF和angiopoietin-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1277-1282

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1277.asp>

0 引言

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)与多种肿瘤的发生、发展密切相关,研究发现COX-2抑制剂可抑制肿瘤血管生成及肿瘤的生长,但其机制尚不完全清楚。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及血管生成素2(angiopoietin-2, Ang-2)可特异性作用于血管内皮细胞,在血管生成及维持血管平衡中起重要作用。我们在细胞水平检测COX-2选择性抑制剂美洛昔康(meloxicam)对结肠癌细胞VEGF和Ang-2表达的影响,以探讨其抗肿瘤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞系HT-29由本院普外实验室保存。美洛昔康由中南民族大学梅之南博士惠赠,二甲基亚砷(DMSO)助溶,终末浓度 ≤ 10 g/L; DMEM、DMEM+F₁₂培养基、小牛血清、DMSO及胰酶购自GIBCO公司。活细胞计数试剂盒CCK-8(Cell Counting Kit-8)购自Kumamoto Techno Research Park公司。人VEGF及Ang-2 ELISA试剂盒为R&D公司产品。Trizol试剂盒、Taq酶、dNTPs购自Promega公司,引物及荧光探针由PRIMER5.0软件设计、上海Invitrogen公司合成。COX-2上游引物5'-GAGGTGTATGTATGAGTGTG G-3',下游引物5'-CCCTTGAAGTGGGTAA GTATG-3',相应Taq MAN探针序列5'-FAM-

TATTTCTGAAACCCACTCCAAACAC-TAMRA-3'; VEGF上游引物5'-TTCTGGGCTG TTCTCGCTTCG-3',下游引物5'-CCCCTCTCC TCTTCCTTCTCT-3',相应Taq MAN探针序列5'-FAM-GCTGTTCTCGCTTCGGAGGAGCC-TAMRA-3'; Ang-2上游引物5'-CAGATTGTTT TCTTTACTTC-3',下游引物5'-CTGATATTG CTTCTTTCCTA-3',相应Taq MAN探针序列5'-FAM-CTTGCCGCAGCCTATAACAACCTT-TAMRA-3'; β -actin上游引物5'-ACCACAGCTG AGAGGGAA-3',下游引物5'-GCTCGAAGTCT AGGGCAA-3',相应Taq MAN探针序列5'-FAM-CGTGACATTAAAGAGAAGCTGTGCT-TAMRA-3'。

1.2 方法 结肠癌细胞株HT-29,用含10 mL/L小牛血清的DMEM培养基,置37℃ 5 mL/L CO₂孵育箱中常规培养。常规消化处于对数生长期的贴壁细胞,进行细胞增殖活性测定时,以 1.0×10^4 个/孔的细胞密度接种到96孔培养板中;进行细胞周期检测、药物干预后细胞VEGF和Ang-2蛋白含量检测及细胞COX-2, VEGF, Ang-2 mRNA表达检测时,以 4.0×10^5 个/孔的细胞密度接种于6孔板;细胞贴壁后换用含不同终浓度美洛昔康的DMEM+F₁₂培养液继续培养。设置空白孔,无细胞为阴性对照,无药物作用的细胞为阳性对照。将HT-29细胞分为对照组(培养液+细胞)和实验组(培养液+细胞+不同终浓度美洛昔康),实验组中美洛昔康终浓度为100, 200, 400, 800 μ mol/L,培养24, 48及72 h。

1.2.1 HT-29细胞增殖活性的检测 用CCK-8试剂检测细胞增殖活性,每孔加入CCK-8 10 μ L,孵育4 h后,以空白孔调零,全自动酶标仪于450 nm处测定吸光度 A 值,参比波长为650 nm。抑制率(%) = $(1 - \text{实验组平均}A\text{值} / \text{对照组平均}A\text{值}) \times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期 实验组与对照组经药物作用48 h后,收集制成 1.0×10^8 个细胞/L的单细胞悬液,4℃预冷的700 mL/L乙醇固定,PI染色,上流式细胞仪进行细胞周期分析。

1.2.3 HT-29细胞VEGF和Ang-2蛋白表达检测 实验组经药物作用不同时间后,收集培养上清液,按ELISA试剂盒说明书进行操作。以空白孔调零,全自动酶标仪于450 nm处测定吸光度 A 值。

1.2.4 HT-29细胞COX-2, VEGF, Ang-2 mRNA表达检测 实验组与对照组经药物作用48 h后,分别从各孔获取 1.0×10^5 个细胞,抽提总RNA,反

表 1 美洛西康作用后HT-29细胞增殖活性和周期 (mean ± SD)

分组	细胞增殖活性 ₄₅₀			细胞周期 (%)		
	24 h	48 h	72 h	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	1.79 ± 0.13	1.94 ± 0.13	2.21 ± 0.20	54.5 ± 0.7	16.0 ± 0.5	29.5 ± 0.4
100 μmol/L	1.78 ± 0.07	1.40 ± 0.37 ^{ae}	0.98 ± 0.10 ^{ae}	75.4 ± 1.4 ^a	11.1 ± 1.0	13.5 ± 0.7
200 μmol/L	1.56 ± 0.40	1.24 ± 0.22 ^a	0.78 ± 0.09 ^{abef}	76.7 ± 0.8 ^a	9.5 ± 0.8	13.8 ± 1.0
400 μmol/L	1.32 ± 0.37 ^{ab}	0.82 ± 0.22 ^{abce}	0.47 ± 0.11 ^{abce}	81.0 ± 1.6 ^{abc}	7.2 ± 1.3	11.9 ± 0.4
800 μmol/L	0.94 ± 0.14 ^{abc}	0.67 ± 0.07 ^{abce}	0.25 ± 0.03 ^{abcdef}	83.8 ± 1.3 ^{abcd}	9.4 ± 1.2	6.6 ± 0.6

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^b*P*<0.05 vs 100 μmol/L; ^c*P*<0.05 vs 200 μmol/L; ^d*P*<0.05 vs 400 μmol/L; ^e*P*<0.05 vs 24 h; ^f*P*<0.05 vs 48 h.

表 2 美洛西康作用后HT-29细胞VEGF和Ang-2蛋白含量 (ng/L, mean ± SD)

分组	VEGF			Ang-2		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1730 ± 40	1933 ± 40	1981 ± 18	2210 ± 130	2467 ± 137	2646 ± 93
100 μmol/L	1660 ± 10	1038 ± 61 ^{ae}	541 ± 9 ^{ae}	2187 ± 65	1585 ± 43 ^{ae}	793 ± 20 ^{ae}
200 μmol/L	1597 ± 26 ^a	893 ± 9 ^{abe}	509 ± 10 ^{abef}	2123 ± 45	1203 ± 92 ^{abe}	749 ± 30 ^{abef}
400 μmol/L	1502 ± 26 ^{abc}	742 ± 9 ^{abce}	350 ± 14 ^{abcdf}	1950 ± 46 ^{abc}	1024 ± 35 ^{abce}	531 ± 20 ^{abcef}
800 μmol/L	1147 ± 74 ^{abcd}	567 ± 10 ^{abcde}	266 ± 12 ^{abcdf}	1834 ± 94 ^{abc}	814 ± 20 ^{abcde}	423 ± 18 ^{abcdf}

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^b*P*<0.05 vs 100 μmol/L; ^c*P*<0.05 vs 200 μmol/L; ^d*P*<0.05 vs 400 μmol/L; ^e*P*<0.05 vs 24 h; ^f*P*<0.05 vs 48 h.

应用要点

本研究采用COX-2选择性抑制剂美洛昔康, 观察其作用于结肠癌细胞HT-29后, 对细胞VEGF及Ang-2表达的影响, 探讨其抑制肿瘤血管形成的作用机制. 为临床上合理、安全、有效的应用COX-2选择性抑制剂来预防和治疗肿瘤提供一定的依据.

转录后, 分别同时对COX-2, VEGF, Ang-2及内参照β-actin进行实时荧光定量PCR扩增, 退火过程中搜集荧光信号, 每次扩增的同时设置无cDNA的阴性对照. 扩增结果采用FTC-2000型实时荧光定量PCR仪自带分析软件分析Ct(Cycle threshold)值, 并计算相应ΔΔCt值.

统计学处理 数据用mean ± SD表示, 应用SPSS 11.0统计分析软件, 进行One-way ANOVA方差分析, LSD法及S-N-K检验, 检验水准α = 0.05.

2 结果

2.1 HT-29细胞增殖活性 细胞经药物作用后, 增殖活性降低. 同时相48, 72 h组中, 各实验组细胞增殖活性与对照组比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05); 且当药物作用72 h后, 随浓度升高, 各浓度间进行比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05). 此外在同浓度为100或800 μmol/L时, 各时间相进行比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05, 表1).

2.2 HT-29细胞周期 流式细胞仪检测显示, 药物作用48 h后, 呈浓度依赖性改变细胞周期的分布, G₀/G₁期细胞比例增加(*P*<0.05), S期和G₂/M期细胞比例降低(表1).

2.3 HT-29细胞VEGF和Ang-2蛋白表达 同时相

48, 72 h组中, VEGF和Ang-2蛋白表达含量随药物作用浓度升高而降低. 各浓度组与对照组比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05), 各浓度间进行比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05). 同浓度各时间相组比较, VEGF和Ang-2蛋白含量随作用时间延长, 表达降低, 差异有显著性意义(*P*<0.05, 表2).

2.4 HT-29细胞COX-2, VEGF和Ang-2 mRNA的表达 COX-2, VEGF和Ang-2 mRNA表达随药物作用浓度升高而降低. 各浓度组与对照组比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05); 各浓度间进行比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05, 表3).

3 讨论

肿瘤血管生成(tumor angiogenesis, TA)是指肿瘤细胞诱导的毛细血管生长及肿瘤血液循环建立的过程, 是实体肿瘤生长、侵袭、扩散转移的关键, 受多种促血管生成因子及抑制因子的作用, 并有多种酶、细胞黏附分子的参与. 其中VEGF和Angs可特异性作用于血管内皮细胞. VEGF作为诱导血管生成的重要因子, 主要通过两种酪氨酸激酶受体VEGFR-1和VEGFR-2高度特异性结合, 使受体自身磷酸化而激活细胞内信号传导通路, 实现生物学效应, 如诱导内皮细胞增殖、迁移, 调节内皮细胞整合素、组织

表 3 美洛西康作用于HT-29细胞VEGF和Ang-2 mRNA含量 ($\Delta \Delta$ Ct值, mean $\pm$ SD)

分组	COX-2	VEGF	Ang-2
对照组	-0.784 $\pm$ 0.285	-5.168 $\pm$ 0.213	-6.90 $\pm$ 0.088
100 μ mol/L	-2.099 $\pm$ 0.446 ^a	-9.226 $\pm$ 0.541 ^a	-14.779 $\pm$ 0.456 ^a
200 μ mol/L	-2.710 $\pm$ 0.138 ^{ab}	-12.285 $\pm$ 0.278 ^{ab}	-17.417 $\pm$ 0.249 ^{ab}
400 μ mol/L	-3.840 $\pm$ 0.324 ^{abc}	-15.530 $\pm$ 0.236 ^{abc}	-20.058 $\pm$ 0.360 ^{abc}
800 μ mol/L	-6.214 $\pm$ 0.479 ^{abcd}	-22.708 $\pm$ 0.267 ^{abcd}	-21.135 $\pm$ 0.165 ^{abcd}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$ vs 100 μ mol/L; ^c $P < 0.05$ vs 200 μ mol/L; ^d $P < 0.05$ vs 400 μ mol/L.

型纤维蛋白溶酶原激活因子、尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活因子、纤溶酶原激活抑制因子以及间质胶原酶在内的多种蛋白酶激活因子的表达,促进胞外基质降解,增加微血管通透性,加速血浆蛋白外渗,最终导致新的基质及新生血管腔形成^[1-3]. Angs家族有Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4四位成员,所起作用各自不同,其受体Tie-1, Tie-2的功能也有差异. Ang-1通过激活受体酪氨酸激酶Tie-2发挥如下功能: (1)抑制内皮细胞凋亡,促进内皮细胞生长; (2)促进内皮细胞出芽,迁移,化学趋化^[4]; (3)稳定血管防止渗漏等作用^[5-6]. Ang-2不能使Tie-2受体激活,其功能主要通过竞争性抑制Ang-1与Tie-2结合,从而抑制管壁周围细胞聚集,使血管壁的可塑性增加,并在VEGF的共同作用下,通过促进PAF等炎症因子的产生及下调细胞黏附分子PECAM-1和VE-Adherin的表达^[7],从而形成不稳定渗漏性血管. 研究还发现在肿瘤发展的不同阶段, VEGF和Ang-2的浓度处于动态平衡^[8-10],并存在协同作用,表现为在肿瘤组织血管消退早期,通过Ang-2的上调表达,拮抗Ang-1维持内皮细胞稳定性的作用,导致内皮细胞凋亡而出现肿瘤血管破坏,肿瘤细胞因缺血、缺氧而坏死;在缺氧环境下,肿瘤细胞分泌更多的VEGF和Ang-2,并使Ang-2在VEGF存在的协同下,促进坏死肿瘤周围新生血管形成.

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是催化花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandin, PG)的限速酶,有两种异构酶, COX-1和COX-2. COX-2为诱导性酶,可被多种血管内外激活物,如细胞因子、生长因子、肿瘤促进剂等诱导产生^[11],在炎症、组织损伤、肿瘤发生、发展过程中表达增加^[12]. 由于PG参与体内的许多生理和病理过程,高水平的PG对多种癌细胞的增殖、侵袭及转移具有促进作用,因此环氧合酶被认为在结直肠癌肿瘤的早期发病及进展中发挥重要作用^[13-14].

近年的研究表明, COX-2可以促进结肠癌细胞诱导血管生长因子, Tomozawa *et al*^[15]研究发现COX-2在结肠肿瘤诱导新生血管和远端转移的过程中发挥重要作用,这种作用可被COX-2特异性抑制剂所抑制; Tsujii *et al*^[16]应用内皮细胞和结肠癌细胞体外共培养的方法发现, COX-2过表达细胞产生PGs,并可刺激血管内皮细胞迁移和体外血管生成; Williams *et al*^[17]则发现,缺乏COX-2表达的小鼠也缺乏VEGF的表达,会减少肿瘤血管形成和减缓肿瘤生长, COX-2抑制剂可通过减少肿瘤细胞VEGF的产生来防止VEGF诱导的内皮细胞MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)途径的活化.

COX-2不仅在肿瘤细胞内,而且在肿瘤组织中的新生血管内皮细胞强烈表达,对大量临床肿瘤标本的研究发现, COX-2与肿瘤血管生成密切相关,在结肠癌^[18]、胃癌^[19]、胰腺癌^[20]、食管癌^[21]、肝癌^[22]、肺癌^[23]、膀胱癌^[24]、乳腺癌^[25]、卵巢癌^[26]和头颈部恶性肿瘤^[27]等均存在与COX-2表达相关的VEGF高表达和/或肿瘤微血管密度(MVD)的增加及不良预后;运用COX-2选择性抑制剂可显著抑制肿瘤组织的血管生成. 在肿瘤血管形成的过程中, COX-2首先诱导肿瘤细胞,单核巨噬细胞等产生以VEGF为主的促血管生成因子,促进肿瘤血管生成^[28];其次,肿瘤组织产生的PGE₂、PGF₂及TXA₂等直接或间接促进血管生成,加之PGE₂可以增加血管通透性及已形成血管的血流量,可进一步促进血管生成;此外, Leung *et al*^[29]认为花生四烯酸有诱导细胞凋亡的作用,通过抑制磷脂酶A₂的活性,减少花生四烯酸的生成可抑制凋亡^[30],而内皮细胞内表达的COX-2也可通过抑制花生四烯酸的积聚,从而抑制内皮细胞的凋亡,促进血管生成;另外,肿瘤细胞迅速生长,使肿瘤处于相对缺氧的状态,缺氧诱导COX-2的产生,进而诱导肿瘤细胞表达VEGF,促进肿瘤血管新生,从而缓解肿瘤细胞

的缺氧状态以维持肿瘤生长。COX-2与血管生成因子之间的相互调节机制必然会影响到肿瘤血管生成的病理过程。

我们发现选择性COX-2抑制剂美洛昔康作用于HT-29细胞后, 细胞增殖活性随作用浓度增加、作用时间延长逐渐降低。但只在作用时间达48及72 h时, 各实验组细胞增殖活性与对照组比较, 差异才均有显著性意义($P<0.05$); 在药物作用72 h后, 存在浓度依赖性; 且在低浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 和高浓度800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 存在时间依赖性。提示本实验所用浓度的美洛昔康可对HT-29细胞产生细胞毒性作用, 但仅在一定程度上表现出量-效、时-效关系, 这可能与不同的COX-2抑制剂对COX-2的结合力不同、不同肿瘤细胞体外培养生长具有相对特异性有关。不同浓度美洛昔康作用于HT-29细胞48 h后, 呈浓度依赖性改变细胞周期的分布, G_0/G_1 期细胞比例增加, S期和 G_2/M 期细胞比例降低, 将细胞阻滞在 G_0/G_1 期。不同浓度美洛昔康作用不同时间后, 细胞培养上清液中VEGF和Ang-2蛋白含量表达明显降低, 具有较好的时间依赖性和浓度依赖性。随美洛昔康作用浓度升高, 细胞COX-2、VEGF和Ang-2 mRNA表达明显降低, 亦存在浓度依赖性。提示: 美洛昔康作为一种选择性COX-2抑制剂, 可通过COX-2依赖途径在蛋白、核酸水平上抑制结肠癌细胞分泌VEGF和Ang-2, 从而抑制肿瘤血管生成。

NSAIDs是一类以抑制COX而抑制前列腺素(PG)合成为共同作用基础的不同药物的总称。近20 a来的研究表明: 其具有明确的抑制胃肠道肿瘤形成和生长的作用, 可通过下调肿瘤相关血管因子的表达, 减少COX-2产物 PGE_2 的合成、降低成纤维细胞的有丝分裂, 从而实现抑制肿瘤内血管形成的作用^[31]。选择性COX-2抑制剂在抑制肿瘤重要相关酶COX-2的同时, 对正常表达的COX-1没有影响, 避免了因保护性PG产生减少, 胃肠道黏膜破坏和出血情况的发生。随着COX-2抑制剂抗肿瘤作用机制的进一步研究, 及NSAIDs相关衍生物的开发, 其临床应用将具有更好的合理性、有效性和安全性。

4 参考文献

- 1 McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003; 198: 863-868
- 2 Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; 272: 7151-7158
- 3 Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; 16: 3898-3911
- 4 Saito M, Hamasaki M, Shibuya M. Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF. *Cancer Sci* 2003; 94: 782-790
- 5 Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511-2514
- 6 Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000; 6: 460-463
- 7 Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Reinmuth N, Bucana CD, Ellis LM. Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis. *Cancer* 2001; 92: 1138-1143
- 8 Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-1998
- 9 Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-5362
- 10 Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11205-11210
- 11 Smith TJ. Cyclooxygenases as the principal targets for the actions of NSAIDs. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; 24: 501-523
- 12 Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 63-75
- 13 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803-809
- 14 Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002; 62: 506-511
- 15 Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 324-328
- 16 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716
- 17 Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1589-1594
- 18 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O,

- Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 1339-1347
- 19 Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 28-33
- 20 Aoki T, Nagakawa Y, Tsuchida A, Kasuya K, Kitamura K, Inoue K, Ozawa T, Koyanagi Y, Itoi T. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in pancreatic tumors. *Oncol Rep* 2002; 9: 761-765
- 21 Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2003; 442: 129-135
- 22 Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1325-1332
- 23 Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, Pairolero P, Trastek V, Jett J, Caporaso NE, Liotta LA, Harris CC. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4739-4744
- 24 Mohammed SI, Craig BA, Mutsaers AJ, Glickman NW, Snyder PW, deGortari AE, Schlittler DL, Coffman KT, Bonney PL, Knapp DW. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, in combination with chemotherapy on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 183-188
- 25 Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2651-2656
- 26 Fujiwaki R, Iida K, Kanasaki H, Ozaki T, Hata K, Miyazaki K. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Hum Pathol* 2002; 33: 213-219
- 27 Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2002; 33: 708-714
- 28 Bamba H, Ota S, Kato A, Kawamoto C, Fujiwara K. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 485-491
- 29 Leung WK, To KF, Ng YP, Lee TL, Lau JY, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 2001; 84: 335-339
- 30 Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1876-1881
- 31 Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 411-417

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿.

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名; 邮编: 210002; 电话: 025-52926620.

中药肠炎清治疗小鼠葡聚糖硫酸钠所致结肠炎的机制

吕永慧, 胡品津, 陈文红, 毕向军, 庞瑞萍

吕永慧, 广州市中医医院消化内科 广东省广州市 510130
胡品津, 陈文红, 毕向军, 庞瑞萍, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州 510080
通讯作者: 吕永慧, 510130, 广东省广州市, 珠玑路16号广州市中医医院消化内科. zdjlyh@126.com
电话: 020-81886504-1401
收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-28

Therapeutic mechanism of *Changyanqing* in treatment of colitis induced by dextran sulfate sodium

Yong-Hui Lü, Pin-Jin Hu, Wen-Hong Chen, Xiang-Jun Bi, Rui-Ping Pang

Yong-Hui Lü, Department of Gastroenterology, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China
Pin-Jin Hu, Wen-Hong Chen, Xiang-Jun Bi, Ruiping Pang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Correspondence to: Yong-Hui Lü, Department of Gastroenterology, Hospital of Traditional Chinese Medicine, 16 Zhuji Street, Guangzhou 510130, Guangdong Province, China. zdjlyh@126.com
Received: 2006-04-06 Accepted: 2006-04-28

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects of *Changyanqing* on dextran sulfate sodium(DSS)-induced colitis and its mechanism.

METHODS: DSS was used to establish the model of experimental colitis in 40 mice. Then the mice were averagely randomized into 4 groups (A, B, C, and D). The mice in group A, B, and C were treated with *Changyanqing*, salicylazosulfapyridine (SASP), and *Changyanqing* + SASP, respectively, and those in group D served as controls. *Changyanqing* was administrated by gastric irrigation at a dose of 0.2 mL/(20g•d) for 7 d. The disease activity index (DAI) and the activity of intestinal myeloperoxidase (MPO) were observed. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 mRNA were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: In comparison with those in the controls, the DAI (1.413 ± 0.835 vs 2.167 ± 0.911 , $P < 0.05$), and activity of MPO (72.4 ± 0.590 nkat/g vs 117.0 ± 0.902 nkat/g, $P < 0.05$), and the expression of TNF- α (0.841 ± 0.190 vs 1.320 ± 0.282 , $P < 0.05$), IL-1 β (0.641 ± 0.095 vs 0.920 ± 0.082 , $P < 0.05$), and IL-6 (1.241 ± 0.247 vs 1.620 ± 0.312 , $P < 0.05$) mRNA were significantly decreased in group A. The above decreases were more significant in group C (DAI: 0.608 ± 0.449 ; MPO: 27.3 ± 0.211 ; TNF- α : 0.339 ± 0.081 ; IL-1 β : 0.239 ± 0.073 ; IL-6: 0.639 ± 0.141) ($P < 0.01$). There was marked difference between group A and B ($P > 0.05$).

CONCLUSION: *Changyanqing* is effective in the treatment of DSS-induced colitis, which may be associated with the decrease of DAI, MPO activity, and TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression.

Key Words: Ulcerative colitis; Dextran sulfate sodium; *Changyanqing*; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β ; Interleukin-6

Lü YH, Hu PJ, Chen WH, Bi XJ, Pang RP. Therapeutic mechanism of *Changyanqing* in treatment of colitis induced by dextran sulfate sodium. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1283-1287

摘要

目的: 探讨肠炎清的疗效及其机制。

方法: 以葡聚糖硫酸钠(DSS)饮水法复制小鼠实验性结肠炎40只, 随机平均分为4组: 肠炎清中药组、柳氮磺胺吡啶(SASP)西药组、肠炎清和SASP中西药结合组和模型组。观察肠炎清(灌胃剂量为0.2 mL/(20g•d)、1次/d、疗程7 d)对疾病活动指数(DAI)和肠组织髓过氧化物酶(MPO)活性及TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA表达的影响。

结果: 与模型组相比, 肠炎清可降低DAI (1.413 ± 0.835 vs 2.167 ± 0.911 , $P < 0.05$)和MPO活性(72.4 ± 0.590 nkat/g vs 117.0 ± 0.902 nkat/g, $P < 0.05$), 并降低肠组织TNF- α (0.841 ± 0.190 vs 1.320 ± 0.282 , $P < 0.05$)、IL-1 β

同行评价

本文应用分子生物学技术手段, 探讨了中药肠炎清治疗结肠炎的机制, 对了解中成药的治疗作用是个很好的研究方向。课题设计合理, 方法先进, 统计资料详实, 结果有说服力。

(0.641 ± 0.095 vs 0.920 ± 0.082 , $P < 0.05$)和 IL-6 mRNA (1.241 ± 0.247 vs 1.620 ± 0.312 , $P < 0.05$)的表达, 中西医结合组以上指标下降更为明显(DAI: 0.608 ± 0.449 ; MPO: 27.3 ± 0.211 ; TNF- α : 0.339 ± 0.081 ; IL-1 β : 0.239 ± 0.073 ; IL-6: 0.639 ± 0.141)($P < 0.01$). 肠炎清与柳氮磺胺吡啶(SASP)的作用相当($P > 0.05$).

结论: 肠炎清可治疗DSS结肠炎, 其降低肠组织TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA的表达可能是其疗效机制之一.

关键词: 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 肠炎清; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

吕永慧, 胡品津, 陈文红, 毕向军, 庞瑞萍. 中药肠炎清治疗小鼠葡聚糖硫酸钠所致结肠炎的机制. 世界华人消化杂志 2006; 14(13): 1283-1287

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1283.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克隆恩病(Crohn's disease, CD). 其中UC的发病率近年来有明显增加的趋势. 本病治愈难度大, 且愈后又常易复发, 已被世界卫生组织列为现代难治病之一. 我们先前的研究发现, 中药制剂肠炎清口服并灌肠治疗UC的疗效优于柳氮磺胺吡啶(SASP)^[1]. 为探讨该药的作用机制, 以期为临床使用提供理论依据, 我们观察了肠炎清对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)所致结肠炎的疗效以及对肠组织TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♀BALB/c小鼠40只, 8-10周龄, 体质量18-22 g, 由中山大学中山医学院实验动物中心提供. 肠炎清制剂由黄连、黄芪、蒲黄、白及、元胡按2:5:3:4:3比例制成, 每mL含3.375 g生药. 灌胃剂量为33.75 g生药/(kg·d), 即0.2 mL/(20g·d), 相当于成人剂量的2倍. 由广州市中医院药房按标准制造工艺加工提供. SASP片为上海三维制药有限公司产品, 批号: 200106c07, SASP碾磨成粉, 配成浓度为50 g/L的混悬液, 灌胃剂量为0.5 g/(kg·d), 即0.2 mL/(20g·d), 相当于成人剂量的2倍. DSS(M_r 36 000-50 000)为ICN Biomedicals Inc.产品. Taq DNA聚合酶、AMV逆

表 1 结肠炎DAI的计算方法

评分	体质量↓(%)	大便	出血
0	(-)	正常	阴性
1	1-5		(+)
2	5-10	松软	(++)
3	11-15		(+++)
4	>15	腹泻	肉眼血便

DAI = 体质量、大便性状及出血3项评分之和/3.

转录酶、提取组织总RNA试剂盒为宝生物工程公司产品; TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和 β -actin引物由宝生物工程有限公司合成. DSS结肠炎模型参照Okayasu *et al*^[2]的方法稍加改良. 以30 g/L DSS代替饮用水给予小鼠饮用, 连续7 d.

1.2 方法 将40只小鼠随机分为4组. 中药组($n = 10$)、西药组($n = 10$)、中西药结合组($n = 10$)和模型组($n = 10$), 均给予30 g/L DSS 7 d, 并于4 d起分别灌胃给予肠炎清、SASP、肠炎清(中药组的半量)+SASP(西药组的半量)和等容的生理盐水, 连续7 d. 观察体质量变化、大便性状及潜血试验以计算疾病活动指数(disease activity index, DAI). 在11 d处死动物, 取下1/2段结肠, 部分置固定液中固定以作病理检查, 部分置液氮保存备用. 据Murthy *et al*^[3]方法稍加改良, 计算DAI(表1). IL-1 β 引物: 5'-CCA GGA TGA GGA CCC AAG CA-3', 3'-CC TTT GTC GTT ACC AGC CCT-5', 扩增片段长度为519 bp; TNF- α 引物: 5'-CGA GTG ACA AGC CCG TAG CC-3', 3'-CC GCT GAC CGC ACA AGT AGG-5', 扩增片段长度为468 bp; IL-6引物: 5'-CTT CCA GCC AGT TGC CTT CT-3', 3'-GG GGT TGA AGG TTA CGA GAG-5'扩增片段长度为496 bp; β -actin引物: 5'-ACC ACA GTC CAT GAA ATC AC-3', 5'-AGG TTT CTC CAG GCG GCA TG-3', 扩增片段长度为315 bp. 取结肠组织100 mg按试剂盒步骤提取组织总RNA, 经紫外分光光度计测量 A_{260}/A_{230} 比值, 计算提取液中RNA含量, 每例各取2.0 μ g 总RNA, 于65℃变性5 min, 依次加入0.5 mmol/L dNTP, 5×RT Buffer, Random Primer 100 ng, 反转录酶10 U, 反应体系为20 μ L, 42℃ 40 min, 95℃ 5 min, 将所得TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和 β -actin cDNA于-20℃保存备用. PCR反应体系: 取cDNA产物5 μ g, 10×PCR Buffer, Taq DNA聚合酶1 U, 反应体系为25 μ L. TNF- α 扩增条件为: 94℃ 2 min, 94℃ 45 s, 50℃

表 2 中药肠炎清对小鼠DSS结肠炎的DAI和MPO的影响 (mean $\pm$ SD, $n = 10$)

分组	DAI	MPO (nkat/g)
中药	1.413 $\pm$ 0.835 ^{ad}	72.4 $\pm$ 0.590 ^{ad}
西药	1.278 $\pm$ 0.648 ^{bc}	62.5 $\pm$ 0.408 ^{bc}
中西药结合	0.608 $\pm$ 0.449 ^b	27.3 $\pm$ 0.211 ^b
模型	2.167 $\pm$ 0.911	117.0 $\pm$ 0.902

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 中西药结合组。

45 s, 72°C 45 s, 循环35次, 72°C 10 min. 取PCR扩增产物10 μ L, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察鉴定扩增产物的片段长度, 并拍照, 用ZL-2000医学图像处理系统对电泳谱带进行灰度及面积扫描, 将同一标本的TNF- α mRNA电泳谱带的积分灰度值与 β -actin mRNA的灰度值的比值作为该标本的TNF- α mRNA的半定量结果. IL-1 β 和IL-6的结果判断与此相同。

统计学处理 结果用mean $\pm$ SD表示, 多组间比较用方差分析和 q 检验, 用SPSS10.0统计软件包进行分析。

2 结果

给予30 g/L DSS 7 d后模型组的所有动物均可观察到大便松软或腹泻、血便及体质量减轻, 而3个治疗组的大便较成形、血便及体质量减轻较不明显(表2). 各组的疾病活动指数, 中药组和西药组较模型组明显降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 但又高于中西药结合组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 中药组和西药组之间无明显差别($P > 0.05$).

2.1 结肠组织MPO活性 中药组和西药组较模型组明显降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 但又高于中西药结合组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 中药组和西药组之间无明显差别($P > 0.05$, 表2).

2.2 结肠组织TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA表达 中药组和西药组的表达较模型组明显降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 但又高于中西药结合组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 中药组和西药组之间无明显差别($P > 0.05$, 表3, 图1).

