ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 5 月 28 日　第 14 卷　第 15 期　(Volume 14 Number 15)

世界华人消化杂志 www.wjgnet.com 二零零六年五月二十八日 第十四卷 第十五期 世界胃肠病学杂志社

祝贺

国家自然科学基金委员会成立

20周年

1986年，国家自然科学基金委员会成立，标志着科学基金制在我国开始全面实施．国家自然科学基金委员会的主要职能是根据国家发展科学技术的方针、政策和规划，运用国家财政投入的自然科学基金，面向全国，公平公开，择优资助自然科学基础研究和部分应用研究，发现和培养人才，发挥基金的导向和协调作用，促进我国科技进步和经济社会发展．20年来，中国科学技术研究领域取得的辉煌成就，很大一部分都曾惠泽于科学基金制的实施．作为进出科学研究的主要资助渠道，科学基金已经成为现代科学事业不可或缺的重要基石和主要推动力量．

15 / 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
别平教授 重庆
白文元教授 石家庄
白玉贤教授 哈尔滨
蔡淦教授 上海
蔡开琳副教授 武汉
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
陈凛教授 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
程树群副教授 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
巩鹏副教授 大连
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
郝春秋副教授 西安
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
李军祥教授 北京
李奇林教授 广州
李胜研究员 济南
李涛主治医师 北京
李晓宇主任医师 北京
李旭副教授 广州
李延青教授 济南
李永哲副研究员 北京
李瑗教授 南宁
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
林胜璋副教授 温州
林勇讲师 上海
刘宝瑞教授 南京
刘彬彬副研究员 上海
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
刘铁夫教授 哈尔滨
刘颖斌副教授 杭州
刘占举教授 郑州
刘正稳教授 西安

世界华人消化杂志®
编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2006 年 5 月 28 日　第 14 卷　第 15 期　(总第167期)

述　评

1445 胰岛ε细胞的研究进展 洪天配, 李琳

基础研究

1448 Caveolin-1对胃癌细胞系MGC803细胞生长的影响
罗红梅, 唐圣松, 廖端芳, 严鹏科, 谭力铭, 汪煜华, 龙治峰, 刘月顺, 朱炳阳

1453 胃癌相关基因GCRG213正反义真核表达载体的构建及鉴定
高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华

1458 hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养和最高表达株的筛选
代文杰, 胡震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈

1462 HBeAg结合蛋白4基因剪切体HBeBP4A的克隆化
张健康, 郭江, 成军, 王丹琼, 伦永志, 赵龙凤, 蓝贤勇, 洪源, 毛羽

1466 粒细胞集落刺激因子促进大鼠移植肝的再生作用
陈国栋, 刘玉兰, 尤鹏, 陈宁

1471 肝硬化大鼠门静脉内毒素水平与Child-Pugh分级之间的关系
殷云勤, 韩德五, 王新国

临床研究

1475 MTHFR C677T基因多态性与新疆哈族和汉族食管癌易感性的关系
张金芳, 庞丽娟, 赵瑾, 陈湘川, 顾立怡, 葛春鸣, 项阳, 李洪安, 蒋金芳, 梁伟华, 赵娟, 张丽翠, 杨磊, 李锋

1481 高脂高糖、饮酒建立家兔脂肪肝模型及超声量化诊断
姚希贤, 南月敏, 王莹, 李凤林, 郭瑞军

1487 胃癌组织中PTEN, MMP-9和Caspase-3表达的关系
张丹丹, 郭琳, 王强

文献综述

1493 胃肠激素与反流性食管炎 李军杰, 郑勇

1498 多层螺旋CT灌注成像对肝转移瘤的诊断价值 李艳英, 刘悦, 张在人

1502 生物活性食物成份与消化系肿瘤 丁雯瑾, 孙丹凤, 房静远

1507 EGCG和染料木黄酮在肿瘤细胞信号传导中的作用 靳西凤, 冉志华

研究快报

1512 胃肠道恶性肿瘤Cyclins表达分型与MDR1及TNM分期的关系
郭勇, 覃吉超, 周毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平

1516 一种新的幽门螺杆菌克拉霉素耐药相关基因
姜葵, 何利华, 赵飞, 王邦茂, 张建中

1520 大鼠重症急性胰腺炎内毒素血症、细胞因子和一氧化氮的变化及善宁的治疗作用
王艳蕾, 张凤宇, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤

临床经验

1524 长期质子泵抑制剂治疗老年反流性食管炎11例
李军, 吴本俨

1527 HBeAg(-)乙型肝炎后肝硬化的临床特征
焦以庆, 刘萍

1530 国人特发性收缩性肠系膜炎47例
顾国利, 王石林, 周晓武

1533 腹水/血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别价值
黄家淼, 杨剑, 周仁荣, 胡健

附　　录	1537 世界华人消化杂志投稿须知
致　　谢	1542 致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	1452 NERD及相关疾病国际研讨会 1470 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1480 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知 1486 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 1497 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 1501 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 1515 第八届中西医结合实验医学研讨会 1523 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 1526 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1536 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会
封面故事	祝贺国家自然科学基金委员会成立20周年
国际会议	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 anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

世界華人消化杂志

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 2006-05-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣　社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁　英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张海宁
电子编辑 张敏 李琪
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: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023，北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》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	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

May 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 15

EDITORIAL

1445 Advance in pancreatic ε cells
Hong TP, Li L

BASIC RESEARCH

1448 Effect of Caveolin-1 on growth of human gastric cancer cell Line MGC803
Luo HM, Tang SS, Liao DF, Yan PK, Tan LM, Wang YH, Long ZF, Liu YS, Zhu BY

1453 Construction and identification of eukaryotic expression vector of gastric cancer associated gene GCRG213
Gao LL, Wu BY, Wang MW, Huang HL, Wu YQ, You WD, Wang WH

1458 Clone culture of human interleukin-10 gene modified L02 hepatocytes and selection of cell strain with most interleukin-10 expression
Dai WJ, Hu Z, Wu LF, Jiang HC, Wu YH, Pan SH

1462 Cloning of spliced variant HBeBP4A of hepatitis B virus e antigen binding protein 4
Zhang JK, Guo J, Cheng J, Wang DQ, Lun YZ, Zhao LF, Lan XY, Hong Y, Mao Y

1466 Granulocyte colony stimulating factor accelerates regeneration and attenuates injury of partial liver allograft in rats
Chen GD, Liu YL, You P, Chen N

1471 Association between portal endotoxemia and Child-Pugh classification in complex pathogens-induced hepatic cirrhosis in rats
Yin YQ, Han DW, Wang XG

CLINICAL RESEARCH

1475 Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with susceptibility to esophageal cancer in Kazakh and Han populations in Xinjiang Uygur Autonomous Region
Zhang JF, Pang LJ, Zhao J, Chen XC, Gu LY, Ge CM, Xiang Y, Li HA, Jiang JF, Liang WH, Zhao J, Zhang LC, Yang L, Li F

1481 Establishment of experimental hepatic steatosis model in rabbits and non-invasive quantitative ultrasonic diagnosis of fatty liver disease
Yao XX, Nan YM, Wang Y, Li FL, Guo RJ

1487 Relationship among PTEN, matrix metalloproteinase-9, and Caspase-3 Expression in gastric carcinoma
Zhang DD, Guo L, Wang Q

REVIEW

1493 Relationship between gastrointestinal hormones and reflux esophagitis
Li JJ, Zheng Y

1498 Values of multislice spiral computed tomography perfusion imaging in diagnosis of metastatic hepatic carcinoma
Li YY, Liu R, Zhang ZR

1502 Bioactive food compositions and digestive tumors
Ding WJ, Sun DF, Fang JY

1507 Roles of epigallocatechin-3-gallate and genistein in signal transduction of tumor cells
Jin XF, Ran ZH

RAPID COMMUNICATION

1512 Correlations of Cyclins expression types with multi-drug resistance-1 and TNM staging in gastrointestinal cancer
Guo Y, Qin JC, Zhou Y, He XJ, Li WH, Xie DX, Gong JP

1516 A novel gene associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*
Jiang K, He LH, Zhao F, Wang BM, Zhang JZ

1520 Changes of endotoximia, cytokines and nitric oxide and therapeutic effects of sandostatin in rats with severe acute pancreatitis
Wang YL, Zhang FY, Jing YL, Zhao JX, Zhao CX, Duan GX

CLINICAL PRACTICE

1524 Long-term use of proton pump inhibitors in treatment of reflux esophagitis in 11 aged patients
Li J, Wu BY

1527 Clinical characteristics of patients with hepatocirrhosis after HBeAg-negative hepatitis B
Jiao YQ, Liu P

1530 Clinical characteristics of Chinese retractile mesenteritis: an analysis of 47 cases
Gu GL, Wang SL, Zhou XW

1533 Values of simultaneous determination of 5 tumor markers in fluid and serum and their ratio in differential diagnosis of benign and malignant ascites
Huang JM, Yang J, Zhou RR, Hu J

APPENDIX

1537 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

1542 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Congratulations to the 20th anniversary of national natural science foundation commitee.

INTERNATIONAL MEETINGS

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 anfermedades 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 28, 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: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**
Copyright © 2006 by The WJG Press

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1445-1447
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

胰岛ε细胞的研究进展

洪天配, 李 琳

洪天配, 李琳, 北京大学第三医院内分泌科 北京大学糖尿病中心 北京市 100083
洪天配, 教授, 主任医师, 博士生导师. 1985年福建医科大学医学学士, 1991年北京大学医学部医学博士, 1997/1999年丹麦Steno糖尿病中心客座研究. 负责国家自然科学基金等课题10项, 发表学术论文70余篇. 现任北京大学第三医院内分泌科主任, 兼任中华内分泌学会委员、中华糖尿病学会青年委员、北京内分泌学会常委、北京糖尿病学会委员、多个学术期刊的编委等.
北京市自然科学基金项目, No. 7062067
高等学校博士学科点专项科研基金, No. 20050001146
国家自然科学基金项目, No. 30170443
通讯作者: 洪天配, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科. tpho66@bjmu.edu.cn
电话: 010-62017691 传真: 010-62007700
收稿日期: 2006-03-22 接受日期: 2006-03-27

摘要

胰腺由外分泌组织和内分泌组织2个部分所组成, 两者在机体能量平衡和营养代谢调节中发挥重要的作用. 胰岛是胰腺组织中重要的内分泌功能单位, 胰岛的发育和分化过程涉及一个复杂而精细的分子调控网络体系, 其中包括许多转录因子的参与. 经典的胰岛内分泌细胞包括α细胞、β细胞、δ细胞及PP细胞, 分别产生胰升糖素、胰岛素、生长抑素及胰多肽(PP), 各种胰岛细胞之间的相互调节在维持血糖稳态中具有重要的意义. 表达ghrelin的ε细胞是一种新近发现和命名的胰岛细胞类型. 现着重对胰岛ε细胞的发现过程、形态学特点及生物学作用进行介绍.

关键词: 胰岛ε细胞; ghrelin; 胰岛

洪天配, 李琳. 胰岛ε细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1445-1447
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1445.asp

0 引言

1970年代, 发现许多人工合成的小分子肽类和非肽类物质在体内或体外均可促进生长激素(GH)分泌, 故将这类物质统称为生长激素促分泌物(growth hormone secretagogues, GHSs). 根据GHSs促进GH分泌的信号传导机制与生长激素释放激素(GHRH)有所不同, 推测机体内存在GHSs相应的受体(GHS-R). 1996年, Howard *et al*[1]成功地克隆了GHS-R的cDNA, 并证实其属于α螺旋7次跨膜的G蛋白偶联受体. 1999年, Kojima *et al*[2]从大鼠胃组织中分离和纯化了一种由28个氨基酸组成的多肽, 其第3位的丝氨酸残基上连接一个辛酰基基团(即被辛酰基化, 是发挥多种生物学功能所必需), 并证实其为GHS-R的内源性配体. 因其具有促进GH释放的作用而命名为ghrelin(“ghre”在古印欧语系中的意思为“生长”, “relin”在美国药典中为表示“释放某物质”的后缀). 早期的研究发现, ghrelin主要分布于胃肠道和下丘脑中, 故将其定义为一种脑肠肽. 近年来的研究发现ghrelin广泛分布于多种组织或器官中, 除了促进GH分泌外, 其还可在心血管、免疫、内分泌等多个系统中发挥复杂的生物学功能[3]. 胰岛是胰腺组织中重要的内分泌器官, 其发育和分化过程涉及一个复杂而精细的调控网络体系, 其中包括许多转录因子的参与, 他们相互协调, 在不同时期发挥着相应的作用. 经典的胰岛内分泌细胞包括α细胞、β细胞、δ细胞及PP细胞, 分别产生胰升糖素、胰岛素、生长抑素及胰多肽(PP), 其中β细胞在数量上最多, 约占成年胰岛细胞中的75%. 表达ghrelin的胰岛ε细胞是最近发现和命名的一种新的胰岛细胞类型. 本文介绍胰岛ε细胞的发现过程、形态学特征及生物学作用.

1 胰岛ε细胞的发现及确认过程

2002年, Wierup *et al*[4]利用免疫荧光染色和原位杂交检测发现, ghrelin在胎儿及成人胰腺组织中表达, 成人期一般呈单个分布于胰岛周边, 并且不与胰升糖素、胰岛素、生长抑素、PP等任何一种已知的经典胰岛内分泌激素共表达. 这个研究小组据此首次提出了胰岛ghrelin细胞可能是一种新的胰岛细胞类型. 同年, Date *et al*[5]采用免疫荧光染色发现ghrelin与胰升糖素在成年大鼠胰岛中共表达, 故而提出了ghrelin可能存在于胰岛α细胞中. 然而, 该研究中的组织荧光染色效果较差, 且ghrelin染色阳性细胞的数

■背景资料
ghrelin是近年从大鼠胃组织中首先发现的一种调节肽, 已知其在多种组织或器官中广泛分布, 并且具有多种多样的生物学功能. 经典的胰岛内分泌细胞包括α细胞、β细胞、δ细胞及PP细胞, 分别产生胰升糖素、胰岛素、生长抑素及胰多肽. 胰岛ghrelin细胞在发育生物学、细胞形态学等方面不同于上述任何一种细胞, 故被认为是一种独立的胰岛细胞类型, 并将其命名为胰岛ε细胞.

■研发前沿
对胰岛ε细胞的研究热点和重点主要集中在发育生物学、形态学特点及生理学作用方面的研究, 有关其病理生理学意义的研究亟待加强.

■创新盘点
本文与其他相关文章的不同点在于本文注重ghrelin与胰岛内分泌功能调控及其机制之间的联系, 对近年来有关胰岛ε细胞的发现过程、形态学特点、生物学作用及其机制的报道进行了总结.

量过多, 故其结果的可靠性值得怀疑. 2004年, Wierup *et al*[6]利用免疫荧光染色对不同发育阶段的大鼠胰腺组织进行观察发现, 胰腺组织中ghrelin阳性细胞的出现明显早于胃组织, 并且其数量在胚胎期和出生后的发育过程中呈现动态变化, 在胚胎中期至出生后5 d的胰岛内达到高峰, 之后逐渐减少; ghrelin细胞在胰岛发育过程中表现为一个独立的细胞群体, 但在围产期有少数ghrelin细胞亚群可与胰升糖素出现短暂的共表达; 此外, 少数胰岛ghrelin细胞可与导管细胞标志物CK20、细胞增殖标志物Ki67及α细胞谱系标志物Brn4共表达. 提示胰岛ghrelin细胞可能起源于导管细胞, 具有增殖的能力, 并与α细胞具有相同的谱系.

2004年, Sussel领导的研究小组发现, 转录因子*Nkx2.2*基因敲除小鼠表现为严重的高血糖、围产期死亡、胰岛结构和大小基本正常, 其胰岛中产生胰升糖素、胰岛素、生长抑素、PP等4种经典内分泌激素的细胞被表达ghrelin的细胞所取代, 并且转录因子*Pax4*敲除小鼠的胰岛也具有相似的表型特征[7]. 提示胰岛ghrelin细胞与β细胞可能来源于共同的前体细胞, *Nkx2.2*和*Pax4*是决定胰岛β细胞分化所必需的重要转录因子[7-8]. 由于野生型正常小鼠胰岛中也存在少量的ghrelin产生细胞, 从而证实胰岛ghrelin细胞是一种新的胰岛类型, 并建议将其命名为胰岛"ε"细胞[7]. Heller *et al*[9]的研究结果显示, ghrelin在围产期小鼠中不仅可由胰岛ε细胞产生, 而且还可由胰岛α细胞产生; 胰岛ε细胞来源于表达*neurogenin3*的胰腺前体细胞, 缺乏*neurogenin3*小鼠没有胰岛ε细胞的发生. 晚近, Wierup *et al*[10]利用透射电镜和免疫金标记技术在超微结构水平上发现, 胎儿胰岛细胞中的ghrelin分泌颗粒在大小、形状及电子致密度等方面均不同于任何一种经典胰岛内分泌激素的分泌颗粒; ghrelin分泌颗粒的特征为电子密度不一、平均直径110 nm的球形颗粒, 而胰升糖素分泌颗粒则呈电子密度高、平均直径较大(约为185 nm)的颗粒. 上述结果进一步支持胰岛ε细胞是一种独立的胰岛细胞类型.

2 胰岛ε细胞对其他胰岛内分泌细胞的调节作用

我们和其他作者的研究证实, ghrelin受体(GHS-R)可在大鼠和小鼠胰岛β细胞或其细胞株上表达, 还可在大鼠胰岛α细胞上表达[6,11], 提示胰岛ε细胞分泌的ghrelin可能通过旁分泌或内分泌的方式对其他类型胰岛细胞发挥调节作用.

2.1 对胰岛素分泌的影响 2002年, 日本学者Date *et al*[5]在报道了ghrelin存在于成年大鼠胰岛α细胞的同时, 还报道了ghrelin可促进大鼠离体胰岛葡萄糖刺激的胰岛素释放和β细胞钙离子内流. 国内也有人报道了ghrelin可促进离体大鼠胰岛的胰岛素合成和高浓度葡萄糖刺激的胰岛素分泌[12]. 然而, 近年来的许多研究却提示ghrelin可抑制大鼠离体胰岛或β细胞株葡萄糖刺激的胰岛素释放[6,13-14], 并且在小鼠离体胰岛的实验中也得到了相同的结果[15-16]. 上述结果提示, 生理状态下胰岛ε细胞分泌的ghrelin对胰岛β细胞功能具有抑制性调节效应, ghrelin的这种效应与其促进GH分泌和增强食欲等效应在能量稳态整合调节中具有重要的意义.

2.2 对胰升糖素和生长抑素分泌的影响 Qader *et al*[14]的研究显示, ghrelin可刺激大鼠离体胰岛的胰升糖素分泌. Ghrelin在小鼠离体胰岛的实验中也可见到相同的效应, 但在整体实验中却未发现注射ghrelin后小鼠血浆胰升糖素水平存在显著的变化[16]. 此外, 离体大鼠胰岛的研究显示, ghrelin可抑制精氨酸激发的生长抑素分泌[17].

3 胰岛ε细胞调节其他胰岛细胞功能的分子机制

有关胰岛ε细胞调节其他胰岛内分泌细胞功能的分子机制, 目前尚知之甚少. 2004年, Dezaki *et al*[18]采用GHS-R拮抗剂或ghrelin抗体阻断内源性ghrelin的作用后, 可增加离体大鼠胰岛葡萄糖刺激的胰岛素分泌和钙离子内流, 在没有钙离子存在的情况下, 阻断内源性ghrelin则对葡萄糖刺激的胰岛素分泌没有显著的效应; 外源性ghrelin可抑制离体大鼠胰岛葡萄糖刺激的胰岛素分泌, 并抑制大鼠单个β细胞葡萄糖刺激的钙离子内流, 钾通道阻断可使其抑制钙离子内流的效应出现逆转. 这一信号转导机制与ghrelin在神经内分泌细胞中发挥作用的信号转导机制相同[2,19]. 此外, 对大鼠胰腺外分泌肿瘤细胞株AR42J的研究也发现, ghrelin及其受体在AR42J中同时表达, 并且ghrelin对该细胞株钙离子内流的影响呈双时相性, 即初期为短暂性的升高, 其后则呈持续升高的平台期[20].

我们近期的研究显示, 10^{-8}-10^{-7} mol/L的ghrelin可抑制小鼠胰岛β细胞高浓度葡萄糖刺激的胰岛素释放; 使高浓度葡萄糖刺激下的β细胞中含两个跨膜区的内向整流钾通道(Kir6.2)基因表达下调, 但对磺酰脲受体1(SUR1)、葡萄糖转

运子2(GLUT2)及胰十二指肠同源盒-1(PDX-1)表达则没有影响; ghrelin还可抑制小鼠胰岛β细胞的钙离子内流, 而对其细胞增殖无明显的效应. 这些结果提示, ghrelin抑制胰岛β细胞高浓度葡萄糖刺激的胰岛素释放和钙离子内流可能至少部分是由于抑制ATP敏感性钾通道组成成分Kir6. 2表达所致. 此外, Qader *et al*[14]最近的研究提示, ghrelin可激活离体大鼠胰岛的原生型一氧化氮合酶(ncNOS), 但对诱生型一氧化氮合酶(iNOS)则没有影响; 同时, ghrelin可抑制葡萄糖刺激的胰岛素释放和促进胰升糖素释放, 一氧化氮(NO)清除剂和NOS抑制剂对该效应具有阻断作用. 上述结果提示, ncNOS激活可能参与介导ghrelin对胰岛α和β细胞的调节作用.

总之, 目前已经明确胰岛中存在一个新的细胞群体-胰岛ε细胞, 其分泌的ghrelin对其他类型胰岛细胞的功能具有调节作用. 而且, ghrelin可能在胚胎期的胰岛发育和分化中也发挥重要的作用. 然而, 胰岛ε细胞的确切的生理学和病理生理学意义尚待进一步研究.

4 参考文献

1 Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund RP, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974-977

2 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660

3 Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 27-68

4 Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002; 107: 63-69

5 Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S. Ghrelin is present in pancreatic α-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: 124-129

6 Wierup N, Yang S, McEvilly RJ, Mulder H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 301-310

7 Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2924-2929

8 Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, Sosa-Pineda B. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic β-cell differentiation. *Dev Biol* 2004; 266: 178-189

9 Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P. Genetic determinants of pancreatic ε-cell development. *Dev Biol* 2005; 286: 217-224

10 Wierup N, Sundler F. Ultrastructure of islet ghrelin cells in the human fetus. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 423-428

11 Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, Sakurai J, Lee EY, Inoue S, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shioda S. Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept* 2005; 126: 67-71

12 毛微波, 郭晓蕙, 高妍, 童玉, 唐朝枢. Ghrelin促进大鼠胰岛素合成及高葡萄糖诱导的胰岛素分泌. 基础医学与临床 2004; 24:432-435

13 Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K. Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas* 2003; 27: 161-166

14 Qader SS, Lundquist I, Ekelund M, Hakanson R, Salehi A. Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regul Pept* 2005; 128: 51-56

15 Reimer MK, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2003; 144: 916-921

16 Salehi A, Dornonville de la Cour C, Hakanson R, Lundquist I. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* 2004; 118: 143-150

17 Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 241-244

18 Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in β-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 2004; 53: 3142-3151

19 Kuramochi M, Kohno D, Onaka T, Kato S, Yada T. Galanin-like peptide and ghrelin increase cytosolic Ca^{2+} in neurons containing growth hormone-releasing hormone in the arcuate nucleus. *Regul Pept* 2005; 126: 85-89

20 Lai JK, Cheng CH, Ko WH, Leung PS. Ghrelin system in pancreatic AR42J cells: its ligand stimulation evokes calcium signalling through ghrelin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 887-900

■应用要点
本文有助于读者了解胰岛ε细胞的发育过程、形态学特点及生理学作用, 也有助于读者理解胰岛内分泌功能精细调节过程的复杂性.

■同行评价
本文对胰岛ε细胞基础研究领域的成果进行了简述, 能反映这一领域研究的水平和当前的进展, 具有较好的学术价值. 全文层次分明, 文字流畅, 表达准确, 可读性强.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1448-1452
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

Caveolin-1对胃癌细胞系MGC803细胞生长的影响

罗红梅, 唐圣松, 廖端芳, 严鹏科, 谭力铭, 汪煜华, 龙治峰, 刘月顺, 朱炳阳

■背景资料
Caveolae是细胞表面胞膜内陷形成的膜结构. Caveolin为一蛋白家族, 是Caveolae的重要组成蛋白, 相对分子量为21-24 kDa, 其家族成员有Caveolin-1, 2, 3三种, 其中Caveolin-1是形成Caveolae所必不可少的结构蛋白. 研究表明, Caveolin-1与胆固醇的转运、胞饮作用及信号转导密切相关, 另外, Caveolin-1与肿瘤的发生、发展密切相关.

罗红梅, 龙治峰, 刘月顺, 南华大学医学院组胚教研室 湖南省衡阳市 421001
唐圣松, 廖端芳, 严鹏科, 谭力铭, 汪煜华, 朱炳阳, 南华大学药物药理研究所 湖南省衡阳市 421001
罗红梅, 2004年南华大学病理学与病理生理学硕士, 讲师, 2005年南华大学博士研究生, 主要从事分子肿瘤学的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30270684
通讯作者: 唐圣松, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学医学院药物药理研究所. tangss111@yahoo.com.cn
电话: 0734-8282854 传真: 0734-8281305
收稿日期: 2006-03-07 接受日期: 2006-03-29

Effect of Caveolin-1 on growth of human gastric cancer cell Line MGC803

Hong-Mei Luo, Sheng-Song Tang, Duan-Fang Liao, Peng-Ke Yan, Li-Ming Tan, Yu-Hua Wang, Zhi-Feng Long, Yue-Shun Liu, Bing-Yang Zhu

Hong-Mei Luo, Zhi-Feng Long, Yue-Shun Liu, Department of Histology and Embryology, Medicial College of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Sheng-Song Tang, Duan-Fang Liao, Peng-Ke Yan, Li-Ming Tan, Yu-Hua Wang, Bing-Yang Zhu, Institute of Pharmacy and Pharmacology, Medicial College of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30270684
Correspondence to: Dr. Sheng-Song Tang, Institute of Pharmacy and Pharmacology, Medicial College of Nanhua University, Hengyang 421001 Hunan Province, China. tangss111@yahoo.com.cn
Received: 2006-03-07 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To investigate the effect of Caveolin-1 on the proliferation and differentiation of gastric carcinoma cell line MGC803, and explore the probability that Caveolin-1 can be used for gene therapy.

METHODS: Caveolin-1 gene and Pcl-neo control plasmid were transfected into human MGC803 cell line by lipofectin, respectively. The positive clones were selected by G418. We also stabled a positive control group which was treated with PD98059 for 48 hours. Then the expression of Caveolin-1 in each group was detected by Western blot. Cell morphology was observed under optical microscope. Cell population doubling time was determined by cell counting method and cell cycle was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: The expression of Caveolin-1 was significantly higher in the cells treated with Caveolin-1 or PD98059 than that in the empty controls ($P < 0.001$, $q = 23.067$ or 13.3376). Furthermore, Caveolin-1 expression was also markedly higher in the cells transfected with Caveolin-1 than that in the positive controls ($P < 0.001$, $q = 9.7294$). Under light microscope, marked changes occurred in cell morphous after gene transfection. Before transfection, the cells had a significant heteromorphism, with the features of large cell body, little cytoplasm, obvious karyokinesis. While in Caveolin-1-transfected MGC803 cells, the cell malignancy declined as the cellular heteromorphism diminished, with the ratio of nuclear-to-cytoplasm decreased, and the karyokinesis disappeared. Caveolin-1-transfected cells had an extended doubling time (65.46 h *vs* 46.67 h, $P < 0.05$, $q = 4.8695$). At same time, the population of Caveolin-1-transfected cells in G_0/G_1 phase was obviously increased ($P < 0.01$, $q = 9.1824$) while that in S phase was decreased ($P < 0.01$, $q = 7.827$). There were also notable differences in cell cycle distribution between Caveolin-1-transfected cells and the positive controls (G_0/G_1: $P < 0.01$, $q = 4.9323$; S: $P < 0.05$, $q = 3.3295$).

CONCLUSION: Caveolin-1 not only induces the differentiation of MGC803 cells, but also blocks them at in G_0/G_1 phase. Caveolin-1 can inhibit the proliferation of MGC803 cells *in vitro* by prolonging the cell doubling time.

Key Words: Caveolin-1; Gastric carcinomas; Cell proliferation; Cell differentiation; Gene therapy

Luo HM, Tang SS, Liao DF, Yan PK, Tan LM, Wang YH, Long ZF, Liu YS, Zhu BY. Effect of Caveolin-1 on growth of human gastric cancer cell Line MGC803. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1448-1452

摘要

目的: 研究Caveolin-1对胃癌细胞增殖、分化的影响, 以探讨Caveolin-1作为基因治疗的候

选基因的可能性.

方法: 运用基因重组技术, 将人全长Caveolin-1基因稳定转染胃癌细胞系MGC803, 建立能稳定表达Caveolin-1的胃癌细胞系, 同时建立空载体转染的MGC803细胞系作为空白对照, 另用PD98059处理48 h作为阳性对照. 以重组细胞系作为研究模型, 通过免疫细胞化学及Western blot确认Caveolin-1蛋白在被转染细胞中的稳定表达. 运用光学显微镜观察转染前后MGC803细胞形态的变化; 另运用细胞计数检测了Caveolin-1对MGC803细胞生长的影响, 流式细胞术分析了Caveolin-1对MGC803细胞周期分布的影响.

结果: Western blot 结果显示, 基因转染组及阳性对照组细胞中Vaveolin-1表达比未处理组细胞中明显增强($P<0.001$, q值分别为23.067与13.3376), 且基因转染组中Caveolin-1表达比阳性对照组更强($P<0.001$, $q = 9.7294$); 基因转染后的MGC803细胞形态发生明显变化, 由异形性明显、核大、胞质很少、核分裂明显变得形态较一致、胞质丰富、核/质比明显变小、核分裂相很少见; 基因转染后细胞的群体倍增时间明显延长, 由46.67 h延长至65.46 h, 差异有统计学意义($P<0.05$, $q = 4.8695$); 基因转染后细胞周期分布发生了明显变化, G_0/G_1期细胞数明显增多($P<0.01$, $q = 9.1824$), S期细胞数明显减少($P<0.01$, $q = 7.827$), G_2/M期细胞数无明显变化($P>0.05$), Caveolin-1基因转染组与阳性对照组间细胞周期分布的变化也有明显差异性(其中G_0/G_1期$P<0.01$, $q = 4.9323$; S期$P<0.05$, $q = 3.3295$).

结论: Caveolin-1既能诱导MGC803细胞分化又能将其阻滞于G_0/G_1期, 通过延长细胞群体倍增时间而抑制胃癌细胞的体外增殖.

关键词: Caveolin-1; 胃癌; 细胞增殖; 分化; 基因治疗

罗红梅, 唐圣松, 廖端芳, 严鹏科, 谭力铭, 汪煜华, 龙治峰, 刘月顺, 朱炳阳. Caveolin-1对胃癌细胞系MGC803细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1448-1452
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1448.asp

0 引言

Caveolae是细胞膜生物功能多样性的重要结构基础, Caveolin-1是Caveolae最为重要的标记蛋白. 近年的研究表明, Caveolin-1在肿瘤中发挥着两种截然不同的作用, 在多种恶性肿瘤组织(如: 乳腺癌[1-5]、卵巢癌[6-8]、肉瘤[9]、胃癌[10]等)中表达下调, 且抑制肿瘤发展及转移, 而在少数恶性肿瘤细胞(如: 前列腺癌[11-13]、膀胱癌[14])中却表达上调, 且能促进癌细胞的浸润. 我们通过pcl-neo载体介导Caveolin-1基因转染胃癌MGC803细胞以探讨Caveolin-1对胃癌细胞生长的影响及作为基因治疗的候选基因的可能性.

1 材料和方法

1.1 材料 重组pcl-neo-Caveolin-1人全长质粒由南华大学药物药理研究所惠赠, G418、RPMI 1640、Lipofectamine™ 2000转染试剂均为Gibco公司产品, 兔抗人Caveolin-1多克隆抗体、BCA Protein Assay Reagent、Western blot荧光检测试剂盒为Santa Cruz公司产品, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗、SABC免疫组化试剂盒、DAB显色剂为福州迈新生物有限公司, 其余试剂均为国产分析纯. 人胃腺癌细胞株MGC803由中山大学肿瘤所惠赠. 细胞培养在含100 mL/L新生牛血清的RPMI 1640培养液中, 置于二氧化碳培养箱内, 恒温37℃ 50 mL/L, 用2.5 g/L胰酶消化传代.

1.2 方法 将对数生长期的MGC803细胞消化接种于6孔板中, 每孔2×10^5个细胞, 待细胞长至80%融合时, 换成完全培养基进行转染. 按转染试剂产品说明书提供的方法, 将载有人Caveolin-1全长cDNA序列的真核表达质粒pcl-neo-cav-1和pcl-neo空载质粒经扩增及常规限制性酶切鉴定后, 用脂质体介导转染入MGC803细胞, 转染时另设未处理组(即MGC803细胞)作为空白对照及经PD98059处理48 h作为阳性对照组. 48 h后转染组培养基加入400 mg/L G418继续培养, 约15 d后可获取G418抗性克隆. 收集对数生长期的各组细胞, 用细胞裂解液(25 mmol/L MBS pH 6.5, 0.15 mmol/L NaCl, 10 g/L Triton X-100)裂解细胞, 以提取细胞蛋白质. 电转移法将蛋白转印至PVDF膜并与兔抗人Caveolin-1抗体共孵育以检测转染前后MGC803细胞中Caveolin-1蛋白的表达变化. 同时用β-actin抗体检测细胞内β-actin表达作为参照. 细胞培养, 常规消化, 制成单细胞悬液, 接种于含盖玻片的培养板中培养. 待细胞基本长成单层后取出盖玻片, PBS洗3遍后用950 mL/L酒精固定30 min, PBS洗3遍, 常规HE染色于镜下观察细胞形态学的变化. 将处于对数生长期的各组细胞接种于24孔培养板培养, 每天取3孔进行计数, 连续观察7 d. 根据计数结果计算肿瘤细胞群体倍增

■研发前沿
Caveolin-1与多种信号分子存在反向调节关系. Caveolin-1的主要作用是减缓细胞增殖进程, 作为抑癌基因发挥作用, 但在前列腺癌等肿瘤中可能作为促癌剂, 这可能与Caveolin-1的磷酸化(Tyr14及Ser80)及突变(P132L)导致骨架区功能丧失有关.

■相关报道
(1)许多细胞内的癌基因可引起Caveolin-1表达下调, 如: c-Myc, HPV E6, v-Abl, Bcr-Abl, H-Ras, v-Src及Neu/ErbB2; (2)失去Caveolin-1的表达协同基因突变可导致INK4a的功能丧失, 而作为编码$p16^{INK4a}$与$p19^{ARE}$的细胞周期调节因子的INK4a基因一旦缺失就足以导致细胞永生化; (3)Caveolin-1存在着自然突变(P132L), 该突变能引起ERK-1/2的超活化; (4)在卵巢癌、乳腺癌及间充质肉瘤中, Caveolin-1表达均为下调.

■创新盘点
本文着眼于Caveolin-1与胃癌，首次明确报道了Caveolin-1与肿瘤细胞分化的关系.

时间(T_D). 计算公式为: $T_D = t \times \lg 2/\lg(N_t/N_0)$, ($N_t$为$t$时间的细胞数, N_0为初种细胞数). 另收集对数生长期的各组细胞, 冷PBS洗涤3遍, 将细胞用700 mL/L冷乙醇5 mL 4℃固定24 h. 测试前用PBS洗细胞2遍, 加PI荧光染料(5 mg/L PI, 20 mg/L RNase A), 300目尼龙网滤过, 上流式细胞仪进行细胞周期分析.

统计学处理 各组数据用mean±SD表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行检验后, 多组间比较采用Student Newman Keuls检验, 全部数据用SPSS 11.0 for Windows统计软件处理.

2 结果

2.1 细胞中Caveolin-1蛋白表达 利用Western blot发现Caveolin-1基因转染组及阳性对照组细胞中Caveolin-1表达比未处理组细胞表达明显增强($P<0.001$, q值分别为23.067与13.3376); Caveolin-1基因转染组中Caveolin-1表达比阳性对照组更强($P<0.001$, $q = 9.7294$); 空载体对照组细胞与未处理组细胞Caveolin-1表达无明显差别($P>0.05$)(图1). 说明已成功筛选出稳定表达Caveolin-1基因的MGC803细胞株.

2.2 细胞形态学变化 镜下观察发现未处理组及空载体对照组的MGC803细胞形态的异形性明显, 胞体大, 胞质很少, 有的有多核, 核分裂相很明显(图2A-B); 阳性对照组细胞核变得较小, 核分裂相也较少(图2C); 而Caveolin-1基因转染组细胞形态较一致, 胞质丰富, 核/质比明显变小, 核分裂相很少见(图2D).

2.3 肿瘤细胞群体倍增时间 根据细胞计数结果计算出各组细胞的群体倍增时间(表1), 结果显示, Caveolin-1基因转染组群体倍增时间明显比未处理组及空载体对照组细胞群体倍增时间要长($P<0.05$, $q = 4.8695$); 而空载体对照组细胞的群体倍增时间与未处理组细胞的无明显差异.

2.4 流式细胞仪检测结果 Caveolin-1基因转染组及阳性对照组细胞与未处理组细胞相比, 其细胞周期分布发生了明显的变化: G_0/G_1期细胞数明显增多(前者$P<0.01$, $q = 9.1824$; 后者$P<0.05$, $q = 4.6105$), S期细胞数明显减少(前者$P<0.01$, $q = 7.827$; 后者$P<0.05$, $q = 4.9929$), G_2/M期细胞数无明显变化($P>0.05$). Caveolin-1基因转染组与阳性对照组间细胞周期分布的变化有明显差异性(其中G_0/G_1期$P<0.01$, $q = 4.9323$; S期$P<0.05$, $q = 3.3295$); 而空载体对照组与未处理组细胞相比较, 其细胞周期差异无统计学意义(表2).

■应用要点
若能进一步研究将Caveolin-1抑制胃癌细胞增殖机制阐明, 可望为胃癌的基因治疗提供理论依据及靶点.

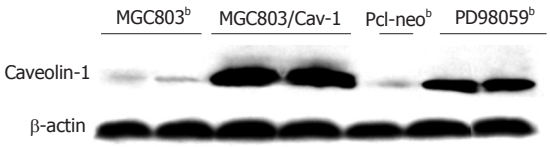


图 1 Caveolin-1在不同处理因素的MGC803细胞中的表达. [b]$P<0.01$ *vs* MGC803/Cav-1 ($n = 4$).

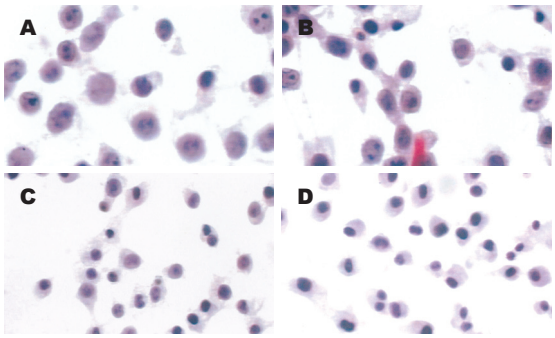


图 2 MGC803细胞的普通光镜观察 (HE, ×400). A: MGC803; B: MGC803/Pcl-neo; C: MGC803+PD98059; D: MGC803/Cav-1.

表 1 各处理组MGC803细胞的群体倍增时间

分组	初种细胞数 ($\times 10^4$)	细胞计数 ($\times 10^4$)	倍增时间 (h)
未处理组	2.50	30.10	46.67[a]
空载体对照组	2.50	28.78	47.32[a]
Caveolin-1基因转染组	2.50	14.79	65.46

[a]$P<0.05$ *vs* Caveolin-1基因转染组.

3 讨论

研究发现, 在很多种肿瘤如乳腺癌[1-5]、卵巢癌[6-8]、肉瘤[9]等组织中存在着不同程度的Caveolin-1低表达, 本实验前期研究结果证实在胃癌组织中Caveolin-1的表达也下调[10]. 一般认为, Caveolin-1是一个候选抑癌基因[2,6,9,15], 但目前对其在肿瘤组织中的表达情况及功能尚存有异议[11-14,16], 在前列腺癌及膀胱上皮癌中, Caveolin-1表达明显升高, 且有促进癌细胞的增殖及淋巴结的转移的作用. 目前认为, 肿瘤的形成是机体局部细胞的增殖、分化、凋亡三者之间的平衡失调或失偶联所致, 细胞过度增殖, 分化及凋亡的阻遏是肿瘤形成的核心环节[17]. 本研究将Caveolin-1基因稳定地转染人胃癌细胞系MGC803中, 观察了Caveolin-1对MGC803细胞生物学性状的影响. 结果显示, 转染Caveolin-1基因后的MGC803细胞中Caveolin-1蛋白表达水平比未处理组及空载体对照组MGC803细

表 2 各处理因素对MGC803细胞增殖周期的影响 (mean ± SD)

分组	G_0/G_1 (%)	G_2/M (%)	S (%)
未处理组	35.02 ± 2.41[a,c]	8.01 ± 0.93	56.97 ± 2.86[a,c]
阳性对照组	43.95 ± 1.39[a]	9.64 ± 1.12	46.41 ± 2.00[a]
空载体对照组	39.56 ± 0.61[a,c]	7.90 ± 1.16	52.54 ± 2.13[a,c]
Caveolin-1基因转染组	51.98 ± 2.67	8.22 ± 1.01	39.80 ± 2.05

[a]$P<0.05$ *vs* Caveolin-1基因转染组; [c]$P<0.05$ *vs* 阳性对照组.

胞明显要高, 甚至比阳性对照组表达水平也更高, 表明Caveolin-1基因已整合到MGC803细胞系中, 成功地构建了Caveolin-1稳定表达细胞系. MGC803在转染Caveolin-1基因后, 其形态相似, 异形性不明显, 胞质丰富, 核变小, 核/质比降低, 核分裂相少见. 提示, Caveolin-1具有诱导MGC803细胞向正常方向分化的作用.

细胞增殖是外界增殖信号作用于细胞膜或胞质受体, 经细胞内信号传递进而影响细胞周期的结果. 细胞周期不仅依靠细胞内的级联反应进行调控, 还受细胞外信号的影响, 细胞外信号通过细胞信号转导通路对细胞周期进行调控, 以实现其对细胞增殖的调控. 细胞周期存在两个主要检测点: G_1/S检测点与G_2/M检测点, 其中G_2/M是保证染色体分开和细胞分裂前染色体均分的精确性; G_1/S检测点是影响细胞周期的最关键点[17]. 已有研究表明, Caveolin-1主要作用于G_1/S检测点, 通过引起G_0/G_1阻滞而影响细胞周期推进[18]. 我们通过细胞计数发现Caveolin-1能抑制肿瘤细胞增殖, 延长肿瘤细胞的群体倍增时间. 采用流式细胞术进一步分析了Caveolin-1对细胞周期分布的影响, 结果显示: 转染Caveolin-1基因后MGC803细胞的细胞周期分布发生了明显的变化: G_0/G_1期细胞数量明显增多, S期细胞数量明显减少, G_2/M期无明显改变, 且其变化与ERK特异性抑制剂PD98059对细胞周期的影响有明显差别. 提示Caveolin-1主要作用于G_1/S检测点, 阻止细胞周期由G_0/G_1期向S期推进, 且其对MGC803细胞增殖的抑制作用比ERK抑制剂的作用更强.

ERK1/2(p42/p44MAPK)信号通路是最为普遍的促进细胞增殖和分化的信号途径, 能被多种生长因子、细胞因子及促分裂剂激活, 同时其持续活化最终促进细胞的增殖和恶性转化[19-23]. 相应地, ERK的下调可促进细胞生长和转录的抑制[24-26]. 研究表明, MAPK通路在人胃癌细胞中处于活化状态[27]. PD98059是MAPK通路ERK的特异性抑制剂, 能抑制ERK的激活. 本结果显示, 用PD98059处理MGC803细胞48 h后, ERK的抑制率达到94.07%±3.01%. 同时显示: Caveolin-1对MGC803细胞增殖的抑制作用比ERK特异性的抑制剂PD98059的作用更强. 蛋白表达结果也显示: 用PD98059处理MGC803细胞后, Caveolin-1蛋白表达明显升高, 提示当ERK1/2活性降低时, Caveolin-1表达上调. 可见, Caveolin-1能抑制Ras/MAPK通路, 使细胞的接触抑制性作用加强, 从而导致细胞的生长阻滞, ERK1/2与Caveolin-1之间存在负反馈调节现象, 但两者间相互调节的机制还有待于进一步的研究.

■名词解释

1 Caveolin-1: 译名较多, 有窖蛋白、陷窝蛋白、囊泡素等, 与细胞的多种生命活动密切相关, 包括细胞内吞、胆固醇的转运、信号转导和肿瘤发生等密切相关, 一般认为他是一抑癌基因.

2 PD98059: 是MAPK通路中ERK的特异性抑制剂, 抑制ERK的活化, 阻遏细胞周期的进程.

4 参考文献

1 Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 2365-2375

2 Hino M, Doihara H, Kobayashi K, Aoe M, Shimizu N. Caveolin-1 as tumor suppressor gene in breast cancer. *Surg Today* 2003; 33: 486-490

3 Bouras T, Lisanti MP, Pestell RG. Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 931-941

4 Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis. *Oncogene* 2004; 23: 7893-7897

5 Sotgia F, Williams TM, Schubert W, Medina F, Minetti C, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 deficiency (-/-) conveys premalignant alterations in mammary epithelia, with abnormal lumen formation, growth factor independence, and cell invasiveness. *Am J Pathol* 2006; 168: 292-309

6 Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R, Sers C. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001; 159: 1635-1643

7 Bagnoli M, Tomassetti A, Figini M, Flati S, Dolo V, Canevari S, Miotti S. Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to alpha-folate receptor overexpression. *Oncogene* 2000; 19: 4754-4763

8 Davidson B, Nesland JM, Goldberg I, Kopolovic J, Gotlieb WH, Bryne M, Ben-Baruch G, Berner A, Reich R. Caveolin-1 expression in advanced-stage ovarian carcinoma-a clinicopathologic study. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 166-171

■同行评价
Caveolin是近年来热门研究的与肿瘤相关的细胞因子. 本文研究选题新颖、实验设计较合理、统计方法正确、结果可信、讨论较充分, 文章说明了Caveolin通过诱导细胞分化、阻滞分裂抑制肿瘤细胞的增殖, 为一种候选抑癌基因. 但要说明Caveolin通过抑制信号通路达到抑制细胞增殖尚需进一步研究探讨.

9 Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, Schneider U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol* 2001; 158: 833-839
10 罗红梅, 张蒙夏, 唐圣松, 谭军, 刘月顺, 龙治峰. Caveolin-1表达及其与胃癌生物学行为关系的研究. 肿瘤防治杂志 2004; 11: 341-343
11 Yang G, Timme TL, Frolov A, Wheeler TM, Thompson TC. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer* 2005; 103: 1186-1194
12 Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, Pestell RG, Di Vizio D, Loda M, Lisanti MP. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem* 2005; 280: 25134-25145
13 Satoh T, Yang G, Egawa S, Addai J, Frolov A, Kuwao S, Timme TL, Baba S, Thompson TC. Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 2003; 97: 1225-1233
14 Fong A, Garcia E, Gwynn L, Lisanti MP, Fazzari MJ, Li M. Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 93-100
15 Capozza F, Williams TM, Schubert W, McClain S, Bouzahzah B, Sotgia F, Lisanti MP. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 2003; 162: 2029-2039
16 Said J. Biomarker discovery in urogenital cancer. *Biomarkers* 2005; 10 Suppl 1: S83-86
17 卢建, 余应年, 徐仁宝. 受体、信号转导系统与疾病. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 1999: 597-618
18 Galbiati F, Volonte D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 2229-2244
19 Maestroni A, Tentori F, Meregalli G, Gabellini D, Asnaghi V, Ruggieri D, Zerbini G. Inhibition of MAP-kinase cascade normalizes the proliferation rate of fibroblasts from patients with Type 1 diabetes and nephropathy. *J Diabetes Complications* 2005; 19: 291-296
20 Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, Donahue HJ. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C776-C784
21 Siriwardana G, Bradford A, Coy D, Zeitler P. Autocrine/paracrine regulation of breast cancer cell proliferation by growth hormone releasing hormone (GHRH) via Ras, Raf, and MAP Kinase. *Mol Endocrinol* 2006
22 Wilkinson MG, Millar JB. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 2000; 14: 2147-2157
23 Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 2005; 118: 3569-3572
24 Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E. Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 136: 557-561
25 Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 320-344
26 Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 2005; 118: 2997-3002
27 Kuno Y, Kondo K, Iwata H, Senga T, Akiyama S, Ito K, Takagi H, Hamaguchi M. Tumor-specific activation of mitogen-activated protein kinase in human colorectal and gastric carcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 903-909

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1453-1457
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

胃癌相关基因GCRG213正反义真核表达载体的构建及鉴定

高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华

高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华, 解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
高利利, 2005年首都医科大学博士毕业, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤和动力的临床及基础研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30370635
通讯作者: 吴本俨, 100853, 北京市复兴路28号, 解放军总医院南楼消化科.
电话: 010-66939443
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-20

Construction and identification of eukaryotic expression vector of gastric cancer associated gene GCRG213

Li-Li Gao, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Hai-Li Huang, Yin-Qiao Wu, Wei-Di You, Wei-Hua Wang

Li-Li Gao, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Hai-Li Huang, Yin-Qiao Wu, Wei-Di You, Wei-Hua Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by National Science Foundation of China, No. 30370635
Correspondence to: Dr. Wu-Ben Yan, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-20

Abstract

AIM: To construct and identify the gastric cancer associated gene GCRG213 eukaryotic expression vector.

METHODS: The sense and anti-sense fragment of GCRG213 were obtained by polymerase chain reaction (PCR), which were GCRG213-a and GCRG213-b respectively. They were cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) after introduced the sites of restrictive endonuclease enzyme *Kpn*I, *Bam*HI and *Eco*RI, *Bam*HI. The recombinant plasmid pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b and the vector pcDNA3.1 were transfected separately into MKN45 cells conducted by lipofectamine™ 2000. G418 selection was used to obtain the stably transfected cells. The expression of GCRG213 was detected at both mRNA and protein level with semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: After sequencing, sense GCRG213 and anti-sense GCRG213 were confirmed to be successfully cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1, which were named pcDNA3.1-a and pcDNA3.1-b correspondingly. The recombinant plasmid pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b, and the vector pcDNA3.1 were transfected successfully into MKN45 cells by lipofectamine™ 2000. After G418 selection, the stably transfected cells were obtained. Transfection with pcDNA3.1-a significantly increased the expression of GCRG213 in MKN45 cells both at mRNA (35.4%) and protein (49.4%) level, while transfection of pcDNA3.1-b significantly decreased the expression of GCRG213 both at mRNA (32.1%) and protein (50.3%) level.

CONCLUSION: The eukaryotic expression vector of gastric cancer associated gene GCRG213 is successfully constructed and identified.

Key Words: Gastric cancer associated gene GCRG213; Eukaryotic expression; Gastric cancer cells; Gene transfection

Gao LL, Wu BY, Wang MW, Huang HL, Wu YQ, You WD, Wang WH. Construction and identification of eukaryotic expression vector of gastric cancer associated gene GCRG213. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1453-1457

摘要

目的: 构建胃癌相关基因GCRG213正、反义真核表达载体.

方法: 从pGEM-T质粒上扩增出的胃癌相关基因GCRG213的DNA片段, 两端分别引入限制性内切酶*Kpn*I, *Bam*HI和*Eco*RI, *Bam*HI识别位点, 按正向、反向克隆入真核表达载体pcDNA3.1(+). 测序正确的重组子pcDNA3.1-a(含GCRG213正向克隆), pcDNA3.1-b(含GCRG213反向克隆)和空载

■背景资料
胃癌是严重威胁人类健康的重要疾患之一, 其发生和发展是多基因变异累积的过程. 近年来研究发现Ref-1基因是一种肿瘤相关基因. 由于GCRG213与APE/Ref-1有同源性, 并且具有该蛋白重要的功能位点, 因此可能是其一个新的变异体. 本文采用分子克隆及基因转染技术将GCRG213基因转入哺乳动物细胞, 成功构建胃癌相关基因GCRG213正、反义真核表达载体, 为下一步研究胃癌相关基因GCRG213的功能奠定了基础.

■同行评价
本研究构建了胃癌相关基因GCRG213的正、反义真核表达载体, 建立了稳定转染的MKN45细胞株, 并采用半定量RT-PCR及Western blot比较转染不同质粒的MKN45细胞中GCRG213在mRNA和蛋白质水平上的表达差异. 研究设计合理, 方法可行, 结果充实, 结论较为明确, 为下一步研究胃癌相关基因GCRG213的功能奠定了一定基础.

体经脂质体转染人胃癌细胞系MKN45细胞, G418筛选获得稳定转染的细胞株, 采用半定量RT-PCR及Western blot比较转染不同质粒的MKN45细胞中GCRG213在mRNA和蛋白质水平上的表达差异.

结果: 经测序证实, GCRG213正向克隆和反向克隆正确插入真核表达载体pcDNA3.1(+), 组成重组子pcDNA3.1-a(含正向克隆), pcDNA3.1-b(含反向克隆). 重组子pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b和空载体经脂质体转染人胃癌细胞系MKN45细胞, G418筛选获得稳定转染的细胞株. 与对应的空载体比较, RT-PCR结果显示转染pcDNA3.1-a的MKN45细胞中其mRNA的表达上调35.4%, 而转染pcDNA3.1-b的MKN45细胞中其mRNA的表达下调32.1%; Western blot结果显示转染pcDNA3.1-a的MKN45细胞中其蛋白的表达上调49.4%, 而转染pcDNA3.1-b的MKN45细胞中其蛋白的表达下调50.3%.

结论: 成功构建胃癌相关基因GCRG213正、反义真核表达载体.

关键词: 胃癌相关基因GCRG213; 真核表达; 胃癌细胞; 基因转染

高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213正反义真核表达载体的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1453-1457
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1453.asp

0 引言

胃癌是严重威胁人类健康的重要疾患之一, 其发生和发展是多基因变异累积的过程. 我们应用荧光标记的DDRT-PCR筛选出一条在肠型胃癌组织、癌旁和正常组织间差异表达的新基因GCRG213, 生物信息学分析表明他具有完整的开放阅读框架, 编码含有142个氨基酸的产物. 原位杂交和Northern blot显示该基因在胃癌和癌旁不典型增生组织高表达, 正常胃组织低表达. 制备多克隆抗体初步检测表明该基因在胃癌、癌旁、正常组织中有蛋白水平的表达差异. 经过同源比对, 该基因与机体中碱基切除修复的关键酶APE/Ref-1序列有61%, 同源性并且含有其保守区的功能位点[1].

无嘌呤无嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonucleas, APE)是一种具有DNA修复与氧化还原双功能的蛋白, 人体APE由Ref-1基因编码, APE/Ref-1是碱基切除修复(base excision repair, BER)通路的关键酶, 能够修复机体受内外环境影响产生的AP位点[2]. APE的氧化还原功能可调节许多转录因子DNA结合活性, 与细胞的增殖、分化、损伤修复有关[3]. 近年来研究发现Ref-1基因是一种肿瘤相关基因. 由于GCRG213与APE/Ref-1有同源性, 并且具有该蛋白重要的功能位点, 因此可能是其一个新的变异体. 该变异体在胃癌和癌前不典型增生组织中mRNA和蛋白水平表达高于正常胃黏膜, 说明他参与了胃癌的发生、发展过程, 可能是影响胃癌细胞生物学特性的重要功能基因.

我们采用分子克隆及基因转染技术将GCRG213基因转入哺乳动物细胞, 以期望能对GCRG213基因的功能有一初步了解.

1 材料和方法

1.1 材料 pGEM-T质粒含GCRG213 cDNA 1094 bp, 其中开放阅读框架426 bp, 为本实验室构建保存. MKN45细胞为本实验室保存, 在37℃, 50 mL/L CO_2的孵箱中常规培养. 限制性内切酶(*Kpn* Ⅰ, *Bam*HⅠ, *Eco*RⅠ)和T4连接酶购自日本宝生物(TaKaRa)工程有限公司. 真核表达载体pcDNA3.1(+)为本实验室保存. 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、高纯度质粒小量提取试剂盒、总RNA提取试剂盒和DH5α感受态细胞购自北京天为时代科技有限公司. 脂质体(Lipofectamine™ 2000)购自美国Gibco公司. G418购自美国Sigma公司. DMEM培养基、RT-PCR试剂盒为美国Gibco公司产品. 胎牛血清购自北京鼎国生物工程公司. 羊抗人β-actinmAb、HRP标记的羊抗兔二抗、HRP标记的兔抗羊二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司. 兔抗人GCRG213多克隆抗体为本实验室保存. 低分子质量蛋白质标准购自北京天为时代科技有限公司. 预染蛋白分子量标准购自New England 公司. ECL Western blot检测试剂盒购自美国Santa Cruz公司. 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂.

