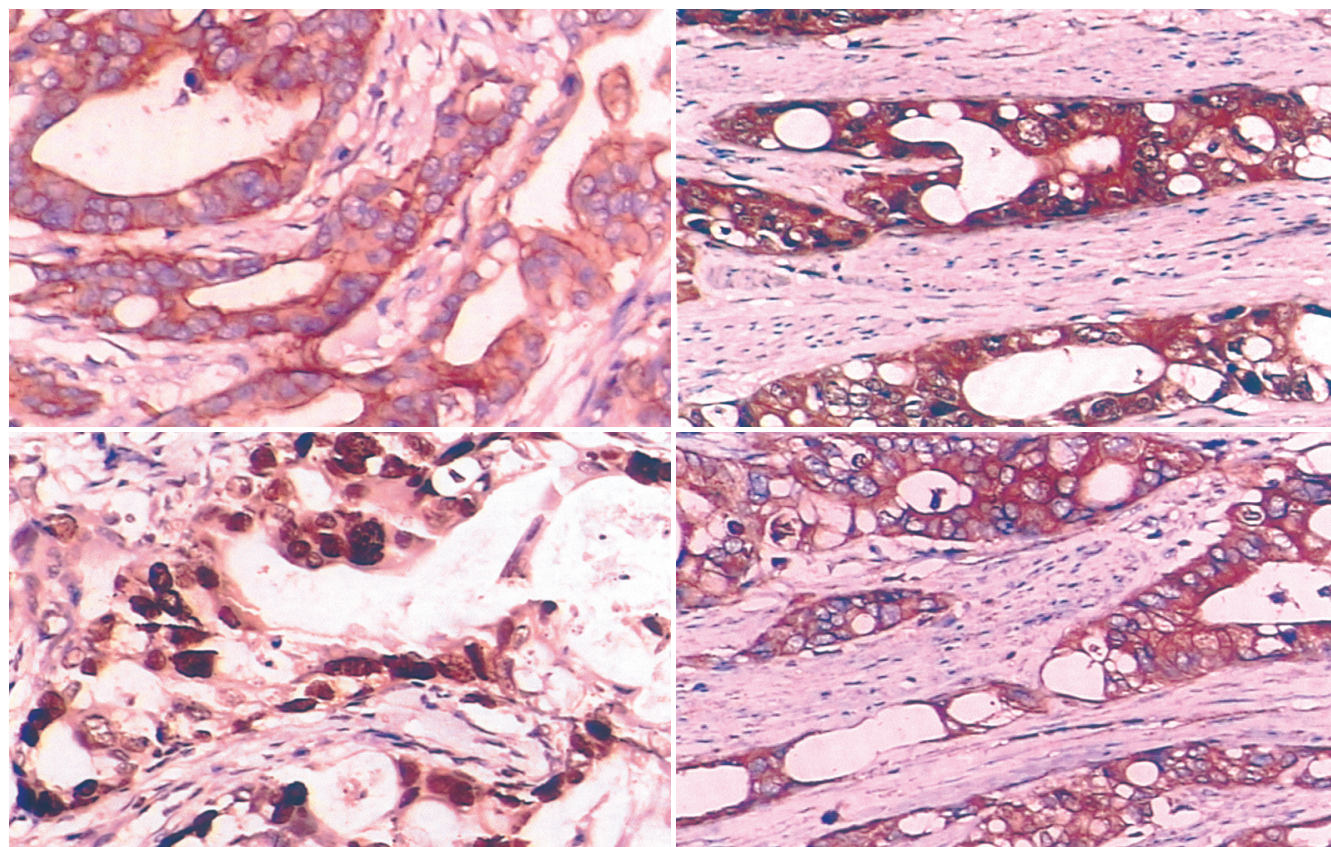


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 6 月 8 日 第 14 卷 第 16 期 (Volume 14 Number 16)