3 讨论

治疗UC的传统药物主要有水杨酸类药物、皮质类固醇和免疫抑制剂. 但这些药物由于副作用多而使不少患者不能耐受. 新药5-氨基水杨酸虽疗效好且副作用少, 但其价格又过于昂贵. 近年来国内有关中药治疗UC的报道较多, 治疗方

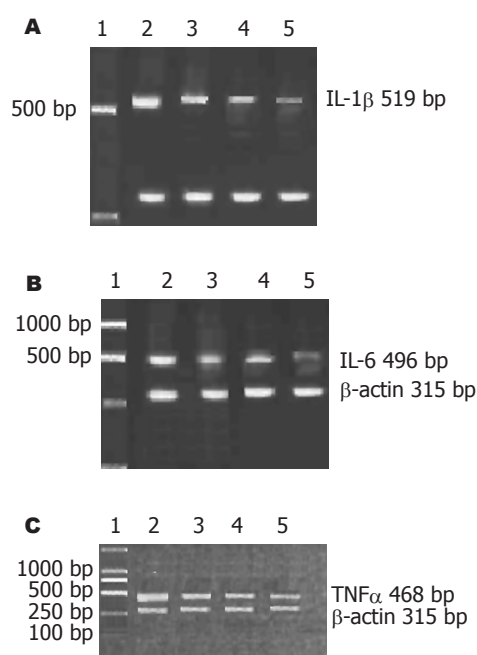


图 1 结肠组织IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA表达的变化. A: IL-1 β ; B: IL-6; C: TNF- α . 1: Marker; 2: 模型组; 3: 中药组; 4: 西药组; 5: 中西药结合组; β -actin 315 bp, 250 bp.

法多样, 疗效显著, 无明显毒副作用, 显示中药治疗本病的优越性和广阔的前景. 但任何一种药物治疗都必须有严格的动物实验, 而类似人类疾病的动物模型对验证药物疗效和研究其作用机制非常重要. 有关UC的动物模型有很多, 目前得到公认和广泛用作药物干预的是DSS模型, 其临床表现和组织学特点类似人类UC^[2-5]. 国内有关中药治疗UC的临床报道虽多, 但开展动物实验研究的不多, 目前已有个别利用DSS结肠炎模型验证药物疗效和研究药物作用机制的报道^[6]. 本研究显示, 给予30 g/L DSS 7 d后, 模型组各动物均出现不同程度的大便松软或腹泻、血便和体质量减轻, 组织学显示结肠下段糜烂或溃疡伴黏膜和黏膜下显著的炎症细胞浸润、部分有隐窝炎, 类似人类UC, 与文献[2,7]报道相符. UC与免疫调节异常密切相关, 正常胃肠道内有大量的抗原物质存在, 如致病菌、正常菌群、细菌毒素、病毒、代谢的化学物质及食物等, 这些内容物均可能是潜在的免疫原. 显然, 肠免疫系统处于一种不断地反应状态, 当机体免疫功能正常时, 则诱发保护性免疫反应, 炎症就不会发生. 肠上皮细胞黏膜屏障的破坏为大量摄取肠抗原创造了条件, 免疫调节失衡是UC的免疫学特性. Sartor认为, UC的发病机制经过一系列的步骤, 如始发事件、诱发事件、免疫调节异常、组织损伤及临床症状. 始发因素

表 3 中药肠炎清对结肠组织TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA表达的影响 (mean $\pm$ SD, $n = 10$)

分组	TNF- α	IL-1 β	IL-6
中药	0.841 $\pm$ 0.190 ^{ad}	0.641 $\pm$ 0.095 ^{ad}	1.241 $\pm$ 0.247 ^d
西药	0.698 $\pm$ 0.108 ^{bc}	0.548 $\pm$ 0.152 ^{bc}	1.098 $\pm$ 0.179 ^{bc}
中西药结合	0.339 $\pm$ 0.081 ^b	0.239 $\pm$ 0.073 ^b	0.639 $\pm$ 0.141 ^b
模型	320 $\pm$ 0.282	0.920 $\pm$ 0.082	1.620 $\pm$ 0.312

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 中西药结合组。

可以是感染、毒素、非甾体类固醇药物等,破坏了肠上皮屏障使肠组织暴露在大量的肠抗原中,在遗传易感的宿主中诱发黏膜免疫反应。故肠黏膜慢性失控的炎症是UC的特征,细胞因子在此起了重要的作用^[8-9]。近年来对于细胞因子研究尚多,细胞因子主要是指由机体免疫细胞和某些非免疫细胞合成,分泌的一类具有广泛生物活性的小分子多肽物质,作为细胞间的信号传递分子。在介导和调节免疫应答及炎症反应过程中发挥重要作用。在UC患者的结肠黏膜中可检测到大量淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、中性粒细胞的存在^[10],这些免疫细胞可释放多种细胞因子。根据细胞因子的大体作用,细胞因子常分为三类:促炎细胞因子、抗炎细胞因子,以及生长因子。促炎细胞因子包括白介素-1(IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), TNF- β , IFN等,其中多数细胞因子由单核细胞以及巨噬细胞产生,参与细胞介导的免疫反应。抗炎细胞因子包括IL-4, IL-5, IL-10, IL-13等,主要由T细胞产生,参与体液免疫反应。另一类生长因子包括了增殖刺激因子、转移生长因子(TGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子等,对不同的细胞具有生长调节和增殖作用。促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡失调被视为UC的一个重要的发病机制^[11-14]。如果抗炎与促炎因子的平衡状态被破坏,如促炎因子一方占优势则导致疾病的发生。现已证实细胞因子在局部炎症反应和免疫反应中起重要作用。IL-1、IL-6、IL-8和TNF等促炎症细胞因子是公认的能介导UC发病的细胞因子^[9],且结肠IL-8水平与黏膜组织的中性粒细胞数成正相关^[15-16]。在活动性UC的病变部位,IL-1, IL-6, TNF- α 及其他细胞因子如IL-8等均可增高^[17],且与病变活动性有关。研究发现,UC患者致炎细胞因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8明显升高^[18-22],且IL-1 β 和TNF- α 的水

平与疾病活动度及内镜分级相关;IL-1 β 是诱导IBD的肠道炎症的一种非常重要的细胞因子^[23],Stevens *et al*^[24]报道了从UC患者结肠黏膜分离的单核巨噬细胞中产生大量的IL-1 β ,在UC活动期明显升高;Breese *et al*报道在UC活动期TNF- α 的水平在血浆及粪便中升高。IL-1 β 还可通过自分泌或旁分泌刺激其他炎症递质如IL-6、IL-8和TNF- α 的产生,TNF- α 则可使中性粒细胞聚集,内皮细胞黏附分子上调以及增加上皮紧密连接的通透性和抑制上皮细胞的生长等。IL-6主要由单核巨噬细胞产生,有广泛的促炎作用,如促进B细胞活化、增生并最终分化为浆细胞,增加免疫球蛋白合成;并能促进T细胞增生、刺激毒性T细胞反应^[25]。有文献报道^[26]:UC时IL-6水平明显升高,可与TNF- α 和IL-1 α 相互作用,导致UC活动期的特征性炎症反应。我们的研究显示,模型组结肠组织出现TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA表达,经肠炎清或SASP或肠炎清加SASP治疗后,反映临床表现的DAI和组织学表现得到改善,结肠组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA表达明显降低,其中肠炎清和SASP的疗效相当,但以肠炎清加SASP的疗效为最好,说明中西药结合的疗效优于单用中药或西药,而且可以减少肠炎清和SASP的用药量,提示有可能减少药物的副作用。肠炎清中黄连清热燥湿以治其标,黄芪健脾以治其本,元胡、蒲黄行气化瘀以改善肠黏膜的微循环,白芨生肌护膜以修复肠黏膜,肠炎清的治疗可降低肠组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA的表达,结合临床^[26]及本动物实验的疗效,说明肠炎清对溃疡性结肠炎有显著的治疗作用,其机制可能与抑制结肠黏膜损伤,促进溃疡修复,增强机体清除自由基和抗氧化能力,调节紊乱的免疫功能有关。

4 参考文献

- 1 吕永慧,吴崇雅,孙丽红,付慧,陈文剑,古伟明,杨洁,

- 叶妙嫦. 肠炎清治疗溃疡性结肠炎的临床研究. 中国中西医结合杂志 1998; 6: 76-78
- 2 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98: 694-702
- 3 Murthy SN, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1722-1734
- 4 Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996; 39: 234-241
- 5 王群英, 王继德, 赖卓胜, 刘荣, 张亚力. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎小鼠模型的建立. 第一军医大学学报 2002; 22: 608
- 6 王真权, 谢力子, 王爱华. 芩柏颗粒剂干预溃疡性结肠炎大鼠可溶性白介素-2受体和IgG的实验研究中医药通报 2004; 3: 48-49
- 7 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正. BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1776-1778
- 8 Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 51: 289-298
- 9 李琪佳, 徐敏, 宫恩聪. 细胞因子与溃疡性结肠炎. 中国煤炭工业医学杂志 2001; 4: 411
- 10 Schreiber S. Experimental immunomodulatory therapy of inflammatory bowel disease. *Neth J Med* 1998; 53: S24-S31
- 11 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9
- 12 Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 51: 289-298
- 13 Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252: 475-496
- 14 Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389
- 15 Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 216-222
- 16 Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta J, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Matsuura T. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 949-959
- 17 余小华, 李刚, 杜兴邦, 高志华. 溃疡性结肠炎发病时组织及血清中IL-8水平的变化. 放射免疫学杂志 2004; 17: 274-275
- 18 Guimbaud R, Bertrand V, Chauvelot-Moachon L, Quartier G, Vidon N, Giroud JP, Couturier D, Chaussade S. Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2397-2404
- 19 Arai F, Takahashi T, Furukawa K, Matsushima K, Asakura H. Mucosal expression of interleukin-6 and interleukin-8 messenger RNA in ulcerative colitis and in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2071-2079
- 20 Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999; 34: 66-74
- 21 Holtkamp W, Stollberg T, Reis HE. Serum interleukin-6 is related to disease activity but not disease specificity in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20: 123-126
- 22 Holub MC, Mako E, Devay T, Dank M, Szalai C, Fenyvesi A, Falus A. Increased interleukin-6 levels, interleukin-6 receptor and gp130 expression in peripheral lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998; 228: 47-50
- 23 甘华田, 欧阳钦, 贾道全. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B活化与细胞因子基因表达. 中华内科杂志 2002; 41: 252-255
- 24 Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 818-826
- 25 丁伟群, 林庚金, 徐三荣, 钱立平. 溃疡性结肠炎发病中白介素水平的变化. 复旦学报 2001; 7: 330-335
- 26 王伟宁, 张熙纯, 刘丽. 活动期溃疡性结肠炎发病机制的免疫学探讨. 中国现代医学杂志 2003; 13: 74-76

电编 李琪 编辑 潘伯荣

低剂量乙肝免疫球蛋白与拉米夫定长期联用预防肝移植后HBV复发

夏念信, 傅志仁, 邱宝安, 王正昕, 李先兴, 白刚, 杨英祥, 王昆

■背景资料

目前OLT是治疗HBV相关性终末期肝病非常有效的方法。移植肝复发HBV,其感染来源可能与血循环及肝外组织中的HBV有关;移植术中及术后大剂量和长期的激素和免疫移植剂的应用,使病毒的复制能力增强,加速移植肝病毒的复发,因此在LT术前、术中和术后进行抗HBV治疗对预防HBV的复发具有关键作用。国外研究揭示LAM或HBIG的单一用药都不能有效预防OLT后HBV的复发,而大剂量HBIG静滴和LAM联用可有效预防HBV复发,但费用高、施药不便。因此探索符合我国国情、效价比高、低剂量HBIG和方便的给药途径非常必要,以提高HBV相关性终末期肝病OLT后移植体和受者的生存率。

夏念信, 邱宝安, 白刚, 杨英祥, 王昆, 海军总医院肝胆外科北京市 100037
傅志仁, 王正昕, 李先兴, 第二军医大学长征医院全军器官移植研究所上海市 200003
夏念信, 2005年第二军医大学医学硕士毕业, 主要从事肝胆胰疾病的临床治疗和研究工作。
国家自然科学基金资助项目, No. 30471643
通讯作者: 夏念信, 100037, 北京阜成路6号, 海军总医院肝胆外科. xnxdoctor@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-02-24 接受日期: 2006-03-20

Low-dose intra-muscular hepatitis B immunoglobulin combined with lamivudine for long-term prophylaxis of hepatitis B recurrence after liver transplantation

Nian-Xin Xia, Zhi-Ren Fu, Bao-An Qiu, Zheng-Xin Wang, Xian-Xing Li, Gang Bai, Ying-Xiang Yang, Kun Wang

Nian-Xin Xia, Bao-An Qiu, Gang Bai, Ying-Xiang Yang, Kun Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Zhi-Ren Fu, Zheng-Xin Wang, Xian-Xing Li, Institute of Organ Transplantation, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30471643

Correspondence to: Nian-Xin Xia, Department of Hepatobiliary Surgery, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China. xnxdoctor@yahoo.com.cn
Received: 2006-02-24 Accepted: 2006-03-20

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of long-term, low-dose intra-muscular hepatitis B immunoglobulin (HBIG) combined with lamivudine (LAM) in patients who received orthotopic liver transplants (OLT) and have been followed up for acute or chronic HBV-related end-stage liver disease.

METHODS: The liver transplantation recipients ($n = 173$) who have been followed up and received antiviral prophylaxis post-OLT were divided into 3 sub-groups according to their post-OLT antiviral therapy, which were group A (LAM monotherapy, $n = 2$), group B (HBIG and LAM therapy, $n = 168$) and group C (HBIG and

ADF therapy $n = 3$). All the patients received LAM treatment for 1 or 2 wk ahead of OLT. Either LAM (100 mg) or ADF (adefovir dipivoxil, 10 mg) was administered orally every day. HBIG were administered intravenously during the first post-operative week (total 5000 or 10 000 U according to HBV copies/L pre-operative) and intramuscularly thereafter (400 U per time, the interval can be adjusted according to HBsAb titer in the blood) to maintain an HBsAb titer > 300 U/L within 1 mo, > 200 U/L between 2-3 mo and > 100 U/L beyond 3 mo after operation. Mean follow-up period was 20.8 ± 14 mo. The periodical investigation for the liver function, the serological HBV and the analyses of liver tissues by immunohistochemistry were performed. The recurrent HB and the death suffered from it were recorded and analyzed in this research. The recurrence rates of HBV infection between UCLA and our institute were statistically analyzed.

RESULTS: Four patients experienced HBV recurrence overall. One patient in group A experienced HBV recurrence (1 week after OLT) and positive HBV DNA (2 months after OLT) associated with an increase in serum alanine aminotransferase. The treatment resistance of LAM was defined and the recipient died of the multiple organ failure 8 months after OLT. Recurrent HBV appeared in 3 patients, whose HBV DNA levels in the pre-OLT blood were more than 10^8 copies/L, in group B (12 d, 12 mo and 1.5 mo after OLT respectively). The pre- and post-operative HBeAg and HBV DNA were always positive in the first case whose blood HBsAb titer was far lower than programming effective one. The treatment resistance of HBIG was defined and the patient died of fulminant hepatitis 11 mo after OLT. The second case became an HBsAg carrier after HBV recurrence and was dead due to tumor recurrence 15 mo after OLT. The third case was fine with the treatment of HBIG combined with ADF and was negative for HBsAg after 5.5 mo. The HBV mutation might exist in both of the second and third case. None

of group C had HBV recurrence. The HBV recurrence rate under the prophylaxis of HBIg combined with LAM was 1.8% (3/168). Intra-muscular HBIg was tolerated well in all the cases. The study showed no difference between UCLA and our institute ($\chi^2 = 0.280\ 37$), and the expenditure was 3000-4000 US dollars per year.

CONCLUSION: The low-dose intra-muscular HBIg combined with LAM is efficacious in the long-term prophylaxis of hepatitis B recurrence after OLT. The total expenditure of prophylaxis is lower. ADF shows efficacy against the HBV-YMDD lamivudine-resistant mutation and may be a more efficacious agent for the prophylaxis of HBV recurrence after OLT.

Key Words: Orthotopic liver transplantation; Hepatitis B virus; Hepatitis B immunoglobulin; Lamivudine; Adefovir dipivoxil; Recurrence

Xia NX, Fu ZR, Qiu BA, Wang ZX, Li XX, Bai G, Yang YX, Wang K. Low-dose intra-muscular hepatitis B immunoglobulin combined with lamivudine for long-term prophylaxis of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1288-1293

摘要

目的: 评价长期低剂量HBIg im联用LAM预防急性慢性HBV相关性终末期肝病OLT后HBV复发的效能。

方法: 肝移植患者173例, 根据OLT后接受的抗病毒预案分成3组, LAM组($n = 2$)、HBIg+LAM组($n = 168$)和阿德福韦组(ADF, $n = 3$)。所有OLT受者术前至少接受1-2 wk LAM治疗。施药剂量, LAM 100 mg/d, 阿德福韦 10 mg/d。术中和术后1 wk内, HBIg每日静脉给予(HBV DNA $>10^8$ copies/L, 总量10 000 U; 否则总量5000 U); 此后im HBIg 400 U/次, 并根据血中HBsAb滴度调整im间隔时间。1 mo内维持HBsAb滴度 >300 U/L; 3 mo内HBsAb滴度 >200 U/L; 超过3 mo HBsAb滴度 >100 U/L。定期检测肝功能、血清HBV标志物, 必要时穿刺肝组织免疫组化检查。平均随访20.8 $\pm$ 14 mo。统计3种预案HBV复发的例数并分析原因; 与国外同期研究结果比较。

结果: 4例HBV复发。LAM组1例HBV复发, 术后1 wk HBsAg(+), 术后2 mo HBV(+), 伴ALT升高, 诊断LAM药物耐受; 术后8 mo死于多器官功能衰竭。HBIg+LAM组3例HBV复发, 分别出现在12 d, 12 mo和1.5 mo; 3例患者术前HBV-DNA $>10^8$ copies/L。第1例术后血中

HBeAg和HBV DNA持续(+), 血中HBsAb滴度远低于有效预防浓度, 诊断HBIg治疗失败, 术后11 mo死于爆发性肝炎。第2例成为乙肝携带者, 术后15 mo死于肿瘤复发。第3例HBV复发后改用HBIg+阿德福韦治疗, 术后5.5 mo HBsAg(-), 目前肝功能正常。第2和第3例可能存在HBV逃逸突变。阿德福韦组受者随访期间无HBV复发。HBIg+LAM预案, HBV相关性终末期肝病OLT后HBV复发率为1.8%(3/168); 所有患者im HBIg耐受性好。OLT后HBV复发率与国外肝移植部比较, 两者无统计学意义($\chi^2 = 0.280\ 37$), 预防费用3000-4000 \$/a。

结论: 长期低剂量HBIg im联用LAM可以有效预防HBV相关性终末期肝病OLT后的HBV复发, 费用相对低。阿德福韦治疗HBV-YMDD变异株有效, 可能是预防HBV复发的更有效因子。

关键词: 肝移植; 乙型肝炎病毒; 人乙肝免疫球蛋白; 拉米夫定; 阿德福韦; 复发

夏念信, 傅志仁, 邱宝安, 王正昕, 李先兴, 白刚, 杨英祥, 王昆. 低剂量乙肝免疫球蛋白与拉米夫定长期联用预防肝移植后HBV复发. *世界华人消化杂志* 2006;14(13):1288-1293
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1288.asp>

0 引言

原位肝移植术治疗HBV相关性终末期肝病既往存在争议。1980年代, 由于缺乏有效免疫预防措施, HBV相关性终末期肝病肝移植患者术后移植体病毒复发率约80%; 2 a生存率仅50%-60%^[1]。1990年代, 术中和术后iv高剂量HBIg, 2 a HBV复发率降至30%-40%, 1 a生存率达到80%^[2-3]。近年国外研究表明, LAM或阿德福韦与HBIg联用, 可以有效预防HBV相关性肝病OLT后HBV的复发^[4-7]。LAM抑制病毒DNA合成; HBIg与LAM有协同作用, 抑制病毒复制并减少逃逸突变发生率, 最大发挥HBIg的作用。然而, 肝移植后HBV复发的预防措施并未标准化, 从一个中心到另一中心改变很大^[8-13]。费用高、施药不便、耐受性差是iv高剂量HBIg的缺点。探索效价比高、低剂量HBIg和方便的给药途径非常必要。2002-01/2004-06, 我所共随访HBV相关性终末期肝病OLT术后患者173例, 参照国内外经验, 采用低剂量HBIg im和LAM联用预防OLT术后HBV复发取得了一定的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-01/2004-06, HBV相关性终末期

■创新盘点

本文通过对173例HBV相关性终末期肝病肝移植的临床资料分析, 揭示长期im低剂量乙肝免疫球蛋白(HBIg)联用拉米夫定(LAM)可以有效预防OLT后HBV复发, OLT后HBV复发率1.8%(3/168), 是目前理想的控制OLT后HBV复发的治疗措施, 效价比好, 比较适合我国的国情。但更长期的临床预防效果仍需要观察。

■名词解释

1 HBV复发的诊断标准: 肝功能检查异常结合下列任何1项阳性, 可诊断为HBV复发. (1)血清HBsAg阳性; (2)血清HBV-DNA阳性; (3)肝组织HBsAg或HBcAg阳性; (4)肝组织的HBV-DNA阳性. 若伴有ALT明显升高, 除外其他原因, 则诊断OLT后复发性肝炎.

2 LAM或HBIG药物耐受: 肝移植后预防用药初期HBV DNA(-), 随后HBV DNA(+); 伴谷丙转氨酶升高超过正常2倍.

肝病OLT术后患者173例, 其中3例为肝肾联合移植术. 男144例, 女29例, 年龄25-67(平均44.8±18.0)岁. 包括急性重型肝炎14例, 慢性重型肝炎74例, 终末期肝硬化42例, 原发性肝癌43例. 36例有术前手术史: 脾切除+分流或断流术16例, 肝癌切除术11例, 胆囊切除和胃大部切除术8例, 1例接受肾移植术. 肝功能Child-Pugh A 23例, B 29例, C 121例, 3 mo内死亡17例, 手术成功率100%, 术后3 mo生存率>90%(156/173). 随访时间4-35(平均20.8±14.0) mo. 重型肝炎确诊标准采用2000年在西安召开的第10次全国病毒性肝炎与肝病会议制定的分型标准^[14]. 移植前血清HBsAg(+)\HBeAg(+)\HBV DNA(+) 95例; HBsAg(+)\HBeAg(-)\HBV DNA(+) 59例; HBsAg(+)\HBeAg(-)\HBV DNA(-) 19例. 总胆红素>400 μmol/L 40例, >800 μmol/L 11例; 重肝合并肝昏迷19例; 凝血酶原时间>30 s 13例, >60 s 44例. 所有供体HBsAg, HBeAg, HBcAb植入前检查阴性, 肝穿刺病理检查除外病毒颗粒.

1.2 方法 供肝获取采用快速肝肾联合切取法, UW液保存, 热缺血3-5 min, 冷缺血6-17 h. 采用经典原位肝移植119例, 被驮式肝移植41例, 腔静脉成型肝移植13例. 平均手术时间7.5±1.4 h. 平均术中输血量1859±206 mL. 胆道重建采用供受体胆总管端端吻合术, 部分患者放置T管引流, 术后4-6 mo后拔除T管. 术后常规广谱抗菌素和更昔洛韦等预防细菌和病毒感染. 术中无肝期500 mg甲基强的松龙(MP)冲击, 术后7 d每日采取MP 500, 500, 200, 160, 120, 80, 40 mg后改强的松20 mg/d口服维持. 所有患者术后24 h内开始接受标准三联免疫抑制治疗(普乐可复+骁悉+强的松, FK506+MMF+PRED), FK506首剂量每日0.075 mg/kg, 并根据血浓度和肾功能调整剂量, 使患者5-7 d内FK506全血浓度达10-12 μg/L, 并维持3 mo; 3-6 mo浓度8-10 μg/L; >6 mo浓度维持在5-8 μg/L. 6 mo后停用强的松和骁悉.

预防HBV复发方案: 术前1-2 wk, 所有受者接受LAM 100 mg/d治疗等待OLT, 并根据OLT后接受的抗病毒预防方案分成3组. (1)拉米夫定组($n = 2$): 术后24 h开始胃管内给予拉米夫定100 mg 1次/d; 饮食恢复后改口服; (2)拉米夫定+HBIG组($n = 168$): HBIG从术中无肝期就开始用, 若HBV DNA $\geq 10^8$ copies/L, 术中HBIG 4000 U, 术后HBIG iv 1000 U/d, 连续6 d; 若HBV DNA $< 10^8$ copies/L, 术中HBIG iv 2000 U,

术后HBIG iv 1000 U/d, 连续3 d. HBIG大剂量疗程结束5 d后开始im HBIG 400 U/d, im间隔日期根据术后血中HBsAb滴度调整^[16], 术后1 mo内HBsAb滴度>300 U/L, 术后2-3 mo>200 U/L, 术后3-6 mo>100 U/L, 术后>6 mo维持在100 U/L左右. (3)阿德福韦+HBIG组($n = 3$): 阿德福韦术后24 h内即服用, 10 mg/d, HBIG的使用同前. HBIG(人乙肝免疫球蛋白), 由中国四川蜀阳药业提供, 抗体活性滴度>95%, 400 U约300 RMB/支.

临床随访: (1)肝功能术后1 wk内每天检查1次, 术后2-4 wk内每周检查2次; 之后每月复查1次, 连续3 mo; 若无并发症每3个月检查1次. (2)血清HBV标志物: 肝炎免疫包括HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb和HBcAb水平; 术后<1 mo每周复查1次, 之后每月复查1次, 连续3 mo, 若无并发症每3个月检查1次. 采用ELISA法, 试剂盒由华美生物工程有限公司提供. (3)HBV DNA定性和定量检测: 若HBsAg(+), 采用PCR法定性测定HBV DNA; 若HBV DNA(+), DNA杂交定量检测, 其敏感度 $< 2 \times 10^5$ copies/L. (4)肝活检免疫组织化学: 检查主要为HBsAg和HBcAg, 方法为S-P法, 全套免疫组织化学试剂由华美生物工程有限公司提供. 我研究所肝穿刺非常规进行, 临床怀疑急排或慢排以及怀疑HBV复发患者则要肝穿确诊, 排异分级依据Banff标准. 所有检测结果由本院中心实验室和病理科专业医师提供. 肝功能检查异常结合下列任何1项阳性, 可诊断为HBV复发^[15]. (1)血清HBsAg阳性; (2)血清HBV DNA阳性; (3)肝组织HBsAg或HBcAg阳性; (4)肝组织的HBV DNA阳性. 若伴有ALT明显升高, 除外其他原因, 则诊断OLT后复发性肝炎. LAM或HBIG药物耐受定义: 肝移植后预防用药初期HBV DNA(-), 随后HBV DNA(+); 伴谷丙转氨酶升高超过正常2倍.

统计学处理 结果表达采用mean±SD. HBV相关性终末期肝病OLT后预防HBV复发的多中心研究比较采用 χ^2 检验, 双尾 $P < 0.05$ 有统计学意义(选择对象: 美国UCLA医学院肝移植部^[17]).

2 结果

术后采用HBIG+LAM或HBIG+ADF预防, 术前HBeAg(+)受者中有3例HBV复发, 3例患者术前HBV DNA PCR检测 $> 10^8$ copies/L; 术前HBeAg(-)受者术后无HBV复发. LAM组2例术前均为HBsAg(+)\HBeAg(-), PCR检测HBV DNA(-). 例1术后化验HBV血清学标志全部阴转, 术后1 mo肝

表 1 HBV相关性肝病173例OLT后HBV复发时特征

病案	组别	性别	年龄	OLT后伴发病	HBV爆发点	OLT后HBV-DNA	OLT后HBsAg	ALT (U/L)	用药方案	HBsAg阴转 (mo)
1	I	男	34	无	7 d	+	+	547	LAM	0
2	II	男	55	无	12 d	+	+	238	L+H转L	0
3	II	男	38	HCC	12 mo	-	+	94	L+H	0
4	II	男	48	无	1.5 mo	-	+	85	L+H转A+H	5.5

L+H: LAM+HBIG; L: LAM; A+H: ADF+HBIG; 转: HBV复发后转换治疗预案。

活检免疫组化HBsAg(-)\HBcAg(-); 目前术后2 a余, 化验HBsAg(-), 肝功能正常。例2术后1 wk血清学检测出HBsAg(+)\HBV DNA(-), 诊断HBV复发; 术后1 mo肝活检HBsAg(-)。术后2 mo免疫组化HBsAg(+)\HBV DNA(+); 肝穿HBsAg(+), 中等量表达, 肝细胞浊肿, 伴交界性排斥反应(RAI 2-3分); 同时伴反复低热、黄疸及转氨酶升高, 定义LAM药物耐受, 诊断OLT后复发性肝炎。术后8 mo死于多器官功能衰竭。LAM+HBIG组168例, 98.2%(165/168)术后HBsAb(+)\HBV DNA(-), HBsAb维持有效滴度。术后1 mo肝功能基本正常, 肝活检免疫组织化学HBsAg(-)\HBcAg(-)。其中3例受者出现HBV复发。第1例术后12 d血清学表现为HBsAg(+)\HBeAg(+)\HBV DNA(+); 肝活检免疫组化HBsAg(+)\HBcAg(+). 术后1 mo血清HBsAg(-), 肝功能正常。术后57 d出现低热、黄疸和转氨酶升高, 测血清HBsAg(+)\HBeAg(+), HBV DNA $>10^6$ copies/L。患者术后HBsAb滴度持续低下, 有时接近0, 虽间隔给予大剂量HBIG iv都不能维持有效滴度, 化验HBsAb始终(-)。定义HBIG药物耐受, 继续给予LAM单治疗。术后11 mo死于乙肝复发导致的急性肝功能衰竭。第2例患者术后12 mo血清学检测发现HBsAg(+)\HBeAg(-)\HBV DNA(-), 肝活检免疫组织化学HBsAg(+), 化验肝功能基本正常, 成为乙肝携带者, 术后15 mo死于肿瘤复发。第3例患者术后1.5 mo血清学检测HBsAg(+)\HBeAg(-)\HBV DNA(-); 肝穿刺HBsAg(-)\HBcAg(-)。ADF立即替换LAM, ADF治疗5.5 mo后HBV血清学指标全部转阴, 目前患者肝功能良好。后2例受者HBsAb始终维持有效滴度, 可能存在HBV逃逸突变; 但3例患者术前HBV DNA $>10^8$ copies/L。阿德福韦(ADF)+HBIG组3例, 术前出现LAM治疗抵抗, 术后持续HBsAb(+)\HBV DNA(-); 肝功能术后1 mo内基本恢复正常(表1)。仅LAM组HBV复发患者伴有轻度排斥反应, 经提高FK506浓度和小剂量MP冲

击后排斥反应缓解。HBIG im后受者未出现过敏反应、发热、酸中毒、皮下硬结等副作用, 耐受性好。年均预防费用: 4-5支400 U HBIG/mo, 合并LAM费用, 平均3000-4000 \$/a。美国UCLA肝移植部报道的HBV复发病例也均发生在术前HBsAg(+), HBeAg(+), HBV DNA(+)患者中。HBIG与LAM联合预防HBV相关性肝病OLT后HBV复发率1/59(UCLA) vs 3/168(长征医院), 无统计学意义($\chi^2=0.280$ 37)。

3 讨论

我国是乙型肝炎的高发国家, 每年有大量患者死于HBV相关性终末期肝病, 而OLT是目前治疗终末期肝病唯一有效的方法。既往由于OLT后缺乏有效的免疫预防措施, 以及免疫抑制剂的应用, 移植肝复发HBV的机率较高, 因此OLT用于治疗HBV相关的终末期肝病一直存在争议。近年来由于LAM和HBIG在临床上的广泛应用, 使得OLT后HBV的复发得到一定程度的控制, OLT在治疗HBV相关性终末期肝病方面有了很大的发展。移植肝复发HBV, 其感染来源可能与血循环及肝外组织中的HBV有关; 移植术中及术后大剂量和长期的激素和免疫抑制剂的应用, 使病毒的复制能力增强, 加速移植肝病毒的复发, 因此在OLT术前、术中和术后进行抗HBV治疗对预防HBV的复发具有关键作用。肝移植术后乙型肝炎病毒的复发多发生在术后0.5-1 a内^[18], 我研究所4例HBV复发中的3例均是术后半年内复发, 临床表现多为纳差、乏力、黄疸及转氨酶升高, 有的病例可与排斥反应等并发症同时出现, 重症患者可迅速出现肝功能衰竭, 血清学检查及肝穿刺活检病理检查等可明确诊断。