1.2 方法 采用Primer 5.0软件设计引物, 选取了GCRG213序列中包含有开放阅读框架(ORF)的序列作为扩增序列, 根据真核表达载体pcDNA3.1(+)的要求, 引物序列如下: 正向克隆(a)引物P1: 5'-GGGGTACCATGCAACAAGAAGAGCTA-3', P2: 5'-CGGGATCCTCAGTTTTGAGTGAGCTTC-3'; 反向克隆(b)引物P1: 5'-AAGAATTCATGCAACAAGAAGAGCTA-3', P2: 5'-CGGGATCCTCAGTTTTGAGTGAGCTTC-3'(产

物预计长度445 bp), 由上海博亚生物工程公司合成. PCR扩增靶DNA片段, 反应条件为: 94℃ 2 min. 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 30 s, 32个循环. 72℃延伸7 min. 采用清华大学天为时代科技公司PCR产物纯化试剂盒对PCR产物进行纯化回收. 取纯化DNA 5 μL, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析. 纯化后DNA需要经紫外分光光度计检测样品的A_{260}和A_{280}, 以确定样品DNA的含量. PCR纯化产物经*Kpn*Ⅰ, *Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ, *Bam*HⅠ分别双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收纯化. 真核表达载体pcDNA3.1(+)同样经*Kpn*Ⅰ, *Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ, *Bam*HⅠ分别双酶切后回收纯化. GCRG213的酶切纯化产物与真核表达载体pcDNA3.1(+)的酶切纯化产物按3∶1的比例混合, 加入T4连接酶进行连接反应(16℃过夜), 重组子(pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b)转化DH5α感受态细胞, 涂布具有氨苄青霉素(100 mg/L)的LB琼脂平板, 于37℃培养过夜. 挑取单个菌落以PCR、内切酶切割、测序依次鉴定之. 使用Lipofectamine™2000脂质体转染试剂并按其说明书方法进行. 将MKN45细胞接种于6孔板, 待细胞数量达到90%-95%汇合后进行瞬时转染, 每孔分别加入10 μL Lipofectamine™2000转染试剂和对应质粒, 在50 mL/L CO_2培养箱中37℃保温24 h, 将细胞按1∶10的稀释比例传代至含100 mL/L FBS的DMEM培养基中, 再培养1 d后换用含G418(500 mg/L)的完全培养基常规培养, 每3-4 d更换培养液, 每日观察细胞生长情况, 抗性细胞集落形成后, 用含半量筛选浓度G418(250 mg/L)的完全培养基扩大培养. 在此后的实验过程中, 间断地取出部分细胞在含500 mg/L的G418的条件培养基中筛选, 未能稳定转染的细胞在6-8 d全部死亡, 转基因MKN45细胞却能持续存活并生长传代.

1.2.1 半定量RT-PCR检测转染细胞中GCRG213 mRNA的表达 采用总RNA提取试剂盒, 按操作说明提取转染细胞的总RNA. 紫外检测仪分别在260 nm和280 nm波长下检测RNA的吸光度值, 测定RNA的纯度, 并用甲醛变性电泳实验检测RNA的完整性. 取RNA 4 μg进行逆转录, 然后各自取cDNA 1 μL用于PCR反应. GCRG213基因引物序列如下: P1: 5'-AACTGCAGATGCAACAAGAA-3', P2: 5'-CGGGATCCAAGTTTTGAGTGAG-3'; 以β-肌动蛋白(β-actin)为内参照, 引物序列如下: P1: 5'-GCTCCGGCATGTGCAAGG-3', P2: 5'-ATGTCACGCACGCTTTCC-3'.

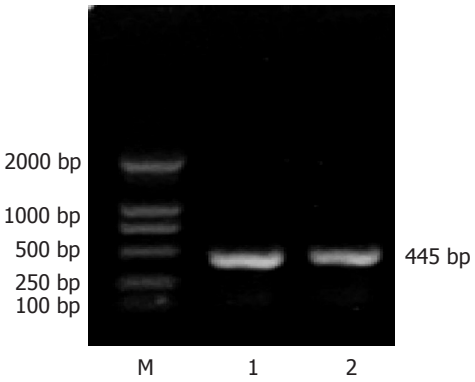


图 1 GCRG213基因PCR扩增纯化回收. M: DNA Marker DL2000; 1: GCRG213-a; 2: GCRG213-b.

PCR引物由上海博亚生物工程公司合成. 反应条件: 94℃ 2 min. 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30个循环. 72℃延伸7 min. 取反应液5 μL, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析. 产物电泳后经凝胶分析软件(Bandscan)分析其灰度值, 结果以产物与内参照的比值表示.

1.2.2 Western blot检测转染细胞GCRG213蛋白的表达 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 按照《分子克隆实验指南》灌制120 g/L的不连续SDS-PAGE, 分别取3组转染细胞裂解液样品(每个均取细胞蛋白100 μg)加样后电泳, 湿式电转移, 封闭, 第1抗体结合, 第2抗体结合, ECL法显影. 以β-actin为内参照. 经凝胶分析软件(Bandscan)分析其灰度值, 结果以产物与内参照的比值表示.

统计学处理 成组*t*检验(SPSS 11.0软件包).

2 结果

GCRG213正向、反向克隆的PCR产物(a, b)经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见在445 bp处各有一条特异的扩增产物, 与预计长度相符(图1). 真核表达载体pcDNA3.1(+)载体分别应用限制性内切酶*Kpn*Ⅰ, *Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ, *Bam*HⅠ双酶切, 产物经10 g/L低熔点琼脂糖凝胶纯化、回收, 在5400 bp处有一特异条带, 与理论值相符(图2). pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b重组质粒经相应的引物PCR扩增后, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见在445 bp处各有一条特异的扩增产物, 与预计长度相符. pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b重组质粒分别经限制性内切酶*Kpn*Ⅰ, *Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ, *Bam*HⅠ双酶切, 产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 分别在5400 bp处和445 bp处有一特异条带, 与理论值相符(图3-4).

2.1 转染细胞GCRG213在mRNA水平上的表

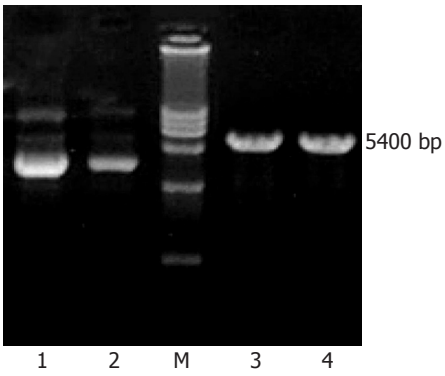


图 2 pcDNA3.1载体双酶切、纯化回收. M: DL15000 Marker; 1, 2: pcDNA3.1载体; 3, 4: pcDNA3.1载体双酶切产物.

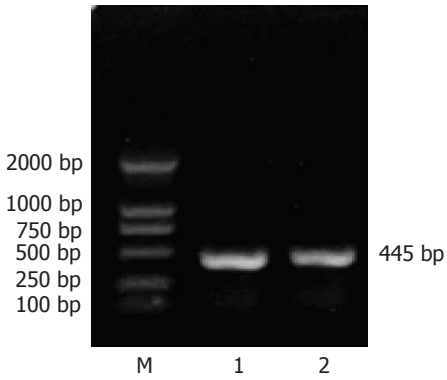


图 3 pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b重组质粒PCR鉴定. M: DL2000 Marker; 1: pcDNA3.1-a PCR鉴定产物; 2: pcDNA3.1-b PCR鉴定产物.

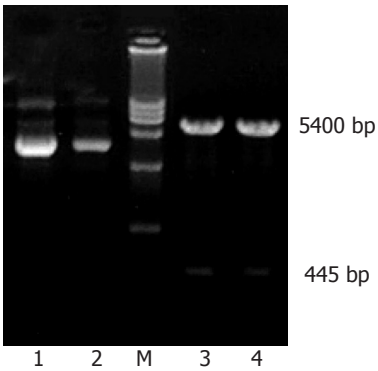
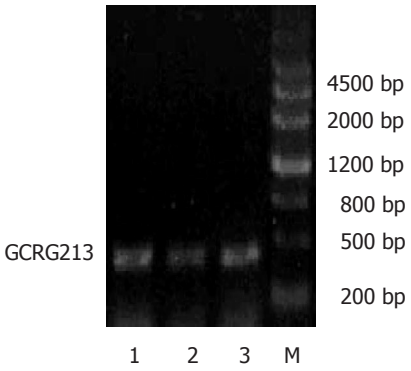


图 4 pcDNA3.1-a, pcDNA3.1-b重组质粒酶切鉴定. M: DL15000 Marker; 1: pcDNA3.1-a重组质粒; 2: pcDNA3.1-b重组质粒; 3: pcDNA3.1-a重组质粒酶切产物; 4: pcDNA3.1-b重组质粒酶切产物.

达 RT-PCR法检测结果表明, 与转染空载体的MKN45细胞相比, 转染GCRG213正向克隆的MKN45细胞中其mRNA的表达上调35.4%, 而转染反向克隆的MKN45细胞中其mRNA的表达下调32.1%. MKN45-213a, MKN45-213b, MKN45-pcDNA3.1 mRNA表达量分别为0.328±0.05, 0.144±0.013, 0.212±0.016(图5).



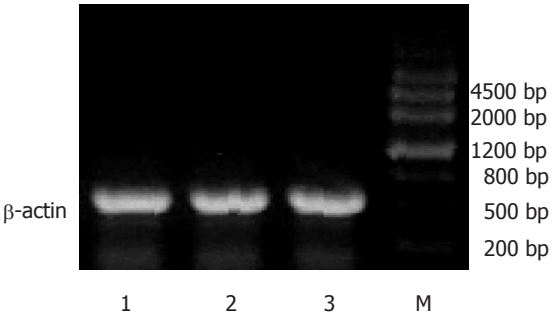


图 5 3种稳定转染细胞GCRG213在mRNA水平上的表达差异. 1: pcDNA3.1-a转染组; 2: pcDNA3.1-b转染组; 3: pcDNA3.1转染组; M: DNA Marker Ⅲ.

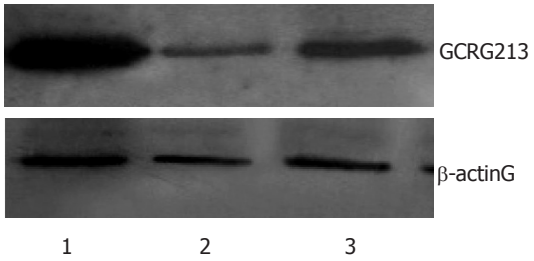


图 6 3种稳定转染细胞GCRG213蛋白及内参照β-actin的表达差异. 1: pcDNA3.1-a转染组; 2: pcDNA3.1-b转染组; 3: pcDNA3.1转染组.

2.2 转染细胞中GCRG213蛋白水平上的表达 Western blot检测结果表明, 与转染空载体的MKN45细胞相比, 转染GCRG213正向克隆的MKN45细胞中其蛋白的表达上调49.4%, 而转染反向克隆的MKN45细胞中其蛋白的表达下调50.3%. MKN45-213a, MKN45-213b, MKN45-pcDNA3.1蛋白表达量分别为3.42±0.05, 0.861±0.013, 1.732±0.016(图6).

3 讨论

我们采用真核表达载体pcDNA3.1作为胃癌相关基因GCRG213转染的载体, GCRG213基因正

向克隆和反向克隆插入到pcDNA3.1的*Kpn* Ⅰ, *Bam*H Ⅰ和*Eco*R Ⅰ, *Bam*H酶切位点之间, 构建了GCRG213的正义和反义真核表达载体. 我们提取3种稳定转染的MKN45细胞总RNA, 采用RT-PCR方法观察不同转染细胞中GCRG213 mRNA水平的表达差异. 与转染空载体的MKN45细胞相比, 转染GCRG213正向克隆的MKN45细胞中其mRNA的表达上调35.4%, 而转染反向克隆的MKN45细胞中其mRNA的表达下调32.1%, 以上结果提示, 正向克隆的转染增加了相应基因的转录, 而反向克隆的转染则抑制了相应基因的转录.

Western blot首先提取转染细胞的蛋白质, 通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将提取的蛋白质浓缩并由于凝胶的分子筛作用和带负电的SDS-蛋白质复合物在凝胶电泳中向正极迁移, 分离不同大小分子质量的蛋白质, 再转移至固相支持体, 通过蛋白特异性的多克隆抗体, 检测转染细胞GCRG213蛋白的表达. 蛋白质的Western blot技术结合了凝胶电泳的高分辨率和固相免疫测定的特异性、敏感性, 可检测到低至1-5 ng中等大小的蛋白质[4]. 本实验中, Western blot结果为: 与转染空载体的MKN45细胞相比, 转染GCRG213正向克隆的MKN45细胞中其蛋白的表达上调49.4%, 而转染反向克隆的MKN45细胞中其蛋白的表达下调50.3%, 以上结果提示, 正向克隆的转染增加了GCRG213蛋白的表达, 而反向克隆转染则抑制了GCRG213蛋白的表达.

BLAST分析显示GCRG213与APE/Ref-1序列有61%同源性, 并且含有其C'末端保守区[1]. APE/Ref-1主要参与由于氧化性损伤造成的DNA损害的修复; 同时, APE/Ref-1也是一种氧化还原因子, 调节转录因子的DNA结合活性. DNA修复机制异常是癌症进展过程中常见的现象. 人体APE由Ref-1基因编码, 编码的蛋白命名为APE/Ref-1或者HAP1. Ref-1基因是一种肿瘤相关基因. Ref-1对一种苯衍生的DNA复合物1, N6-benzetheno-dA(p-BQ-dA)具有序列依赖性, 提示Ref-1在苯诱导的致癌过程中发挥作用[5]. Herring *et al*[6]研究了人宫颈癌促克隆形成细胞与APE/Ref-1蛋白表达的关系, 发现肿瘤活检组织的促克隆形成细胞与APE/Ref-1蛋白表达之间存在中等程度的显著正相关(r = 0.60, P = 0.002). APE/Ref-1能激活一些氧化的原癌基因, 在卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、横纹肌肉瘤、生殖细胞肿瘤等多种肿瘤中APE/Ref-1表达增强[7]. 我们成功构建胃癌相关基因GCRG213正、反义真核表达载体, 为下一步研究胃癌相关基因GCRG213的功能奠定了基础.

4 参考文献

1 Wang GS, Wang MW, Wu BY, Liu XB, You WD, Yang XY. A gene encoding an apurinic/apyrimidinic endonuclease-like protein is up-regulated in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1196-1201

2 Wilson DM 3rd, Barsky D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* 2001; 485: 283-307

3 Kakolyris S, Kaklamanis L, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Hickson ID, Barzilay G, Turley H, Leek RD, Kanavaros P, Georgoulias V, Gatter KC, Harris AL. Expression and subcellular localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) protein: a basis for its role in human disease. *Histopathology* 1998; 33: 561-569

4 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 第2版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 554-555

5 Hang B, Chenna A, Sagi J, Singer B. Differential cleavage of oligonucleotides containing the benzene-derived adduct, 1, N6-benzetheno-dA, by the major human AP endonuclease HAP1 and *Escherichia coli* exonuclease III and endonuclease IV. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1339-1343

6 Herring CJ, Deans B, Elder RH, Rafferty JA, MacKinnon J, Barzilay G, Hickson ID, Hendry JH, Margison GP. Expression levels of the DNA repair enzyme HAP1 do not correlate with the radiosensitivities of human or HAP1-transfected rat cell lines. *Br J Cancer* 1999; 80: 940-945

7 Fritz G. Human APE/Ref-1 protein. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 925-929

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1458-1461
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养和最高表达株的筛选

代文杰, 胡 震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈

■背景资料
IL-10是Th2细胞因子的重要代表, 大量研究证实在肝硬化进程中发挥负性调节作用, 是肝硬化治疗中具有潜力的细胞因子.

代文杰, 胡震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科, 黑龙江省肝脾外科重点实验室 黑龙江省哈尔滨市 150001
代文杰, 博士, 博士后, 主要从事肝胆胰外科、器官移植、外科分子细胞生物学研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30070739, 30300340
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D01-04
通讯作者: 代文杰, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科, 黑龙江省肝脾外科重点实验室. wenjdai@yahoo.com.cn
电话: 0451-53600281
收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-04-13

Clone culture of human interleukin-10 gene modified L02 hepatocytes and selection of cell strain with most interleukin-10 expression

Wen-Jie Dai, Zhen Hu, Lin-Feng Wu, Hong-Chi Jiang, Yao-Hua Wu, Shang-Ha Pan

Wen-Jie Dai, Zhen Hu, Lin-Feng Wu, Hong-Chi Jiang, Yao-Hua Wu, Shang-Ha Pan, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University; Key Laboratory of Hepatosplenic Surgery, Heilongjiang Province, Harbin 150001, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30070739 and 30300340, and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D01-04
Correspondence to: Wen-Jin Dai, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University; Key Laboratory of Hepatosplenic Surgery, Heilongjiang Province, Harbin 150001, China. wenjdai@yahoo.com.cn
Received: 2006-03-30 Accepted: 2006-04-13

Abstract

AIM: To clone and culture human interleukin-10 (IL-10) gene modified L02 hepatocytes and select the cell strain highly expressing IL-10.

METHODS: With preparation of previously constructed and purified eukaryotic expression plasmid vector pchIL-10, L02 hepatocytes were transfected and then the positive clones were selected with the help of G418 pressure. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of human IL-10 in the cells strain.

RESULTS: Sequencing and restriction endonuclease digestion confirmed that eukaryotic expression plasmid vector pchIL-10 was constructed successfully, and electrophoresis show a band of 540 bp. hIL-10 gene was highly expressed in L02 hepatocytes and the highest expression level was 69.875 ng/10^6 cell per hour.

CONCLUSION: Human interleukin-10 (IL-10) gene modified L02 hepatocytes can highly expresses hIl-10, which may be used in the antifibrotic or cirrhotic treatment.

Key Words: Interleukin 10; Gene transduction; Liver fibrosis; Liver cirrhosis

Dai WJ, Hu Z, Wu LF, Jiang HC, Wu YH, Pan SH. Clone culture of human interleukin-10 gene modified L02 hepatocytes and selection of cell strain with most interleukin-10 expression. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1458-1461

摘要

目的: 确认hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养可实现hIL-10在L02肝细胞中的高效表达.

方法: 通过构建真核质粒表达载体pchIL-10, 并纯化后转染L02肝细胞. 通过G418的压力选择获得hIL-10高表达的克隆株, 并以ELISA测定其表达水平.

结果: 经过测序和酶切验证, 真核质粒表达载体pchIL-10构建成功. 电泳显示一长约540 bp条带. hIL-10基因转导可在L02肝细胞中实现hIL-10的高效表达. 最高表达株表达量为每小时69.875 ng/10^6细胞.

结论: hIL-10基因修饰的L02肝细胞的克隆培养可实现hIL-10的高效表达, 为抗肝纤维化、肝硬化提供有效途径.

关键词: 白细胞介素10; 基因转导; 肝纤维化; 肝硬化

代文杰, 胡震, 武林枫, 姜洪池, 吴耀华, 潘尚哈. hIL-10基因修

饰的L02肝细胞的克隆培养和最高表达株的筛选. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1458-1461
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1458.asp

0 引言

人白细胞介素-10(hIL-10)是肝纤维化、肝硬化进程中的重要调控因子, 具有潜在的抗纤维化的作用. 本研究通过构建真核质粒表达载体, 并纯化后感染L02肝细胞, 观察hIL-10的表达. 从而为肝纤维化和肝硬化的基因治疗提供有效途径.

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体pcDNA3.1(+)由黑龙江省肝脾外科中心实验部保存, 其全长5428 bp, 含CMV(巨细胞病毒)启动子(232-819). 其*Bgl*Ⅱ(A/GATCT)酶切位点为12, *Sma*Ⅰ(CCC/GGG)位点为2077, *Eco*RⅠ(G/AATTC)位点为952, *Bam*HⅠ(G/GATCC)位点为929. L02肝细胞是永生化人肝细胞系, 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供.

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1hIL-10真核表达载体的构建(图1) pUC18hIL-10和pcDNA3.1质粒的*Xba*Ⅰ酶切: 两种质粒载体, 分别取3 μg和1 μg, 总体系20 μL, 含5×酶切反应缓冲液4 μL, *Xba*Ⅰ 2 U, 加ddH_2O至20 μL, 37℃反应2 h. pcDNA3.1/*Xba*Ⅰ继续以CIAP进行去磷酸化反应. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶后以Boehringer-Mannheim公司玻璃乳胶回收试剂盒回收目的片段. 14℃连接反应16 h后, 转化感受态大肠杆菌JM109. 挑取生长良好的菌落克隆行增菌培养, 对正向插入克隆进行测序分析[1]. 以Promega公司Wizard PureFection纯化转染质粒. 测序引物为T7启动子通用引物. 构建的pcDNA3.1 hIL-10以下简写为pchIL-10. 脂质体转染前24-36 h, 将L02肝细胞重新传代, 调整细胞数量, 使在转染时细胞贴壁生长状态良好, 达60%-70%汇合. 传代及转染时均使用无双抗的RPMI 1640培养液. 按LipofectAMINE Plus说明制备DNA-Plus-LipofectAMINE混合物并转染: 混合物500 μL加入培养瓶的2 μL RPMI 1640中, 轻轻混匀, 37℃, 50 mL/L CO_2条件下培养3 h. 3 h后追加3-4 mL含100 mL/L胎牛血清的完全RPMI 1640培养基, 转染24 h后更换培养液为正常完全培养基继续培养. L02肝细胞正常传代后, 以含不同G418浓度的完全RPMI 1640培养, 绘制生长曲线, 以8 h内使L02肝细胞完全死亡的最低浓度作为筛选G418抗性阳性转染克隆的应用浓度. G418毒性试验的药物浓度依次为600, 500, 400, 300, 200, 100 mg/L. 转染后72 h将RPMI 1640培养液更换为含高浓度G418的完全RPMI 1640培养液.

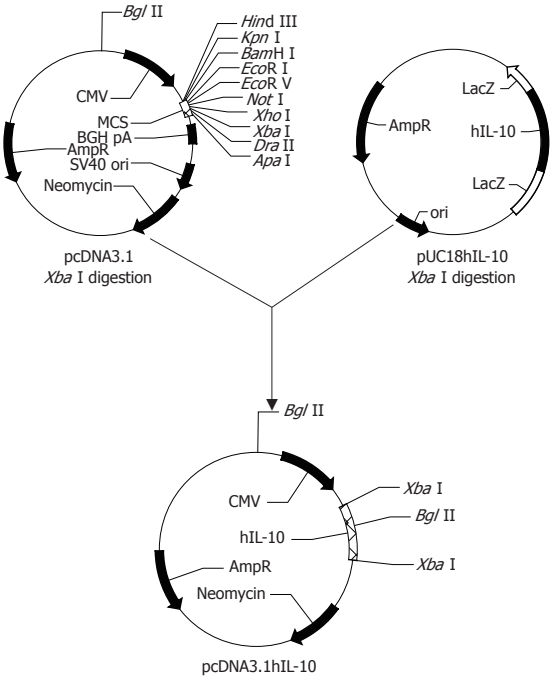


图 1 真核表达载体pcDNA3.1hIL-10的构建和鉴定.

表 1 引物及序列

引物	序列
CMVP	5'-GCTCGTTTAGTGAACCGT-3'
hIL-10×P1	5'-GCTCTAGAATGCACAGCTCAGCACTGCT-3'
hIL-10×P2	5'-GCTCTAGAGTCTCAGTTTCGTATCTTCAT-3'
hβ-actin1	5'-CATTGTGATGGACTCCGGAGACGG-3'
hβ-actin2	5'-CATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAGC-3'

1.2.2 hIL-10的转录 转染72 h与转染2 wk后, 收集细胞, 以GIBCO BRL TRIZOL法提取总RNA和DNA. PCR检测hIL-10在L02肝细胞中表达: hIL-10扩增引物为CMVP/hIL-10XP2, 循环条件: 94℃孵育5 min, 94℃变性40 s, 56℃退火50 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸5 min. RT-PCR检测hIL-10在L02肝细胞中的转录: hIL-10扩增引物为hIL-10XP1/hIL-10XP2. 以hβ-actin为内对照, 扩增片段长度为232 bp(表1). λDNA/*Eco*RⅠ+*Hin*d Ⅲ, λDNA/*Hin*d Ⅲ及hALR为标记(380 bp).

1.2.3 ELISA法检测hIL-10的表达 转染24 h后, 开始收集50 mL培养瓶中培养液行ELISA测定, 分别于1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 d取样测定.

■研发前沿
采用IL-10基因转导方式是肝硬化基因治疗的重要方案之一. 本研究旨在克隆获取hIL-10并验证其在肝细胞中的表达.

■相关报道
Louis *et al*证实IL-10在肝纤维化肝硬化过程中发挥负性调节作用, 具有潜在抗肝硬化功能.

■**创新盘点**
本文制备IL-10真核表达载体并将IL-10转导L02肝细胞后筛选高表达单克隆并计划扩增培养, 并应用于肝硬化的治疗, 以期为肝硬化基因治疗提供可选方案.

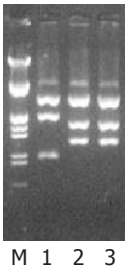


图 2 pchIL-10真核表达载体的构建和鉴定. M: λDNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ; 1: 正向插入; 2, 3: 反向插入.

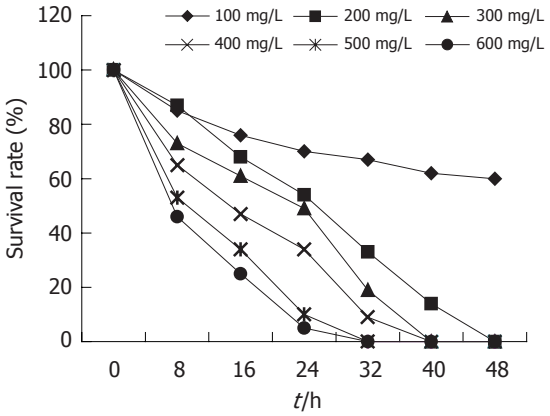


图 3 L02肝细胞的生长曲线.

最高表达株的筛选: 转染24 h后, 将细胞按有限稀释法单克隆至96孔培养板内, 待贴壁生长良好后, 以含400 mg/L G418的RPMI 1640作筛选. 待细胞生长为70%-90%汇合后, 收集新更换的24 h培养上清, 按hIL-10 ELISA检测说明书检测hIL-10含量, 同时计数相应孔别的细胞数.

2 结果

2.1 pchIL-10真核表达载体的构建 pchIL-10以*Xba*Ⅰ, *Bgl*Ⅱ酶切鉴定插入片段方向: *Bgl*Ⅱ酶切正向插入片段为1105 bp, 4860 bp, 反向插入片段为1390 bp和4575 bp(图2). 测序结果显示hIL-10 ORF完全与前述结果吻合[1]. 每隔8 h计数活细胞数, 绘制48 h存活率曲线(图3), 确定48 h内使培养L02肝细胞完全死亡的最低G418浓度为200 mg/L. L02肝细胞的克隆生长见图4.

2.2 RT-PCR检测 电泳后出现约540 bp (hIL-10), 约380 bp (hALR)和232 bp (hβ-actin)电泳条带(图5).

2.3 hIL-10 ELISA检测 hIL-10浓度-时间曲线(图6). hIL-10最高表达株的筛选至96孔板内L02肝细胞克隆生长旺盛, 达80%-90%汇合时测定上清中hIL-10, 最高表达株表达量为69.875 ng/(10^6·h).

3 讨论

人白细胞介素-10基因定位于1号染色体, 为单拷贝基因, 全长8868 bp, 其mRNA为1.8 kb, 开放阅读框架为534 bp, 包括编码N-末端信号肽(18个)的序列. 研究证实hIL-10 ORF与EB病毒ORF有70%同源性[2], 并与马疱疹病毒亦有同源性, 推测EB病毒和马疱疹毒因具有哺乳动物IL-10同源序列, 在宿主细胞内可合成IL-10类似物, 抑制巨噬细胞和T细胞而逃避宿主抗病毒免疫. hIL-10蛋白质分子量约M_r 18 700, 活性形式常为二硫键形成的二聚体, 其中含有两个N-糖基化位点, 但无糖链. 另有3个半胱氨酸残基和9个甲

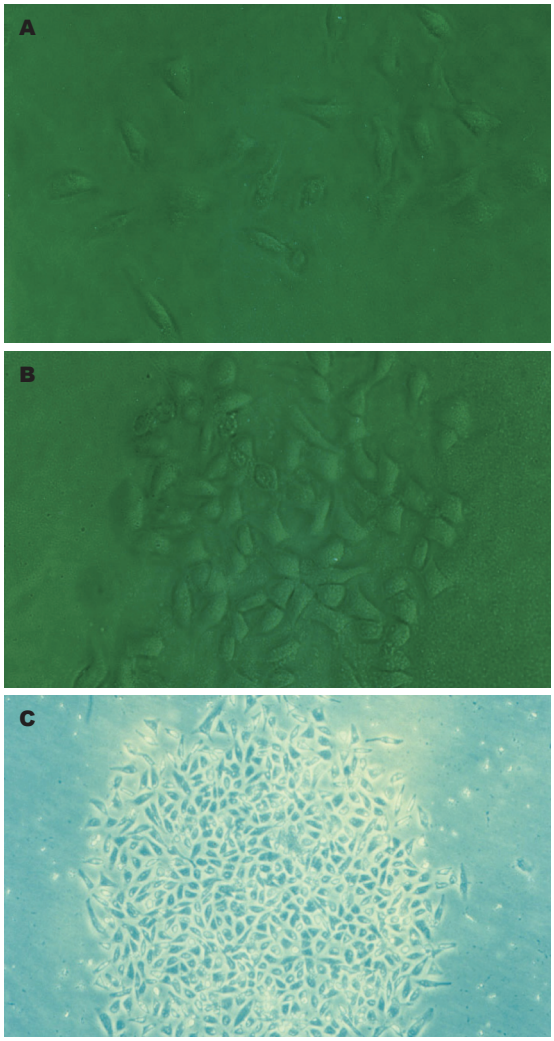


图 4 G418筛选下转染阳性呈克隆生长的L02肝细胞. A: ×400; B: ×400; C: ×100.

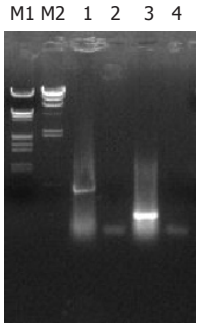


图 5 hIL-10的RT-PCR检测. M1: λDNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ; M2: λDNA/*Hin*dⅢ; 1: hIL-10; 2, 4: hβ-actin; 3: hALR.

■**应用要点**
本研究有助于开发实用性IL-10抗肝硬化治疗产品.

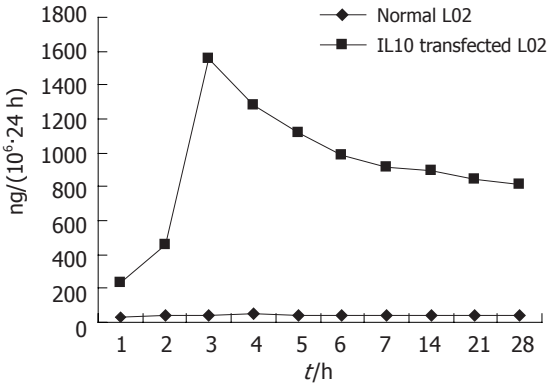


图 6 转染阳性L02肝细胞克隆hIL-10时间-浓度曲线.

硫氨酸残基. 本研究克隆的人IL-10开放阅读框架与GenBank登记序列完全吻合.

现已证实IL-10具有多种生物学功能, 参与了多种疾病的病理生理调节进程[3-18]. 作为炎症过程的负性调节因子, 其抑制功能主要表现在: 抑制Th1类细胞因子如IL-2、IL-1-β、IFN-γ、TNF-α等的合成及活性, 抑制单核细胞表面MHC Ⅱ类分子HLA-DR/DP及DQ的表达, 降低单核细胞的抗原提呈能力, 阻断抗原特异性的单核巨噬细胞因子如IL-2、IL-8和TNF-α的产生. 下调ICAM-1等黏附分子及核转录因子、核因子κB的表达, 正向调节IL-1R拮抗剂的表达. 抑制NK细胞的活性, 抑制单核细胞依赖性Th细胞的增生, 抑制反应性氮氧化物产生等.

大量证据表明IL-10参与了肝纤维化、肝硬化过程, 并具有重要的负性调控功能. 因IL-10具有强大的抑制炎症和巨噬细胞活性的功能, 具有潜在的抗肝纤维化、抗肝硬化能力而备受关注[3-5,9-10,16-18]. 以基因转导或基因修饰细胞移植方式将IL-10导入纤维化或硬化肝脏将成为治疗肝纤维化、肝硬化非常有前途的手段.

4 参考文献

1 代文杰, 姜洪池, 潘尚哈, 吕晓颖. 人白细胞介素-10 cDNA的克隆、测序和真核表达载体的构建. 哈尔滨医科大学学报 2001; 35: 4-6

2 Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstine ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. *Science* 1990; 248: 1230-1234

3 Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992; 13: 198-200

4 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998; 28: 1597-1606

5 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615

6 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-308

7 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation *In vitro*. *Hepatology* 1998; 28: 1518-1524

8 Rai RM, Loffreda S, Karp CL, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology* 1997; 25: 889-895

9 Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Schouten HJ, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, van Lambalgen AA, Dijkstra CD, van Leeuwen PA. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 2000; 20: 66-77

10 Le Moine O, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22: 1436-1439

11 Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94: 2489-2492

12 Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2304-2310

13 Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I, Uitto J. Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression *in vivo* and *in vitro* at the transcriptional level. *Biochem J* 1994; 302 (Pt 2): 331-333

14 Van Vlasselaer P, Borremans B, van Gorp U, Dasch JR, De Waal-Malefyt R. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor-beta (TGF-beta) synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol* 1994; 124: 569-577

15 Ertel W, Keel M, Steckholzer U, Ungethum U, Trentz O. Interleukin-10 attenuates the release of proinflammatory cytokines but depresses splenocyte functions in murine endotoxemia. *Arch Surg* 1996; 131: 51-56

16 Zou XM, Yagihashi A, Hirata K, Tsuruma T, Matsuno T, Tarumi K, Asanuma K, Watanabe N. Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and prolongation of rat liver allograft survival by interleukin-10. *Surg Today* 1998; 28: 184-191

17 Louis H, Le Moine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, Deviere J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997; 25: 1382-1389

18 Louis H, Le Moine A, Quertinmont E, Peny MO, Geerts A, Goldman M, Le Moine O, Deviere J. Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology* 2000; 31: 381-390

■同行评价

本文通过构建表达载体、体外转染的方法研究hIL-10在L02肝细胞中的表达, 实验方法合理, 为肝硬化的治疗提供修饰化细胞, 具有一定临床实用意义.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1462-1465
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

HBeAg结合蛋白4基因剪切体HBeBP4A的克隆化

张健康, 郭 江, 成 军, 王丹琼, 伦永志, 赵龙凤, 蓝贤勇, 洪 源, 毛 羽

■背景资料
乙型病毒性肝炎是由HBV感染引起的世界性传染病, 目前还没有特效的治疗方法. HBV属嗜肝DNA病毒, 其基因组功能单位十分密集, 高度压缩, 重复利用, 目前已确定有4个主要的开放读码框, 编码至少7个蛋白, 包括3个表面抗原: 包膜蛋白前-S1、前-S2、S; 核心抗原(HBcAg); e抗原(HBeAg); 病毒多聚酶(P); X蛋白(HBxAg). HBeAg是核壳蛋白的分泌型, 存在于HBV Dane氏颗粒的核心, 既往研究认为HBeAg对HBV的感染和复制无重要作用, 但HBeAg与肝细胞之间的具体作用机制尚不清楚, 研究HBeAg与肝细胞间的相互作用蛋白, 可能是解决HBV感染的有效途径之一.

张健康, 郭江, 成军, 王丹琼, 伦永志, 赵龙凤, 蓝贤勇, 洪源, 毛羽, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张健康, 赵龙凤, 山西医科大学第一医院消化科 山西省太原市 030001
张健康, 山西医科大学2004级内科学博士生, 主要从事慢性肝病的临床与基础研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30371288
北京市自然科学基金项目, No. 5042024
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2006-01-06 接受日期: 2006-01-25

Cloning of spliced variant HBeBP4A of hepatitis B virus e antigen binding protein 4

Jian-Kang Zhang, Jiang Guo, Jun Cheng, Dan-Qiong Wang, Yong-Zhi Lun, Long-Feng Zhao, Xian-Yong Lan, Yuan Hong, Yu Mao

Jian-Kang Zhang, Jiang Guo, Jun Cheng, Dan-Qiong Wang, Yong-Zhi Lun, Long-Feng Zhao, Xian-Yong Lan, Yuan Hong, Yu Mao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Jian-Kang Zhang, Long-Feng Zhao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Surpported by National Natural Science Foundation, No. 30371288, and Beijing Natural Science Foundation, No. 5042024
Correspondence to: Professor Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2006-01-06 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To clone a new gene, binding protein 4 spliced variant HBeBP4A of hepatitis B virus e antigen (HBeAg), and to explore its function and structure by bioinformatical analysis.

METHODS: HBeBP4A was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using HepG2 cDNA as template and inserted into pGEM-T easy vector by TA cloning. Recombinant eukaryotic expression vector (pcDNA™3.1/myc-HisA-HBeBP4A) was constructed by subcloning followed by restriction enzyme digestion analysis and sequencing. Bioinformatical methods were used to analyze its possible physical and chemical characteristics, structure, and function.

RESULTS: Spliced form of HBeBP4, named HBeBP4A, was amplified successfully by RT-PCR from HepG2 cDNA. Bioinformatical analysis showed that its new open reading frame (ORF) is 1104 bp in length and translated a protein containing 367 amino acid residues.

CONCLUSION: A new gene, spliced variant HBeBP4A of HBeAg binding protein 4, is recognized, and its recombinant eukaryotic expression vector is constructed.

Key Words: Hepatitis B virus e antigen; Binding protein; Cloning; Spliced variant; Recombinant eukaryotic expression vector

Zhang JK, Guo J, Cheng J, Wang DQ, Lun YZ, Zhao LF, Lan XY, Hong Y, Mao Y. Cloning of spliced variant HBeBP4A of hepatitis B virus e antigen binding protein 4. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1462-1465

摘要

目的: 克隆HBeAg结合蛋白未知功能新基因HBeBP4的剪切体基因HBeBP4A, 构建其真核表达载体, 并应用生物信息学初步探讨其结构及功能.

方法: 应用PCR技术从HepG2细胞提取的cDNA扩增HBeBP4基因的剪切体基因HBeBP4A, 选用pGEM-Teasy载体进行TA克隆, 通过PCR, 限制性酶切分析及测序进行鉴定, 再将其亚克隆到真核表达载体pcDNA™3.1/myc-HisA, 通过PCR, 限制酶切分析进行鉴定, 并应用生物信息学初步分析其物理化学性质, 蛋白质结构和功能.

结果: 成功扩增出HBeBP4剪切体基因, 命名为HBeBP4A. 利用生物信息学分析推定其ORF为1104个核苷酸(nt), 编码产物为367个氨基酸残基(aa).

结论: 发现了HBeAg结合蛋白4(HBeBP4)基因的剪切体HBeBP4A, 构建了pcDNA™3.1/

myc-HisA真核表达载体.

关键词: 乙型肝炎病毒e抗原; 结合蛋白; 克隆化; 剪切体; 真核表达载体

张健康, 郭江, 成军, 王丹琼, 伦永志, 赵龙凤, 蓝贤勇, 洪源, 毛羽. HBeAg结合蛋白4基因剪切体HBeBP4A的克隆化. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1462-1465
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1462.asp

0 引言

HBeAg是核壳蛋白的分泌型, 研究发现HBeAg对HBV的感染和复制无重要作用, 有学者提出他可能具有免疫调节的作用而导致HBV感染的持续[1-3]. HBeAg可阻断细胞毒性T淋巴细胞优先清除对HBcAg特异的Th1细胞及Th1细胞介导的抗-HBc抗体反应, 使免疫应答转换为Th2细胞亚型, 使HBV逃避免疫清除, 致感染慢性化[4-7]. 但HBeAg与肝细胞之间的相互作用机制尚不清楚, 此方面的研究较少. 陆荫英 *et al*[8]利用酵母双杂交系统3, 发现了HBeAg结合蛋白4-HBeBP4, 为探讨其生物学功能及其作用, 我们应用PCR技术对其进行扩增与克隆, 构建其真核表达载体, 从寻找HBeAg与肝细胞间的相互作用蛋白入手, 对其生物学功能进行预测分析, 为今后更加广泛深入地研究新基因的生物学功能打下基础, 并希望在研究HBeAg的确切生物学功能方面有所发现[9-11].

1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系HepG2及大肠杆菌DH5α为本室保存; Taq酶购于鼎国生物公司; T4 DNA连接酶, pGEM-Teasy, IPTG及X-gal购于Promega公司; 玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司; *Eco*RⅤ, *Hin*dⅢ, *Bam*HⅠ, *Sac*Ⅰ, *Nhe*Ⅰ, DNA Marker DL15000和DL2000购自TaKaRa生物公司; pcDNA^{TM}3.1/myc-HisA由北京大学人民医院肝病研究所魏来教授惠赠; 引物合成及DNA序列测定由Invitrogen公司完成. 陆荫英 *et al*[8]利用酵母双杂交系统3, 构建了pGBKT7-HBeAg诱饵表达质粒, 在预转化的人肝cDNA文库中"钓"出与HBeAg有相互作用的蛋白基因39种, 5种为未知基因, 在GenBank中未发现与之同源的表达基因序列, 根据基因起始密码子的Kozak规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 电子拼接推定未知基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因, 将其中之一命名为HBeAg结合蛋白4(HBeBP4), 开放读码框长1374 bp, 编码457个氨基酸残基, 并获得GenBank注册号AY134474, 目前该基因在GenBank中已升级为GLYCTK基因, GenBank注册号NM_145262.

1.2 方法 根据HBeBP4的全长编码基因, 设计序列特异性的含有限制性核酸内切酶*Eco*RⅤ/*Hin*dⅢ(下划线序列)位点的引物P1、P2. P1: 5'-CGG ATATCA TGG CTG CAG CCC TGC AG-3', P2: 5'-CGAAGC TTC CGA GGC CGC AGG AAC AAG-3', 提取HepG2细胞的总RNA进行反转录, 以反转录产物cDNA为模板进行PCR, PCR参数如下: 95℃ 6 min预变性, 94℃ 50 s变性, 66℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 共35个循环, 72℃延伸10 min, 最后4℃保存. 将PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-Teasy载体16℃连接过夜, 转化进DH5α感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37℃培养12-16 h. 挑取阳性菌落, 增菌. 碱裂解法提取质粒进行*Eco*RⅤ/*Hin*dⅢ与*Bam*HⅠ/*Sac*Ⅰ两次双酶切鉴定, 证明目的基因片段已正确插入pGEM-Teasy载体中后送测序. 选择经酶切与测序鉴定的pGEM-Teasy-HBeBP4A重组质粒和pcDNA^{TM}3.1/myc-His A真核表达空质粒分别进行*Eco*RⅤ/*Hin*dⅢ双酶切反应, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳纯化回收并在16℃以T4连接酶连接两个目的基因片段, 按上述方法常规转化感受态细菌, 提取pcDNA^{TM}3.1/myc-HisA-HBeBP4A重组质粒作*Eco*RⅤ/*Hin*dⅢ与*Bam*HⅠ/*Sac*Ⅰ两次双酶切鉴定. 利用在线www.ebi.ac.uk/clustalw/软件将Teasy vector所测基因序列与HBeBP4及其升级基因GLYCTK进行序列比对, 确定该序列为HBeBP4基因的剪切体; 然后利用NCBI数据库中BLASTn比对分析, 确定剪切体的新开放读码框(ORF), 命名为HBeBP4A基因, 并在NCBI中登陆获取GenBank注册号.

2 结果

新基因HBeBP4A与HBeBP4及其升级基因GLYCTK序列比对结果发现, 在441 bp处有1个G-A的点突变, 在1077-1549 bp之间缺失473 bp, 确定该序列为HBeBP4基因的剪切体, 其开放读码框长1104 bp, 编码367个氨基酸残基, 该序列已在美国核苷酸序列数据库GenBank注册, 注册号DQ352863. 以HepG2细胞cDNA文库为模板, PCR反应后经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见长度

■**研发前沿**
酵母双杂交(yeast two hybrid)技术是利用酵母遗传学方法分析蛋白质之间的相互作用. HBeBP4是利用酵母双杂交技术筛选得到的HBeAg肝细胞结合蛋白, 其结构和功能的研究均未有报道. 对其进一步的研究期望能在HBV的发病机制方面有所突破.

■**创新盘点**
本文利用PCR技术在对HBeBP4克隆时意外地发现了该基因的剪切体HBeBP4A, 并利用生物信息学技术分析对比了二者的基因组序列、编码蛋白的结构功能, 确定这是一个HBeAg与肝细胞结合新的靶基因, 已获GenBank注册DQ352863.

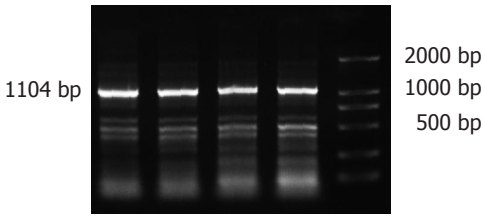


图 1 HBeBP4A RT-PCR扩增产物.

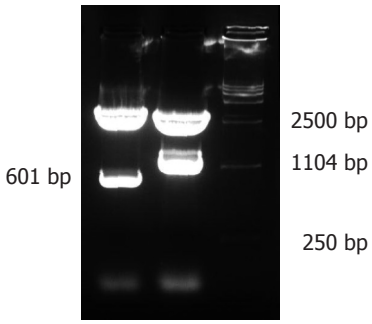


图 2 重组质粒PGEM-Teasy-HBeBP4A的酶切鉴定.

为1104 bp左右的电泳条带(图1). 利用pGEM-Teasy vector System Ⅰ将纯化PCR产物进行TA克隆, 经*Eco*RⅤ/*Hin*dⅢ酶切, 得到约3027 bp, 1104 bp两条带, *Bam*HⅠ/*Sac*Ⅰ鉴定酶切, 得到约3531 bp, 601 bp两条带(图2), 命名为pGEM-Teasy-HBeBP4A, 进一步构建的pcDNA^{TM}3.1/myc-HisA-HBeBP4A重组真核表达载体, 经*Eco*RⅤ/*Hin*dⅢ酶切, 得到约5473 bp, 1104 bp两条带, *Hin*dⅢ/*Nhe*Ⅰ鉴定酶切, 得到约5422 bp, 999 bp, 157 bp三条带(图3), 证明pcDNA^{TM}3.1/myc-HisA-HBeBP4A构建成功.

3 讨论

近年来由于乙肝疫苗的广泛应用对HBV感染起到了一定的阻断作用, 但全世界仍有超过3.5亿人处于HBV慢性感染状态, 成为重要的传染源, 其中有很大部分要转化为肝硬化、肝癌[12-15]. 在HBV感染的漫长过程中大多数感染者由于HBeAg的阴转及抗HBe的出现而伴随病毒复制明显减少, 但少数HBeAg阴性的感染者体内病毒仍有持续或间断的高水平复制, 并伴有肝细胞坏死性炎症及进行性纤维化. 既往的研究结果普遍认为HBeAg是一种免疫调节因子, 可调节宿主的免疫应答, 抑制宿主T细胞的细胞毒活性, 形成对HBV感染的免疫耐受性[16-18]. 另一方面由于HBeAg含有病毒高度保守的体液和细胞抗原靶位, 与HBcAg有部分共同的序列, 有相同的抗原靶位, 当HBeAg发生突变时, 失去血清中

■**应用要点**
新基因HBeBP4A的克隆和功能研究, 为今后更加广泛深入地研究新基因的生物学功能打下基础, 并为研究HBeAg与肝细胞间的相互作用、乙型肝炎发病机制创造了条件.

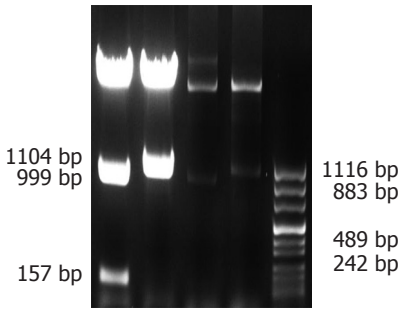


图 3 重组质粒pcDNA^{TM}3.1/myc-HisA-HBeBP4A的酶切鉴定.

HBeAg的调节, 表达HBcAg的肝细胞经受增强的T细胞的细胞毒作用, 可导致病情加重[19-23]. 血中抗HBe长期阳性的患者发生肝硬化肝癌的机率较高, 原因不清, 这些发现使得HBeAg的生物学功能变得更复杂. 寻找肝细胞中HBeAg的相互作用蛋白并进一步探明其机制对于明确上述问题有着重要意义.

陆荫英 *et al*[24-30]利用酵母双杂交系统3, 构建了pGBKT7-HBeAg诱饵表达质粒在预转化的人肝cDNA文库中钓出与HBeAg有相互作用的蛋白基因39种, 其中一种未知基因在GenBank中未发现与之同源的表达基因序列. 根据基因起始密码子的Kozak规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因, 将该未知功能基因命名为HBeBP4, 发现其开放读码框长1374 bp, 编码457个氨基酸残基, 并获得GenBank注册号(AY134474). 目前该基因在GenBank中已升级为GLYCTK基因, GenBank注册号NM_145262. 本研究以HBeBP4基因序列为参考, 应用PCR及生物信息学技术设计引物对其进行克隆研究过程中, 我们意外地发现了该基因的剪切体, 其开放读码框长1104 bp, 编码367个氨基酸残基, 命名为HBeBP4A[31-32]. 新基因HBeBP4A与HBeBP4及其升级基因GLYCTK序列比对结果发现, 在441 bp处有1个G-A的点突变, 在1077-1549 bp之间缺失473 bp, 该序列已在美国核苷酸序列数据库GenBank注册, 注册号DQ352863. 确定一个新基因的编码序列, 研究该基因的表达与调控, 编码蛋白的结构与功能, 确定新基因的生物学和医学意义, 是医学分子生物学研究领域中一项具有挑战性的工作[33]. 我们发现了HBeAg的肝细胞结合蛋白新基因HBeBP4A, 这是一种未知功能的新基因, 对于这一新基因结构与功能的研究目前还是空白. 提示我们对HBeAg生物学功能极其在HBV致病机

制的认识存在很大的局限性, 目前的研究着眼点可能遗漏了很多重要的方面, 或许有更关键的因素没有被发现而使研究工作误入歧途, 新基因的发现同时也为今后的科研工作指明了新的方向.

4 参考文献

1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998; 160: 2013-2021

2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S218-222

3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S178-187

4 万克青, 唐世刚, 龚环宇. 慢性乙型肝炎患者T细胞亚群与HBV标志物的关系. 湖南医科大学学报 1999; 24: 97

5 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002; 168: 4951-4959

6 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001; 52: 99-111

7 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 553-555

8 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003; 11: 422-425

9 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 95-98

10 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. Applications to drug discovery. *Methods Mol Biol* 2001; 176: 359-376

11 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001; 175: 415-454

12 Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2663-2668

13 Miranda J, Cabezas C. Hepatitis B among health workers. *Rev Gastroenterol Peru* 2001; 21: 128-135

14 Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-486

15 Marx G, Martin SR, Chicoine JF, Alvarez F. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origins. *J Infect Dis* 2002; 186: 295-301

16 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002; 76: 8609-8620

17 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin-alpha1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002; 9: 280-287

18 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000; 273: 149-159

19 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Nondeletional T-cell receptor transgenic mice: model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000; 74: 7587-7599

20 姜荣龙, 卢桥生, 侯金林, 骆抗先, 章廉, 富宁. 辅助性T细胞极化群体在慢性乙型肝炎病毒感染中的作用. 中华医学杂志 2000; 80: 741-744

21 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999; 116: 765-768

22 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Gr ner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999; 116: 650-657

23 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001; 8: 311-321

24 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 15-18

25 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002; 27: 341-342

26 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2基因酵母表达载体的构建及表达. 胃肠病学和肝病学杂志 2002; 11: 222-224

27 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合的蛋白基因. 世界华人消化杂志 2002; 10: 161-164

28 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1379-1383

29 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 129-132

30 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002; 82: 673-677

31 杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因2基因组DNA结构分析及其不同剪切体的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 801-804

32 成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 纪冬. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白反式调节基因2不同剪切体调节靶基因的比较. 世界华人消化杂志 2005; 13: 198-201

33 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003; 11: 373-377

■名词解释

剪切体: 由于mRNA编辑产生了不同的多肽, 进而形成不同蛋白质, 这些蛋白质就互称为剪切体(splice variants).

■同行评价

本文报道的HBeAg结合蛋白4剪切体HBeBP4A基因的克隆, 内容新颖, 有一定参考借鉴价值.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1466-1470
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

粒细胞集落刺激因子促进大鼠移植肝的再生作用

陈国栋, 刘玉兰, 尤 鹏, 陈 宁

■背景资料
临床肝移植近年来发展迅速, 但供肝的缺乏严重影响临床肝移植发展. 部分肝移植为解决供肝来源问题开拓了新的途径, 但移植后肝脏受缺血再灌注损伤、免疫抑制剂及宿主免疫系统应答等多种因素的影响, 肝再生情况不同于肝切除的肝再生. 因此如何促进部分移植物迅速再生, 进而保障肝脏正常功能和受体存活显的尤为重要.

陈国栋, 刘玉兰, 尤鹏, 陈宁, 北京大学人民医院消化科, 北京大学器官移植中心 北京市 100044
陈国栋, 2003年北京大学医学部硕士, 北京大学人民医院消化科住院医师, 主要从事肝移植免疫的研究.
通讯作者: 陈国栋, 100044, 北京市西直门南大街11号, 北京大学人民医院消化科. absnmj@hotmail.com
收稿日期: 2006-04-05 接受日期: 2006-04-24

Granulocyte colony stimulating factor accelerates regeneration and attenuates injury of partial liver allograft in rats

Guo-Dong Chen, Yu-Lan Liu, Peng You, Ning Chen

Guo-Dong Chen Yu-Lan Liu, Peng You, Ning Chen, Department of Gastroenterology, People's Hospital; Center for Organ Transplantation, Peking University, Beijing 100044, China
Correspondence to: Guo-Dong Chen, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Peking University, 11 Xizhimen South Street, Beijing 100044, China. absnmj@hotmail.com
Received: 2006-04-05 Accepted: 2006-04-24

Abstract

AIM: To investigate the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the regeneration of partial liver allograft in rats.

METHODS: Rat models with 50% partial liver transplantation (PLTx) were established, followed by administration of either saline or G-CSF for 5 consecutive days. Livers and serum samples were harvested 1 3, 5, 7 and 14 d after PLTx. GRWR (graft-recipient weight ratio) and serum biochemical parameters were calculated or measured, and the expression of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) was detected by immunohistochemistry (SABC).

RESULTS: As compared with that in control group, the survival rate of liver allograft was significantly higher (90% *vs* 60%, $\chi^2 = 5.03$, $P < 0.05$) in G-CSF groups. Three days after PLTx, liver regeneration reached the peak in both groups. In comparison with those in the controls, GRWR was increased ($P < 0.05$), and the level of aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were lower (3 d: $t = 17.61$, $P < 0.05$; $t = 20.16$, $P < 0.05$; 5 d: $t = 15.64$, $P < 0.05$; $t = 23.08$, $P < 0.05$); the level of albumin (ALB) (3 d: 36.2 ± 4.7 *vs* 29.5 ± 3.4, $P < 0.05$; 5 d: 43.2 ± 4.1 *vs* 33.8 ± 3.9, $P < 0.05$) and the expression of PCNA ($t = 23.08$, $P < 0.05$) were higher 3 and 5 d after PLTx in G-CSF groups.

CONCLUSION: G-CSF can promote the regeneration and alleviate the injury of partial liver allograft in rats.