16 / 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
陈凇教授 北京
陈其奎教授 广州
陈强谱教授 滨州
陈仕珠主任医师 西安
陈卫昌教授 苏州
陈耀凯副教授 重庆
陈贻胜教授 福州
陈知水教授 武汉
陈治水主任医师 哈尔滨
陈祖林副教授 重庆
程爱国教授 唐山
程红岩教授 上海
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	邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江
龙致贤教授	北京	谭学瑞教授	汕头	闫惠平研究员	北京
鲁华玉研究员	北京	唐采白副教授	徐州	严律南教授	成都
陆才德教授	宁波	唐芙爱教授	郑州	阎晓初副教授	重庆
陆伦根教授	上海	唐霓副研究员	重庆	杨冬华教授	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨广顺教授	上海
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨建勇教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨林副研究员	广州
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	杨维良教授	哈尔滨
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	杨希山教授	广州
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	杨云生教授	北京
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	姚登福教授	南通
梅林教授	北京	万军教授	北京	姚树坤教授	石家庄
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
宁琴教授	武汉	汪思应教授	合肥	阴赅宏研究员	北京
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	于红刚副教授	武汉
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	余宏宇教授	上海
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	于健春教授	北京
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	于颖彦教授	上海
潘秀珍教授	福州	王健生副教授	西安	郁宝铭教授	上海
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	喻荣彬副教授	南京
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	张柏和教授	上海
彭曦副研究员	重庆	王晓艳副教授	长沙	张方信主任医师	兰州
彭心宇教授	石子河	王新月教授	北京	张吉翔教授	南昌
彭志海教授	上海	王学美研究员	北京	张锦生教授	上海
秦波教授	重庆	王正康教授	北京	张军教授	西安
秦成勇教授	济南	王志刚副主任医师	上海	张青云研究员	北京
秦环龙教授	上海	王忠裕教授	大连	张群华教授	上海
钱建民教授	上海	卫洪波教授	广州	张水军教授	郑州
秦仁义教授	武汉	魏经国教授	西安	张绪清副教授	重庆
卿三华教授	广州	魏来教授	北京	张学教授	北京
邱双健副教授	上海	闻勤生教授	西安	张宗明教授	北京
邱伟华副主任医师	上海	吴德全教授	哈尔滨	赵桂珍教授	沈阳
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵景民教授	北京
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵连三教授	成都
任建林教授	厦门	吴萍主任医师	徐州	赵平副教授	上海
邵成浩讲师	上海	吴志勇教授	上海	郑民华教授	上海
邵先玉教授	泰安	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周国雄主任医师	南通
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周晓东研究员	广州
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	庄林主任医师	昆明
宋世兵主任医师	北京	徐存拴教授	新乡	朱传武副主任医师	苏州
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙诚谊教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱立元教授	深圳
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱人敏教授	南京
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	邹小明教授	哈尔滨
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	左国营副主任药师	昆明
孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 6 月 8 日 第 14 卷 第 16 期 (总第168期)

述 评	1543 门静脉栓塞术应用进展 代文杰, 于洪伟, 姜洪池
基 础 研 究	1548 莪术对SGC7901胃癌细胞COX-1, COX-2, VEGF和PGE ₂ 表达的影响 沈洪, 刘增巍, 朱莹莹, 张坤, 王伟, 郭青龙, 袁胜涛 1554 抗HBsAg-Fab重组体在小鼠肝脏的表达 唐莉, 曾志贵, 潘桃, 袁劲, 陈必成, 陈忠华, 陈知水 1561 甘氨酸对内毒素性肝损害保护作用的机制 王强, 张涛, 陈叶恒, 余和斌, 游海波
临 床 研 究	1566 趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路在结直肠癌肝转移中的作用 马向涛, 余力伟, 张在兴, 王杉, 杜如显, 崔志荣 1571 细胞凋亡基因、肿瘤侵袭相关蛋白酶及血管内皮生长因子在胃癌分型中的表达和意义 刘易欣, 赵春歌, 赵秀兰, 潘彦珩 1578 乙肝病毒大蛋白检测在乙型肝炎诊治中的临床意义 乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景 1582 肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿的临床比较 赵宗珉, 赵金满, 万建华 1587 多药耐药基因蛋白在贲门癌组织中的表达及其临床价值 史宏灿, 石维平, 束余声, 陆世春, 王康, 顾学文, 田秀春
文 献 综 述	1592 肝细胞癌基础研究的某些进展 李冬, 张建中 1602 G蛋白偶联受体激酶的研究进展 杨雯, 夏时海 1608 可验证的剪应变溃疡病因理论和胃溃疡发生机制 霍世平 1612 血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道的作用 姜柳琴, 林琳 1617 胰岛素样生长因子 I 与肝纤维化 吕国良, 刘德许 1621 门静脉高压侧支循环与血管内皮细胞生长因子 邓伟哲, 李柏
研 究 快 报	1627 Survivin反义寡核苷酸抑制肝癌移植瘤生长的作用 高鹏, 张刚庆, 颜政, 方驰华 1631 幼鼠肠缺血/再灌注损伤肠组织TNF- α 和c-fos mRNA的表达 李春艳, 张莹, 崔泽实, 卢瑶, 于明
临 床 经 验	1635 顽固性功能性消化不良与情绪障碍的关系及坦度螺酮的治疗作用 陈朝元, 何顺勇 1638 老年人腹部手术后早期炎性肠梗阻35例 杨建光, 赵宇, 于作夫, 孙玉华
病 例 报 告	1641 利福平外用致原位肝移植术后患者过敏反应1例 程芮, 臧运金, 沈中阳