国外移植中心肝移植后采用大剂量HBIG预防HBV复发, 取得了良好的效果; 但其用药时间、剂量和持续时间并不一致; 维持血中HBsAb何种水平争议也很大^[19-20]; HBeAg(+)

■同行评价

目前对肝移植术后患者抗病毒治疗研究尚处于探索过程中。本研究病例数多, 观察时间较长, 共随访HBV相关性终末期肝病LT术后患者173例, 采用低剂量HBIG肌注和LAM联用预防LT术后HBV复发并取得较好治疗效果。研究工作量大, 文章立意新颖, 逻辑性强, 研究内容和技术手段较为翔实, 数据分析合理, 讨论部分内容与实验结果密切相关, 是一篇较为优秀的临床研究论文。

和/或HBV DNA(+)的受体其预防失败率为20%-30%^[3]。而且费用昂贵,施药不便,耐受性差也限制了大剂量HBIg临床应用的推广。LAM对HBV反转录酶的活性有明显抑制作用,单独应用LAM能够预防HBV的复发,但是长期应用易形成药物耐受,仍有一定比例的患者移植术后复发乙型肝炎病毒,文献报道大约在27%-62.5%左右^[21]。我研究所早期2例受者术后单用LAM来预防乙型肝炎复发的患者,有1例定义为LAM治疗药物耐受,由于当时国内尚未引入ADF,难以调整药物,肝功能难以好转,术后8 mo死于多器官功能衰竭。另外1例术前1 wk开始服用LAM,目前已经存活2 a,化验HBV血清学指标正常,肝功能良好。UCLA肝移植部研究揭示^[19]:术前HBsAg(+)\HBeAg(-)\HBV DNA(-)受者,术后才开始服用LAM,半年内无HBV复发,因此术前短期(我所1-2 wk)或术后才开始服用LAM可能有利于降低术后早期病毒变异株的产生。

国内外研究证实HBIg一定剂量、长时间应用可明显降低HBV的复发率,尤其是对低水平复制的HBV更有效。美国UCLA肝移植部报道:术中和术后1 wk内采用HBIg iv 10 000 U/d;术前HBV DNA(+)者连续iv 7 d,术前HBV DNA(-)者连续iv 3 d;然后根据血中HBsAb滴度,每2-4周再给予1200 U im, 3 mo内维持HBsAb>300 U/L, >3 mo则>100 U/L;HBsAg(+)和HBV DNA(+)者,从列为肝移植名单开始服用LAM 100 mg/d;HBV DNA(-)者,肝移植术后开始长期应用, 100 mg/d,可以使移植后HBV复发率控制在1.7%(1/59)^[17]。参照国内外经验,我中心随访168例应用LAM+低剂量HBIg im预防HBV复发的患者,肝移植术后HBV的复发率为1.8%(3/168);HBV复发3例,均出现在术前HBeAg(+), HBV DNA>10⁸ copies/L受者,术中均iv大剂量的HBIg;而HBeAg(-)\HBV DNA<10⁸ copies/L者无HBV复发。因此术前HBeAg由阳性转阴性可能会有效的降低OLT后HBV的复发率。

国外有报道,应用ADF治疗对LAM耐药的患者取得了很好的疗效^[22],但国内尚未见应用该药的临床报道。我们术后应用ADF+HBIg预防术前确诊有YMDD区病毒变异的3例受者,3例受者OLT后均无HBV复发。由于移植术后乙肝的复发可能导致肝移植的失败,单用LAM仍有较高的复发率,所以我们没有设立更多的LAM治疗组例数,而ADF我们刚开始使用,更多的疗效需要进一步的积累。另外,我们体会在

移植术中无肝期的一次性、大剂量使用HBIg对预防HBV复发尤其具有特别重要的意义,他可以迅速中和血液和肝外组织中的HBV;术后再根据预定的血中HBsAb滴度来调整HBIg的用量。在我研究所设定的HBsAb滴度下,采用LAM+HBIg预防OLT后HBV复发,OLT后HBV复发率1.8%(3/168),与美国UCLA肝移植部的报道相比两者无统计学意义($\chi^2=0.280\ 37$),两者临床总的HBV复发率无差异。说明我所预防方案可靠,预防效果好,而且年预防费用3000-4000 \$/a,明显低于国外年预防费用^[22],效价比明显,比较适合我国的国情。低剂量HBIg im方便,无明显副作用,患者易接受;但其长期的临床预防效果仍需要观察。

预防乙型肝炎病毒的复发是肝移植治疗HBV相关的终末期肝病所面临的一个重要问题,是提高肝移植患者术后长期存活率重要因素之一。我所的随访初步观察表明, LAM+HBIg或ADF+HBIg的联合用药可以有效预防肝移植术后乙型肝炎病毒的复发,是目前理想的控制乙型肝炎复发的治疗措施,效价比好。

4 参考文献

- 1 Samuel D, Muller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou JP, Bismuth H. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1993; 329: 1842-1847
- 2 Terrault NA, Zhou S, Combs C, Hahn JA, Lake JR, Roberts JP, Ascher NL, Wright TL. Prophylaxis in liver transplant recipients using a fixed dosing schedule of hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology* 1996; 24: 1327-1333
- 3 Sawyer RG, McGory RW, Gaffey MJ, McCullough CC, Shephard BL, Houlgrave CW, Ryan TS, Kuhns M, McNamara A, Caldwell SH, Abdulkareem A, Pruett TL. Improved clinical outcomes with liver transplantation for hepatitis B-induced chronic liver failure using passive immunization. *Ann Surg* 1998; 227: 841-850
- 4 McGory RW, Ishitani MB, Oliveira WM, Stevenson WC, McCullough CS, Dickson RC, Caldwell SH, Pruett TL. Improved outcome of orthotopic liver transplantation for chronic hepatitis B cirrhosis with aggressive passive immunization. *Transplantation* 1996; 61: 1358-1364
- 5 McGory R. Pharmacoeconomic analysis of HBV liver transplant therapies. *Clin Transplant* 2000; 14 Suppl 2: 29-38
- 6 Nery JR, Weppeler D, Rodriguez M, Ruiz P, Schiff ER, Tzakis AG. Efficacy of lamivudine in controlling hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 1615-1621
- 7 Markowitz JS, Martin P, Conrad AJ, Markmann JF, Seu P, Yersiz H, Goss JA, Schmidt P, Pakrasi A, Artinian L, Murray NG, Imagawa DK, Holt C, Goldstein LI, Stribling R, Busuttil RW. Prophylaxis

- against hepatitis B recurrence following liver transplantation using combination lamivudine and hepatitis B immune globulin. *Hepatology* 1998; 28: 585-589
- 8 Ben-Ari Z, Mor E, Tur-Kaspa R. Experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection before and after liver transplantation, and review of the literature. *J Intern Med* 2003; 253: 544-552
- 9 Fagiuali S, Mirante VG, Pompili M, Gianni S, Leandro G, Rapaccini GL, Gasbarrini A, Naccarato R, Pagliaro L, Rizzetto M, Gasbarrini G. Liver transplantation: the Italian experience. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 640-648
- 10 Nery JR, Nery-Avila C, Reddy KR, Cirocco R, Weppler D, Levi DM, Nishida S, Madariaga J, Kato T, Ruiz P, Schiff E, Tzakis AG. Use of liver grafts from donors positive for antihepatitis B-core antibody (anti-HBc) in the era of prophylaxis with hepatitis-B immunoglobulin and lamivudine. *Transplantation* 2003; 75: 1179-1186
- 11 Lo CM, Fan ST, Liu CL, Lai CL, Wong J. Prophylaxis and treatment of recurrent hepatitis B after liver transplantation. *Transplantation* 2003; 75: S41-S44
- 12 Vargas HE, Dodson FS, Rakela J. A concise update on the status of liver transplantation for hepatitis B virus: the challenges in 2002. *Liver Transpl* 2002; 8: 2-9
- 13 van Nunen AB, de Man RA, Heijtkink RA, Vossen AC, Schalm SW. Passive immunization of chronic hepatitis B patients on lamivudine therapy: a feasible issue? *J Viral Hepat* 2002; 9: 221-228
- 14 成军, 张玲霞, 斯崇文, 庄辉. 第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议纪要. *中华传染病杂志* 2001; 19: 53-55
- 15 Neff GW, O'Brien CB, Nery J, Shire N, Montalbano M, Ruiz P, Nery C, Safdar K, De Medina M, Tzakis AG, Schiff ER, Madariaga J. Outcomes in liver transplant recipients with hepatitis B virus: resistance and recurrence patterns from a large transplant center over the last decade. *Liver Transpl* 2004; 10: 1372-1378
- 16 袁桂玉, 段毅利, 王风水, 梁树人, 朱理珉. 肝移植后乙型肝炎病毒再感染的预防与治疗. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 14-16
- 17 Han SH, Martin P, Edelstein M, Hu R, Kunder G, Holt C, Saab S, Durazo F, Goldstein L, Farmer D, Ghobrial RM, Busuttil RW. Conversion from intravenous to intramuscular hepatitis B immune globulin in combination with lamivudine is safe and cost-effective in patients receiving long-term prophylaxis to prevent hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: 182-187
- 18 郑树森, 吴健, 梁廷波, 王伟林, 黄东胜, 马伟杭. 肝移植患者乙型肝炎病毒再感染的防治. *中华器官移植杂志* 2000; 21: 366-368
- 19 Lok AS. Prevention of recurrent hepatitis B post-liver transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8: S67-S73
- 20 Villamil FG, Vierling JM. Recurrence of viral hepatitis after liver transplantation: insights into management. *Liver Transpl Surg* 1995; 1: 89-99
- 21 Ben-Ari Z, Daudi N, Klein A, Sulkes J, Papo O, Mor E, Samra Z, Gadba R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 151-159
- 22 Walsh KM, Woodall T, Lamy P, Wight DG, Bloor S, Alexander GJ. Successful treatment with adefovir dipivoxil in a patient with fibrosing cholestatic hepatitis and lamivudine resistant hepatitis B virus. *Gut* 2001; 49: 436-440

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿。

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.

www.wjgnet.com

EBV相关胃癌*ras*基因突变及法尼基转移酶 β -亚单位基因的表达

孙佰秀, 殷凡, 朱伟, 高玉, 孙淑红, 罗兵

■背景资料

近几年, 罗兵教授在EBV相关胃癌方面作了大量研究, 包括EBV相关基因、癌基因、抑癌基因在胃癌组织的表达及相关性, 发表多篇文章, 并获得山东省教育厅科技进步一等奖。本文章旨在研究EBVaGC中EBV基因表达与*ras*基因异常和FTase mRNA转录水平的关系, 为胃癌病因学研究和防治提供理论依据, 尤其为法尼基转移酶抑制剂的临床应用提供理论依据。本研究13例EBV相关胃癌标本选自185例病例, EBV相关胃癌发生率较低, 标本收集有一定难度, 需在以后作进一步工作。

孙佰秀, 青岛市妇女儿童医疗保健中心检验科 山东省青岛市 266011

殷凡, 朱伟, 高玉, 孙淑红, 罗兵, 青岛大学医学院微生物学教研室 山东省青岛市 266021

孙佰秀, 1995年青岛大学医学院本科毕业, 主管检验师, 主要从事临床检验工作。

通讯作者: 罗兵, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院微生物教研室。qdluobing@yahoo.com
电话: 0532-83812423

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-03-20

Ras mutation and expression of farnesyltransferase β mRNA in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma

Bai-Xiu Sun, Fan Yin, Wei Zhu, Yu Gao, Shu-Hong Sun, Bing Luo

Bai-Xiu Sun, Clinical Laboratory, Qingdao Women & Children's Medical and Health Care Center, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Fan Yin, Wei Zhu, Yu Gao, Shu-Hong Sun, Bing Luo, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Bing Luo, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. qdluobing@yahoo.com

Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-03-20

Abstract

AIM: To investigate *ras* gene mutations and farnesyltransferase (FTase) β mRNA expression in Epstein-Barr virus (EBV)-associated gastric carcinoma (EBVaGC), EBV-negative gastric carcinoma (EBVnGC) with matched clinico-pathological parameters and corresponding adjacent tissues of gastric carcinoma.

METHODS: The mutations of *ras* gene were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the expression of FTase β mRNA was tested by reverse transcription PCR (RT-PCR) in 13 EBVaGCs, 45 EBVnGCs with matched clinico-pathological parameters and 58 corresponding adjacent tissues of gastric carcinoma.

RESULTS: H-*ras* mutation at codon 12 was detected in 2(3.45%) cases of gastric carcinomas, both of which were EBVnGCs. No K-*ras* mutations occurred at codon 12 and 13 in all cases. The level of FTase β mRNA expression was 0.93 ± 0.39 in gastric carcinomas and 0.78 ± 0.26 in corresponding adjacent tissues, respectively. The difference between the two groups was significant ($t = 2.44$, $P = 0.02$). The level of FTase β mRNA expression was 0.80 ± 0.19 in EBVaGCs and 0.96 ± 0.43 in EBVnGCs respectively. The difference between the two groups was not significant ($t = 1.93$, $P = 0.06$). FTase β mRNA expression was not significantly different ($t = 0.54$, $P = 0.60$) between EBVaGCs and corresponding adjacent tissues either, while it was significant ($t = 2.39$, $P = 0.02$) between EBVnGCs and corresponding adjacent tissues. The level of FTase β mRNA expression had no significant relationship between 2 BHRF1 positive samples and 11 BHRF1 negative samples of EBVaGCs ($t = 0.26$, $P = 0.80$) as well as between 6 BHRF1 positive samples and 7 BHRF1 negative samples of EBVaGCs ($t = 1.59$, $P = 0.14$).

CONCLUSION: The frequency of *ras* gene mutations in gastric carcinomas is low in this study. The level of FTase β mRNA expression in gastric carcinomas is much higher than that in normal tissues. EBV infection has no significant correlations with *ras* mutations and FTase expression in EBVaGC.

Key Words: Stomach neoplasm; Epstein-Barr virus; PCR-RFLP; RT-PCR; *ras*; FTase

Sun BX, Yin F, Zhu W, Gao Y, Sun SH, Luo B. *Ras* mutation and expression of farnesyltransferase β mRNA in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1294-1299

摘要

目的: 探讨EBV相关胃癌(EBVaGC)、EBV阴性胃癌(EBVnGC)及相应癌旁组织中*ras*基因突变和法尼基转移酶(FTase)的表达意义。

方法:应用PCR-RFLP技术检测EBVaGCs 13例、EBVnGCs 45例以及相应癌旁组织58例中H- ras 12和K- ras 12, 13密码子点突变情况; RT-PCR技术检测FTase β 亚单位mRNA的表达水平。

结果:共检测到H- ras 12位点突变2例, 突变率为3.45%(2/58), 均发生在EBVnGCs, 未发现K- ras 12和13密码子点突变。58例癌组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平为 0.93 ± 0.39 , 癌旁组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平为 0.78 ± 0.26 , 两者有显著性差异($t = 2.44, P = 0.02$)。EBVaGCs组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平为 0.80 ± 0.19 , EBVnGCs组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平为 0.96 ± 0.43 , 两者无显著性差异($t = 1.93, P = 0.06$); EBVaGCs和癌旁组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平无显著性差异($t = 0.54, P = 0.60$); EBVnGCs和癌旁组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平有显著性差异($t = 2.39, P = 0.02$); 2例BHRF1阳性和11例BHRF1阴性EBVaGCs组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平无显著性差异($t = 0.26, P = 0.80$); 6例BARF1阳性和7例BARF1阴性EBVaGCs组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平亦无显著性差异($t = 1.59, P = 0.14$)。

结论:胃癌组织 ras 基因突变率较低, 胃癌组织中FTase β 亚单位mRNA明显高于癌旁组织。EBVaGC组织中 ras 基因突变、FTase β 亚单位表达与EBV感染无明显相关性。

关键词:胃肿瘤; EB病毒; PCR-RFLP; RT-PCR; ras ; FTase

孙佰秀, 殷凡, 朱伟, 高玉, 孙淑红, 罗兵. EBV相关胃癌 ras 基因突变及法尼基转移酶 β -亚单位基因的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1294-1299
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1294.asp>

0 引言

Epstein-Barr病毒(EBV)是重要的DNA肿瘤病毒, 与人类多种淋巴系统恶性肿瘤如Burkitt淋巴瘤、移植后B淋巴细胞瘤、何杰金病及某些T淋巴细胞瘤等的发生密切相关。近年来研究表明, 胃癌、肝癌和口腔癌组织中可检测到EBV基因组。胃腺癌组织中也存在EBV阳性细胞, 同时伴有患者血清EBV抗体效价的升高, 证实EBV感染与胃癌存在一定的相关性^[1-2]。胃癌细胞内存在EBV者, 定义为EBV相关胃癌(EBV-associated

gastric carcinoma, EBVaGC)^[3]。目前认为EBV相关肿瘤的发生、发展是病毒基因表达与癌基因、抑癌基因等异常协同作用, 导致正常细胞的生长调控发生障碍所致。EBVaGC组织中 ras 基因突变和FTase mRNA表达是否由于EBV参与而与EBV阴性胃癌(EBV-negative gastric carcinoma, EBVnGC)有所不同, 目前尚未见报道。我们选择EBVaGC和各种临床指标与之匹配的EBVnGC作为研究对象, 应用PCR限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测胃癌及相应癌旁组织中H- ras 12和K- ras 12, 13密码子点突变情况; 半定量RT-PCR检测FTase β 亚单位mRNA的表达水平。探讨EBVaGC中EBV基因表达与 ras 基因异常和FTase mRNA转录水平的关系, 为胃癌病因学研究和防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-12, 收集青岛大学医学院附属医院126例、青岛市市立医院25例和烟台毓璜顶医院34例胃癌患者手术切除的新鲜胃癌组织和相应癌旁组织(距离癌组织5 cm以上), 全部病例均经病理诊断证实。自上述185例胃癌患者中选取病理诊断与原位杂交证实的EBVaGCs 13例, 组织中均检测到EBV核抗原EBNA1基因的mRNA, EBNA2和潜伏膜蛋白LMP1基因mRNA均为阴性, 6例检测到EBV早期基因BARF1的表达, 2例检测到EBV早期基因BHRF1的表达^[4]。临床病理资料与之匹配的EBVnGCs 45例, 平均年龄 $57.9 \pm 13.4(31-81)$ 岁, 男48例, 女10例。EBV阳性组和EBV阴性组病例在年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、分化程度、有无淋巴结转移以及临床分期等方面均无显著性差异。酚、氯仿、异戊醇法常规提取组织DNA, Trizol一步法提取组织总RNA。cDNA的合成参照逆转录试剂盒要求的标准条件进行cDNA合成。反应体系为: $10 \times \text{Buffer } 2 \mu\text{L}$, $\text{MgCl}_2 5 \text{ mmol/L}$, dNTP 1 mmol/L , AMV反转录酶 15 U , 核酸酶抑制剂 0.5 U , Oligo(dT) $15 \text{ } 0.5 \mu\text{g}$, 模板RNA $5 \mu\text{L}$, 加Nuclease-Free Water至终体积 $20 \mu\text{L}$ 。42℃ 1 h , 99℃ 5 min , 然后快速冷却至4℃。合成的cDNA用作PCR反应模板, -20℃保存备用。

1.2 方法 参照文献[5-6]设计并由上海生工生物工程技术有限公司合成检测 ras 基因突变的特异性引物, 同时选择相应的限制性核酸内切酶进行酶切分析, 引物序列、扩增产物大小以及所用限制性内切酶见表1。PCR反应体系为

■同行评价

本研究通过cDNA的合成、PCR检测等方法探讨了EBVaGC、EBVnGC及癌旁组织基因突变中 ras 基因突变和FTase的表达。得出胃癌 ras 基因突变率低、FTase β 亚单位mRNA明显高于癌旁组织。EBVaGC中 ras 基因突变、FTase β 亚单位表达与EBV感染无相关。立题新颖, 设计合理, 方法先进, 数据可靠, 是一篇很好的学术论文。

表 1 PCR-RFLP分析*ras*基因突变所用寡聚核苷酸引物和限制性核酸内切酶

名称	引物序列	扩增产物	酶	突变型	野生型
K- <i>ras</i> sense primer	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'	162 bp	<i>Bst</i> NI	162 bp	133 bp+29 bp
12位点 antisense primer	5'-CTGTATCAAAGAATGGTCTGCACCAGTA-3'				
K- <i>ras</i> sense primer	5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAA-3'	159 bp	<i>Hae</i> III	85 bp+74 bp	85 bp+48 bp+26 bp
13位点 antisense primer	5'-GTATCGTCAAGGCACTCTTGCCCTAGG-3'				
H- <i>ras</i> sense primer	5'-CAGGGCCCTCCTTGGCAGG-3'	170 bp	<i>Hpa</i> II	122 bp+48 bp	66 bp+56 bp+48 bp
12位点 antisense primer	5'-GTCGTATTCTGCCACAAATGG-3'				

10×Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各0.5 μmol/L, Taq DNA聚合酶1.0 U, DNA模板2 μL, 加双蒸水至终体积25 μL. 检测K-*ras* 12密码子突变的PCR扩增参数为95℃预变性5 min; 然后95℃ 40 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共35个循环; 最后72℃延伸5 min. 检测K-*ras* 13密码子突变的扩增参数中退火温度调整为50℃, 其余参数均与检测K-*ras* 12密码子突变的相同. 检测H-*ras* 12密码子突变的PCR扩增参数为94℃预变性5 min; 然后94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环; 最后72℃延伸5 min. 取PCR扩增产物5 μL于含溴化乙锭(0.5 mg/L)的20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 80 V, 1 h, 紫外投射仪下观察结果, 与PCR marker DL2000进行对照分析, 若分别观察到162 bp, 159 bp和170 bp条带表明扩增成功.

1.2.1 限制性酶切反应 检测K-*ras* 12位点突变的限制性酶切反应: *Bst*NI 酶切PCR产物, 反应体系为10×NEB Buffer 2 μL, 100×BSA 0.2 μL, *Bst*NI 5 U, PCR产物10 μL, 加双蒸水至20 μL, 混匀后60℃水浴过夜. 检测K-*ras* 13位点突变的限制性酶切反应: *Hae*III酶切PCR产物, 反应体系为10×Buffer 2 μL, *Hae*III 5 U, PCR产物5 μL, 加双蒸水至20 μL, 混匀后37℃水浴过夜. 检测H-*ras* 12位点突变的限制性酶切反应: *Hpa*II酶切PCR产物, 反应体系为10×Buffer 2 μL, *Hpa*II 10 U, PCR产物5 μL, 加双蒸水至20 μL, 混匀后37℃水浴1 h. 酶切产物于80 g/L聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, 紫外投射仪下观察结果并拍照. 野生型和突变型条带结果判断标准见表1.

1.2.2 半定量RT-PCR检测FTase β亚单位mRNA表达 法尼基转移酶β亚单位(FTase β subunit)和内参照基因GAPDH特异性引物参照文献[7-8]设计, 由上海生工生物技术服务公司合成. 引物序列如下: 目的基因sense primer: 5'-ATC-CAGGCCACTACATACTTT-3'; antisense primer:

5'-GGCTGATAGATTTTTGGTTTG-3', 扩增产物片段长度为316 bp. 内参照基因sense primer: 5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3'; antisense primer: 5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGT-CATA-3', 扩增产物片段长度为450 bp. PCR反应体系为10×Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, FTase β亚单位mRNA和内参照基因GAPDH上下游引物均0.3 μmol/L, Taq DNA聚合酶1.0 U, cDNA模板2 μL, 加双蒸水至终体积25 μL. PCR扩增参数为94℃预变性5 min; 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 最后72℃延伸10 min. 取PCR产物5 μL于含溴化乙锭(0.5mg/L)的20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 80 V, 1 h, 紫外投射仪下观察结果并拍照, 出现316 bp和450 bp扩增条带表明扩增成功. 用凝胶图像分析系统对FTase β亚单位mRNA的表达进行半定量分析, 以FTase β亚单位与GAPDH荧光强度乘面积的比值表示目的基因的表达水平, 大于或等于正常平均值+2SD者确定为过度表达.

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件对实验数据进行处理. 采用 t 检验分析胃癌和癌旁组织FTase β亚单位mRNA表达的配对数据的差异; 多元逐步回归分析胃癌组织中FTase β亚单位mRNA表达水平与临床病理各参数, 前者为应变量, 后者为自变量, $P<0.05$ 认为有相关关系.

2 结果

2.1 *ras*基因突变 我们采用PCR-RFLP检测13例EBVaGCs, 45例EBVnGCs以及58例相应癌旁组织中K-*ras* 12和13密码子以及H-*ras* 12密码子点突变, 结果检测到2例H-*ras* 12位点突变, 突变率3.45%(2/58), 均发生在EBVnGCs. 未发现K-*ras* 12和13密码子点突变, 13例EBVaGCs以及58例相应癌旁组织中均未检测到上述密码子的点突变(图1).

2.2 EBVaGCs, EBVnGCs组织FTase β亚单位

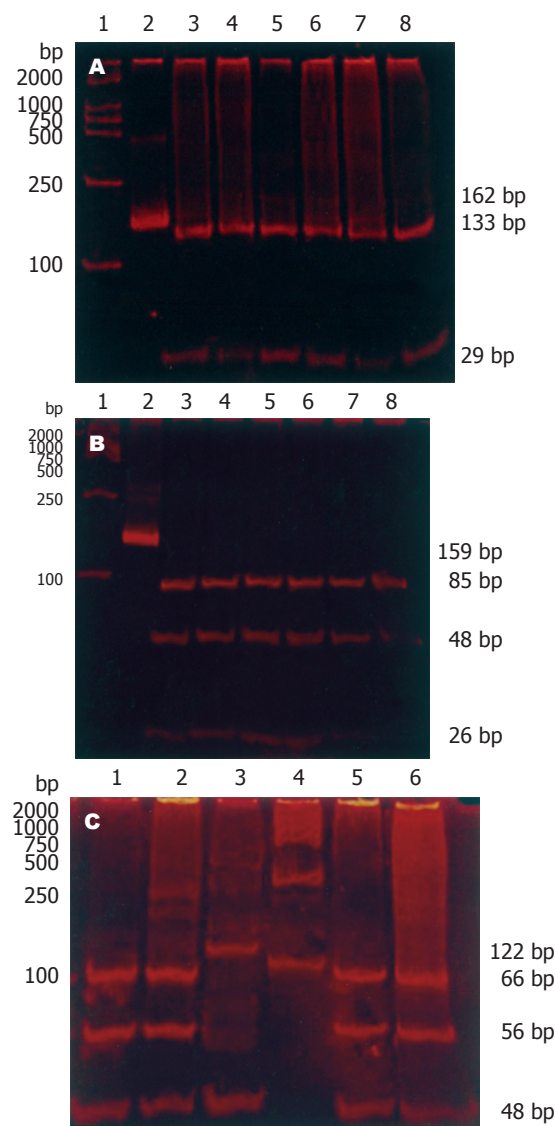


图1 胃癌组织K-ras和H-ras 12, 13密码子PCR-RFLP检测。
A: K-ras 12. 1: Marker; 2: PCR产物; 3-8: PCR-RFLP产物。
B: K-ras 13. 1: Marker; 2: PCR产物; 3-8: PCR-RFLP产物。
C: H-ras 12. 1, 2, 5, 6: 野生型H-ras 12 PCR-RFLP产物; 3: 突变型H-ras 12 PCR-RFLP产物; 4: Marker。

mRNA的表达 以GAPDH为内参照, 采用半定量RT-PCR技术检测13例EBVaGCs, 45例EBVnGCs以及58例相应癌旁组织FTase β亚单位mRNA表达, 上述组织中均检测到内参照基因GAPDH的表达, 表明cDNA分子完整以及PCR反应成功(图2)。58例胃癌组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.93 ± 0.39 , 癌旁组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.78 ± 0.26 , 统计学分析表明两者有显著性差异($t = 2.44, P = 0.02 < 0.05$); 13例EBVaGCs组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.80 ± 0.19 , 45例EBVnGCs组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.96 ± 0.43 , 统计学分析表明两者无显著性差异($t = 1.93, P = 0.06$); EBVaGCs和癌旁组织中FTase β亚单位mRNA表达

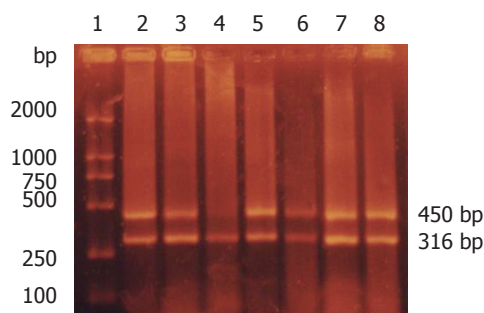


图2 部分胃癌标本FTase β亚单位mRNA表达电泳结果。1: Marker; 2-8: FTase β亚单位RT-PCR产物和GAPDH。

表2 胃癌FTase β亚单位mRNA表达与临床病理参数的多元逐步回归分析

临床病理	B ¹	标准误	Beta ²	t	P
性别	0.458	0.178	0.372	2.566	0.014
年龄	6.933	0.005	0.202	1.321	0.194
病理分型	0.765	0.334	0.336	2.288	0.027
组织学分级	7.964	0.153	0.081	0.520	0.606
淋巴结转移	4.440	0.171	0.040	0.259	0.797

¹非标准化回归分析; ²标准化回归分析。

水平无显著性差异($t = 0.54, P = 0.60$); EBVnGCs和癌旁组织中FTase β亚单位mRNA表达水平有显著性差异($t = 2.39, P = 0.02 < 0.05$)。FTase β亚单位mRNA有3例过表达, 2例发生于EBVnGCs组织中, 1例发生于癌旁组织, 统计学分析过表达在胃癌以及癌旁组织间无显著性差异; FTase β亚单位mRNA过表达的病例中均无ras突变。

2.3 FTase β亚单位mRNA的相关性 2例BHRF1阳性EBVaGCs组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.76 ± 0.24 , 11例BHRF1阴性EBVaGCs组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.86 ± 0.21 , 统计学分析表明两者无显著性差异($t = 0.26, P = 0.80$); 6例BARF1阳性EBVaGCs组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.73 ± 0.19 , 7例BARF1阴性EBVaGCs组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为 0.90 ± 0.21 , 统计学分析表明两者无显著性差异($t = 1.59, P = 0.14$)。以胃癌组织中FTase β亚单位mRNA表达水平为应变量, 临床病理各参数(包括性别、年龄、病理分型、组织学分级、有无淋巴结转移)为自变量, 进行多元逐步回归分析。结果显示胃癌组织中FTase β亚单位mRNA表达水平增高与患者性别和病理分型有关, 与年龄、组织学分级无关, 发生在女性、病理分型为印戒细胞癌的胃癌组织FTase β

亚单位mRNA表达水平有显著升高(表2)。

3 讨论

*ras*基因作为癌基因家族的重要成员,其基因突变以及编码蛋白过表达与许多肿瘤的发生、发展相关,*ras*基因家族包括H-*ras*, K-*ras*和N-*ras*,*ras*癌基因异常导致肿瘤发生的主要方式为点突变。研究表明约10%-15%的肿瘤中至少有一种*ras*基因发生点突变,点突变主要集中在第12, 13以及61位密码子;胃癌组织中主要是H-*ras*和K-*ras*基因的突变。Yoo *et al*^[9]采用PCR技术和DNA序列分析检测140例美国胃腺癌患者癌组织中*ras*基因突变情况,结果显示*ras*基因点突变率为14%, H-*ras* 2位点突变5例; K-*ras* 13位点突变7例, 61位点突变3例;未发现K-*ras* 12, H-*ras* 13及61位点突变。郝莹 *et al*^[10]应用多种方法检测胃癌演变过程中*ras*基因的突变,发现肠化生、不典型增生以及胃癌组织中H-*ras* 12位点突变率分别为16.7%, 31.2%和34.7%,各组间无显著性差异;而浅表性胃炎及正常对照组未发现突变。表明中国人胃癌组织中有一定的H-*ras*突变率;而国外研究多显示胃癌组织中H-*ras*突变率较低甚至检测不到*ras*基因突变。本研究结果显示H-*ras* 12位点突变发生率3.45%(2/58),且均发生在EBVnGCs;未发现K-*ras* 12, 13位点突变;13例EBVaGCs以及58例相应癌旁组织中均未检测到*ras*基因突变。这与Yoo *et al*的报道有所不同,推测*ras*基因突变可能存在地区和种族差异。