Key Words: Liver transplantation; Granulocyte colony-stimulating factor; Liver regeneration; Proliferating cell nuclear antigen; Immunohistochemistry

Chen GD, Liu YL, You P, Chen N. Granulocyte colony stimulating factor accelerates regeneration and attenuates injury of partial liver allograft in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1466-1470

摘要

目的: 探讨部分肝移植后, 粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)对部分肝移植物再生的促进作用.

方法: 采用改良"二袖套法"建立SD大鼠50%部分肝移植模型, 受体鼠随机分为实验组和对照组, 术后分别注射(sc) G-CSF和相同体积的生理盐水5 d. 观察大鼠移植肝存活时间. 术后1, 3, 5, 7和14 d取血清和移植肝脏, 测移植物与受体质量比(graft-recipient weight ratio, GRWR), 检测血清生化指标, 并采用免疫组织化学方法观察肝内的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达.

结果: 实验组移植肝存活率较对照组高(90% *vs* 60%, $\chi^2 = 5.03$, $P<0.05$), 术后第3-5天, 实验组GRWR较对照组明显增加($P<0.05$). 两组肝再生均于移植后3 d达高峰. 与对照组相比, 实验组肝坏死灶少, AST, ALT水平低(3 d: $t = 17.61$, $P<0.05$; $t = 20.16$, $P<0.05$; 5 d: $t = 15.64$,

$P<0.05$; $t = 23.08$, $P<0.05$), 白蛋白水平高(3 d: 36.2±4.7 *vs* 29.5±3.4, $P<0.05$; 5 d: 43.2±4.1 *vs* 33.8±3.9, $P<0.05$), PCNA表达升高($t = 23.08$, $P<0.05$).

结论: 大鼠部分肝移植后G-CSF可以促进肝细胞再生, 减轻肝损伤.

关键词: 肝移植; 粒细胞集落刺激因子; 肝再生; 免疫组化; 增殖细胞和抗原

陈国栋, 刘玉兰, 尤鹏, 陈宁. 粒细胞集落刺激因子促进大鼠移植肝的再生作用. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1466-1470
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1466.asp

0 引言

临床肝移植近年来发展迅速, 但供肝的缺乏严重影响临床肝移植发展[1-2]. 部分肝移植为解决供肝来源问题开拓了新的途径[3-5], 但移植后肝脏受缺血再灌注损伤、免疫抑制剂及宿主免疫系统应答等多种因素的影响, 肝再生情况不同于肝切除的肝再生[6-18]. 近来研究表明粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)可能具有促进细胞再生的能力[19-23], 故本实验观察其是否可以促进部分肝移植物的再生.

1 材料和方法

1.1 材料 取SD纯系♂220-280 g大鼠, 随机分为2组(每一时间点6只). 实验组通过对Kamada法[24]改进, 熟练掌握二袖套法原位肝移植的手术技术, 达到1 wk存活率>90%后开始正式实验. 治疗组: 同基因大鼠原位50%部分肝移植(SD→SD)术(切除左外叶、部分中叶和尾叶), 3 h后用生理盐水稀释的rhG-CSF每日10 μg/kg, sc, 共5 d. rhG-CSF由麒麟鲲鹏(中国)生物药业有限公司生产, 商品名为惠尔血, 制剂标示量为75 μg/支. 给药前用生理盐水稀释至所需浓度. 对照组: 50%部分肝移植, 3 h后等量生理盐水sc 5 d. 分别于术后1, 3, 5, 7, 14 d从各组中取6只大鼠. 称取移植肝和受鼠的质量, 测移植物与受体质量比(GRWR)[25]. 将一部分肝脏组织块40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋; 一部分肝脏组织块OCT包埋, 液氮速冻, -70℃保存备用.

1.2 方法

取血标本室温下静置, 离心后, 取血清低温(-20℃)保存, 全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT), 天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和白蛋白(albumin, ALB)水平. 免疫组织化学(SABC)的方法检测肝组织石蜡切片中检测增殖细胞核抗原(PCNA)(武汉博士德公司)的表达, 操作按说明书进行. 结果判定标准: PCNA以细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性. 阳性结果分级按以下标准记录, 即每张切片随机观察5个高倍视野, 每个视野计100个细胞中的阳性细胞数, 取均值, 以百分数表示细胞增殖指数.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 采用统计软件SPSS 10.0分析. 先以F检验判断其方差齐型, 各时间点两组间比较采用t检验, $P<0.05$为差异有统计学意义. 生存时间绘制成Kaplan-Meier曲线, 比较采用对数秩检验(log-rank), $P<0.05$为差异有显著性.

2 结果

实验组14 d存活率(90%)高于对照组生存率(60%). 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.03$, $P<0.05$, 图1). 实验组在术后3-5 d时GRWR明显较对照组高, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图2). 移植后3 d, 移植肝脏有轻度的汇管区单核细胞浸润, 肝细胞点状坏死灶, 并可见中央小静脉、肝窦和叶间静脉轻度扩张, 肝结构基本正常, 与对照组相比, 实验组移植后7-14 d汇管区浸润明显, 组织结构较

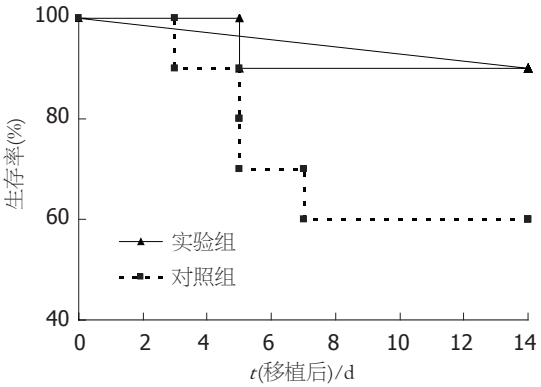


图 1 肝移植大鼠生存曲线.

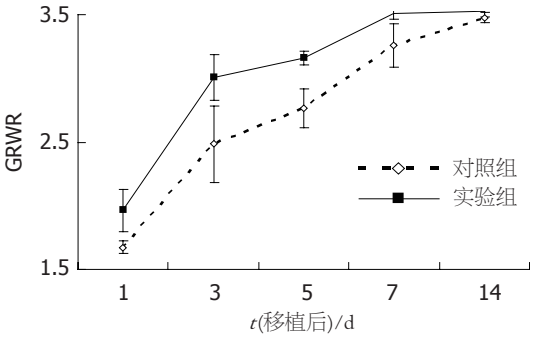


图 2 肝移植大鼠GRWR的比较.

■**研发前沿**
提高部分肝移植物存活率的研究主要集中于提高手术技术和改善缺血再灌注损伤方面, 如何促进肝再生方面的相关报道较少.

■**相关报道**
如何提高部分肝移植物的存活率, 目前主要集中于缺血再灌注损伤、免疫抑制剂的研究; 而如何提高肝再生的能力, 国内有使用IL-10, IL-18等的相关报道.

■**创新盘点**
本文利用大鼠部分肝移植模型, 证实G-CSF可以促进部分肝移植物的再生, 减轻肝损伤.

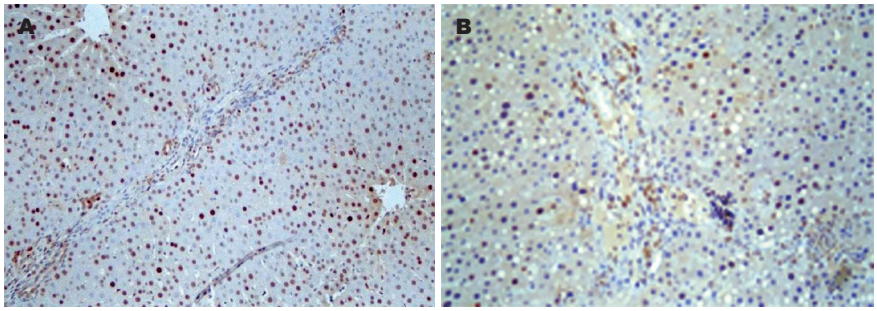


图 3 肝移植术后3 d PCNA的表达. A: 实验组; B: 对照组(SABC×200).

表 1 肝移植大鼠血清生化指标和PCNA的变化 (mean ± SD)

移植后(d)	ALT (nkat/L)		AST (nkat/L)		ALB (g/L)		PCNA (%)	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
1	12 703 ± 667	12 503 ± 1450	20 921 ± 3784	22 621 ± 984	27.4 ± 3.2	26.1 ± 2.0	27.7 ± 6.0	27.2 ± 6.1
3	6601 ± 567[a]	8802 ± 950	12 186 ± 984[a]	17 153 ± 1284	36.2 ± 4.7[a]	29.5 ± 3.4	67.7 ± 14.0[a]	56.8 ± 6.0
5	4134 ± 733[a]	6435 ± 1000	2884 ± 517[a]	9519 ± 2884	43.2 ± 4.1[a]	33.8 ± 3.9	33.3 ± 6.7[a]	24.7 ± 5.1
7	1334 ± 367	1817 ± 317	2167 ± 467	2534 ± 900	46.1 ± 3.7	42.1 ± 4.4	23.2 ± 5.6	19.8 ± 5.7
14	934 ± 350	1150 ± 317	2184 ± 700	2534 ± 683	49.0 ± 2.7	44.1 ± 3.1	8.8 ± 2.3	13.3 ± 3.1

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组.

好, 肝坏死灶少. 移植后3 d, 实验组细胞核有丝分裂像增多, 双核及三核细胞也显著增多, 7 d时肝细胞核分裂及多核肝细胞减少.

2.1 *血清ALT、AST及ALB水平* 两组ALT和AST均于术后1 d升高, 然后呈下降趋势. 实验组和对照组相比, 以移植后3-5 d差异有显著性(3 d: ALT: 6601±567 *vs* 8802±950 nkat/L, $t = 20.16$, $P<0.05$; AST: 12 186±984 *vs* 17 153±1284 nkat/L, $t = 17.61$, $P<0.05$) (5 d: ALT: 4134±733 *vs* 6435±1000 nkat/L, $t = 23.08$, $P<0.05$; AST: 2884±517 *vs* 9519±2884 nkat/L, $t = 15.64$, $P<0.05$), 实验组ALB水平在术后第3-5天时较对照组增高, 差异有显著性($P<0.05$, 表1).

2.2 *肝组织PCNA的表达* 正常组PCNA阳性着色定位于细胞核内呈颗粒状或弥漫性, 部分为细胞着色, 阳性颗粒较粗大且分布不均匀. PCNA阳性细胞首先出现于汇管区的胆管上皮细胞, 内皮细胞和单个核细胞, 然后可见肝细胞, 并于移植后第3天表达达高峰, 实验组与对照组PCNA表达差异有显著性(67.7%±14.1% *vs* 56.8%±5.98%, $t = 23.08$, $P<0.05$). 5-7 d仍有较多量的PCNA阳性(图3, 表1).

3 讨论

除影响大鼠原位全肝移植手术成功的因素外, 部分肝移植还有其独特的影响因素, 即移植肝体积减少可能导致肝功能衰竭. 本实验用”二袖套法”肝移植技术进行部分肝移植手术, 受体大鼠术中无死亡, 术后24 h内死亡亦被考虑为手术技术所致, 手术成功率与早期报道一致[26].

G-CSF是一种促粒细胞增殖的细胞因子. 近来研究表明G-CSF可以促进心肌梗塞后梗死心肌和血管的再生及促进出血性休克的修复[19-20], 提示G-CSF可能具有损伤修复的作用. 早期的研究也表明G-CSF具有增加部分肝切除后剩余肝脏的再生能力[21-23]. 而部分移植肝脏的再生能力除与肝脏的容量丧失有关, 还与缺血再灌注损伤、免疫抑制剂及宿主免疫系统应答等多种因素有关, 肝再生情况不同于肝切除的肝再生. 故我们观察G-CSF是否有助于部分移植肝脏的损伤修复. 部分肝移植物受损伤刺激启动其再生, 通过增殖以代偿. 因此肝再生是肝损伤的修复过程, 肝再生和肝损伤是一矛盾统一体, 其损伤和再生的程度与肝功能密切相关. 本研究中发现实验组存活率高于对照组. 组织学表明实验组中, 移植后第3-5天, 汇管区单个核细胞浸润明显, 移植后第7-14天, 肝组织结构整齐, 坏死灶减少, 肝损伤小. 血清学指标也进一步证实肝损伤比对照组轻. 提示G-CSF减轻了部分移植肝脏的损伤. GRWR在一定程度上反映细胞再生的情况; PCNA是一种与细胞周期相关的增殖细胞核抗原, 存在并合成于核内, 静止细胞中PCNA含

量很少, 增殖细胞和转化细胞中其含量发生明显变化, 其含量和表达强弱的变化与DNA合成及DNA复制的活跃程度一致. 本研究中, 实验组移植物的GRWR和PCNA的表达在术后第3, 5天时明显高于对照组. 提示G-CSF能促进部分移植肝再生. 而术后第7天时两组移植物GRWR、肝细胞PCNA标记指数的差异无统计学意义, 这可能是由于术后第7天时两组移植物细胞再生的过程均已完成. 虽然大鼠部分肝移植后移植肝的细胞再生较大鼠部分肝切除后剩余肝脏的再生要延迟[27], 但有报道部分肝移植后的大鼠仍具有很强的细胞再生能力[8], 术后1 wk时肝脏的再生已基本完成, 这与本研究结果相符.

在实验组中, 肝损伤减少, 肝再生能力增加, 这提示G-CSF可能通过多种途径来对部分移植肝发挥作用. 一方面G-CSF促进部分肝切除模型中肝脏的再生, 说明G-CSF可以直接增加肝细胞的再生能力; 另一方面, G-CSF可以改变细胞因子的水平(如: TNF-α)[28], 而肝脏是多种细胞因子的靶器官, 故可能通过细胞因子对肝脏产生直接或间接的影响; 再者, G-CSF可以动员干细胞入血[29-30], 故动员的肝系相关的干细胞可能归巢入肝脏, 参与肝再生. 因此, 我们认为, G-CSF能够促进移植肝的细胞再生, 减轻肝损伤, 说明这种方法是有效的, 为临床应用提供了依据. 但需作进一步的研究明确其更深入的作用机制, 并了解其药物的量效关系及其副作用.

4 参考文献

1 Thalheimer U, Capra F. Liver transplantation: making the best out of what we have. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 945-953

2 陈知水, 王海灏. 中国肝癌肝移植的现状与展望. 世界华人消化杂志 2006; 14: 939-941

3 de Jonge J, Kazemier G, Metselaar HJ, Tilanus HW. Partial liver transplantation. *Scand J Gastroenterol* Suppl 2001; 98-102

4 周宁新, 范上达. 活体部分肝移植技术的成熟及其发展的意义. 中国实用外科杂志 2001; 21: 381-382

5 Ikegami T, Shiotani S, Ninomiya M, Minagawa R, Nishizaki T, Shimada M, Sugimachi K. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation from living donors. *Surgery* 2002; 131: S205-210

6 Xu MQ, Yao ZX. Functional changes of dendritic cells derived from allogeneic partial liver graft undergoing acute rejection in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 141-147

7 Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 181-189

8 李相成, 王学浩, 俞悦, 黄蓬. 大鼠部分肝移植的实验研究. 中华器官移植杂志 2002; 23: 167-168

9 Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 2005; 5: 2605-2610

10 Guo L, Haga S, Enosawa S, Naruse K, Harihara Y, Sugawara Y, Irani K, Makuuchi M, Ozaki M. Improved hepatic regeneration with reduced injury by redox factor-1 in a rat small-sized liver transplant model. *Am J Transplant* 2004; 4: 879-887

11 钱晓峰, 张峰, 王学浩, 王科, 成峰. 重组肝细胞生长因子促进大鼠移植肝细胞的再生. 中华器官移植杂志 2005; 26: 679-681

12 Cheng F, Li XC, Wang XH, Qian XF, Wang K, Huang P. Relationship between the expression of IL-10 and liver regeneration following reduced-size orthotopic liver transplantation in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 552-554

13 王爱坤, 成峰, 王学浩, 李相成. 冷缺血时间对大鼠部分肝移植存活率的影响. 肝胆外科杂志 2004; 12: 55-57

14 袁晟光, 王继见, 董家鸿. 冷保存大鼠部分肝移植模型的建立. 消化外科 2003; 2: 274-276

15 Eguchi S, Yanaga K, Sugiyama N, Okudaira S, Furui J, Kanematsu T. Relationship between portal venous flow and liver regeneration in patients after living donor right-lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: 547-551

16 Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002; 36: 812-818

17 Dirsch O, Dahmen U, Gu YL, Shen K, Li J, Fan LM, Broelsch CE. Influence of cold ischemia on liver regeneration after partial liver transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 2303-2304

18 Xu MQ, Suo YP, Gong JP, Zhang MM, Yan LN. Augmented regeneration of partial liver allograft induced by nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides-modified dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 573-578

19 Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant* 2004; 13: 741-748

20 Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Distinct effects of systemic infusion of G-CSF *vs*. IL-6 on lung and liver inflammation and injury in hemorrhagic shock. *Shock* 2000; 14: 41-48

21 Theocharis SE, Papadimitriou LJ, Retsou ZP, Margeli AP, Ninos SS, Papadimitriou JD. Granulocyte-colony stimulating factor administration ameliorates liver regeneration in animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1797-1803

22 Theocharis SE, Margeli AP, Kittas CN. Effect of granulocyte colony-stimulating-factor administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1990-1996

23 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119

24 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with

■应用要点

本研究为今后临床部分肝移植术后更好地促进部分肝移植物的再生, 提高受体存活率, 提供了实验依据.

■名词解释

G-CSF: 粒细胞集落刺激因子, 作为一种促粒细胞增殖的细胞因子应用于临床, 近年来研究发现G-CSF还可以改变细胞因子的水平并促进细胞增殖的作用.

■同行评价
本文探讨了粒细胞集落刺激因子对大鼠移植肝再生的促进作用, 立题具有一定的创新性, 也具有一定的理论和实践意义, 但整体研究内容单薄.

five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
25 Gu Y, Dirsch O, Dahmen U, Ji Y, He Q, Chi H, Broelsch CE. Impact of donor gender on male rat recipients of small-for-size liver grafts. *Liver Transpl* 2005; 11: 669-678
26 徐明清, 姚榛祥, 贺强. 大鼠原位部分肝移植与围手术期处理的技术改进. 重庆医学 2003; 32: 135-136
27 Wang J, Tahara K, Hakamata Y, Mutoh H, Murakami T, Takahashi M, Kusama M, Kobayashi E. Auxiliary partial liver grafting in rats: effect of host hepatectomy on graft regeneration, and review of literature on surgical technique. *Microsurgery* 2002; 22: 371-377
28 Xu S, Hoglund M, Hakansson L, Venge P. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines *in vivo*. *Br J Haematol* 2000; 108: 848-853
29 Kroger N, Renges H, Kruger W, Gutensohn K, Loliger C, Carrero I, Cortes L, Zander AR. A randomized comparison of once versus twice daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2000; 111: 761-765
30 Elfenbein GJ. Granulocyte-colony stimulating factor primed bone marrow and granulocyte-colony stimulating factor mobilized peripheral blood stem cells are equivalent for engraftment: which to choose? *Pediatr Transplant* 2005; 9 Suppl 7: 37-47

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.

1 征文内容

会议征集的论文内容包括: (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操作表演; (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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1471-1474
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

肝硬化大鼠门静脉内毒素水平与Child–Pugh分级之间的关系

殷云勤, 韩德五, 王新国

殷云勤, 韩德五, 王新国, 山西医科大学肝病研究所 山西省太原市 030001
殷云勤, 硕士, 山西医科大学肝病研究所博士生, 副主任医师.
通讯作者: 韩德五, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学肝病研究所. smuhan@ty.sx.cn
电话: 0351–4135067
收稿日期: 2006–01–20 接受日期: 2006–02–21

Association between portal endotoxemia and Child-Pugh classification in complex pathogens-induced hepatic cirrhosis in rats

Yun-Qin Yin, De-Wu Han, Xin-Guo Wang

Yun-Qin Yin, De-Wu Han, Xin-Guo Wang, Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Correspondence to: Dr. De-Wu Han, Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. smuhan@ty.sx.cn
Received: 2006-01-20 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To evaluate the association between the Child-Pugh classification and portal endotoxemia during the course of rat liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4) plus ethanol and cholesterol.

METHODS: Liver cirrhosis model was induced in 20 Wistar rats using CCl_4 plus ethanol and cholesterol, while 6 rats were treated as controls. At 6 and 10 wk, serum samples were collected from portal vein for the detection of prothrombin time, albumin, bilirubin and endotoxin level, and the ascites and brain wave were also tested. The liver function was evaluated by Child-Pugh scoring system and the relationship between Child-Pugh classification and portal endotoxemia was assessed.

RESULTS: Spearman rank correlation analysis showed that Child-Pugh grading was correlated with albumin level and prothrombin time (r = -0.695, P < 0.05; r = 0.649, P < 0.05), but not with bilirubin level (P > 0.05). The level of endotoxin in portal vein was elevated with prolonging of cirrhosis time, and it was significantly higher at 6 or 10 wk than that in the controls (1983.7 ± 586.4, 2600.7 ± 343.8 mEU/L *vs* 925.1 ± 527.7 mEU/L, both P < 0.01). Endotoxin level was correlated with cirrhosis time (r = 0.624, P < 0.01) and Child-Pugh classification (r = 0.680, P < 0.01).

CONCLUSION: Portal endotoxemia is significantly correlated with Child-Pugh classification, indicating that intestinal endotoxemia plays an important role during the course of complex pathogens-induced cirrhosis in rats.

Key Words: Intestinal endotoxemia; Child-Pugh classification; Liver cirrhosis; Carbon tetrachloride

Yin YQ, Han DW, Wang XG. Association between portal endotoxemia and Child-Pugh classification in complex pathogens-induced cirrhosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1471-1474

摘要

目的: 研究CCl_4诱导大鼠肝硬化形成过程中门静脉内毒素与Child-Pugh分级, 探讨肠道在大鼠肠源性内毒素及大鼠肝硬化代偿向失代偿转化中的作用.

方法: 20只Wistar大鼠采用CCl_4复合因素诱发大鼠肝硬化模型, 6只作为对照. 于制模开始后的6及10 wk分别测定凝血酶原时间, 白蛋白, 胆红素, 腹水情况, 脑电图情况及门静脉内毒素水平, 并依据Child-Pugh分级系统确定大鼠肝功能分级, 比较Child分级与门静脉内毒素的关系.

结果: 经Spearman等级相关分析, Child-Pugh分级指标与白蛋白、凝血酶原时间显著相关(r = -0.695, P<0.05; r = 0.649, P<0.05), 而与胆红素没有显著相关性(r = 0.111, P = 0.732). 门静脉内毒素水平随着肝硬化模型制作时间的延长而逐渐加重, 正常大鼠门静脉内毒素水平与6及10 wk毒素门静脉内毒素水平比较均有

■背景资料
肝硬化往往伴有内毒素血症, 其产生原因与肠黏膜通透性升高及肠道内菌群失调有关, 这种肠源性内毒素血症对肝硬化肝功能的影响如何, 有待深入的研究.

■研发前沿
肠源性内毒素血症在应激、创伤、休克等病理过程中有重要的促进作用,肝硬化发生、发展过程中常常伴有内毒素血症,他是肝硬化的结果,同时也是肝病慢性化及重型化的重要因素.

统计学差异(925.1±527.7 mEU/L *vs* 1983.7±586.4, 2600.7±343.8 mEU/L, 均$P<0.01$), 门静脉内毒素水平与时间相关($r = 0.624$, $P<0.01$), 与Child-Pugh分级之间有显著相关($r = 0.680$, $P<0.01$).

结论: 肝硬化大鼠门静脉高内毒素血症与肝功能分级有显著相关关系,说明肠源性内毒素在大鼠肝硬化代偿向失代偿转化中起着重要作用.

关键词: 肠源性内毒素; Child-Pugh分级; 肝硬化; 四氯化碳

殷云勤, 韩德五, 王新国. 肝硬化大鼠门静脉内毒素水平与Child-Pugh分级之间的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1471-1474
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1471.asp

0 引言

急慢性肝病伴发肠源性内毒素血症(IETM)的事实已无可争辩, 其出现主要是由于肝脏Kupffer细胞功能减退, 使得从肠道来源的内毒素不能被有效地清除而溢出到体循环[1-2]. 研究表明, 体循环内毒素水平随着肝病病程的延长及病情的加重而增高[3-5]. 肝硬化动物腹腔或尾静脉给予显著低于致死量的内毒素即可诱使动物出现肝功能衰竭、肝性脑病、肝肾综合征或肝肺综合征[6-7]. 这些研究多是基于体循环内毒素血症的产生及其对机体的影响, 因为门静脉是肠道来源的内毒素进入肝脏的主要通道, 而这些肠源性内毒素首先要在肝脏进行代谢, 只有肝脏对内毒素的代谢减少、进入肝脏的内毒素过多以及门体侧支循环存在时, 才出现体循环的内毒素血症. 为了进一步明确肠道在肝硬化发生、发展中的作用, 故取门静脉血以观察内毒素水平与Child分级的关系.

■相关报道
以往报道多研究肝硬化时体循环内毒素与肝功能损害之间的关系, 因只有肝脏Kupffer细胞功能减退或存在门体侧支循环时, 才出现体循环内毒素血症, 故这些研究不利于深入理解肠道在肝硬化肝功能损害中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂Wistar大鼠由山西医科大学实验动物中心提供, 26只, 体质量220-260 g. 20只大鼠采用我室多年来建立的复合因素复制肝硬化模型[8], 另6只动物为正常对照, 同期普通饲料自由饮水饲养, 待10 wk时处理.

1.2 方法 分别于实验开始后的第6, 10周各取存活动物6只. 各时段动物处理前3 d先从眼眶静脉采血1.8 mL, 用1×10^9 mmol/L枸橼酸钠0.2 mL抗凝, 分离血清后在自动分析仪上进行凝血酶原时间检测, 检测试剂盒购自北京世第科学仪器公司. 同日于乙醚麻醉无菌条件下在头部安置螺丝电极, 用以描记脑电图. 脑电图按照正常(脑电频率8-9次/s, 电压100 μV)、中度异常(脑电频率5-7次/s, 电压150 μV)和重度异常(脑电频率4-5次/s, 电压310 μV)进行分级[9]. 处理当日禁食12 h, 清醒状态下描记脑电图后用30 g/L的戊巴比妥钠3 mL/kg麻醉, 无菌腹正中切口, 先观察腹水情况, 分为无、中量(2-5 mL)、大量(>5 mL)3个等级分别计分. 充分暴露门静脉, 然后从门静脉主干用无菌肝素抗凝注射器采集门静脉血4 mL, 分离血清后-70℃备检. 检测指标包括血内毒素、血总胆红素和血浆白蛋白水平. 按照各组动物凝血酶原时间、血清白蛋白水平、血清胆红素水平、腹水及脑病存在情况进行Child的综合评定(表1)[10-12]. 同时留取肝右叶组织, 中性甲醛固定, 常规VG染色, 显微镜下观察肝脏组织学变化情况.

表 1 肝硬化大鼠Child-Pugh分级评分表

项目	1	2	3
凝血酶原时间 (s)	≤14	15-17	≥18
白蛋白 (g/L)	>35	28-35	<28
胆红素 (μmol/L)	<34	34-51	>51
腹水	无	中量	大量
肝性脑病	无	中度	重度

根据5项的总分判断分级, A级5-6分, B级7-9分, C级10-15分.

统计学处理 计量资料的数据采用mean±SD表示, 计数资料用数字表示, 用SPSS 11.5软件进行统计分析. $P<0.05$视为统计学上有显著性差异.

2 结果

2.1 肝脏形态与Child-Pugh分级 10 wk模型组动物较6 wk时腹水发生率高, 且腹水量较多, 最多达15 mL. 肝脏表面结节亦更明显. VG染色显示正常动物无明显纤维间隔形成, 6 wk时有纤维间隔形成, 10 wk时已明显形成假小叶(图1A-C). 6 wk时(前6只动物)有2只动物处于A级, 4只处于B级; 10 wk时, 2只处于B级, 4只已进入C级. 说明在我们观察的时段, 6 wk左右大鼠肝功能多处于代偿与失代偿的交界阶段, 而10 wk左右多在失代偿阶段(表2). 经Spearman等级相关分析Child-Pugh分级指标与白蛋白之间$r = -0.695$, $P<0.05$, 有统计学差异. Child-Pugh分级

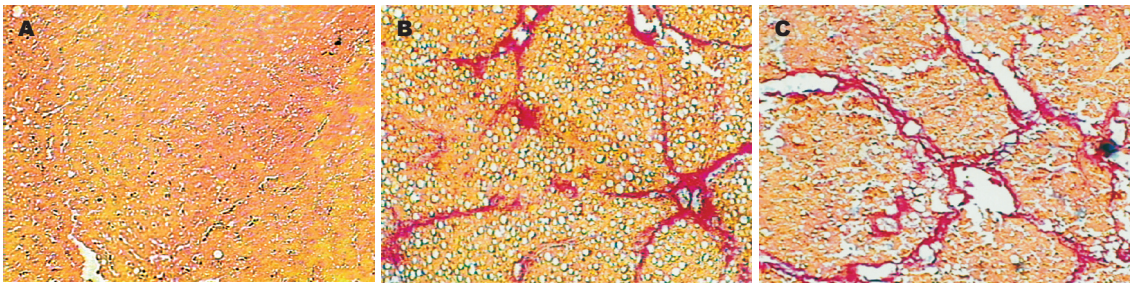


图 1 肝组织VG染色 (×100). A: 正常; B: 6 wk; C: 10 wk.

■创新盘点
由于门静脉高内毒素血症对肝脏会产生更直接的损害作用, 故本文将门静脉内毒素与肝功能Child分级两者联系起来, 试图找到两者的内在联系.

指标与凝血酶原时间之间r = 0.649, P<0.05, 有统计学意义. 但Child-Pugh分级与胆红素之间r = 0.111, P = 0.732, 统计学上无显著性差异(表2).

2.2 门静脉内毒素 经Spearman等级相关分析门静脉内毒素水平与不同时间(6 wk及10 wk) r = 0.624, P<0.01. 两两之间比较, 正常动物(925.1±527.7 mEU/L)与6 wk (1983.7±586.4 mEU/L)及10 wk (2600.7±343.8 mEU/L)时比较均有统计学差异, P<0.01. 6 wk与10 wk之间比较也有统计学差异(P<0.05). 门静脉内毒素与Child-Pugh分级之间r = 0.680, P<0.01. 虽然Child A级动物仅有2只, 但分级指标与不同时间(6 wk及10 wk) r = 0.738, P<0.01. 说明肝硬化的严重程度与门静脉内毒素水平、动物处理时间均有显著的相关性.

表 2 肝硬化大鼠Child-Pugh分级

No	凝血酶原时间(s)	白蛋白(g/L)	胆红素(μmol/L)	腹水	脑病	总分	分级
1	13.2	30.86	2.28	无	无	6	A
2	12.3	28.52	25.08	无	无	6	A
3	12.8	25.01	8.44	无	无	7	B
4	10.5	26.77	7.07	无	无	7	B
5	14.0	25.74	1.82	无	无	7	B
6	11.6	25.59	6.61	无	无	7	B
7	16.4	20.48	7.52	中度	无	9	B
8	27.6	29.40	2.74	中度	无	9	B
9	20.1	26.03	1.60	无	中度	10	C
10	21.0	11.41	8.44	中度	无	10	C
11	28.6	17.40	10.72	无	中度	10	C
12	17.6	12.72	13.00	重度	无	10	C

3 讨论

我们采用我室的CCl_4复合因素诱发大鼠肝硬化的模型, 其特点是分期较明确, 一般在4 wk左右形成较明显的肝纤维化, 6-8 wk形成代偿期肝硬化, 8-10 wk左右为失代偿期肝硬化阶段, 往往在诱因的作用下发生肝衰竭而死亡. 多数观测指标与人类肝硬化的情况相近, 成模率高. Child-Pugh分级结果表明, 6 wk时6只动物中肝功能处于A级的有2只, B级4只; 10 wk时, 6只动物中有2只为B级, 4只为C级. 从Child-Pugh分级与白蛋白、凝血酶原时间、胆红素的关系上看, 前两个指标与Child分级指标有显著的相关性(P<0.05). 说明肝脏的合成功能受损更加明显. 两个时段大鼠门静脉内毒素水平随着时间的延长而逐渐升高, 相关分析表明, 门静脉血内毒素水平与肝功能的Child-Pugh分级有显著的相关关系(P<0.01). 说明在肝硬化的发生、发展过程中, 门静脉内毒素血症起着重要作用[13]. 门静脉高内毒素血症产生的原因主要是肠黏膜屏障功能的减退同时存在肠道菌群的失调, 其结果是引起细菌易位[14-19]. 由于肝病病因的作用, 一方面影响肝细胞的功能, 包括合成、代谢和分泌功能, 另一方面使Kupffer细胞功能受损, 不能有效清除从门静脉进入肝脏的内毒素, 形成体循环肠源性内毒素血症. 这种体循环内毒素血症, 不仅通过激活肝脏Kupffer细胞使其释放大量细胞因子和炎症因子, 对肝脏形成“二次打击”, 加重肝脏的损害, 还可以损害其他器官, 如肺、肾、肠道[20-21]. 但此时体循环内毒素血症可不很明显[22-23]. 由于肠道的损害使得更多的肠源性内毒素进入肝脏, 加重肝脏的损害. 而随着肝脏Kupffer细胞长久的损害加之肝硬化形成后结构的改建, Kupffer细胞功能将衰退, 体循环内毒素血症必将加重, 此时外周单核巨噬系统的活性占有一定优势, 他们的激活可能在肝硬化肝功能衰竭的发病过程中起重要作用[24-28]. 我室先前的研究中使用小剂量的内毒素sc可短期内诱发肝硬化大鼠出现肝性脑病或肝肾综合征也说明在肝功能损害的基础上, 体循环内毒素在肝衰竭进程中的作用.

总之, CCl_4复合因素诱导的肝硬化大鼠高门静脉内毒素血症与肝功能Child-Pugh分级有显

■应用要点
肠源性内毒素血症是肝功能失代偿的重要促进因素, 进一步研究的重点是如何有效地控制肠源性内毒素血症的发生, 以改善肝硬化患者的预后.

著的相关关系, 而门静脉高内毒素血症的发生与肠黏膜屏障功能和细菌易位直接相关, 进一步说明肠道在肝硬化病程发生、发展中的重要作用, 由于我们选择的是肝硬化代偿到失代偿两个阶段所进行的研究, 故本结果也提示, 肠道来源的内毒素在大鼠的肝硬化代偿向失代偿转化中也起着重要作用. 也正是由于门静脉内毒素对肝脏的直接和间接的作用最终影响了肝病的结局.

4 参考文献

1 韩德五. 肠源性内毒素血症所致“继发性肝损伤”的临床依据. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1055-1058

2 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-965

3 Wang L, Ren CS. Progress of endotoxin and chronic liver diseas. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 251-253

4 赵龙凤, 李红, 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1145-1149

5 林敏西. 肝病与肠源性内毒素血症防治. 中国感染控制杂志 2003; 2: 74-77

6 李夏青, 韩德五. 内毒素诱发肝硬化大鼠发生肝性脑病的实验研究. 中国病理生理杂志 1999; 15: 151-153

7 Zhang HY, Han DW, Wang XG, Zhao YC, Zhou X, Zhao HZ. Experimental study on the role of endotoxin in the development of hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 567-572

8 韩德五, 马学惠, 赵元昌. 肝硬化动物模型的研究. 山西医药杂志 1979; 4: 1-5

9 Oppong KN, Bartlett K, Record CO, al Mardini H. Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology* 1995; 22: 553-558

10 Li Q, Wang BE, Jia JD. The evolution and characteristics of liver function classification: from Child to MELD. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 319-320

11 Christensen E. Prognostic models including the Child-Pugh, MELD and Mayo risk scores-where are we and where should we go? *J Hepatol* 2004; 41: 344-350

12 Huo TI, Wu JC, Lin HC, Lee FY, Hou MC, Lee PC, Chang FY, Lee SD. Evaluation of the increase in model for end-stage liver disease (DeltaMELD) score over time as a prognostic predictor in patients with advanced cirrhosis: risk factor analysis and comparison with initial MELD and Child-Turcotte-Pugh score. *J Hepatol* 2005; 42: 826-832

13 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病: 肝衰竭的IETM学说. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 2004: 9-24

14 Navasa M, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 277-280

15 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 422-433

16 Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 32-37

17 Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1538-1544

18 Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 27-31

19 Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, Gutierrez A, Carnices F, Palazon JM, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1482-1486

20 Lin RS, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hsu WC, Huang CC, Wang SS, Lo KJ. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1995; 22: 165-172

21 Gong JP, Wu CX, Liu CA, Li SW, Shi YJ, Yang K, Li Y, Li XH. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 923-927

22 Yano H, Kinoshita S, Kira S. Effects of acute moderate exercise on the phagocytosis of Kupffer cells in rats. *Acta Physiol Scand* 2004; 182: 151-160

23 Luckey SW, Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2001; 71: 226-240

24 Lough J, Rosenthall L, Arzoumanian A, Goresky CA. Kupffer cell depletion associated with capillarization of liver sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *J Hepatol* 1987; 5: 190-198

25 Arii S, Monden K, Itai S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H, Tobe T. Depressed function of Kupffer cells in rats with CCl4-induced liver cirrhosis. *Res Exp Med (Berl)* 1990; 190: 173-182

26 Maianskii DN, Shvarts IaSh, Tsyrendorzhiev DD, Kutina SN. Functional restructurings of the mononuclear phagocyte system in experimental liver cirrhosis. *Biull Eksp Biol Med* 1988; 105: 214-216

27 Mayanski DN, Schwartz YS, Kutina SN, Zubakhin AA, Mayanskaya NN, Tsyrendorjiev DD. Mononuclear phagocyte system responsiveness in CCl4-induced liver cirrhosis. *Int J Exp Pathol* 1993; 74: 229-236

28 Nakatani Y, Fukui H, Kitano H, Nagamoto I, Tsujimoto T, Kuriyama S, Kikuchi E, Hoppou K, Tsujii T. Endotoxin clearance and its relation to hepatic and renal disturbances in rats with liver cirrhosis. *Liver* 2001; 21: 64-70

■名词解释

1 肠源性内毒素血症: 在严重创伤、烧伤、应激、休克、肠缺血、肝病时都可发生体循环内毒素血症, 由于这些内毒素来自肠道, 与肠黏膜屏障功能减退和Kupffer细胞吞噬清除功能障碍有关, 故称为肠源性内毒素血症.

2 Child-Pugh分级: 最初用来评价肝硬化门体分流手术前的肝功能状况, 目前也常用于一般肝硬化患者的临床评价, 是最常用的肝功能分级指标之一.

■同行评价

本文探讨了肝硬化大鼠门静脉内毒素水平与Child-Pugh分级之间的关系, 有一定的创新性和借鉴价值.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1475-1480
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

MTHFR C677T基因多态性与新疆哈族和汉族食管癌易感性的关系

张金芳, 庞丽娟, 赵 瑾, 陈湘川, 顾立怡, 葛春鸣, 项 阳, 李洪安, 蒋金芳, 梁伟华, 赵 娟, 张丽翠, 杨 磊, 李 锋

张金芳, 庞丽娟, 赵瑾, 陈湘川, 李洪安, 蒋金芳, 梁伟华, 赵娟, 张丽翠, 杨磊, 李锋, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院病理教研室 新疆维吾尔族自治区石河子市 832002
顾立怡, 葛春鸣, 项阳, 新疆伊犁州友谊医院、新华医院、农四师医院病理科 新疆维吾尔族自治区 835100
张金芳, 2003级石河子大学硕士生, 主要从事肿瘤分子病理的研究.
科技部重大基础研究前期研究专项, No. 2005CCA03700
教育部科学技术研究重点项目, No. 206167
2004年度石河子大学技术研究发展计划-重点项目, No. ZRKX2004-Z10
通讯作者: 李锋, 832002, 新疆维吾尔族自治区, 石河子大学医学院病理教研室. lifeng7855@yahoo.com.cn
电话: 0993-2057125 传真: 0993-2057136
收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-03-24

Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with susceptibility to esophageal cancer in Kazakh and Han populations in Xinjiang Uygur Autonomous Region

Jin-Fang Zhang, Li-Juan Pang, Jin Zhao, Xiang-Chuan Chen, Li-Yi Gu, Chun-Ming Ge, Yang Xiang, Hong-An Li, Jin-Fang Jiang, Wei-Hua Liang, Juan Zhao, Li-Cui Zhang, Lei Yang, Feng Li

Jin-Fang Zhang, Li-Juan Pang, Jin Zhao, Xiang-Chuan Chen, Hong-An Li, Jin-Fang Jiang, Wei-Hua Liang, Juan Zhao, Li-Cui Zhang, Lei Yang, Feng Li, Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Li-Yi Gu, Chun-Ming Ge, Yang Xiang, Youyi Hospital; Xinhua Hospital; Nongsishi Hospital, Yili 835100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by the Special Foundation for Major Basic Research Program of the Ministry of Science and Technology, No. 2005CCA03700; the Scientific and Technological Research Key Program of Ministry of Education, No. 206167; and the Technology Research and Development Project of Shihezi University during 2004 period, No. ZRKX2004-Z10
Correspondence to: Dr. Feng Li, Department of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lifeng7855@yahoo.com.cn
Received: 2006-03-08 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To investigate the gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and its association with susceptibility to esophageal cancer (EC) in Kazakh and Han populations in Xinjiang Uygur Autonomous Region.

METHODS: The MTHFR C677T genotypes were detected by a polymerase chain reaction (PCR)-based restriction restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay in 179 patients with EC (Kazakh 94, Han 84) and 155 population cancer-free controls (Kazakh 98, Han 57) in Xinjiang of China.

RESULTS: The frequencies of CC, CT and TT in MTHFR C677T were 56.4%, 36.2% and 7.4% in Kazakh patients with EC, respectively, which were significantly different from those in Han patients with EC (32.9%, 40.0% and 27.1%) (χ^2 = 15.37, P < 0.05). The frequencies of CC, CT and TT were 58.2%, 29.6% and 12.2% in Kazakh controls and 22.8%, 52.6% and 24.6% in Han controls, respectively, and there were also significant differences between them (χ^2 = 18.26, P < 0.05). The distribution of C677T genotypes was not markedly different between Kazakh EC patients (CC 56.4%, CT 36.2% and TT 7.4%) and controls (CC 22.8%, CT 52.6% and TT 24.6%) (χ^2 =1.776, P > 0.412), and there was no statistical differences between Han EC patients and controls (χ^2 = 2.750, P = 0.253), either.

CONCLUSION: The polymorphisms of MTHFR C677T are different between Kazakh and Han EC patients as well as normal individuals in Xinjiang. The polymorphisms of MTHFR C677T are not correlated with the susceptibility to EC in Kazakh and Han populations.

Key Words: Methylenetetrahydrofolate reductase; Gene polymorphism; Esophageal cancer; Kazakh; Han

Zhang JF, Pang LJ, Zhao J, Chen XC, Gu LY, Ge CM, Xiang Y, Li HA, Jiang JF, Liang WH, Zhao J, Zhang LC, Yang L, Li F. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with susceptibility to

■背景资料
以游牧为生涯的新疆哈族人食管癌的发生有着明显的地域和民族特异性. 近年来, 遗传因素与食管癌的关系受到关注, 某些基因的多态性与食管癌的发病有关. 国内外有关遗传背景和肿瘤遗传易感基因在新疆哈萨克族食管癌中的研究较少.

■相关报道
一些研究已报道, MTHFR C677T基因多态性与汉族食管癌的发生有关, 认为MTHFR 677T基因型是食管癌的一个危险因素, 可显著增加食管癌的发病风险.

esophageal cancer in Kazakh and Han populations in Xinjiang Uygur Autonomous Region. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1475-1480

摘要

目的: 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因C677T多态性与新疆哈族、汉族食管癌易感性的关系.

方法: 用PCR-RFLP方法检测食管癌患者178例(哈萨克族94例, 汉族84例)和同一地区无肿瘤病史的正常对照者155例(哈萨克族98例, 汉族57例)的MTHFR基因C677T基因型分布.

结果: 新疆哈族食管癌组中MTHFR C677T 3种基因型CC, CT, TT, 所占比例分别是56.4%, 36.2%, 7.4%, 与新疆汉族食管癌组中的32.9%, 40.0%, 27.1%相比, 存在显著差异(χ^2 = 15.37, P<0.05); 哈族正常对照组分别为58.2%, 29.6%, 12.2%与汉族正常对照组22.8%, 52.6%, 24.6%相比, 有显著差异(χ^2 = 18.26, P<0.05). MTHFR 3种基因型在哈族食管癌组中的分布(CC 56.4%, CT 36.2% and TT 7.4%)与对照组中(CC 22.8%, CT 52.6% and TT 24.6%)相比, 无显著差异(χ^2 = 1.776, P = 0.412). 在汉族食管癌组与对照组间也无显著差异(χ^2 = 2.750, P = 0.253).

结论: MTHFR C677T基因多态性分布在新疆哈族、汉族正常对照组间存在民族差异, 在食管癌间也存在差异. MTHFR C677T基因多态性可能与新疆哈萨克族与汉族食管癌的易感性无关.

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶; 基因多态性; 食管癌; 哈萨克族; 汉族

张金芳, 庞丽娟, 赵瑾, 陈湘川, 顾立怡, 葛春鸣, 项阳, 李洪安, 蒋金芳, 梁伟华, 赵娟, 张丽翠, 杨磊, 李锋. MTHFR C677T基因多态性与新疆哈族和汉族食管癌易感性的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1475-1480
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1475.asp

0 引言

食管癌是人类最常见的十大恶性肿瘤之一, 我国每年约有25万新诊断的食管癌病例, 占全世界食管癌病例数的一半. 新疆北部哈萨克族(哈族)聚集区是我国食管癌高发区之一, 其调整死亡率达68.88/10万, 是其他民族调整死亡率(5.13/10万)的10倍之多[1-2]. 哈萨克族食管癌的死亡率居哈萨克族恶性肿瘤死亡的首位[3]. 以游牧为生涯的哈族有特殊的饮食习惯, 以面、腌肉类、自制奶制品为主食, 较少摄入新鲜蔬菜水果[4]. 流行病学研究表明, 我国北方食管癌高发与蔬菜水果摄入量低相关[1], 新鲜蔬菜水果是叶酸的主要来源, 叶酸缺乏引起DNA低甲基化, DNA低甲基化与许多肿瘤的发生有关[5-8]. 亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢的关键酶之一, 在机体代谢的DNA甲基化、合成和修复中起重要作用. MTHFR C677T多态性影响了MTHFR的活性, 有研究报道, MTHFR C677T多态性与一些肿瘤(包括食管癌)的发生有关[9-12]. 新疆哈萨克族食管癌的发生与MTHFR C677T多态性的关系未见报道, 因此, 我们采用PCR-RFLP方法检测、分析了新疆哈族和汉族食管中MTHFR C677T的分布.

1 材料和方法

1.1 材料 新疆石河子大学医学院第一附属医院、新疆伊犁州友谊医院、新华医院、农四师医院病理科1980-2004病理诊断为食管癌石蜡包埋组织178例(哈族94例, 汉族84例), 病理诊断及分化程度均核实正确, 所有标本用40 g/L福尔马林固定、石蜡包埋后保存, 同时在当地收集相同年龄组无肿瘤史的一般人群血样155例(哈萨克族98例, 汉族57例)作为对照, 对照组人群抽肘静脉血、肝素钠抗凝、液氮保存.

1.2 方法 每例组织5 μm 10张入2.0 mL消毒的EP管中, 经脱蜡水化后, 加细胞裂解液(0.02 mmol/L Tris HCl, 0.02 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS), 蛋白酶K(终浓度0.3 g/L)55℃水浴振荡过夜. 待组织完全裂解后依次加入等体积的Tris饱和酚(pH 8.0), 酚/氯仿为1∶1, 氯仿/异戊醇为24∶1, 各抽提1次, 无水乙醇沉淀DNA, 干燥, 加入50-80 μL TE (pH 8.0)溶解DNA沉淀12-24 h, 测定所提取DNA的A_{260}、A_{280}, 并计算A_{260}/A_{280}以确定DNA的质量和纯度, 提取的DNA置于-20℃冰箱保存备用. 血样DNA的提取采用上海生工的小剂量DNA抽提试剂盒提取基因组DNA. 特异扩增MTHFR基因多态性引物参照文献[13], 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 扩增的目的片段长度为173 bp. 限制性核酸内切酶*Hin*fⅠ购自上海生工生物工程有限公司. 限制性核酸内切酶*Hin*fⅠ特异识别GAGTC酶切位点, 当677位点C→T颠换后, 会产生一个*Hin*fⅠ酶切位点. PCR反应体系为25 μL, 10×

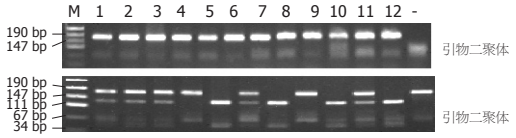


图 1 MTHFR C677T多态位点的PCR及酶切的电泳. M: DNA分子质量标准; 1, 4, 5: 阳性对照; 2, 3, 6, 10: C/T型; 4, 8, 12: C/C型; 7, 9, 11: T/T型; −: 空白对照.

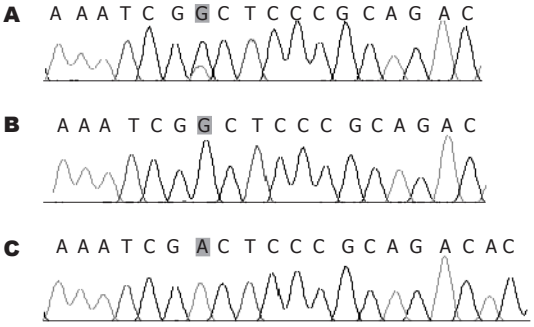


图 2 MTHFR C677T不同基因型测序. A: MTHFR C677T测序; B: MTHFR C677C测序; C: MTHFR T677T测序.

Buffer 2.5 μL, 引物终浓度0.2 μmol/L, Taq DNA聚合酶1 U, 模板2 μL(约20 ng DNA)及高压双蒸水. 扩增条件为: 95℃预变性5 min, 然后进行35个循环(每个循环包括: 94℃ 1 min, 60.5℃ 1 min, 72℃ 1 min), 最后72℃延伸8 min. 选用PCR扩增产物测序确定是MTHFR 677位基因阳性的食管癌标本作为阳性对照, 以高压双蒸水代替DNA模板作为空白对照. PCR产物由上海基康生物技术公司纯化并测序. 每个酶切体系的体积为20 μL, 包含PCR扩增产物10 μL, 酶切Buffer 2.0 μL, 限制性核酸内切酶*Hin*fⅠ 5 U, 补高压双蒸水至20 μL. 上述反应体系置于37℃水浴5-8 h酶切消化, 取酶切产物5 μL, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像图像分析仪观察结果, 杂合型MTHFR C677T在电泳图上产生173, 125, 48 bp的3条片段, 纯合型MTHFR T677T产生125, 48 bp的2条片段, 而野生纯合型MTHFR C677C没有酶切位点, 只产生173 bp的1条片段. 选取部分MTHFR C677T PCR产物送至上海基康生物技术有限公司进行纯化并测序, 结果经BLAST基因服务站进行同源性分析, 进一步验证我们扩增目的片段酶切后的分型是否正确.

统计学处理 采用SPSS 12.0统计软件对相关数据行χ^2检验.

2 结果

2.1 研究对象的性别、**年龄分布资料(表1)** 哈族与汉族的食管癌组与对照组间性别分布均无统计学差异, 而年龄分布均存在统计学差异(P<0.05), 但本实验所测的基因型分布与年龄无相关性(哈族r = -0.081, P = 0.261; 汉族r = 0.059, P = 0.487).

表 1 研究对象的性别、年龄分布

	哈族		汉族	
	食管癌	对照	食管癌	对照
n	94	98	84	57
性别(男：女)	53：41	56：42	43：41	22：35
平均年龄(岁)	55 ± 9.64	50 ± 12.86	61 ± 7.23	46 ± 11.12
年龄范围(岁)	26–79[a]	17–77	42–84[a]	25–72

[a]P<0.05 *vs* 对照.

表 2 正常对照和食管癌中MTHFR C677T基因型的分布 n (%)

	民族	n	C/C	C/T	T/T
食管癌	哈族	94	53 (56.4)	34 (36.2)	7 (7.4)
	汉族[a]	84	28 (32.9)	34 (40.0)	23 (27.1)
对照组	哈族	98	57 (58.2)	29 (29.6)	12 (12.2)
	汉族[a]	57	13 (22.8)	30 (52.6)	14 (24.6)

[a]P<0.05 *vs* 哈族.

2.2 MTHFR C677T基因型的分布 MTHFR基因扩增、酶切后电泳, 根据出现的条带判断基因型, 产生173, 125和48 bp 3条片段的是杂合型MTHFR C677T, 产生125和48 bp 2条片段的是纯合型MTHFR T677T, 只产生173 bp 1条片段的是野生纯合型MTHFR C677C(图1). MTHFR基因3种基因型PCR扩增产物测序结果判定, 根据测序图上多态位点上的峰来判断基因型, 单峰为纯合基因型, 双峰为杂合基因型(图2). 我们的测序结果与GenBank中公布的人类MTHFR基因(序列号: AY338232.1) 同源性高达100%.

MTHFR C677T 3种基因型C/C, C/T, T/T的分布(表2), 在哈族和汉族食管癌中3种基因型的分布存在显著差异(χ^2 = 15.387, P<0.05). 哈萨克族食管癌中C/C基因型显著高于汉族食管癌及其**他2型, 汉族食管癌中T/T基因型显著高于**哈萨克族食管癌. 在新疆哈族与汉族正常对照组中3种基因型的分布也有显著差异(χ^2 = 18.26, P<0.05). 哈萨克族以C/C基因型为主, 汉族以C/T基因型为主, 汉族人群中T/T基因型的分布显著高于哈族. 在两民族内部的食管癌组与正常对照组间, MTHFR C677T基因型的分布均无显著

■创新盘点
本研究以新疆哈萨克族、汉族食管癌为研究对象, 未发现MTHFR C677T基因多态性与新疆哈族、汉族食管癌的发生有关.

■应用要点
本研究为进一步研究新疆哈萨克族食管癌的遗传背景和肿瘤遗传易感基因及其作用机制奠定基础.

差异(哈族χ^2 = 1.776, P = 0.412; 汉族χ^2 = 2.750, P = 0.253).

2.3 MTHFR C677T基因型与食管癌病理分级及转移的关系 将178例食管癌, 按病理诊断标准分为高分化、中分化和低分化, 并与MTHFR C677T多态性进行比较, 在新疆汉族、哈族食管癌中, 不同病理分级与MTHFR C677T基因型的分布均无显著性差异(哈族χ^2 = 1.711, P>0.05, 汉族χ^2 = 1.880, P>0.05). 在MTHFR C677T不同基因型分布与有无淋巴结转移的比较中, 也未发现有显著性差异(汉族χ^2 = 1.88, P = 0.391, 哈萨克族χ^2 = 1.742, P = 0.418).

3 讨论

亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是调节叶酸和甲硫氨酸代谢的限速酶, 可催化5, 10-亚甲基四氢叶酸还原为5-甲基四氢叶酸, 后者作为叶酸在血浆和组织中存在的主要形式, 参与同型半胱氨酸转化为S-腺苷甲硫氨酸的过程, 而S-腺苷甲硫氨酸可作为甲基供体, 在机体代谢的DNA甲基化和核酸合成过程中起重要作用[14]. MTHFR C677T多态性, 影响酶的活性, TT纯合基因型的酶活性仅为CC野生型的30%, CT杂合基因型的酶活性仅为CC野生型的60%[15], 变异型MTHFR (C677T和T677T)活性的下降导致5-甲基四氢叶酸的合成不足, 无法有效启动S-腺苷甲硫氨酸的生成, 从而不能保证机体基因组正常的甲基化状态, 由于不能提供足够的甲基供体, 基因组DNA将随之出现低甲基化, 基因组的去甲基化及某些特定基因的低甲基化状态, 如原癌基因及p53基因等, 已被多个试验证实是促进肿瘤发生的危险因素[16-18].