附 录	1643 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	1648 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	1560 第十届全军普通外科学学术会议征文通知 1577 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 1586 第十一届全国普通外科学学术会议征文通知 1601 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会 1611 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1616 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1620 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 1626 第十五次全国中西医结合肝病学术会议 1634 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知 1637 NERD及相关疾病国际研讨会 1642 第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文
封面故事	史宏灿, 石维平, 束余声, 陆世春, 王康, 顾学文, 田秀春. 多药耐药基因蛋白在贲门癌组织中的表达及其临床价值. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1587-1591 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1587.asp
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 enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

 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 2006-06-08 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 电子编辑 张敏 李琪 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 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

June 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 16

EDITORIAL	1543 Advance in application of portal vein embolization <i>Dai WJ, Yu HW, Jiang HC</i>
BASIC RESEARCH	1548 Effect of Ezhu on expression of cyclooxygenase, vascular endothelial growth factor and prostaglandin E ₂ in human gastric cancer cell line SGC7901 <i>Shen H, Liu ZW, Zhu XX, Zhang K, Wang W, Guo QL, Yuan ST</i> 1554 Expression of recombination human anti-HBsAg Fab in murine liver <i>Tang L, Zeng ZG, Pan T, Yuan J, Chen BC, Chen ZH, Chen ZS</i> 1561 Protection mechanisms of glycine against liver injury induced by lipopolysaccharide <i>Wang Q, Zhang T, Chen YH, Yu HB, You HB</i>
CLINICAL RESEARCH	1566 Role of chemokine receptor CXCR4/CXCL12 signaling pathway in hepatic metastasis of colorectal carcinoma <i>Ma XT, Yu LW, Zhang ZX, Wang S, Du RY, Cui ZR</i> 1571 Expression and significances of apoptosis gene, invasion-associated proteases and vascular epithelial growth factor in Lauren's classification of gastric carcinoma <i>Liu YX, Zhao CG, Zhao XL, Pan YL</i> 1578 Clinical significance of serum hepatitis B virus large surface protein in diagnosis and treatment of patients with hepatitis B <i>Le AP, Ju BH, Wang W, Zhang WJ</i> 1582 Comparison between pyogenic liver abscess caused by <i>Klebsiella pneumoniae</i> and non- <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Zhao ZM, Zhao JM, Wan JH</i> 1587 Expression of P-glycoprotein, glutathione S-transferase- π , topoisomerase II and lung resistance protein in cardiac carcinoma and their clinical significances <i>Shi HC, Shi WP, Shu YC, Lu SC, Wang K, Gu XW, Tian XC</i>
REVIEW	1592 Advance in basic research of hepatocellular carcinoma <i>Li D, Zhang JZ</i> 1602 Research progress on G protein-coupled receptor kinase <i>Yang W, Xia SH</i> 1608 Validatable pathogenic theory of shear strain ulcerative diseases and mechanism of gastric ulcer <i>Huo SP</i> 1612 Role of heme oxygenase/carbon monoxide system in gastrointestinal tract <i>Jiang LQ, Lin L</i> 1617 Relationship between insulin-like growth factor I and liver cirrhosis <i>Lv GL, Liu DX</i> 1621 Relationship between vascular endothelial growth factor and collateral circulation in portal hypertension <i>Deng WZ, Li B</i>
RAPID COMMUNICATION	1627 Inhibitory effect of Survivin antisense oligonucleotide on growth of human hepatic carcinoma transplanted subcutaneously <i>Gao P, Zhang GQ, Yan Z, Fang CH</i>

	1631 Expression of tumor necrosis factor-α and c-fos mRNA in immature rats' model of gut ischemia/reperfusion injury <i>Li CY, Zhang Y, Cui ZS, Lu Y, Yu M</i>
CLINICAL PRACTICE	1635 Relationship between refractory functional dyspepsia and emotional disturbance and therapeutic action of tandospirone <i>Chen CY, He SY</i> 1638 Inflammatory intestinal obstruction early after abdominal operation in elderly patients: an analysis of 35 cases <i>Yang JG, Zhao Y, Yu ZF, Sun YH</i>
CASE REPORT	1641 Allergic reaction induced by external application of Rifampicin in patients after orthotopic liver transplantation <i>Cheng R, Zang YJ, Shen ZY</i>
APPENDIX	1643 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	1648 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Shi HC, Shi WP, Shu YC, Lu SC, Wang K, Gu XW, Tian XC.</i> Expression of P-glycoprotein, glutathione S-transferase-π, topoisomerase II and lung resistance protein in cardiac carcinoma and their clinical significances. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(16):1587-1591 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1587.asp
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 June 08, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