*ras*基因编码产物*ras*蛋白的持续活性状态可引起细胞增生和转化,细胞中*ras*蛋白需经过一系列修饰后才具有生物活性,*ras*蛋白脂化修饰中的法尼基化是其关键步骤^[11-12]。*ras*蛋白的法尼基化主要由法尼基转移酶(FTase)催化完成,未法尼基化的*ras*蛋白不能定位于细胞膜,因而无法实现其信号传导功能和致癌作用。目前*ras*蛋白作为抗肿瘤治疗的靶点,已成为该领域研究的热点,法尼基转移酶抑制剂已用于肺癌、头颈部癌和结肠癌等实体癌治疗的I期、II期和III期临床试验^[13-16]。FTase是由 α 、 β 两种亚单位组成的异二聚体, β -亚单位识别底物序列,结合*ras*蛋白; α -亚单位是其底物法尼基二磷酸盐FPP的携带者,FTase的酶催化功能必须由 α 、 β 亚单位共同完成,任何一个亚单位的变性都会影响酶活性。为探讨FTase是否直接参与细胞增殖,Nagase *et al*^[17]采用DNA重组技术将FTase α 和 β 亚单位编码基因同时转染NIH3T3细胞,对FTase

过表达细胞中*ras*蛋白的法尼基化以及*ras*信号传导途径的上下游因子活性进行了研究。结果显示转染细胞呈FTase过表达, α 、 β 亚单位蛋白表达较未转染细胞提高3-13倍,FTase活性提高1.5-3倍,法尼基化*ras*蛋白表达增加,且发现*ras*法尼基化提高程度低于法尼基酶活性升高程度。进一步研究发现适量的生长因子如胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、纤维母细胞生长因子(bFGF)能明显提高FTase过表达细胞的DNA合成和细胞增殖,若将FTase过表达NIH3T3接种裸鼠则可导致肿瘤形成,但与*ras*过表达细胞注入裸鼠形成的肿瘤表型明显不同,提示FTase直接参与细胞生长转化以及肿瘤形成机制。本研究结果表明,胃癌组织中FTase β 亚单位mRNA明显高于癌旁组织,但FTase的高表达与*ras*突变无相关性。我们认为胃癌的发生发展是多种基因异常协同作用的结果,*ras*基因异常在该过程不起主要作用;FTase不是通过活化*ras*基因发挥其致癌作用,可能FTase直接参与细胞的癌变过程。FTase表达水平在EBVaGC及癌旁组织中无显著性差异,该观点有待扩大标本量深入研究。FTase表达水平在女性和病理分型为印戒细胞癌^[18]的胃癌组织中有显著升高,但由于女性和印戒细胞癌标本例数较少,目前该观点尚难定论。

我们曾对13例EBV相关胃癌组织中病毒潜伏期基因和早期基因的表达进行了研究^[19-21],结果显示,13例EBVaGC组织中LMP1表达均缺失,而6例BARF1阳性,2例BHRF1阳性,提示BARF1和BHRF1可能代替LMP1在胃癌的发生发展过程中发挥重要作用。BARF1可在体外转化原代猴肾上皮细胞和人上皮细胞,并使鼠成纤维细胞系BALB/c3T3或EBV阴性的B细胞系Louckes产生致癌转化,转化的鼠成纤维细胞接种至新生鼠体内,可形成进行性表达BARF1的肿瘤^[22-23]。Sall *et al*^[24]研究认为BARF1具有生长因子作用。BHRF1与*bcl-2*的基因序列具有高度的同源性,与*bcl-2*基因相似,BHRF1可抑制细胞凋亡,促进细胞的生长和转化,延长细胞寿命^[25-26]。本研究结果显示,EBVaGCs组织中FTase β 亚单位mRNA表达水平与EBVnGCs中的表达水平无统计学意义,FTase表达与EBV编码基因的表达无明显相关性,推测胃癌的发生是多因素作用的结果,病毒感染和FTase高表达通过不同途径参与EBV相关胃癌的发生。

4 参考文献

- 1 Burke AP, Yen TS, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1990; 3: 377-380
- 2 Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-774
- 3 Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1250-1254
- 4 Luo B, Wang Y, Wang XF, Liang H, Yan LP, Huang BH, Zhao P. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 629-633
- 5 Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, Iliadis K, Kodaxis A, Papaioannou D, Labropoulos S, Vasilaki M, Kosmidis P, Saetta A, Mihalatos M, Nasioulas G. A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 243-247
- 6 罗元辉, 房殿春, 鲁荣, 门荣甫, 晋华源. 采用PCR-RFLP技术分析石蜡包埋胃癌组织 ras 和 $p53$ 基因点突变. 肿瘤防治研究 1995; 22: 68-71
- 7 Khan SG, Dummer R, Siddiqui J, Bickers DR, Agarwal R, Mukhtar H. Farnesyltransferase activity and mRNA expression in human skin basal cell carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 795-801
- 8 Kijima Y, Hokita S, Yoshinaka H, Itoh T, Koriyama C, Eizuru Y, Akiba S, Aikou T. Amplification and overexpression of c-met gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Oncology* 2002; 62: 60-65
- 9 Yoo J, Park SY, Robinson RA, Kang SJ, Ahn WS, Kang CS. ras Gene mutations and expression of Ras signal transduction mediators in gastric adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1096-1100
- 10 郝莹, 张锦坤, 吕有勇, 易粹琼. 应用多种方法检测胃癌演变过程中 ras 基因的突变. 中华内科杂志 1997; 36: 595-598
- 11 熊舜斌, 唐朝宇, 许根俊. Ras的结构和功能及其参与的信号传导. 生物化学与生物物理进展 1995; 6: 482-486
- 12 Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3631-3652
- 13 Vogt A, Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Hamilton AD, Sehti SM. A non-peptide mimetic of Ras-CAAX: selective inhibition of farnesyltransferase and Ras processing. *J Biol Chem* 1995; 270: 660-664
- 14 Zujewski J, Horak ID, Bol CJ, Woestenborghs R, Bowden C, End DW, Piotrovsky VK, Chiao J, Belly RT, Todd A, Kopp WC, Kohler DR, Chow C, Noone M, Hakim FT, Larkin G, Gress RE, Nussenblatt RB, Kremer AB, Cowan KH. Phase I and pharmacokinetic study of farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in advanced cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 927-941
- 15 Adjei AA, Erlichman C, Davis JN, Cutler DL, Sloan JA, Marks RS, Hanson LJ, Svingen PA, Atherton P, Bishop WR, Kirschmeier P, Kaufmann SH. A Phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biological and clinical activity. *Cancer Res* 2000; 60: 1871-1877
- 16 Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1430-1438
- 17 Nagase T, Kawata S, Nakajima H, Tamura S, Yamasaki E, Fukui K, Yamamoto K, Miyagawa J, Matsumura I, Matsuda Y, Matsuzawa Y. Effect of farnesyltransferase overexpression on cell growth and transformation. *Int J Cancer* 1999; 80: 126-133
- 18 Luo B, Murakami M, Fukuda M, Fujioka A, Yanagihara K, Sairenji T. Characterization of Epstein-Barr virus infection in a human signet ring cell gastric carcinoma cell line, HSC-39. *Microbes Infect* 2004; 6: 429-439
- 19 Wang Y, Luo B, Yan LP, Huang BH, Zhao P. Relationship between Epstein-Barr virus-encoded proteins with cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3234-3239
- 20 Wang Y, Luo B, Zhao P, Huang BH. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinoma. *Ai Zheng* 2004; 23: 782-787
- 21 Luo B, Wang Y, Wang XF, Gao Y, Huang BH, Zhao P. Correlation of Epstein-Barr virus and its encoded proteins with Helicobacter pylori and expression of c-met and c-myc in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1842-1848
- 22 zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene. *Cancer Res* 2000; 60: 2745-2748
- 23 Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189-218
- 24 Sall A, Caserta S, Jolicœur P, Franqueville L, de Turenne-Tessier M, Ooka T. Mitogenic activity of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein. *Oncogene* 2004; 23: 4938-4944
- 25 Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8479-8483
- 26 Dawson CW, Dawson J, Jones R, Ward K, Young LS. Functional differences between BHRF1, the Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue, and Bcl-2 in human epithelial cells. *J Virol* 1998; 72: 9016-9024

电编 李琪 编辑 潘伯荣

胃癌及癌前病变中P27和Cyclin E蛋白的表达意义

孔郁, 朴熙绪, 张媛, 朴东明

■背景资料

P27和Cyclin E均为细胞周期调控基因, 在多种恶性肿瘤中表达异常, 常有P27表达下降和Cyclin E表达增高。胃癌临床病理与P27和Cyclin E表达之间的关系也有一些文献报告, 但结果不尽一致。

孔郁, 朴熙绪, 张媛, 延边大学医院消化内科 吉林省延吉市 133000

朴东明, 延边大学医院病理科 吉林省延吉市 133000

孔郁, 2003年延边大学医学院内科学硕士, 主要从事胃癌分子病理学研究。

通讯作者: 朴熙绪, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医院消化内科, piaoxixu1951@yahoo.com.cn

电话: 0433-2660061 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2006-02-27 接受日期: 2006-03-11

Expression and significances of P27 and Cyclin E protein in gastric carcinoma and precancerous lesion

Yu Kong, Xi-Xu Piao, Yuan Zhang, Dong-Ming Piao

Yu Kong, Xi-Xu Piao, Yuan Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin province, China

Correspondence to: Xi-Xu Piao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin province, China. piaoxixu1951@yahoo.com.cn

Received: 2006-02-27 Accepted: 2006-03-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of P27 and Cyclin E protein in gastric carcinoma (GC) and precancerous lesion and their correlations with the clinicopathological parameters.

METHODS: Immunohistochemical staining was used to evaluate the expression of P27 and Cyclin E protein in the samples of normal gastric mucosa (NGM, $n = 20$), chronic superficial gastritis (CSG, $n = 20$), chronic atrophic gastritis (CAG) with metaplasia ($n = 20$), CAG with dysplasia ($n = 20$) and GC ($n = 60$), and their correlations with the clinicopathological parameters were analyzed.

RESULTS: The positive rates of P27 and Cyclin E protein expression were 100% and 5% in NGM, 85% and 10% in CSG, 70% and 20% in CAG with metaplasia, 45% and 30% in CAG with dysplasia, and 38.3% (23/60) and 40% (24/60) in GC,

respectively. The positive rate of P27 expression in GC and CAG with dysplasia were lower than that in NGM, CSG, and CAG with metaplasia ($P < 0.05$), and the positive rate of Cyclin E expression in GC and CAG with dysplasia were higher than that in NGM, CSG, and CAG with metaplasia ($P < 0.05$). The expression of P27 and Cyclin E were significantly correlated with tumor differentiation, infiltration and clinical stages, and P27 expression was also correlated with lymph nodes metastasis. Furthermore, the expression of P27 was inversely correlated with Cyclin E expression in GC ($r = -0.768$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: It is helpful to detect of P27 and Cyclin E protein expression in the judgment of GC progression, and combined analysis of them is of added prognostic value.

Key Words: Gastric carcinoma; P27; Cyclin E; Immunohistochemistry

Kong Y, Piao XX, Zhang Y, Piao DM. Expression and significances of P27 and Cyclin E protein in gastric carcinoma and precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1300-1304

摘要

目的: 探讨P27和Cyclin E蛋白在胃癌及癌前病变中的表达及其与胃癌病理参数之间的关系。

方法: 用免疫组化技术(SP法)对正常胃黏膜(normal gastric mucosa, NGM)、慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis CSG)、慢性萎缩性胃炎(chronic atrophia gastritis, CAG)伴肠上皮化生、慢性萎缩性胃炎伴非典型性增生各20例和胃癌(gastric carcinoma, GC)60例标本进行免疫组织化学染色, 分析P27和Cyclin E蛋白表达及其与胃癌临床和病理的关系。

结果: 各组胃组织中P27和Cyclin E蛋白表达阳性率分别为NGM组100%和5%, CSG组85%和10%, CAG伴肠化生组70%和20%, CAG伴不典型增生组45%和30%, 胃癌组38.3%和40%。胃癌组和CAG伴不典型增生组P27阳性率显著低于其他组($P < 0.05$), Cyclin E阳性率则显

著高于其他组($P<0.05$). P27和Cyclin E在胃癌中的表达分别与肿瘤分化程度、浸润深度及肿瘤临床分期相关, P27蛋白的表达尚与有无淋巴结转移相关. P27和Cyclin E蛋白在胃癌中的表达呈显著负相关($r=-0.768, P<0.05$).

结论: 检测胃癌组织中P27和Cyclin E蛋白的表达有助于判断肿瘤的进展程度, 两者联合检测有助于判断肿瘤预后.

关键词: 胃癌; P27; Cyclin E; 免疫组织化学

孔郁, 朴熙绪, 张媛, 朴东明. 胃癌及癌前病变中P27和Cyclin E蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1300-1304
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1300.asp>

0 引言

细胞周期调控异常与肿瘤发生、发展的关系日益受到重视. 我们运用免疫组化方法检测参与细胞周期调节的P27和Cyclin E蛋白在胃癌及癌前病变中的表达, 目的在于探讨他们在胃癌组织中表达及其与胃癌临床病理参数之间的相关性, 进而分析他们在胃癌发生、发展中的作用及预后价值.

1 材料和方法

1.1 材料 延边大学附属医院2000-01/2003-07手术切除标本存档蜡块. 其中20例NGM取自因十二指肠穿孔行手术切除的病例, 各20例的CSG、CAG伴肠上皮化生、CAG伴不典型增生均取自因胃穿孔或胃溃疡行手术切除的病例. 60例胃癌均为行胃癌根治术的病例, 且均未在手术前行放化疗. 所有切片均按全国胃癌协作组提出的标准, 由具有丰富经验的病理科主任医师进行复检. 每例选取1-2张切片的蜡块, 连续切片4 μm 厚. 进行常规HE染色和免疫组化染色.

1.2 方法 P27和Cyclin E蛋白的免疫组化测定按试剂盒说明进行. 试剂盒均购自北京中山试剂公司. 采用微波抗原修复. 免疫组化设阳性、阴性对照. P27和Cyclin E蛋白阳性反应物质均定位于胞核. 每张切片在高倍视野下分别取上、下、左、右及中心共5个区域进行细胞计数, 每个区计数200个细胞, 共计数1000个细胞, 计算染色细胞所占比例. 细胞核内出现棕黄色颗粒为P27或Cyclin E蛋白染色阳性, 阳性细胞数 $<10\%$ 为P27或Cyclin E蛋白表达阴性; 阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为P27或Cyclin E蛋白表达阳性.

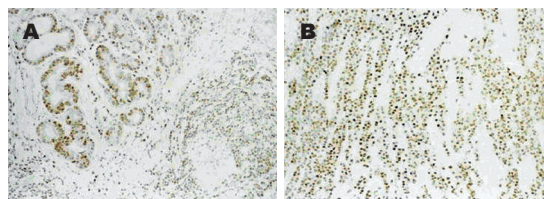


图1 胃腺癌组织免疫组化(SP)染色($\times 200$). A: 高分化(II级)P27癌细胞核阳性; B: 中分化(II级)Cyclin E癌细胞核阳性.

统计学处理 数据采用SPSS 11.0统计学软件进行处理. 采用 χ^2 检验、相关性检验方法进行分析, 当 $P<0.05$ 时差异有统计学意义.

2 结果

2.1 P27和Cyclin E的表达 P27蛋白在NGM, CSG, CAG伴肠上皮化生, CAG伴不典型增生和胃癌组织中的阳性率分别为100%, 85%, 70%, 55%, 38.3%. 而Cyclin E在上述组织中的阳性率分别为5%, 10%, 20%, 30%, 40%. P27和Cyclin E蛋白阳性表达率在胃癌组与CAG伴不典型增生组之间差异无显著性($P>0.05$), 而与其他各组差异有显著性($P<0.05$).

2.2 P27和Cyclin E表达与胃癌临床病理的关系 P27蛋白表达多见于浸润浅、分化好、淋巴结转移少、临床分期早的胃癌组织(图1A). P27蛋白表达水平与肿瘤浸润深度($P<0.05$)、淋巴结转移($P<0.05$)、分化程度($P<0.05$)、临床分期($P<0.05$)均相关, 而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、Bormann分型等均无明显相关($P>0.05$, 表1). Cyclin E蛋白表达多见于浸润深、分化差、临床分期晚的胃癌组织(图1B). Cyclin E蛋白表达水平与肿瘤分化程度($P<0.05$)、浸润深度($P<0.05$)及临床分期($P<0.05$)相关, 而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、Bormann分型、淋巴结转移等均无明显相关($P>0.05$, 表1).

2.3 胃癌P27和Cyclin E的相关性 胃癌组织P27和Cyclin E蛋白表达呈负相关, 相关系数($r=-0.768, P<0.05$). Cyclin E蛋白表达阳性的肿瘤, 其P27蛋白表达阳性率(16.7%)显著低于Cyclin E蛋白表达阴性者(52.8%, $P<0.05$). 在中高分化、浸润未达浆膜层、无淋巴结转移及临床I、II期胃癌中, P27阳性并Cyclin E阴性者显著多于P27阴性并Cyclin E阳性者($P<0.01$), 相反在低分化或未分化、浸润已达浆膜层、有淋巴结转移及临床III、IV期胃癌中, P27阴性并Cyclin E阳性者显著多于P27阳性并Cyclin E阴性者($P<0.01$ 或 $P<0.05$, 表2).

■ 研究前沿

胃癌的发生、发展被认为是多种基因参与, 经过多阶段的事件. 因此在胃癌发生的不同阶段各种相关基因的表达及相互作用的研究以及P27和Cyclin E等基因表达的临床及预后意义研究很受重视.

■创新盘点

本文对正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生、慢性萎缩性胃炎伴非典型性增生及胃癌组织中检测P27和Cyclin E表达,分析胃炎不同阶段至胃癌的P27和Cyclin E表达情况,分别探讨这两种基因表达的单独或联合检测结果与胃癌临床病理参数及预后的关系。

表 1 P27和Cyclin E蛋白表达与胃癌临床病理参数的关系 *n* (%)

临床病理参数	<i>n</i>	P27 ^{KIP1} 阳性	Cyclin E阳性
性别			
男	43	18 (41.9)	18 (41.9)
女	17	5 (29.4)	6 (35.3)
年龄			
<60岁	33	16 (48.5)	16 (48.5)
≥60岁	27	11 (40.7)	8 (29.6)
肿瘤大小			
≤4 cm	29	13 (44.8)	13 (44.8)
>4 cm	31	10 (32.3)	11 (35.5)
肿瘤部位			
胃窦部	30	6 (20.0)	9 (30.0)
贲门胃底部	16	8 (50.0)	7 (43.8)
胃体部	14	9 (64.3)	8 (57.1)
Bormann分型			
I, II型	23	10 (43.5)	11 (47.8)
III, IV型	37	13 (35.1)	13 (35.1)
肿瘤分化			
中高	26	18 (69.2) ^a	5 (19.2) ^a
低或未	34	5 (14.7)	19 (55.9)
浸润深度			
未达浆膜层	12	8 (66.7) ^a	3 (25.0) ^a
已达浆膜层	48	15 (31.3)	21 (43.8)
淋巴结转移			
阴性	30	16 (53.3) ^a	9 (30.0)
阳性	30	7 (23.3)	13 (43.3)
临床分期			
I, II期	19	12 (63.2) ^a	4 (21.1) ^a
III, IV期	41	11 (26.8)	20 (48.8)

^a*P*<0.05.

3 讨论

参与细胞周期调控的分子有:细胞周期蛋白(或细胞周期素, cyclin)、周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、磷酸化酶以及周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(cyclin-dependent kinase inhibitory protein, CDKI)等。由cyclin-CDK-CDKI构成了细胞周期中的中心网络调控系统,其中中心分子是CDK。cyclin、CDKI通过调节CDK活性,使活化的CDK作用于(磷酸化)相应的特定期相中的一套底物,进而对细胞周期起调节作用。p27^{KIP1}基因是Koff *et al*^[1]于1993年在研究经TGF-β及接触性处理的细胞中发现的一种 M_r 27 000的热稳定蛋白。Polyak *et al*^[2]于1994年克隆其cDNA。该基因对细胞周期具有负调控作用,主要通过CDK或CDK-cyclin复合物结合,尤其抑制Cyclin E-CDK2复合物的活性,

表 2 胃癌中P27和Cyclin E表达的组合与临床病理的关系

临床病理参数	<i>n</i>	P27(+)/Cyclin E(-)	P27(-)/Cyclin E(+)
分化			
中高分化	26	16 (61.5%)	5 (19.2%) ^b
低分化或未分化	34	3 (8.8%)	15 (44.1%) ^b
浸润			
未达浆膜层	12	8 (66.7%)	2 (16.7%) ^b
已达浆膜层	48	11 (22.9%)	18 (37.5%) ^a
淋巴结转移			
阴性	30	16 (53.3%)	4 (13.3%) ^b
阳性	30	3 (10.0%)	16 (53.3%) ^b
临床分期			
I, II期	19	16 (84.2%)	2 (10.5%) ^b
III, IV期	41	3 (2.4%)	18 (43.9%) ^b

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

控制着细胞周期G₁/S的转变,实现对CDK活性的抑制。其基因缺失、突变罕见于人类肿瘤中^[3-4],其mRNA水平在细胞周期中保持相对稳定,但其蛋白水平在多种肿瘤中明显下降^[5]。已有研究^[6-10]发现P27^{KIP1}与多种肿瘤的预后相关,如乳腺癌、食管癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、大肠癌等。我们发现, P27蛋白表达阳性率在NGM、CSG、CAG伴肠上皮化生、CAG伴非典型性增生和GC组中呈逐渐下降趋势。GC组与CAG伴不典型性增生组无显著性差异(*P*>0.05),而与其他各组有显著性差异(*P*<0.05)。提示在从正常胃黏膜到胃癌的演变过程中, p27基因逐渐失去了抑制细胞增殖、促进细胞正常分化的功能,其蛋白水平的降低与胃癌的发生有密切关系。本研究表明,胃癌组织中P27表达阳性率明显降低,仅为38.3%(23/60),与文献报道相符^[11-14]。P27是一个细胞周期负调控因子,他在G₀期浓度最高,他的水平高低提示细胞的增殖能力和细胞的状态^[15],一旦受到恶性增殖信号的刺激, P27蛋白表达水平开始下降,一方面由于合成降低,更主要是通过细胞蛋白翻译后降解途径的速度提高^[16],这个降解途径在细胞的静止期作用很小,而在细胞接受增殖信号后明显增强。P27蛋白表达的下降降低了他对CDK活性的抑制效应,导致CDK的毒性效应递增,从而能够充分的维持pRb的失活效应,使细胞能够完成细胞周期G₁/S的重要转换,无法阻断细胞进行增殖、分裂,乃至肿瘤形成。

P27与胃癌临床病理之间关系的研究报告较多,但结果不尽一致^[17-20]。本实验表明, P27的

低表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、分化程度和临床分期呈负相关, 统计学有显著性差异 ($P<0.05$), 而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、Bormann分型等临床病理参数无关. P27蛋白表达阳性多见于浸润浅、分化好、无淋巴结转移、临床分期早的胃癌组织中, 而其表达阴性则多见于浸润深、分化差、有淋巴结转移、临床III、IV期的胃癌组织中. 提示P27在胃癌的进展、转移中起一定作用. P27作为具有抑癌作用的细胞周期负调控因子, 在胃癌进展过程中表达逐渐下降, 功能逐渐丧失, 使癌细胞更具侵袭力、恶性程度更高、淋巴结转移更快, 预后更差.

Cyclin E是一种核蛋白质, 最初是从酿酒酵母菌中提取出来的^[21-22], Cyclin E的表达受细胞周期调节, 并在G₁期末达到高峰, 并激活CDK2, Cyclin E/CDK2复合物在细胞进入S期前显示出短暂而强烈的酶活性, 并引起Rb蛋白的进一步磷酸化, Cyclin E/CDK2复合物的活性可被P21^{WAF/CIP1}, P27^{KIP1}等CDIs系列中的成员所调节. 在异常情况下, Cyclin E蛋白失去周期性表达, 而在整个细胞周期中高水平表达, 则可持续地整个细胞周期中激活CDK2, 促使G₁/S期转换, 使细胞发生异常增殖^[23-24]. 国外学者在肺、肾、胰腺、胃、结肠、子宫、睾丸、内分泌以及食管肿瘤的研究中认为Cyclin E可能是一个致癌基因, 在肿瘤组织中他的表达在质和量上均有异常.

我们发现, Cyclin E蛋白表达阳性率在NGM, CSG, CAG伴肠上皮化生, CAG伴不典型增生以及GC组中逐渐升高. GC组与CAG伴不典型增生组无显著性差异, 而与其他各组有显著性差异 ($P<0.05$). 提示Cyclin E蛋白的过度表达在胃癌的发生、发展过程中起重要的作用. 已有研究提示, Cyclin E蛋白的表达与胃癌临床严重程度、组织学恶性程度及预后有关^[25-26]. 在本组胃癌组织中, Cyclin E的表达与肿瘤分化程度、浸润程度及肿瘤分期相关, 统计学有显著性差异 ($P<0.05$), 在分化差、浸润深、分期高的肿瘤Cyclin E蛋白表达阳性率更高, 提示Cyclin E蛋白表达与胃癌的进展有关.

近年来, 胃癌分子标记物与临床病理关系的研究多采用同一标本中多种标记物检测方法^[27-28]. 本研究同时检测两种分子标记物结果, P27蛋白表达与Cyclin E蛋白的表达呈显著负相关, 与既往报道一致^[12,29]. 本组胃癌患者中, P27

表达阳性并Cyclin E表达阴性的多为浸润浅、分化好、无淋巴结转移、临床分期为I, II期的患者; 相反, P27表达阴性并Cyclin E表达阳性的多为浸润深、分化差、有淋巴结转移、临床分期为III、IV期的患者. 这可能是由于Cyclin E表达增加, 加速细胞周期从G₁向S期过度, 而P27低表达失去了对Cyclin E/CDK2复合物活性的抑制, 二者共同作用, 加速肿瘤的进展, 使肿瘤更具侵袭性, 恶性程度更高^[30-31]. 新近的研究提示, P27缺陷鼠被感染*H pylori*后随时间推移逐渐发生胃黏膜的肠上皮化生及不典型增生^[32], 根除*H pylori*可使慢性胃炎患者的胃黏膜P27表达显著升高^[33]. 本研究中CAG伴不典型增生组的P27和Cyclin E表达阳性率与胃癌组相似. 这与*H pylori*感染的关系及不同阶段慢性胃炎中P27和Cyclin E表达与其发生胃癌的潜能之间关系很值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 1993; 260: 536-539
- 2 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66
- 3 Kim DH, Lee HI, Nam ES, Shin HS, Sohn JH, Park CH, Yoon DS, Song SY, Park YE. Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2000; 36: 245-251
- 4 Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 262-265
- 5 Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996; 271: 1861-1864
- 6 Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3: 227-230
- 7 Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27(Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. *Oncology* 1999; 57: 311-317
- 8 Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3381-3385
- 9 Kuczyk M, Machtens S, Hradil K, Schubach J, Christian W, Knuchel R, Hartmann J, Bokemeyer C, Jonas U, Serth J. Predictive value of decreased

■应用要点

检测P27和Cyclin E的表达有助于胃癌严重度及预后估计, 也可能有助于各种不同阶段胃炎向胃癌发展潜在危险性的评估.

■同行评价

本文有一定的可读性,亦有一定的科学性。

- 10 Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3: 231-234
- 11 宋传贵, 卢辉山, 张祥福. p27^{KIP1}和细胞周期蛋白D1在胃癌中的表达及其预后意义. *中国癌症杂志* 2001; 11: 309-312
- 12 夏加增, 杨继昌, 张熔熔, 朱正纲, 尹浩然. 胃癌中 cyclinD1、Cyclin E和p27的表达及其意义. *中国普外基础与临床杂志* 2001; 8: 148-150
- 13 万美珍, 陈玉芳, 朱友群. p27^{KIP1}在胃癌中的表达及意义. *肿瘤防治杂志* 2003; 10: 144-145
- 14 Al-Moundhri MS, Nirmala V, Al-Hadabi I, Al-Mawaly K, Burney I, Al-Nabhani M, Thomas V, Ganguly SS, Grant C. The prognostic significance of p53, p27 kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol* 2005; 91: 243-252
- 15 Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996; 85: 707-720
- 16 Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269: 682-685
- 17 闫庆辉, 宋伟庆, 任鹏涛, 王凤安, 蔡建辉. p27和细胞核增殖抗原在胃癌中的免疫组化研究. *中国实用外科杂志* 2004; 24: 40
- 18 倪耀忠, 姚钰, 张学森, 罗定存, 万涛. p27^{KIP1}在胃癌与癌旁黏膜中的表达及意义. *温州医学院学报* 2002; 32: 96-97
- 19 Lee SJ, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of cyclin dependent kinase inhibitors of KIP family in gastric cancer. *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 84-93
- 20 Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarelli R, Segato P, Lise M. Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol* 2002; 81: 167-175
- 21 Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991; 66: 1217-1228
- 22 Lew DJ, Dulic V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 1991; 66: 1197-1206
- 23 Gong J, Ardel B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 1994; 54: 4285-4288
- 24 Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1669-1679
- 25 Liang WJ, Zhang WD, Zhang YL, Liu LM. Association of TGFalpha and cyclin E expression in gastric carcinoma and precancerous lesions. *Aizheng* 2004; 23: 259-263
- 26 Tenderenda M. A study on the prognostic value of cyclins D1 and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histoclinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 405-414
- 27 Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 86-94
- 28 Sun Y, Li JY, He JS, Zhou LX, Chen K. Tissue microarray analysis of multiple gene expression in intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma of the stomach. *Histopathology* 2005; 46: 505-514
- 29 Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 625-629
- 30 So JB, Samarasinghe K, Raju GC, Moochhala SM, Ti TK. Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients. *J Surg Res* 2000; 94: 56-60
- 31 Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Tanabe G, Baba M, Kuroshima K, Aikou T. The cooperative role of p27 with cyclin E in the prognosis of advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1214-1219
- 32 Kuzushita N, Rogers AB, Monti NA, Whary MT, Park MJ, Aswad BI, Shirin H, Koff A, Eguchi H, Moss SF. p27kip1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology* 2005; 129: 1544-1556
- 33 Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after H. pylori eradication in chronic gastritis. *Mod Pathol* 2006; 19: 49-58

电编 张敏 编辑 潘伯荣

肝癌经肝动脉栓塞化疗后VEGF和CD44v6表达的意义

李兴睿, 杨志芳, 易继林

李兴睿, 杨志芳, 易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 李兴睿, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科. chenwenyyy@163.com
电话: 027-83663818
收稿日期: 2006-02-17 接受日期: 2006-03-15

Expression of CD44v6 and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial chemoembolization

Xing-Rui Li, Zhi-Fang Yang, Ji-Lin Yi

Xing-Rui Li, Zhi-Fang Yang, Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Correspondence to: Xing-Rui Li, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. lixingrui@sina.com

Received: 2006-02-17 Accepted: 2006-03-15

Abstract

AIM: To investigate the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD44v6 in the recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) after transcatheter hepatic arterial chemoembolization (TACE).