我国学者Song *et al*[9]对北京地区的240例食管癌患者和360例正常对照进行MTHFR C677T的检测, 发现T677T基因频率显著高于对照组, 发生食管癌的风险比C677C型高6.18倍; 认为MTHFR T677T基因型可能是食管癌的一个易感因素; 与河南安阳地区Wang *et al*[19]的报道结果相同, Wang *et al*认为T677T在食管癌的发生中是一个危险因素. 而Zhang *et al*[20]在研究河北地区与德国高加索人的食管癌与正常对照中MTHFR C677T基因型的分布, 发现德国高加索人食管癌的发生与MTHFR C677T基因多态性无关, 河北地区T677T基因型在食管癌与对照组间无差异, C677C基因型对食管癌的发生是一个保护因素. 本结果显示, 在新疆哈族食管癌组中T677T基因型高于对照组, 新疆汉族食管癌C677C基因型略高于对照组, 但均无统计学差异. 而我们发现, 在新疆汉族、哈族食管癌间MTHFR C677T基因型的分布有显著差异, 在新疆哈族、汉族正常对照组间也存在显著差异. 新疆哈族食管癌T677T (7.4%)基因型显著低于新疆汉族食管癌(27.1%), 与Zhang *et al*[20]研究的德国高加索人食管癌中T677T的频率(12.9%)也不同. 新疆汉族食管癌中T677T基因型的频率与各地区也有差异[21-23](河南37%-43%, 北京38.8%, 石家庄42.3%, 江苏淮安16.1%, 日本12.1%). 新疆汉族、哈族正常人群中MTHFR C677T基因型的分布存在显著差异, 新疆汉族T677T基因型(24.6%)显著高于哈族(12.2%). 哈族正常人群的T677T基因型与以前报道[24-26]的研究结果相比, 显著高于布依族(0.9%)、巴基斯坦人(7.4%), 低于苗族(28%)和美国Hispanic人(20.7%), 他们的MTHFR C677T多态性, 除美国Hispanic人以杂合型为主外, 其余均以野生纯合型为主, 而新疆汉族以杂合型为主; 新疆汉族正常人群中MTHFR T677T基因型的分布与河南31%的接近, 与其他地区的也有差异, 河北地区44%, 日本16.2%, 北京17.2%[27-29]. 这些结果与MTHFR C677T基因多态性的分布存在种族地域的差异一致. 我们发现, 在新疆哈族人群中MTHFR T677T等位基因远低于新疆汉族人群中的分布, 但哈萨克族患食管癌的机率远高于新疆汉族人, 这反映出肿瘤发生的复杂性. 我们还发现一个有趣的事, 在汉族正常人群中C/C基因型低于食管癌组, 虽然没有统计学意义, 但存在这样的趋势, 这与张健慧 *et al*[30]的发现相反, 尚需扩大样本进行研究. 同时本研究对MTHFR C677T基因多态性与食管癌病理分级、有无淋巴结转移做了分析, 未发现有统计学意义, 可能MTHFR C677T基因多态性与食管癌的恶性程度无关.

本研究结果表明, MTHFR C677T基因多态性与新疆哈族、汉族食管癌的发生及恶性程度可能无关, 确切的结果还需进一步扩大样本, 收集流行病学相关资料进行分层分析. 下一步的工作是扩大样本量的同时收集流行病学相关资料, 结合与叶酸代谢相关的其他基因, 如蛋氨酸合酶(MS)、蛋氨酸合酶还原酶(MTRR)及胸腺嘧啶核苷酸合酶(TS)等的关系, 同时分析他们与环境的交互作用, 进一步分析MTHFR C677T基因多态性与新疆食管癌的关系. 因为疾病的发生是多种危险因素共同作用的结果, 只有全面

深入了解各种因素作用的方式及效应, 才有可能阐明发病机制.

4 参考文献

1 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究. 中华流行病学杂志 2003; 24: 939-943

2 张月明. 新疆食管癌分布. 新疆医学院学报 1998; 11: 139-144

3 阿依恒・曲库尔汉, 夏依木拉提・夏依马尔旦. 新疆哈萨克族904例恶性肿瘤流行病学分析. 肿瘤 2003; 23: 11-13

4 木沙白, 任佰华. 我团哈族食管癌流行病学调查. 中华临床医药 2002; 3: 34

5 陆娟, 房静远. 叶酸、DNA甲基化与消化系统肿瘤. 胃肠病学 2002; 7: 111-123

6 Graziano F, Kawakami K, Ruzzo A, Watanabe G, Santini D, Pizzagalli F, Bisonni R, Mari D, Floriani I, Catalano V, Silva R, Tonini G, Torri V, Giustini L, Magnani M. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T gene polymorphism, gastric cancer susceptibility and genomic DNA hypomethylation in an at-risk Italian population. *Int J Cancer* 2006; 118: 628-632

7 Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002; 132: 2382S-2387S

8 Shrubsole MJ, Jin F, Dai Q, Shu XO, Potter JD, Hebert JR, Gao YT, Zheng W. Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res* 2001; 61: 7136-7141

9 Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenet etrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001; 61: 3272-3275

10 Miao XP, Yang S, Tan W, Zhang XM, Ye YJ, Lin DX, Wang S. Association between genetic variations in methylenetetrahydrofolate reductase and risk of colorectal cancer in a Chinese population. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi* 2005; 39: 409-411

11 Zhang XM, Miao XP, Tan W, Qu SN, Sun T, Zhou YF, Lin DX. Association between genetic polymorphisms in methylentetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2005; 27: 700-703

12 Vairaktaris E, Yapijakis C, Kessler P, Vylliotis A, Ries J, Wiltfang J, Vassiliou S, Derka S, Neukam FW. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and minor increase of risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 219-222

13 Radha Rama Devi A, Govindaiah V, Ramakrishna G, Naushad SM. Prevalence of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in South Indian population. *Cur Sci* 2004; 86: 440-443

14 Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr Drug Metab* 2005; 6: 37-46

15 Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenete trahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-172

16 Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5606-5611

17 Woodson K, Mason J, Choi SW, Hartman T, Tangrea J, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Hypomethylation of p53 in peripheral blood DNA is associated with the development of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 69-74

18 Ehrlich M, Jiang G, Fiala E, Dome JS, Yu MC, Long TI, Youn B, Sohn OS, Widschwendter M, Tomlinson GE, Chintagumpala M, Champagne M, Parham D, Liang G, Malik K, Laird PW. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene* 2002; 21: 6694-6702

19 Wang LD, Guo RF, Fan ZM, He X, Gao SS, Guo HQ, Matsuo K, Yin LM, Li JL. Association of meth ylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase promoter polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal and cardia cancer in a Chinese high-risk population. *Dis Esophagus* 2005; 18: 177-184

20 Zhang J, Zotz RB, Li Y, Wang R, Kiel S, Schulz WA, Wen D, Chen Z, Zhang L, Wang S, Gabbert HE, Sarbia M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and predisposition towards esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 574-580

21 吴建中, 高长明, 丁建化, 刘燕婷, 臧宇, 李苏平, 胡旭, Takezaki Toshiro. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性与食管癌易感性的关系. 肿瘤 2002; 22: 268-270

22 Yang CX, Matsuo K, Ito H, Shinoda M, Hatooka S, Hirose K, Wakai K, Saito T, Suzuki T, Maeda T, Tajima K. Gene-environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1285-1290

23 Stolzenberg-Solomon RZ, Qiao YL, Abnet CC, Ratnasinghe DL, Dawsey SM, Dong ZW, Taylor PR, Mark SD. Esophageal and gastric cardia cancer risk and folate- and vitamin B(12)-related polymorphisms in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1222-1226

24 Xiao Y, Shan K, Li Y, Zhao Y, Qi X, Xie Y, Wu C, Ma J, Liu H, Xu Y, Guan Z, Ren X. 5, 10-methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in three nationalities of Guizhou in China. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2005; 22: 219-221

25 Kureshi N, Ghaffar S, Siddiqui S, Salahuddin I, Frossard PM. Head and neck cancer susceptibility: a genetic marker in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66: 241-245

26 Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahyd rofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1258-1260

27 Miao X, Xing D, Tan W, Qi J, Lu W, Lin D. Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1454-1458

28 Shen H, Xu Y, Zheng Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of 5,10-meth ylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control

■同行评价

本文对MTHFR C677T基因多态性与新疆哈族和汉族食管癌易感性的关系进行了探讨与研究, 提供了充足的有意义的信息, 具有科学性和可读性, 能反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

study. *Int J Cancer* 2001; 95: 332-336
29 Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, Kobayashi M, Ishihara J, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Yoshimura K, Yoshida T, Tsugane S. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer* 2005; 53: 42-50
30 张健慧, 李琰, 郭炜, 王瑞, M. SARBIA, S. KIEL, 温登瑰, 魏丽珍, 陈志峰, 何明, 邝钢, 张立玮, 吴明利, 王士杰. 利用LightCycler研究食管鳞状细胞癌与*MTHFR* C677T多态性的关系. 生物化学与生物物理进展 2003; 30: 555-559

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 •

第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知

本刊讯 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会于2006-09-15/18在浙江省杭州市举行. 本届会议由上海同仁医院和浙江省中医院联合主办, 中华放射学杂志、中华消化内镜杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同协办. 会议将邀请众多著名专家围绕消化疾病介入诊治新热点及消化道内支架治疗的热门技术和疑难问题进行专题演讲和实例操作, 并就消化道支架治疗中的疑难病例和出现问题以沙龙形式深入研讨. 参会代表可获国家级继续教育Ⅰ类学分12分.

1 会议主要议题

消化疾病诊治进展、消化内镜治疗新技术应用、化疗药物应用新进展、上消化道吻合口梗阻和瘘的综合治疗、胸腔胃穿瘘的支架封堵技术、肠道支架临床应用、肝门部胆道梗阻的内支架治疗、食管及胃肠道支架难点研讨以及其他介入新技术应用等.

2 征文内容

征集消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等方面的论著、文献综述、临床经验、个案报告等稿件. 欢迎消化、介入放射、肿瘤、普外胸外及、肝胆外科等相关学科医师投稿参会.

3 投稿要求

专题讲座由组委会约稿. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件一律要求电脑打印用E-mail投稿, 邮寄者需附WORD格式软盘(请自留稿底, 恕不退稿).

4 报名地址及要求

联系地址: 杭州市邮电路54号(浙江省中医院)吕宾 收, 邮编: 310006, 电话: 0571-87032028, 手机: 13906515409, E-mail: lvin@medmail.com.cn; 上海市愚园路786号(上海同仁医院)茅爱武 收, 邮编: 200050, 电话: 021-62524259-3397, 手机: 13371936559, E-mail: maoaw@sohu.com. 会议收费800元, 提前注册收费700元, 截稿日期: 2006-08-15.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1481-1486
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

高脂高糖、饮酒建立家兔脂肪肝模型及超声量化诊断

姚希贤, 南月敏, 王 莹, 李凤林, 郭瑞军

姚希贤, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
南月敏, 河北医科大学第三医院中西医结合肝病科 河北省石家庄市 050051
王莹, 李凤林, 河北医科大学第三医院病理科 河北省石家庄市 050051
郭瑞军, 河北医科大学第三医院超声科 河北省石家庄市 050051
姚希贤, 博士, 河北省消化病研究所所长, 中西医结合导师, 省管优秀专家, 享受国务院特殊津贴, 主要从事消化系疾病的研究.
河北省卫生厅计划项目, No. 02-123
通讯作者: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. ydm8080@126.com
电话: 0311-87222831
收稿日期: 2006-04-07 接受日期: 2006-04-13

Establishment of experimental hepatic steatosis model in rabbits and non-invasive quantitative ultrasonic diagnosis of fatty liver disease

Xi-Xian Yao, Yue-Min Nan, Ying Wang, Feng-Lin Li, Rui-Jun Guo

Xi-Xian Yao, Departmet of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Yue-Min Nan, Division of Liver Diseases, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China
Ying Wang, Feng-Lin Li, Department of Pathology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China
Rui-Jun Guo, Department of Ultrasonics, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China
Supported by the Foundation of Hebei Health Bureau, No. 02-123
Correspondence to: Xi-Xian Yao, Departmet of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. ydm8080@126.com
Received: 2006-04-07 Accepted: 2006-04-13

Abstract

AIM: To explore the non-invasive, quantitative ultrasonic diagnostic criteria of fatty liver diseases by establishing a rabbit model of hepatic steatosis and measuring ultrasonic integrated backscatter (IBS) and gray scale (GS).

METHODS: Forty healthy New Zealand rabbits were randomly divided into normal control and three experimental groups. Hepatic steatosis was induced by high fat and sugar diet plus drinking water containing five percent of ethanol. Seven patients with mild or severe hepatic steatosis were also recruited in the study. The steatosis, inflammation, and fibrosis of the rabbits' and patients' liver were evaluated by several histological staining methods including Sudan IV, H&E, and Masson's Trichrome staining. Hepatic steatosis was graded as simple steatosis, steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis. Liver IBS including average image intensity (AII) and peak-peak intensity, and GS were measured using HP Sonos 5500 image system. The data were analyzed with one-way ANOVA.

RESULTS: Hepatic AII was associated with the aggravated hepatic steatosis in near areas of the rabbit liver, i.e., normal control < mild fatty liver < moderate fatty liver < severe fatty liver ($P < 0.0001$). Significant differences were observed between AII of steatohepatitis and simple hepatic steatosis. In the patients, IBS was more accurate in the reflection the severity of the liver pathology than routine ultrosonic examination (85.7% *vs* 57.1%, $P < 0.05$), and significant differences of AII were observed between mild and severe hepatic steatosis ($P < 0.0001$, 0.001 or 0.05). The liver GS were markedly increased in the moderate and severe fatty liver as compared with that in normal control and mild fatty liver. Correlation analysis showed that GS and AII were consistently increased as the disease aggravated in the near area of the left and right liver lobes of the animals ($r_1 = 0.442\ 21$, $P_1 = 0.0012$; $r_2 = 0.335\ 73$, $P_2 = 0.0160$).

CONCLUSION: Rabbit fatty liver models can be developed in a short time by high fat and sugar diet plus alcohol. Hepatic IBS and GS intensity can reflect the grades of hepatic steatosis, inflammation and fibrosis, so they may serve as reliable non-invasive tools for the quantitative diagnosis of fatty liver disease.

Key Words: Fatty liver disease; Histopathology; Ultrasonography; Integrated backscatter; Gray scale;

■**背景资料**
脂肪肝患病率逐年上升, 发病年龄趋于年轻化, 且发病隐匿, 一旦发现, 多伴有炎症、坏死及纤维化. 目前临床沿用超声检查为主的影像学诊断方法, 缺乏量化诊断标准及病理对照研究, 往往对同一患者诊断不一.

■研发前沿
对脂肪肝无创性量化诊断渐渐成为国内外研究热点，但目前仍缺乏适于临床器械和设备检查并模拟人类饮食联合两种以上因素致病的较大动物脂肪肝模型，且缺乏具有病理基础的无创性量化诊断对照研究.

■相关报道
正常肝左叶AII高于肝右叶，同侧肝叶不同部位AII无显著差异，脂肪肝AII高于正常肝88.5%. 通过对正常肝组织、脂肪肝、肝硬化等标本测量发现衰减系数和散射程度与脂肪含量正相关.

Rabbits

Yao XX, Nan YM, Wang Y, Li FL, Guo RJ. Establishment of experimental hepatic steatosis model in rabbits and non-invasive quantitative ultrasonic diagnosis of fatty liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1481-1486

摘要

目的：模拟人类不良饮食结构建立家兔不同程度脂肪肝模型，进行肝脏背向散射积分(integrated backscatter, IBS)和图像灰阶平均强度(gray scale, GS)测定，并结合临床研究，探讨具有病理基础的脂肪肝无创性超声量化诊断标准.

方法：选用纯种新西兰家兔40只，采用高脂高糖饲料及乙醇饮料建立不同程度脂肪肝模型三组(每组n = 10)，设立对照组(n = 10)；临床病例同步进行肝组织病理学及超声检测. 病理组织学检测采用苏丹Ⅳ，HE和Masson三色染色；应用HP Sonos 5500超声诊断仪实时检测肝脏IBS，包括图像平均强度(average image intensity, AII)、峰-峰强度及图像强度标准差；采用Photo shop 7.0直方图分析超声图像GS. 所得数据采用SAS8.2进行统计学分析.

结果：肝脏AII随脂肪变加重呈递增趋势，正常肝<轻度脂肪肝<中度脂肪肝<重度脂肪肝，尤以近区各组间差异显著(P<0.0001)；同等程度肝脂肪变AII随炎症的发生而增大. 临床研究显示，IBS对脂肪肝诊断率及与病理组织学符合率(85.7%)较常规超声检测(57.1%)明显增高，重度脂肪肝AII显著高于轻度脂肪肝(P<0.0001, 0.001或0.05). 肝脏GS与AII相关，于肝左、右叶近区二者随病变加重呈一致性增高趋势(r_1 = 0.442 21, P_1 = 0.0012; r_2 = 0.335 73, P_2 = 0.0160). 中重度脂肪肝伴炎症GS显著高于正常肝及轻度脂肪肝(P<0.05).

结论：高营养及乙醇联合喂养家兔可快速建立不同程度脂肪性肝病模型；肝脏超声IBS及GS强度可反映肝脂肪变、炎症和纤维化的病变程度，为脂肪肝无创性量化诊断提供可靠依据.

关键词: 脂肪性肝病; 组织病理学; 超声检查; 背向散射积分; 灰阶强度; 家兔

姚希贤，南月敏，王莹，李凤林，郭瑞军. 高脂高糖、饮酒建立家兔脂肪肝模型及超声量化诊断. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1481-1486
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1481.asp

0 引言

脂肪肝患病率呈逐年上升趋势，发病年龄趋于年轻化，而其发病隐匿，一旦发现，往往伴有不同程度的炎症、坏死及纤维化[1-6]. 如果早期诊治，可阻止病情进展，甚至使其逆转. 当前临床沿用超声检查为主的影像学诊断方法，主要依据灰阶级别肉眼判断有无病变及病变程度，缺乏统一的量化诊断标准，更乏具有病理基础的对照研究，因而，对同一脂肪肝患者的诊断(有无脂肪肝与程度)不一. 为此，我们首先对35只正常家兔肝脏进行了二维超声图像平均灰阶强度(gray scale, GS)直方图分析和实时背向散射积分(integrated backscatter, IBS)检测，表明本法可较准确的反映肝组织结构的变化[7]，进一步模拟目前人类不良饮食方式(高营养+乙醇)建立不同程度脂肪肝模型，进行肝脏超声图像GS和IBS测定，以探讨有病理基础的脂肪肝无创性超声量化诊断指标.

1 材料和方法

1.1 材料 选用纯种新西兰家兔40只，河北医科大学动物实验研究中心提供，雌雄各半，体质量1.5-2.5(平均2.2±0.3) kg. 实验家兔正常喂养1 wk随机分成对照组(普通饲料及水喂养6 wk)和实验1，2，3组[高脂高糖饲料(普通饲料加20 g/kg胆固醇、50 g/kg蔗糖、100 g/kg猪油)及50 mL/L酒精饮料分别喂养3, 4, 5和6 wk]. 于实验动物造模结束、完成超声检测后，采用氯胺酮(12 mg/kg)臀部im，动物麻醉后开腹取出肝脏，分别留取左、右肝叶冰冻切片和100 g/kg甲醛固定标本；实验2, 3组分别于3-5 wk同步进行超声检测及肝穿刺病理组织学检查. 另选择肝胆外科因肝脏良性肿瘤或胆结石手术治疗的患者7例，男2例，女5例，年龄50-80(平均57.2±6.3)岁. 其中胆囊结石5例，肝血管瘤2例. 手术前后进行常规超声及IBS检测，手术中采取肝组织标本.

1.2 方法 冰冻切片进行苏丹Ⅳ脂肪染色，100 g/kg甲醛固定标本切片进行HE和Masson三色染色. 根据低倍显微镜下肝细胞脂变面积将脂肪肝分为轻度(1/3-1/2)、中度(1/2-2/3)和重度(2/3以上)；根据肝小叶及/或汇管区炎症和纤维化的有无分为单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎. 各组实验动物于空腹8-12 h、胸腹部脱毛后，取仰卧位，采用HP Sonos 5500超声诊断仪(美国惠普公司，配备IBS图像采集和声学定量分析软件)进

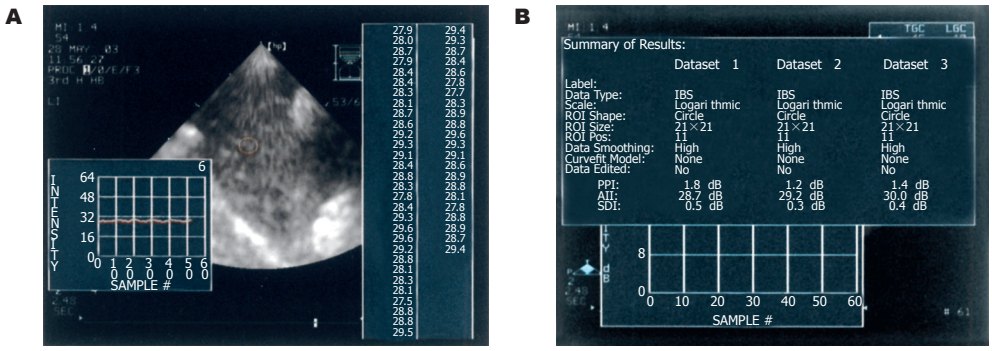


图 1 中度脂肪肝IBS测量中家兔脂肪肝超声图像.

表 1 脂肪肝家兔肝脏AII分析 (mean ± SD, dB)

分组	*n*	肝左叶近区	肝左叶中区	肝左叶远区	肝右叶近区	肝右叶中区	肝右叶远区
对照组	9	25.6 ± 3.4	25.4 ± 2.8	26.5 ± 2.9	23.9 ± 2.5	24.7 ± 2.6	24.3 ± 2.7
轻度脂肪肝	13	27.1 ± 1.8	26.0 ± 2.4	24.2 ± 1.6	26.1 ± 1.8	24.1 ± 2.8	22.5 ± 2.0
中度脂肪肝	20	30.0 ± 3.1	27.2 ± 2.3[a]	24.8 ± 2.4	27.6 ± 2.7	24.6 ± 3.2	23.5 ± 3.2
重度脂肪肝	10	33.1 ± 1.8	30.4 ± 2.7[a]	28.1 ± 1.3[a]	30.4 ± 2.4	25.7 ± 1.6[c]	24.2 ± 1.9[c]

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组和轻度脂肪肝组; [c]$P<0.05$ *vs* 轻度脂肪肝组.

行肝脏超声检测, 首先观察肝左叶、右叶及尾叶, 在图像显示最佳时, 左、右肝分别选取胃旁并显示腹主动的断面和肝肾断面, 采取超声图像, 采用Photo shop 7.0图像分析系统, 图像灰度等级0-255, 21×21圆形像素取样框, 于距左、右肝表面1.5-2 cm, 2.5-3 cm, 3.5-4 cm取感兴趣区, 各测量3次, 取平均值进行半定量分析; 同步进行实时IBS测定: 调出AD-IBS状态, 探头频率2-4 mHz, 侧向增益补偿曲线设置前后一致, 调整时间增益补偿(TGC)曲线得到良好的IBS图像, 取样方法同GS分析, 描记IBS曲线并记录所测得图像平均强度(average image intensity, AII)(图1).

临床研究: 于手术前、后7-10 d, 空腹8 h后进行肝脏超声检测, 分别于肝左、右叶近、远声场取感兴趣区, 测定方法同动物实验. 为缩小因TGC调整对图像的影响, 采用TGC对所测得的IBS值进行标化. 将实验采用的所有TGC值合计并计算均值, 标化IBS = 实测IBS×TGC均值/自身(所在深度)TGC值[7].

统计学处理 采用SAS 8.2版, 多组均数差异的比较采用单因素方差分析, 两组均数差异的比较采用Fisher's LSD法, $P<0.05$差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *动物实验* 39只家兔完成实验, 腹泻死亡1只, 正常对照组9只, 轻度脂肪肝10只, 中度脂肪肝11只, 重度脂肪肝9只. 将肝穿刺活检与完成实验处死家兔病理学与超声结果一并分析, 轻、中、重度脂肪肝模型数依次为: 13, 20, 10只. 轻度脂肪肝中单纯性脂肪肝7只, 伴发脂肪性肝炎6只; 中度中单纯性脂肪肝7只, 伴发脂肪性肝炎13只; 10只重度脂肪肝均有炎症. 肝脂肪变特点: 以小泡性脂肪变为主, 轻度见于腺泡Ⅲ带, 苏丹Ⅳ染色肝细胞内散在大小较均匀的鲜红色脂滴; 中度1/2以上肝细胞脂肪变, 随脂质的积累, 脂滴可有融合, 胞核偏位或脂滴围绕细胞核形成"梅花样"改变; 重度者全小叶布满脂滴, 肝细胞胀大、窦间隙变窄, 细胞核和细胞器被脂滴挤压移位至细胞边缘呈"印戒样", 细胞内结构不能辨认, 多伴发脂肪性肝炎或不同程度纤维化. 正常肝左叶AII高于右叶, 差异具有显著性意义($F = 3.08$, $P = 0.0111$), 同侧肝叶不同部位AII差异无显著性意义. 脂肪肝AII明显高于正常肝, 并随脂肪变程度的加重、炎症的有无, 左肝近、中、远三区及右肝近区AII值呈递增趋势(表1).

2.1.1 *单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎AII的比较* 为确定炎症病变对IBS的影响, 根据肝细胞变性、坏死、气球样变、炎症细胞浸润和纤维化等有无分为单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎. 同等程度脂肪变, 脂肪性肝炎AII较单纯脂肪肝增高; 中、

■创新盘点

本文通过对家兔脂肪肝二维超声图像灰阶直方图分析证实, 其能分辨人眼不能识别的图像信号细微变化、辨别组织的均匀程度. IBS测定对脂肪肝的诊断率、与病理组织学诊断符合率均较常规超声明显提高. 肝GS与AII相关性分析提示于近区二者随病变加重呈一致性增高趋势, 联合检测有助于提高诊断准确性. 超声诊断结果有病理组织学研究的参照, 大大提高了结果的可靠性.

■应用要点
肝脏不同部位IBS与GS强度测定可反映脂肪肝的有无、病变程度及炎症和纤维化发生情况. 采用超声IBS与GS明显提高脂肪肝的确诊率, 与病理组织学符合率提高, 为临床无创性量化诊断脂肪肝提供了可靠依据.

表 2 单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎家兔肝脏AII分析 (mean ± SD, dB)

分组	*n*	肝左叶近区	肝左叶中区	肝左叶远区	肝右叶近区	肝右叶中区	肝右叶远区
对照组	9	25.6 ± 3.4	25.4 ± 2.8	26.5 ± 2.9	23.9 ± 2.5	24.7 ± 2.6	24.3 ± 2.7
单纯轻度脂肪肝	7	26.4 ± 1.8	25.5 ± 3.1	23.6 ± 2.0	25.6 ± 1.5	24.0 ± 3.1	22.8 ± 1.8
轻度脂肪肝伴炎症	6	27.7 ± 1.6	26.4 ± 1.6	24.7 ± 0.8	26.6 ± 2.0	24.2 ± 2.5	22.3 ± 2.2
单纯中度脂肪肝	7	28.2 ± 1.7	26.3 ± 2.4	23.4 ± 2.3	26.5 ± 2.0	23.4 ± 1.9	22.8 ± 1.3
中度脂肪肝伴炎症	13	31.9 ± 3.1	28.2 ± 1.8	26.2 ± 1.7[c]	28.6 ± 2.9[a]	25.8 ± 3.7[a]	24.3 ± 4.3[a]
重度脂肪肝伴炎症	10	33.1 ± 1.8	30.4 ± 2.7[a]	28.1 ± 1.3[a]	30.4 ± 2.4[a]	25.7 ± 1.6[a]	24.2 ± 1.9[a]

[a]$P<0.05$ *vs* 其余组; [c]$P<0.05$ *vs* 单纯轻度脂肪肝/轻度脂肪肝伴炎症.

表 3 单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎家兔肝脏GS分析 (mean ± SD, dB)

分组	*n*	肝左叶近区	肝左叶中区	肝左叶远区	肝右叶近区	肝右叶中区	肝右叶远区
对照组	9	38.1 ± 6.2	37.2 ± 5.9	36.4 ± 5.6	35.4 ± 6.1	34.4 ± 6.1	33.5 ± 6.0
单纯轻度脂肪肝	7	38.9 ± 7.5	36.9 ± 6.7	35.3 ± 6.5	35.6 ± 4.4	33.6 ± 3.3	31.7 ± 3.5
轻度脂肪肝伴炎症	6	42.2 ± 5.9	39.6 ± 6.0	37.3 ± 5.4	39.5 ± 4.9	37.3 ± 4.7	35.2 ± 3.8
单纯中度脂肪肝	7	50.7 ± 8.8[a]	48.3 ± 7.9[a]	45.7 ± 8.9	37.2 ± 4.2	37.0 ± 4.0	35.3 ± 3.7
中度脂肪肝伴炎症	13	52.5 ± 10.9[c]	48.5 ± 10.4[a]	46.9 ± 10.4[a]	43.5 ± 11.2[a]	39.1 ± 11.7	36.2 ± 12.4
重度脂肪肝伴炎症	10	56.8 ± 13.4[c]	51.4 ± 13.5[c]	47.9 ± 13.3[c]	47.1 ± 8.1[c]	43.2 ± 7.7[a]	38.3 ± 6.3

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组和单纯轻度脂肪肝组; [c]$P<0.05$ *vs* 对照组和单纯轻度脂肪肝/轻度脂肪肝伴炎症组.

表 4 轻、重度脂肪肝患者肝脏AII分析 (mean ± SD, dB)

脂肪肝	*n*	肝左叶近区	肝左叶中区	肝左叶远区	肝右叶近区	肝右叶中区	肝右叶远区
轻度	4	25.9 ± 2.9	25.7 ± 6.4	18.3 ± 3.3	26.4 ± 6.8	24.5 ± 6.3	22.0 ± 7.4
重度	3	35.5 ± 0.0[b]	34.6 ± 1.0[b]	31.8 ± 0.6[b]	33.8 ± 1.7[a]	32.4 ± 0.8[a]	29.6 ± 4.9[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 轻度.

重度脂肪肝伴炎症者AII均显著高于其余病变组(表2).

2.1.2 不同程度脂肪肝GS比较 单纯轻度脂肪肝与正常肝GS无明显差异, 随脂肪变加重和炎症发生, 图像回声信号强度逐渐增强, 尤以中、重度脂肪肝伴炎症GS增高明显(表3). 对正常家兔及不同程度脂肪肝家兔肝脏GS与AII进行相关性分析, 结果左、右肝近区二者间呈正相关, 分别为$r = 0.442\ 21$, $P = 0.0012$和$r = 0.335\ 73$, $P = 0.0160$. 由于衰减方式的不同, 二者中、远区无明显相关性. 肝AII与GS联合检测诊断脂肪肝与病理组织学符合率为85.2%.

2.2 临床研究 病理组织学结果显示, 轻度脂肪肝4例, 重度脂肪肝3例. 常规超声检测诊断率为71.4%(5/7), 与病理组织学诊断符合率为57.1%(4/7), IBS测定诊断率和与病理组织学符合率均为85.7%(6/7); 重度脂肪肝各声场AII均显著高于轻度脂肪肝(表4).

3 讨论

高营养和饮酒是目前人类流行的不良饮食方式, 由此导致的脂肪肝已严重威胁人类健康. 既往脂肪肝的研究多采用鼠类、单致病因素模型进行基础和药物干预实验[8-16]. 缺乏适于临床器械和设备检查并模拟人类饮食联合两种以上因素致病的较大动物脂肪肝模型, 因此缺乏具有病理基础的无创性量化诊断对照研究. 我们选用家兔为实验动物, 联合高营养和乙醇喂养, 模型形成快, 形成率达100%, 并可应用临床检查器械(如肝脏穿刺针)和设备(如超声诊断仪)进行肝脏病理学和超声学诊断. 动物实验和临床对比研究发现, 超声IBS脂肪肝分度和炎症病变与病理组织学的符合率分别达85.2%和85.7%, 提示超声IBS检测可作为一种无创性量化方法诊断脂

肪肝.

背向散射信号产生的基础为组织中的细微结构, 包括大分子物质和胶原成分等, 病变时组织结构的微细变化, 如脂质积累、炎症细胞浸润、纤维组织增生等均可成为良好的散射源致使IBS发生改变[17-21]. 单纯轻度脂肪肝细胞内脂滴小、数量少, 组织结构变化不明显, 随着脂质的积累, 脂滴增大、增多, 肝细胞增大、形态发生改变、进一步发生变性、坏死、气球变、间质内炎细胞浸润、枯否细胞增殖、纤维组织增生等, 均可导致散射体浓度、大小、排列方式与周围组织声阻抗差发生变化, 致使IBS值增高. 赵玉华 *et al*[22]研究报道, 脂肪肝AII高于正常肝88.5%. Hill *et al*[23]对正常肝组织、脂肪肝、肝硬化等标本测量发现衰减系数和散射程度与脂肪含量正相关. 本研究结果显示: 正常家兔AII右肝低于左肝, 差异显著(P<0.01), 考虑与右侧胸壁干扰声波传播使部分声束失落有关; 同侧肝叶不同部位AII值接近, 表明IBS能客观反映家兔肝实质组织微细结构及均匀性[7]. 随脂肪肝程度加重, AII值呈现递增趋势, 正常肝脏<轻度脂肪肝<中度脂肪肝<重度脂肪肝, 同等程度脂肪肝伴发炎症者, AII进一步增高. 临床病例观察结果亦显示, IBS测定对脂肪肝的诊断率、与病理组织学符合率(85.7%)均较常规超声检测(71.4%和57.1%)明显提高, 重度脂肪肝AII较轻度脂肪肝显著增高(P<0.0001/0.05), 表明肝脏IBS可更准确的反映脂肪肝的有无、病变程度以及炎症和纤维化发生情况. 通过对正常家兔肝二维超声图像灰阶直方图分析证实, 其能分辨人眼所不能识别的图像信号细微变化、辨别组织的均匀程度. 卓忠雄 *et al*[24]对正常人及化疗性脂肪肝超声图像定量分析显示二者差异显著, 正常肝声像图近、远声场回声强度基本一致, 化疗性脂肪肝声像图回声强度依次为近声场最强、中声场次之、远声场最弱. 本研究结果显示, 正常家兔左肝GS高于右肝, 随脂肪变及炎性病变加重, 肝脏回声信号增强, 中、重度脂肪肝伴发炎症者GS显著高于正常肝和轻度脂肪肝(P<0.05); 同等程度脂肪变, 伴有炎症者图像信号强于单纯性脂肪肝, 提示灰阶级别的数字化分析可作为鉴别肝脂肪变和炎症有无及其程度的重要参考指标. 肝GS与AII相关性分析提示于近区二者随病变加重呈一致性增高趋势, 联合检测有助于提高诊断准确性. 由于衰减方式的不同, 于中、远区二者无明显相关性.

总之, 上述研究表明, 高营养及酒精联合喂养家兔可快速建立不同程度脂肪性肝病模型; 肝脏不同部位IBS及GS强度测定可反映脂肪肝的有无、病变程度以及炎症和纤维化发生情况. 临床凭常规超声波检测对脂肪肝诊断率仅71.5%, 与病理组织学符合率仅57.4%. 采用超声联合检测IBS与GS明显提高脂肪肝的确诊率, 与病理组织学符合率高达85.7%, 为临床无创性量化诊断脂肪肝提供了可靠依据.

■**名词解释**

1 IBS技术: 通过一体化的在线方法来测量、显示和分析在用户自定义的间期来触发的图像上的用户自定义的感兴趣区域内的图像的平均声学强度.

2 峰-峰强度(peak to peak intensity, PPI): 数据强度曲线的最大值和最小值的差; 平均图像强度(average image intensity, AII), 时间强度曲线的各数据的平均值.

4 参考文献

1 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419

2 Reid BM, Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1117-1122

3 Cubelic S, Misak Z, Gasparov S, Kolacek S. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *Lijec Vjesn* 2004; 126: 197-200

4 王吉耀. 脂肪肝的流行病学. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 115

5 Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Uribe M. Obesity and non-alcoholic steatohepatitis. *Gac Med Mex* 2004; 140 Suppl 2: S67-72

6 曾民德. 脂肪肝–肝病领域的新挑战. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 69

7 南月敏, 郭瑞军, 姚希贤, 甄景琴, 殷春霞. 正常家兔肝超声背向散射积分研究. 中华超声影像学杂志 2004; 13: 292-295

8 Liang YQ, Kinoshita M, Muto T, Fujimaki Y, Matsuki N, Saito H, Yamanaka M, Teramoto T. Defect in an intrahepatic degradation of apolipoprotein B in suncus: an animal model of hypobetalipoproteinemia. *J Biochem (Tokyo)* 1998; 123: 28-32

9 Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993; 55: 737-741

10 Zhang BH, Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 133-137

11 Kazumi T, Odaka H, Hozumi T, Ishida Y, Amano N, Yoshino G. Effects of dietary fructose or glucose on triglyceride production and lipogenic enzyme activities in the liver of Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM. *Endocr J* 1997; 44: 239-245

12 Callaghan R, Desmond PV, Mashford ML. The effect of a nutritional model of chronic liver injury on the hepatic glucuronidation of morphine in rats. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 998-999

13 Rakotoamboa JL, Masson M, Palate B, Carleer J, Roba J. Fasting for 24 h reveals liver microsteatosis after continuous i.v. infusion of milacemide in the rat. *Arch Toxicol* 1994; 68: 266-271

14 Paquet KJ, Kamphausen U. The carbon-tetrachloride-hepatotoxicity as a model of liver damage. First report: Long-time biochemical changes. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1975; 22: 84-88

15 Mikhail TH, Ibrahim KM, Awadallah R, Mona E. The effect of vitamin B12 on tetracycline-induced

■同行评价
本文通过模拟人饮食成功复制复合病因所致脂肪性肝炎并肝纤维化模型, 通过新型超声指标探讨实时超声在脂肪性肝炎肝纤维化诊断中的价值, 并进行了数例临床肝活检和影像学检查结果一致性的探讨, 对指导临床从事无创伤性诊断脂肪性肝炎的研究提供了新的希望. 选题紧密结合临床, 设计合理, 造模方法可以接受, 研究结果可靠, 具有较高的科学性.

fatty liver. *Z Ernahrungswiss* 1980; 19: 173-178
16 Puddu P, Caldarera CM, Marchetti M. Studies on ethionine-induced fatty liver. *Biochem J* 1967; 102: 163-167
17 Schwarz KQ, Chen X, Steinmetz S. Methods for quantifying ultrasound backscatter and two-dimensional video intensity: implications for contrast-enhanced sonography. *J Am Soc Echocardiogr* 1998; 11: 155-168
18 Feinberg MS, Gussak HM, Davila-Roman VG, Baumann CM, Miller JG, Perez JE. Dissociation between wall thickening of normal myocardium and cyclic variation of backscatter during inotropic stimulation. *Am J Cardiol* 1996; 77: 515-520
19 黄晓玲, 高云华. 超声诊断中声学定量技术新进展及其应用. 中华医学影像技术 1999; 15: 312-314
20 王志刚. 超声组织定征研究、应用进展. 重庆医科大学学报 1998; 23: 207-210
21 藏福波, 高晓军. 正常成人肝脏超声背向散射积分的测定. 中华超声影像学杂志 2001; 10: 328-330
22 赵玉华, 陈兰芳, 姚炜, 张宏. 人体正常、异常组织结构声学密度定量的初步研讨. 中国超声医学杂志 1998; 14: 1-5
23 Hill CR, Rivens I, Vaughan MG, ter Haar GR. Lesion development in focused ultrasound surgery: a general model. *Ultrasound Med Biol* 1994; 20: 259-269
24 卓忠雄, 高云华, 李宁, 夏红梅, 严鸿瑜, 王志刚, 冉海涛. 化疗性脂肪肝的超声组织定征研究. 中华超声影像学杂志 2001; 10: 331-333

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, 国际肝胆胰协会侯任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会. 会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功.

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

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

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1487-1492
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

胃癌组织中PTEN, MMP-9和Caspase-3表达的关系

张丹丹, 郭 琳, 王 强

张丹丹, 中国医科大学附属第四医院胸外科 辽宁省沈阳市 110032
郭琳, 王强, 中国医科大学附属第二医院胃肠普通外科 辽宁省沈阳市 110004
张丹丹, 2001年牡丹江医学院本科毕业, 2005年中国医科大学附属第二医院普通外科硕士, 现从事胸外科临床工作.
通讯作者: 王强, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院胃肠普通外科. wangq@cmu2h.com
电话: 024-83955060
收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-03-25

Relationship among PTEN, matrix metalloproteinase-9, and Caspase-3 Expression in gastric carcinoma

Dan-Dan Zhang, Lin Guo, Qiang Wang

Dan-Dan Zhang, Department of Thoracic Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China
Lin Guo, Qiang Wang, Department of Gastroduodenal Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Dr. Qiang Wang, Department of Gastroduodenal Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangq@cmu2h.com
Received: 2006-03-08 Accepted: 2006-03-25

Abstract

AIM: To study the expression of PTEN, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and Caspase-3 in gastric cancer, and to discuss their roles and correlations in the occurrence, development, invasion and metastasis of gastric cancer.

METHODS: SP immunohistochemistry was used to measure the expression of PTEN, MMP-9, and Caspase-3 in 54 samples of gastric carcinoma selected from paraffin wax embodied specimens with complete clinicopathological data, and another 15 cases of normal gastric mucosa.

RESULTS: The expression of PTEN in gastric cancer was low (28/54, 51.9%), and reduced with the increased invasive depth (P = 0.004) and clinical stages (P = 0.001), reduced histological differentiation (P = 0.008) and occurrence of lymph node (P = 0.003) and long distance metastasis (P = 0.015). The expression of MMP-9 in gastric cancer was high (41/54, 75.9%), and increased with increased invasive depth (P = 0.04) and clinical stages (P = 0.039), reduced histological differentiation (P = 0.009), and occurrence of lymph node metastasis (P = 0.025). The expression of Caspase-3 in gastric cancers was low (12/54, 22.2%), and reduced with increased clinical stages (P = 0.015), reduced histological differentiation (P = 0.035) and occurrence of lymph node metastasis (P = 0.045). The expression of PTEN and MMP-9 (r = -0.543, P = 0.001), Caspase-3 and MMP-9 (r = -0.741, P = 0.001) were in inversely correlation, while the expression of PTEN and Caspase-3 (r = 0.515, P = 0.001) were in positive correlation in gastric cancer.

CONCLUSION: PTEN and Caspase-3 are lowly expressed in gastric caner, while MMP-9 is highly expressed. PTEN, MMP-9, and Caspase-3 can serve as the markers in the diagnosis and prognosis of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; PTEN; Matrix metalloproteinase-9; Caspase-3; Immunohistochemistry

Zhang DD, Guo L, Wang Q. Relationship among PTEN, matrix metalloproteinase-9, and Caspase-3 Expression in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1487-1492

摘要

目的: 研究PTEN, MMP-9和Caspase-3在胃癌及正常胃组织中的表达, 探讨他们在胃癌的发生、发展、浸润和转移中的作用.

方法: 选择临床病理资料齐全的胃癌蜡块标本54例, 另取正常胃黏膜标本15例作对照. 采用SP免疫组化方法检测PTEN, MMP-9和Caspase-3在其中的表达.

结果: 胃癌中PTEN低表达(28/54, 51.9%), 且肿瘤浸润深(P = 0.004)、有淋巴(P = 0.003)和远隔转移(P = 0.015)、临床分期高(P = 0.001)、病理分化低(P = 0.008)时降低. 胃癌

■背景资料
PTEN是肿瘤抑制基因, 可抑制肿瘤发生、发展、浸润和转移. MMP-9可降解细胞外基质和基底膜而促进恶性肿瘤浸润和转移. Caspase-3细胞凋亡蛋白酶, 其功能的抑制将导致肿瘤的发生. 在多种恶性肿瘤包括胃癌中均可以检测到他们表达的异常. PTEN具有双特异性磷酸酶活性, 是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因, 涉及三磷脂酰肌醇激酶、FAK、促细胞分裂素激活的蛋白激酶途径, 其抑癌机制还很不清楚.

■相关报道
肿瘤早期便发生PTEN完全缺失的只有子宫内膜癌和卵巢癌里，其他肿瘤的PTEN的完全失活发生在肿瘤晚期，所以PTEN基因的缺失被认为是恶变过程中的后期事件.

中MMP-9高表达(41/54, 75.9%), 且肿瘤浸润深(P = 0.040)、有淋巴转移(P = 0.025)、临床分期高(P = 0.039)、病理分化低(P = 0.009)时增高. 胃癌中Caspase-3低表达(12/54, 22.2%), 且有淋巴转移(P = 0.045)、临床分期高(P = 0.015)、病理分化低(P = 0.035)时降低. 胃癌中PTEN与MMP-9 (r = -0.543, P = 0.001), Caspase-3与MMP-9的表达负相关(r = -0.741, P = 0.001), PTEN与Caspase-3的表达正相关(r = 0.515, P = 0.001).

结论: 胃癌中PTEN, Caspase-3低表达, MMP-9高表达; PTEN、MMP-9和Caspase-3可作为胃癌诊断和预后判断的指标.

关键词: 胃癌; PTEN; MMP-9; Caspase-3; 免疫组织化学

张丹丹, 郭琳, 王强. 胃癌组织中PTEN, MMP-9和Caspase-3表达的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1487-1492
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1487.asp

0 引言

胃癌的发生、发展是一个多因素、多步骤的过程, 涉及到癌基因、抑癌基因表达的失调, 细胞凋亡、细胞运动和迁移调控的异常等多方面机制. PTEN是1997年才发现的新的肿瘤抑制基因, 具有双特异性磷酸酶活性, 他通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡等抑制肿瘤发生、发展, 并能多途径地抑制肿瘤浸润和转移. 细胞外基质和基底膜降解是恶性肿瘤浸润和转移的关键环节, MMPs的作用底物是细胞外基质和基底膜中的纤维网架分子, 其中MMP-9可特异性地降解其中的Ⅳ型胶原. 细胞凋亡功能的抑制将导致肿瘤的发生及免疫功能的异常, Caspase家族是直接导致细胞凋亡的蛋白酶系统, Caspase-3是人类细胞凋亡的关键蛋白酶. 在多种恶性肿瘤中均可以检测到PTEN、Caspase-3表达缺失及MMP-9过表达. 我们对胃癌组织中PTEN、MMP-9、Caspase-3的表达与临床病理特征相关性的研究如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-2003年手术切除, 病理证实为腺癌, 临床及病理资料齐全的胃癌蜡块标本54例, 术前均未行化疗或放疗. 男37例, 女17例; 年龄38-78岁; 肿瘤的原发灶大小、深度(T)、淋巴结转移(N)由病理确定, 远处转移(M)由病理学和临床确定. 其中肿瘤直径<5 cm 37例, ≥5 cm 17例; 肿瘤浸润深度在浆膜下者15例, 浸透浆膜者39例; 组织学分型: 高分化19例, 中分化17例, 低分化18例; 局部淋巴结无转移29例, 有转移25例; 远隔无转移42例, 有转移12例. 根据1997年国际抗癌联盟(IUCC)制定的TNM分期标准进行临床分期, Ⅰ期12例, Ⅱ期14例, Ⅲ期16例, Ⅳ期12例. 另取正常胃黏膜组15例作对照, 标本取自胃溃疡或十二指肠溃疡手术标本中正常的胃黏膜组织, 并经病理观察证实且排除重度不典型增生. 男10例, 女5例, 年龄44-77岁. 浓缩型PTEN鼠抗人mAb(30617665), MMP-9兔抗人mAb(BA0573), Caspase-3鼠抗人mAb(JHM62, ZM-0320)购于北京中山生物制品有限公司, S-P试剂盒及DAB显色试剂盒购自福州市迈新生物技术开发公司(AR1022). 免疫组织化学染色所需的常规试剂: 枸橼酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.0)、磷酸氢二钠、氯化钠、二甲苯、乙醇、过氧化氢、苏木素等, 普通实验室冰箱、切片机、烤片机、高压锅、温育箱、湿盒、恒温振荡器、Olympus BX_{41}显微镜、显微数码照相机Olympus $BX_{40}F_4$等, 均由中国医科大学附属二院病理科提供.

1.2 方法 常规HE染色, 确定标本的组织分化程度. 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法检测PTEN, MMP-9, Caspase-3在胃癌及正常胃组织中的表达. 具体操作步骤按常规进行, 其一抗工作稀释度: PTEN为1∶75, MMP-9为1∶100, Caspase-3为1∶200. 用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, PBS缓冲液代替一抗作阴性对照. 以细胞质内出现明显棕黄色颗粒为阳性细胞. 先于低倍镜下观察, 排除肿瘤坏死出血区及边缘反应区, 于肿瘤内染色相对密集区选取5个视野分别进行细胞计数, 高倍镜下进行观察, 以阳性细胞数占同类计数细胞的百分比为阳性细胞率. 按阳性细胞率, 将3种蛋白染色结果进行半定量测定, (1)PTEN: 阴性(-): 阳性细胞率<5%; 弱阳性(+): 阳性细胞率为5%-25%; 阳性(++): 阳性细胞率为25%-50%; 强阳性(+++): 阳性细胞率>50%. (2)MMP-9: 于肿瘤侵袭边缘及肿瘤内染色相对密集区选取5个视野, 阴性(-): 无明显的阳性细胞; 弱阳性(+): 阳性细胞率<25%; 阳性(++): 阳性细胞率为25%-75%; 强阳性(+++): 阳性细胞率>75%. (3)Caspase-3: 阴性(-): 阳性细胞率<5%; 阳性(+): 阳性细胞率≥5%.

统计学处理 采用SPSS 12.0软件包进行统计分析. PTEN, MMP-9, Caspase-3为计数资料,

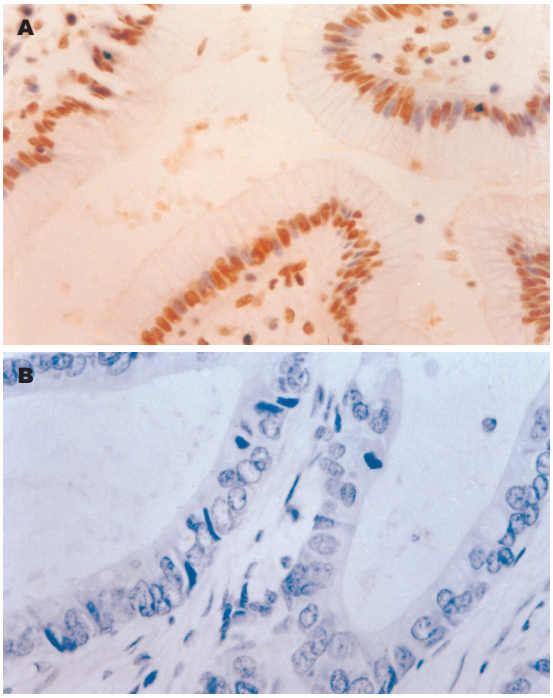


图 1 PTEN在正常胃组织及胃癌中的表达 (×400). A: 正常胃组织中PTEN呈阳性表达; B: 胃癌组织中PTEN呈阴性表达.

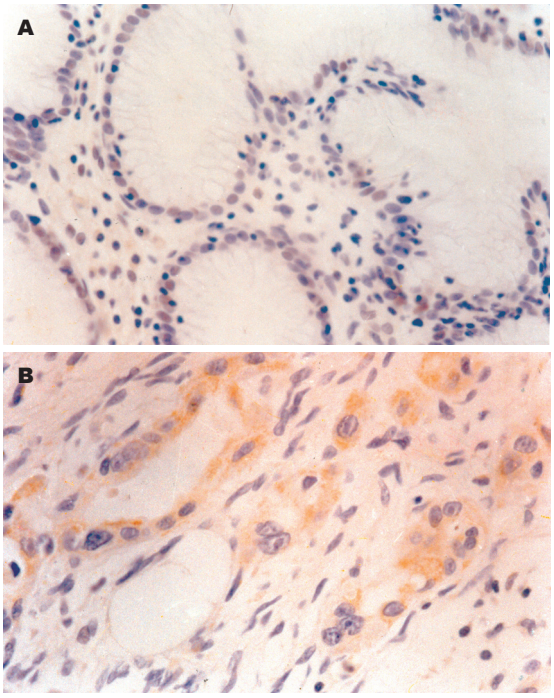


图 2 MMP-9在正常胃组织及胃癌中的表达 (×400). A: 正常胃组织中MMP-9呈阴性表达; B: 胃癌组织中MMP-9呈阳性表达.

■创新盘点

胃癌中PTEN, MMP-9, Caspase-3的相互关系及其机制的研究, 目前较为少见. MMP-9和Caspase-3之间关系的研究更为少见. 研究他们之间的关系对认识PTEN的抑癌机制有提示作用.

各个相关因素的差异性比较采用χ^2检验. PTEN, MMP-9, Caspase-3各指标间的相关性研究采用相关分析. 各检验方法皆以$P<0.05$为差异显著标准.

2 结果

2.1 PTEN PTEN在正常胃组织中的阳性表达率(+～+++)为100%, 位于胞质. 在胃癌组织中的阳性表达率为51.9%, 明显低于在正常胃组织中的表达($P<0.01$, 图1). 与胃癌的肿瘤浸润深度、淋巴转移、远隔转移、临床分期呈负相关($P<0.05$), 随肿瘤浸润深度的加深、淋巴转移的产生、远隔转移的发生、临床分期的提高而降低; 与肿瘤的病理分化程度呈正相关($P<0.05$), 随肿瘤病理分化程度的降低而降低. 与患者的性别、年龄、肿瘤大小无相关性($P>0.05$).

2.2 MMP-9 MMP-9在正常胃组织中的阳性表达率(+～+++)为26.7%. 在胃癌组织中的阳性表达率为75.9%, 主要表达于癌巢和正常组织交接部位, 癌细胞及间质细胞都有表达, 多定位于胞质, 明显高于在正常胃组织中的表达($P<0.05$, 图2). 与胃癌的肿瘤浸润深度、淋巴转移、临床分期呈正相关($P<0.05$), 随肿瘤浸润深度的加深、淋巴转移的产生、临床分期的提高而明显增高; 与肿瘤的病理分化程度呈负相关($P<0.05$), 随肿瘤病理分化程度的降低而增高. 与患者的性别、年龄、肿瘤大小、远隔转移无相关性($P>0.05$).

2.3 Caspase-3 Caspase-3在正常胃组织中的阳性表达率为53.3%, 位于胃小凹的黏液上皮细胞, 顶部染色最强, 颈部细胞和固有腺体少见阳性细胞. 在胃癌组织中的阳性表达率为22.2%, 明显低于在正常胃组织中的表达($P<0.05$, 图3). 与胃癌的淋巴转移、远隔转移、临床分期呈负相关($P<0.05$), 随淋巴转移的产生、临床分期的提高而明显降低; 与肿瘤的病理分化程度呈正相关($P<0.05$), 随肿瘤病理分化程度的降低而降低. 与患者的性别、年龄、肿瘤大小、浸润深度、远隔转移无相关性($P>0.05$).

2.4 PTEN, MMP-9, Caspase-3的相关性 胃癌组织中PTEN与MMP-9的表达呈负相关($P<0.001$, $r = -0.543$). PTEN与Caspase-3的表达呈正相关($P<0.001$, $r = 0.515$). Caspase-3与MMP-9的表达呈负相关($P<0.001$, $r = -0.741$). 胃癌PTEN, MMP-9和Caspase-3表达与病理因素的关系见表1.

3 讨论

PTEN即与张力蛋白同源的、第10染色体丢失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome10, PTEN)基因[1-3], 定位于人类染色体10q23.3, 编码由403个氨基酸残基组成的蛋

■应用要点
PTEN, MMP-9, Caspase-3各自都可以作为胃癌诊断和预后判断的指标, 这在胃癌的诊断和预后的判断有指导价值, 并对胃癌的手术方案、放化疗方案的选择及新药的研究有提示作用.

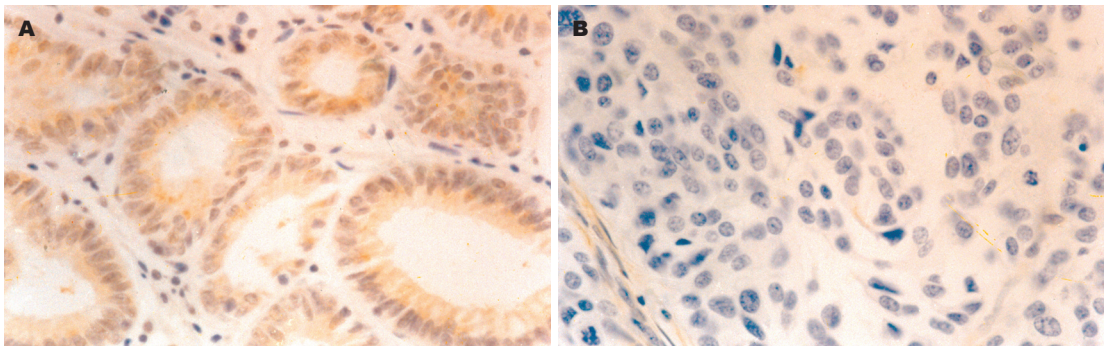


图 3 Caspase-3在正常胃组织及胃癌中的表达. A: 正常胃组织中Caspase-3呈阳性表达(×400); B: 胃癌组织中Caspase-3呈阴性表达(×400).