METHODS: The expression of CD44v6 and VEGF in 29 HCC samples obtained from the patients underwent secondary hepatectomy after TACE was examined by immunohistochemical staining and morphometric analysis. HCC samples ($n = 30$) obtained from the patients without TACE were used as the control group.

RESULTS: The value of VEGF absorbance in the TACE group was 0.149 ± 0.021 , significantly higher than that in the controls (0.134 ± 0.018 , $P < 0.05$). The positive rate of CD44v6 expression was 82.8% and 66.7% in the TACE group and control group, respectively, without significant difference between them ($P > 0.05$). The numbers of

CD44v6 positive cells were also not markedly different between the two groups (112.4 ± 22.3 vs 102.4 ± 21.2 , $P > 0.05$).

CONCLUSION: VEGF may take part in the recurrence and metastasis of HCC after TACE, while CD44v6 may not.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Transcatheter hepatic arterial chemoembolization; Vascular endothelial growth factor; CD44v6

Li XR, Yang ZF, Yi JL. Expression of CD44v6 and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial chemoembolization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1305-1308

摘要

目的: 探讨VEGF和CD44v6在肝癌经肝动脉栓塞化疗(TACE)术后复发和转移中的作用。

方法: 选取经TACE治疗后二期切除的肝癌标本29例, 以同期单纯手术切除的30例标本作为对照, 采用免疫组织化学和图像分析的方法检测VEGF和CD44v6的表达。

结果: TACE治疗组与单纯手术组的VEGF吸光度A值分别为 0.149 ± 0.021 和 0.134 ± 0.018 , 前者明显高于后者($P < 0.05$); TACE治疗组与单纯手术组的CD44v6表达阳性率分别为82.8% 和66.7%, 阳性细胞数分别为 112.4 ± 22.3 /视野和 102.4 ± 21.2 /视野, 两者间差异均无显著性($P > 0.05$)。

结论: VEGF可能参与了TACE术后肝癌的复发和转移, 而CD44v6可能并不是TACE术后肝癌复发和转移的主要因素。

关键词: 肝细胞癌; 经肝动脉化疗栓塞术; 血管内皮生长因子; CD44v6

李兴睿, 杨志芳, 易继林. 肝癌经肝动脉栓塞化疗后VEGF和CD44v6表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1305-1308
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1305.asp>

■背景资料

经导管肝动脉栓塞化疗术(TACE)是肝癌综合治疗中的一项重要方法。然而, TACE治疗具有较高的复发率。迄今为止, TACE术后复发和转移的机制尚不清楚。

■创新盘点

本文将VEGF和CD44v6与TACE术后肿瘤转移复发联系起来, 研究其发生机制, 结果证实VEGF可能参与了TACE术后肝癌的复发和转移, 而CD44v6可能并不是TACE术后肝癌复发和转移的主要因素。

0 引言

经导管肝动脉栓塞化疗术(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)是肝癌综合治疗中的一项重要方法。对于不可切除的肝癌, TACE治疗可有效地延长患者生存期, 部分患者因肿瘤缩小可获得二期手术切除机会。然而, TACE治疗具有较高的复发率, 接受TACE治疗的患者中, 肝内外转移也明显多见。迄今为止, TACE术后复发和转移的机制尚不清楚。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是肿瘤组织中最重要血管生成因子, 不仅与肿瘤血管发生、增殖有关, 而且直接参与其浸润和转移^[1-7]。此外, 近来研究发现, 黏附分子CD44的一种变异体CD44v6与多种肿瘤的侵袭转移有关^[8-13]。我们采用免疫组织化学方法, 观察TACE治疗后残留肝癌组织中CD44v6和VEGF的表达情况, 探讨CD44v6和VEGF在TACE治疗后肝癌复发和转移中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 我院1990-01/2000-01行TACE治疗后, 接受二期切除术的肝癌患者34例, 成功回访29例(85.3%); 选取同期仅接受手术切除治疗, 并有完整资料的肝癌患者30例(单纯手术组)作为对照。各组病例均按照全国肝癌防治协会制定的标准或病理诊断为原发性肝癌。两组年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤结节数目、AFP值、肿瘤包膜有无等临床资料间均无显著性差异。TACE方法采用Seldinger技术, 常规做肠系膜上动脉间接门脉造影及腹腔动脉造影, 再做肿瘤供血动脉选择性和超选择性插管。经导管注入丝裂霉素(MMC)10-16 mg, 5-氟脲嘧啶(5-FU)1500-2000 mg或顺铂(CDPP)100 mg/m², 再灌注含药碘化油, 最后用明胶海绵颗粒(8 mm³, 100-300粒)栓塞肝动脉血管近端。

1.2 方法 标本于我院病理科经40 g/L甲醛液固定后, 常规脱水, 石蜡包埋, 分别于癌旁正常组织、肿瘤区和坏死组织取材切片, 作4 μm连续切片。HE染色并经病理诊断证实。采用SABC法进行免疫组织化学染色, 兔抗人CD44v6购自北京中山生物技术有限公司, 兔抗人VEGF单克隆抗体及SABC试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司, 具体方法按试剂盒说明书操作。VEGF表达以肿瘤细胞及血管内皮细胞胞质内出现棕黄色颗粒为VEGF阳性, 选取阳性细胞密集区域, 在高倍显微镜(×400)下选取4个视野, 应用高清晰度彩色

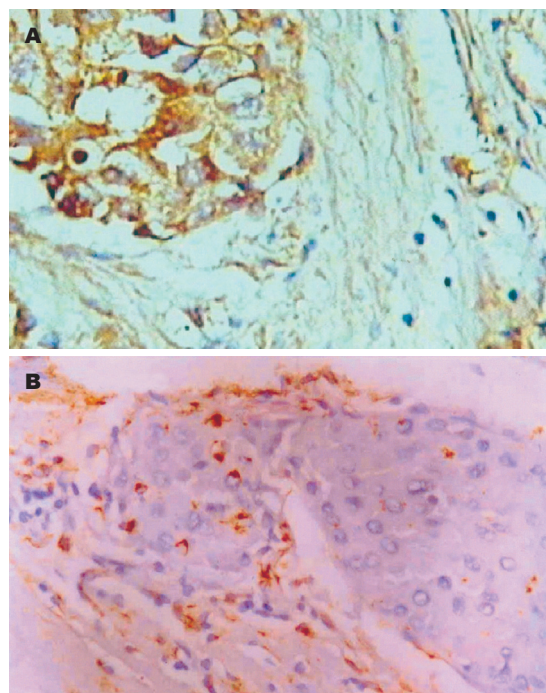


图1 VEGF和CD44v6在TACE后癌组织的表达。A: VEGF(SP); B: CD44v6(SABC)。

病理图像分析系统(HPIAS-1000)测定平均吸光度值(A), 代表阳性胞质单位面积内VEGF相对含量。CD44v6表达以细胞质及细胞膜呈棕黄色为阳性细胞, 首先于低倍视野下选取阳性细胞较集中的5个区域, 再于200倍视野下计数阳性细胞数并取其平均值。

统计学处理 数据采用SAS软件V6.4进行分析, 数据mean±SD形式表示, 计量数据统计处理采用t检验, 计数数据统计处理采用χ²检验。

2 结果

TACE组5例(17.2%)肿瘤发生完全坏死, 其余24例(82.8%)均为不完全坏死。镜下可见, 坏死肿瘤为大片凝固性坏死改变, 呈红染无结构坏死物。坏死肿瘤周边可见残存癌巢, 被纤维隔膜包绕成大小不等的岛状肿瘤结节。残存的肿瘤细胞有不同程度的变性, 如透明样变、气球样变等。肿瘤周边有纤维结缔组织包绕, 有大量炎性细胞浸润。

2.1 VEGF在肝癌组织中的表达 VEGF阳性颗粒定位于肿瘤细胞的胞质内。VEGF阳性的肿瘤细胞分布呈异质性, 强阳性染色的肿瘤细胞多位于肿瘤浸润边缘及肿瘤包膜附近。TACE治疗后肿瘤坏死区周围的残留癌巢内可见强阳性的肿瘤细胞分布(图1A)。图像分析显示, TACE治疗后残留癌组织内VEGF的表达明显强于单纯手术

表 1 VEGF和CD44v6在肝癌组织的表达

分组	n	VEGF表达值	CD44v6 阳性例数 (%)	CD44v6 阳性细胞数
单纯手术	30	0.134 ± 0.018	20 (66.7)	102.4 ± 21.2
TACE	29	0.149 ± 0.021 ^a	24 (82.8)	112.4 ± 22.3

^aP<0.05, TACE vs 单纯手术.

组($t = 2.587, P < 0.05$, 表1).

2.2 CD44v6在肝癌组织中的表达 肝癌组织内可见CD44v6的强阳性表达, 主要集中于细胞质和细胞膜上. 在TACE治疗后的残留癌中也可见CD44v6的表达(图1B). 30例单纯手术切除组的肝癌组织中, CD44v6阳性者20例, 阳性率为66.7%; 29例TACE治疗后的残留癌中, CD44v6阳性者24例, 阳性率为82.8%, 高于前者, 但两者间无显著性差异. 细胞计数结果发现, TACE治疗后肝癌组织中CD44v6的阳性细胞数为112.4 ± 22.3, 多于单纯手术组的CD44v6阳性细胞数, 但是两者间亦无显著性差异($P > 0.05$, 表1).

3 讨论

TACE是肝癌综合治疗中的一项重要方法, 一部分不可切除的肝癌患者经TACE治疗后, 获得了二期切除的机会. 然而在20多年的临床应用中, TACE也暴露出了其缺点和局限性. TACE不能根治性治疗肝癌患者, 而且经TACE治疗后, 肝癌具有很高的复发和转移率. 关于TACE治疗后肝癌高复发和转移的机制目前尚不清楚. VEGF是一个 M_r 为46 000的高度糖基化碱性蛋白, 可由正常细胞及肿瘤细胞产生和分泌^[14-17]. 作为肿瘤组织中最主要的血管生成因子, VEGF不仅与肿瘤血管的发生、增殖有关, 而且直接参与其浸润和转移^[18-22]. 我们发现, 在肝癌组织内有VEGF的表达, 而且VEGF的表达水平明显高于邻近正常组织, 强阳性染色的肿瘤细胞多位于肿瘤浸润边缘或肿瘤包膜附近, 而且TACE治疗后残留癌巢内VEGF表达明显高于单纯手术组. 残留癌巢高表达VEGF的原因目前尚不清楚, 可能是TACE治疗造成的缺血、缺氧环境以及化疗药物的作用, 杀死了恶性程度较低的肿瘤细胞, 而残留的恶性程度较高的肿瘤细胞表现出更高的VEGF表达状态; 或者缺血、缺氧促进了肿瘤细胞自身分泌更多的VEGF^[23-26]. VEGF在TACE治疗后残留癌组织中的高表达可能是引起肝癌高复发和转移的一个重要原因. VEGF的

高表达可以促进新生血管的形成, 一方面可促使肿瘤发生转移; 另一方面可使得肿瘤组织无法完全坏死而残留癌巢, 为以后的复发和转移奠定基础.

人类CD44基因定位于11号染色体短臂上, 全长约50 kb, 由20个高度保守的外显子组成. 含有变异性拼接外显子的CD44转录子称为CD44v, CD44v6是CD44的一种变体, 具有v6外显子编码的功能区^[27]. 近来研究发现, CD44v6参与了多种肿瘤的转移. 作为一种细胞黏附因子, CD44v6在细胞外基质中与透明质酸结合, 促进细胞浸润和介导细胞迁移^[28]; 此外, CD44v6高表达的癌细胞可能获得淋巴细胞的“伪装”, 逃避人体免疫系统的识别和杀伤, 产生免疫逃避, 因而更易进入淋巴管, 形成转移^[29]. 对肝癌组织的研究发现, 肝癌组织中CD44v6的阳性表达明显高于癌旁组织, 提示CD44v6参与了肝癌的发生^[30]. 然而关于CD44v6与TACE术后肝癌复发转移的关系, 尚未见文献报道. 我们发现, 虽然TACE治疗后的肝癌组织中CD44v6表达阳性的例数和细胞数多于未经TACE治疗的肝癌, 但是两者间无显著性差异, 提示CD44v6可能并不是TACE术后肝癌的复发和转移的主要因素, 其表达并不受TACE治疗所造成的缺血、缺氧等因素的影响. 但由于本组样本量不多, 关于CD44v6在TACE术后肝癌复发和转移中的确切作用还需进一步大样本的研究.

4 参考文献

- Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2239-2245
- Kitagawa Y, Dai J, Zhang J, Keller JM, Nor J, Yao Z, Keller ET. Vascular endothelial growth factor contributes to prostate cancer-mediated osteoblastic activity. *Cancer Res* 2005; 65: 10921-10929
- Dai J, Kitagawa Y, Zhang J, Yao Z, Mizokami A, Cheng S, Nor J, McCauley LK, Taichman RS, Keller ET. Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein. *Cancer Res* 2004; 64: 994-999
- Krupski T, Harding MA, Herce ME, Guldin KM, Stoler MH, Theodorescu D. The role of vascular endothelial growth factor in the tissue specific *in vivo* growth of prostate cancer cells. *Growth Factors* 2001; 18: 287-302
- Kim LS, Huang S, Lu W, Lev DC, Price JE. Vascular endothelial growth factor expression promotes the growth of breast cancer brain metastases in nude mice. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 107-118
- Yano S, Shinohara H, Herbst RS, Kuniyasu H,

■应用要点

VEGF可能参与了TACE术后肝癌的复发和转移, 可作为TACE术后肝癌复发转移的检测指标.

■同行评价

本文立意依据较好, 创新性较强, 研究方法可行, 试验结果可靠, 是一篇学术价值较高的论文。

- 7 Qiu MB, Zhang JX, Liu LM, Gong BD, Wu BL, Zhu SS, Wen Y. Inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotide on expression of vascular endothelial growth factor by human hepatocarcinoma cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 552-557
- 8 Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, Kudo T, Hirohashi S, Ochiai A, Tohnai I, Ueda M, Kimata K. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncol Rep* 2003; 10: 1919-1924
- 9 Lou G, Gao Y, Ning XM, Zhang QF. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5032-5036
- 10 Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 1999; 56: 232-238
- 11 Xu YP, Zhao XQ, Sommer K, Moubayed P. Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci* 2003; 4: 491-501
- 12 Sun XM, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Clinical significance of detecting VEGF, CD44v6, MMP-2, and MMP-9 in malignant ascites. *Aizheng* 2004; 23: 85-89
- 13 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, Ma JP. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 776-782
- 14 Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, Frilling A, Haussinger D. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol* 2004; 41: 274-283
- 15 Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2006; 118: 879-888
- 16 Munaut C, Noel A, Hougrand O, Foidart JM, Boniver J, Deprez M. Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. *Int J Cancer* 2003; 106: 848-855
- 17 Yabushita H, Shimazu M, Noguchi M, Kishida T, Narumiya H, Sawaguchi K, Noguchi M. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascitic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Oncol Rep* 2003; 10: 89-95
- 18 Wey JS, Stoltzing O, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Oncol* 2004; 2: 37-45
- 19 Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 2005; 104: 427-438
- 20 Huang H, Held-Feindt J, Buhl R, Mehdorn HM, Mentlein R. Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors. *Neurol Res* 2005; 27: 371-377
- 21 Enholm B, Jussila L, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-C: a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 292-297
- 22 Lu ZQ, Li HG, Xie DR, Zhang HZ, Shen XM, Zeng YJ, Zeng H. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in non-small cell lung carcinoma. *Aizheng* 2005; 24: 1132-1135
- 23 Xiong ZP, Yang SR, Liang ZY, Xiao EH, Yu XP, Zhou SK, Zhang ZS. Association between vascular endothelial growth factor and metastasis after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 386-390
- 24 Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X. Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2878-2882
- 25 Poon RT, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. High serum levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Oncol Rep* 2004; 11: 1077-1084
- 26 Xiong ZP, Yang SR, Xiao EH, Zhou SK, Zhang ZS, Liang ZY. Relation between vascular endothelial growth factor and reoccurrence-metastasis after transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003; 25: 562-565
- 27 Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, Shiono O, Kokatu T, Kubota A, Furukawa M, Tsukuda M. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 2005; 26: 308-313
- 28 Gao C, Guo H, Downey L, Marroquin C, Wei J, Kuo PC. Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG₂ cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1871-1878
- 29 Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, Zoller M. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 1992; 257: 682-685
- 30 张庆光, 李燕屏. 肝细胞癌组织CD44v6的检测及其临床意义. *中国肿瘤临床与康复* 2002; 9: 7-9

电编 李琪 编辑 潘伯荣

蒙、汉族人群小肠脂肪酸结合蛋白基因Ala54Thr多态性的频率

王振辉, 常晓彤, 侯小平, 董明纲, 王洪涛, 张利, 李桂喜

王振辉, 侯小平, 王洪涛, 张利, 李桂喜, 中国人民解放军第251医院检验科 河北省张家口市 075000
常晓彤, 董明纲, 河北北方学院生物化学教研室 河北省张家口市 075000
王振辉, 1992年张家口医学院本科毕业, 2002年第三军医大学硕士, 检验医师, 主要从事代谢综合征方面的研究。
通讯作者: 王振辉, 075000, 河北省张家口市建国路13号, 解放军第251医院检验科. wangzh680927@sina.com
电话: 0313-8785616
收稿日期: 2006-03-02 接受日期: 2006-03-21

Investigation of Ala54Thr polymorphism in intestinal fatty acid binding protein in Han and Mongoloid populations

Zhen-Hui Wang, Xiao-Tong Chang, Xiao-Ping Hou, Ming-Gang Dong, Hong-Tao Wang, Li Zhang, Gui-Xi Li

Zhen-Hui Wang, Xiao-Ping Hou, Hong-Tao Wang, Li Zhang, Gui-Xi Li, Department of Clinical Laboratory, the 251st Hospital of Chinese PLA, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Xiao-Tong Chang, Ming-Gang Dong, Department of Biochemistry, Hebei Normal University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Correspondence to: Zhen-Hui Wang, Department of Clinical Laboratory, the 251st Hospital of Chinese PLA, 13 Jianguo Avenue, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China. wangzh680927@sina.com
Received: 2006-03-02 Accepted: 2006-03-21

Abstract

AIM: To investigate the single nucleotide polymorphism (SNP) at the 54Ala/Thr (A/T) in the intestinal fatty acid binding protein (IFABP) gene in Hans and Mongolians.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR), restriction endonuclease (*HhaI*) digestion and DNA sequencing technique were performed to detect the IFABP gene polymorphism at the 54Ala/Thr in 208 Mongolians of pastoral area, 150 Mongolians of Zhangjiakou city and 190 Hans.

RESULTS: The allelic frequency of 54Thr was 0.51, 0.33, and 0.30, while that of 54Ala was 0.49, 0.67, and 0.70 in Mongolians of pastoral area,

Zhangjiakou city and 190 Hans, respectively. In comparison with that of Mongolians in urban area and Hans, the allelic frequency of codon 54Thr in Mongolians of pastoral area was significantly increased ($\chi^2 = 22.98$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 34.23$, $P < 0.01$, respectively), however, it was not significantly different between the Mongolians of urban area and Hans.

CONCLUSION: The IFABP gene polymorphism at 54A/T has no correlation with ethnics among Mongolians and Hans, and the high frequency of 54Thr mutant genotype in Mongolians of pastoral area may be associated with high-fat dieting.

Key Words: IFABP gene; Single nucleotide polymorphism; High-fat diet; Mongolians; Hans

Wang ZH, Chang XT, Hou XP, Dong MG, Wang HT, Zhang L, Li GX. Investigation of Ala54Thr polymorphism in intestinal fatty acid binding protein in Han and Mongoloid populations. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1309-1313

摘要

目的: 调查蒙、汉族人群小肠脂肪酸结合蛋白(IFABP)基因exon II 54位点编码丙氨酸或苏氨酸(A/T)单核苷酸多态性(SNP), 探讨不同种族、饮食习惯与IFABP基因多态性频率分布的关系。

方法: 采用聚合酶链反应(PCR), DNA限制性内切酶酶切及基因测序等技术, 分别对208例牧区蒙古族人群、150例张家口市蒙古族人群和190例汉族人群54A/T IFABP基因型分析。

结果: 牧区蒙古族人群54T等位基因频率为0.51, 54A等位基因频率为0.49; 市区蒙古族人群54T等位基因频率为0.33, 54A等位基因频率为0.67; 汉族人群54T等位基因频率为0.30, 54A等位基因频率为0.70。与市区蒙古族人群、汉族人群相比, 牧区蒙古族人群突变型54T等位基因频率明显增高, 且差别有统计学意义(分别为 $\chi^2 = 22.98$, $P < 0.01$; $\chi^2 =$

■背景资料

脂类代谢异常与心血管疾病的发生密切相关, 环境与遗传因素的相互作用越来越引起关注。目前的研究结果显示, IFABP基因第2外显子54Ala/Thr突变可能与腹性肥胖、高血脂、高血糖、胰岛素抵抗等代谢综合征有关。本文探讨了不同种族、不同饮食习惯与等位基因54Ala/Thr频率分布的关系, 为今后进一步研究打下理论基础。

■同行评价

本文比较蒙汉人群IFABP Ala54Thr多态性频率, 观察生活习惯对他的影响, 有一定的创新性, 有较大的理论意义. 设计合理, 技术先进, 结果可靠.

34.23, $P < 0.01$). 市区蒙古族和汉族相比较, 突变型54T等位基因频率无明显差异($\chi^2 = 0.47$, $P > 0.05$).

结论: 蒙、汉族人群IFABP基因54A/T多态性频率分布无种族差别; 牧区蒙古族人群突变型54T IFABP基因高频率分布可能与高脂饮食习惯有关.

关键词: IFABP基因; 单核苷酸多态性; 高脂饮食; 蒙古族; 汉族

王振辉, 常晓彤, 侯小平, 董明纲, 王洪涛, 张利, 李桂喜. 蒙、汉族人群小肠脂肪酸结合蛋白基因Ala54Thr多态性的频率. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1309-1313

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1309.asp>

0 引言

基因多态性构成了不同个体与群体对疾病的易感性、对药物与环境因子不同反应的遗传学基础. 肥胖、高血脂、高血糖等代谢综合征的发生、发展受饮食、环境及遗传等多因素影响, 而胰岛素抵抗是其形成的中心环节. 在代谢综合征发生机制的探索中, 相关基因多态性改变越来越引起关注. IFABP定位于小肠上皮吸收细胞, IFABP基因exon II 54位点可编码丙氨酸或苏氨酸(A/T), 具有单核苷酸多态性. 近年来, 国外学者相继报道, 突变型54T IFABP与高脂血症、II型糖尿病、胰岛素抵抗相关^[1]. 我们通过对蒙、汉族人群IFABP基因多态性分析, 旨在探讨种族、饮食习惯与54A/T频率分布的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象: 张家口市蒙古族150例(市区居住3代以上, 饮食习惯与汉族类似), 男102例, 女48例, 平均年龄 50.2 ± 5.5 岁; 牧区蒙古族208例, 来自内蒙古集宁市中旗牧区, 男142例, 女66例, 平均年龄 49.8 ± 7.1 岁; 张家口市汉族190例, 男144例, 女46例, 平均年龄 40.2 ± 10.1 岁. 以上研究对象均无血缘关系. 限制性内切酶Hha I, Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司; 蛋白酶K购自Sigma公司; UNIQ-5胶回收试剂盒, PCR反应回收试剂盒购自上海生物工程有限公司. UNO II型PCR仪(Biometra, 德国), UV-1601型紫外分光光度计, 75S/00771型凝胶成像分析系统(Bio Rad, 美国). 根据GenBank提供的人IFABP基因序列, 按引物设计原则, 将上游引物设计在距离突变位点200 bp, 下游引物设计在

距离突变位点100 bp, 扩增产物长度为300 bp, 即上游引物序列: 5'-ACAGGTGTTAATATAGTG AAAAGG-3', 下游引物序列: 5'-ATTGGCTTCTT CAGTTAGTGAAGG-3'. GAPDH内参对照: 扩增片段长450 bp, 上游引物序列: 5'-ACCACAGTC CATGCCATCAC-3'; 下游引物序列: 5'-TCACCA CCCTGTTGCTGTA-3'.

1.2 方法 空腹静脉血1 mL, 38 g/L枸橼酸钠抗凝. 采用低渗溶血法分离白细胞; 酚/氯仿抽提法提取DNA. 目的IFABP基因片段扩增条件: 95℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃补平8 min, 反应体系为50 μ L. GAPDH内参扩增条件: 95℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃补平8 min, 反应体系为25 μ L. IFABP基因PCR扩增产物, 经PCR产物回收试剂盒回收后, 用限制性内切酶Hha I, 37℃酶切过夜. 结果行30 g/L琼脂糖凝胶电泳, 经凝胶成像分析系统摄像, 并记录分析结果. 根据酶切结果, 针对性地选择部分完全切割、不完全切割和未切割的PCR产物, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳纯化回收, 待DNA序列分析比较, 测序分析由上海博亚生物技术有限公司完成.

统计学处理 基因型及等位基因频率采用基因计数法, 观察对象与Hardy-Weinberg平衡的符合程度、组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验. 以上统计均在SPSS 10.0软件上完成.

2 结果

以外周血白细胞DNA为模板, 进行PCR扩增, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察, 在约300 bp处扩增出1条与预期值相符合的特异性IFABP基因片段, GAPDH内参扩增结果为450 bp. PCR产物经回收试剂盒回收后, 用限制性内切酶Hha I, 37℃过夜酶切. Hha I内切酶碱基识别序列为GCGC. 当IFABP基因54位点GCT(A)→ACT(T)时, 其所在碱基序列片段将由GCGCT→GCACT, Hha I内切酶不能酶切. 酶切结果电泳分析显示3种情况: (1)突变纯合子型54T/T, 显示1条带, 分子量约为300 bp; (2)野生型54A/A, 显示2条带, 分子量约为200 bp和100 bp; (3)突变杂合子型54A/T, 显示3条带, 分子量分别约为300 bp, 200 bp和100 bp(图1). 图2所示为野生型54A/A(GCT/GCT)IFABP基因上游核苷酸序列片段测序结果; 图3所示为突变纯合子型54T/T(ACT/ACT)IFABP基因上游核苷酸序列片段测序结果.

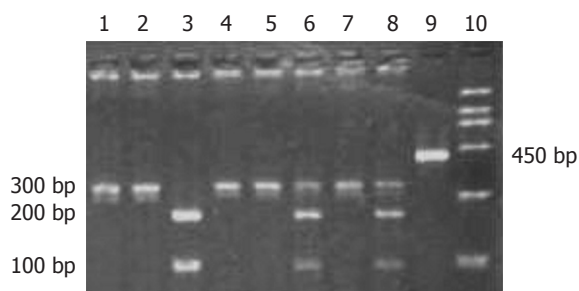


图 1 *Hha* I 内切酶酶切结果. 6, 8: IFABP 54A/T杂合子基因型(300 bp, 200 bp, 100 bp); 1, 2, 4, 5, 7: IFABP 54T/T突变纯合子基因型(300 bp); 3: IFABP 54A/A野生基因型(200 bp, 100 bp); 9: GAPDH内参(450 bp); 10: DL 2000 Marker.

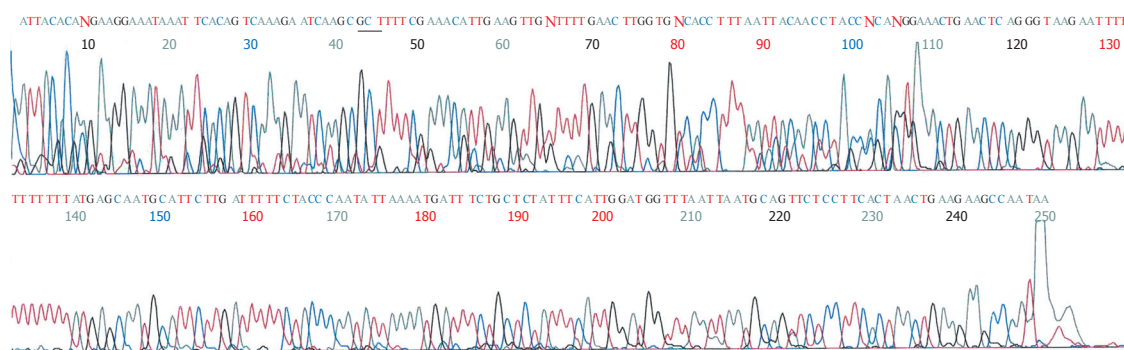


图 2 野生型IFABP 54A/A(GCT/GCT)基因片段测序分析(正向, “-”所示为54位点 GCT).

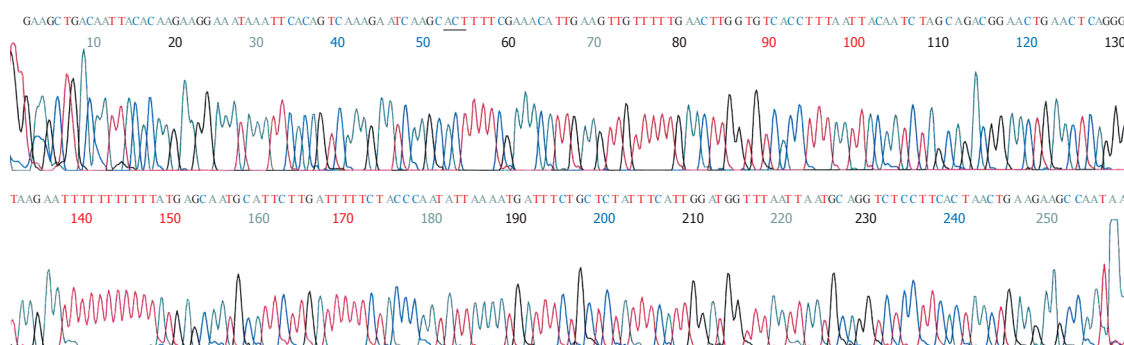


图 3 突变型IFABP 54T/T(ACT/ACT)基因片段测序分析(正向, “-”所示为54突变点 ACT).

150例市区蒙古族人群54A/T基因型分布: 野生型A/A 72例占0.48, 杂合子型A/T 57例占0.38, 突变纯合子型T/T 21例占0.14; 54T等位基因频率为0.33, 54A等位基因频率为0.67. 208例牧区蒙古族人群54A/T基因型分布: 野生型A/A 8例占0.04, 杂合子型A/T 198例占0.90, 突变纯合子型T/T 12例占0.06; 54T等位基因频率为0.51, 54A等位基因频率为0.49. 190例汉族人群54A/T基因型分布: 野生型A/A 96例占0.50, 杂合子型A/T 72例占0.38, 突变纯合子型T/T 22例占0.12; 54T等位基因频率为0.30, 54A等位基因频率为0.70. 与市区蒙古族人群相比, 牧区蒙古族人群54T等位基因频率明显增高, 且差别有统计学意义($\chi^2 = 22.98, P < 0.01$); 与汉族人群相比, 牧区蒙古族人群54T等位基因频率亦明显增高, 且差异非常显著($\chi^2 = 34.23, P < 0.01$). 市区蒙古族和汉

族相比较, 突变型等位基因频率无统计学差别($\chi^2 = 0.47, P > 0.05$).

3 讨论

饮食因素与冠心病、动脉粥样硬化、高脂血症等代谢性疾病的发生、发展关系密切, 业已证实, 西方的饮食方式, 即高脂饮食习惯是诱发此类疾病的重要因素之一. 20世纪末, 发现并初步证实IFABP基因在机体内脂类吸收、代谢中发挥着重要作用^[2-14]. FABPs是一组细胞内小分子量蛋白超家族, M_r 15 000, 迄今为止, 共发现8种, 其分布具有组织特异性^[15]. IFABP是这家族成员之一, 分布于小肠上皮细胞, 与食物中饱和、非饱和长链脂肪酸(long chain fatty acid, LCFA)的摄取、运输及代谢有关^[16]. 1995年, Baier *et al*^[17]报道, 人类IFABP基因第2外显子54位点存在点

突变, 编码氨基酸由丙氨酸(Ala)突变为苏氨酸(Thr). 实验证实, 突变型T54 IFABP与配基LCFA的亲合力是野生型A54 IFABP的2倍^[17]; 细胞学实验结果显示, 转染了54T/T IFABP基因的CaCo-2细胞摄取脂肪酸的能力, 分泌三酰甘油(TG)的浓度均高于对照组54A/A IFABP CaCo-2细胞^[18]. 从结构上, 尽管54T与配基结合无明显的直接关系, 但是苏氨酸(T)替代丙氨酸(A), 使蛋白分子侧链增大, 影响了配基进出结构域“入口”, 从而降低了IFABP运输配基的转移速率^[19]. 一些学者认为, 突变型54T IFABP分子结构的微小改变, 可能影响了脂类的正常代谢. 最近临床研究结果显示, 与野生型54A相比较, 突变型54T携带者, 餐后血浆非酯化脂肪酸、TG、载脂蛋白E(ApoE)及胰岛素水平均显著升高, 并且持续时间明显延长^[20-21]. 早在1992年, Patsch *et al*发现, 餐后高脂血与冠心病的发生、发展有显著的相关性^[22]. 因此, 预测突变型54T IFABP可能与异常的脂类代谢相关疾病有关.

肠道IFABP基因表达受食物中LCFA正向调节^[23], 从十二指肠到结肠, 从绒毛顶端到肠隐窝, 随着上皮细胞摄取脂肪酸能力的降低, IFABP基因表达呈明显递减的阶梯状分布. 随着食物中脂肪酸含量增加, 肠道上皮细胞IFABP表达亦增多. 是否高脂饮食也与IFABP基因点突变有关? 目前尚无确切答案. 但从另一个角度, Vincent *et al*^[24]通过饮食干预实验发现, 高脂饮食引起的高三酰甘油血症与54T IFABP基因有直接关系; Hegele *et al*^[25]研究证实, 高纤维饮食可降低54T基因携带者外周血LDL-胆固醇和ApoB浓度. 人类基因的多态性是普遍存在的. 业已证实, 许多代谢性疾病, 如心血管疾病、糖尿病、肥胖症等起因于遗传的易感性和环境因素的相互作用. 大量资料显示, 与冠心病相关的参与脂类代谢基因, 如载脂蛋白E, B, A-IV, C-III, LDL受体和IFABP的多态性改变与饮食有关. 边远的牧区蒙古族人大程度上仍保持着传统的游牧民族的生活习惯, 饮食主要以高脂的肉、奶类为主, 蔬菜类较少; 而市区蒙古族人的饮食习惯与汉族几乎没有区别, 营养成分更趋于多元化. 我们的实验结果显示, 在市区蒙古族人群和汉族人群中, 突变型54T IFABP基因分布频率无统计学差别($P>0.05$), 并且两者的突变频率与其他种族报道类似^[26]. 牧区蒙古族人群54T基因突变频率明显增高, 与前两者相比, 差异非常显著($P<0.01$). 因此, 我们推测, 在市区蒙、汉族人群中, IFABP

基因54A/T多态性频率分布可能与种族无关; 而高脂饮食习惯可能与牧区蒙古族人群突变型54T IFABP基因高频率分布有关.

4 参考文献

- 1 Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 141-147
- 2 Ribalta J, Halkes CJ, Salazar J, Masana L, Cabezas MC. Additive effects of the PPARgamma, APOE, and FABP-2 genes in increasing daylong triglycerides of normolipidemic women to concentrations comparable to those in men. *Clin Chem* 2005; 51: 864-871
- 3 Tai ES, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Coltell O, Schaefer EJ, Tucker KL, Ordovas JM. Polyunsaturated fatty acids interact with the PPARG-L162V polymorphism to affect plasma triglyceride and apolipoprotein C-III concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 2005; 135: 397-403
- 4 Georgopoulos A, Aras O, Tsai MY. Codon-54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglyceride in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3155-3160
- 5 Georgopoulos A, Aras O, Noutsou M, Tsai MY. Unlike type 2 diabetes, type 1 does not interact with the codon 54 polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3735-3739
- 6 Umpaichitra V, Banerji MA, Castells S. Postprandial hyperlipidemia after a fat loading test in minority adolescents with type 2 diabetes mellitus and obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 17: 853-864
- 7 Galluzzi JR, Cupples LA, Meigs JB, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Association of the Ala54-Thr polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein with 2-h postchallenge insulin levels in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2001; 24: 1161-1166
- 8 Marin C, Perez-Jimenez F, Gomez P, Delgado J, Paniagua JA, Lozano A, Cortes B, Jimenez-Gomez Y, Gomez MJ, Lopez-Miranda J. The Ala54Thr polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with a change in insulin sensitivity after a change in the type of dietary fat. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 196-200
- 9 Lefevre M, Lovejoy JC, Smith SR, Delany JP, Champagne C, Most MM, Denkins Y, de Jonge L, Rood J, Bray GA. Comparison of the acute response to meals enriched with cis- or trans-fatty acids on glucose and lipids in overweight individuals with differing FABP2 genotypes. *Metabolism* 2005; 54: 1652-1658
- 10 Salguero ML, Leon RE, Santos A, Roman S, Segura-Ortega JE, Panduro A. The role of FABP2 gene polymorphism in alcoholic cirrhosis. *Hepatol Res* 2005
- 11 Pollex RL, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Hegele RA. Clinical and genetic associations with hypertriglyceridemic waist in a Canadian aboriginal population. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 484-491
- 12 Gonzalez Sanchez JL, Serrano Rios M, Fernandez Perez C, Laakso M, Martinez Larrad MT. Effect

- of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 495-501
- 13 Pollex RL, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Khan HM, Hegele RA. Metabolic syndrome in aboriginal Canadians: prevalence and genetic associations. *Atherosclerosis* 2006; 184: 121-129
- 14 Lindi V, Schwab U, Louheranta A, Laakso M, Vessby B, Hermansen K, Storlien L, Riccardi G, A Rivellesse A. Impact of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene on serum triacylglycerol response to n-3 fatty acid supplementation. *Mol Genet Metab* 2003; 79: 52-60
- 15 Zimmerman AW, Veerkamp JH. Members of the fatty acid-binding protein family inhibit cell-free protein synthesis. *FEBS Lett* 1998; 437: 183-186
- 16 Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 28-44
- 17 Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 1281-1287
- 18 Baier LJ, Bogardus C, Sacchettini JC. A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 10892-10896
- 19 Ito K, Nakatani K, Fujii M, Katsuki A, Tsuchihashi K, Murata K, Goto H, Yano Y, Gabazza EC, Sumida Y, Adachi Y. Codon 54 polymorphism of the fatty acid binding protein gene and insulin resistance in the Japanese population. *Diabet Med* 1999; 16: 119-124
- 20 Zhang F, Lucke C, Baier LJ, Sacchettini JC, Hamilton JA. Solution structure of human intestinal fatty acid binding protein with a naturally-occurring single amino acid substitution (A54T) that is associated with altered lipid metabolism. *Biochemistry* 2003; 42: 7339-7347
- 21 Nakanishi S, Yamane K, Kamei N, Okubo M, Kohno N. The effect of polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein 2 gene on fat metabolism is associated with gender and obesity amongst non-diabetic Japanese-Americans. *Diabetes Obes Metab* 2004; 6: 45-49
- 22 Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto AM Jr, Patsch W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1336-1345
- 23 Mochizuki K, Suruga K, Yagi E, Takase S, Goda T. The expression of PPAR-associated genes is modulated through postnatal development of PPAR subtypes in the small intestine. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1531: 68-76
- 24 Vincent S, Planells R, Defoort C, Bernard MC, Gerber M, Prudhomme J, Vague P, Lairon D. Genetic polymorphisms and lipoprotein responses to diets. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 427-434
- 25 Hegele RA, Wolever TM, Story JA, Connelly PW, Jenkins DJ. Intestinal fatty acid-binding protein variation associated with variation in the response of plasma lipoproteins to dietary fibre. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 857-862
- 26 Kim CH, Yun SK, Byun DW, Yoo MH, Lee KU, Suh KI. Codon 54 polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene is associated with increased fat oxidation and hyperinsulinemia, but not with intestinal fatty acid absorption in Korean men. *Metabolism* 2001; 50: 473-476

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

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

炎症性肠病及其干细胞移植再生修复

魏亚明, 聂玉强, 李瑜元, 沙卫红

■背景资料

炎症性肠病(IBD)在我国发病率逐步升高, 其相关病理学研究和再生修复成为研究的热点. 造血干细胞移植治疗IBD是最近出现的一种新型治疗方法, 自体与异体移植均有较好临床疗效, 基础研究已经证实移植的造血干细胞可以定居于肠道上皮, 但移植修复损伤肠道黏膜的详细机制则有待于深入研究.

魏亚明, 聂玉强, 李瑜元, 沙卫红, 广州医学院附属广州市第一人民医院消化科, 广州市临床医学研究所 广东省广州市 510180 广东省科技厅项目, No. 2004-139-50

通讯作者: 魏亚明, 510180, 广东省广州市, 广州医学院附属广州市第一人民医院消化科, 广州市临床医学研究所. weiyaming@163.com
电话: 020-81045568

收稿日期: 2006-03-03 接受日期: 2006-03-20

摘要

炎症性肠病(IBD)在我国发病率逐步升高, 其相关病理学研究和再生修复成为研究的热点. 炎症性肠病存在易感基因NOD2, 发病与感染、饮食、药物、肠道菌群变化及免疫因素有关. 肠道干细胞, 具有自我更新与增殖能力. 肠黏膜被破坏时, 陷窝残存的干细胞向外生长并移行, 重建绒毛直至肠黏膜恢复正常. 肠道干细胞的增殖和分化与多种细胞因子作用有关. 造血干细胞移植治疗IBD是最近出现的一种新型治疗方法, 自体与异体移植均有较好临床疗效, 基础研究已经证实移植的造血干细胞可以定居于肠道上皮, 但移植修复损伤肠道黏膜的详细机制则有待于深入研究.

关键词: 炎症性肠病; 病理; 免疫; 干细胞; 移植

魏亚明, 聂玉强, 李瑜元, 沙卫红. 炎症性肠病及其干细胞移植再生修复. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1314-1317
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1314.asp>

0 引言

近年来, 随着人民群众生活水平提高, 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)这种在欧美发病率较高的疾病, 在我国发病率正逐步升高^[1-2], 其中难治性IBD也显著增加. IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 他们共同表现为肠黏膜炎症, 且相关肠癌发病率较高, 因此, 炎症性肠病的病理学基础和再生修复研究成为近年来消化领域研究的热点.

1 IBD病理学基础

IBD与遗传因素、免疫因素有关, 常以感染、饮

食、药物、肠道菌群失调等为诱因发病. 流行病学调查发现, IBD易感性在不同人种中区别较大, 黑人, 黄种人等有色人种发病率较低, 而白人较高, IBD近亲属中患病几率是其他人群的10-100倍^[3-4]. 在遗传因素方面, Hugot *et al*^[3]和Inohara *et al*^[4]在2001年几乎同时报告了IBD的第一个易感基因NOD2, 该基因主要表达于单核细胞中, 位于16号染色体着丝点附近, 他编码的NOD2蛋白含1040氨基酸, 参与细胞凋亡和核因子 κ B(NF- κ B)激活. 其N末端是半胱-天冬氨酸蛋白酶补充区域, 是IL-1受体, C末端包括caspase募集区, 核苷结合区及富含亮氨酸的重复序列区, 具有结合、识别细菌的脂多糖及激活NF- κ B功能, 而NF- κ B在IBD炎症反应过程起着信号通路作用. NOD2基因有3个易发突变位点, 突变使患者体内大量合成蛋白, 并结合相应抗原提呈给单核细胞, 将信号传递给肿瘤坏死因子(TNF)受体及其相关蛋白, 引起细胞内产生炎症因子的级联放大反应, 导致IBD. 同时, 人类白细胞抗原(HLA)的某些类型如DR2基因与UC有关, DR1和DQ5与Crohn病呈正相关. 其他易感标记物包括组织相容性复合体(MHC)、某些细胞受体、细胞因子、细胞黏附分子、免疫球蛋白等. 在免疫因素方面, 消化道黏膜本身起着免疫屏障和抗黏膜损伤作用, 肠道黏膜免疫系统存在辅助细胞亚群, 正常情况下可对肠道内容物和正常菌群产生免疫耐受, 对病原体则产生免疫反应. IBD时这种免疫耐受失衡, 可对肠道共生菌及化学物质产生免疫反应, 致使肠壁和外周血中激活的CD4+T细胞分泌大量炎症因子和化学趋化因子, CD4+T细胞可以分为Th1和Th2细胞, Th1细胞诱导肉芽肿性炎症, 白介素12(IL-12)和干扰素(IFN- γ)在炎症发展中起关键作用, 而Th2细胞则可诱导浅表黏膜炎症, 由IL-13起主导作用, 二者通过细胞因子相互调节^[5]. 因此, 也有人认为IBD是一种自身免疫性疾病, 临床采用细胞因子或免疫抑制剂治疗. 动物实验已经证实IL-12能够阻断IBD进展, 下调炎症反应因子. 环境诱因,

主要包括感染、饮食、药物和微生物。饮食不当, 吸烟, 或药物导致肠道菌群失调和免疫缺陷, 创伤或外科手术及感染时, 常伴肠道黏膜的通透性增高, 正常黏膜功能的下调, 会导致炎症级联放大反应和组织的损伤。

2 肠道干细胞研究进展

干细胞(stem cell, SC)具有终身自我更新能力, 可根据环境变化产生多种高度分化的子代细胞。肠道干细胞也称肠道上皮干细胞, 位于肠道隐窝内具有自我更新与增殖分化功能。解剖学上, 肠道干细胞位于在陷窝纵向切片第2至7层细胞之间。肠上皮干细胞通常发生不对称分裂, 生成一个子代干细胞和一个可继续分化的子细胞。但在发育时或损伤后则发生对称性分裂, 分裂成两个子代干细胞或两个可继续分化的子细胞。正常情况下约5%发生对称分裂, 即一个干细胞生成两个子代干细胞, 以完成陷窝内干细胞更替或凋亡^[6]。肠黏膜屏障被破坏时, 陷窝干细胞将产生溃疡相关细胞, 并逐渐向绒毛移行, 形成单独的导管结构, 分泌黏蛋白和表皮生长因子(EGF), EGF又可以促进这种细胞的生成, 通过这种残存的干细胞发生对称性分裂以再生陷窝, 重建绒毛直至肠黏膜恢复正常。肠黏膜修复速度取决于陷窝的干细胞数量、细胞周期时间、对称分裂的发生频率以及环境刺激给予的强度。肠道上皮干细胞自身基因表达和其所处的微环境是其增值和分化的决定因素, 在非对称分裂及向绒毛上移过程中逐渐失去干细胞功能。影响肠道干细胞的增殖和分化的因素十分复杂, 目前知道表皮生长因子是对隐窝上皮细胞增生最有效的细胞因子^[7]。T细胞因子-4(T cell factor-4, TCF-4), 可调节肠道干细胞增殖或上移^[5]。成纤维细胞生长因子可以促进上皮细胞的有丝分裂, 并调节细胞的分化, 其中碱性成纤维细胞生长因子作用于小肠隐窝细胞外基质, 通过与干细胞表面的酪氨酸蛋白激酶受体的结合而发挥作用。给予足量的外源性碱性成纤维细胞生长因子, 能够加快干细胞增殖分化速度, 促进干细胞进入增殖周期, 修复受损肠道上皮^[8]。TNF^[9]和角化细胞生长因子^[10]可有效地促进受损后的小肠干细胞分裂, 增加定向祖细胞的数量。胰岛素样生长因子可与其他生长因子协同作用促进干细胞增殖和分化^[11]。肝细胞生长因子, 作为一种促有丝分裂原, 其生物学机制与碱

性成纤维细胞生长因子类似, 体内外试验均证明对肠道干细胞有明显的促增殖作用^[12]。其他生长因子对肠道干细胞增殖分化的作用尚在进一步研究中。

3 造血干细胞移植根治炎症性肠病

传统IBD治疗法方有: 糖皮质激素、水杨酸制剂结合局部灌肠及全身用药。症状重或顽固者可用免疫抑制剂如硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素等。近年迅速发展的IBD生物学治疗^[13], 用TNF- α 单抗等促炎因子拮抗剂和抗炎因子等细胞因子治疗, 在临床疗效显著。其次是用反义核酸等小分子干扰技术为主的基因治疗, 尚处于临床前实验研究阶段。而最近新出现的一种IBD治疗新方法——干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT), 使IBD临床治疗出现了全新的思路。最初HSCT移植的病例报告来自于淋巴瘤或白血病合并IBD的移植患者, Ditschkowski *et al*^[12,14]随访11例施行异基因外周血HSCT的白血病合并CD或UC患者, 发现移植后中位时间34 mo时, 存活10例均未表现IBD活动性。Lopez *et al*^[15]报道6例恶性血液病合并CD的患者行异基因HSCT取得类似疗效。1例日本非霍奇金淋巴瘤合并UC患者^[16], 1例瑞典UC和白血病患者^[17]行自体HSCT后, 长期随访也取得了完全治愈的结果。2003年Burt *et al*^[18]和Kreisel *et al*^[19]以CD为指征共对3例难治性CD患者进行自体外周血HSCT, 随访1 a, 患者病情缓解(CD活动指数CDAI评分<100)。以上报道提示无论自体或异体HSCT对IBD都有较好的临床疗效, 但HSCT对肠黏膜的损伤修复机制尚未明了。

按照器官移植理论, IBD所造成的肠道黏膜损伤, 其移植治疗的最佳干细胞来源自然应是肠道上皮干细胞。但由于肠道上皮干细胞来源数量有限, 在体外尚不能长期培养和扩增, 因而目前临床IBD移植干细胞均来自造血干细胞。造血干细胞移植按干细胞来源分为骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT), 外周血造血干细胞移植(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT), 脐带血干细胞移植(cord blood stem cell transplantation, CBSCT)等, 按遗传背景又分为自体(auto-)干细胞移植和异体(allo-)干细胞移植。近年来, 随着重组人干细胞因子在干细胞动员中的应用和分离采集技术的进步, 除脐带血干细胞移植外, 自体与异体的干细胞移

■同行评价

IBD发病率正逐步升高, 治疗效果差, 易复发。干细胞是生物医学研究热点, 用于IBD治疗取得一定效果。该文对干细胞用于IBD治疗实验和临床研究进行了综述, 文章结构合理, 观点新颖。

植已几乎全部采用外周血干细胞移植技术来进行. 在预处理方案上除沿用传统大剂量化疗加全身放疗外, 现在又发展了非清髓性移植或小移植技术^[20], 大大增加了移植成功率和降低了移植相关死亡率. Oyama *et al*^[21]分别用环磷酰胺(cyclophosphamide)和粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)作动员剂, 进行自体HSCT, 观察一年半以上, 共计12例中11例持续缓解(CDAI<100), 仅1例复发. Garcia-Olmo *et al*^[22]用自体脂肪间充质干细胞移植治疗CD瘻管患者, 6/9得到治愈. 鉴于IBD病因涉及免疫遗传方面, 而HSCT则有利于重建和恢复患者免疫遗传系统, 这无疑为IBD的治疗提供了新的选择. IBD虽有易感基因, 但并不是遗传性疾病, 就像HSCT治疗自身免疫性疾病^[23]一样, 自体干细胞移植因不存在干细胞来源和移植排斥反应, 因而疗效较好, 在难治性炎症性肠病治疗中有着良好的应用前景^[24-25].

异体干细胞移植虽然在血液病伴IBD的患者中取得了较好的效果, 但尚未得到大样本临床资料证实. 考虑到IBD是慢性渐进性疾病, 绝大多数CD患者经相应传统治疗后, 可获得一定好转, 发病15 a后约半数尚能生存, 急性重症病例近期病死率低于10%, 其中半数以上患者需要手术治疗; UC患者经传统治疗后, 多得到某种程度的康复, 轻型者康复率90%, 重型症状减轻和好转率超过50%, 保守治疗无效还可手术治疗, 而全结肠型UC的病死率可达25%左右^[26-27]. 相对于自体干细胞移植而言, 异体干细胞移植增加了移植排斥反应风险, 存在HLA相合供体干细胞来源缺乏, 移植成功后患者免疫抑制剂的使用和生活质量等问题, 除非有完全配合的供者, 否则选择异体HSCT治疗IBD在获得大规模临床验证前, 应严格掌握适应证. 尽管如此, 应用HSCT治疗IBD的探索已成为趋势, 而要使HSCT治疗IBD取得更大的临床应用, 甚至成为重症IBD患者的常规疗法, 不仅需要更多患者进行治疗研究和长期随访, 不断完善临床移植方案, 移植机制研究尽快取得突破性进展也是关键.

从临床用HSCT治疗IBD需要药物预处理以破坏IBD患者炎症的免疫反应环境, 纠正了异常的肠道菌群环境, 有利于肠道黏膜的修复. 但我们依然不清楚这种修复是依赖于“土壤”的变化还是“种子”的改变, 修复损伤的干细胞是来自植入细胞还是原有肠道干细胞, 或者是二者兼而有之? 我们已在UC大鼠动物模型中, 用

雄性大鼠Y染色体作为植入标志, 将雄性大鼠的骨髓间充质干细胞植入雌性大鼠, 发现其可以定居于受者肠道上皮^[28], 这一点也得到国外同行的认可^[29-30]. 这种定居于肠道上皮的间充质干细胞是否已转化为肠道上皮干细胞, 是否具有连续分裂分化成不同上皮细胞的能力尚无直接证据. 因此, 造血干细胞体外诱导分化成为上皮干细胞或不同分化阶段的上皮细胞, 以及追踪肠道损伤黏膜修复细胞的来源, 对于奠定造血干细胞移植治疗炎症性肠病的理论基础, 对以后造血干细胞移植用于治疗胃、食道疾病, 甚至癌症都会有重要的启示作用.

4 参考文献

- 1 李瑜元. 第四届亚太消化疾病州(APDW, 2004)会议纪要. 中华消化杂志 2004; 24: 700-702
- 2 欧阳钦. 我国炎症性肠病研究的概况和策略. 四川医学 2005; 26: 355-356
- 3 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
- 4 Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001; 276: 2551-2554
- 5 Harber M, Sundstedt A, Wraith D. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2000: 1-20
- 6 Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002; 24: 91-98
- 7 Potten CS, Booth D, Haley JD. Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage *in vivo*. *Br J Cancer* 1997; 75: 1454-1459
- 8 付小兵, 孙同柱, 孙晓庆, 杨银辉, 顾小曼, 盛志勇. EGF和bFGF在大鼠不同发育阶段肠道定位和表达特征的比较研究. 中国危重病急救医学 2001; 13: 407-409
- 9 Potten CS, Owen G, Hewitt D, Chadwick CA, Hendry H, Lord BI, Woolford LB. Stimulation and inhibition of proliferation in the small intestinal crypts of the mouse after *in vivo* administration of growth factors. *Gut* 1995; 36: 864-873
- 10 Booth D, Haley JD, Bruskin AM, Potten CS. Transforming growth factor-B3 protects murine small intestinal crypt stem cells and animal survival after irradiation, possibly by reducing stem-cell cycling. *Int J Cancer* 2000; 86: 53-59
- 11 MacDonald RS, Park JH, Thornton WH Jr. Insulin, IGF-1, and IGF-2 receptors in rat small intestine following massive small bowel resection. Analysis by binding, flow cytometry, and immunohistochemistry. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1658-1669
- 12 Igawa T, Matsumoto K, Kanda S, Saito Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute

- renal injury. *Am J Physiol* 1993; 265: F61-F69
- 13 Travis S. Advances in therapeutic approaches to ulcerative colitis and Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 475-484
- 14 Ditschkowski M, Einsele H, Schwerdtfeger R, Bunjes D, Trenchel R, Beelen DW, Elmaagacli AH. Improvement of inflammatory bowel disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1745-1747
- 15 Lopez-Cubero SO, Sullivan KM, McDonald GB. Course of Crohn's disease after allogeneic marrow transplantation. *Gastroenterology* 1998; 114: 433-440
- 16 Koike K, Kohda K, Kuga T, Nakazawa O, Ando M, Takayanagi N, Matsunaga T, Sakamaki S, Niitsu Y. Ulcerative colitis after autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 619-621
- 17 Soderholm JD, Malm C, Juliusson G, Sjodahl R. Long-term endoscopic remission of crohn disease after autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 613-616
- 18 Burt RK, Traynor A, Oyama Y, Craig R. High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood* 2003; 101: 2064-2066
- 19 Kreisel W, Potthoff K, Bertz H, Schmitt-Graeff A, Ruf G, Rasenack J, Finke J. Complete remission of Crohn's disease after high-dose cyclophosphamide and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 337-340
- 20 Burt RK, Verda L, Oyama Y, Statkute L, Slavin S. Non-myeloablative stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 26: 57-69
- 21 Oyama Y, Craig RM, Traynor AE, Quigley K, Statkute L, Halverson A, Brush M, Verda L, Kowalska B, Krosnjak N, Kletzel M, Whittington PF, Burt RK. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 552-563
- 22 Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Garcia LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, Garcia-Sancho L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 451-454
- 23 Marmont AM. Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Coincidental autoimmune disease in patients transplanted for conventional indications. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004; 17: 223-232
- 24 Lashner BA. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for Crohn's disease: high risk for a high reward. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 778-779
- 25 Folwaczny C, Glas J, Folwaczny M, Torok HP. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn's disease: a feasible therapeutic approach? *Gastroenterology* 2005; 128: 2180
- 26 Whelan G, Farmer RG, Fazio VW, Goormastic M. Recurrence after surgery in Crohn's disease. Relationship to location of disease (clinical pattern) and surgical indication. *Gastroenterology* 1985; 88: 1826-1833
- 27 Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology* 1985; 88: 1818-1825
- 28 段进粮, 聂玉强, 李瑜元, 杜艳蕾, 沙卫红, 何慧华, 董伟华. 大鼠骨髓间充质干细胞移植后在溃疡性结肠炎模型肠道的定位. *广州医学院学报* 2006;(印刷中)
- 29 Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1-6
- 30 Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 2005; 50 Suppl 1: S34-S38

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿.

2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com.

复方甘草酸苷对暴发性肝衰竭患者的保护作用

于仲青, 杨宝山, 王岩, 陈立艳, 毕蔓茹, 王福祥, 马英骥

■背景资料

在临床对照治疗观察前, 已通过实验研究验证了甘草酸苷对小鼠暴发性肝坏死模型的保护作用。该领域中的研究热点是重型肝炎肝细胞凋亡的发病机制及甘草酸苷对其保护机制研究。

于仲青, 杨宝山, 王岩, 陈立艳, 毕蔓茹, 王福祥, 马英骥, 哈尔滨医科大学第一临床医学院传染科 黑龙江省哈尔滨市 150001

黑龙江省十五攻关重大课题, No. 200101031-00
通讯作者: 杨宝山, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院传染科. baoshanyang@126.com
电话: 0451-53601171

收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

Protective effect of Stronger Neo-Minophagen C on patients with fulminant liver failure

Zhong-Qing Yu, Bao-Shan Yang, Yan Wang, Li-Yan Chen, Man-Ru Bi, Fu-Xiang Wang, Ying-Ji Ma

Zhong-Qing Yu, Bao-Shan Yang, Yan Wang, Li-Yan Chen, Man-Ru Bi, Fu-Xiang Wang, Ying-Ji Ma, Department of Infectious Diseases, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Supported by the Key Program during the 10th Five-Year Plan of Heilongjiang Province, No.200101031-00

Correspondence to: Bao-Shan Yang, Department of Infectious Diseases, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. baoshanyang@126.com

Received: 2006-01-03 Accepted: 2006-01-25

Abstract

Aim: To discuss the protective effect of Stronger Neo-Minophagen C (SNMC) on patients with fulminant liver failure (FLF).

METHODS: From March 2003 to March 2005, 86 FLF patients were selected for this study, and they were assigned into group A and B. The patients in group A were intravenously injected with SNMC 120 mL per day, combined with symptomatic treatment to protect the liver. Symptomatic treatment was only performed on patients in group B, serving as controls. The level changes of serum alanine aminotransferase (ALT), cholesterol (CHOL), total bilirubin (TBIL), prothrombin activity (PTA), tumor necrosis factor TNF- α , nitric oxide (NO), and interleukin-6 (IL-6), as well as the outcome of the disease, were observed and comparatively analyzed.

RESULTS: The levels of ALT and TBIL had no

significant difference between the two groups ($P > 0.05$), while those of CHOL and PTA were significantly different between them ($P < 0.01$). After treatment, the levels of NO and IL-6 were markedly lower in group A than those in group B ($24.5 \pm 18.1 \mu\text{mol/L}$ vs $48.1 \pm 24.1 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$; $76.9 \pm 71.2 \text{ ng/L}$ vs $357.1 \pm 79.1 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$). The fatality rates were 37.8% (17/45) and 70.7% (29/41), respectively, in group A and B, and there was significant difference between them ($P < 0.01$).

CONCLUSION: SNMC has obvious protective effect on FLF patients through inhibiting the inflammation mediated by inflammatory mediators.

Key Words: Stronger Neo-Minophagen C; Fulminant liver failure; Inflammatory mediators; Outcome

Yu ZQ, Yang BS, Wang Y, Chen LY, Bi MR, Wang FX, Ma YJ. Protective effect of Stronger Neo-Minophagen C on patients with fulminant liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1318-1322

摘要

目的: 探讨复方甘草酸苷(Stronger Neo-Minophagen C, SNMC)对暴发性肝衰竭(FLF)患者的保护作用。

方法: 全部病例均为2003-03/2005-03期间住院的患有急性、亚急性重型肝炎的86例实验分为治疗组和对照组。治疗组每天注射(iv)SNMC 120 mL, 同时采用常规保肝支持对症治疗。对照组则仅用保肝支持对症治疗。对比观察两组的转氨酶(ALT)、胆固醇(CHOL)、总胆红素(TBIL)、凝血酶原活动度(PTA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、一氧化氮(NO)、白介素-6(IL-6)的变化情况及病情转归。

结果: ALT、TBIL两组比较差异不显著($P > 0.05$); CHOL、PTA在治疗组的恢复程度(3 wk后)明显优于对照组, 两组差异显著($P < 0.01$)。两组治疗后, 治疗组NO、IL-6水平与对照组相比有显著差异($24.5 \pm 18.1 \mu\text{mol/L}$

vs $48.1 \pm 24.1 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$; $76.9 \pm 71.2 \text{ ng/L}$ vs $357.1 \pm 79.1 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$). 治疗组有17例治疗无效, 病死率为37.8%(17/45), 对照组有29例治疗无效, 病死率为70.7%(29/41), 两组相比差异显著($P < 0.01$).

结论: SNMC对暴发性肝衰竭有明显的保护作用, 并抑制各种因素所介导的炎症反应, 从而防止或缓解肝坏死及减少并发症, 降低病死率.

关键词: 甘草酸苷; 暴发性肝衰竭; 炎症介质; 病情转归

于仲青, 杨宝山, 王岩, 陈立艳, 毕蔓茹, 王福祥, 马英骥. 复方甘草酸苷对暴发性肝衰竭患者的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1318-1322

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1318.asp>

0 引言

越来越多的研究证明, 各种急、慢性肝病, 尤其是暴发性肝衰竭的发病过程与细胞免疫直接导致的炎症坏死有密切关系, 一些炎症介质和细胞因子(包括NO, TNF- α , ET-1, IL-6, 内毒素等)参与了暴发性肝衰竭的发病过程. 近年国内外研究表明, 肝细胞凋亡与肝炎尤其是暴发性肝衰竭关系十分密切. 最新研究发现, 当LPS与D2GalN联合应用时可复制出类似人类暴发性肝衰竭的损伤模型, 更重要的是在肝脏损伤过程中有细胞凋亡的发生, 尤其在损伤早期凋亡特别明显, 因而二者合用致肝损伤有逐步取代两者单用成为研究FLF理想模型的趋势.