表 1 胃癌PTEN, MMP-9和Caspase-3表达与病理因素的关系

病理因素		*n*	PTEN *n* (%)	MMP-9 *n* (%)	Caspase-3 *n* (%)
浸润深度	浆膜下	15	13 (86.7)	8 (53.3)	6 (40.0)
	浸透浆膜	39	15 (38.5)[b]	33 (84.6)[a]	6 (15.4)
分化	高	19	12 (63.2)	10 (52.6)	8 (42.1)
	中	17	12 (70.6)	14 (82.4)	2 (11.8)
	低	18	4 (22.2)[b]	17 (94.4)[b]	2 (11.1)[a]
淋巴转移	无	29	21 (72.4)	18 (62.1)	10 (34.5)
	有	25	7 (28.0)[b]	23 (92.0)[a]	2 (8.0)[a]
远隔转移	无	42	26 (61.9)	31 (73.8)	10 (23.8)
	有	12	2 (16.7)[a]	10 (83.3)	2 (16.7)
TNM分期	Ⅰ+Ⅱ	26	20 (76.9)	16 (61.5)	10 (38.5)
	Ⅲ+Ⅳ	28	8 (28.6)[b]	25 (89.3)[a]	2 (7.1)[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$.

白质. PTEN蛋白包括氨基端的磷酸酶结构域、C2结构域和羧基端结构域[4], 通过脂质磷酸酶活性特异性的去除磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸(phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate, PIP3)3'位上的磷酸基团, 负性调控PI3K/蛋白激酶B(PKB/Akt)通路, 使细胞周期依赖性激酶(CDK)抑制剂p27去磷酸化, 并可以提高Caspase-3活性, 使细胞周期停滞在G_1期, 促进细胞凋亡, 抑制细胞外基质和基底膜的降解而发挥其抑癌作用[5-6]. 研究发现, PTEN在多种良恶性肿瘤中均可以检测到突变与缺失, 胃癌中也可以检测到PTEN表达的异常[7]. 将野生型PTEN基因转导到肿瘤细胞中, 会发现肿瘤细胞的生长明显受到抑制[8]. Sano *et al*[9]发现, PTEN蛋白表达高低与患者的病理分级及预后有关, 预后越差, 恶性程度越高, PTEN蛋白表达水平越低. 我们发现, PTEN在胃癌组织中的表达率明显低于在正常胃组织中的表达, 并随肿瘤病理分化程度的降低、浸润深度的加深、淋巴转移的发生、远隔转移的产生及临床分期的增高而降低($P<0.05$), 与文献报道相符, 提示PTEN基因表达的缺失与胃癌的发生、发展、浸润和转移密切相关, 而且可能为判断胃癌的恶性程度提供依据.

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜(basement membrane)降解是恶性肿瘤浸润和转移的关键环节. 基质金属蛋白酶(matrixmetallo-proteinases, MMPs)的作用底物是细胞外基质和基底膜中的纤维网架分子. 基质金属蛋白酶-9(metrix metalloproteinase-9, MMP-9)属于其中的明胶酶类, 通常以酶原的形式合成, 被激活后可特异性地降解细胞外基质和基底膜中的主要成分Ⅳ型胶原. MMP-9不仅主要在癌细胞中表达, 而且基质中的纤维母细胞、单核吞噬细胞中也有表达, 其阳性表达以浸润癌巢周围最明显, 说明他与肿瘤的浸润密切相关[10]. MMP-9还能和VEGF协同作用参与肿瘤血管的生成[11]. 研究发现MMP-9在胃癌中的表达与肿瘤生长方式、浸润深度、淋

巴转移、病理分化、远隔转移及患者的不良预后相关[12-13]. 我们发现, MMP-9在胃癌组织中的表达率明显高于在正常胃组织中的表达, 并随肿瘤病理分化程度的降低、浸润深度的加深、淋巴转移的发生、临床分期的增高而增加(P<0.05), 与文献报道相符, 提示MMP-9的高表达与胃癌的发生、发展、侵袭与转移密切相关. MMP-9在胃癌组织中的表达与肿瘤的远隔转移无相关性, 可能与样本量较小有关. 研究发现PTEN能负性调控MMP-9而抑制细胞外基质和基底膜降解, 抑制肿瘤浸润和转移[14-19]. 我们发现, PTEN和MMP-9在胃癌组织中的表达呈负相关(P<0.001, r = -0.543), MMP-9的表达随PTEN的降低而升高, 提示胃癌组织中PTEN表达的缺失, 导致了对MMP-9的抑制作用降低, 而使MMP-9高表达, 促进了肿瘤细胞的侵袭和转移.

半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族是直接导致细胞凋亡的蛋白酶系统, Caspase-3(cysteine protease p32 Yama, 又称CPP32, Apopain)是细胞凋亡下游的关键蛋白酶[20-22]. Hoshi *et al*[23]发现, Caspase-3在胃癌发生过程中表达下调. Leonardos *et al*[24]发现, Caspase-3的表达下调与恶性肿瘤的浸润、转移和临床病理分期等生物学行为特征密切相关, 并与肿瘤患者生存期的缩短关系密切. 我们发现, Caspase-3在胃癌组织中的表达率明显低于在正常胃组织中的表达, 并随肿瘤病理分化程度的降低、淋巴转移的产生、临床分期的增高而降低(P<0.05), 与文献报道相符, 提示Caspase-3表达的降低与胃癌的发生、发展密切相关. Caspase-3在胃癌组织中的表达与肿瘤浸润深度及远隔转移无相关性, 可能与样本量较小有关. 研究发现PTEN可通过上调Caspase-3活性而促进细胞凋亡[25-28]. 我们发现, 胃癌组织中PTEN与Caspase-3的表达呈正相关(P<0.001, r = 0.515), 且Caspase-3的表达随PTEN的降低而降低, 提示PTEN基因表达的缺失, 丧失了对Caspase-3活性的促进作用, 而降低了其促进肿瘤细胞凋亡的作用, 导致癌细胞的无限制生长.

Riedel *et al*[29]发现, 在头颈部鳞状细胞癌中Caspase-3和MMP-9的表达呈负相关, 且有统计学意义. 我们亦发现胃癌组织中Caspase-3与MMP-9的表达呈负相关(P<0.001, r = -0.741), MMP-9的阳性表达率随Caspase-3的降低而升高, 提示Caspase-3介导的细胞凋亡和MMP-9降解细胞外基质和基底膜而促进的细胞迁移和侵袭在胃癌的发生、发展中互相制约而共同起作用.

总之, PTEN, MMP-9, Caspase-3的表达在胃癌的发生、发展和浸润转移过程中起重要作用, 其作用途径和形式复杂且相互关联, 需要进一步研究其作用机制及其对胃癌的预防、诊断、治疗和预后判断的意义.

■**同行评价**
本文讨论了PTEN这一新型抑癌基因与转移相关基因MMPs和凋亡相关基因Caspase在胃癌中的表达及其相关性, 有一定新意, 但其仅系回顾性研究, 且病例数尚少.

4 参考文献

1 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947

2 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362

3 Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129

4 Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 829-844

5 Besson A, Robbins SM, Yong VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999; 263: 605-611

6 Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; 264: 29-41

7 Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165

8 Wu Y, Karas M, Dupont J, Zhao H, Toyoshima Y, Le Roith D. Multiple signaling pathways are involved in the regulation of IGF-I receptor inhibition of PTEN-enhanced apoptosis. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14: 52-58

9 Sano T, Lin H, Chen X, Langford LA, Koul D, Bondy ML, Hess KR, Myers JN, Hong YK, Yung WK, Steck PA. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res* 1999; 59: 1820-1824

10 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174

11 Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 337-344

12 Senota A, Itoh F, Yamamoto H, Adachi Y, Hinoda Y, Imai K. Relation of matrilysin messenger RNA expression with invasive activity in human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 313-321

13 Koumura H, Sugiyama Y, Kunieda K, Saji S. Significance in gene expression of matrix metalloproteinase-9, urokinase-type plasminogen

activator and tissue inhibitor of metalloproteinase for metastases of gastric and/or colo-rectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1997; 24 Suppl 2: 324-331
14 Park MJ, Kim MS, Park IC, Kang HS, Yoo H, Park SH, Rhee CH, Hong SI, Lee SH. PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. *Cancer Res* 2002; 62: 6318-6322
15 Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004; 18: 1123-1125
16 Moon SK, Kim HM, Kim CH. PTEN induces G1 cell cycle arrest and inhibits MMP-9 expression via the regulation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 2004; 421: 267-276
17 Dolo V, Ginestra A, Cassara D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, Nagase H, Canevari S, Pavan A, Vittorelli ML. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4468-4474
18 Koul D, Parthasarathy R, Shen R, Davies MA, Jasser SA, Chintala SK, Rao JS, Sun Y, Benvenisite EN, Liu TJ, Yung WK. Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN. *Oncogene* 2001; 20: 6669-6678
19 Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 1828-1835
20 Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99-104
21 Hishikawa K, Nakaki T, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase 3 in cultured human aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2000; 392: 19-22
22 Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abe N, Schmidt K, Franke A, Shevchenko A, Mann M, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59: 5299-5306
23 Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H. Immunohistochemistry of Caspase3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4347-4353
24 Leonardos L, Butler LM, Hewett PJ, Zalewski PD, Cowled PA. The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 143: 29-35
25 Schwartzbauer G, Robbins J. The tumor suppressor gene PTEN can regulate cardiac hypertrophy and survival. *J Biol Chem* 2001; 276: 35786-35793
26 Yeon JE, Califano S, Xu J, Wands JR, De La Monte SM. Potential role of PTEN phosphatase in ethanol-impaired survival signaling in the liver. *Hepatology* 2003; 38: 703-714
27 Yuan XJ, Whang YE. PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* 2002; 21: 319-327
28 Wick W, Furnari FB, Naumann U, Cavenee WK, Weller M. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene* 1999; 18: 3936-3943
29 Riedel F, Gotte K, Bergler W, Hormann K. Inverse correlation of apoptotic and angiogenic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep* 2001; 8: 471-476

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1493-1497
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

胃肠激素与反流性食管炎

李军杰, 郑 勇

李军杰, 郑勇, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内分泌科 新疆石河子市 832008
通讯作者: 郑勇, 832008, 新疆石河子市, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内分泌科. lji_666222@163.com
电话: 0993-2859284
收稿日期: 2006-02-24 接受日期: 2006-03-30

摘要

反流性食管炎确切的发病机制目前尚不明确, 近年研究表明胃肠激素及气体信使分子对食管运动有调节作用, 在反流性食管炎的发生、发展中起着重要作用. 胃肠激素(血管活性肠肽、胆囊收缩素、胃泌素、P物质、蛙皮素、生长抑素、阿片肽、降钙素相关基因肽、胃动素、一氧化氮、一氧化碳)与反流性食管炎发病密切相关, 本文对此作一综述.

关键词: 胃肠激素; 反流性食管炎; 食管下括约肌; 食管下括约肌压力

李军杰, 郑勇. 胃肠激素与反流性食管炎. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1493-1497
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1493.asp

0 引言

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是指由于胃与食管交界处抗反流屏障功能障碍而导致的胃或十二指肠内容物反流入食管, 引起食管组织黏膜损害. 李兆申 *et al*[1]调查显示, 1990-1999年RE占内镜检查总数的2.02%, 而2000-2004年比率上升至5.11%, 可见近年反流性食管炎发病率有增高趋势. 其发病机制涉及食管胃交界屏障减弱、食管壁清除降低及胃排空延迟, 引起攻击因子反流, 刺激和损害食管黏膜[2]. 其中胃食管交界异常引发反流的机制有: 一过性食管下段括约肌松弛(TLESR); 食管下段括约肌压力(LESP)降低; 食道裂孔疝所致的胃食管连接结构的破坏. 一过性食管下段括约肌松弛是反流性食管炎的最主要发病机制[3-8], 胃肠激素及气体信使分子对食管运动有调节作用, 下面综述几种常见的胃肠激素与RE的关系.

1 提高食管下括约肌压力的胃肠激素

1.1 胃泌素(gastrin, GAS)

1.1.1 GAS与食管下括约肌(LES) 可明显促进LES的收缩, 促进食管平滑肌推进性蠕动.

1.1.2 GAS在RE患者血液中的变化 国内外有学者用人工合成胃泌素iv观察正常志愿者或RE患者的LESP, 结果显示胃泌素能明显增加RE患者的LESP, 且与剂量大小呈正相关. 但李甫棒 *et al*[9]研究胃食管反流病(GERD)患儿LESP明显下降, 其血浆胃泌素水平与LESP无相关性. 由此推测正常或略下降的胃泌素浓度对LESP影响不大, 药理剂量的胃泌素能增加LESP, 而灌注抗胃泌素血清, 则伴有基础LESP下降.

1.1.3 GAS在RE发病中的机制 有人认为胃泌素对LES的兴奋作用可能是经节后胆碱能神经元释放乙酰胆碱、对LES的直接刺激或经尼古丁神经元等途径实现的. 但有学者测定卓-艾综合症患者中的高胃泌素与LESP无明显关系, 故这一矛盾的结果还需进一步的研究.

1.2 P物质(substance P, SP)

1.2.1 SP与LES SP的生理作用可促进LES收缩和胃肠平滑肌收缩、促进胃肠蠕动等.

1.2.2 SP在RE患者血液、组织中的变化 Allescher *et al*[10]研究显示, 用SP iv能升高负鼠的LESP, 其促进LES收缩的强度明显超过乙酰胆碱, 阿托品可减弱这一作用. 夏金荣 *et al*[11]研究显示, 不同程度RE组的LES局部组织中SP含量明显低于无食管炎组, 不同程度RE之间SP含量差异也有非常显著意义, 随着RE程度的增加SP含量则逐步降低. SP含量越低, LESP越低, 造成的食管反流和食管黏膜损害就越严重.

1.2.3 SP在RE发病中的机制 直接刺激胆碱能神经元和作为非胆碱能兴奋性神经递质作用于LES. RE患者中SP含量降低, LESP下降, 导致RE的发生.

1.3 蛙皮素(bombesin, BBS)

1.3.1 BBS与LES BBS的生理作用为中枢神经系统的神经递质, 可刺激各种胃肠激素的释放、

■背景资料
反流性食管炎是消化系统一种常见疾病, 近年研究显示反流性食管炎发病率有增高趋势. 临床表现为烧心、反酸、胸骨后疼痛, 严重影响患者生活质量. 反流性食管炎确切的发病机制目前尚不明确, 研究表明胃肠激素在反流性食管炎的发生、发展中起着重要作用.

■研发前沿
目前胃肠激素与反流性食管炎的研发热点集中于血管活性肠肽、一氧化氮、一氧化碳等导致食管下括约肌松弛的神经肌肉传导通路及他们之间的相互关系(递质共存或递质共区域); 还有一些胃肠激素如垂体腺苷酸环化酶激活肽等与食管下括约肌的关系; 一过性食管下段括约肌松弛的发生机制等.

■创新盘点
本文重点从提高和降低食管下括约肌压力的胃肠激素在血液、组织含量的变化及他们在反流性食管炎发病中机制的探讨两个方面阐述了胃肠激素与反流性食管炎的关系, 以便了解胃肠激素在反流性食管炎发生、发展中所起的重要作用.

调节胃肠运动, 引起LES收缩.

1.3.2 BBS在RE发病中的机制 BBS通过增加蠕动波振幅和收缩时程来影响食管体部的运动, 不被阿托品、酚妥拉明等阻断[12]. 但也有人认为BBS通过P物质的释放对LES的直接作用和对肾上腺素能神经元释放去甲肾上腺素的间接作用来引起LES收缩. 然而Aoki *et al*[13]却发现蛙皮素相关肽Cerulein降低正常人LESP, 升高贲门失驰缓症患者的LESP.

1.4 胃动素(motilin, MTL)

1.4.1 MTL与LES MTL促进LES收缩.

1.4.2 MTL在RE患者血液中的变化 Perdikis *et al*[14]发现胃动素浓度与LESP成正相关关系; 国内真岩波 *et al*[15]也证实RE患者空腹血浆胃动素水平下降, 其血浆胃动素浓度与LESP呈明显正相关.

1.4.3 MTL在RE发病中的机制 MTL作用于平滑肌上的胃动素受体, 导致平滑肌收缩, 增加LESP. 胃动素使LES收缩, 可被阿托品和六甲季铵阻断, 说明节前和节后胆碱能神经参与此过程.

2 降低食管下括约肌压力的胃肠激素

2.1 血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)

2.1.1 VIP与LES VIP可能兼具激素、神经介质等作用, 具有松弛胃肠道平滑肌, 抑制LES张力作用.

2.1.2 VIP在RE患者血液中的变化 有人用VIP iv小鼠时监测到LESP下降并呈剂量关系[16]; Rosstier *et al*[17]以VIP注入贲门失弛缓患者中, 观察到LESP的下降, 患者的症状得以缓解; 有研究[18]显示RE和Barrett食管患者血浆VIP水平较对照组显著升高, 与LESP水平呈负相关; 王薇 *et al*[19]发现RE患者LESP与LES组织中VIP浓度呈负相关.

2.1.3 VIP在RE发病中的机制 VIP作为调节LESP的非肾上腺素能、非胆碱能神经的神经递质, 在血浆中浓度升高时, 伴随LESP下降. 其可能的机制, 直接通过VIP和(或)间接通过一氧化氮(NO), γ-氨基丁酸(GABA)等来实现[20]. VIP与其细胞膜上的受体特异性结合, 使细胞内cAMP含量升高, 细胞Ca^{2+}内流, 使一氧化氮合酶(NOS)的Ca^{2+}/CaM活化, 从而使NO合成增加, 通过刺激NO产生而发挥其作用[21-22]. 有研究表明VIP的释放部分依赖于NO的产生, 因为他能被L-NNA强烈抑制, 而NO因VIP作用于肌细胞而大量产生, 他可被VIP的拮抗剂抑制. VIP通过诱导型NO合酶(iNOS)促进NO释放, 松弛胃肠平滑肌, 这种作用具有组织和神经元特异性[23], 这均提示NO与VIP的释放之间相互影响和相互作用, 两者共同参与LESP的调节及RE的病理生理过程.

■应用要点
胃肠激素是调节胃肠运动的重要因素, 研究发现胃肠激素与反流性食管炎的发生有一定的相关性. 通过进一步的深入研究将对反流性食管炎的发病机制、诊断、治疗依据提供新思路、新方法.

2.2 胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)

2.2.1 CCK与LES CCK使胃肠平滑肌兴奋和收缩LES等.

2.2.2 CCK与LESP及TLESR 动物实验证实犬静脉注入CCK对基础LESP无影响, 但是增加TLESR并有剂量依赖关系. 在犬胃膨胀之前静脉注入CCK拮抗剂devazepide则可明显减少TLESR.

2.2.3 CCK在RE发病中的机制[24] CCK在活体减少LESP是通过内源性激素来实现的, 而内源性CCK加强餐后胃食管反流是通过增加TLESR频率和降低餐后LESP来实现的, CCK拮抗剂减少TLESR是通过外周CCK-A受体途径实现的[25-26]. 但Huang[27]认为CCK分子形式不同, 作用的受体不同, 对LESP的影响也不同. 另有实验证明, 左旋精氨酸甲酯(L-NAME)能使CCK诱发的TLFSR速率增加, 因此NO可能是CCK神经作用的一种介质, CCK对LES的松弛作用可能与促进局部神经释放VIP和NO有关.

2.3 生长抑素(somatostatin, SS)

2.3.1 SS与LES 生理剂量的SS可刺激食管收缩, 降低LESP, 并可抑制GAS, MTL等胃肠激素的分泌.

2.3.2 SS在RE患者血液中的变化 Barrioz *et al*[28]报道SS对正常人的LESP无影响, 但可显著增加肝硬化食道静脉曲张患者的LESP而降低门脉压. 许树长 *et al*[29]研究发现RE患者血浆SS明显高于健康志愿者, 考虑为SS含量增加可能继发于胃窦和十二指肠的低pH值, 增加的SS又可抑制GAS, MTL等的分泌, 从而在RE的发病中发挥作用.

2.3.3 SS在RE发病中的机制 在中枢神经系统SS可作用于迷走神经运动核内受体5, 通过胆碱能传入纤维作用于胃肠道, 也可通过其他神经元间接作用于平滑肌来增加抑制性神经元活动. SS选择性抑制LES中的兴奋性神经元、VIP, 抑制蛙皮素但不抑制SP或乌拉胆碱引起的LES收缩.

2.4 阿片肽(opioid peptide, OP)

2.4.1 OP与LES OP主要存在于中枢和整个胃肠道, 胃肠道的OP主要为甲啡肽、亮啡肽和少量强啡肽[30], 其作用的受体不同对LES产生的作用不同.

2.4.2 OP在RE发病中的机制 阿片肽有四型受体: σ, δ, μ, κ. 他只存在于环肌细胞, 纵肌没有阿片受体. 阿片直接作用于σ和δ受体促使乙酰胆碱的释放, 使LES收缩; 作用于μ和κ受体抑制LES收缩. 有研究证实吗啡可使LESP下降, 其拮抗剂纳络酮可使LESP升高, Penagini *et al*[31]证实阿片受体激动剂洛哌丁胺对RE的发生没有作用, 推测吗啡通过中枢神经机制抑制TLESR.

2.5 降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)

2.5.1 CGRP与LES CGRP广泛分布于神经系统和胃肠道组织中, 松弛LES.

2.5.2 CGRP在RE发病中的机制 有学者[32]研究负鼠食管平滑肌CGRP与LES的关系, 结果显示CGRP可松弛LES, 而其拮抗剂CGRP 8-37能抑制外源性CGRP的作用, 认为CGRP直接作用于LES使其松弛. 但Farre *et al*[33]研究显示CGRP对猪的LES无松弛作用.

2.6 一氧化氮(nitric oxide, NO)

2.6.1 NO与LES 近年来的研究证实, NO为肠神经系统中非肾上腺素能、非胆碱能神经(NANC)的主要抑制性神经递质, 在食管神经肌肉的调控中发挥重要作用[34], 由NOS介导生成. 有人报道, 贲门失弛缓症患者LES内缺乏NOS[35]. 还有研究表明, NO是重要的炎症介质[36]. 另有研究显示, NO含量减少时, LESP升高[37]. 王薇 *et al*[19]也证实LESP与NO呈负相关.

2.6.2 NO在RE发病中的机制[19] 一方面一氧化氮可能是TLESR的启动因子[38-39], 激活鸟苷环化酶, 使环磷鸟苷增加, 降低细胞内钙离子浓度或对钙离子的敏感性, 引起肌肉松弛, 从而使LES松弛; 另一方面使依赖cGMP的蛋白激酶活性上升, 促使蛋白磷酸化使肌肉松弛, 从而使LES松弛; 此外一氧化氮又是一种炎性递质, 可与超氧化物反应产生过氧化亚硝酸盐, 后者可加速脂类等化合物氧化反应, 引起食管炎症反应[40]. 一氧化氮与血管活性肠肽的相互作用[41]: 研究发现人类食管中NOS阳性的氮能神经元是VIP神经元的5倍, 大约50% VIP阳性的神经元和神经纤维同时存在NO和VIP, VIP通过释放平滑肌的NO而起作用, NO作为信使分子对VIP的释放及作用进行调解. VIP的释放能被NOS抑制剂L-NNA强烈抑制, NO的产生也可被VIP拮抗剂所抑制, NO因VIP作用于肌细胞而产生, 两者呈正相关, 两者相互影响、相互作用, 共同参与RE的病理生理过程.

2.7 一氧化碳(carbon monoxide, CO)

2.7.1 CO与LES Ny *et al*[42]研究猫LES时发现, 血红素氧合酶-1(HO-1)仅在一些平滑肌散在分布的非神经元结构中存在活性, 而在黏膜下神经丛和肌间神经丛中均发现了血红素氧合酶-2(HO-2)的免疫活性, 且与NOS及VIP有近50%的重叠. 进一步的研究[43-45]还表明, 猪离体LES在不同浓度一氧化碳的影响下呈现出明显的浓度依赖性舒张, 并伴随着cGMP浓度的升高, 而cAMP浓度改变则不明显.

2.7.2 CO在RE发病中的机制[46-47] 有学者认为CO通过sGC-cGMP途径发挥舒张平滑肌效应, 此外此效应在体外可被亚甲蓝所抑制, 推测可能是阻滞了钙离子激活的钾离子通道所致, 提示CO可通过调节细胞内钾离子外流发挥其效应. 而Farre *et al*[33]研究猪的LES运动时认为, CO与VIP在LES松弛中起次要作用, 主要是硝基能和嘌呤能起主要作用. CO在LES中的作用还需进一步探讨.

总之, 虽然关于胃肠激素在反流食管炎病理生理过程中的作用做了大量的研究, 但要彻底揭开他们与反流食管炎的关系还有待于进一步的研究. 这必将有助于阐明反流性食管炎的发病机制并为其治疗提供新思路、新策略.

■**名词解释**

一过性食管下段括约肌松弛(TLESR): 是指与吞咽无关的短时间食管下括约肌松弛(压力降至胃内压水平并持续至少10 s). 虽然TLESR也发生于健康人, 且与胃扩张、进食有关. 但反流性食管炎患者TLESR发生的频率较健康人高. 在TLESR过程中, 当LES的压力下降至0时, LES就不再具有抗反流的屏障功能. 目前认为一过性食管下段括约肌松弛是引起反流的最主要发病机制.

3 参考文献

1 李兆申, 徐晓蓉, 许国铭, 邹多武, 孙振兴, 王雯, 叶萍, 陆建萍. 反流性食管炎的临床特征分析. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 315-318

2 雷贝拉唑多中心临床协作组. 反流性食管炎患者的症状特征及雷贝拉唑治疗疗效的多中心评估. 中华消化杂志 2005; 25: 363-365

3 Scheffer RC, Wassenaar EB, Herwaarden MA, Holloway RH, Samsom M, Smout AJ, Akkermans LM. Relationship between the mechanism of gastro-oesophageal reflux and oesophageal acid exposure in patients with reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 654-662

4 Boeckxstaens GE, Hirsch DP, Verkleij CB, Lei A, Holman R, Lehmann A, Rydholm H. Reproducibility of meal-induced transient lower oesophageal sphincter relaxations in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 23-28

5 Piche T, Galmiche JP. Pharmacological targets in gastro-oesophageal reflux disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97: 333-341

6 Frisby CL, Mattsson JP, Jensen JM, Lehmann A, Dent J, Blackshaw LA. Inhibition of transient lower esophageal sphincter relaxation and gastroesophageal reflux by metabotropic glutamate receptor ligands. *Gastroenterology* 2005; 129: 995-1004

7 Boeckxstaens GE. The lower oesophageal sphincter.

■同行评价
本文较全面地阐述了胃肠激素与反流性食管炎的关系，有一定可读性、临床价值和指导意义.

Neurogastroenterol Motil 2005; 17 Suppl 1: 13-21
8 Zou D, Chen WH, Iwakiri K, Rigda R, Tippett M, Holloway RH. Inhibition of transient lower esophageal sphincter relaxations by electrical acupoint stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G197-201
9 李甫棒, 赵泓, 周雪莲, 郑季彦, 黄晓磊, 欧弼悠, 章许平, 徐亚萍. 小儿胃食管反流病与食管功能及胃肠激素的关系. 浙江预防医学 2005; 17: 11-13
10 Allescher HD, Stoschus B, Wunsch E, Schusdziarra V, Classen M. Effect of human gastrin-17 with and without acid suppression on human esophageal motility. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 385-391
11 夏金荣, 张忠兵, 汪毅, 缪才良, 沈琰, 孔梅, 汤永祥. NO、VIP和SP在反流性食管炎中的病理生理学作用. 临床消化病杂志 2002; 14: 198-200
12 Masclee AA, Lam WF, Lamers CB. Effect of bombesin on esophageal motility in humans. *Dis Esophagus* 1999; 12: 54-59
13 Aoki T, Hanyu N, Yanai S. Diagnosis using esophageal manometry and various loading tests. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2000; 101: 333-335
14 Perdikis G, Wilson P, Hinder RA, Redmond EJ, Wetscher GJ, Saeki S, Adrian TE. Gastroesophageal reflux disease is associated with enteric hormone abnormalities. *Am J Surg* 1994; 167: 186-191; discussion 191-192
15 真岩波, 张淑红, 孙晓辉. 反流性食管炎患者血浆胃动素、胃排空时间相关性研究. 临床荟萃 2003; 18: 1149-1150
16 Guelrud M, Rossiter A, Souney PF, Rossiter G, Fanikos J, Mujica V. The effect of vasoactive intestinal polypeptide on the lower esophageal sphincter in achalasia. *Gastroenterology* 1992; 103: 377-382
17 Rossiter A, Guelrud M, Souney PF, Mendoza S, Rossiter G, Gelrud D. High vasoactive intestinal polypeptide plasma levels in patients with Barrett's esophagus. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 572-576
18 Kassim SK, El Touny M, El Guinaidy M, El Moghni MA, El Mohsen AA. Serum nitrates and vasoactive intestinal peptide in patients with gastroesophageal reflux disease. *Clin Biochem* 2002; 35: 641-646
19 王薇, 付亮, 高欣, 李铭, 许乐. 胆汁反流与食管下端括约肌组织中一氧化氮及血管活性肠肽的关系. 中国综合临床 2005; 21: 134-136
20 李景南, 钱家鸣. 胃肠激素与消化系疾病. 中华消化杂志 2005; 25: 253-254
21 Dick JM, Van Geldre LA, Timmermans JP, Lefebvre RA. Investigation of the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig gastric fundus. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 751-763
22 Dick JM, Van Molle W, Brouckaert P, Lefebvre RA. Relaxation by vasoactive intestinal polypeptide in the gastric fundus of nitric oxide synthase-deficient mice. *J Physiol* 2002; 538: 133-143
23 Van Geldre LA, Lefebvre RA. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2483-2497
24 刘玉成, 张正. 胃肠激素与食管运动. 职业卫生与病伤 2002; 17: 41-42
25 Gonzalez AA, Farre R, Mones J, Capella G, Clave P. Pharmacological and molecular characterization of muscular cholecystokinin receptors in the human lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 539-546
26 Hirsch DP, Mathus-Vliegen EM, Holloway RH, Fakhry N, D'Amato M, Boeckxstaens GE. Role of CCK(A) receptors in postprandial lower esophageal sphincter function in morbidly obese subjects. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2531-2537
27 Huang SC. Functional CCK-A and Y2 receptors in guinea pig esophagus. *Regul Pept* 2000; 88: 55-60
28 Barrioz T, Borderie C, Strock P, Ingrand P, Fort E, Silvain C, Beauchant M. Effects of octreotide on lower esophageal sphincter in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1566-1571
29 许树长, 陈锡美, 胡运彪, 戈之铮. 反流性食管炎患者血GAS、MTL、VIP、SS含量变化及其意义. 上海铁道大学学报 1999; 20: 12-14
30 莫剑忠, 王承觉. 胃肠激素对胃运动的调节作用. 中华消化杂志 2005; 25: 379-381
31 Penagini R, Allocca M, Cantu P, Mangano M, Savojardo D, Carmagnola S, Bianchi PA. Relationship between motor function of the proximal stomach and transient lower oesophageal sphincter relaxation after morphine. *Gut* 2004; 53: 1227-1231
32 Uc A, Murray JA, Conklin JL. Effects of calcitonin gene-related peptide on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* 1997; 113: 514-520
33 Farre R, Auli M, Lecea B, Martinez E, Clave P. Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1238-1248
34 Brisinda G, Civello IM, Albanese A, Maria G. Gastrointestinal smooth muscles and sphincters spasms: treatment with botulinum neurotoxin. *Curr Med Chem* 2003; 10: 603-623
35 Mearin F, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S, Malagelada JR. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 724-728
36 Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 903-913
37 Mearin F, Vasconez C, Zarate N, Malagelada JR. Esophageal tone in patients with total aperistalsis: gastroesophageal reflux disease versus achalasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G374-379
38 Hirsch DP, Tiel-Van Buul MM, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Effect of L-NMMA on postprandial transient lower esophageal sphincter relaxations in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2069-2075
39 胡运彪, 许树长, 戴军, 莫剑忠. 一氧化氮在实验性反流性食管炎发病机制中的作用. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 331-333
40 Liu B. Effects of nitric oxide synthase inhibitor to esophagus in a feline esophagitis model. *Dis Esophagus* 2003; 16: 312-314
41 于凤海, 李兆申, 许国铭. 一氧化氮、血管活性肽与反流性食管炎. 中华消化杂志 2001; 21: 430-432
42 Ny L, Grundemar L, Larsson B, Alm P, Ekstrom P, Andersson KE. Carbon monoxide as a putative messenger molecule in the feline lower oesophageal sphincter of the cat. *Neuroreport* 1995; 6: 1389-1393
43 Ny L, Alm P, Ekstrom P, Larsson B, Grundemar L, Andersson KE. Localization and activity of haem oxygenase and functional effects of carbon mono-

xide in the feline lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 392-399
44 Ny L, Alm P, Larsson B, Andersson KE. Morphological relations between haem oxygenases, NO-synthase and VIP in the canine and feline gastrointestinal tracts. *J Auton Nerv Syst* 1997; 65: 49-56
45 Werkstrom V, Ny L, Persson K, Andersson KE. Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 312-318
46 朱珉, 魏明发, 王果. 一氧化碳和胃肠道平滑肌的关系. 中华小儿外科杂志 2002; 23: 558-560
47 Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556: 325-336

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1502-1506
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

生物活性食物成份与消化系肿瘤

丁雯瑾, 孙丹凤, 房静远

■背景资料
消化道肿瘤为最常见的肿瘤之一, 随着人民生活水平的提高和工业化城市化进程, 其发病率和死亡率逐步提高, 因此胃癌, 结直肠癌的防治日益受到重视. 除了遗传因素和环境因素外, 消化道肿瘤与饮食、营养物质等密切联系.

丁雯瑾, 孙丹凤, 房静远, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科 上海市 200001
通讯作者: 房静远, 200001, 上海市山东中路145号, 上海市消化疾病研究所. Jingyuanfang@yahoo.com
电话: 021-63200874 传真: 021-63266027
收稿日期: 2006-03-24 接受日期: 2006-04-20

摘要
消化道肿瘤为最常见的肿瘤之一, 随着人民生活水平的提高和工业化城市化进程, 其发病率和死亡率逐步提高, 因此胃癌, 结直肠癌的防治日益受到重视. 除了遗传因素和环境因素外, 消化道肿瘤与饮食、营养物质等密切联系. 生物活性食物成份不仅满足人体必需的营养物质, 而且可以影响身体健康状况. 目前研究已表明, 生物活性食物成份中含有的抗氧化维生素、硒、纤维素等对于消化道肿瘤具有有效的防治作用. 现将对这些营养成份的作用及其机制的研究进展作一综述.

关键词: 生物活性食物成份; 消化道肿瘤; 维生素; 硒; 纤维素

丁雯瑾, 孙丹凤, 房静远. 生物活性食物成份与消化系肿瘤. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1502-1506
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1502.asp

0 引言
消化道肿瘤发病率高, 危害性大. 其中胃腺癌是包括中国在内的亚洲国家中最常见的癌症[1]. 在美国大肠癌患者5 a生存率仅为62%, 成为美国第二大死亡病因[2]. 因此消化道肿瘤的预防和治疗成为研究热点. 目前认为除遗传因素、环境因素外, 饮食中的营养物质也与肿瘤的发生有关[3-5], 其中叶酸、抗氧化维生素、微量元素硒等可降低癌症的发生[6-7]. 将这种既能满足人体必需的营养成份又有益于身体健康的食物成份称为生物活性食物成份[8]. 通过研究生物活性食物成份的作用机制可有效地预防肿瘤, 或与传统的抗肿瘤药物合用以加强疗效.

1 维生素
胃癌的发生与饮食有一定的联系, 其中就包括维生素的摄入量[9-12]. 在一项中国舟山的病例对照研究中发现高蛋白、高饱和脂肪酸、高胆固醇的饮食者胃癌发生率较高, 而维生素A, 不饱和脂肪酸及维生素C, 维生素E是胃癌发生的保护因素[13-15]. Kim *et al*[9]发现饮食中高摄入植物油、叶酸、抗氧化剂(维生素A, 维生素C, 维生素E)是胃癌的保护因素. 对于*H pylori*感染者, 维生素A, C, E的摄入量与胃癌发生率呈负相关, 当长期大量摄入以上2种或3种维生素时, 这种负相关性更明显. 因此鼓励*H pylori*感染者多摄入抗氧化维生素.

胃癌细胞中全反式维甲酸(ATRA)影响肿瘤相关蛋白p62的表达[16-17]. 在实验细胞中p62多浓缩于胞质基质, 经5 d 50 mmol/L ATRA处理后细胞生长受抑制, 不仅p62表达下降, 蛋白也由胞质易位至胞核. p62与IGF-Ⅱ mRNA结合表明他可能参与IGF-Ⅱ mRNA转录后过程, 并调节IGF-Ⅱ的表达使细胞增殖. 通常认为维生素A在代谢、ATRA作用下通过视黄酸受体(RAR)与维甲酸反应元件(RARE)介导基因转录[18], 目前存在一定争议. Park及其同事研究维生素A在HCT-15(ATRA敏感)、HCT-116(ATRA抵抗)癌细胞株中的抑制能力, 未检测到维生素A代谢生成的ATRA或活化的类维生素A类. 尽管HCT-116, WiDR细胞中有少量维生素A转变为ATRA, 却不至于抑制细胞生长. 因此认为维生素A是通过新的非依赖于RAR机制来抑制自细胞生长, 主要是影响细胞周期, 而不是直接诱导凋亡、分化和坏死. 既然维生素A与胃癌发生关系密切, 那么其不同衍生物对胃癌影响有多大区别呢? 以瑞士雌鼠为例, 用苯并芘诱发贲门癌, 同时比较维生素A1、复合物及类胡萝卜素的抗癌效果, 结果发现胡萝卜醇、维生素A2抗癌效果更甚, 但其最佳剂量与肿瘤抑制的相关性还需进一步实验证明[19].

对于结直肠腺癌, 血浆中维生素A、维生素E浓度同样也有防治作用[20], 这种防治作用似乎与性别有关, 男性患者效果更明显[21-23]. Wakai *et al*[22]检测了116例大肠癌患者血清中的微量元

素, 发现男性血清中类胡萝卜素水平较高者发病率较低, 女性中结果相反. 同时发现血清中维生素A能降低男女性患病率, 而维生素E只对男性明显. 目前维生素A及其代谢形式ATRA治疗肿瘤已取得良好效果, 但却易引起“维生素A过多综合征”、患者产生耐药性等. 为了克服这些问题现已合成并实验了多种类视黄醇衍生物, 5-羟基-11-O-水解菲(ⅡF)为其中之一[24]. 不同致癌度下试验ⅡF在CaCo-2、HT-29细胞株内对细胞生长、分化所产生的作用, 发现他不仅具有更强的抗增殖效果, 并能诱导细胞分化, 故而表明ⅡF可作为治疗结肠癌的药物之一.

许多研究资料认为, 补充抗氧化剂不仅可以降低消化道肿瘤的发生率, 而且可降低其死亡率[25-27], 其效果与患者的基础疾病有关[28]. 对于无烟酒嗜好者而言, 类胡萝卜素、维生素A还可降低腺瘤性息肉复发[29]. 但也有研究表明抗氧化剂(维生素A, 维生素E, 类胡萝卜素等)对胃肠肿瘤无明显预防效果, 甚至使死亡率上升[30-31].

2 硒

大量资料表明, 在肠癌、肝癌高发地区, 土壤中微量元素硒较一般地区为低. 硒是一种具有较强抗氧化性的微量元素, 能防止DNA受损[32], 高血清硒可减低缺硒人群中上消化道肿瘤的发生[33-35]. 在对伊朗四省胃癌发病率与血清硒水平的研究[36]中发现, 胃癌高发区Ardabil人群中血清硒>90 mg/L仅有29%, 余省达到了100%. Jacobs *et al*[37]在调查了1763为受试者后发现血清硒含量高者患大肠腺癌风险较低. 在中国同样有资料表明, 血清硒浓度与胃贲门癌、食管鳞状细胞癌有关[38].

硒降低癌症发生率与细胞溶质中谷胱甘肽过氧化酶(GPX1)有关. GPX1是含硒的抗氧化酶, 当其位点上等位基因缺失后会诱发癌症. Hu *et al*[39]检测出肿瘤组织DNA的GPX1杂合子丢失率达到42%. 此外, 含硒蛋白质SelP、胃肠道GPX在正常人群的肠黏膜上表达比患者丰富, 有种假设认为是SelP的下调释放部分Se以结合GI-GPX, 抵抗活性氧簇(ROS)对DNA破坏, 增强对细胞的保护. 硒影响肿瘤形成的机制还包括基因启动子的甲基化、多不饱和脂肪酸代谢等[40]. 肿瘤形成过程中DNMT1表达增强, 出现CpG岛的高甲基化, 导致甲基化表达紊乱, 硒可抑制DNMT1在HCT116、HT29等各种细胞系中的表达, 从而抑制细胞生长. 研究还发现硒与参与结直肠肿瘤形成的脂肪氧化酶(LOXS)有关.

环氧化酶COX1、COX2是前列腺素合成的主要酶, 在近80%的大肠癌(CRC)患者中过度表达. 人工合成的无机硒(p-XSC)在蛋白转录后调节COX2活性, 显著降低APC小鼠肠道肿瘤形成, 并与剂量相关, 加用二十二碳六烯酸(DHA)可达协同作用[41]. COX的脂质产物PGE2通过表皮生长因子受体(EGFR)介导产生诱癌作用. 硒蛋氨酸可通过降低HCA-7等细胞中COX-2蛋白、PEG2蛋白水平, 抑制HCA-7, HT-29, Caco-pcDNA, Caco-60四个结肠癌细胞系. 近几年COX2抑制剂成为防治CRC的新途径. 免疫调节剂西妥昔单抗是嵌合体IgG1单克隆抗体, 与EGFR高度特异性结合阻断其配位体诱导的磷酸化. 当补充硒后可提高西妥昔单抗在CRC患者中的疗效[42]. Frank *et al*[43]将含硒酵母(200 mg/d)与塞来考昔(400 mg/d)结合使用, 受试者随机分为2组(含硒酵母+塞来考昔; 安慰剂+塞来考昔), 进行为期6 wk实验研究, 检测2, 4, 6 wk受试者的血样和毒性, 结果发现两组塞来考昔的血药浓度并无显著差异, 试验组也无不适主诉. 用含硒复合物处理被HCT-8, HT-29嫁接的无胸腺裸小鼠发现硒不仅具有抗癌作用, 还能高度抵抗由化疗因子引起的毒性作用[44].

大型随机化临床试验即流行病学研究表明微量元素硒可降低结直肠瘤的形成[45-46], 但其防治CRC的最佳剂量、起始时间、持续时间、潜在危害以及性别差异尚无定论[47-48]. 其次, 尽管硒的复合物用于临床防治具有广阔前景[49], 但有些也具有一定副作用. 如研究发现Na_2SeO_3易使胃黏膜损害、出血, 促进肠化生, 其机制可能与壁细胞有关[50].

3 纤维素

纤维素可简单定义为食物中不被人体消化、吸收的成份[51], 研究认为他能有选择性地促进人体肠道中菌群的生长与活性, 并促进肠道蠕动. 绝大多数可发酵的碳水化合物及部分寡糖就属于这类物质[52]. 肠道菌群是结肠癌危险因素之一, 通过食物纤维素改变其组成与代谢活性, 可使大肠癌发病率降低[53-54], 作用效果与性别有关[55], Jacobs *et al*[56]发现男性更受益. 有研究证实长期食富含纤维素者患大肠癌比低纤维饮食者降低25%[57-58]. 其机制可能包括调节代谢活性和/或解毒作用, 促进丁酸盐等短链脂肪酸生成以改变外源性诱癌因素.

■研发前沿

生物活性食物成份不仅满足人体必需的营养物质, 而且可以影响身体健康状况. 目前研究已表明, 生物活性食物成份中含有的抗氧化维生素、硒、纤维素等对于消化道肿瘤具有有效的防治作用.

■应用要点
通过研究生物活性食物成份的作用机制可有效地预防肿瘤, 或与传统的抗肿瘤药物合用以加强疗效.

丁酸盐等短链脂肪酸可通过抑制组蛋白去乙酰化来抑制细胞增殖、促进分化与凋亡[59]. p21诱导的细胞生长抑制是通过组织蛋白高乙酰化发生的: 一方面丁酸盐可抑制组蛋白去乙酰化, 提高组蛋白乙酰化水平, 使稳定高表达的p21基因抑制癌细胞生长; 另一方面在p21缺乏的HCT116结肠癌细胞中, 丁酸盐无法通过改变组蛋白乙酰化水平抑制细胞生长. 因此p21在丁酸盐诱导大肠癌细胞生长过程中起着重要作用[60-61].

有些文献认为, p21的过度表达与特定胃癌病理有关, 癌细胞中p21的免疫活性在胃腺癌过程中具有预测作用[62]. 丁酸钠(NaBT)能减低细胞增殖使其在48 h内发生凋亡, Tsai *et al*[63]发现NaBT诱导胃癌TMK-1细胞的凋亡与c-Myc, c-Jun, Bc1-xs蛋白有关. c-Jun蛋白的诱导先于DNA断裂, NaBT能显著诱导c-Jun, Bc1-xs蛋白水平, 并明显降低c-Myc蛋白水平. 此外根据对β2相关基因表达的研究发现, 随着NaBT的增多, Bc1-xs蛋白水平也上升. 研究同样表明, 地塞米松可降低NaBT作用. NaBT可诱导凋亡以抑制SⅡA胃癌细胞增殖, 该过程与细胞周期抑制因子p21 Waf1/Cip1, p27Kip1及调节前体蛋白Bar、Bak和Bik有关, 因而NaBT可作为胃癌诱导的辅助因子[64-65].

现代分析技术发现纤维素还具有改变宿主肠黏膜的功能. 然而也有些Ⅱ期、Ⅲ期实验发现纤维素的补充对癌症的预防没有太大效果[66-67], 甚至可使腺癌复发率上升.

还有大量文献报道了叶酸、钙等可有效地降低结直肠癌的发生[68-70]. 前者是通过影响DNA甲基化的表达[71], 后者与患者维生素D的状态有关[72-73]. 此外, 也发现牛乳、人乳中含有的α-乳清蛋白在结肠腺癌细胞株中具有抗细胞增殖作用[74], 但也影响部分人群的消化功能[75], 产生乳糜泻等[76].

4 参考文献

1 He QY, Cheung YH, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Chiu JF. Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics* 2004; 4: 3276-3287
2 Hawk ET, Levin B. Colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol* 2005; 23: 378-391
3 Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis* 2005; 26: 1450-1456
4 De Stefani E, Correa P, Boffetta P, Ronco A, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M. Plant foods and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10: 357-364
5 Lynn A, Collins A, Fuller Z, Hillman K, Ratcliffe B. Cruciferous vegetables and colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 135-144
6 Penner R, Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 596-603
7 Davis CD, Hord NG. Nutritional "omics" technologies for elucidating the role(s) of bioactive food components in colon cancer prevention. *J Nutr* 2005; 135: 2694-2697
8 Ferguson LR. Nutrigenomics: integrating genomic approaches into nutrition research. *Mol Diagn Ther* 2006; 10: 101-108
9 Kim HJ, Kim MK, Chang WK, Choi HS, Choi BY, Lee SS. Effect of nutrient intake and Helicobacter pylori infection on gastric cancer in Korea: a case-control study. *Nutr Cancer* 2005; 52: 138-146
10 Qiu JL, Chen K, Zheng JN, Wang JY, Zhang LJ, Sui LM. Nutritional factors and gastric cancer in Zhoushan Islands, China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4311-4316
11 Yuan JM, Ross RK, Gao YT, Qu YH, Chu XD, Yu MC. Prediagnostic levels of serum micronutrients in relation to risk of gastric cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1772-1780
12 Okazaki K, Ishii Y, Kitamura Y, Maruyama S, Umemura T, Miyauchi M, Yamagishi M, Imazawa T, Nishikawa A, Yoshimura Y, Nakazawa H, Hirose M. Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Sci* 2006; 97: 175-182
13 Meyerhardt JA, Heseltine D, Campos H, Holmes MD, Willett WC, Winer EP, Enzinger PC, Bunnell CA, Kulke MH, Fuchs CS. Assessment of a dietary questionnaire in cancer patients receiving cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8453-8460
14 Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Qui M, Whaley SG, Yang H. Tocopherols and the treatment of colon cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 223-233
15 Mozsik G, Rumi G, Domotor A, Figler M, Gasztonyi B, Papp E, Par A, Par G, Belagyi J, Matus Z, Melegh B. Involvement of serum retinoids and Leiden mutation in patients with esophageal, gastric, liver, pancreatic, and colorectal cancers in Hungary. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7646-7650
16 Shi P, Huang Z, Wang S, Zhang J, Peng X. Effects of ATRA on expression of mRNA binding protein p62 in human gastric cancer cells. *Cell Biol Int* 2005; 29: 127-131
17 Ping S, Wang S, Zhang J, Peng X. Effect of all-trans-retinoic acid on mRNA binding protein p62 in human gastric cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 616-627
18 Park EY, Dillard A, Williams EA, Wilder ET, Pepper MR, Lane MA. Retinol inhibits the growth of all-trans-retinoic acid-sensitive and all-trans-retinoic acid-resistant colon cancer cells through a retinoic acid receptor-independent mechanism. *Cancer Res* 2005; 65: 9923-9933
19 Goswami UC, Sharma N. Efficiency of a few

retinoids and carotenoids *in vivo* in controlling benzo[a]pyrene-induced forestomach tumour in female Swiss mice. *Br J Nutr* 2005; 94: 540-543
20 Nouraie M, Pietinen P, Kamangar F, Dawsey SM, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR. Fruits, vegetables, and antioxidants and risk of gastric cancer among male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2087-2092
21 Jiang J, Suzuki S, Xiang J, Kuriki K, Hosono A, Arakawa K, Wang J, Nagaya T, Kojima M, Katsuda N, Tokudome S. Plasma carotenoid, alpha-tocopherol and retinol concentrations and risk of colorectal adenomas: A case-control study in Japan. *Cancer Lett* 2005; 226: 133-141
22 Wakai K, Suzuki K, Ito Y, Kojima M, Tamakoshi K, Watanabe Y, Toyoshima H, Hayakawa N, Hashimoto S, Tokudome S, Suzuki S, Kawado M, Ozasa K, Tamakoshi A. Serum carotenoids, retinol, and tocopherols, and colorectal cancer risk in a Japanese cohort: effect modification by sex for carotenoids. *Nutr Cancer* 2005; 51: 13-24
23 Musil F, Zadak Z, Solichova D, Hyspler R, Kaska M, Sobotka L, Manak J. Dynamics of antioxidants in patients with acute pancreatitis and in patients operated for colorectal cancer: a clinical study. *Nutrition* 2005; 21: 118-124
24 Bartolini G, Ammar K, Mantovani B, Scanabissi F, Ferreri AM, Rocchi P, Orlandi M. Retinoids and cancer: antitumor effect of ATRA and of a new derivative of retinoic acid, IIF, on colon carcinoma cell lines CaCo-2 and HT-29. *Anticancer Res* 2004; 24: 1779-1783
25 Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2004; 364: 1219-1228
26 Taylor PR, Qiao YL, Abnet CC, Dawsey SM, Yang CS, Gunter EW, Wang W, Blot WJ, Dong ZW, Mark SD. Prospective study of serum vitamin E levels and esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1414-1416
27 Abdel-Latif MM, Raouf AA, Sabra K, Kelleher D, Reynolds JV. Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells *in vitro*. *J Chemother* 2005; 17: 539-549
28 Rosman-Urbach M, Niv Y, Birk Y, Morgenstern S, Schwartz B. Relationship between nutritional habits adopted by ulcerative colitis relevant to cancer development patients at clinical remission stages and molecular-genetic parameters. *Br J Nutr* 2006; 95: 188-195
29 Steck-Scott S, Forman MR, Sowell A, Borkowf CB, Albert PS, Slattery M, Brewer B, Caan B, Paskett E, Iber F, Kikendall W, Marshall J, Shike M, Weissfeld J, Snyder K, Schatzkin A, Lanza E. Carotenoids, vitamin A and risk of adenomatous polyp recurrence in the polyp prevention trial. *Int J Cancer* 2004; 112: 295-305
30 Fischer JL, Lancia JK, Mathur A, Smith ML. Selenium protection from DNA damage involves a Ref1/p53/Brca1 protein complex. *Anticancer Res* 2006; 26: 899-904
31 Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD004183
32 Friedrich MJ. To "E" or not to "E," vitamin E's role in health and disease is the question. *JAMA* 2004; 292: 671-673
33 Verma A, Atten MJ, Attar BM, Holian O. Selenomethionine stimulates MAPK (ERK) phosphorylation, protein oxidation, and DNA synthesis in gastric cancer cells. *Nutr Cancer* 2004; 49: 184-190
34 Finley JW. Reduction of cancer risk by consumption of selenium-enriched plants: enrichment of broccoli with selenium increases the anticarcinogenic properties of broccoli. *J Med Food* 2003; 6: 19-26
35 Gail MH, You WC. A factorial trial including garlic supplements assesses effect in reducing precancerous gastric lesions. *J Nutr* 2006; 136: 813S-815S
36 Nouarie M, Pourshams A, Kamangar F, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Akbari MR, Fakheri H, Zahedi MJ, Caldwell K, Abnet CC, Taylor PR, Malekzadeh R, Dawsey SM. Ecologic study of serum selenium and upper gastrointestinal cancers in Iran. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2544-2546
37 Jacobs ET, Jiang R, Alberts DS, Greenberg ER, Gunter EW, Karagas MR, Lanza E, Ratnasinghe L, Reid ME, Schatzkin A, Smith-Warner SA, Wallace K, Martinez ME. Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1669-1675
38 Wei WQ, Abnet CC, Qiao YL, Dawsey SM, Dong ZW, Sun XD, Fan JH, Gunter EW, Taylor PR, Mark SD. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 80-85
39 Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AM. Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* 2005; 135: 3021S-3024S
40 Duffield-Lillico AJ, Shureiqi I, Lippman SM. Can selenium prevent colorectal cancer? A signpost from epidemiology. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1645-1647
41 Altundag K, Silay YS, Altundag O, Yigitbasi OG, Gundeslioglu O, Gunduz M. Selenium supplementation may increase the efficacy of cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Med Hypotheses* 2005; 64: 1162-1165
42 Cao S, Durrani FA, Rustum YM. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2561-2569
43 Frank DH, Roe DJ, Chow HH, Guillen JM, Choquette K, Gracie D, Francis J, Fish A, Alberts DS. Effects of a high-selenium yeast supplement on celecoxib plasma levels: a randomized phase II trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 299-303
44 Gill S, Sinicrope FA. Colorectal cancer prevention: is an ounce of prevention worth a pound of cure? *Semin Oncol* 2005; 32: 24-34
45 Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Sunga A, Fakih M, Alberts DS, Marshall JR. Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int J Cancer* 2006; 118: 1777-1781
46 Vermel' AE. Pharmacological capacities of the prevention of colorectal cancer. *Klin Med (Mosk)* 2004; 82: 39-44
47 Li H, Li HQ, Wang Y, Xu HX, Fan WT, Wang ML, Sun PH, Xie XY. An intervention study to prevent gastric cancer by micro-selenium and large dose of allitridum. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1155-1160
48 Verma A, Atten MJ, Attar BM, Holian O. Selenomethionine stimulates MAPK (ERK) phosphorylation, protein oxidation, and DNA synthesis in gastric

■同行评价

文章系统综述了生物活性食物成分在消化道肿瘤发生中的作用, 选题新颖, 研究方向独特, 同时在临床工作中有较好的实用性. 文章中各因素的作用机制讲述详细, 有一定深度.

cancer cells. *Nutr Cancer* 2004; 49: 184-190
49 Mego M, Majek J, Koncekova R, Ebringer L, Ciernikova S, Rauko P, Kovac M, Trupl J, Slezak P, Zajac V. Intramucosal bacteria in colon cancer and their elimination by probiotic strain Enterococcus faecium M-74 with organic selenium. *Folia Microbiol (Praha)* 2005; 50: 443-447
50 Su YP, Tang JM, Tang Y, Gao HY. Histological and ultrastructural changes induced by selenium in early experimental gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4457-4460
51 Hawk ET, Umar A, Viner JL. Colorectal cancer chemoprevention-an overview of the science. *Gastroenterology* 2004; 126: 1423-1447
52 Lim CC, Ferguson LR, Tannock GW. Dietary fibres as "prebiotics": implications for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 609-619
53 Ahmed FE. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2004; 22: 91-147
54 Bingham S. The fibre-folate debate in colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 19-23
55 Johnson SK, Chua V, Hall RS, Baxter AL. Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. *Br J Nutr* 2006; 95: 372-378
56 Jacobs ET, Lanza E, Alberts DS, Hsu CH, Jiang R, Schatzkin A, Thompson PA, Martinez ME. Fiber, sex, and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 343-349
57 Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496-1501
58 Ferguson LR, Karunasinghe N, Philpott M. Epigenetic events and protection from colon cancer in New Zealand. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44: 36-43
59 Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Growth properties of colonic tumor cells are a function of the intrinsic mitochondrial membrane potential. *Cancer Res* 2006; 66: 1591-1596
60 Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6791-6796
61 Goldstein NS. Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 146-153
62 Baldus SE, Schneider PM, Monig SP, Zirbes TK, Fromm S, Meyer W, Glossmann J, Schuler S, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. p21/waf1/cip1 in gastric cancer: associations with histopathological subtypes, lymphonodal metastasis, prognosis and p53 status. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 975-980
63 Tsai LC, Hung MW, Chang GG, Chang TC. Apoptosis induced by the sodium butyrate in human gastric cancer TMK-1 cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 2441-2448
64 Litvak DA, Hwang KO, Evers BM, Townsend CM Jr. Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. *Anticancer Res* 2000; 20: 779-784
65 Tureckova J, Kucerova D, Vojtechova M, Sloncova E, Tuhackova Z. Expression of beta-catenin is regulated by PI-3 kinase and sodium butyrate in colorectal cancer cells. *Int J Mol Med* 2006; 17: 69-75
66 Bonithon-Kopp C, Kronborg O, Giacosa A, Rath U, Faivre J. Calcium and fibre supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomised intervention trial. European Cancer Prevention Organisation Study Group. *Lancet* 2000; 356: 1300-1306
67 Robertson DJ, Sandler RS, Haile R, Tosteson TD, Greenberg ER, Grau M, Baron JA. Fat, fiber, meat and the risk of colorectal adenomas. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2789-2795
68 Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. A prospective study of dietary folate intake and risk of colorectal cancer: modification by caffeine intake and cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 740-743
69 Yin G, Kono S, Toyomura K, Hagiwara T, Nagano J, Mizoue T, Mibu R, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y, Okamura T, Ikejiri K, Futami K, Yasunami Y, Maekawa T, Takenaka K, Ichimiya H, Imaizumi N. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Sci* 2004; 95: 908-913
70 Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and colorectal cancer: recent findings. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 24-29
71 van Engeland M, Weijenberg MP, Roemen GM, Brink M, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Baylin SB, de Goeij AF, Herman JG. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3133-3137
72 Grau MV, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Beach ML, Church TR, Heber D. Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas: results of a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1765-1771
73 Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Munoz A. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001; 154: 369-387
74 Sternhagen LG, Allen JC. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alpha-lactalbumin. *Adv Exp Med Biol* 2001; 501: 115-120
75 Pantako OT, Amiot J. The effects of alpha-lactalbumin and whey protein concentrate on alpha-amino acids, calcium and phosphorus levels in blood and gastrointestinal tract of rats. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41: 227-238
76 Kuitunen M, Savilahti E. Gut permeability to human alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, mannitol, and lactulose in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22: 197-204

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1498-1501
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

多层螺旋CT灌注成像对肝转移瘤的诊断价值

李艳英, 刘 悦, 张在人

■背景资料
肝脏是恶性肿瘤最常见的转移器官, 肝转移瘤的早期诊断, 对患者的治疗和生存时间的延长至关重要. 螺旋 CT三期扫描是诊断肝转移瘤的主要手段.但由于肝转移瘤患者间血液循环时间存在差异, 许多患者的三期扫描并不能真实地反映肝脏及病灶的血液动力学改变, 造成诊断困难. 而CT灌注成像不仅可较精确地分析计算出反映肝脏及病灶的动脉及门脉供血情况的相关参数值, 而且还可在毛细血管水平上反映组织血流动力学的改变, 敏感地探测到微小病灶的存在.

李艳英, 刘悦, 张在人, 哈尔滨医科大学附属二院CT室 黑龙江省哈尔滨市 150086
通讯作者: 李艳英, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院CT室. xpjchw102@163.com
电话: 0451-88912796
收稿日期: 2006-02-25 接受日期: 2006-03-30

摘要
肝转移瘤的早期诊断对患者生存时间的延长至关重要. 由于双期扫描在病变定性方面的不足, 一种新的CT灌注技术应运而生, 他是在同层动态CT及图像处理技术基础上发展起来的, 并逐渐被中外学者关注, 目前已成功地应用于临床. 本文综述其基本原理、计算方法及在肝转移瘤中的应用和成果.

关键词: CT灌注成像; 肝转移瘤; 血流动力学

李艳英, 刘悦, 张在人. 多层螺旋CT灌注成像对肝转移瘤的诊断价值. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1498-1501
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1498.asp

0 引言
恶性肿瘤严重危及人们的生存质量和健康状况, 肝脏是恶性肿瘤最常见的转移器官, 如胃癌、直肠癌、结肠癌发生肝转移的几率都比较高. 肝转移瘤的早期诊断, 对患者的治疗和生存时间的延长至关重要. 近年来, 螺旋CT三期扫描是诊断肝转移瘤的主要手段. 但由于肝转移瘤患者间血液循环时间存在差异, 许多患者的三期扫描并不能真实地反映肝脏及病灶的血液动力学改变, 造成诊断困难. 而CT灌注成像不仅可较精确地分析计算出反映肝脏及病灶的动脉以及门静脉供血情况的相关参数值, 而且还可在毛细血管水平上反映组织血流动力学的改变, 敏感地探测到微小病灶的存在.

血流通过毛细血管网将携带的氧和营养物质输送给组织细胞的过程, 被称为灌注[1]. 在一定程度上能反映组织、器官的血流动力学状态和功能情况. 通过影像学手段来直观显示活体灌注过程和作定量或半定量分析的方法称为灌注成像, 灌注成像技术, 代表着现代影像学从原来的主要反映解剖形态学改变, 向着既能反映宏观的大体形态, 又能揭示微观的代谢和功能状态演变的一种发展趋势[2]. 灌注成像包括核医学的单光子发射断层成像(SPECT); 正电子发射断层成像(PET)以及新近发展的CT和MRI灌注成像等[3-4]. CT灌注成像具有扫描时间短、空间分辨率高、技术简单易行的特点, 在显示血流改变的同时能够提供精细的解剖图像, 特别是新近出现的多排螺旋CT技术, 使CT灌注成像显示出了广阔的临床应用前景. 通过影像学手段来直观显示活体灌注过程和作定量或半定量分析的方法称为灌注成像(perfusion imaging)[5]. 灌注成像技术代表着现代影像学从原来的主要反映解剖形态学改变, 向着既能反映宏观的大体形态, 又能揭示微观的代谢和功能状态演变的这样一种发展趋势. 单光子发射断层成像及正电子发射断层成像虽然也是依据核医学的理论, 但是, 两者存在着一定差距. 放射性核素成像(SPECT和PET)均存在着空间分辨率低, 操作程序复杂和检查时间长等不足. SPECT主要缺点在于不能计算血流参数的绝对值. PET检查费用昂贵,普及范围窄. 而CT灌注成像具有扫描时间短、空间分辨率高、技术简单易行的特点, 在显示血流改变的同时能够提供精细的解剖图像, 特别是新近出现的多排螺旋CT技术, 使CT灌注成像显示出了广阔的临床应用前景[6].

1 CT灌注成像的原理
CT灌注成像是指在静脉注射对比剂的同时对选定的层面行同层动态扫描, 以获得该层面内每一像素的密度随强化时间而演变的曲线, 称为时间/密度曲线(time density curve, TDC), 横坐标为时间, 纵坐标为注药后增加的CT值, 所反映的是对比剂在该器官中浓度的变化, 进而间接反映组织器官内灌注量的变化. 利用不同的数学模型, 可根据该曲线计算出BF[在单位时间内流经一定量组织血管结构的血流量, mL/(min•mL^{-1})], BV指存在于一定量组织血管结构内的血容量(mL/g); 血液流经血管结构(包括动脉、毛细血管、静脉窦、静脉)时, 所经过的路径不

同, 通过时间也不相同, 因此用MTT(mean transit time)表示[7-8]主要反映的是CT对比剂通过毛细血管网的时间. 对获得的参数进行图像重组和伪彩染色处理, 又能得到血流灌注图、血流容积图、对比剂平均通过时间图和对比剂峰值时间图等, 以此来全面评价组织器官的灌注状态.

CT灌注成像使用的数学模型主要有两种:非去卷积模型(non deconvolution model); 去卷积模型(deconvolution)[9]非去卷积模型是指对比剂蓄积的速度等于动脉流入速度减去静脉流出速度, 因此在某一时间段内组织器官中对比剂的含量等于在该段时间内动脉流入量减去静脉流出量. 该模型利用对比剂首过状态下(first pass)是指对比剂由动脉进入毛细血管到达静脉之前的一段时间内, 没有对比剂进入静脉再次循环的现象, 可忽略静脉流出的假定, 在没有对比剂外渗的情况下, 获得增强的TDC, 并计算BF, BV, MTT等参数[10-11]. 去卷积数学模型概念复杂, 根据实际情况综合考虑了流入动脉和流出静脉的血液进行数学计算处理, 主要反映的是注射对比剂后组织器官中存留的对比剂随时间的变化量, 因此较真实地反映组织器官的内部血液动力学情. 二者相比, 非去卷积数学模型概念相对简单, 便于理解, 但易低估BF, 且注射对比剂时要求注射流率大(8 mL/s), 增加了操作难度和危险性[12]. 去卷积数学模型计算偏差小, 注射速度要求不高(一般4-5 mL/s)[13], 但需要采集数据的时间较长, 对于易受呼吸运动影响的部位, 获得成功的技术难度较大. 目前去卷积法的应用日趋广泛. 使用去卷积数学方法计算, Bell *et al*[14]对肾、脾CT灌注研究表明注射对比剂剂量越小, 计算的BF值越准确.

2 肝脏CT灌注成像的扫描方法

肝脏灌注扫描有别于常规增强扫描方式, 他是在扫描床不动的情况下, 对感兴趣区行同层动态扫描若干次[15-16]. 扫描前训练患者的呼吸, 患者扎腹带以减少呼吸运动的影响. 注射对比剂剂量越小, 计算的血流量(BF)值越准确, 但为了保证增强后的图像具有良好的信噪比, 对比剂的剂量不应少于50 mL[17]. 注射速率要求低, 一般为3-4 mL/s[18]. 经肘前静脉注射, 静脉穿刺, 应一次性穿刺成功, 尽量选择较粗大静脉, 注射方向应与静脉回流一致, 使用18-21G穿刺针[19]. 扫描参数: 先进行常规CT平扫, 确定灌注扫描的层面. 感兴趣层面通过第一肝门或病灶的最大层面. 连续扫描35-40次, 层厚5-10 mm, 可选管电压120 kV, 管电流150-300 mA[20]. 可根据不同器官的血流动力学不同而采用不同的扫描间隔时间, 国内腹部扫描时, 要求训练患者憋住气, 以保证图像质量. 图像后处理: 首先, 要选择好输入动脉和输出静脉. 腹主动脉被确定为输入动脉, 肿瘤引流方向的门静脉被确定为输出静脉, 通过灌注软件计算出CT灌注图像. 其次, 兴趣区(ROI)的选择也很重要, 应仔细划定兴趣区, 其中主动脉和门静脉取圆形感兴趣区; 肝脏和脾脏的感兴趣区沿脏器边缘绘制, 肝脏的感兴趣区主要包括扫描层面肝叶的大部分, 并避开肝脏内的大血管影, 脾脏的感兴趣区包含每一层面的整个脾脏. 所选取感兴趣区的边缘均距脏器边缘1 cm左右, 以避免部分容积效应. 另外还要选择面积大的ROI以减少光子噪声. 可进行阈值定义, 如将CT值定义在0-300 Hu以去除骨、脂肪、空气等组织的图像[21]. 在同一序列原始图像上, 同一器官或病灶的ROI应尽量一致. 分析ROI在不同时间点的CT值变化并利用专门的软件处理即可得到各种灌注参数. 通过定义彩色灰阶的方法, 可以直观地显示局部灌注的异常. 最后, 分析所有动态图像以得到一系列CT灌注参数图, 图像均可以彩色显示, 以突出病变区域的对比度. 在所得的各灌注图上可分别测量感兴趣区的血流量等参数, 并可进行定量, 半定量分析和数据统计分析.

在肝脏CT灌注成像中, 注入对比剂后, 肝脏CT值增加首先来自肝动脉血的对比剂, 然后是门静脉, 只有在快速扫描的基础上, 才能显示肝脏的这种增强模式. 区分出肝动脉和门静脉成分, 并对其分别进行评价. Miles *et al*以脾增强高峰出现为界, 把肝脏增强分为肝动脉期和门静脉期[22], 其灌注参数如下: (1)肝动脉灌注量(HAP)= 脾峰值增强前的肝脏时间密度曲线(TDC)最大斜率/最大主动脉CT增加值. (2)门静脉灌注量(HPP)=脾峰值增强后的肝脏时间密度曲线(TDC)最大斜率/最大主动脉CT增加值.

3 CT灌注成像在肝转移瘤中的应用

肝转移瘤的血供与正常肝脏有很大的不同, 肝脏具有独特的双重供血, 其血供的20%-30%来自肝动脉系统, 70%-80%来自门静脉系统, 而肝脏恶性肿瘤, 包括高血供的转移瘤及原发性肝癌, 大多由肝动脉供血, 肝动脉灌注量(HAP)增加, 一般>0.25 mL/(min•mL^{-1})[23]. 良性肿瘤大

■研发前沿

研究热点: GE Light speed 16层螺旋CT扫描与单排或双排螺旋CT相比, 具有扫描速度快, 扫描层面薄的特点.

研究重点: 肝脏CT灌注成像, 以往肝脏灌注研究中, 主要集中于肝癌和肝硬化的血液动力学的研究, 对肝转移瘤方面的报道较少, 而肝转移瘤的定性诊断对患者的生存至关重要.

■应用要点
严格按照扫描方法的步骤进行, 包括对比剂的剂量, 注射流率扫描条件等, 可以把灌注顺利完成, 同时获得满意的图像.

多不由肝动脉供血, HAP多正常. 肝动脉灌注量(HAP)增加对诊断肝脏恶性肿瘤的敏感性为82%, 特异性为63%. 肝硬化的HAP也增加, 但多伴有脾脏灌注增加[24], 而肝脏恶性肿瘤多数不伴有脾脏灌注的增加[10]. 肝脏恶性肿瘤的门静脉灌注量(HPP)与良性肿瘤数值相近, 平均0.37 mL/(min•mL^{-1}), 但变化幅度较大, 可呈异常高值, 或异常低值. 转移瘤周边部分的肝动脉灌注较中央部分高, 而其邻近正常肝组织肝动脉灌注较低, 如果邻近肝组织肝动脉灌注升高, 则提示邻近肝组织可能已发生恶变. 有转移瘤的肝脏, 形态看似正常的区域, 其血流动力学可能已发生改变, 即HAP及HPP升高[25]可能与以下原因有关, 肝内存在微小转移灶, 这些转移灶可能因为太小而在常规CT或MRI上均不能显示[26].

总之, 超声, MRI等影像学检查能反映出肿瘤的大体形态学特点, 并由此作出可能的定性诊断[27], 但是对肿瘤血供的观察仍有其局限性, 不能全面准确反映肿瘤的血流动力学改变[29-30]. 而CT灌注成像易于与患者的常规CT检查融为一体, 根据病灶强化类型, 可初步了解病灶的血供情况. 有助于制定出介入治疗方案和判断介入治疗的效果. 一次CT检查就可以同时获得形态和功能两方面的信息, 使我们有可能早于形态学变化之前, 发现肝转移病灶并评价各种治疗手段对肝脏血流动力学的影响.

4 参考文献

1 Haradome H, Ichikawa T, Sou H, Yoshikawa T, Nakamura A, Araki T, Hachiya J. The pearl necklace sign: an imaging sign of adenomyomatosis of the gallbladder at MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2003; 227: 80-88

2 Mayer TE, Hamann GF, Baranczyk J, Rosengarten B, Klotz E, Wiesmann M, Missler U, Schulte-Altedorneburg G, Brueckmann HJ. Dynamic CT perfusion imaging of acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 1441-1449

3 Arger PH, Malkowicz SB, VanArsdalen KN, Sehgal CM, Holzer A, Schultz SM. Color and power Doppler sonography in the diagnosis of prostate cancer: comparison between vascular density and total vascularity. *J Ultrasound Med* 2004; 23: 623-630

4 Kao YH, Mohler ER, Arger PH, Sehgal CM. Brachial artery: measurement of flow-mediated dilatation with cross-sectional US--technical validation. *Radiology* 2003; 228: 895-900

5 Lee SJ, Lee KH, Na DG, Byun HS, Kim YB, Shon YM, Cho SJ, Lee J, Chung CS, Hong SC. Multiphasic helical computed tomography predicts subsequent development of severe brain edema in acute ischemic stroke. *Arch Neurol* 2004; 61: 505-509

6 Sanelli PC, Lev MH, Eastwood JD, Gonzalez RG, Lee TY. The effect of varying user-selected input parameters on quantitative values in CT perfusion maps. *Acad Radiol* 2004; 11: 1085-1092

7 Kopka L, Rogalla P, Hamm B. Multislice CT of the abdomen-current indications and future trends. *Rofo* 2002; 174: 273-282

8 Eastwood JD, Lev MH, Wintermark M, Fitzek C, Barboriak DP, Delong DM, Lee TY, Azhari T, Herzau M, Chilukuri VR, Provenzale JM. Correlation of early dynamic CT perfusion imaging with whole-brain MR diffusion and perfusion imaging in acute hemispheric stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24: 1869-1875

9 Tsushima Y, Unno Y, Koizumi J, Kusano S. Hepatic perfusion changes after transcatheter arterial embolization (TAE) of hepatocellular carcinoma: measurement by dynamic computed tomography (CT). *Dig Dis Sci* 1998; 43: 317-322

10 Eastwood JD, Lev MH, Azhari T, Lee TY, Barboriak DP, Delong DM, Fitzek C, Herzau M, Wintermark M, Meuli R, Brazier D, Provenzale JM. CT perfusion scanning with deconvolution analysis: pilot study in patients with acute middle cerebral artery stroke. *Radiology* 2002; 222: 227-236

11 Na DG, Ryoo JW, Lee KH, Moon CH, Yi CA, Kim EY, Lee SJ, Yi BY, Kim JH, Byun HS. Multiphasic perfusion computed tomography in hyperacute ischemic stroke: comparison with diffusion and perfusion magnetic resonance imaging. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27: 194-206

12 Furukawa M, Kashiwagi S, Matsunaga N, Suzuki M, Kishimoto K, Shirao S. Evaluation of cerebral perfusion parameters measured by perfusion CT in chronic cerebral ischemia: comparison with xenon CT. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26: 272-278

13 Gandhi D, Hoeffner EG, Carlos RC, Case I, Mukherji SK. Computed tomography perfusion of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Initial results. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27: 687-693

14 Elgeti T, Proquitte H, Rogalla NE, Mews J, Wauer R, Hamm B, Schmalisch G, Rogalla P. Dynamic computed tomography of the neonatal lung: volume calculations and validation in an animal model. *Invest Radiol* 2005; 40: 761-765

15 Na DG, Byun HS, Lee KH, Chung CS, Kim EY, Ro DW, Jeong YK, Kim HD, Kim SH. Acute occlusion of the middle cerebral artery: early evaluation with triphasic helical CT-preliminary results. *Radiology* 1998; 207: 113-122

16 Dugdale PE, Miles KA, Bunce I, Kelley BB, Leggett DA. CT measurement of perfusion and permeability within lymphoma masses and its ability to assess grade, activity, and chemotherapeutic response. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23: 540-547

17 Van Beers BE, Leconte I, Materne R, Smith AM, Jamart J, Horsmans Y. Hepatic perfusion parameters in chronic liver disease: dynamic CT measurements correlated with disease severity. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 667-673

18 Ichikawa T, Arbab AS, Araki T, Touyama K, Haradome H, Hachiya J, Yamaguchi M, Kumagai H, Aoki S. Perfusion MR imaging with a superparamagnetic iron oxide using T2-weighted and susceptibility-sensitive echoplanar sequences: evaluation of tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 207-213

19 Bader TR, Grabenwoger F, Prokesch RW, Krause W.

■名词解释
1 灌注: 是指血流通过毛细血管网将携带的氧和营养物质输送给组织细胞的过程.
2 CT灌注成像: 是指在静脉注射对比剂的同时对选定的层面行同层动态扫描, 以获得该层面内每一像素的密度随强化时间而演变的曲线,称为时间/密度曲线.

Measurement of hepatic perfusion with dynamic computed tomography: assessment of normal values and comparison of two methods to compensate for motion artifacts. *Invest Radiol* 2000; 35: 539-547
20 Miles KA, Griffiths MR, Fuentes MA. Standardized perfusion value: universal CT contrast enhancement scale that correlates with FDG PET in lung nodules. *Radiology* 2001; 220: 548-553
21 Materne R, Van Beers BE, Smith AM, Leconte I, Jamart J, Dehoux JP, Keyeux A, Horsmans Y. Non-invasive quantification of liver perfusion with dynamic computed tomography and a dual-input one-compartmental model. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99: 517-525
22 Cenic A, Nabavi DG, Craen RA, Gelb AW, Lee TY. Dynamic CT measurement of cerebral blood flow: a validation study. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 63-73
23 Roberts HC, Roberts TP, Smith WS, Lee TJ, Fischbein NJ, Dillon WP. Multisection dynamic CT perfusion for acute cerebral ischemia: the "toggling-table" technique. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 1077-1080
24 Klotz E, Konig M. Perfusion measurements of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke. *Eur J Radiol* 1999; 30: 170-184
25 Koenig M, Klotz E, Luka B, Venderink DJ, Spittler JF, Heuser L. Perfusion CT of the brain: diagnostic approach for early detection of ischemic stroke. *Radiology* 1998; 209: 85-93
26 Kamotani Y, Lee WM, Arger PH, Cary TW, Sehgal CM. Multigated contrast-enhanced power Doppler to measure blood flow in mice tumors. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 977-984
27 Sehgal CM, Arger PH, Holzer AC, Krisch RE. Correlation between Doppler vascular density and PSA response to radiation therapy in patients with localized prostate carcinoma. *Acad Radiol* 2003; 10: 366-372
28 Weber MA, Krakowski-Roosen H, Delorme S, Renk H, Krix M, Millies J, Kinscherf R, Kunkele A, Kauczor HU, Hildebrandt W. Relationship of skeletal muscle perfusion measured by contrast-enhanced ultrasonography to histologic microvascular density. *J Ultrasound Med* 2006; 25: 583-591
29 Miles KA, Leggett DA, Kelley BB, Hayball MP, Sinnatamby R, Bunce I. *In vivo* assessment of neovascularization of liver metastases using perfusion CT. *Br J Radiol* 1998; 71: 276-281
30 Leggett DA, Kelley BB, Bunce IH, Miles KA. Colorectal cancer: diagnostic potential of CT measurements of hepatic perfusion and implications for contrast enhancement protocols. *Radiology* 1997; 205: 716-720

■**同行评价**
MDCT(多层螺旋CT)是目前常用的设备, 灌注成像技术为影像诊断新技术, 本文实用性强.

电编 李琪 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上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开.

1 会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗.

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估.

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗. 论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿. 截止日期: 2006-08-10. 来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍 (请写明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025. 联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com.

会议将授予国家继续教育Ⅰ类学分8分.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1507-1511
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

EGCG和染料木黄酮在肿瘤细胞信号传导中的作用

靳西凤, 冉志华

靳西凤, 冉志华, 上海交通大学医学院附属仁济医院 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. violetmoodee1210@126.com
电话: 021-63260930
收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-05-08

摘要

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)和染料木黄酮是两种天然的食物组份, 具有多种抗癌功效, 其抑制肿瘤发生的途径一直备受关注. 两者均可抑制特异的酪氨酸激酶(RTKs)及其相应的下游信号通路RAS/MAPK和PI3K/AKT途径, 从而发挥其抗肿瘤作用. 近年来, 两者在临床研究方面也有较大的开展, 但需相关的临床实验研究来确定其最佳剂量、方案、毒性和临床效率, 以便达到临床的最优化治疗.

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 染料木黄酮; RTK超家族; HER家族; RAS/MAPK; PI3K/AKT

靳西凤, 冉志华. EGCG和染料木黄酮在肿瘤细胞信号传导中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1507-1511
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1507.asp

0 引言

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶茶多酚中的一种单体成份. 染料木黄酮(genistein)是大豆异黄酮的一种, 以游离形式存在. 两者对不同的癌细胞系的生长、增殖均具有抑制作用. 现对EGCG和染料木黄酮在干扰信号传导方面进行综述, 主要介绍2条涉及酪氨酸激酶并与细胞的凋亡和存活密切相关的通路: (1)RAS/MAPK信号通路; (2)依赖磷酸肌醇(PI3P)的PI3K/AKT细胞存活信号通路.

1 HER超家族及其信号传导途径

1.1 HER家族 膜相关RTKs借助于特异的受体位于膜的表面, 在细胞的生长、增殖、分化等过程中起重要的调节作用, 并与肿瘤的发生密切相关. EGFR(erB1)、HER2(neu/erbB2)、HER3(erbB3)和HER4(erbB4)同属Ⅰ类受体酪氨酸激酶(RTK)超家族, 通常称为HER家族[1]. EGFR可与TGFa, EGF等其他配体结合得以活化, 但并未发现有HER2的特异配体[1]. 与配体结合引起受体同二聚化和异二聚化, 并活化受体酪氨酸激酶, 使酪氨酸残基自身磷酸化, 并启动细胞内的级联信号通路. HER2是erbB家族其他成员优先选择的异二聚体配体[1].

1.2 RAS/MAPK通路及PI3K/AKT信号通路 在各种外在刺激的作用下RAS/MAPK均可被激活, 激活后的RTKs在这条信号通路中起着重要的作用. 活化后的RTK激活衔接蛋白(adaptor protein)Grb2, Shc和Sos, 然后激活RAS, 活化后的Ras蛋白可进一步活化Raf1蛋白, 这反过来又激活MEK1/2, 活化后的MEK1/2再磷酸化ERK1($p44^{MAPK}$), ERK2($p42^{MAPK}$)[2]. 除ERK1/2信号通路, JNK1/2/3和p38α/β/γ信号通路作用也各不相同. 这些信号通路相互独立, 又有共同之处[3]. 现在普遍认为, ERK通路, JNK通路和p38通路之间的平衡决定了细胞的命运. MAPKs(ERK, JNK, p38)一旦被激活后就能够磷酸化ELK, c-jun和AP-1等转录因子[3-4]. PI3K是erbB家族的又一个效应子. 丝/苏氨酸激酶与PI3K相互依存、相互影响而得以激活. 其中能使PI3Ks发挥作用关键的丝/苏氨酸激酶就是蛋白激酶B(PKB, 或叫做AKT). PI3K被活化后, 合成第二信使PIP3, PIP3是募集和磷酸化膜表面丝氨酸/苏氨酸激酶B(PKB, 或叫做AKT)所必要的. AKT可直接磷酸化Bad, 增强Bcl-xL的抗凋亡功能[5], 同时他也可抑制Caspase-9的催化活性来阻抑凋亡的进程[6]. 而且, AKT通过活化NF-κB可提高细胞的生存. RAS/MAPK和PI3K/AKT信号通路在很多肿瘤中失调, 因此作用于以上信号通路在癌的预防和治疗将是一个有效的策略[7-8]. 激活蛋白-1(AP-1)和核因子-κB(NF-κB)分别是Ras/MAPK和PI3K/AKT信号通路下游的重要调节子. AP-1是一个复杂的二聚体, 包括Jun和Fos. 生长因子、细胞因子、癌蛋白诱导AP-1复合体结合到TRE序列(位于基因启动子区域), 在细胞

■背景资料
EGCG是茶多酚抑制肿瘤最重要的成分, 研究中证实EGCG在体内可广泛分布于皮肤、食管、胃、肠、肝脏、胰腺、前列腺等多个组织及器官, 并且没有毒副作用. 因此EGCG作为一种安全有效的肿瘤抑制药物正在受到越来越多的关注, 而被进一步用于肿瘤的化学预防及辅助治疗. 染料木黄酮在大豆中的含量高, 较易供应, 可为预防癌症的有力工具. EGCG和染料木黄酮在某种程度上抗肿瘤作用类似. 两者均可抑制特异的酪氨酸激酶(RTKs)及其相应的下游信号通路RAS/MAPK和PI3K/AKT途径最终抑制AP-1和NF-κB活性, 从而起到抗肿瘤细胞增殖及促凋亡作用.

■研发前沿
EGCG和染料木黄酮在临床应用方面也得到了较大的开展, 许多人工合成类似物已经应用于临床的研究. 发展同其他抗(肿)瘤剂的协同作用, 提高肿瘤预防和治疗的效率是两类药物未来研究的重点.

增殖、生存、发育分化和转化中起着重要的作用. AP-1的功能性活动同肿瘤诱发和恶化都存在关联. NF-κB与家族Rel有较强的同源性, 合称NF-κB/Rel家族. 大多数细胞中, p65和p60是NF-κB活性形式的重要成份. 通常所说的NF-κB和Rel/NF-κB家族即为p50/p65. AP-1和NF-κB的活化能够独立也可协同调节特异靶基因的表达.

2 信号传导

2.1 EGCG EGCG可通过抑制肿瘤细胞HER家族的3个成员: EGFR, HER2和HER3的及其下游信号分子的活化并使其发生细胞周期阻滞, 诱导其凋亡. EGCG抑制EGFR活化及EGFR依赖性ERK1/2和AKT的活化. 同时伴随下游底物(p90RSK, FKHR, BAD)磷酸化水平降低. 这些变化同p53、p21(WAF-1)和p27(Kip-1)水平的增加, Cyclin E蛋白水平及CDK2激酶活性的降低有关. 因此细胞发生G1期阻滞. 持久的EGCG处理则导致凋亡细胞死亡. 除通过抑制EGFR发生作用外, EGCG可直接抑制ERK1/2和AKT, 因此EGCG可同时在多重水平抑制EGF-依赖性信号通路, 但是EGCG的抑制是选择性的, 并不抑制JNK的活化. 以上提示: EGCG选择性抑制EGF-依赖性激酶来抑制细胞增生[9]. HER2的过表达同乳腺癌的发展及预后相关. EGCG抑制小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV) N639的细胞生长. 因为EGCG抑制了基底Her2/neu受体酪氨酸磷酸化, 因此经由Her2/neu/PI3K/AKT/NF-κB信号通路来抑制其信号传导. EGCG同样抑制SMF和Ba/F3 2+4细胞中的基底受体磷酸化, 因此对EGCG对于那些her2/neu过表达的肿瘤辅助治疗有重要的作用[10], 此类报道也见于头颈鳞状上皮细胞癌(HNSCC)等的研究中[11]. EGFR和HER2蛋白在结肠癌细胞中而不是正常胎儿结肠细胞(FHC)中过表达并持续性激活. EGCG和poly E(去咖啡因绿茶儿茶素混合物制剂)两者都优先抑制结肠癌(Caco2, HCT116, HT29, SW480, SW837)细胞而非正常胎儿结肠细胞的生长, 同EGFR和HER2蛋白的磷酸化形式减少及ERK和AKT磷酸化水平降低有关. 两者也抑制AP-1, c-fos, NF-κB和Cyclin D1启动子的转录活性, 进而活化Caspase3和Caspase9, 通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡, 并使细胞发生G1期阻滞[12]. 另有试验证实EGCG可同时抑制EGFR, HRE2和HER3活化. HER3在SW837结肠癌细胞高度表达, EGCG干预SW837结肠癌细胞后, 使EGFR, HRE2和HER3磷酸化水平降低, 同时降低下游信号蛋白Erk和Ak的磷酸化, 伴随COX-2蛋白和其mRNA水平的降低, 进而诱导肿瘤细胞凋亡. 基因分析显示: EGCG抑制COX-2, AP-1, NF-κB的启动因子活性[13]. 总之, 以上试验中EGCG对信号分子的作用解释了其抗增殖及促凋亡作用.

EGCG抑制胰岛素生长因子-1(IGF-1)是其抑制RTK相关信号通路的一个例子. IGF/IGF-1R体系, 包括胰岛素生长因子IGF, 胰岛素生长因子-1受体(IGF-1R)和胰岛素生长因子-1结合蛋白(IGFBPs)蛋白. 他们在直肠结肠癌的发展中起着重要的作用. IGF-1R蛋白在结肠癌细胞caco-2, HT29, SW837和SW480高度表达, 并在SW837和SW480细胞处于组成性活化状态. EGCG干预结肠癌细胞后引起IGF-1R受体磷酸化(活化)形式的减少, 使IGF-1蛋白及其mRNA水平降低, 但是增加IGFBP-3蛋白和其mRNA水平. EGCG使水解IGFBP-3的MMPs-7, MMPs-9的mRNA的水平降低, 同时升高诱导IGFBP-3的TGF-β2的表达. 因此, EGCG作为受体酪氨酸激酶家族的抑制者参与了抗细胞增生作用[14]. 近来研究表明, 给予转基因鼠口腔灌注茶多酚, 可抑制前列腺癌发展和恶化, 这与其降低IGF-1水平, 减弱下游信号分子AKT和ERK活性及降低VEGF, MMPs-2和MMPs-9水平相关[15]. MMPs的过表达同肿瘤细胞的侵袭及转移密切相关. EGCG可通过促分裂原活化蛋白激酶依赖性途径来抑制MMP-2, MMP-9表达. 例如EGCG抑制佛波酯肉豆蔻酸酯(或盐)(PMA)诱导的人胃癌细胞(AGS)侵袭及MMP-9的表达, 并呈现剂量依赖性方式, 而且EGCG可降低其MMP-9的转录活性. 这是因为EGCG阻断ERK, JNK和p38的活化并抑制其相应下游基因AP-1和NF-κB的活性[16-18]. 但是EGCG以剂量和时间依赖性方式增加细胞内外MMP-7酶原的水平, 并明显上调其mRNA的表达. 这是其通过活化JNK1/2诱导产生的, 与ERK1/2和p38 MAPK活性无关. 同时可诱导c-Jun磷酸化, 增加AP-1的DNA结合活性. 但超氧化剂物歧化酶等可中断EGCG诱导的MMP-7酶原的产生[19].

最后, EGCG通过抑制EGFR相关性信号转导通路分子可抑制VEGF的产生, 从而抑制肿瘤血管发生[20]. EGCG通过抑制VEGF-诱导的AKT的活性和VE-钙黏蛋白磷酸化来抑制内皮血管的形成[21]. 此外, EGCG也可抑制IL-8的产生进而抑制肿瘤血管的形成. 在对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的研究中发现: EGCG明显抑制

VEGFR2同VEGF复合体的形成, 使PI3K激酶活性呈现剂量依赖性降低, 降低NF-κB与DNA结合活性, 使IL-8 mRNA及蛋白水平降低, 使有丝分裂减弱进而影响血管的形成[22]. EGCG通过抑制以上两条信号转导通路在不同的肿瘤细胞系中还有其独特的作用. 脂肪酸合酶(FAS)是脂肪形成的关键酶, 在乳腺癌细胞(MCF-7)中高表达. EGF可提高其表达水平. 但是EGCG可同时抑制其蛋白水平和mRNA水平发生. 这是因为EGCG抑制AKT的活化, 阻断Sp-1结合到其靶区. 由此可知: 茶多酚通过下调EGFR/PI3K/AKT/Sp-1信号通路抑制FAS表达, 同时抗乳腺癌细胞增殖[23]. 此外, EGCG也可通过增强PI3K/AKT信号通路抑制糖原合成酶(GSK)对神经细胞发挥保护作用[24-25].

2.2 染料木黄酮 染料木黄酮的抗氧化性和抗增殖是其抗癌效果的主要原因, 而且他在大豆中的含量高, 较易供应, 因此染料木黄酮可为预防癌症的有力的工具. 染料木黄酮通过调节细胞信号转导通路抑制乳腺癌、肠癌、肺癌、白血病、前列腺癌等多种癌细胞的生长. 生长因子受体的PTK活性在细胞促有丝分裂信号转导过程中起重要作用. 一旦生长因子受体PTK活性受到抑制, 就会影响到促有丝分裂的转导, 从而抑制细胞增殖. 染料木黄酮可显著抑制酪氨酸受体超家族成员及其下游信号分子. 而且染料木黄酮是公认的酪氨酸激酶抑制剂. 在转基因鼠模型(TRAMP)前列腺癌中, 染料木黄酮可明显下调其RTKs、EGFR和IGF-1R活性, 也降低下游效应分子ERK1/2磷酸化水平, 从而抑制肿瘤细胞增生[26]. 染料木黄酮下调的酪氨酸激酶相关蛋白、EGFR、IGF-1R及下游的MAPK ERK1/2为其在前列腺癌的化学预防方面提供了一个新的机制. 此外, 染料木黄酮可下调HER-2/neu, HER3和HER4介导的下游信号传导通路分子如AKT等, 发挥其抗肿瘤作用[27-28]. 另有试验证实: 染料木黄酮通过抑制IGF-1R进而抑制PI3K/AKT信号通路来抑制结肠癌细胞HT-29和Caco-2增殖并诱导其凋亡. 染料木黄酮降低IGF-1R蛋白水平而非ErbB2和ErbB3蛋白水平, 染料木黄酮并不改变胰岛素受体底物1(IRS-1), PI3K的p85调节亚单位或AKT蛋白水平, 但是降低IGF-1R, IRS-1和AKT的磷酸化水平, 同时使募集到IGF-1R的p85调节亚单位减少[29].

虽然多数学者认为染料木黄酮对PTK活性的抑制作用是其抗癌效应的重要分子机制, 但是染料木黄酮的抗肿瘤细胞增殖效应并非都是通过抑制PTK活性实现的. 有人在对前列腺细胞DU-145的研究中证实, 染料木黄酮并不阻断其表皮生长因子受体(EGF-R)的自身磷酸化[30]. 染料木黄酮也可同时抑制AKT和MAPK下游信号分子NF-κB、AP-1来发挥抗肿瘤作用[31]. 有人在对乳腺癌的研究中发现, 染料木黄酮抗增殖促凋亡作用在某种程度上是通过下调AKT和NF-κB通路实现的. 凝胶移动检测显示: 乳腺癌细胞被转染有AKT cDNA后, NF-κB的DNA结合活性被其诱导. 因此NF-κB和AKT信号通路间存在交叉会话. 染料木黄酮干预后可抑制EGF和AKT诱导的NF-κB的活性. 由以上可知: 染料木黄酮引起的NF-κB的失活是由AKT信号通路介导的[32]. 此外, 染料木黄酮也可通过抑制ERK进而抑制AP-1活性诱导乳腺癌细胞凋亡, 并使其发生细胞周期阻滞[33].

此外, 体外试验还发现, 染料木黄酮可提高某些药物的抗癌效果. 这也是其通过抑制不同的信号传导途径实现的. PI3K途径控制结肠癌细胞的存活及其药物耐药性. PI3K抑制剂(LY294002)除阻断AKT的磷酸化外, 可使细胞内阿酶素浓度增加3倍, 并以竞争性方式抑制药物的输出. 而染料木黄酮抑制药物流出效率类似于LY294002. 因此染料木黄酮可以用来辅助治疗耐药性肿瘤[34]. 染料木黄酮也可应用于放疗的辅助治疗. 如染料木黄酮可增强食管鳞状细胞癌细胞对放射的敏感性, 这也是其通过抑制p42/p44ERK, AKT/PKB生存信号通路实现的[35]. 其他学者也证实染料木黄酮联合化疗药物是高表达EGFR的肿瘤的潜在治疗策略[36].

3 EGCG和染料木黄酮在临床方面的应用

EGCG和染料木黄酮在临床应用方面也取得了很大的进步. 梅奥诊所开展的临床试验证实: EGCG诱导大部分慢性淋巴细胞性白血病(CLL)患者的白血病B细胞凋亡细胞死亡. 在公开此发现后, 4例慢性淋巴细胞性白血病患者开始自愿服用茶多酚制剂, 并有客观的临床表现, 而且其中的3例患者符合部分标准反应标准. B细胞性恶性肿瘤的患者偶尔可有自发的缓和和退化的症状, 但这种事件很少见. 这几例患者在临床、实验室或/和X线照片影像学进展方面均较为稳定. 因此, 在其被广泛推荐使用前, 需要临床实验来确定其最佳剂量、方案、毒性和临床效率, 以便达到临床的最优化治疗[37].

■**同行评价**
本文选题明确, 较详细的列出将文献中研究结果, 所引用的参考文献较新, 内容有一定的科学参考价值.

现在临床上应用的许多药物是染料木黄酮的合成类似物, 如phenoxodiol. 他是新一代的抗肿瘤药物, 可调节多条信号转导通路, 并诱导肿瘤细胞凋亡[38]. 他在治疗卵巢癌和前列腺癌方面前景较好[39-41], 同时也具有治疗许多其他实体瘤和血液科相关肿瘤的潜能. phenoxodiol现在在美国和澳大利亚已被开发到II期实验阶段, 以治疗晚期癌症.

总之, EGCG和染料木黄酮均是多效的天然活性物质, 具有较强的抗肿瘤活性. 两者均可抑制包括生长因子介导的细胞分裂素(丝裂原)活化蛋白激酶(MAPK)依赖性和酪氨酸激酶依赖性信号传导通路. 近来的一期、二期临床试验也在探讨服用绿茶茶多酚及染料木黄酮的患者的情况. 而且他们毒性小, 价格低廉, 药源充足, 很有开发前景. 未来研究领域可着眼于: 确定其直接靶向分子, 提高其体内的新陈代谢及生物利用度, 发展同其他抗(肿)瘤剂的协同作用, 提高肿瘤预防和治疗的效率, 减少其潜在副作用.

4 参考文献

1 Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19: 3159-3167

2 Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 1990; 343: 651-653

3 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-1912

4 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40

5 Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241

6 Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318-1321

7 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501

8 Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000; 19: 6594-6599

9 Sah JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J Biol Chem* 2004; 279: 12755-12762

10 Pianetti S, Guo S, Kavanagh KT, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 652-655

11 Masuda M, Suzui M, Lim JT, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate inhibits activation of HER-2/neu and downstream signaling pathways in human head and neck and breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3486-3491

12 Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2735-2746

13 Shimizu M, Deguchi A, Joe AK, Mckoy JF, Moriwaki H, Weinstein IB. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *J Exp Ther Oncol* 2005; 5: 69-78

14 Shimizu M, Deguchi A, Hara Y, Moriwaki H, Weinstein IB. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 947-953

15 Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 8715-8722

16 Kim HS, Kim MH, Jeong M, Hwang YS, Lim SH, Shin BA, Ahn BW, Jung YD. EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *Anticancer Res* 2004; 24: 747-753

17 Vayalil PK, Katiyar SK. Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate* 2004; 59: 33-42

18 Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, Miyase T, Sano M, Hashimoto-Ohta A, Isemura M. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 1858-1863

19 Kim M, Murakami A, Kawabata K, Ohigashi H. (-)-Epigallocatechin-3-gallate promotes pro-matrix metalloproteinase-7 production via activation of the JNK1/2 pathway in HT-29 human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1553-1562

20 Masuda M, Suzui M, Lim JT, Deguchi A, Soh JW, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol* 2002; 2: 350-359

21 Tang FY, Nguyen N, Meydani M. Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis *in vitro* through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of AKT molecule. *Int J Cancer* 2003; 106: 871-878

22 Rodriguez SK, Guo W, Liu L, Band MA, Paulson EK, Meydani M. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *Int J Cancer* 2006; 118: 1635-1644

23 Yeh CW, Chen WJ, Chiang CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of fatty acid synthase in MCF-7 breast cancer cells by tea and tea polyphenols: a possible mechanism for their hypolipidemic effects. *Pharmacogenomics J* 2003; 3: 267-276
24 Koh SH, Kim SH, Kwon H, Park Y, Kim KS, Song CW, Kim J, Kim MH, Yu HJ, Henkel JS, Jung HK. Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 118: 72-81
25 Koh SH, Kim SH, Kwon H, Kim JG, Kim JH, Yang KH, Kim J, Kim SU, Yu HJ, Do BR, Kim KS, Jung HK. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal-differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology* 2004; 25: 793-802
26 Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA. Genistein alters growth factor signaling in transgenic prostate model (TRAMP). *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219: 171-180
27 Katdare M, Osborne M, Telang NT. Soy isoflavone genistein modulates cell cycle progression and induces apoptosis in HER-2/neu oncogene expressing human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 2002; 21: 809-815
28 Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, Morgan E, Czubayko F, List HJ, Reiter R, Martin MB, Stoica A. Heregulin-beta1 regulates the estrogen receptor-alpha gene expression and activity via the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2003; 22: 2073-2087
29 Kim EJ, Shin HK, Park JH. Genistein inhibits insulin-like growth factor-I receptor signaling in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism of the growth inhibitory effect of Genistein. *J Med Food* 2005; 8: 431-438
30 朱俊东, 杨家驹. 大豆异黄酮抗癌作用的研究进展. 国外医学卫生学分册 1998; 25: 257-259
31 Valachovicova T, Slivova V, Bergman H, Shuherk J, Sliva D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 2004; 25: 1389-1395
32 Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4702-4709
33 Dampier K, Hudson EA, Howells LM, Manson MM, Walker RA, Gescher A. Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein. *Br J Cancer* 2001; 85: 618-624
34 Abdul-Ghani R, Serra V, Gyorffy B, Jurchott K, Solf A, Dietel M, Schafer R. The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1. *Oncogene* 2006; 25: 1743-1752
35 Akimoto T, Nonaka T, Ishikawa H, Sakurai H, Saitoh JI, Takahashi T, Mitsuhashi N. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, enhanced radiosensitivity in human esophageal cancer cell lines in vitro: possible involvement of inhibition of survival signal transduction pathways. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 195-201
36 Lei W, Mayotte JE, Levitt ML. Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res* 1999; 19: 221-228
37 Shanafelt TD, Lee YK, Call TG, Nowakowski GS, Dingli D, Zent CS, Kay NE. Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leuk Res* 2006; 30: 707-712
38 Alvero AB, O'Malley D, Brown D, Kelly G, Garg M, Chen W, Rutherford T, Mor G. Molecular mechanism of phenoxodiol-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer* 2006; 106: 599-608
39 Sapi E, Alvero AB, Chen W, O'Malley D, Hao XY, Dwipoyono B, Garg M, Kamsteeg M, Rutherford T, Mor G. Resistance of ovarian carcinoma cells to docetaxel is XIAP dependent and reversible by phenoxodiol. *Oncol Res* 2004; 14: 567-578
40 Brown DM, Kelly GE, Husband AJ. Flavonoid compounds in maintenance of prostate health and prevention and treatment of cancer. *Mol Biotechnol* 2005; 30: 253-270
41 Choueiri TK, Wesolowski R, Mekhail TM. Phenoxodiol: isoflavone analog with antineoplastic activity. *Curr Oncol Rep* 2006; 8: 104-107

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1512-1515
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

胃肠道恶性肿瘤Cyclins表达分型与MDR1及TNM分期的关系

郭 勇, 覃吉超, 周 毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平

■背景资料
Cyclins在细胞周期运行中是一种重要的"驱动", 其表达情况的异常是导致肿瘤恶性转变并浸润生长转移的重要因素; 而MDR1(多药耐药基因1)编码的糖蛋白P-gp是导致化疗失败的主要原因之一.

郭勇, 覃吉超, 周毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院分子医学中心 湖北省武汉市 430030
卫生部临床学科重点资助项目, No. 20012537
973肿瘤计划资助项目, 2004CB518705
通讯作者: 龚建平, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院分子医学中心. gongjianping11@hotmail.com
电话: 027-83663301
收稿日期: 2006-02-28 接受日期: 2006-03-28

Correlations of Cyclins expression types with multi-drug resistance-1 and TNM staging in gastrointestinal cancer

Yong Guo, Ji-Chao Qin, Yi Zhou, Xiao-Jun He, Wei-Hua Li, Da-Xing Xie, Jian-Ping Gong

Yong Guo, Ji-Chao Qin, Yi Zhou, Xiao-Jun He, Wei-Hua Li, Da-Xing Xie, Jian-Ping Gong, Center of Molecular Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by Emphasized Project from Clinical Department of Ministry of Health, No. 20012537, and the Tumor Project in 973 Plan, No. 2004CB518705
Correspondence to: Professor Jian-Ping Gong, Center of Molecular Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. gongjianping11@hotmail.com
Received: 2006-02-28 Accepted: 2006-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of four Cyclins in gastrointestinal cancers, and to explore their correlations with multi-drug resistance-1 (MDR1) and TNM staging.

METHODS: Sixty-two fresh samples (gastric cancer 32, colorectal cancer 30) from patients underwent operation were collected, and the expression of Cyclin (D1, E, A, B1) and MDR1 were detected by flow cytometry. In addition, pathological reports were analyzed for TNM staging.

RESULTS: According to the expression of four Cyclins, four cell cycle types were divided in the gastrointestinal cancers. These four cell cycle types were in accordance with TNM staging (κ = 0.599, P < 0.01) and marked correlation with the level of MDR1 expression (r_s = 0.495, P < 0.01).

CONCLUSION: Cell cycle typing based on Cyclins expression has the same significance as TNM staging. MDR1 expression is correlated with the cell cycle typing, so it is possible to reverse MDR through interfering in cell cycle.

Key Words: Cyclins; Cell cycle; Multi-drug resistance-1; Gastrointestinal cancer; Flow cytometry; TNM staging

Guo Y, Qin JC, Zhou Y, He XJ, Li WH, Xie DX, Gong JP. Correlations of Cyclins expression types with multi-drug resistance-1 and TNM staging in gastrointestinal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1512-1515

摘要

目的: 研究胃肠道恶性肿瘤的4种主要Cyclins (Cyclin D1, E, A, B1)的表达规律, 以此为依据对恶性肿瘤进行分型, 并结合肿瘤标本中MDR1(多药耐药基因1)的表达情况, 与肿瘤TNM分期进行相关性分析.

方法: 采用流式细胞术分析新鲜手术获取的62例肿瘤标本(胃癌32例, 结直肠癌30例)的Cyclin D1, E, A, B1及MDR1表达情况, 再记录术后病理报告进行TNM分期.

结果: 根据4种主要Cyclins的表达情况对恶性消化道肿瘤分为Ⅰ-Ⅳ型Cyclin非时相性表达类型, 此Ⅰ-Ⅳ型细胞周期类型与TNM分期具有一致性, Kappa系数等于0.599(P<0.01). Ⅰ-Ⅳ型细胞周期类型中MDR1的表达水平逐渐增高, 等级相关系数r_s为0.495(P<0.01).

结论: 根据Cyclins的表达情况对消化道恶性肿瘤进行的分型具有与TNM分期相同的意义. 在消化道肿瘤中, MDR1与肿瘤细胞周期素表达类型有关, 对治疗具有指导意义.

关键词: Cyclins; 细胞周期; 多药耐药基因1; 胃肠道恶性肿瘤; TNM分期; 流式细胞术

郭勇, 覃吉超, 周毅, 何小军, 李伟华, 谢大兴, 龚建平. 胃肠道恶性肿瘤Cyclins表达分型与MDR1及TNM分期的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1512-1515
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1512.asp

0 引言

细胞周期素Cyclins在细胞周期运行中是一种重要的“驱动”, 其表达情况的异常是导致肿瘤恶性转变并浸润生长转移的重要因素[1]; 而MDR1(多药耐药基因1)编码的糖蛋白P-gp是导致化疗失败的主要原因之一, 研究其表达情况与肿瘤的某些生物学行为的关系, 用于判断恶性程度及预后是研究热点之一[2-4]. 我们通过流式细胞术研究胃肠道恶性肿瘤手术标本的4种主要Cyclins及MDR1的表达情况, 根据Cyclins的表达情况对肿瘤进行分型, 根据临床病理诊断进行TNM分期, 研究彼此之间的相关性. 旨在尝试用“分子指标”进行肿瘤分期, 并探讨该分期与一些肿瘤标志物的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 在手术室获取新鲜肿瘤标本(共62例, 其中胃癌32例, 结肠癌11例, 直肠癌19例), 每次在不影响病检的前提下取组织2-6 g, 放入冰PBS的小标本瓶中, 带回实验室, 所有肿瘤患者均未行术前化疗; 2.5 g/L Triton X-100购自Sigma公司; 鼠抗人Cyclins, MDR1, 同质特异性对照抗体鼠抗人IgG单抗均购自BD公司; FITC标记的兔抗鼠IgG抗体购自Dako公司; FACSORT流式细胞仪购自BD公司.

1.2 方法 机械法制备单细胞悬液, 每个标本固定6管, 1管用纯甲醇固定(用于Cyclin D1分析), 其他5管用800 mL/L乙醇固定(分别用于其他3种Cyclins, IgG, MDR1分析). -20℃保存过夜. 取固定的细胞, PBS洗涤后加2.5 g/L Triton X-100在冰上放置5 min. 加入PBS溶液洗涤、离心、去上清吸干. 将含有一抗(用10 g/L BSA稀释1∶50-1∶ 200)的BSA分别加入细胞管中, 4℃孵育过夜. 将孵育过夜的细胞加PBS洗涤倒干残液. 加10 g/L BSA稀释(1∶20)的FITC标记的兔抗鼠IgG抗体. 室温避光放置30 min. PBS洗涤, 离心弃上清. 加入含10 mg/L的PI和1 g/L RNase的PBS液, 室温避光放置20 min, 待检测. 使用FACSORT流式细胞仪, 经488 nm激光激发, 被标记细胞同时发射红色(PI)和绿色(FITC)荧光, 经Cell Quest软件处理并对荧光强度进行分析, 获得Cyclins/DNA双参数图像. 以同型对照的Gate内的细胞百分比在5%以下的电压检测同一标本4种Cyclins和MDR1的间接荧光水平. 每一个标本共6管, 分别为IgG对照, Cyclin D1, E, A, B1, MDR1. 阳性标准: 10%以下为“-”, 10%-25%为“+”, 25%-100%为“++”. 记录术后病检报告, 进行TNM分期.

表 1 Cyclins非时相性表达分型

Cyclins非时相性表达类型	Cyclin表达			
	Cyclin D1	Cyclin E	Cyclin A	Cyclin B1
Ⅰ	+~++	+~++	+~++	+~++
Ⅱ	+~++	+~++/-	+~++/-	+~++/-
Ⅲ	—	+~++/-	+~++/-	+~++/-
	+	—	—	—
Ⅳ	—	—	—	—

统计学处理 对Cyclins非时相性表达类型与TNM分期做一致性检验, 计算κ系数并进行假设检验; 对MDR1的表达水平与Cyclins非时相性表达类型做Spearman等级相关检验. $P<0.05$视为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃肠肿瘤Cyclins非时相性表达分型 考虑到Cyclin D1为G_0/G_1期主要Cyclin, 驱动细胞通过限制点进入细胞周期, 继而Cyclin E, A, B1顺序驱动细胞周期运行完毕. 同时根据Cyclins的表达情况(半定量分析结果)分为4种类型(表1).

2.2 细胞周期类型Ⅰ-Ⅳ型与TNM分期Ⅰ-Ⅳ期的关系 细胞周期类型Ⅰ-Ⅳ型与TNM分期Ⅰ-Ⅳ期进行一致性检验, 计算κ值并进行显著性检验. 其中TNM分期采用国际抗癌联盟(UICC)胃癌和结肠癌的TNM分期指标. 计算κ系数等于0.599, 对κ值进行z检验, $P<0.01$, 认为有一致性(表2).

2.3 细胞周期类型Ⅰ-Ⅳ型与MDR1表达水平的关系 细胞周期类型Ⅰ-Ⅳ型与MDR1阳性细胞百分比的分布情况(表3和图1). 可以发现MDR1的表达水平呈现从细胞周期Ⅰ-Ⅳ型逐渐升高的趋势, 等级相关$r=0.495$, $P<0.01$.

3 讨论

当生长信号传递到细胞周期调控机制时, 首先是Cyclin D1的表达增加(Cyclin D1是G_0/G_1期主要Cyclin, 起生长因子与细胞周期之间纽带的作用,

■研发前沿
研究MDR1表达情况与肿瘤的某些生物学行为的关系, 用于判断恶性程度及预后是研究热点之一. 如何逆转耐药是目前肿瘤治疗的难点.