目前对于重症肝炎尚无有效的治疗方法, 预后极差, 病死率高达70%. 人工肝治疗和肝移植的开展虽然可以改善重症肝炎的预后, 但由于其价格昂贵及技术复杂还未能被众多的患者所接受. 因此重症肝炎的死亡率仍居高不下. 近年来诸多的医学工作者都在寻找新的方法和药物来治疗重症肝炎以降低其病死率, 但都没取得满意的结果. 以甘草酸为主要成分的复方甘草酸苷(Stronger neominophagen C, SNMC)注射剂具有抗炎及抗过敏, 并具有类激素样作用. 1958年日本的山本佑夫首次将SNMC用于治疗慢性肝炎, 认为其对降低转氨酶有效果. 后来铃木宏经过多年的临床应用和总结, 证明SNMC有明确的肝细胞保护作用. 其药理作用有: 保护肝细胞膜; 抗炎作用; 类固醇样作用; 免疫调节作用; 抑制病毒增殖、灭活病毒作用; 调控细胞凋

亡作用; 抗补体作用; 抗纤维化作用. 但对重症肝炎治疗的研究尚未见报告. 近两年来我们根据本药的药理学作用将其试用于治疗重症肝炎获得了较好的疗效. 为了深入研究SNMC对人类暴发性肝衰竭的保护机制, 我们采用临床随机对照多中心研究观察了SNMC对暴发性肝衰竭患者的保护作用, 同时探讨了SNMC对患者血清NO, TNF- α , IL-6的影响, 为临床应用SNMC治疗重症肝炎提供了一定的临床和实验依据, 可能对提高重症肝炎治疗的疗效有重要意义.

1 材料和方法

1.1 材料 入选标准: 既往无肝炎病史, 此次感染甲至戊型嗜肝病毒或非嗜肝病毒; 既往有慢性肝炎病史或乙肝病毒携带病史, 近1 a内无肝功变化者新近重叠感染甲至戊型嗜肝病毒或非嗜肝病毒; 药物性肝损伤; 妊娠合并肝炎; 实验室主要指标: PTA $\leq 40\%$ ($40\% < \text{PTA} < 60\%$ 诊断为重症趋势); TBIL每天增长 $\geq 17.1 \mu\text{mol/L}$ 或血清总胆红素大于正常值10倍以上; 肝脏储备能力降低(蛋白和胆固醇合成能力明显降低). 排除标准: 单纯自身免疫性肝损伤; 单纯酒精性肝损伤; 代谢性疾病引起肝损伤; 慢性肝炎1 a内肝功反复活动; 入院后治疗疗程小于7 d; 出现2种以上危及生命并发症者. 全部病例均为住院的急性、亚急性重型肝炎. 分为治疗组和对照组, 其中治疗组45例, 对照组41例. 治疗前两组患者的性别比例、年龄构成、病程长短及病情定度等主要指标差异无显著意义($P > 0.05$). 所有入选病例共观察4-8 wk. 治疗组男30例, 女15例, 平均年龄 47.3 ± 17.0 岁; 其中甲肝5例, 戊肝13例, 乙肝17例(其中2例重叠感染戊肝), 未分型10例; 该组中有7例由重症倾向转为亚急性重型肝炎; 腹水型18例, 脑型6例, 两者同时存在者14例. 对照组男28例, 女13例, 平均年龄 45.2 ± 17.0 岁; 甲肝3例, 戊肝12例, 乙肝19例(其中1例重叠感染戊肝), 未分型7例; 5例由重症倾向转为亚急性重型肝炎; 腹水型16例, 脑型5例, 两者同时存在者15例. 甘草酸苷由日本美能发源制药公司提供; IL-6, TNF- α 定量酶联检测试剂盒购自上海森雄科技试验有限公司; NO荧光试剂盒购自南京建成生物工程研究所; MOF-38IE超低温冰箱, 由日本SANYO公司制造; Q/BL001-91离心机, 北京医学离心机厂生产; DR-HW-1恒温水浴箱, 北京西城区医疗器械厂.

1.2 方法

1.2.1 对照组采用综合治疗措施 即目前通用的

■应用要点

本文首次应用甘草甜素在临床上对重型肝炎患者进行了多中心、随机、对照观察, 降低了重型肝炎的病死率, 且筛选出取得最佳疗效的剂量, 这将对重型肝炎的临床治疗具有重要的指导作用, 为有效降低重肝的病死率提供新疗法.

表 1 SNMC治疗FLF病例一般情况 (mean ± SD)

分组	n	ALB (g/L)	TBIL (μmol/L)	CHOL (mmol/L)	PTA (%)
治疗组	45	32.3 ± 4.6	322.1 ± 1.8	2.6 ± 1.0	32.8 ± 1.5
对照组	41	32.5 ± 4.8	360.6 ± 1.6	2.6 ± 0.9	38.6 ± 1.3

表 2 SNMC治疗FLF前后血清NO, TNF-α, IL-6的变化 (mean ± SD)

分组	n	治疗	NO (μmol/L)	TNF-α (μg/L)	IL-6 (ng/L)
治疗组 ^b	45	前	54.6 ± 31.2	206.1 ± 62.5	447.8 ± 91.9
		后	24.5 ± 18.1	148.7 ± 108.4	76.9 ± 71.2
对照组	41	前	60.0 ± 28.1	114.9 ± 55.6	403.4 ± 81.4
		后	48.1 ± 24.1	94.1 ± 54.4	357.1 ± 79.1

^bP<0.01 vs 对照组.

综合治疗措施. 稳定水、电解质平衡; 保持热量平衡; 支持治疗(新鲜血浆: 200-400 mL/d; 白蛋白: 50-100 mL/d); 护肝及促肝细胞再生; 并发症的防治. 治疗组在综合治疗措施基础上用SNMC替代甘利欣, iv点滴120 mL/d, 疗程应大于7 d. 治疗过程中24 h详细记录患者出入量, 观察基本生命体征、消化道症状、体力、精神状态及出血倾向等, 每3 d复查1次血尿分析、生化全项、PT和PTA. PTA的检测用酶联免疫法, 按说明书操作. 血清NO用硝酸还原法, 按说明书操作. ALT, TBIL, ALB, CHOL用日立7070全自动生化仪进行检测. TNF-α, NO, IL-6分别于入院时(用药前)和出院时(用药后)各化验1次; CHOL, PTA, ALT, TBIL治疗组平均每周采血1次, 共7次, 对照组因死亡或病情加重退院及经济承受能力等原因, 仅采血5次. 同时观察患者消化道症状, 体力恢复, 黄疸消退的情况, 及并发肝性脑病, 出血, 腹水, 肝肾综合征, 肝肺综合征, 继发感染等情况, 以及病死率.

1.2.2 疗效判定 显效为PTA>70%或接近正常、生化学检查各项指标达到或接近正常、症状和体征基本消失、生活质量明显提高; 好转为40%≤PTA≤70%、生化学检查各项指标得到一定改善、症状和体征明显好转、危及生命的并发症得到控制、生活质量改善; 恶化为黄疸进行性加深、PTA进行性下降、出现了难以控制的危及生命的并发症; 死亡. 将上述标准归纳为有效和无效2类, 有效包括显效及好转, 无效包括

恶化和死亡.

统计学处理 NO, TNF-α, IL-6的数据用mean ± SD表示, 不同组别间用SPSS 10.0软件进行配对t检验及成组t检验, 其他数据的处理则仅用t检验.

2 结果

治疗组严重乏力、消化道症状、黄疸、出血倾向、焦虑和烦躁、低热、肝臭及并发症的缓解情况明显好于对照组. 治疗组有17例治疗无效(包括死亡和病情恶化自动出院的患者), 病死率为37.8%(17/45), 对照组有29例治疗无效(包括死亡和病情恶化自动出院的患者), 病死率为70.7%(29/41). 两组病例PTA<20%的患者均死亡, 死亡者大多数合并二种以上严重的并发症, 如肝肾综合征、严重感染、腔道出血、肝性脑病等. 另外, 治疗组有7例重症趋势发展为重症肝炎的病例, 经积极治疗仅有1例死亡, 而对照组有5例类似患者就有1例死亡. 经统计学处理后, 出院时治疗组病情转归则明显优于对照组, 治疗前两组病例一般情况、病情定度无显著差异(P>0.05, 表1).

2.1 实验指标ALT, TBIL两组比较差异不显著, 可能与重症肝炎酶胆分离以及肝内淤胆有关; CHOL, PTA在治疗组的恢复程度明显优于对照组, 两组差异显著(P<0.01), 于治疗第3周后即明显改善(图1).

2.2 炎症介质两组之间的变化有显著差异, 可见

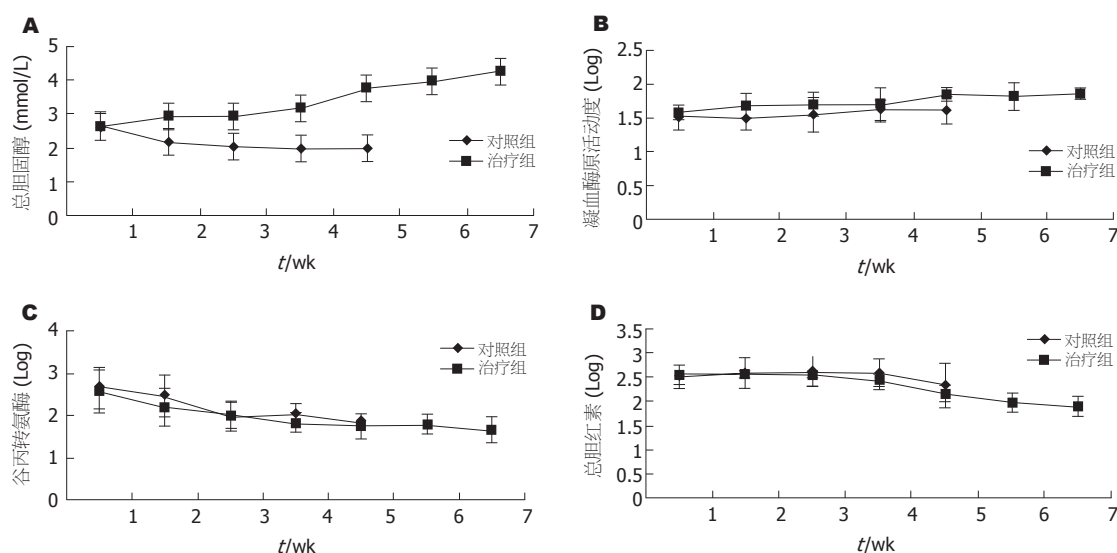


图1 复方甘草酸苷治疗重型肝炎不同时间两组血生化指标比较. A: 总胆固醇; B: 凝血酶原活动度; C: 谷丙转氨酶; D: 总胆红素.

SNMC对上述细胞因子作用明显(表2).

3 讨论

暴发性肝衰竭是病毒性肝炎的严重临床类型,其主要病理生理改变是机体免疫功能改变和肝细胞凋亡或死亡,导致的肝功能衰竭.急性重型肝炎发病多在14 d之内,入院时多伴有神志障碍或昏迷;亚急性重型肝炎发病多在8-10 wk之间,肝功能全面受损,黄疸加深,PTA降低,昏迷不多见,至少入院时未发生昏迷;极度乏力、严重的消化道症状如腹胀、恶心、呕吐、呃逆是重型肝炎的早期而重要的表现;性格改变、睡眠颠倒、计算力下降是肝昏迷先兆;出血倾向、感染、少尿是重型肝炎的危险信号;而劳累、酗酒、情绪波动、各类感染、上消化道出血、高蛋白饮食是重型肝炎病情加重的诱发因素,重型肝炎病情重,合并症多,预后差^[1].复方甘草酸苷是最先由日本开发的以甘草酸(甘草甜素)为主要成分的静脉和口服制剂.1958年,日本学者将SNMC尝试性地用于慢性肝炎患者的治疗,结果肝功能指标得到了明显改善.1977年,日本肝病专家铃木宏教授采用严格的随机双盲对照法验证了SNMC对慢性肝炎的疗效,证实SNMC能够有效降低ALT, AST和 γ -GT,目前,在日本肝病临床上正作为最佳的肝保护剂广泛应用.1980年初,北京协和医院等11家医院将甘草酸苷用于治疗慢性乙肝,证明其具有明显改善肝功能的疗效,1985年我国应用甘草单胺盐制剂 α -体治疗慢性病毒性肝炎,临床应用证实该制剂有显著改善肝功能的作用.但应用本制剂

对重型肝炎患者的临床治疗研究尚未见报道^[2].我们首先通过动物实验研究证明,本剂有明显阻止肝细胞凋亡和碎屑样坏死,减轻内毒素所介导的炎症介质对肝细胞的损伤,提高实验动物的存活率^[3].本研究经过2 a的临床观察,共对照治疗86例,在综合治疗的基础上加用SNMC,共治疗45例,与对照组相比,在治疗完成1 wk以上的患者大部分自觉症状明显改善,体力、食欲好转,实验室指标,如血清白蛋白、总胆固醇、PTA等主要指标明显优于对照组($P < 0.05$).同时我们还观察到治疗组的TNF- α , NO, IL-6比对照组低^[4].实验结果表明,SNMC通过使NO, IL-6释放的减少,从而减轻FLF中肝血窦内微血栓形成及肝内微循环障碍的发生,并且还能抑制FLF过程中产生的各种细胞因子所介导的免疫损伤,减轻FLF时内毒素的产生,从而减轻了LPS对肝细胞二次损伤作用.这与动物实验得出的结果一致.重型肝炎血清中TNF- α 水平升高^[5],患者外周血单个核细胞诱导TNF- α 活性增高,恢复期下降^[6],提示TNF- α 与肝坏死有一定关系.有学者认为,病毒性肝炎组织中TNF- α 的表达和肝坏死病变的程度呈正相关,肝组织中参与了病毒性肝炎肝坏死的发生. TNF- α 具有活化CD4+CD8+及NK细胞杀伤肝细胞的作用,是抗病毒防御效应的重要机制;而TNF- α 则与肝细胞的坏死密切相关^[7].因此CTL被活化后在发挥抗病毒效应时还能引起肝细胞的损伤甚至严重的肝衰竭.我们利用SNMC保护肝细胞的作用将其用于重型肝炎的患者,发现SNMC不但能降低胆红素,提高凝血酶原活动度,缓解病情,减

少并发症,降低病死率,而且能够降低重症肝炎患者血清TNF- α , NO, IL-6的水平.我们不但证明SNMC能降低FLF患者血清ALT和TBIL,增加PTA和CHOL,更为重要的是通过我们的实验证实,SNMC能使FLF患者血清TNF- α , NO, IL-6水平明显下降,从而减少危及患者生命的严重并发症的发生,缓解病情降低病死率,但强调治疗必须早期.本研究中治疗组7例重症倾向发展为重型肝炎,经早期积极治疗有1例死亡,而对照组3例只有1例痊愈.两组病例中PTA<20%的所有患者均出现严重并发症而死亡就是一个证明.已有实验研究证实SNMC能使小鼠FLF的肝细胞凋亡减少^[6],对FLF小鼠肝细胞有明显保护作用,本实验又在临床治疗对照研究中证明了其在FLF患者的相同疗效.我们推测SNMC能使FLF患者变性的肝细胞得到恢复,阻止其进一步坏死,使未变性的肝细胞免于损伤,同时可促进肝细胞再

生,从而使FLF患者肝细胞坏死面积缩小.

4 参考文献

- 1 向晓星, 王国俊, 蔡雄. 暴发型肝炎肝细胞凋亡的阻断治疗研究. 肝脏 2001; 6: 64-65
- 2 汪俊韬, 于少军, 肖炜. 复方甘草甜素(美能)在肝病领域的临床应用. 中国药房 2002; 13: 500-502
- 3 杨宝山, 陈立艳, 马英骥, 毕蔓茹. 甘草酸苷对小鼠暴发性肝损伤细胞凋亡的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 325-329
- 4 陈立艳, 杨宝山, 马英骥, 毕蔓茹, 高峰. 复方甘草酸苷对小鼠暴发性肝功能衰竭的保护作用. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 209-212
- 5 Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. Lancet 1988; 2: 72-74
- 6 张定凤. 肿瘤坏死因子在病毒性肝炎肝坏死中的作用及其防护. 中华医学杂志 1990; 70: 438-441
- 7 于岩岩, 斯崇文, 郎振为, 田秀兰, 何群, 薛海鹏. 肿瘤坏死因子 α 在病毒性肝炎肝坏死中的作用. 中华内科杂志 1996; 35: 28-31

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”. 本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨. 会议邀请国内外著名外科专家, 对热点问题做专题演讲, 参会代表进行学术交流、经验介绍和开展讨论.

1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等.

2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份, 并附拷贝软盘, 寄到100034, 北京西城区阜内大街133号 齐老师 收; 联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“普外会议征文”字样. 参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分. (3)截稿日期: 2006-06-30.

延边地区朝、汉族慢性乙型肝炎患者血清标志物与HBV DNA定量的关系

沈哲式, 金仁顺, 朴东明, 张英哲

沈哲式, 金仁顺, 朴东明, 张英哲, 延边大学医院病理科 吉林省延吉市 133000

通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医院病理科. pdm1117@hotmail.com

电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2006-02-27 接受日期: 2006-03-29

Relationship between hepatitis B virus serum markers and hepatitis B virus DNA quantities in Korean and Han patients with chronic hepatitis B in Yanbian area

Zhe-Shi Shen, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao, Ying-Zhe Zhang

Zhe-Shi Shen, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao, Ying-Zhe Zhang, Department of Pathology, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of pathology, Hospital of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm1117@hotmail.com

Received: 2006-02-27 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the HBV markers (HBV M) and contents of HBV DNA in Korean and Han patients with chronic hepatitis B (CHB) in Yanbian area.

METHODS: The contents of HBV DNA and the levels of HBV M were detected in 1773 patients (Korean, $n = 1074$; Han, $n = 699$) with CHB by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The data were comparatively analyzed between the two ethnic groups.

RESULTS: For HBV M, Korean and Han patients covered percentages of 40.69% and 47.07% ($P < 0.01$), respectively, in group A (HBsAg+, HBeAg+, HBcAb+), 47.07% and 38.34% ($P < 0.05$), respectively, in group B (HBsAg+, HBeAb+, HBcAb+), and 7.18% and 4.58% ($P < 0.05$), re-

spectively, in group C (HBsAg+, HBcAb+). The positive rates of HBV DNA had no significant difference between Korean and Han patients (A: 93.82%, 93.92%; B: 47.54%, 47.39%). The higher content of HBV DNA ($\geq 10^{14}$ - 10^{16} copies/L) was prominent in group A (70.73%, 72.17%), and the lower content ($\geq 10^6$ - 10^{10} copies/L) was dominant in group B (51.64%, 51.18%) in both Korean and Han patients.

CONCLUSION: HBV M levels are significantly different between Korean and Han patients with CHB in Yanbian area. The positive rate of HBV DNA is similar, but the content of HBV DNA is correlated with HBV M levels in two ethnic groups.

Key Words: Korean; Han; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Hepatitis B virus marker; HBV DNA

Shen ZS, Jin RS, Piao DM, Zhang YZ. Relationship between hepatitis B virus serum markers and hepatitis B virus DNA quantities in Korean and Han patients with chronic hepatitis B in Yanbian area. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1323-1325

摘要

目的: 探讨延边地区朝、汉族慢性乙型肝炎患者血清HBV M表现模式与HBV DNA含量的关系。

方法: 采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测慢性乙型肝炎患者1773例(朝鲜族1074例, 汉族699例)血清HBV DNA含量及HBV M, 比较分析朝、汉族HBV M表现模式与HBV DNA含量的关系。

结果: HBV M表现模式中朝、汉族在A组(HBsAg+、HBeAg+、HBcAb+)各占40.69%、47.07%($P < 0.01$), B组(HBsAg+、HBeAb+、HBcAb+)和C组(HBsAg+、HBcAb+)各占47.07%、38.34%及7.18%、4.58%(均 $P < 0.05$)。两个民族A、B组HBV DNA

■背景资料

乙型肝炎病毒感染率在不同人群中存在差异, 近年来国内有较多HBV M与HBV DNA关系的研究报道, 但有关少数民族的报道尚少。

■创新盘点

有关延边地区朝、汉族HBV感染的流行病学资料均检测了HBV M, 且样本较少。我们采用FQ-PCR法检测了1773例慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA含量, 比较分析了朝、汉族血清HBV M表现模式与HBV DNA含量的关系, 为进一步了解两个民族乙型肝炎感染状况提供依据。

的阳性率(A: 93.82%, 93.92%; B: 47.54%, 47.39%)相似, 在A组HBV DNA含量主要以高含量($\geq 10^{14}$ - 10^{16} copies/L, 70.73%, 72.17%)为主, B组多数以低含量($\geq 10^6$ - 10^{10} copies/L, 51.64%, 51.18%)为主。

结论: 延边地区朝、汉族HBV M表现模式有明显差异, 但HBV DNA的阳性率相似, HBV DNA含量与HBV M表现模式明显相关。

关键词: 朝族; 汉族; 荧光定量PCR; 乙型肝炎病毒DNA; 乙型肝炎病毒; 血清标志物

沈哲式, 金仁顺, 朴东明, 张英哲. 延边地区朝、汉族慢性乙型肝炎患者血清标志物与HBV DNA定量的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1323-1325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1323.asp>

0 引言

近年来国内有较多HBV M与HBV DNA关系的研究报道, 但有关少数民族的报道尚少。我们采用FQ-PCR和ELISA法检测了延边地区1773例慢性乙型肝炎患者血清HBV M及HBV DNA含量, 比较分析朝、汉族HBV M表现模式与HBV DNA含量的关系, 为更好地防治本地区乙型肝炎提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-04/2005-12未接受抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者1773例血清标本, 其中朝鲜族1074例(男637例, 女437例), 年龄7-78岁, 汉族699例(男447例, 女252例), 年龄5-85岁。Alisei全自动酶标仪和日本大和荧光定量PCR检测系统(FQD-33A)。

1.2 方法 采用ELISA法检测五项HBV M, 试剂盒由英科创新科技公司提供。FQ-PCR法检测HBV DNA, 试剂盒由深圳匹基生物工程公司提供。检测结果低于最低检出限时报告为 $<1 \times 10^6$ 拷贝/L; 检测结果 $>1 \times 10^6$ 拷贝/L时直接报告, 检测拷贝范围为 1×10^6 - 10^{16} 拷贝/L。每次试验均设阴性、阳性和峰值对照, 相关系数 $r \leq -0.980$, 严格按试剂盒说明书进行操作和分析结果。HBsAg+、HBeAg+、HBcAb+为A组; HBsAg+、HBeAb+、HBcAb+为B组; HBsAg+、HBcAb+为C组。

统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件系统进行数据处理, 两组率比较采用 χ^2 检验。

表 1 朝、汉族HBV M表现模式与HBV DNA阳性率的关系

HBV M模式	朝鲜族	HBV DNA+ (%)	汉族	HBV DNA+ (%)
1, 3, 5	437	410 93.8	329	309 93.9
1, 4, 5	448	213 47.5	268	127 47.4
1, 5	77	54 70.1	32	20 62.5
1	25	15 60.0	20	12 60.0
2, 5	24	6 24.0	5	1 20.0
4, 5	21	3 14.3	10	1 10.0
2, 4, 5	12	3 25.0	6	0 0
1, 3	8	8 100.0	8	7 87.5
1, 4	2	1 50.0	9	3 33.3
3	3	1 33.3	1	0 0
5	10	0 0	7	0 0
2	7	0 0	4	0 0
合计	1074	714 66.5	699	480 68.7

2 结果

HBV M检测结果HBsAg+为1, HBsAb+为2, HBeAg+为3, HBeAb+为4, HBcAb+为5。朝、汉族HBV M均由12种不同的模式组成, 在A组各占40.69%, 47.07%($P < 0.01$), 在B组及C组各占47.07%, 38.34%; 7.18%, 4.58%(均 $P < 0.05$), 两个民族HBV M表现模式有明显差异(表1)。朝、汉族大、B组HBV DNA的阳性率相似, 在A组HBV DNA的含量主要以高含量($\geq 1 \times 10^{14}$ - 10^{16} 拷贝/L, 70.73%, 72.17%)为主, B组多数以低含量($\geq 1 \times 10^6$ - 10^{10} 拷贝/L, 51.64%, 51.18%)为主, HBV DNA含量与HBV M不同表现模式有关。

3 讨论

HBV感染主要在非洲和亚洲国家流行, 我国属高地方性流行地区^[1-2]。乙型肝炎病毒总感染率受多种因素的影响, 不同人群总感染率存在差异。吉林延边州是中国朝鲜族聚居的地区, 研究表明本地区朝鲜族HBsAg阳性率高于当地汉族和韩国人^[3-7]。通常判断HBV感染及其状况采用ELISA法检测血清HBV M, 其结果只能提供HBV存在的间接证据。近年来发展起来的FQ-PCR技术达到定量检测HBV DNA的目的, 并消除了样本污染, 在扩增过程可进行实时在线定量阅读。如何判断血清HBV DNA与HBV M检测结果, 直接关系到临床治疗方案的确立, 也是临床医生和患者最为关心的问题。血清HBV DNA是判断HBV感染、有无传染性 & 评价各种药物疗效最可靠的标志物, 是与HBV相关肝细胞癌的重要预后因素。近年来国内用FQ-PCR检测

HBV DNA的研究报道较多, 但有关少数民族的报道很少^[8]. 本组检测结果朝、汉族HBV M由12种不同模式组成, 在A组($P<0.01$)、B组和C组(均 $P<0.05$)的构成比有明显差异, 表明朝、汉族HBV M表现模式不同, 这可能与不同种族及生活方式等的差异有关^[3]. 本组朝、汉族在大、B组HBV DNA的阳性率均相似, HBV DNA含量A组大多数以高含量为主, B组多数以低含量为主, 表明HBV DNA含量与HBV M不同表现模式有关, 与国内报告相似^[9-11].

一般认为HBeAg阳性血清用PCR检测HBV DNA几乎全为阳性, 本组HBeAg阳性组的HBV DNA阳性率为93.64%, 进一步证实了HBV M中HBeAg阳性是反映病毒复制活跃、传染性强的可靠指标. HBeAg血清转换通常表示病毒复制减弱, HBV DNA含量减少, 但并未完全消失, 使感染持续存在出现病毒血症. 亚洲人群中部分患者HBeAg血清转换后肝病活动持续进展, 发生合并症患者的2/3以上HBeAb阳性. 大多数肝硬化相关的合并症和肝细胞癌的发生是在HBeAg血清转换以后, HBeAb阳性的大部分患者肝硬化进展很可能与低水平病毒血症有关^[12], 因此HBeAg血清转换后即使血中HBV DNA含量低也需要继续给予积极的治疗.

比较国内报道的用FQ-PCR检测HBV DNA的结果, 在A组的阳性率均很高, 但在B组和C组的阳性率有较大差异^[9-11], 这可能与使用的试剂及仪器种类不同、各实验室的条件不同等因素有关. FQ-PCR检测技术在乙肝的诊治和评价药物疗效等方面有广泛的应用前景. 本组使用的FQ-PCR检测试剂最低检测限为 10^6 拷贝/L, 如样本中HBV DNA的量 $<10^6$ 拷贝/L时可能检测不出. 我们以往的研究表明, FQ-PCR法检测的40份HCV RNA阴性样品中, 用RT-PCR检测出4份阳性^[13], 因此用FQ-PCR检测HBV DNA阴性时同样

不能轻易排除病毒血症水平低于检测极限的可能性, 应重复用定性PCR检测, 以免漏诊病毒含量低的HBV感染活跃期的患者.

4 参考文献

- 1 Bae SH, Yoon SK, Jang JW, Kim CW, Nam SW, Choi JY, Kim BS, Park YM, Suzuki S, Suguchi F, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype C prevails among chronic carriers of the virus in Korea. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 816-820
- 2 庄辉. 我国乙型肝炎病毒感染与挑战. *中华传染病杂志* 2005; 23: 2-6
- 3 方今女, 崔莲花, 全贞玉, 南红梅, 金昌吉, 崔英一, 崔普律, 朴恒培, 寄牡丹, 申运秀, 曹海越, 尹载德, 吴熙福, 朴京锡. 中国延边和韩国京畿道农村地区乙型肝炎病毒的血清流行病学比较. *中华预防医学杂志* 2000; 34: 97
- 4 崔正洙, 柳吉洙, 朴华益, 王延玲. 延边地区不同人群乙型肝炎病毒感染的初步调查. *职业与健康* 2000; 16: 58-59
- 5 方今女, 崔莲花, 全贞玉, 金昌吉, 崔普律. 中国延边和韩国京畿道农村地区乙型肝炎病毒感染危险因素的比较. *疾病控制杂志* 2000; 4: 104-106
- 6 方今女, 崔莲花, 全贞玉, 金昌吉, 崔普律. 中国延边和韩国京畿道农村地区乙型肝炎病毒感染模式的比较研究. *延边大学医学学报* 2000; 23: 49-52
- 7 Lee DH, Kim JH, Nam JJ, Kim HR, Shin HR. Epidemiological findings of hepatitis B infection based on 1998 National Health and Nutrition Survey in Korea. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 457-462
- 8 李春林, 关英芝, 蒋学纷. 240例汉族与100例维吾尔族荧光定量PCR检测HBV-DNA结果初步分析. *中华临床医学杂志* 2004; 5: 40-41
- 9 李欣华, 蒋卫平, 武蓉珍. HBV DNA定量与乙肝血清标志物之间关系探讨. *临床肝胆病杂志* 2003; 19: 118-119
- 10 陈雪娟, 李刚, 刘淑芳, 陈文思, 李桂侠. HBV感染者HBV DNA与抗原抗体标志物的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 870-871
- 11 陈肇杰, 叶巧国, 刘正华, 曾桂胜, 何良兴. HBV病毒滴度与血清标志物关系的研究. *热带医学杂志* 2004; 4: 261-263
- 12 Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai KC, Lai CL. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1610-1614
- 13 张英哲, 金仁顺, 朴东明, 沈哲式. 荧光定量PCR与逆转录PCR检测HCV RNA的比较分析. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1349-1350

■同行评价

本文探讨了朝、汉人群中HBV感染模式的不同, 有一定的流行病学意义. 样本量大, 同以往国内报道结论存在不同, 是我国朝鲜族HBV感染状况的数据补充.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

罗格列酮治疗非乙醇性脂肪肝的疗效与脂联素相关

崔克勤, 赵翔伟, 张耀, 康小红, 孟杰, 陈贤栋

■背景资料

目前认为非乙醇性脂肪性肝病是代谢综合征的组成部分, 胰岛素抵抗、脂肪细胞因子(脂联素、抵抗素等)参与了其发病过程, 改善胰岛素抵抗, 增加脂联素水平可改善非乙醇性脂肪性肝病的病变程度。为此我们进行了罗格列酮对非乙醇性脂肪性肝病治疗的探讨。

崔克勤, 赵翔伟, 张耀, 康小红, 孟杰, 陈贤栋, 河北大学附属医院内分泌科 河北省保定市 071000

通讯作者: 崔克勤, 071000, 河北省保定市红星路108号, 河北大学附属医院内分泌科. ckqmjpmqb@126.com

电话: 0312-5981512

收稿日期: 2006-02-17 接受日期: 2006-03-21

Efficacy of rosiglitazone in treatment of nonalcoholic fatty liver disease and its relations with adiponectin

Ke-Qin Cui, Xiang-Wei Zhao, Yao Zhang, Xiao-Hong Kang, Jie Meng, Xian-Li Chen

Ke-Qin Cui, Xiang-Wei Zhao, Yao Zhang, Xiao-Hong Kang, Jie Meng, Xian-Li Chen, Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China

Correspondence to: Ke-Qin Cui, Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Hebei University, 108 Hongxing Road, Baoding 071000, Hebei Province, China. ckqmjpmqb@126.com

Received: 2006-02-17 Accepted: 2006-03-21

Abstract

AIM: To explore an effective, safe and convenient method in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and a marker in the prediction of the efficacy.

METHODS: One hundred and twenty-four patients diagnosed with NAFLD (except cirrhosis) were randomly divided into rosiglitazone (RSG) treatment group and placebo group (controls). After treatment with the corresponding methods, comparative analysis on the efficacy and serum adiponectin was performed between the two groups.