■相关报道
胃肠肿瘤中MDR1的高表达与肿瘤的进展有关. 同时, 肿瘤是一类渐进性细胞周期调控机制破坏的疾病.

■**创新盘点**
本文的创新之处在于探讨了肿瘤耐药的重要分子基础MDR1和细胞周期调控破坏的关系，试图从细胞周期运行的角度来解释和预测原发耐药.

表 2 细胞周期分型与TNM分期

Cyclins非时相性表达类型	TNM分期				
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	合计
Ⅰ	10	2	0	0	12
Ⅱ	0	7	6	0	13
Ⅲ	0	5	16	2	23
Ⅳ	0	0	3	11	14
合计	10	14	25	13	62

表 3 细胞周期类型与MDR1表达水平

Cyclins非时相性表达类型	MDR1阳性表达水平			
	0%–10%	10%–25%	25%–100%	合计
Ⅰ	9	2	1	12
Ⅱ	2	8	3	13
Ⅲ	4	5	14	23
Ⅳ	2	2	10	14
合计	17	17	28	62

可被称为细胞周期外Cyclin), 与Cdk4/6形成复合物, 此时在Cdk4, pRB, E2F等参与瀑布式激动下, 使细胞通过Restriction Point(限制点)以便进入S期[5-7]. 通过限制点后即无需生长因子刺激, 此时进入细胞周期. CyclinE进一步升高, 形成越来越多的CyclinE-Cdk2复合物, 启动通过G_1期检测点, 并最终进入S期, 此后CyclinA、B1水平的依次升高和Cdk2, Cdk1的依次激活, 细胞通过G_2, M期及其中相应的检测点完成细胞增殖[8]. 所以CyclinE, A, B1可被称为细胞周期内Cyclin. 几乎所有的肿瘤都有一个根本的共同特征: 细胞周期调控机制的破坏, 导致细胞的失控性生长[9]. 已经有研究正常肠道上皮的Cyclin表达规律[10]的报道, 本课题中我们揭示消化道肿瘤的Cyclin表达规律, 发现不同TNM期有不同的Cyclin表达情况, 进而我们将Cyclins表达分为Ⅰ-Ⅳ型(表1): Ⅰ型细胞周期内外Cyclin均有表达, 可能“生长信号”过强, 腺体结构增生旺盛, 符合“High cyclin, high speed”这一观点. Ⅱ型细胞周期外Cyclin有表达, 细胞周期内Cyclin一种或两种表达. Ⅲ型仅有细胞周期内Cyclin或仅有细胞周期外Cyclin表达. Ⅳ型细胞周期内外Cyclin均无表达, 可能拥有不依赖于Cyclin/Cdk的细胞周期机制, 使肿瘤细胞逃避了限制点和检测点的调控. 多种癌基因、抑癌基因改变的累积是导致不同表型的肿瘤获得多样的生物学行为的主要原因, 而几乎所有的癌基因、抑癌基因的功能效应,

■**应用要点**
本文揭示了决定肿瘤原发性多药耐药的重要分子基础MDR1与细胞周期调控破坏的关键即Cyclins表达之间的关系. 可从细胞周期运行的角度预测耐药, 并能进一步研究探索肿瘤的细胞周期与原发耐药之间的关系的分子基础, 最终通过干预肿瘤的细胞周期逆转耐药.

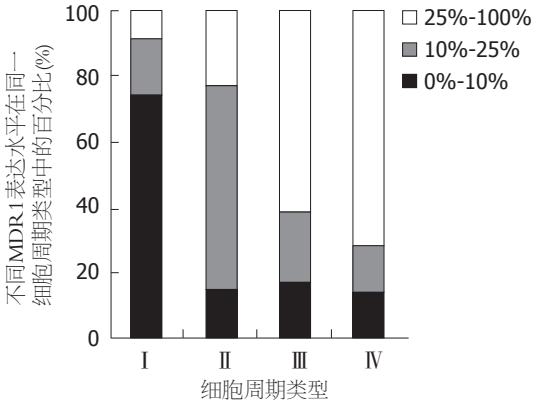


图 1 MDR1的表达情况从细胞周期Ⅰ–Ⅳ型变化趋势.

最终都是从不同的途径汇聚到细胞周期机制上来或者本身直接就是细胞周期的重要调控成分[11-12]. Ⅰ-Ⅳ型中Cyclin D1表达下降提示肿瘤生长不再依赖外界生长刺激, Cyclin D1在肿瘤恶性转变中具有重要意义[13-14]. 而Ⅰ-Ⅳ型中不同的细胞周期内Cyclin的表达逐渐下降或不表达提示不同的检测点效应的丧失. 所以, Cyclin表达情况的分型所反映出的不同的细胞周期机制的破坏情况可以与肿瘤的生物学行为联系起来. 统计结果也显示Ⅰ-Ⅳ型与TNM分期有一致性.

我们发现MDR1的表达水平呈现从细胞周期Ⅰ-Ⅳ型逐渐升高的趋势. 诚然, 实验标本选取的均为术前未行化疗的患者, 所以排除了获得性耐药的可能. 而且, 先前已有的报道认为MDR1与肿瘤的进展和预后有一定的关系. Fujii *et al*[15]通过单抗C219, 运用流式细胞仪分析24例胃癌患者中P-gp的表达, 其中8例P-gp阳性, 阳性发生率在进展期患者中较高. 另在89例行手术治疗的胃癌患者中, 研究体外化学敏感性测试(TIA)和胃癌患者的临床病理特征及生存期的关系, 其中31例TIA测试显示MDR阳性(34.8%), 多药耐药组的术后5 a生存率16%显著低于非多药耐药组的38%(P<0.05). 多药耐药基因MDR1编码的P-gp高表达是耐药的主要机制. 而在我们的研究中将MDR1与细胞周期类型联系起来, 是对该分型的一项评价, 同时又将肿瘤原发耐药的生物学属性和细胞周期联系了起来.

至于MDR1(多药耐药基因1)编码的糖蛋白即P-gp的表达与细胞周期运行调控机制的联系的具体分子基础还不明了. 但是已有诸多研究发现细胞周期与多药耐药有可能的潜在联系. Wong *et al*[16]认为在结直肠癌中β-catenin(作为癌发生的关键)与T细胞因子协同促进几种在肿瘤

进展中具有重要作用的复合物的表达: C-myc, Cyclin D1, Cyclooxygenase (COX)-2, MMP-7, CD44 proteins和P-glycoprotein, 这一观点可以看出Cyclin D1和MDR1的表达有相同的上游驱动. Patel *et al*[17]研究发现在肿瘤生长转移中起促进作用的COX-2对MDR1的表达有上调的作用. Kornmann *et al*[18]在胰腺癌细胞系中发现通过稳定转染Cyclin D1反义片段抑制Cyclin D1的表达可以下调MDR1的mRNA水平. 综合这些研究成果来看, 推动细胞周期运行的Cyclin与MDR1及其他肿瘤相关基因组成了一个复杂的网络, 细胞周期和多药耐药必有直接或间接的联系, 未来在彻底研究了两者之间关系的分子基础之后, 通过干预肿瘤的细胞周期是有可能逆转耐药的.

4 参考文献

1 Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 63-72

2 Meijer GA, Schroeijers AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP, Scheper RJ. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J Clin Pathol* 1999; 52: 450-454

3 Wang Q, Beck WT. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res* 1998; 58: 5762-5769

4 张威, 邹寿椿, 赵仲生, 徐文娟. P-糖蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义. 中国胃肠外科杂志 2000; 3: 163-165

5 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell* 1991; 66: 1071-1074

6 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-582

7 Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-3695

8 Pines J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 921-925

9 Marx J. How cells cycle toward cancer. *Science* 1994; 263: 319-321

10 李伟华, 吴剑宏, 高纯, 钟以胜, 龚建平. 空、结肠黏膜细胞增殖过程中主要细胞周期蛋白表达规律的研究. 中华实验外科杂志 2005; 22: 603-605

11 Brechot C. Cyclins and carcinogenesis. *Pathol Biol (Paris)* 1993; 41: 17

12 Zucca E, Nigg EA. Cell cycle regulation and the function of cancer genes. *Ann Oncol* 1995; 6: 975-978

13 刘红, 刘倩, 王文奇. CyclinD1和VEGF在胃癌组织中的表达及其临床意义. 实用癌症杂志 2004; 19: 27-29

14 Schwandner O, Bruch HP, Broll R. p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 11-19

15 Fujii H, Tanigawa N, Muraoka R, Shimomatsuya T, Tanaka T. Clinical significance of multidrug resistance and P-glycoprotein expression in patients with gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 1995; 58: 63-69

16 Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin-a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002; 160: 389-401

17 Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38915-38920

18 Kornmann M, Danenberg KD, Arber N, Beger HG, Danenberg PV, Korc M. Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes. *Cancer Res* 1999; 59: 3505-3511

■同行评价
本文研究了胃肠道肿瘤不同细胞周期蛋白表达的分期, 并探讨其与TNM分期的相关性, 以提出"肿瘤分子分期"的可行性, 有一定新意.

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1516-1519
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

一种新的幽门螺杆菌克拉霉素耐药相关基因

姜 葵, 何利华, 赵 飞, 王邦茂, 张建中

■背景资料
*H pylori*是慢性活动性胃炎、消化性溃疡及胃黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤的病因, 是胃癌发生的危险因子, 根除*H pylori*可治疗慢性胃炎、消化性溃疡. 由于耐药性*H pylori*的感染率不断升高, 致使*H pylori*根除率不甚理想. 在标准的三联或四联疗法中, 克拉霉素是一线抗生素. 近年来*H pylori*对克拉霉素的耐药率国内外均呈上升趋势. 目前对克拉霉素耐药机制的研究主要集中在对*H pylori* 23S rRNA基因的分析, 其他基因与克拉霉素耐药的关系在国内外未见报道.

姜葵, 何利华, 赵飞, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室 北京市 102206
姜葵, 王邦茂, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052
姜葵, 2004年中国疾病预防控制中心传染病预防控制所博士生, 副主任医师, 主要从事幽门螺杆菌耐药机制的研究.
天津市高等学校科技发展基金资助项目, No. 20050233
通讯作者: 张建中, 102206, 北京市, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室. zhangjianzhong@icdc.cn
电话: 010-61739456
收稿日期: 2006-04-11 接受日期: 2006-04-18

A novel gene associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*

Kui Jiang, Li-Hua He, Fei Zhao, Bang-Mao Wang, Jian-Zhong Zhang

Kui Jiang, Li-Hua He, Fei Zhao, Jian-Zhong Zhang, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Kui Jiang, Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Supported by University Science and Technology Development Foundation of Tianjin, No. 20050233
Correspondence to: Professor Jian-Zhong Zhang, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, P.O. Box 5, Changping, Beijing 102206, China. zhangjianzhong@icdc.cn
Received: 2006-04-11 Accepted: 2006-04-18

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of *H pylori* resistance to clarithromycin in different concentrations, and to look for a novel gene associated with clarithromycin resistance.

METHODS: *H pylori* 26695 were used as the primary strain. Antibiotic selection pressure test, mutation by transponson (Tn5) containing chloromycetin marker and *E*-test were performed for the analysis of *H pylori* resistance to clarithromycin in different concentrations.

RESULTS: After 12 generations, the 0.5 mg/L clarithromycin resistance strains remained resistant after the storage in -80℃ for 30 d. Clarithromycin-restant *H pylori* which had been inserted by transponson showed a band of 700 bp. After culturing for 98-168 h, the resistant *H pylori* from clarithromycin selection pressure test showed an elliptic inhibition ring. On the other hand, clarithromycin-resistant *H pylori* inserted by transponson showed no inhibition ring. After sequencing, the gene at the insertion site was homogenous with *H pylori*1469, which coded Omp31.

CONCLUSION: The resistant *H pylori* from lower concentrations of clarithromycin can be changed into higher concentration resistance strain through transponson insertion, indicating that the mechanism of *H pylori* resistance to clarithromycin may be associated with Omp31 apart from 23S rRNA mutation.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Clarithromycin; Resistance

Jiang K, He LH, Zhao F, Wang BM, Zhang JZ. A novel gene associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1516-1519

摘要

目的: 分析不同克拉霉素浓度下*H pylori*菌株耐药的发生机制, 以期发现新的耐药基因.

方法: 以*H pylori* 26695株为初发菌株, 经抗生素压力筛选、转座子Tn5插入失活、*E*-test检测等实验方法探讨*H pylori*对克拉霉素的耐药机制.

结果: 经12次传代, 在0.5 mg/L克拉霉素浓度下培养出的耐药株经-80℃冻存30 d复苏, 仍为抗性菌株; 克拉霉素抗性的转座插入株于700 bp左右出现条带; 经96-168 h培养, 单纯经抗生素选择压力筛选的低浓度耐药株*E*-test出现椭圆形抑菌环, 而经Tn5插入的克拉霉素抗性菌株无抑菌环出现. 对插入位点基因的测序发现该片段与*H pylori* 26695菌株中"*H pylori*1469"完全同源, 为编码Omp31的基因.

结论: *H pylori*对克拉霉素的低浓度耐药, 经转座后可转化为高浓度耐药, 其耐药性的发生与23S rRNA点突变以外的Omp31基因有关.

关键词: 幽门螺杆菌; 克拉霉素; 耐药

姜葵, 何利华, 赵飞, 王邦茂, 张建中. 一种新的幽门螺杆菌克拉霉素耐药相关基因. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1516-1519
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1516.asp

0 引言

自1982年Warren和Marshall从慢性胃炎患者体内分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)后, *H pylori*一直备受世界各地学者们的关注[1]. *H pylori*是慢性活动性胃炎、消化性溃疡及胃黏膜相关性淋巴样组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤的病因, 是胃癌发生的危险因子, 1994年WHO已将其列为胃癌的Ⅰ类致癌因子, 也是迄今第一个明确作为肿瘤病因的细菌. 随着对*H pylori*的深入研究, 发现*H pylori*与胃肠外疾病也有关[2]. 我国*H pylori*感染率为50%-60%, 全国肿瘤防治中心统计, 近年来胃癌发病率位居20余种肿瘤的第1位, 根除*H pylori*可治疗慢性胃炎、消化性溃疡, 可以使消化性溃疡的年复发率从80%降低至4%[3]. 抗*H pylori*感染通常采用多药联合治疗, 包括抗生素、质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)和/或铋剂. *H pylori*于体外对大多数常见抗生素敏感, 所以从理论上说只要服用足够剂量和疗程的敏感抗生素, *H pylori*是很容易被根除的, 但耐药性*H pylori*的感染率不断升高, 成为根除失败的主要原因之一. 克拉霉素(clarithromycin, CLA)是新一代的大环内酯类抗生素, 作为目前根除*H pylori*治疗方案中的一线药物, 其通过与细菌核糖体紧密结合, 作用于23S rRNA V区的多肽转移酶环, 抑制多肽转移活性, 影响核糖体的移位过程, 阻止肽链延长, 从而抑制细菌蛋白质的合成, 达到杀菌目的[4]. 但是近年来*H pylori*对CLA的耐药率国内外均呈上升趋势. 目前对克拉霉素耐药机制的研究主要集中在对*H pylori* 23S rRNA基因的分析[5], 其他基因与克拉霉素耐药的关系在国内外未见报道, 但研究中发现许多*H pylori*耐药菌株的23S rRNA并未发生突变. 我们拟通过抗生素选择压力、转座子插入失活、*E*-test检测等方法分析不同CLA浓度下筛选的耐药*H pylori*菌株的发生机制, 以期进一步发现新的克拉霉素耐药基因.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 26695原始株, 经抗生素选择压力筛选的低浓度(0.5 mg/L克拉霉素)耐药株C3、C4, 来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室*H pylori*菌种保存库. 克拉霉素原药, 购自中国药品及生物制品检定所. 克拉霉素*E*-test试条, 购自广东倍肯公司. pMOD-2-<camB>质粒, 张建中研究员自美国华盛顿大学医学院分子生物学系实验室构建并带回, 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室保存并提供. Labconco生物安全柜、混合气体培养箱、Eagle Eye Ⅱ型凝胶成像系统、EquiBio电击转化仪、PCR扩增仪、光学显微镜.

1.2 方法 将pMOD-2-<camB> 5 μL, 10×mol/L buffer 2 μL, pvuⅡ(15 MU/L)1 μL, 灭菌TE(pH 7.5)12 μL依次加入到0.5 mL的灭菌Eppendorf管中, 混匀, 封口, 37℃水浴4 h酶切. 酶切产物纯化按照Qiagen纯化试剂盒说明书操作. 将酶切纯化后的Tn5-<camB> 2.5 μL, EZ∶∶TN transpoase 5 μL, 灭菌1000 mL/L glycerol 2.5 μL依次加入到0.5 mL的灭菌Eppendorf管中, 混匀, 封口, 37℃水浴0.5 h. 取2 mm电击杯在750 mL/L的乙醇液中浸泡2 h, 取出后在生物安全柜中将乙醇完全挥发, 同时用紫外线照射, 盖紧塞后, 置于-20℃冰箱预冷1 h; 在生物安全柜中取1 μL transposome加入到预处理的*H pylori* 26695菌悬液中, 用枪吹打均匀, 迅速转移至预冷的电击杯中, 放置在电转化仪上进行电转化. 条件: A1 V: 2500 C: 25; R: 201 T: 5; 延迟时间10 s. A2 V: 120 C: 150; R: 99 T: 14.8. 电击转化后的菌液均匀涂布于普通哥伦比亚血平皿, 在混合气体培养箱内培养复苏24 h, 然后将菌苔全部刮下悬菌于200 μL的灭菌脑心浸液保存管内, 并重新涂布于氯霉素抗性哥伦比亚血平皿, 培养72 h, 再均匀涂布于CLA平皿, 经16, 10, 8, 3, 2, 1, 0.5 mg/L, 7个浓度梯度平皿掺入压力选择. 将挑取的单克隆分别进行过氧化氢酶, 氧化还原酶, 尿素酶鉴定. 选择经转座子插入的耐药单克隆d1、d2、d3及单纯经抗生素选择压力筛选的低浓度耐药株C3、C4进行*E*-test: 用棉拭子蘸取菌液(菌液浓度为10^{11} CFU/L)均匀涂布于整个培养基表面, 置干; 镊取克拉霉素试条的E端, 将试条放在已经接种待测*H pylori*的琼脂表面, 试条标有MIC刻度面向上, 浓度最大端靠近平皿边缘, 37℃微需氧培养72-96 h, 在椭圆抑菌环与试条交界处读取MIC值, 以原始26695 *H pylori*菌株为对照.

2 结果

经36 d 12次传代, 在0.5 mg/L CLA浓度下选择

■创新盘点
本文就*H pylori*对克拉霉素的耐药机制进行了研究, 并初步筛选出一个新的耐药相关基因.

■应用要点
近年来, 对*H pylori*的耐药机制尽管进行了广泛深入研究, 但关于其对克拉霉素的耐药机制, 除23S rRNA外未见报道. 本课题初步筛选出一个新的耐药相关基因, 对于今后临床提高*H pylori*根除率具有重要意义.

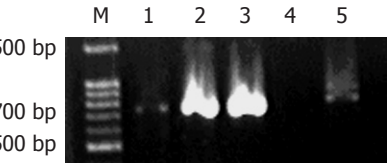


图 1 克拉霉素抗性的转座插入株的检测. M: Marker; 1: d1; 2: d2; 3: d3; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照.

出5株耐药菌, 命名为d1-d5, 置-80℃冻存30 d后复苏, d1-d3在无抗性平皿连续传代3次转到含CLA 0.5 mg/L平皿, 生长良好, 加大CLA浓度到1, 2, 3 mg/L, 终浓度为3 mg/L. d1-d5过氧化氢酶实验: 迅速产生大量气泡; 氧化还原酶实验: 菌体变成黑色; 尿素酶实验: 指示剂玫瑰红色. 克拉霉素抗性的转座插入株的检测: d1, d2, d3于700 bp左右出现条带(图1).

经北京博亚公司测序, 结果如下:

AGCCTTCaAGCcTTCAAAACAAGCctGCCCG-
TAgtGcAAgACCGGCgAGCCTTCgcTgAg
TTGtAACAtGTTTTCgCtCACCAATCCgCcTT-
GCgACCAAgAGCCGTTTTTATAAgtGGC
GATgAAgCGAAAATCCGTTTTAAtGTAGCTA-
AAGCCTAAATTTTTCCAGTCtAAaTTTTC
TAAATTTGCCATTTTCACaCCTTTAAAtG-
GATAGTTTCAGGCGTGATTGTaTCTAAAAAG
GGGTtAAAAAtCCCtCAAGtAACtGATTT-
GAAACGCAtAAActCTACgCAcaTCAgCCtG
TAAGGtGtAtCCcTTTTCgTTGGTAAgAgAgA-
AAAgcTGGtGtGtGAtCGtAGGCacTTT
AatCCCTAaTTCtAGGCtATtGtGTTTAGC-
GAtAtGGGtGCGgACCCCAAAcTTCCATAA
AAACtGGAAATtGGCCGGGCtATAACtG-
GAATTGCtGtGGtGTTTTGCAtAAtGAGCGAT
TTCTTTACtGAtGCTCGTTGCCCAAC-
TATCCCCCGCTAATtGgATCCCCACCA-
CAAAACC
AAAAACCAtGTTTTCTTTATTCACAAAATTC-
CACAGCGtATCTAACCCCACGCCATAAGT
GAATAAATTGACATAgTATTGCCCCTGATAG-
GCTGtCTCTTATACACATCTcAACCCTGA
AGCTCTtGTtGGCTAGtGgcGTAgtcC

将测序结果在http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/中比对分析, 发现该片段与*H pylori* 26695菌株中"*H pylori* 1469"完全同源, 该基因在*H pylori* 26695中编码outer membrane protein (omp31).

经96 h培养后单纯经抗生素选择压力筛选的低浓度耐药株C3于6 mg/L可见椭圆形抑菌环, 而d1, d2, d3, C4无抑菌现象出现, 平皿中有菌落发育, 继续培养72 h, C4于8 mg/L也出现椭圆形抑菌环, d1, d2, d3仍无抑菌现象, 平皿中细菌生长良好, 包括试条周围区域.

3 讨论

克拉霉素是目前根除*H pylori*治疗方案中的一线药物, 其通过与细菌核糖体紧密结合, 作用于23S rRNA V区的多肽转移酶环, 抑制多肽转移活性, 影响核糖体的移位过程, 阻止肽链延长, 从而抑制细菌蛋白质的合成, 达到杀菌目的. 但是近年来*H pylori*对CLA的耐药率国内外均呈上升趋势. 目前对于克拉霉素耐药机制的研究主要集中在*H pylori* 23S rRNA基因, 已报道在23S rRNA的V区至少存在5种不同的点突变与CLA的耐药有关, 即: A2115G, G2141A, A2142G, A2142C和A2143G[6], 除此以外基因所致者国内外未见报道. Shen *et al*[7]以实验室诱导的耐药菌株为研究对象, 采用变性高效液相色谱(DHPYLORILC)和测序技术, 观察基因突变与耐药性形成的关系, 结果提示, 在实验室诱导CLR耐药过程中, 首先形成的低水平耐药性涉及23S rRNA点突变以外的其他基因的改变, 然后产生23S rRNA的A2143G突变, 进而导致更高水平的耐药性的形成. 我们通过回复稳定性实验研究发现所筛选到的耐药克隆为稳定的基因型耐药, 可传给子代菌, 即使在失去抗性压力的条件下仍然可以将耐药基因型稳定传代保留.

E-test是目前用于检测*H pylori*对抗生素敏感性的常用方法之一, 当试条放在一个已接种了一定菌量*H pylori*的琼脂平皿后, 抗生素迅速释放入琼脂中, 在试条下方形成一个抗生素浓度的连续梯度, 经孵育后即可见到一个以试条为中心的、对称的椭圆抑菌环, 其边缘与试条交界处的刻度即为MIC值[8-9]. 我们前期工作, 即经过抗生素选择压力实验筛选出的耐克拉霉素单克隆*E*-test结果显示, 分别在其对应浓度范围(6 mg/L, 8 mg/L)内出现椭圆形抑菌环. 转座子Tn5长期以来被广泛应用于发现新基因、分析基因功能和构建突变体库[10-12]. 近年, 通过对转座酶的结构、DDE模体等的研究, Tn5转座机制、转座频率调控等才得到了较深刻的认识[13-16]. 在Mg^{2+}存在的条件下, 两个转座酶分子末端和活性中心的氨基酸残基分别结合到Tn5末端, 形成

发夹结构的复合体, 具有切割DNA的活性. Tn5攻击靶序列, 其插入位点形成9 bp的黏性末端, 转座子插入到靶序列之中. 在DNA聚合酶的作用下补平缺口, 转座子的两端形成9 bp的正向重复序列, 完成转座插入. 我们以EZ∶∶TN系列转座产品为主要工具, 利用其如下特点: (1)可以随机插入到目的基因, 插入后稳定不会丢失; (2)带有氯霉素标签, 易于筛选; (3)序列已知, 带有测序引物. 通过插入失活和筛选, 以及耐药实验检测发现, *H pylori*对克拉霉素的低浓度耐药, 经转座后可转化为高浓度耐药, 推测与23S rRNA点突变以外的其他基因的改变有关. 我们将测序结果在http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/中比对分析, 发现该片段与*H pylori* 26695菌株中"*H pylori* 1469"完全同源, 该基因在*H pylori* 26695中编码outer membrane protein (omp31), 为一新发现的与克拉霉素耐药相关基因; 该基因功能的发现和进一步的研究, 对认识*H pylori*的耐药机制[17-20]、指导临床有效的根除*H pylori*、控制人群中*H pylori*对克拉霉素的原发耐药和继发耐药的发生率都具有重要意义.

4 参考文献

1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315

2 范学工, 黄燕. 幽门螺杆菌感染在肝癌发生中的潜在作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 160-162

3 Nervi G, Liatopoulou S, Cavallaro LG, Gnocchi A, Dal-Bo N, Rugge M, Iori V, Cavestro GM, Maino M, Colla G, Franze A, Di Mario F. Does *Helicobacter pylori* infection eradication modify peptic ulcer prevalence? A 10 years' endoscopical survey. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2398-2401

4 Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, Tanaka SK, Graham DY, Go MF. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477-480

5 Hulten K, Gibreel A, Skold O, Engstrand L. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2550-2553

6 Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Megraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2724-2728

7 Shen J, Zhang JZ, Ke Y, Deng D. Formation of A2143G mutation of 23S rRNA in progression of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* 26695. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 100-106

8 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 309-311

9 何利华, 尹焱, 尤元海, 闫笑梅, 张建中. 波利特、达克普隆和Nexium对幽门螺杆菌的体外抑菌效果比较. 中华流行病学杂志 2003; 24: 447-448

10 唐江涛, 何勇强, 唐纪良. 细菌转座子Tn5转座机理的研究进展. 广西农业生物科学 2003; 22: 316-321

11 Jenks PJ, Chevalier C, Ecobichon C, Labigne A. Identification of nonessential *Helicobacter pylori* genes using random mutagenesis and loop amplification. *Res Microbiol* 2001; 152: 725-734

12 Chang KC, Yeh YC, Lin TL, Wang JT. Identification of genes associated with natural competence in *Helicobacter pylori* by transposon shuttle random mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 961-968

13 Salama NR, Shepherd B, Falkow S. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2004; 186: 7926-7935

14 Guo BP, Mekalanos JJ. *Helicobacter pylori* mutagenesis by mariner *in vitro* transposition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 30: 87-93

15 Lin TL, Shun CT, Chang KC, Wang JT. Isolation and characterization of a HpyC1I restriction-modification system in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 2004; 279: 11156-11162

16 Ton-Hoang B, Guynet C, Ronning DR, Cointin-Marty B, Dyda F, Chandler M. Transposition of ISHp608, member of an unusual family of bacterial insertion sequences. *EMBO J* 2005; 24: 3325-3338

17 Sakharkar KR, Sakharkar MK, Chow VT. Gene fusion in *Helicobacter pylori*: making the ends meet. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006; 89: 169-180

18 Moore JM, Salama NR. Mutational analysis of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1236-1237

19 Ribeiro ML, Gerrits MM, Benvengo YH, Berning M, Godoy AP, Kuipers EJ, Mendonca S, van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr, Kusters JG. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40: 57-61

20 Jiang K, Zhang JZ, Pan GZ. Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Chin J Dig Dis* 2001; 2: 95-99

■同行评价

*H pylori*相关的基础与临床研究一直是消化系疾病研究的热点之一. *H pylori*的耐药性是临床上急需解决的难题, 深入研究其耐药机制的产生、形成尤为重要. 本研究对*H pylori*的耐药机制进行了研究, 并初步筛选出一个新的耐药相关基因, 该研究具有一定的开创性, 选题准确, 实验设计合理, 结果可靠, 具有一定的理论和临床指导意义.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1520-1523
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

大鼠重症急性胰腺炎内毒素血症、细胞因子和一氧化氮的变化及善宁的治疗作用

王艳蕾, 张凤宇, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤

■背景资料
重症急性胰腺炎发病急, 变化快, 并发症多, 是目前最为棘手的急腹重症之一. 尽管围绕胰腺炎的研究已历时百余年, 但迄今有关SAP的发病机制尚未完全阐明, 治疗药物也不够满意.

■研发前沿
目前有关重症急性胰腺炎发病机制的研究热点集中在细胞因子、胰腺微循环、肠道细菌移位在疾病发生和发展中的作用. 研究重点是在分子生物学的水平上对免疫应答、全身炎症反应、细胞因子、胰腺微循环障碍等的深入研究.

王艳蕾, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤, 华北煤炭医学院生理教研室 河北省唐山市 063000
张凤宇, 唐山市丰润区第一人民医院消化科 河北省唐山市 064000
通讯作者: 王艳蕾, 063000, 河北省唐山市建设南路57号, 华北煤炭医学院生理教研室. xiaolei1973@yahoo.com.cn
电话: 0315-3725606
收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-03-30

Changes of endotoximia, cytokines and nitric oxide and therapeutic effects of sandostatin in rats with severe acute pancreatitis

Yan-Lei Wang, Feng-Yu Zhang, You-Ling Jing, Jing-Xia Zhao, Chun-Xiu Zhao, Guo-Xian Duan

Yan-Lei Wang, You-Ling Jing, Jing-Xia Zhao, Chun-Xiu Zhao, Guo-Xian Duan, Department of Physiology, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Feng-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Fengrun District, Tangshan 064000, Hebei Province, China
Correspondence to: Yan-Lei Wang, Department of Physiology, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. xiaolei1973@yahoo.com.cn
Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-03-30

Abstract

AIM: To study the roles of endotoximia, cytokines and nitric oxide in the development of severe acute pancreatitis (SAP) and the therapeutic effects of sandostatin (SS) in rats.

METHODS: SAP models were induced by retrograde injection of 15 g/L sodium deoxycholate and then treated by SS. The plasma levels of endotoxin (ET), lipid peroxide (LPO), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO), as well as the expression LPO, TNF-α, IL-6 and NO in pancreatic tissues, were measured. The changes of pancreatic histology were examined under light microscope.

RESULTS: As Compared with those in sham operation group, the plasma levels of ET, LPO, TNF-α, IL-6 and NO were markedly higher in SAP group ($P < 0.01$), and the changes of ET, LPO, TNF-α and NO at 6 h were higher (898 ± 114 EU/L, 24.58 ± 1.23 μmol/L, 246.3 ± 16.5 ng/L, 162.8 ± 10.9 mmol/L, $P < 0.05$) than those at 12 and 24 h. The changes of LPO, TNF-α, IL-6 and NO in pancreatic tissues of SAP group were obviously higher in comparison with those of sham group (3.31 ± 0.85 μmol/g *vs* 0.33 ± 0.04 μmol/g, $P < 0.01$; 2.57 ± 0.14 ng/g *vs* 0.16 ± 0.04 ng/g, $P < 0.01$; 85.6 ± 24.6 ng/g *vs* 32.5 ± 5.7 ng/g, $P < 0.01$; 15.3 ± 1.2 mmol/g *vs* 6.6 ± 1.4 mmol/g, $P < 0.01$); and severe damages of pancreatic tissues were observed under light microscope. In SAP group, the plasma levels of LPO, TNF-α, IL-6 and NO were significantly correlated with ET level ($r = 0.858$, $P < 0.01$; $r = 0.958$, $P < 0.01$; $r = 0.918$, $P < 0.01$; $r = 0.875$, $P < 0.01$). The indexes mentioned above in SS group were obviously ameliorated in comparison with those in SAP group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Endotoximia, cytokines and NO play important roles in the development of severe acute pancreatitis. Sandostatin can block the chain reaction caused by these factors.

Key Words: Pancreatitis; Endotoxin; Tumor necrosis factor-α; Interleukin 6; Nitric oxide; Lipid peroxide; Sandostatin

Wang YL, Zhang FY, Jing YL, Zhao JX, Zhao CX, Duan GX. Changes of endotoximia, cytokines and nitric oxide and therapeutic effects of sandostatin in rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1520-1523

摘要

目的: 探讨内毒素血症、细胞因子和一氧化氮在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发展中的作用及善宁的治疗作用.

方法: 经胰管逆行注射15 g/L去氧胆酸钠建立SAP模型, 给予善宁治疗, 观察造模后各

时间点血中内毒素(ET)、过氧化脂质(LPO), TNF-α, IL-6, 一氧化氮(NO)的变化, 并进行相关分析; 于24 h后取胰腺组织, 测定胰腺组织中LPO, TNF-α, IL-6和NO水平, 同时进行相关分析及胰腺组织病理学检查.

结果: 与对照组比较, SAP组各时间点血浆ET, LPO, TNF-α, IL-6, NO的水平明显升高(P<0.01), 其中ET, LPO, TNF-α和NO 6 h尤为显著(898±114 EU/L, 24.58±1.23 μmol/L, 246.3±16.5 ng/L, 162.8±10.9 mmol/L, P<0.05 *vs* 12, 24 h). 胰腺组织LPO, TNF-α, IL-6, NO的水平SAP组明显高于对照组(3.31±0.85 μmol/g *vs* 0.33±0.04 μmol/g, P<0.01; 2.57±0.14 ng/g *vs* 0.16±0.04 ng/g, P<0.01; 85.6±24.6 ng/g *vs* 32.5±5.7 ng/g, P<0.01; 15.3±1.2 mmol/g *vs* 6.6±1.4 mmol/g, P<0.01), 光镜下胰腺组织病理损害明显.相关分析显示SAP组血浆LPO, TNF-α, IL-6, NO水平分别与ET水平呈显著正相关(r = 0.858, P<0.01; r = 0.958, P<0.01; r = 0.918, P<0.01; r = 0.875, P<0.01). 善宁治疗后上述各指标均较SAP组明显改善(P<0.01).

结论: ET血症、细胞因子、NO等相互激发、相互促进, 在SAP的发展中起着重要的协同作用. 善宁能阻断这些损伤因子的连锁反应.

关键词: 胰腺炎; 内毒素; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素6; 一氧化氮; 过氧化脂质；善宁

王艳蕾, 张凤宇, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤. 大鼠重症急性胰腺炎内毒素血症、细胞因子和一氧化氮的变化及善宁的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1520-1523
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1520.asp

0 引言

SAP是一种胰腺出血坏死所致的全身炎症反应综合征, 往往发展迅速, 难以控制, 其确切病因和发病机制迄今尚未完全阐明. 在SAP的发展过程中, 有许多因素参与, 我们从SAP时的内毒素(ET)血症、细胞因子和一氧化氮(NO)的动态变化着手, 探讨他们在SAP发展中的作用, 并观察善宁在阻断这些因子连锁反应中的作用, 从而为临床治疗提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠36只, 体质量180-220 g, 雌雄不拘. 动物实验前12 h禁食不禁水, 在乙醚麻醉下作无菌手术, 剖腹后经十二指肠乳头向胰管内缓慢逆行注入15 g/L去氧胆酸钠0.5 mL/kg, 诱发重症急性胰腺炎, 注射时阻断胆总管, 以免药液进入肝胆. 注药后5 min胰腺即出现均匀性出血、坏死、肿胀、渗出, 待确定SAP模型成功, 关腹. 对照组向胰管内注射等量生理盐水. 造模后动物随机分为3组(n = 12): 对照组(Sham)、胰腺炎组(SAP)、善宁治疗组(SS). 善宁治疗组于造模后1, 6, 12 h背部sc善宁13.5 μg/kg(善宁购自瑞士诺华制药有限公司).

1.2 方法 各组分别于造模后6, 12, 24 h经内眦采血测定血浆ET, LPO, TNF-α, IL-6, NO的水平, 24 h后处死动物取胰腺留待胰腺组织生化检测及组织学检查. ET的测定采用鲎试剂偶氮显色法作定量测定(试剂购自上海伊华临床医学科技公司); NO的测定采用硝酸还原酶法(试剂购自晶美生物工程有限公司); TNF-α, IL-6的测定均用ELISA法(试剂购自晶美生物工程有限公司); LPO的测定采用TBA法即硫代巴比妥酸法.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 应用SPSS8.0统计软件分析, 组与组间均数比较采用方差分析和q检验, 相关系数的显著性用t检验. 以P<0.05为显著性检验界限.

2 结果

2.1 血浆ET, LPO, TNF-α, IL-6, NO的变化 SAP组各时间点血浆ET, LPO, TNF-α, IL-6, NO明显高于对照组(P<0.01), 其中ET, LPO, TNF-α, NO以造模后6 h最高, 与12 h和24 h相比差异显著(P<0.05); IL-6以造模后12 h最高, 与6 h和24 h相比有显著差异(P<0.05, 表1). 善宁治疗组在各时间点上述各指标均较模型组明显改善(P<0.01). SAP组血浆LPO, TNF-α, IL-6, NO水平分别与ET水平呈显著正相关(r = 0.858, P<0.01; r = 0.958, P<0.01; r = 0.918, P<0.01; r = 0.875, P<0.01); SAP组血浆LPO, IL-6, NO水平分别与TNF-α水平呈正相关(r = 0.847, P<0.01; r = 0.968, P<0.01; r = 0.936, P<0.01).

2.2 胰腺组织LPO, TNF-α, IL-6, NO的变化 SAP组胰腺组织匀浆中LPO, TNF-α, IL-6, NO水平较对照组明显升高, 两组间有显著性差异(P<0.01); 善宁治疗后胰腺组织中上述各指标下降, 与SAP组比较差异明显(P<0.01, 表2). SAP组胰腺组织LPO, TNF-α, IL-6水平与NO呈明显正相关(r = 0.897, P<0.01; r = 0.952, P<0.01; r = 0.949, P<0.01).

2.3 胰腺组织学改变 SAP组胰腺小叶轮廓破坏,

■创新盘点
本文从不同时间点研究细胞因子、内毒素、氧自由基、一氧化氮在重症急性胰腺炎发生和发展中的作用, 寻求始动因素, 并探讨善宁的治疗作用.

■名词解释
全身炎症反应综合征(SIRS): 是1992年在美国危重医学和胸科两个学会主持的协议会上由Bone提出的. SIRS是指由于各种原因, 巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等免疫细胞或炎性细胞受到刺激、诱导, 产生并分泌释放各种细胞因子入血, 进入全身循环引起全身的炎症反应的一种病理生理状态, 其实质是"高细胞因子血症".

表 1 SAP大鼠血浆ET, LPO, TNF-α, IL-6, NO的变化. (mean ± SD, n = 12)

分组	t/h	ET (EU/L)	LPO (μmol/L)	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	NO (mmol/L)
Sham	6	32 ± 12	11.23 ± 0.58	49.6 ± 4.9	41.2 ± 4.6	35.17 ± 1.86
	12	30 ± 14	11.35 ± 0.49	49.2 ± 4.5	40.6 ± 5.3	36.15 ± 1.65
	24	31 ± 11	10.90 ± 0.23	48.6 ± 5.6	40.8 ± 5.9	35.57 ± 1.98
SAP	6	898 ± 114[b]	24.58 ± 1.23[b]	246.3 ± 16.5[b]	146.5 ± 13.8[bc]	162.8 ± 10.9[b]
	12	542 ± 105[ab]	17.23 ± 0.98[ab]	192.3 ± 15.4[ab]	184.8 ± 14.6[b]	129.6 ± 9.64[ab]
	24	429 ± 128[ab]	16.98 ± 0.85[ab]	182.5 ± 13.9[ab]	149.7 ± 15.3[bc]	121.8 ± 9.92[ab]
SS	6	219 ± 78	14.69 ± 1.56	70.69 ± 11.52	60.5 ± 10.9	61.24 ± 7.45
	12	123 ± 56	12.83 ± 1.24	65.46 ± 10.12	73.8 ± 11.6	52.73 ± 7.13
	24	82 ± 30	11.73 ± 1.28	56.78 ± 9.85	58.8 ± 7.9	50.65 ± 6.04

[a]P<0.05 *vs* 6 h; [b]P<0.01 *vs* Sham, SS; [c]P<0.05 *vs* 12 h.

表 2 SAP大鼠胰腺组织LPO, TNF-α, IL-6, NO的变化. (mean ± SD, n = 12)

分组	LPO (μmol/g)	TNF-α (ng/g)	IL-6 (ng/g)	NO (mmol/g)
Sham	0.33 ± 0.04	0.16 ± 0.04	32.5 ± 5.7	6.6 ± 1.4
SAP	3.31 ± 0.85[b]	2.57 ± 0.14[b]	85.6 ± 24.6[b]	15.3 ± 1.2[b]
SS	0.51 ± 0.03	0.33 ± 0.06	40.6 ± 5.7	8.9 ± 2.1

[b]P<0.01 *vs* Sham, SS.

呈大面积坏死, 间质水肿, 炎细胞浸润, 血管充血伴有红细胞渗出. 善宁治疗组胰腺组织损伤程度明显轻于SAP组, 仅有部分胰腺小叶轮廓破坏, 未见明显炎细胞浸润.

3 讨论

重症急性胰腺炎是外科凶险的疾病, 其最严重的并发症是引起全身炎症反应综合征(SIRS), 最终导致多系统器官功能衰竭(MSOF)[1-2]. 近年来, 一系列实验研究均证实SAP能够引起肠道细菌、ET移位, 发生ET血症[3-4]. 目前认为肠黏膜屏障功能障碍和肠道细菌微生态平衡的破坏及机体免疫功能的损害是导致肠道细菌、ET移位的3个基本要素. SAP时氧自由基、炎症介质和NO大量产生, 损伤肠黏膜, 再加上肠运动受到抑制, 肠黏膜微循环障碍, 造成肠黏膜通透性增加, 大量细菌、ET移位发生ET血症[5-6]. 而SAP还可引起肠道菌群失调, G^-菌(尤其是大肠杆菌)呈几何级数增长, 更是促进了肠道细菌、ET移位的发生[7]. 本实验结果显示, SAP早期血浆ET水平明显升高, 6 h达到最高; 同时血中LPO和NO含量也升高, 并且具有相关性. 表明氧自由基和NO可破坏肠道屏障, 加重ET血症的发生.

ET是G^-菌细胞壁的脂多糖成分, 是刺激细胞因子生成的重要因素. 大量研究表明, 肠源性ET可触发多种细胞因子的释放和炎症介质的级联反应, 进而诱发SIRS和MSOF[4,8]. 我们发现, 造模后血浆TNF-α, IL-6明显升高, 而且其水平与血浆ET水平呈明显正相关. SAP时ET大量入侵, 激活巨噬细胞, 引起TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8等细胞因子的大量释放. 在本研究中, TNF-α在SAP早期即明显升高, 6 h达高峰, 而IL-6在12 h达高峰, 并且模型组血浆IL-6水平与TNF-α水平呈正相关, 这表明TNF-α可能是细胞因子连锁反应中最早启动的因子. TNF-α的致病机制是他能激活中性粒细胞等炎性细胞, 释放大量介质如氧自由基、蛋白酶等, 介导胰腺组织细胞损伤[9]; 他还可以诱导IL-1, IL-6, IL-8等其他细胞因子的瀑布样释放. IL-6是单核细胞和血管内皮细胞产生的重要炎症介质之一. 他可刺激活化B细胞增殖及免疫球蛋白的生成, 还可刺激肝脏产生急性期反应蛋白. 血浆IL-6水平与胰腺的病理损害程度明显相关, 可作为预测胰腺病理变化的重要指标[10]. 细胞因子是一个"大家族", 由复杂的网络系统所调节. 一旦一种细胞因子产生, 就能促进他自身和其他细胞因子的生成, 并形成级联和扩展. SAP时, 正是由于上述这些因子相互激发、协同作用, 导致全身炎症反应, 最终造成组织损害. NO是极强的血管舒张因子, 他在SAP的发生、发展过程中起着重要作用[11]. 我们发现SAP早期血浆NO水平即明显升高, 6 h达峰值, 而且其水平与血浆ET, TNF-α和IL-6水平呈明显正相关. ET、炎症细胞因子刺激巨噬细胞、血管平滑肌细胞等, 使诱导型NO合酶(iNOS)活性增加是SAP时NO大量生成的主要原因[12]. NO除了能引起血管过度扩张, 血流淤滞, 造成胰腺血供低灌注外, 还可以与超氧阴离子反应生成具有强氧化性的过氧化亚硝酸根($ONOO^-$), 对胰腺产生直接毒性作用[13]. 此外过

量的NO还参与SAP时肠道损伤的病理生理过程, 引起肠通透性增加[14], 加剧细菌移位和内毒素血症.

可见SAP早期所诱发的全身炎症反应综合征是与过量的细胞因子、氧自由基、ET, NO等损伤因子的参与有关, 这些因子相互激发、相互影响, 在SAP的发生、发展中起重要的协同作用.本研究观察到给予善宁可以使血浆和胰腺组织中ET, LPO, NO, TNF-α, IL-6接近正常水平, 并明显减轻胰腺的损伤程度. 从而推测善宁可抑制炎症介质、细胞因子的过度表达, 并能减轻ET血症、NO和氧自由基的损伤作用, 进而阻断这些损伤因子的连锁反应. 因此在SAP早期应用善宁对防治全身炎症反应综合征将有所裨益.

4 参考文献

1 Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 132-144

2 Zhang Q, Ni Q, Cai D, Zhang Y, Zhang N, Hou L. Mechanisms of multiple organ damages in acute necrotizing pancreatitis. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 738-742

3 Vasilescu C, Herlea V, Buttenschoen K, Beger HG. Endotoxin translocation in two models of experimental acute pancreatitis. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 417-424

4 Giamarellos-Bourboulis EJ, Nikou GC, Matsaggoura M, Toumpanakis C, Grecka P, Giannikopoulos G, Katsilambros N. Alterations of systemic endotoxemia over the course of acute edematous pancreatitis. correlation to the advent of an infection? *Pancreatology* 2003; 3: 323-328

5 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421

6 Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35; discussion 35-36

7 徐桂芳, 路筝, 邹晓平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪. 肠内免疫微生态营养支持对重症急性胰腺炎犬肝损害的影响. 胰腺病学 2005; 5: 89-92

8 Bhatia M. Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. *Scand J Surg* 2005; 94: 97-102

9 Yang YL, Li JP, Li KZ, Dou KF. Tumor necrosis factor alpha antibody prevents brain damage of rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2898-2900

10 Jiang CF, Shiau YC, Ng KW, Tan SW. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J Chin Med Assoc* 2004; 67: 442-446

11 Leindler L, Morschl E, Laszlo F, Mandi Y, Takacs T, Jarmai K, Farkas G. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004; 29: 157-161

12 Rahman SH, Ammori BJ, Larvin M, McMahon MJ. Increased nitric oxide excretion in patients with severe acute pancreatitis: evidence of an endotoxin mediated inflammatory response? *Gut* 2003; 52: 270-274

13 Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 2004; 24: 452-474

14 Simsek I, Mas MR, Yasar M, Ozyurt M, Saglamkaya U, Deveci S, Comert B, Basustaoglu A, Kocabalkan F, Refik M. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces bacterial translocation in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23: 296-301

■同行评价

本研究利用大鼠SAP模型观察了内毒素、细胞因子和NO在SAP发展中的作用, 并探讨了善宁治疗后各项指标的变化规律, 在指导临床治疗上有重要意义.

电编 李琪 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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1524-1526
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

长期质子泵抑制剂治疗老年反流性食管炎11例

李 军, 吴本俨

■背景资料
反流性食管炎是目前消化界研究热点之一, 质子泵抑制剂是治疗该病的首选药物之一, 但国内外对长期使用该药的效果和远期影响的报道少见.

李军, 吴本俨, 解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
通讯作者: 李军, 100853, 北京市, 解放军总医院南楼消化科. bjlijun1@sohu.com
电话: 010-66937512
收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-05-17

Long-term use of proton pump inhibitors in treatment of reflux esophagitis in 11 aged patients

Jun Li, Ben-Yan Wu

Jun Li, Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Jun Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, South Building, Beijing 100853, China. bjlijun1@sohu.com
Received: 2006-05-09 Accepted: 2006-05-17

Abstract
AIM: To observe the changes of symptoms in the aged patients with reflux esophagitis (RE) after long-term use of proton pump inhibitors (PPI).

METHODS: Eleven RE patients over 70 years old, who received PPI treatment for above 5 years, were investigated. The changes of reflux symptoms, the development of mucosal lesions under endoscope and the effects of PPI were analyzed.

RESULTS: Reflux symptoms were well controlled in all the 11 patients. Polypi (villous adenoma pathologically) were founded in duodenum in one case, who had been continuously treated with PPI for 6 years.

CONCLUSION: Long-term use of PPI is benefit for the aged RE patients in the control of the symptoms, but it is necessary to pay attention to the occurrence of digestive cancer.

Key Words: Reflux esophagitis; Aged patients; Proton pump inhibitors; Long-term use

Li J, Wu BY. Long-term use of proton pump inhibitors in treatment of reflux esophagitis in 11 aged patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1524-1526

■应用要点
本研究对老年反流性食管炎患者长期使用质子泵抑制剂后的疗效和影响进行了分析研究, 对指导临床工作实践有重要参考价值.

摘要
目的: 研究老年反流性食管炎患者长期服用质子泵抑制剂的临床特点和不利因素, 为防治老年反流性食管炎提供依据.

方法: 对11例长期服用质子泵抑制剂的老年人进行随访观察, 分析其临床症状及内镜上消化道黏膜病变的发展变化, 研究长期用药的影响.

结果: 11例患者在随访中, 长期使用质子泵抑制剂均取得良好的症状控制, 1例长期服用后出现十二指肠息肉, 病理为绒毛状腺瘤.

结论: 老年反流性食管炎患者长期服用质子泵抑制剂的的疗效值得肯定, 但需警惕对上消化道肿瘤发生的影响.

关键词: 反流性食管炎; 老年人; 质子泵抑制剂; 长期

李军, 吴本俨. 长期质子泵抑制剂治疗老年反流性食管炎11例. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1524-1526
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1524.asp

0 引言
反流性食管炎(RE)是消化系统常见疾病之一, 质子泵抑制剂问世(1979)以来, 该病在很大程度上得到了控制, 但长期服用该药物的临床报告少见. 本文对1994年以来反复在我院诊断治疗的老年反流性食管炎患者中, 超过5 a长期服用质子泵抑制剂治疗的病例共11例进行了追踪随访, 现报道如下.

1 材料和方法
1.1 材料 本组病例中, 男10例, 女1例, 年龄71-88岁, 平均80.6岁, 其中食管或贲门癌术后5例. 均有反酸症状, 其中伴烧心者9例, 上腹部不适者3例, 胸骨后痛者2例, 吞咽不适者1例, 呃逆1例, 黑便1例. 11例患者均经内镜及食管24 h

酸反流测定明确诊断. 参照我国消化内镜学会1999年烟台会议拟定的反流性食管炎内镜分级标准: Ⅰ级3例, Ⅱ级4例, Ⅲ级4例; 酸反流得分25.9-273, 平均142.3, 其中小于50分者仅1例, 大于150分者5例.

1.2 方法 该组病例病程时间6-56 a, 平均14.7 a. 使用质子泵抑制剂5-13 a, 平均9.4 a, 其中10例为间断服用, 每年服用时间为7-12 mo, 平均每年9.5 mo(其中2例在病程中后期改为连续服用, 时间为4, 8 a), 服药初期均采用口服洛塞克(20 mg, 2次/d)或兰索拉唑(30 mg, 1次/d), 维持治疗量为20 mg, 1次/d, 维持药物有洛塞克、奥美片、奥克、兰索拉唑(30 mg, 1次/d)等多种剂型. 1例为连续服用13 a, 治疗方式为口服洛塞克20 mg, 2次/d. 11例患者均在服用质子泵抑制剂2-3 mo后行胃镜检查, 并且以后仍定期复查胃镜(每年1次者9例, 2次者2例)及血常规、肝肾功能等检查项目.

2 结果

使用质子泵抑制剂4 wk后, 4例临床症状消失, 7例明显缓解, 内镜下黏膜表现0级3例, Ⅰ级8例, 但10例间断服用者, 在停药或改用H_2受体拮抗剂为维持治疗药物后, 临床症状及内镜下黏膜表现均出现反复. 病程中, 有6例患者出现息肉(食管2枚, 十二指肠2枚, 贲门、胃体、胃窦各1枚, 其中1例在食管和十二指肠各形成1枚息肉, 共形成7枚, 病理结果3枚为炎性, 3枚腺体增生, 1枚位于十二指肠者为管状-绒毛状腺瘤), 不典型增生者2例(食管1例, 胃窦1例), 有溃疡者9例(食管3例, 贲门2例, 吻合口1例, 十二指肠3例, 其中Barrett食管2例). 继续使用质子泵抑制剂后, 症状再次得到明显改善, 内镜下黏膜病变也再度好转: 溃疡愈合, 绒毛状腺体及不典型增生均未再发现. 其中1例病程达16 a的顽固性反酸烧心患者, 使用质子泵抑制剂前酸反流得分高达273, 食管病理活检提示有溃疡, 服用质子泵抑制剂后症状明显改善, 内镜下溃疡愈合, 但停用后症状反复, 病程中出现Barrett食管、不典型增生, 改为连续使用质子泵抑酸治疗后, 临床症状消失, 每年复查胃镜均提示食管黏膜光滑, 偶有小片状充血或血管纹理欠清晰, 治疗效果良好, 现已连续服用8 a, 但在连续服用质子泵抑制剂6 a后十二指肠出现息肉, 病理为绒毛状-管状腺瘤(钳除), 以后内镜随访未有类似发现. 1例连续13 a服用质子泵抑制剂的病例, 临床症状一直控制良好, 胃镜随访观察食管曾出现片状充血, 无息肉及不典型增生发现.

11例患者在病程中, 2例曾因胆囊炎、胆石症出现白细胞总数及转氨酶短暂升高, 经治疗后恢复正常外, 其他病例白细胞总数及肝肾功能均处于正常范围.

3 讨论

胃内容物(包括十二指肠内容物)反流入食管, 损伤食管黏膜, 引发临床症状称之为反流性食管炎. 主要表现为烧心、反酸、反胃、胸骨后痛等表现, 其发病是多因素的, 主要包括食管下段括约肌功能减退, 反流物对食管黏膜攻击增强、食管防御性机制下降(或破坏)[1]. 老年人的发病因素中还有唾液分泌减少, 贲门松弛等[2]. 反流物中H^+的损伤作用最为严重, 所以抑制胃酸分泌成为治疗反流性食管炎的主要措施之一[3]. 目前质子泵抑制剂是临床广泛使用的抑制胃酸药物之一[4], 临床已证实, 口服奥美拉唑(OME)20 mg/d, 可使胃酸减少约90%左右, 且半衰期长, 可维持作用近24 h, 可快速缓解症状并治愈食管炎. 文献报道, 老年人反流性食管炎的发病率要高于非老年人, 且具有发病率高、易漏误诊、病变程度重, 复发率高的特点[5], 并与口咽部及呼吸道疾病有密切关系[6]. 所以提高对老年人反流性食管炎的治疗水平显的非常重要, 药物治疗仍是缓解老年反流性食管炎症状的必要手段[7]. 质子泵抑制剂被认为是主要的控制症状[8]和维持治疗药物[9], 国外文献报道老年反流性食管炎服用PPI维持治疗3 a以上仍有良好的控制症状的效果[10], 长期治疗甚至优于手术[11]. 而国内鲜见长期服用后的临床报告. 本组病例均长期服用质子泵抑制剂治疗, 时间最长者连续服用13 a, 症状表现和内镜下黏膜病变均能得到持续改善, 也没有影响白细胞总数及肝肾功能的证据, 说明此类药物对老年患者长期治疗的疗效值得肯定. 然而近年来, 国外有报道认为长期服用质子泵抑制剂会对胃黏膜肿瘤的发生有潜在影响, 但一些研究发现长期服用该药对胃黏膜的内、外分泌功能均未见到有明显的损害[12], 也并不增加胃黏膜上皮细胞的分裂速度和表皮生长因子及p53基因的过度表达[13]. 但在本组病例中, 有1例在连续服用此类药物6 a后出现1枚十二指肠息肉, 且病理类型为绒毛-管状腺瘤, 提示长期服用是否对肿瘤的发生有影响, 仍需做更多的研究工作. 在10例间断服药的病例中, 短期停药

■名词解释

质子泵: 也称H^+/K^+ATP酶, 能主动将壁细胞内的H^+逆浓度差转运到胃腔内, 是胃酸形成的最终步骤.在壁细胞处于非活动状态时, 细胞质内有大量小管泡, 质子泵便贮存在小管泡膜内, 当受到化学的、神经的、激素的刺激后, 壁细胞内的小管泡迅速与分泌小管相融合, 质子泵转移到分泌小管膜上并在有氧代谢中高能磷酸键产生的能量的参与下, 将H^+从pH为7.4的壁细胞质中跨梯度转运到pH为1的分泌小管管腔内, 最后进入胃腔. 当质子泵受到抑制时, 由于阻断了胃酸形成的最终步骤, 所以不论是基础胃酸分泌, 还是各种形式引起应激性胃酸分泌都可受到有效的抑制.

■同行评价
本文对11例老年反流性食管炎患者长期应用质子泵抑制剂治疗的情况进行总结分析, 肯定了长期服用质子泵抑制剂治疗老年反流性食管炎的的疗效, 同时指出要警惕上消化道肿瘤的发生, 对临床有较大的指导意义.

或换用H_2受体拮抗剂维持治疗后, 出现息肉者有5例, 胃窦腺体绒毛状增生1例、食管及胃窦轻-中度不典型增生各1例, 也表明在服用质子泵抑制剂一段时间后停药, 各种癌前疾病或状态的发生似有增速表现, 尚需进一步探讨.

4 参考文献

1 陈清林, 操寄望, 罗和生. 洛塞克治疗反流性食管炎临床疗效观察. 胃肠病学和肝病学杂志 2002; 12: 42
2 高本林, 吴俊杰. 奥美拉唑 多潘立酮联合治疗老年人反流性食管炎. 江苏大学学报(医学版) 2002; 12: 591-592
3 张东兴, 马西宽. 兰索拉唑治疗老年人反流性食管炎42例. 中国综合临床 2000; 16: 65
4 Edwards SJ, Tind T, Lundell L. 质子泵抑制剂治疗急性反流性食管炎的系统回顾. 中华消化杂志 2002; 22: 491-493
5 李泽民, 陈正言. 老年反流性食管炎78例临床特点分析. 实用老年医学 2001; 15: 93-94
6 王升, 吴本俨, 吴道宏. 老年例胃食管反流病98例5年随访报告. 解放军医学杂志 2004; 29: 358-359
7 吴本俨, 邵勇, 李园, 王升, 尚铁跃, 雷全友. 北京地区老年人胃食管反流症状流性病学调查. 军医进修学院学报 2004; 25: 110-112
8 Mine S, Iida T, Tabata T, Kishikawa H, Tanaka Y. Management of symptoms in step-down therapy of gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1365-1370
9 Donnellan C, Sharma N, Preston C, Moayyedi P. Medical treatments for the maintenance therapy of reflux oesophagitis and endoscopic negative reflux disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD003245
10 Pilotto A, Franceschi M, Leandro G, Novello R, Di Mario F, Valerio G. Long-term clinical outcome of elderly patients with reflux esophagitis: a six-month to three-year follow-up study. *Am J Ther* 2002; 9: 295-300
11 Arguedas MR, Heudebert GR, Klapow JC, Centor RM, Eloubeidi MA, Wilcox CM, Spechler SJ; VA Cooperative Study Group. Re-examination of the cost-effectiveness of surgical versus medical therapy in patients with gastroesophageal reflux disease: the value of long-term data collection. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1023-1028
12 Lamberts R, Brunner G, Solcia E. Effects of very long (up to 10 years) proton pump blockade on human gastric mucosa. *Digestion* 2001; 64: 205-213
13 Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Tulassay Z, Pronai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and epithelial growth factor receptor expression and has no effect on apoptosis and p53 expression. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4721-4726

电编 张敏 编辑 张海宁

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研人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1527-1529
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

HBeAg(–)乙型肝炎后肝硬化的临床特征

焦以庆, 刘 萍

焦以庆, 北京地坛医院肝炎一科 北京市 100011
刘萍, 北京地坛医院检验科 北京市 100011
通讯作者: 焦以庆, 100011, 北京市东城区地坛公园13号, 北京地坛医院肝炎一科. jyq1898@sina.com
电话: 010-64211031-2303
收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-04-06

Clinical characteristics of patients with hepatocirrhosis after HBeAg-negative hepatitis B

Yi-Qing Jiao, Ping Liu

Yi-Qing Jiao, the First Department of Hepatitis, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Ping Liu, Department of Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Correspondence to: Yi-Qing Jiao, the First Department of Hepatitis, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. jyq1898@sina.com
Received: 2006-03-20 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To conclude the clinical characteristics of hepatocirrhosis after HBeAg-negative hepatitis B (HB).

METHODS: Three hundred and seventy-one patients with hepatocirrhosis after HB, from January to June in 2005, in Beijing Ditan Hospital, were classified into three groups: HBVDNA(+)HBeAg(+), HBVDNA(+)HBeAg(-), and HBVDNA(-)HBeAg(-), named group A, B, and C, respectively. The incidence rates of severe hepatitis and liver cancer, liver function and the level of blood lipid were observed.

RESULTS: The incidence rate of liver cancer was significantly higher in group B than that in group A or C (31.3% *vs* 19.2%, 18.2%, both $P < 0.05$). The incidence rate of severe hepatitis was not significantly different between all the groups. The levels of albumin (ALB), pro-albumin (PAB), and cholinesterase (ChE) were reduced remarkably in group A ($P < 0.05$), while the level of blood lipid in group C was higher than that in group A or B ($P < 0.05$). The level of total bile acid (TBA) was 96.89 ± 101.44, 76.46 ± 83.80, and 58.92 ± 77.17 μmol/L, respectively, in group A, B and C, and significant difference existed between each groups ($P < 0.01$). Mean virus load was markedly higher in group A than that in group B or C (2.5×10^7 *vs* 7.7×10^6, 0, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Hepatocirrhosis after HBVDNA(+)HBeAg(-) HB has a high incidence rate of liver cancer, and liver injury is lighter than that after HBVDNA(+)HBeAg(+) HB, but more severe than that after HBVDNA(-)HBeAg(-) HB.

Key Words: Hepatitis B e antigen; Hepatocirrhosis; Hepatitis B; Clinical characteristics

Jiao YQ, Liu P. Clinical characteristics of patients with hepatocirrhosis after HBeAg-negative hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1527-1529

摘要

目的: 探讨HBeAg(-)乙型肝炎后肝硬化患者临床特征.

方法: 我院2005-01/06, 肝硬化住院患者371例, 分为A, B, C三组, 分别为HBVDNA(+)HBeAg(+), HBVDNA(+)HBeAg(-), HBVDNA(-)HBeAg(-)3组进行分析. 观察癌变发生率、重症肝炎发生率, 肝功能及血脂等指标.

结果: B组癌变率明显高于A, C组(31.3% *vs* 19.2%, 18.2%, 均$P<0.05$); 重症肝炎发生率三组间无显著差异($P>0.05$); ALB、PAB、CHE在C, B, A三组间依次降低, A组降低最明显, 与其他B, C组差异呈高度显著性($P<0.05$). 血脂4项检测在C组最高, 与A, B组之间的差异呈高度显著性($P<0.05$). TBA在A, B, C三组间依次降低(96.89±101.44, 76.46±83.80, 58.92±77.17 μmol/L), 相互之间有显著性差异($P<0.01$). 平均病毒载量A组明显高于B, C组, 有显著性差异(2.5×10^7 *vs* 7.7×10^6, 0, $P<0.05$).

结论: HBVDNA(+)HBeAg(-)乙型肝炎后

■**背景资料**
既往认为, 慢性乙型肝炎患者HBeAg转阴、抗-HBe出现, 标志着病毒低复制, 病情较稳定. 近年来发现, 部分HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者体内仍有大量病毒复制, 炎症活动明显. 考虑这类患者存在前C区基因变异或基本核心启动子(BCP)基因突变.

■**研发前沿**
HBeAg阴性慢性乙型肝炎致重型肝炎和肝硬化、肝癌的比率较多, 治疗比较困难. 已经在临床上受到重视. 关于此类病人, 临床上如何更有效的治疗, 是亟待解决的问题.

肝硬化患者癌变率高; 肝脏受损程度介于HBeAg(+)DNA(+)组和HBeAg(-)DNA(-)组之间.

关键词: 乙型肝炎病毒e抗原; 乙型肝炎; 肝硬化; 临床特征

焦以庆, 刘萍. HBeAg(–)乙型肝炎后肝硬化的临床特征. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1527–1529
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1527.asp

■**创新盘点**
本文首次对HBeAg(-)乙型肝炎后肝硬化患者临床特征进行系统分析.

0 引言

近年来研究发现, HBeAg阴性慢性乙型肝炎致重型肝炎[1-2]和肝硬化[3]、肝癌的比率较多[4], 治疗比较困难[5-8]. 已经在临床上受到重视[9]. 在HBeAg(-)乙型肝炎后肝硬化患者中是否存在类似的现象, 探讨如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01-01/2005-06-30, 所有在我院住院的乙型肝炎后肝硬化患者, 诊断标准符合2000年修订的病毒性肝炎防治方案[10]. 排除条件: 合并酒精性肝硬化, 合并其他病毒性感染(丙型肝炎、戊型肝炎病毒、HIV), 梗阻性黄疸, 自身免疫性肝炎. 符合入选条件者共371例, 男277例, 女94例, 年龄20-82(平均50.5)岁.

1.2 方法 回顾性统计, 根据患者检测结果, 分为HBVDNA(+)HBeAg(+)、HBVDNA(+) HBeAg(-)、HBVDNA(-) HBeAg(-)3组进行分析. 观察: 重症肝炎发生率; 癌变发生率; 化验: ALT、AST、胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)、胆汁酸(TBA)、凝血酶原活动度(PTA)、前白蛋白(PAB)、胆碱酯酶(CHE). 血脂4项: 胆固醇(CHO)、甘油三脂(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL).

统计学处理 应用SPSS11.0进行分析, 应用列联表卡方检验和单因素方差检验.

2 结果

2.1 癌变及重症肝炎发生率 HBeAg(-)DNA(+)组癌变率明显高于另外2组. 该组平均年龄最高, 但与其他2组比较无统计学意义. 重症肝炎发生率3组间无显著差异(表1).

2.2 化验结果比较 ALB、PAB、CHE在HBeAg(-)DNA(-)、HBeAg(-)DNA(+)、HBeAg(+)DNA(+)3组间依次降低, HBeAg(+)DNA(+)组降低最明显, 与其他2组差异呈高度显著性. 血脂4项检测在HBeAg(-)DNA(-)组最高, 与另外2组之间的差异呈高度显著性. TBA在HBeAg(+)DNA(+)、HBeAg(-) DNA(+)、HBeAg(-)DNA(-)3组间依次降低, 相互之间有显著性差异. 平均病毒载量HBeAg(+)DNA(+)组明显高于HBeAg(-)DNA(+)组, 有显著性差异(表2). 其他指标ALT, AST, TBIL, GLO, PTA, CHE等, 3组之间无显著性差异.

■**应用要点**
本组资料显示, 乙型肝炎后肝硬化癌变率与病毒变异相关, 肝脏损伤与病毒载量相关, 因此在临床上, 可以对不同的患者采取不同的治疗措施.

表 1 乙型肝炎后肝硬化癌变和重症肝炎发生率比较

观察指标	HBeAg(+)DNA(+)	HBeAg(–)DNA(+)	HBeAg(–)DNA(–)
n	172	166	33
平均年龄 (岁)	49.6	51.6	50.5
癌变人数 (91)	33 (19.2%)	52 (31.3%)[a]	6 (18.2%)
重肝人数 (18)	9 (5.2%)	8 (4.8%)	1 (3.0%)

[a]$P<0.05$ *vs* HBeAg(+)DNA(+)组和HBeAg(–)DNA(–)组.

表 2 乙型肝炎后肝硬化化验结果比较 (mean ± SD)

观察指标	HBeAg(+)DNA(+)	HBeAg(–)DNA(+)	HBeAg(–)DNA(–)
ALB (g/L)	30.34 ± 5.28[a]	31.78 ± 5.80	31.78 ± 6.73
PAB (mg/L)	70.07 ± 32.22[a]	76.62 ± 41.11	91.98 ± 53.07
CHE (μkat/L)	42.6 ± 29.5[a]	42.3 ± 32.9	59.9 ± 45.5
CHO (mmol/L)	2.83 ± 1.24	2.78 ± 1.14	2.97 ± 1.28[b]
TG (mmol/L)	0.82 ± 0.68	0.84 ± 0.74	0.91 ± 0.86[b]
HDL (mmol/L)	0.82 ± 0.44	0.78 ± 0.42	0.92 ± 0.38[b]
LDL (mmol/L)	1.00 ± 0.75	0.97 ± 0.61	1.11 ± 0.75[b]
TBA (μmol/L)	96.89 ± 101.44	76.46 ± 83.80	58.92 ± 77.17[c]
平均病毒载量 (copies/L)	2.5×10^{7}[d]	7.7×10^{6}	0

[a]$P<0.01$ *vs* HBeAg(–)DNA(+)组和HBeAg(–)DNA(–)组, [b]$P<0.05$ *vs* HBeAg(–)DNA(+)组和HBeAg(+)DNA(+)组, [c]$P<0.01$ *vs* HBeAg(–) DNA(+)组和HBeAg(+)DNA(+)组, [d]$P<0.05$ HBeAg(–)DNA(+)组和HBeAg(–)DNA(–)组.

3 讨论

通过对371例患者的分析表明, HBeAg(-)乙型肝炎后肝硬化患者中, 由于HBVDNA状态的不同, 其临床表现有明显差异. 结果发现, HBVDNA(+)HBeAg(-)组病例癌变率高; 肝脏受损程度介于HBeAg(+)HBVDNA(+)组和HBeAg(-)HBVDNA(-)组之间. 乙型肝炎自然感染史[11]中, HBeAg阴性反映了该患者已经过免疫耐受期、免疫清除期, 进入低复制期[12], 但部分患者发生了前C区变异或基本核心启动子(BCP)变异, 使HBeAg不能产生或表达水平下降, 但HBVDNA(+), 病毒复制仍然活跃, 炎症活动明显[4,9,13-14]. 目前认为此类慢性乙型肝炎患者病情重, 治疗困难, 预后差. 在乙型肝炎后肝硬化患

者中, 我们发现HBVDNA(+)HBeAg(-)组患者癌变率高, 这与既往柯伟民 *et al*[15]报道相似. 其原因可能与病毒变异有关[16-18], 向光明 *et al*报道, 基本核心启动子(BCP)与HBxAg部分重叠, 该区域核苷酸发生变异, 可能导致原发性肝癌发生[19-21].

对化验指标的分析, 我们发现, 肝脏炎症活动的指标ALT、AST、TBIL各组之间无显著差异. 在HBeAg(+)HBVDNA(+)组病例中合成功能的指标ALB、PAB、CHE等最低, 血脂4项指标明显降低, 肝损伤指标TBA最高, 清楚地表明该组病例肝脏受损最严重. 与之相反, HBeAg(-)HBVDNA(-)组病例肝脏功能比较稳定. HBeAg(-)HBVDNA(+)组介于二者之间. 究其原因, 考虑和病毒载量有关[22-23]. 因此, 对于肝硬化患者, 在有条件的情况下, 积极适当的抗病毒治疗, 防止病毒变异, 对于稳定病情, 减轻肝脏损害有积极的意义[24-26].

4 参考文献

1 张汉荣, 刘新钰, 孙梅, 钟备, 赵巍, 曹利, 李敏. 慢性重型乙型肝炎患者的乙型肝炎病毒C基因启动子和前C基因变异及与e抗原系统的关系. 江苏医药 2004; 30: 406-408

2 林裕龙, 侯金林, 王战套, 孙剑, 问丽, 骆抗先. e抗原阴性重症乙型肝炎患者HBV前C区热点变异研究. 第一军医大学学报 2001; 11: 852-854

3 Li JQ, Zhuang H, Du H, Wang XH, Duan XZ. Hepatitis B virus genotypes and alanine aminotransferase levels in HBeAg negative patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 491-493

4 贾继东. 乙型肝炎e抗原阴性慢性乙型肝炎的治疗. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 539

5 Consensus statements on the prevention and management of hepatitis B and hepatitis C in the Asia-Pacific region. Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 825-841

6 Ibragimova MM, Krel' PE, Abdurakhmanov DT. HBeAg-negative chronic hepatitis. *Ter Arkh* 2004; 76: 87-91

7 Krastev Z, Jelev D, Antonov K. Long-term supportive cyclical re-treatment in HBeAg-negative IFN responders. *J Hepatol* 2005; 42: 277-278

8 金生, 周卫平, 张大志. HBeAg阴性慢性乙型肝炎的治疗进展. 西部医学 2004; 16: 174-176

9 赵巍, 张汉荣, 刘新钰, 孙梅, 钟备. 乙型肝炎病毒C基因启动子和前C基因变异对HBeAg表达及病情的影响. 中国生化药物杂志 2004; 25: 165-166

10 中华医学会肝病学分会、传染病与寄生虫病学分会修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324

11 王豪. 乙型肝炎病毒感染的自然史. 中国计划免疫 2004; 10: 166-170

12 任慧琼, 傅青春. 乙型肝炎的自然史和预后 2003; 8: 36-37

13 陈成伟. 血清乙型肝炎病毒载量与肝细胞癌发生的关系. 中华内科杂志 2005; 44: 715-716

14 王豪. HBeAg阴性慢性乙型肝炎. 肝脏 2004; 9: 24-28

15 柯伟民, 邓洪, 李学俊, 李建国, 姚集鲁. 慢性乙型肝炎e系统状态与肝纤维化及癌变的关系. 中国癌症杂志 2000; 10: 531-533

16 高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖. 乙型肝炎核心启动子的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 933-936

17 王中林. 乙型肝炎病毒相关原发性肝癌的分子发病机制. 国外医学・流行病学传染病学分册 2004; 31: 283-285

18 方钟燎, 何并文, 庄辉, Ling Ring, Tim J Harrison. 广西肝癌患者乙型肝炎病毒前C区基因的突变. 中华预防医学杂志 2000; 34: 83-85

19 向光明, 钟森. 乙肝病毒基因组变异与肝细胞癌的关系研究进展. 国外医学病毒学分册 2005; 12: 65-67

20 丁海, 薛迪广, 刘伟. 乙肝X基因在原发性肝癌及转移中表达的临床研究. 临床消化病杂志 2002; 14: 243-244

21 刘亮文, 罗文, 刘晶美, 张吉翔. HBx在原发性肝癌发病中的作用及其生物治疗策略. 世界华人消化杂志 2005; 13: 432-439

22 黄毅, 伍严安, 马晓宁, 陈华. 乙型肝炎后肝硬化患者血清HBV DNA测定含量及其临床意义. 福建医药杂志 2004; 26: 97-98

23 李延军, 冯继红, 徐光华. 病毒载量在乙肝肝硬化中的意义探讨. 临床肝胆病杂志 2005; 21: 114

24 巫贵成, 周卫平, 赵有蓉, 郭树华, 王志毅, 邹淑碧, 张全海, 任红, 黄爱龙, 张定风. 慢性乙型肝炎自然史的研究. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 45-48

25 王守义. 慢性乙型肝炎并肝硬化的抗病毒治疗. 医师进修杂志 2005; 28: 3-4

26 张占卿, 周汉高. 慢性乙型肝炎相关的失代偿性肝硬化的抗病毒治疗. 世界感染杂志 2001; 1: 61-63

■名词解释

前C区变异或基本核心启动子(BCP)变异: HBeAg由前C/C基因表达, 并受到C基因启动子(core promoter, CP)调控. CP和前C基因变异均能造成HBeAg表达下降或停止.另有报道, 这两处基因变异还与乙型肝炎的病情程度有关.

■同行评价

本文探讨了HBV DNA和HBeAg的结果与肝癌发生的关系, 全文可信度高, 指导临床实践性强, 下一步应多中心协作调查, 为阻断肝硬化向肝癌发展提供更多的理论依据和临床依据.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1530-1532
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

国人特发性收缩性肠系膜炎47例

顾国利, 王石林, 周晓武

顾国利, 王石林, 周晓武, 空军总医院普通外科 北京市 100036
通讯作者: 顾国利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院普通外科. kzggl@163.com
电话: 010-68410099-6302
收稿日期: 2006-04-13 接受日期: 2006-04-27

■背景资料
临床上特发性收缩性肠系膜炎十分少见, 极易被误诊漏诊. 分析原因除了该病缺乏特异性的临床和影像学表现外, 也与临床医生对该病缺乏更深入、系统、详实的认识有关. 国内外关于该病的报道以个案为主, 缺乏总结材料.

■创新盘点
本文作者在总结自己诊治经验的同时, 通过权威数据库的文献检索, 将最近28 a来零散的报道资料进行总结,希望归纳总结出中国人的特发性收缩性肠系膜炎的流行病学和临床病理特点.

Clinical characteristics of Chinese retractile mesenteritis: an analysis of 47 cases

Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Xiao-Wu Zhou

Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Xiao-Wu Zhou, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, Beijing 100036, China
Correspondence to: Guo-Li Gu, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, Beijing 100036, China. kzggl@163.com
Received: 2006-04-13 Accepted: 2006-04-27

Abstract
AIM: To summarize the clinical characteristics of Chinese retractile mesenteritis.

METHODS: Three patients diagnosed with retractile mesenteritis in our hospital and 44 ones reported in 33 articles were concluded in this study. The clinical data, including the ages, sex, predisposing factors, clinical manifestations, diagnosis and treatment, locations and sizez of the lesions, and prognosis, were analyzed.

RESULTS: Chinese retractile mesenteritis mainly occurred in middle-aged and old patients (mean age: 46 ± 18), among which the male and females covered an equivalent proportion. Its dominant symptoms were bellyache and celiac mass. The mean value of long diameter was more than 5 cm (mean: 8.5 ± 3.5 cm) in majority. The focus located in the mesentery of small intestine most frequently, then came to ascending colon, transverse colon, descending colon sigmoid colon and epiploon, orderly.

CONCLUSION: Non-specific symptoms and physical signs lead to a high rate of misdiagnosis in patients of retractile mesenteritis. The accurate diagnosis for retractile mesenteritis depends on pathological and surgical examination.

Key Words: Retractile mesenteritis; Sclerosing mesenteritis; Mesenteric panniculitis; Mesenteric Weber-Christian disease; Diagnosis; Treatment

Gu GL, Wang SL, Zhou XW. Clinical characteristics of Chinese retractile mesenteritis: an analysis of 47 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1530-1532

摘要
目的: 分析国人特发性收缩性肠系膜炎的临床特点, 提高对该病的认识, 避免误诊误治.

方法: 回顾性分析我院确诊的3例和近28 a来国内期刊发表的33篇文献报道44例总共47例特发性收缩性肠系膜炎的临床资料, 总结其在发病年龄、性别、诱因、临床表现、诊治、病变部位大小、预后等方面的特点.

结果: 特发性收缩性肠系膜炎好发于中老年, 男女比例相当. 以腹痛和腹部肿物为主要表现, 病变长径多>5 cm, 以小肠系膜多见, 其次是盲肠升结肠系膜, 横结肠、降结肠、乙状结肠系膜和大网膜少见.

结论: 特发性收缩性肠系膜炎缺乏特异性的临床和影像学表现, 极易被误诊. 确诊主要依赖手术探查和病理检查. 本病的预后好. 临床上提高对该病的认识和病理检查是提高确诊率的关键.

关键词: 收缩性; 硬化性; 肠系膜炎; 肠系膜型Weber-Christian病; 肠系膜型脂膜炎; 诊断; 治疗

顾国利, 王石林, 周晓武. 国人特发性收缩性肠系膜炎47例. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1530-1532
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1530.asp

0 引言
特发性收缩性肠系膜炎(retractile mesenteritis, RM)是一种罕见的特发性、非肿瘤性、瘤病样

肠系膜炎性疾病[1]. 因少见且缺乏特异性的临床和影像学表现,该病极易被误诊漏诊. 现将我院确诊的3例及经检索中国生物医学文献数据库CBMDisc(1978年至今)和清华同方医学期刊数据库CNKI(1994年至今)所得的文献33篇44例[2-34]综合分析报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 特发性收缩性肠系膜炎47例, 男25例, 女22例, 男女比例1.14∶1. 年龄4-80(中位46±18)岁; >40岁者32例(68.1%). 病程6 h-10 a, 平均30 d. 发病前有腹腔感染或腹部外伤手术史者9例(19.1%), 进餐诱发者2例(4.26%). 其余无明确诱因. 38例(80.9%)以腹痛为首发症状, 程度由隐痛到剧痛不等. 9例(19.1%)以腹部肿物为首发症状. 症状体征集中于右下腹者22例(46.8%), 左下腹、中腹部各6例(各占12.8%),下腹部5例(10.6%), 左上腹、右上腹各4例(各占8.5%), 伴发热者26例, 腹肌紧张8例, 腹胀、恶心呕吐、体质量下降者6例. 18例行腹部影像学检查, 其中超声、MRI、CT发现腹腔肿物者10例, 明确定位于肠系膜者3例. 腹部平片及钡剂造影均未发现病变. 全部病例均是通过手术后的组织病理检查确诊. 病理检查发现单个病灶者34例(72.3%), 多个病灶者13例(27.7%). 病变位于小肠系膜者26例(55.3%),盲肠升结肠系膜9例(19.1%), 横结肠系膜、降结肠乙状结肠系膜各5例(各占10.6%), 大网膜者2例(4.3%). 病变长径<5 cm者9例(19.1%), 5-10 cm者24例(51.1%), >10 cm者14例(29.8%); 平均8.5±3.5 cm. 本组术前和术中均被误诊, 误诊率100%. 被误诊为结肠癌14例, 腹腔肿瘤7例, 肠系膜肿瘤、阑尾炎各6例, 腹腔结核4例, 腹膜炎、肠梗阻各3例, 消化道穿孔、卵巢囊肿扭转、胰腺炎、腹膜后肿瘤各1例.

1.2 方法 本组均行手术治疗, 其中行病变+肠段切除者28例(59.6%), 单纯病变切除者13例(27.7%), 仅行病变活检者6例(12.8%). 手术后给予强的松等免疫抑制剂治疗者9例(19.1%).

统计学处理 使用SPSS11.5统计软件进行统计, 用mean±SD表示.

2 结果

本组无手术死亡, 均治愈出院. 有随访记录者20例, 随访时间8 mo-7 a,有3例分别在术后2 mo、5 mo、2 a复发, 均再次行手术治疗后恢复健康. 其余出院后健康.

3 讨论

目前RM的病因、病原体和自然病程均不清楚[1]. 有学者认为该病是自身免疫性疾病, 也有学者认为其与自身免疫、感染、手术和创伤等综合因素有关[35]. 自1955年Crane *et al*首次报道以来, 该病有很多命名, 包括: 硬化性肠系膜炎、缩窄性肠系膜炎、肠系膜脂膜炎、肠系膜硬化性脂性肉芽肿、肠系膜黄色肉芽肿、脂质硬化性肠系膜炎、肠系膜脂性营养障碍、肠系膜Weber-Christian病等. 目前较多学者[1,35-36]倾向于用特发性收缩性肠系膜炎来命名. 本组显示国内RM以中老年多见(占72.1%), 中位发病年龄46岁, 病程从数小时至10 a, 部分病例发病前有腹部感染及创伤手术的可能诱因. 这些都与国外资料报道[35-36]相仿. 但国外报道本病男女比例约2-3∶1, 而本组为1.14∶1, 性别比例基本相当. 分析原因除可能与本组例数稍少有关外, 也不排除人种差异所致. 综合本组资料发现本病以腹痛和腹部肿物为主要表现, 可伴随一些非特异性症状. 腹痛以下腹(含左右下腹)为主(占70.2%), 中上腹较少; 疼痛程度差异很大. 病灶以单发居多(72.3%), 长径多>5 cm(80.9%). 国外报道本病较少发生于结肠系膜, 但本组发生于结肠系膜者与位于小肠系膜的比例基本持平(21∶26), 可见其发生于结肠系膜并不少见.

因本病很少累及肠管, 因此传统的腹部X线检查及钡剂造影很难发现病变. 另外由于肠系膜易活动、表面肠管阻隔、无特异性表现以及肠系膜病变较少见, 因此影像学检查既难定位、更难定性. 有学者认为[37]CT和MRI是术前诊断本病的有效手段. 本组被作出正确定位诊断的3例中有2例行CT检查. 由于本病少见、起病隐匿且症状表现复杂多样, 又无特异性影像学表现或特殊化验指标, 因此临床上极易被误诊漏诊. 有时病理也可因缺乏经验而不能确诊导致延误治疗或误诊为其他疾病[38]. 本组在术前和术中均被误诊, 均是通过术后组织病理检查得到确诊. 因此, 临床上提高对该病的认识和病理检查是提高确诊率的关键.

文献报道[1,35-39]本病预后较好, 复发率低. 因病因不明, 我们认为对其手术范围宜小. 肠系膜病变较小时可行病变切除. 如病变广泛,术中冰冻病理明确诊断后, 肠系膜病变可不切除或仅清除坏死组织, 而以处理肠梗阻等并发症为主. 如无梗阻不要盲目切除肠管. 本组行肠段切

■应用要点

本文试图通过对零散的个案资料的总结, 归纳出中国人特发性收缩性肠系膜炎的临床病理特点, 以期临床医生在一线工作中提高对该病的认识和诊治技能, 避免误诊误治.

■名词解释
特发性收缩性肠系膜炎是一种罕见的特发性、非肿瘤性、瘤病样肠系膜炎性疾病. 其病因、病原体和自然病程均不清楚, 自1955年Crane首次报道以来, 该病命名较混乱, 包括: 硬化性肠系膜炎、肠系膜脂膜炎、肠系膜硬化性脂性肉芽肿、肠系膜脂性营养障碍、肠系膜Weber-Christian病等. 目前较多学者倾向于用特发性收缩性肠系膜炎来命名.

除者较多是因为误诊为结肠癌和肠系膜肿瘤所致; 实际上未行肠段切除者也取得了较好的疗效. 本组在确诊后未行免疫抑制治疗者预后也较好, 复发率不高. 因此对本病是否必须进行免疫抑制治疗、如何治疗及治疗多久都还值得继续探索.

4 参考文献

1 李荣. 外科疾病误诊误治与防范. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 7-9
2 吕平. 收缩性肠系膜炎1例. 中国医师进修杂志 1989; 9: 46
3 曹国祥, 付锡锟, 王庆林. 收缩性肠系膜炎一例报告. 实用外科杂志 1985; 5: 142
4 朱云华, 周元. 硬化性肠系膜炎. 江苏医药杂志 1983; 9: 22-23
5 沈家驹, 潘林祥, 朱泰来. 硬化性肠系膜炎1例. 江苏医药杂志 1987; 13: 453
6 周视华, 韩锡琳, 陈菊荣. 肠系膜Weber-christian病1例. 中国实用外科杂志 1994; 14: 424
7 袁海霞, 季正标, 丁红, 王文平. 肠系膜Weber-christian病1例报告. 中国临床医学杂志 2004; 11: 1090
8 滕伟, 刘凯. 肠系膜Weber-Christian病误诊1例报告.辽宁医学杂志 2002; 16: 50-51
9 陶文华. 肠系膜型Weber-Christian病1例. 实用内科杂志 1985; 5: 390
10 叶晟, 刘友富, 袁政洪. 肠系膜型Weber-Christian病二例. 中华普通外科杂志 2000; 15: 126
11 郑林方, 杨根仁. 肠系膜脂肪炎1例报告. 浙江实用医学杂志 2004; 9: 57
12 安会波, 高洁. 肠系膜脂膜炎1例. 河北医学杂志 2002; 24: 704
13 顾太国. 肠系膜脂膜炎三例报告. 中国医师进修杂志 1989; 12: 246
14 金秋艳, 舒建厂, 张明. 肠系膜脂膜炎一例报道. 腹部外科杂志 2004; 17: 342
15 梁增义, 张静华, 邓福生. 肠系膜脂膜炎致急腹症2例. 天津医药杂志 1986; 28: 40
16 柳祥庭, 刘延军. 对回缩性肠系膜炎的补充. 临床放射杂志 1994; 13: 188
17 陈宽仁. 坏死性肠系膜炎1例. 现代医药卫生杂志 2001: 17
18 源刚晖, 麦月檬. 回肠系膜收缩性肠系膜炎1例. 广东医学杂志 1999; 20: 706
19 柳祥庭. 介绍一罕见的病种: 收缩性肠系膜炎. 现代医用影像学杂志 1994; 3: 85
20 徐佰成. 空肠系膜炎性肉芽肿1例. 中华超声影像学杂志 2002; 11: 285
21 张红丹, 周祖平. 收缩性肠系膜炎误诊盲肠肿瘤3例报告. 实用医学杂志 1994; 10: 125-126
22 陈立明. 收缩性肠系膜炎致急性腹膜炎三例报告. 临床误诊误治杂志 1996; 9: 264-265
23 胡茂清, 何茜, 邓亚敏. 缩窄性肠系膜炎一例. 放射学实践杂志 2005; 20: 650-651
24 范远芳, 张兴云. 特发性回缩性肠系膜炎误诊阑尾炎1例. 中国实验诊断学杂志 1999; 3: 283
25 顾国利, 王石林, 魏学明. 特发性收缩性肠系膜炎两例报告. 空军总医院学报杂志 2004; 20: 242-246
26 顾国利, 王石林, 魏学明, 王洪海. 特发性收缩性肠系膜炎一例. 中华普通外科杂志 2004; 19: 525
27 姜军, 詹新恩, 蔡志民, 马宏敏. 特发性收缩性肠系膜炎一例. 中华普通外科杂志 1999; 14: 236-237
28 何勇, 马庆久, 褚延奎. 特发性收缩性肠系膜炎一例报道及文献回顾. 世界胃肠病杂志 2000; 5: 76
29 穆如颖. 特发性收缩性肠系膜炎一例报告. 腹部外科杂志 2000; 13: 86
30 白文启, 任元满, 郗彦凤. 特发性收缩性肠系膜炎诊治(附2例报告). 临床医药实践杂志 2004; 13: 116-117
31 刘志坚. 特发性收缩性横结肠系膜炎误诊一例. 中国厂矿医学杂志 2002; 15: 352-353
32 刘改文, 王强. 乙状结肠冗长伴收缩性肠系膜炎1例. 中国实用外科杂志 2002; 22: 508
33 廖圣芳, 张诚华, 凌小明. 乙状结肠系膜多发性囊肿伴脂膜炎误诊一例报告. 腹部外科杂志 1999; 12: 279
34 蒋振善, 张祖荀, 吕翔. 硬化性肠系膜炎四例报告. 腹部外科杂志 1996; 9: 77-78
35 Emory TS, Monihan JM, Carr NJ, Sobin LH. Sclerosing mesenteritis, mesenteric panniculitis and mesenteric lipodystrophy: a single entity? *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 392-398
36 姜军, 詹新恩. 特发性收缩性肠系膜炎. 国外医学•外科分册 1998; 25: 214-216
37 齐滋华, 徐惠. 肠系膜脂膜炎的影像学表现. 医学影像学杂志 2003; 13: 355-357
38 谭郁彬, 张万鑫. 外科诊断病理学. 第2版. 天津: 天津科学技术出版社, 2000: 553-554
39 史景泉, 陈意生. 现代外科病理学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1998: 250-253

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1533-1536
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

腹水/血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别价值

黄家淼, 杨 剑, 周仁荣, 胡 健

黄家淼, 杨剑, 周仁荣, 胡健, 中国人民解放军81医院消化科 江苏省南京市 210002
通讯作者: 黄家淼, 210002, 江苏省南京市太平南路34标34号, 中国人民解放军81医院消化科. hjmnj@sohu.com
电话: 025-80864047 传真: 025-86648090
收稿日期: 2006-03-28 接受日期: 2006-04-13

Values of simultaneous determination of 5 tumor markers in fluid and serum and their ratio in differential diagnosis of benign and malignant ascites

Jia-Miao Huang, Jian Yang, Ren-Rong Zhou, Jian Hu

Jia-Miao Huang, Jian Yang, Ren-Rong Zhou, Jian Hu, Department of Gastroenterology, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jia-Miao Huang, Department of Gastroenterology, the 81st Hospital of Chinese PLA, 34-34 Taiping South Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. hjmnj@sohu.com
Received: 2006-03-28 Accepted: 2006-04-13

Abstract

AIM: To evaluate the values of the simultaneous determination of tumor markers AFP, CEA, CA19-9, CA50 and CA125 in fluid and serum, and their ratio (F/S) in the differential diagnosis of benign and malignant ascites.

METHODS: Serum and ascites fluid specimens were simultaneously collected from 105 patients with ascites (benign 57, malignant 48). The tumor markers AFP, CEA were determined by electrochemoluminescence. The tumor markers CA19-9, CA50 and CA125 were measured with radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: The F/S ratios were all lower than 1.2 in benign ascites fluid and higher than 1.2 in the majority of malignant fluid when the tumor marker content in fluid was higher than the normal cut-off of serum (AFP > 25 μg/L, CEA > 5 μg/L, CA19-9 > 37 kU/L and CA50 > 20 mg/L). The combination of a F/S ratio greater than 1.2 and a cut-off stated above showed sensitivities of 18.8%, 62.5%, 58.3% and 72.9%, respectively for AFP, CEA, CA19-9 and CA50, with a specificity of 100%, These sensitivities were significantly higher than those of a single determination of concentration in fluid or F/S ratio (16.7%, 37.5%, 29.2% and 47.9%)($P < 0.01$) besides AFP. The combined sensitivity of 4 tumor markers and their F/S ratios was 91.7% with a specificity of 100%.

CONCLUSION: In comparison with either single determination of concentration in serum or fluid, the sensitivity and specificity of tumor markers AFP, CEA, CA19-9 and CA50 can be significantly increased by simultaneous determination of the concentration in fluid and their F/S ratio.

Key Words: Ascites; Benign; Malignant; Differential diagnosis; Tumor Markers

Huang JM, Yang J, Zhou RR, Hu J. Values of simultaneous determination of 5 tumor markers in fluid and serum and their ratio in differential diagnosis of benign and malignant ascites. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(15):1533-1536

摘要

目的: 评价同时测定腹水和血清中5种肿瘤标志物AFP, CEA, CA19-9, CA50, CA125水平及其腹水/血清(F/S)比值对良恶性腹水鉴别诊断的价值.

方法: 对明确诊断的腹水患者105例(良性57例, 恶性48例)同时采血和抽取腹水, 采用化学发光法测定AFP和CEA, 免疫放射分析法测定CA19-9, CA50和CA125.

结果: 腹水中肿瘤标志物的水平高于血清正常上限值(AFP>25 μg/L, CEA>5 μg/L, CA19-9>37 kU/L和CA50>20 mg/L)时, 良性腹水的F/S比值都小于1.2, 而恶性腹水的绝大多数F/S比值大于1.2. 腹水AFP, CEA, CA19-9, CA50的上述上限值结合F/S比值大于1.2, 诊断敏感性分别为18.8%, 62.5%, 58.3%和72.9%, 除AFP外, 皆显著高于单纯的腹水浓

■背景资料
良恶性腹水的鉴别诊断是消化内科医师经常要面对的挑战. 血清和腹水肿瘤标志物检测是鉴别良恶性腹水的重要方法之一, 但敏感性和特异性较低. 腹水和血清肿瘤标志物及比值同时测定用于良恶性腹水的鉴别诊断, 值得探索.

■研发前沿
引起恶性腹水的病因复杂, 分原发和转移两类. 腹膜转移癌可来自不同组织和器官. 至今尚无一种理想的肿瘤标志物能兼有高度敏感性和特异性. 选择几种特异性高的标志物联合检测, 能提高诊断的敏感性.

■相关报道
Trape *et al* 2004年在以胸水为主的研究中，引进肿瘤标志物体液/血清(F/S)比值用于良恶性胸、腹水的鉴别诊断，认为CEA，CA19-9和CA153的F/S比值在特异性100%时的诊断敏感性显著高于单纯的体液浓度测定.

度和F/S比值的敏感性(16.7%, 37.5%, 29.2%和47.9%)(P<0.01). 四项联合诊断敏感性达91.7%, 特异性100%.

结论: 与单纯血清或腹水中浓度测定相比, 同时测定肿瘤标志物AFP, CEA, CA19-9和CA50的腹水浓度和F/S比值能显著提高诊断的敏感性和特异性, 对良恶性腹水的鉴别诊断具有较大的价值.

关键词: 腹水; 良性; 恶性; 鉴别诊断; 肿瘤标志物

黄家淼, 杨剑, 周仁荣, 胡健. 腹水/血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别价值. 世界华人消化杂志 2006;14(15):1533-1536
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1533.asp

0 引言

通常将腹水分为良性和恶性, 后者约占腹水的10%-30%[1-2]. 细胞学检查仍为恶性腹水确诊的金标准, 但其敏感性仅为30%-50%[1]. 近年来染色体检测、单抗免疫细胞化学染色和端粒酶活性检测的应用使细胞学检查法敏感性增加, 但仍不理想. 研究表明, 检测腹水中IL-2, IL-6, TNF-α, 钙黏附素及VEGF等有助于良、恶性腹水的鉴别诊断[3-4], 但离临床广泛使用尚需时日. 检测血清和腹水中的肿瘤标志物已普遍用于恶性腹水的诊断[5-11], 然而, 已有一些研究结果显示, 在某些良性腹水如结核、肝硬化并自发性腹膜炎等患者的血清和腹水中肿瘤标志物的水平显著升高[12-14], 对鉴别诊断造成困难. 我院2002-01-01/2005-11-30同时测定腹水患者血清和腹水中AFP, CEA, CA19-9, CA50和CA125 5种肿瘤标志物, 目的在于探讨联合检测能否提高诊断的敏感性和特异性.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-01-01/2005-11-30明确腹水性质的患者105例, 男72例, 女33例, 平均50.5岁. 恶性腹水48例, 病因: 肝细胞癌12例, 胆囊癌2例, 胰腺癌6例, 胃癌10例, 结肠癌6例, 十二指肠癌1例, 卵巢癌6例, 恶性腹膜间皮瘤2例, 原发病灶不明的转移性腺癌3例. 均经腹水细胞学、多功能腹膜检查针活检[15]或腹腔镜、手术病理证实. 良性腹水57例, 病因: 肝硬化40例(其中并自发性腹膜炎者10例), 结核性12例, 类风湿(Felty综合征)1例, Budd-Chiari综合征3例, 脾包膜下出血反应性腹膜炎1例. 均符合相关疾病诊断标准和治疗有效证实. 入院次日清晨空腹采血, 同日上午抽取腹水(距采血时间4 h内).

1.2 方法 AFP和CEA测定采用化学发光法, 美国Beckman Coulter公司仪器; CA19-9和CA125采用免疫放射分析法, 美国Centocor公司试剂盒; CA50采用免疫放射分析法, 天津市协和医药科技有限公司试剂盒. 血清AFP<25 μg/L, CEA<5 μg/L, CA19-9<37 kU/L和CA50<20 mg/L为正常上限值.

统计学处理 良恶性腹水肿瘤标志物浓度和腹水/血清(F/S)比值均值的比较采用Mann-Whitney U检验. 计数资料的比较采用χ^2检验.

2 结果

除CA125血清含量良恶性组比较无显著性差异外, 其余4种标志物腹水和血清中含量及F/S比值, 恶性腹水组均高于良性腹水组, 差异有显著性意义(P<0.05或P<0.01, 表1). 以良性腹水中肿瘤标志物的最高浓度或最大F/S比值作为上限值(即特异性100%时), AFP, CEA, CA19-9和CA50四种肿瘤标志物的F/S比值的诊断敏感性与腹水浓度的诊断敏感性相比, 差异无统计学意义(P>0.05). CA125的F/S比值的诊断敏感性低于腹水浓度的诊断敏感性(表2). 当腹水中AFP>25 μg/L, CEA >5 μg/L, CA19-9>37 kU/L和CA50>20 mg/L时, 良性腹水的F/S比值均小于1.2; 而恶性腹水的F/S比值绝大多数大于1.2. 也即良性腹水F/S比值大于1.2的情况均发生于四种肿瘤标志物腹水浓度低于上述上限值时. 因此, 如表3所示: F/S>1.2结合AFP>25 μg/L, CEA>5 μg/L, CA19-9>37 kU/L和CA50>20 mg/L(即血清正常上限值)联合诊断, 在特异性100%时, 诊断敏感性分别为18.8%, 62.5%, 58.3%和72.9%, 除AFP外, 各项与单纯腹水浓度和单纯F/S比值的诊断敏感性比较, 有显著提高(P<0.01). 四项联合诊断敏感性达91.7%, 特异性100%. 良恶性腹水间CA125的腹水浓度与F/S比值间无上述规律性, 增加CA125的五项联合与四项联合比较, 在特异性100%时, 诊断敏感性无显著性差异(P>0.05).

3 讨论

腹水是临床常见病症, 肝硬化、腹膜结核、腹膜转移癌和腹膜原发肿瘤是引起腹水的最常见病因[1-2]. 临床上为治疗和判断预后常需先区分腹水的良恶性, 细胞学是最常用的诊断方法, 但其敏感性常低于50%[1]. 因此, 非常需要有其他技

■创新盘点
本研究结果表明, 肿瘤标志物F/S比值在特异性100%时的诊断敏感性并不优于单纯的腹水浓度测定. 但F/S>1.2联合腹水中肿瘤标志物浓度高于正常血清上限值, 能显著提高诊断敏感性.

表 1 良恶性腹水患者腹水和血清肿瘤标志物检测结果mean (range)

肿瘤标志物		良性	恶性
AFP (μg/L)	腹水	18.2 (0.5–389)	381 (2.8–376 670)[b]
	血清	16.1 (1.7–480.1)	216 (1.8–300 000)[b]
	F/S比值	0.87 (0.04–2.05)	1.6 (1.0–2.76)[a]
CEA (μg/L)	腹水	2.5 (0.2–36.1)	25.1 (3.2–465.9)[b]
	血清	3.8 (0.7–42.2)	19.1 (1.3–365.0)[b]
	F/S比值	0.31 (0.06–1.42)	4.13 (1.63–58.85)[b]
CA19–9 (kU/L)	腹水	17.4 (1.0–239.1)	184.5 (9.0–1050.8)[b]
	血清	27.9 (3.5–584.5)	55.2 (9.0–733.8)[a]
	F/S比值	0.34 (0.02–1.42)	1.43 (0.61–9.04)[b]
CA50 (mg/L)	腹水	5.2 (1.0–30.2)	60.5 (7.2–684.7)[b]
	血清	6.1 (1.5–34.6)	22.4 (3.7–464.4)[b]
	F/S比值	0.78 (0.32–2.07)	2.36 (1.47–18.05)[b]
CA125 (kU/L)	腹水	421 (18–1122)	896 (21–2359)[b]
	血清	155 (11–2265)	161(20–2431)
	F/S比值	1.76 (0.52–11.37)	5.21(0.38–21.40)[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 良性腹水组.

表 2 腹水中肿瘤标志物及其F/S比值在特异性100%时的诊断敏感性

肿瘤标志物		上限值	敏感性 (%)
AFP	腹水	400 μg/L	14.6
	F/S比值	2.1	16.7
CEA	腹水	37 μg/L	41.7
	F/S比值	1.45	37.5
CA19–9	腹水	240 kU/L	39.6
	F/S比值	1.45	29.2
CA50	腹水	31 mg/L	43.8
	F/S比值	2.1	47.9
CA125	腹水	1130 kU/L	29.2[a]
	F/S比值	11.5	10.4

[a]$P<0.05$ *vs* F/S比值.

表 3 腹水中肿瘤标志物联合其F/S比值在特异性100%时的诊断敏感性

肿瘤标志物	敏感性（%）
AFP (>25 μg/L+F/S>1.2)	18.8
CEA (>5 μg/L+F/S>1.2)	62.5[b]
CA19–9 (>37 kU/L+F/S>1.2)	58.3[b]
CA50 (>20 mg/L+F/S>1.2)	72.9[b]
CA125 (>1130 kU/L+F/S>11.5)	31.3
4 项联合 (任一项阳性)	91.7
5 项联合 (任一项阳性)	93.8

[b]$P<0.01$ *vs* 表2中各自腹水浓度和F/S比值的诊断敏感性.

术来进一步提高诊断的敏感性和特异性. 检测腹水中肿瘤标志物是鉴别良恶性腹水的方法之一, 国内、外已有较多报道[5-11]. 本研究的结果与之前的报道基本一致, 即恶性腹水中肿瘤标志物浓度显著高于良性腹水. 但诊断的敏感性、特异性报道各异. 可能与标志物的上限值不一有关. 已有研究表明, 一些疾病如肾衰、肝硬化、结核等所致的良性腹水中肿瘤标志物浓度明显升高[12-14]. 此外, 良性腹水患者如伴有一些已知的其他脏器的原发或转移癌(paraneoplastic effusion)[13], 都会造成上限值的明显升高, 因而降低诊断的敏感性. 相反, 如不考虑良性腹水中肿瘤标志物浓度使用较低的上限值, 则产生高的假阳性, 降低了诊断的特异性.

腹水中肿瘤标志物的水平是腹膜上皮局部产生/释放和/或自血液中渗透的结果. Trape *et al*[13]将肿瘤标志物分为二类: 一类是可由正常间皮细胞, 特别是当间皮受到炎症等刺激时产生/释放的肿瘤标志物, 如CA125和细胞角质蛋白19(CYFRA21-1), 另一类是正常间皮细胞不能或低产生/释放的肿瘤标志物如CEA, CA19-9和CA15-3等, 在第2类肿瘤标志物, 腹水中有比血清更高的水平提示有局部的产生, 表示有上皮转移; 相反, 腹水中肿瘤标志物浓度正常或低于血清, 很可能提示, 血清是这些肿瘤标志物的来源. Trape *et al*[13]于2004年报道胸、腹水患者CEA, CA19-9, CA153的F/S比值较单纯的胸、腹水中肿瘤标志物浓度有更高的诊断敏感性. 本研究显示, AFP, CEA, CA19-9和CA50的F/S比值对良恶性腹水的诊断敏感性并不优于单纯的腹水中浓度测定. 造成上述差异的主要原因, 可能是由于我们测定的部分良性腹水中, 当肿瘤标志物低于正常血清上限值时, 有部分患者的F/S比值>1.2, 降低了F/S比值的诊断敏感性. 当腹水中AFP, CEA, CA19-9和CA50高于血清上限值时, 良性腹水的F/S比值均小于1.2; 而恶性腹水的F/S比值绝大多数大于1.2. 腹水中AFP,

■同行评价
腹水和血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别诊断, 国内外已有很多报道, 但是腹水和血清肿瘤标志物及比值同时测定的报道鲜见, 本文有较高的临床指导价值. 采用几种肿瘤标志物腹水浓度结合F/S比值联合诊断, 显著提高诊断敏感性和特异性, 方法简便易行, 应用前景广阔.

CEA, CA19-9和CA50高于正常血清上限值结合F/S>1.2联合诊断, 诊断敏感性显著提高.

腹水中肿瘤标志物对鉴别诊断的敏感性各家报道不一, 既与使用上限值不一有关, 也与肿瘤原发器官和使用肿瘤标志物的数量有关. 恶性腹水常见于胃肠、肝、胆、胰等脏器的肿瘤转移, 因而测定CEA, CA19-9和CA50有较高的阳性率. AFP对恶性腹水的诊断敏感性不高, 但因我国肝细胞癌发病率较高, AFP对肝癌所致腹水的诊断有不可代替的作用. 本研究结果显示, 联合检测腹水中AFP, CEA, CA19-9和CA50四种肿瘤标志物的水平和其F/S比值(>1.2), 在特异性100%时, 诊断恶性腹水的敏感性为91.7%. 高于先前的报道. 增加测定CA125及其F/S比值并不能提高诊断的敏感性. 总之, 在良恶性腹水的鉴别诊断中, 肿瘤标志物是有诊断意义的检测方法之一, 同时测定肿瘤标志物AFP, CEA, CA19-9和CA50及它们的F/S比值可能提高诊断的敏感性和特异性.

4 参考文献

1 Runyon BA. Care of patients with ascites. *N Engl J Med* 1994; 330: 337-342
2 陈凤英, 李新华, 袁伟建. 以腹水为主要表现的61例病因分析. 中日友好医院学报 2001; 15: 147-149
3 Schofield K, D'Aquila T, Rimm DL. E-cadherin expression is a sensitive and specific method for detection of carcinoma cells in fluid specimens. *Diagn Cytopathol* 2000; 22: 263-267
4 Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, Unger C, Marme D, Gastl G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 1999; 85: 178-187
5 朱焕兴, 杨永清. 血清、腹水中AFP、CEA及CA125水平对良恶性腹水的诊断价值. 放射免疫学杂志 2003; 16: 329-331
6 Alexandrakis MG, Moschandrea JA, Koulocheri SA, Kouroumalis E, Eliopoulos GD. Discrimination between malignant and nonmalignant ascites using serum and ascitic fluid proteins in a multivariate analysis model. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 500-508
7 Miedouge M, Salama G, Barange K, Vincent C, Vinel JP, Serre G. Evaluation of alpha-fetoprotein assay in ascitic fluid for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1999; 280: 161-171
8 Gulyas M, Kaposi AD, Elek G, Szollar LG, Hjerpe A. Value of carcinoembryonic antigen (CEA) and cholesterol assays of ascitic fluid in cases of inconclusive cytology. *J Clin Pathol* 2001; 54: 831-835
9 黄中伟, 孟宪镛, 堵浩荣, 葛政举, 成晔. 腹水四项指标检测对消化系恶性腹水的诊断价值. 医学临床研究 2004; 21: 1286-1288
10 王磊, 钟英强. 腹水与血清的癌胚抗原比值对恶性腹水的诊断意义. 现代消化及介入诊疗 2004; 9: 104-105
11 刘军, 鄢斌, 付千钧. 血清-腹水白蛋白梯度、腹水/血清CEA、腹水/血清LDH对腹水性质的鉴别价值. 现代检验医学杂志 2004; 19: 25-26
12 马灵筠, 杨五彪, 万学东, 陈群力. CA125、CEA、AFP检测在结核性腹水及恶性腹水鉴别诊断中的价值. 陕西医学杂志 2004; 33: 995-997
13 Trape J, Molina R, Sant F. Clinical evaluation of the simultaneous determination of tumor markers in fluid and serum and their ratio in the differential diagnosis of serous effusions. *Tumour Biol* 2004; 25: 276-281
14 陈伟忠, 谢谓芳, 林勇, 周玉坤. CA125在恶性及结核性腹水中的鉴别诊断意义. 世界华人消化杂志 2002; 10: 243-244
15 张忠兵, 朱梁, 马述春, 张兴荣, 胡和平, 陈伟忠, 刘苏, 林勇. 多功能腹膜活检针的研制及临床应用研究. 中华消化杂志 1999; 19: 114-116

电编 李琪 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.

世界华人消化杂志 2006年5月28日; 14(15): 1537-1541
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 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, LD_{50}, 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$T\frac{1}{2}$, *V*max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*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *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℃, 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℃. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^9/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2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B_1、维生素B_2、维生素B_6、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B_{12}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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/ L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 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χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*υ*; (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^aP <0.05, ^bP <0.01(P >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^cP <0.05, ^dP <0.01; 第三套为^eP <0.05, ^fP <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5±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±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±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→23.5→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≤分母≤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

基金资助项目 格式如: Supported by National

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.

Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及接受日期 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、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃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 cm×4.5 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 gas-troenterology. *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 •

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

蔡淦 教授
上海曙光医院蔡淦工作室

陈治水 主任医师
解放军第二一一医院中医科

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院放射科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

樊红 副教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

范建高 教授
上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

房静远 教授
上海第二医科大学附属仁济医院

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医院普外科

季国忠 副教授
南京医科大学第二附属医院消化科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

匡安仁 教授
四川大学华西医院核医学科

蓝宇 教授
北京积水潭医院消化科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属四院消化病诊疗中心

牛建昭 教授
北京中医药大学

秦仁义 教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院外科

邱双健 副教授
复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化科

王春友 教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

喻荣彬 副教授
南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科

周学文 教授
辽宁中医学院附属医院消化内科