RESULTS: ESG significantly improved the liver function, levels of blood glucose, lipid and serum adiponectin, as well as insulin resistance (HOMA-IR) ($P < 0.05$). The total effective rates were markedly significantly between RSG group and placebo group (57/63 vs 37/61, $P < 0.01$). The levels of serum alanine aminotransferase (ALT) was significantly correlated with adipo-

nectin level ($r = -0.685$, $P < 0.01$) and HOMA-IR ($r = 0.447$, $P < 0.01$). The safety was not notably different between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: RSG is effective and safe in the treatment of NAFLD and serum adiponectin level can be used to predict its efficacy.

Key Words: Rosiglitazone; Nonalcoholic fatty liver disease; Insulin resistance; Adiponectin; Efficacy

Cui KQ, Zhao XW, Zhang Y, Kang XH, Meng J, Chen XL. Efficacy of rosiglitazone in treatment of nonalcoholic fatty liver disease and its relations with adiponectin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1326-1329

摘要

目的: 寻找有效、安全、简便治疗非乙醇性脂肪肝的方法及预测疗效的指标。

方法: 非乙醇性脂肪肝患者(除外肝硬化期)124例随机分为罗格列酮治疗组($n = 63$)和安慰剂对照组($n = 61$), 比较两组的疗效及对血清脂联素的影响。

结果: 罗格列酮组对肝功能、血糖、血脂、胰岛素抵抗(HOMA-IR)、血清脂联素的改善优于对照组($P < 0.01$); 总有效率罗格列酮组与对照组比较有显著差异(57/63 vs 37/61, $P < 0.01$); ALT与脂联素水平负相关正相关($r = -0.685$, $P < 0.01$), 与HOMA-IR呈正相关($r = 0.447$, $P < 0.01$)。两组在安全性上无差异($P > 0.05$)。

结论: 罗格列酮是一安全、有效、简便的治疗非乙醇性脂肪肝的药物。血清脂联素水平可作为预测治疗非乙醇性脂肪肝效果的指标。

关键词: 罗格列酮; 非乙醇性脂肪肝; 胰岛素抵抗; 脂联素; 疗效

崔克勤, 赵翔伟, 张耀, 康小红, 孟杰, 陈贤栋. 罗格列酮治疗非乙醇性脂肪肝的疗效与脂联素相关. *世界华人消化杂志* 2006;14(13):1326-1329

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1326.asp>

表 1 罗格列酮治疗非乙醇性脂肪肝后BMI、肝功能、血脂、胰岛素抵抗程度和脂联素的比较 (mean ± SD)

组别	t/wk	ALT (nkat/L)	GGT (nkat/L)	TG (mmol/L)	BMI (kg/m ²)	Homa-IR	脂联素 (mg/L)
对照组	0	1448 ± 220.7	1360 ± 224.9	2.07 ± 1.01	24.96 ± 2.67	1.39 ± 0.54	6.76 ± 1.87
	12	1161 ± 179.0 ^b	1137 ± 208.7 ^b	1.56 ± 1.22 ^a	24.94 ± 2.84	1.36 ± 0.53	6.96 ± 1.17
	24	896.8 ± 190.4 ^b	946.0 ± 214.9 ^b	1.48 ± 1.06 ^b	24.75 ± 2.71	1.31 ± 0.57 ^a	6.98 ± 1.28
治疗组	0	1487 ± 190.9	1419 ± 209.5	2.24 ± 1.06	25.02 ± 3.07	1.39 ± 0.53	6.84 ± 1.67
	12	855.7 ± 158.9 ^{bd}	849.2 ± 208.4 ^{bd}	1.39 ± 1.16 ^b	24.98 ± 3.14	1.21 ± 0.52 ^b	7.93 ± 1.29 ^b
	24	589.0 ± 159.7 ^{bd}	652.5 ± 169.5 ^{bd}	1.01 ± 0.89 ^{bd}	24.87 ± 2.73	0.96 ± 0.47 ^{bd}	10.07 ± 1.39 ^{bd}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 治疗前; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 对照组.

0 引言

随着社会经济的发展和人民生活水平的提高, 非乙醇性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率在逐年上升且呈现出低龄化的趋势. NAFLD是一种与肥胖、高胰岛素血症、2型糖尿病密切相关的临床病理综合征^[1], 在病理上分为: 单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝硬化. NAFLD确切的发病机制至今尚未完全阐明, 其中胰岛素抵抗(IR)及其相关代谢紊乱在NAFLD的发生过程中起重要作用^[2]. 罗格列酮(RSG)属于噻唑烷二酮类药物(TZDs), 是一种新型的口服抗糖尿病药物, 该药物除了具有改善胰岛素抵抗、降低血糖的作用外, 近年来许多研究发现此药尚有改善脂质代谢紊乱、减轻肝脏脂肪蓄积和肝脏炎性变程度等作用. 为此, 我们对罗格列酮治疗NAFLD的效果进行观察.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-2005在我院内分泌或消化内科就诊的诊断为非乙醇性脂肪肝(除外肝硬化期)124例, 随机双盲分为治疗组(罗格列酮组, *n* = 63)和对照组(安慰剂组, *n* = 61), 采用2002年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和乙醇性肝病学组制定的标准^[3], 凡具备下列第1-4项和第5项或第6项中任一项者: (1)无饮酒史或饮酒折合乙醇量每周<40 g; (2)除原发病表现外, 可出现乏力、腹胀、肝区隐痛等症状, 可伴肝脾肿大; (3)血清转氨酶可升高, 并以丙氨酸转移酶(ALT)增加为主, 常伴有γ-谷氨酰转肽酶(GGT)、三酰甘油(TG)等水平增高; (4)肝脏影像学表现符合弥漫性脂肪肝的影像学诊断标准; (5)肝脏组织学改变符合脂肪肝的病理学诊断标准; (6)除外病毒性肝炎、全胃肠外营养等可导致脂肪性肝病的特定疾病. 符合上述标准的患者入选前2 wk未服用

或已停用降酶、保肝和降血脂药物, 患者在完全了解本研究的性质、本人疾病的性质、药物的特性、相关治疗的方法和参加本试验可能承担的风险后, 能理解并签署了知情同意书. 治疗组63例, 男33例, 女30例, 年龄25-71(平均46.2 ± 2.6)岁, 体质指数(BMI)24.96 ± 2.67 kg/m²; 对照组61例, 男31例, 女30例, 年龄24-69(平均45.5 ± 2.0)岁, BMI 25.02 ± 3.07 kg/m². 生化指标、HOMA-IR、脂联素(表1), 两组间相关指标比较无差异, 具有可比性. 治疗期间无病例剔除实验.

1.2 方法 进行饮食教育及指导, 在饮食和运动治疗的基础上, 治疗组罗格列酮(药物来源葛兰素史克公司)4 mg, 2次/d, 口服24 wk; 对照组口服安慰剂1片, 2次/d, 口服24 wk, 每6 wk复查肝功能, 12及24 wk复查肝脏CT或B超, 评价疗效. 显效: 症状、体征消失, B超检查无脂肪肝表现, CT检查肝脏密度恢复正常, 肝脏CT值高于脾脏; 生化检查ALT, GGT, TG均恢复正常; 有效: 症状、体征好转, CT检查肝脏密度有所增高, 但CT值仍低于脾脏1-5 Hu, ALT, GGT, TG下降治疗前的2/3; 无效: 症状、体征无好转, CT检查肝脏密度增高, 但CT值仍低于脾脏5 Hu以上, ALT, GGT, TG下降未超过治疗前的2/3. 记录用药期间患者发生的任何不良事件, 其发生的时间和相应的处理及是否停药, 记录停药原因.

1.2.1 标本采集 受试者均于清晨空腹 8 h以上抽前臂静脉血10 mL, 室温静置30 min, 3000 r/min离心15 min, 分离血清, 取6 mL置于-70℃冰箱保存以备测定脂联素(美国LINCO公司提供, 放射免疫法, 批内CV<6.21%, 批间CV<9.25%)、胰岛素(中国原子能科学研究院); 另4 mL用以空腹血糖、血脂、肝功能、乙肝和丙肝标志物检测. 稳态模式胰岛素抵抗指数指标: HOMA-IR = Ln[(FINS × FPG)/22.5].

1.2.2 病例剔除 用药依从性差, 2 d以上未按要

■应用要点

罗格列酮在临床上应用具有较高的价值, 可减少非乙醇性脂肪肝的危害, 并具有较好的可行性.

■名词解释

脂联素: 为30 kDa的脂肪细胞分泌的脂肪细胞补体相关蛋白, 肝脏和肌肉中存在脂联素受体, 刺激肝脏脂联素受体可激活AMPK和PPAR- α , 起抗肝脂肪沉积作用。脂联素还具有抑制NF- κ B活化及抑制巨噬细胞功能的抗炎作用。脂联素和TNF- α 对IR和炎症的影响作用正好相反。

求服药者; 观察期内合并使用其他治疗如: 降脂药、保肝药, 不按时复诊或失访者不进入疗效分析, 由于不良事件的发生, 出于对患者的利益考虑, 医生认为需停药者不进入疗效统计, 但进入安全性评价。

统计学处理 使用SPSS 11.0统计软件进行数据处理, 计量资料用 t 检验及方差分析, 等级资料用秩和检验, 相关分析用直线相关分析。

2 结果

治疗12及24 wk时相关指标的比较, 两组与治疗前相比ALT, GGT, TG均有下降, 胰岛素抵抗程度治疗组有显著改善, 血清脂联素水平升高, 但对照组血清脂联素虽有升高但无统计学意义, 对照组于24 wk时胰岛素抵抗程度较治疗前下降。两组间比较, 24 wk治疗组较对照组ALT, GGT, TG, HOMA-IR下降明显, 血清脂联素升高($P<0.01$); 治疗12 wk时两组TG、HOMA-IR、脂联素水平比较无差异。治疗前后两组BMI有所下降, 但无统计学意义, 两组间比较无差异。治疗组24 wk末显效、有效分别为35/63和22/63, 比对照组好(17/61, 20/61, $P<0.01$)。根据脂联素水平分为高脂联素(≥ 5 mg/L)和低脂联素组(<5 mg/L), 两组显效30/45和22/79, 有效10/45和32/79, 而无效5/45和25/79($P<0.01$)。相关分析: ALT与HOMA-IR呈正相关($r = 0.447$, $P<0.01$), ALT与脂联素呈负相关($r = -0.685$, $P<0.01$)。在治疗期间, 对照组无不良反应发生, 治疗组有一女性发生轻度水肿, 但对症处理后症状消失, 继续实验, 未终止。

3 讨论

脂肪肝并非临床上一个独立的疾病, 而是各种原因导致的肝脏脂肪蓄积过多的一种病理状态; 非乙醇性脂肪肝已被认为是隐匿性肝硬化的常见原因^[4], 在沉积于肝脏的脂肪中, 磷脂占50%, 三酰甘油占20%, 降血脂药物的应用目前尚有争议, 因为这类药物将使更多的血脂集中于肝脏代谢, 加重了肝脏脂质的沉积并损害肝功能, 因此寻找一种既能降低血脂, 又不增加脂质沉积的药物对脂肪肝的治疗具有重要意义。罗格列酮为过氧化物酶增殖体的受体(PPAR γ)的激动剂, 调控与胰岛素效应有关的多种基因转录。这些基因的功能涉及葡萄糖的产生、转运、利用以及脂肪代谢的调节, 诸如增加胰岛素受体底物2(IRS-2), 葡萄糖转运子4(Glut-4), 脂蛋白脂酶

的表达以及抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、瘦素的表达, 降低游离脂肪酸(FFA)的产生。我们研究证实罗格列酮有效的改善NAFLD的程度和肝功能, 这与Neuschwander-Tetri *et al*^[5]报道一致, 其曾对30名患有非乙醇性脂肪性肝炎的成年患者应用罗格列酮治疗48 wk, 治疗前经肝穿刺活检证实均符合非乙醇性脂肪性肝炎的病理改变, 治疗后再次肝穿刺活检有10名患者的穿刺结果不再符合非乙醇性脂肪肝的病理表现, 且治疗后患者的血浆ALT水平明显下降。

ALT与HOMA-IR呈正相关。肝脏是脂肪代谢的重要器官, 在正常情况下, 脂类代谢在肝脏中保持着动态平衡。胰岛素抵抗时, 由于胰岛素对脂肪分解的抑制作用减弱, 产生大量的FFA, 脂肪组织的分解大于合成, 储脂能力下降而造成脂肪在肝脏的异位沉积, 而肝脏脂肪沉积使肝脏对额外的打击(如活性氧)易于发生更严重肝细胞损伤^[6]。FFA水平升高不仅促进NAFLD发生, 还可刺激胰岛细胞分泌胰岛素增多而产生或加重高胰岛素血症, 并使胰岛素介导的葡萄糖摄取和利用降低及促使肝糖异生, 使肝葡萄糖输出增加, 进一步加重胰岛素抵抗。因罗格列酮改善了胰岛素抵抗, 从而改善了肝功能。我们还发现罗格列酮可显著降低血清TG, ALT, 说明罗格列酮在改善胰岛素抵抗相关因素的同时改善脂质代谢紊乱, 减轻了肝脏的脂肪变性炎症^[7]。有研究认为其机制为罗格列酮激活体内的PPAR γ 后可以促进白色脂肪细胞分化, 增加小脂肪细胞的数量而减少大脂肪细胞的数量。小脂肪细胞对胰岛素的反应性更强, 有利于促进葡萄糖摄取, 促进能量消耗, 减少多余能量在脂肪组织中的储存^[8]。

罗格列酮治疗非乙醇性脂肪肝的疗效与脂联素水平相关, 非乙醇性脂肪肝改善与脂联素水平的升高相平行。ALT与脂联素水平负相关。脂联素降低可能是非乙醇性脂肪肝的致病因素之一。与文献报道一致^[9-10]。脂联素可以作为非乙醇性脂肪肝疗效评判的指标之一。动物实验证实ob/ob老鼠所形成的肥胖和脂肪肝模型中, 血浆脂联素水平均下降。在补充脂联素2 wk后, 血浆TG和FFA较对照组明显下降, 血清ALT显著下降, 肝脏与体质量比减少, 肝脏脂肪沉积明显减轻^[11]。我们采用B超或CT进行脂肪肝的诊断及疗效评估, 因尽管肝活检是诊断和评估NAFLD疗效的金标准, 但费用昂贵、有创伤及其并发症限制了肝活检的临床应用。研究结果显示: 在饮

食和运动治疗下, 患者脂肪肝的程度有改善, 与文献报道一致^[12]. 并在此基础上加用罗格列酮后, 疗效明显提高. 提示在节制饮食、增加运动等修正不良行为的基础上罗格列酮是对NAFLD治疗的一种较好的方法.

治疗组和对照组体质量指数(BMI)在干预治疗后均有所下降, 但无统计学意义, 两组间比较无差异. 需增加样本量及观察时间. 有文献报道脂联素与BMI、ALT负相关, 控制体质量后, 脂肪肝得到改善^[13]. 每降低1%的体质量可使血清ALT下降10%, 降低10%体质量可能使之复常. 需要注意的是, 短期内减肥速度过快, 易致脂肪性肝炎病变加重、电解质紊乱、高尿酸症、酮症及体质量反跳等不利影响^[14].

罗格列酮的不良事件与对照组比较无差异, 在观察期间无严重不良反应发生, 无因此退出治疗, 说明罗格列酮在常规剂量治疗NAFLD是安全的. 脂肪肝患者往往存在着多种胰岛素抵抗相关性疾病, 表现为严重的胰岛素抵抗, 从理论上讲TZDs改善胰岛素抵抗及脂质代谢紊乱对脂肪肝的治疗会十分有益. 但是由于曲格列酮的肝脏毒性作用, 临床医生对TZDs的安全性格外关注. 罗格列酮主要通过肝P4502C8代谢, 不经过肝药酶P4503A4代谢, 与二甲双胍、地高辛、阿卡波糖等多种药物无明显的相互作用^[15]. 许多离体实验和临床研究均显示罗格列酮对肝脏的不利影响明显低于曲格列酮. 且是一种改善与胰岛素抵抗密切相关的多种代谢紊乱的药物, 有很好的临床应用前景.

4 参考文献

- 1 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 371-375
- 2 Yoon D, Lee SH, Park HS, Lee JH, Park JS, Cho KH, Kim SM. Hypoadiponectinemia and insulin resistance are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 421-426
- 3 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝病诊断标准. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 71
- 4 Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med* 2006; 6: 19-25
- 5 Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38: 1008-1017
- 6 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 7 Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Sponseller CA, Hampton K, Bacon BR. Interim results of a pilot study demonstrating the early effects of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone on insulin sensitivity, aminotransferases, hepatic steatosis and body weight in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003; 38: 434-440
- 8 Matsuda J, Hosoda K, Itoh H, Son C, Doi K, Hanaoka I, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Yamori Y, Odaka H, Nakao K. Increased adipose expression of the uncoupling protein-3 gene by thiazolidinediones in Wistar fatty rats and in cultured adipocytes. *Diabetes* 1998; 47: 1809-1814
- 9 Louthan MV, Barve S, McClain CJ, Joshi-Barve S. Decreased serum adiponectin: an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2005; 147: 835-838
- 10 Kim SG, Kim HY, Seo JA, Lee KW, Oh JH, Kim NH, Choi KM, Baik SH, Choi DS. Relationship between serum adiponectin concentration, pulse wave velocity and nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 225-231
- 11 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 12 Liangpunsakul S, Chalasani N. Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Treat Option Gastroenterol* 2003; 6: 455-463
- 13 Sargin H, Sargin M, Gozu H, Orcun A, Baloglu G, Ozisik M, Seker M, Uygur-Bayramicli O. Is adiponectin level a predictor of nonalcoholic fatty liver disease in nondiabetic male patients? *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5874-5877
- 14 曾民德, 陆伦根. 非酒精性脂肪性肝炎的治疗. 胃肠病学和肝脏病学杂志 2000; 9: 158-160
- 15 Balfour JA, Plosker GL. Rosiglitazone. *Drugs* 1999; 57: 921-930

■同行评价

文章从临床试验的角度研究罗格列酮对非酒精性脂肪肝的治疗作用及机制, 有一定参考价值.

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

原发性十二指肠肿瘤诊治8例

张宗明, 李刚, 高原, 邢海林, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 杨俊雄

■背景资料

原发性十二指肠肿瘤少见, 临床症状缺乏特异性, 早期诊断困难。探讨原发性十二指肠乳头、降部、水平部良恶性肿瘤的诊断和手术方式选择十分必要。

张宗明, 李刚, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 杨俊雄, 清华大学第一附属医院消化中心普外科 北京市 100016
高原, 邢海林, 同济大学附属同济医院普外一科 上海市 200065

通讯作者: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化中心普外科。

zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

电话: 010-64372362 传真: 010-64361322

收稿日期: 2006-03-03 接受日期: 2006-03-15

Experience in diagnosis and treatment for 8 cases of primary duodenal tumor

Zong-Ming Zhang, Gang Li, Yuan Gao, Hai-Lin Xing, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Hua Zhong, Jin-Xing Guo, Jun-Xiong Yang

Zong-Ming Zhang, Gang Li, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Hua Zhong, Jin-Xing Guo, Jun-Xiong Yang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Yuan Gao, Hai-Lin Xing, the First Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

Correspondence to: Professor Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2006-03-03 Accepted: 2006-03-15

Abstract

AIM: To evaluate the preoperative diagnostic and surgical procedures for primary tumor of the duodenum (PTD).

METHODS: A retrospective analysis was performed on 8 PTD patients admitted in our hospital from October 2001 to December 2004. B-ultrasound, computed tomography (CT), duodenal endoscopy and air barium double radiography were used in the diagnosis of PTD located in the descending portion (2 cases), papilla region (3 cases) and inferior part (3 cases) of the duodenum.

RESULTS: For papilla region of the duodenum, 1 case of tubular adenoma and 1 leiomyoma were treated with the local resection of tumor, and 1 case of well/moderately-differentiated

carcinoma underwent the pancreatoduodenectomy. For the descending portion of the duodenum, 1 case of moderately-differentiated and 1 poorly-differentiated carcinoma received pancreatoduodenectomy. For inferior part of the duodenum, 2 cases of leiomyoma were given the local segmental resection of the duodenum, and 1 case of moderately-differentiated carcinoma underwent pancreatoduodenectomy. All the patients got smooth recovery from the operation, and no complications occurred. All the patients survived healthily, with the follow-up period of 29.7 ± 19.7 mo (3 to 51 mo).

CONCLUSION: For the PTD located in the papilla region and descending portion, CT and duodenal endoscopy are main methods for the preoperative diagnosis, and local resection are ideal surgical procedures. For the benign PTD in the inferior part, air barium double radiography is the first choice for the diagnosis, and segmental duodenectomy are curable. For the malignant PTD in the papilla region, descending portion and inferior part, the therapeutic choice should be pancreatoduodenectomy.

Key Words: Primary duodenal neoplasms; Diagnosis; Pancreatoduodenectomy; Duodenal segmental resection; Local resection

Zhang ZM, Li G, Gao Y, Xing HL, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX, Yang JX. Experience in diagnosis and treatment for 8 cases of primary duodenal tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(13):1330-1332

摘要

目的: 探讨原发性十二指肠乳头、降部、水平部良恶性肿瘤的诊断和手术方式选择, 提高诊治水平和疗效。

方法: 对2001-09/2005-10收治的8例原发性十二指肠乳头、降部、水平部肿瘤的诊断和手术方式进行回顾性分析。术前行B超、CT、十二指肠低张造影、十二指肠镜检查, 发现乳头肿瘤3例, 降部肿瘤2例, 水平部肿瘤3例。

结果: 确诊原发性十二指肠乳头管状腺瘤及

间质瘤并行肿瘤局部切除术各1例, 中高分化腺癌行胰十二指肠切除术1例; 原发性十二指肠降部中及低分化腺癌行胰十二指肠切除术各1例; 原发性十二指肠水平部间质瘤行局部肠段切除术2例, 中高分化腺癌行胰十二指肠切除术1例. 所有病例术后恢复良好, 无手术并发症. 随访时间 $29.1 \pm 19.7(3-51)$ mo, 均健康生存.

结论: 对于原发性十二指肠乳头和降部良性肿瘤, 以CT结合十二指肠镜检查 and 局部肿瘤切除为主要诊断手段和术式选择; 对于原发性十二指肠水平部良性肿瘤, 首选十二指肠低张造影检查和局部肠段切除治疗; 对于原发性十二指肠乳头、降部或水平部恶性肿瘤, 均应首选胰十二指肠切除术.

关键词: 原发性十二指肠肿瘤; 诊断; 胰十二指肠切除术; 十二指肠节段切除; 局部切除

张宗明, 李刚, 高原, 邢海林, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 杨俊雄. 原发性十二指肠肿瘤诊治8例. 世界华人消化杂志 2006;14(13):1330-1332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1330.asp>

0 引言

原发性十二指肠肿瘤少见, 分为良性和恶性2种, 可发生于十二指肠各段, 临床症状缺乏特异性, 早期诊断困难. 由于其毗邻胰腺和胆总管下段, 给治疗带来诸多困难^[1]. 我院2001-09/2005-10收治原发性十二指肠乳头、降部、水平部肿瘤8例, 现对其诊断和手术方式进行回顾性分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2001-09/2005-10收治原发性十二指肠乳头、降部、水平部肿瘤患者8例, 男5例, 女3例; 年龄40-72(平均 58.5 ± 11.9)岁; 病程21-300(平均 92.6 ± 93.7) d. 临床表现右上腹疼痛不适3例(37.5%), 间歇黑便3例(37.5%), 皮肤及巩膜黄染2例(25%), 腹胀、呕吐2例(25%), 体质减轻2例(25%), 腹部肿块1例(12.5%).

1.2 方法 全组病例均行B超和CT检查, B超检查显示不同程度的肝内外胆管扩张3例; CT检查显示胆总管下端占位性病变伴肝内外胆管扩张3例, 十二指肠降部或水平部肿块影或软组织影5例. 6例行十二指肠低张造影, 显示十二指肠水平部肠腔充盈缺损、黏膜完整2例, 十二指肠水平部肠腔狭窄、黏膜稍乱1例, 十二指肠降部肠腔狭窄、黏膜稍乱2例. 6例行十二指肠镜检查, 发现十二指肠降部肿物2例, 十二指肠乳

头肿物3例, 其中1例乳头肿物质软、较游离、有蒂、阻塞胆总管下端、可用网篮拉出. 血清CEA $6.5-39.7(\text{平均} 16.2 \pm 14.5) \mu\text{g/L}$; CA19-9 $2.9-627.4(\text{平均} 179.94 \pm 254.50) \text{ kU/L}$; CA125 $5.1-22.2(\text{平均} 9.53 \pm 6.02) \text{ kU/L}$.

2 结果

2.1 手术方式 全部患者行手术治疗, 术前十二指肠镜取材活检或术中冰冻切片病理检查. 确诊原发性十二指肠乳头管状腺瘤及间质瘤并行肿瘤局部切除术各1例, 中高分化腺癌行胰十二指肠切除术1例; 原发性十二指肠降部中及低分化腺癌行胰十二指肠切除术各1例; 原发性十二指肠水平部间质瘤行局部肠段切除术2例, 中高分化腺癌行胰十二指肠切除术1例.

2.2 生存情况 所有病例术后恢复良好, 无手术并发症出现. 2006-01对全组病例进行随访, 获得随访资料8例, 随访率100%, 随访时间3-51(平均 29.1 ± 19.7) mo, 均健康生存.

3 讨论

原发性十二指肠肿瘤, 由于发病率低、起病隐匿、缺乏特异性症状, 致早期诊断困难. 随着影像技术和十二指肠镜的广泛应用, 早期诊断率明显提高. 手术切除是原发性十二指肠肿瘤最基本、最有效的治疗方法, 主要根据十二指肠肿瘤所在的部位和病理学类型决定手术治疗方案. 十二指肠部位划分除通常分为球部、降部、水平部、升部外, 也常以十二指肠乳头为界, 分为乳头上区、乳头区、乳头下区. 根据原发性十二指肠肿瘤的好发部位和对机体造成的危害及预后因素, 我们选择十二指肠乳头、降部、水平部为重点观察对象, 旨在探讨其良恶性肿瘤的诊断和手术方式选择, 以期提高诊治水平和疗效. 针对本组病例的诊治经验和体会, 我们认为: (1) 十二指肠镜检查不仅可观察肿瘤的部位、形态和范围, 还可取材作病理活检, 尤其适于十二指肠乳头和降部肿瘤检查, 但对十二指肠水平部或升部的肿瘤观察不满意, 且易受镜本身“盲区”等因素的影响, 此时需要结合十二指肠低张造影来诊断. 十二指肠镜检查的最大优点是可取病变组织活检而确诊, 但常由于取材浅表或部位不准确而致确诊率仅为60%左右, 因此要求多点、多次活检以提高确诊率. (2) 十二指肠低张造影可使十二指肠黏膜平展而易于发现小病灶, 可显示肿物影像, 并可显示十二指肠镜不易看到的水平

部或升部病变或因肠腔狭窄十二指肠镜不能伸入的病变,因对怀疑十二指肠水平部或升部肿瘤者应首选本检查,但其缺点在于不能判断病变性质。(3)十二指肠肿瘤局部切除主要适用于十二指肠乳头区或降部的良性肿瘤,或因年老体弱不能耐受根治性手术的十二指肠乳头区或降部小癌灶患者^[2-5],要求将肿瘤基底部完全切除,切缘至少离肿瘤基底1.5 cm以上,尽量避免切透十二指肠后壁。局部切除乳头区肿瘤时应注意胆、胰管开口成形和黏膜化,局部切除乳头附近的肿瘤时应注意避免损伤乳头及壶腹。(4)十二指肠节段切除主要适用于十二指肠水平部或升部的良性肿瘤^[6-7],或因年老体弱不能耐受根治性手术的十二指肠水平部或升部小癌灶患者,一般可距肿瘤2-3cm切除病变肠段,行十二指肠空肠端端吻合。尽管此术式使病变周围组织切除不足,不能清扫附近淋巴结,不符合肿瘤根治原则,但乳头下区十二指肠癌若无胰腺浸润,行节段性十二指肠切除是可行的^[8-9];另外,十二指肠水平部或升部的恶性肿瘤行节段性十二指肠切除,可以取得比较满意的治疗效果^[10-11]。(5)由于十二指肠与胰头关系密切,其恶性肿瘤易侵犯胰头,因此胰十二指肠切除术已被多数人认为是目前最有希望的根治性手术和标准的治疗方法^[12]。该术式主要适用于十二指肠各段的恶性肿瘤,若肿瘤未侵及十二指肠球部,可行保留幽门的胰十二指肠切除术。

4 参考文献

- 1 Stell D, Mayer D, Mirza D, Buckels J. Delayed diagnosis and lower resection rate of adenocarcinoma of the distal duodenum. *Dig Surg* 2004; 21: 434-438; discussion 438-439
- 2 高原, 张宗明, 王宝昌, 吴强. 十二指肠乳头腺瘤的诊治体会. *中华普通外科杂志* 2003; 18: 253-254
- 3 Rice DC, Bakaeen F, Farley DR, Unni KK, van Heerden JA. Surgical management of duodenal leiomyomas. *World J Surg* 2001; 25: 562-566
- 4 Chong KC, Cheah WK, Lenzi JE, Goh PM. Benign duodenal tumors. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1298-1300
- 5 孙卫红, 费立升, 潘玉玲, 曾思务, 陈占峰. 肿瘤局部切除在高龄十二指肠乳头癌患者治疗中的作用. *中华胃肠外科杂志* 2005; 8: 463-464
- 6 De Nicola P, Di Bartolomeo N, Francomano F, D'Aulerio A, Innocenti P. Segmental resection of the third and fourth portions of the duodenum after intestinal derotation for a GIST: a case report. *Suppl Tumori* 2005; 4: S108-S110
- 7 Tocchi A, Mazzoni G, Puma F, Miccini M, Cassini D, Bettelli E, Tagliacozzo S. Adenocarcinoma of the third and fourth portions of the duodenum: results of surgical treatment. *Arch Surg* 2003; 138: 80-85
- 8 杨占宇, 韩本立, 董家鸿, 别平. 原发性十二指肠癌的诊治与外科治疗. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 478-480
- 9 Bakaeen FG, Murr MM, Sarr MG, Thompson GB, Farnell MB, Nagorney DM, Farley DR, van Heerden JA, Wiersma LM, Schleck CD, Donohue JH. What prognostic factors are important in duodenal adenocarcinoma? *Arch Surg* 2000; 135: 635-641
- 10 Joesting DR, Beart RW Jr, van Heerden JA, Weiland LH. Improving survival in adenocarcinoma of the duodenum. *Am J Surg* 1981; 141: 228-231
- 11 陶开山, 窦科峰, 高志清, 李开宗. 原发性十二指肠肿瘤96例的诊断和治疗. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 342-344
- 12 Bucher P, Gervaz P, Morel P. Long-term results of radical resection for locally advanced duodenal adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1727-1729

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、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、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)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或μmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcyj@wjgnet.com
收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:
摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用:^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^{\circ}\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang et al”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号。

如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 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: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名

单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 主治医师
中山大学附属第一医院消化内科

陈红松 副研究员
人民医院肝病研究所

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院全军感染病研究所

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

党双锁 副教授
西安交通大学第二医院感染科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

房静远 教授
仁济医院消化所

龚国忠 教授
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

季国忠 副教授
南京医科大学第二附属医院消化科

李靖 副教授
重庆市第三军医大学附属新桥医院肝胆外科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心、传染病科

牛建昭 教授
北京中医药大学

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

彭心宇 教授
石河子大学医学院一附院

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

石统东 副教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

唐霓 副研究员
重庆医科大学

唐文富 主治医师
四川大学华西医院中西医结合科

王广义 教授
吉林大学第一医药普外科

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

魏经国 教授
第四军医大学唐都医院放射科

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

伊力亚尔·夏合丁 教授
西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

张学 教授
中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心

邹小明 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科