门静脉栓塞术应用进展

代文杰, 于洪伟, 姜洪池

代文杰, 于洪伟, 姜洪池, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科, 黑龙江省肝胆外科重点实验室 黑龙江省哈尔滨市 150001

国家自然科学基金资助项目, No. 30300340

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, 黑龙江省肝胆外科重点实验室. wenjdai@yahoo.com.cn

电话: 0451-53600281

收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-27

摘要

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 在肝脏移植尚不能普及的今天, 手术切除是目前治疗肝癌的最有效方法. 但是术后剩余肝脏组织(future liver remnant, FLR)过少则是造成术后肝功能衰竭等并发症的重要因素, 限制了肝癌手术的进行, 从而使一些患者失去了手术的机会. 肝切除术前门静脉栓塞术(portal vein embolization, PVE)可以使栓塞侧肝叶萎缩和对侧肝叶增生, 使术后FLR增大, 功能提高, 从而使不能直接手术切除的肝癌患者获得手术切除的机会, 扩大了手术指征. PVE的实施通常采用超声引导下经皮经肝门静脉栓塞术, 常用的栓塞材料有: 纤维蛋白胶(fibrin glue)、氰基丙烯酸+碘油、明胶海绵+凝血酶、弹簧圈、微粒(如PVA颗粒)和无水乙醇等. 目前PVE主要用于原发性肝癌、转移性肝癌、肝门胆管癌和胆囊癌等需要行肝大部切除或扩大肝切除的患者以及多发肝转移瘤需行二期肝切除患者. 但在患有严重门静脉高压症的患者不适合行PVE治疗. 同时PVE的应用仍存在许多问题: PVE患者的选择尚无统一标准; PVE理想栓塞材料的研究; PVE与现行肝癌治疗手段如动脉栓塞术、辅助化疗等的联合应用等都需要深入的研究. 严格把握适应证, PVE在肝癌的治疗中将会发挥越来越重要的作用.

关键词: 肝癌; 门静脉栓塞

代文杰, 于洪伟, 姜洪池. 门静脉栓塞术应用进展. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1543-1547

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1543.asp>

0 引言

肝切除目前仍是治疗肝脏肿瘤的首选和最有效

效的方法. 在约45%的原发和继发的肝癌中, 为使切缘无瘤需行扩大肝切除术. 但是术后剩余肝脏组织(future liver remnant, FLR)过少是造成术后肝功能衰竭等并发症的重要因素. 在肝癌患者中, 有原发损害的肝脏切除60%的有功能肝组织, 正常肝脏切除75%的功能肝组织, 术后并发症明显增高. 门静脉栓塞术(portal vein embolization, PVE)可以使栓塞侧肝叶萎缩和对侧肝叶增生, 使术后FLR增大, 从而使不能直接手术切除的肝癌患者获得手术切除的机会^[1-3]. 1986年Kinoskita *et al*首次采用门静脉栓塞术来限制动脉栓塞治疗无效的原发性肝癌门静脉癌栓的蔓延. 1990年Makkudi *et al*首次对1例肝门胆管癌患者行肝大部切除术前采用PVE促进肝左叶增生. 自此, 肝切除术前PVE因其能扩大受术切除的指征, 增加手术的安全性, 减少术后并发症在临床得到推广, 在日本、欧美的部分较大临床中心已成常用技术^[1]. PVE术后可使栓塞侧肝叶萎缩, 非栓塞侧肝代偿性增生. 研究表明, 在没有慢性肝损害的患者中, PVE术后2 wk非栓塞侧肝组织的增生达12-21 cm³/d, 术后4 wk为11 cm³/d, 32 d为6 cm³/d^[3]. 胆汁ICG分泌检测^[4]、(99m)Tc-GSA造影^[5]显示PVE术后非栓塞侧肝功能亦提高. 目前PVE后肝组织的增生具体机制尚不清楚, 多种细胞因子参与了肝细胞的再生过程, 如HGF, TGF- α , TNF- α , IL-6, 胰岛素和去甲肾上腺素等^[3]. 糖尿病患者肝脏增生速度明显减慢^[6]. PVE术后1 d门静脉血流速度明显增快, 后逐渐减慢, 但术后14 d流速仍明显高于基线, 而且肝脏的增生速度与门静脉血流流速的增高呈正相关^[7]. 门静脉血流动力学改变可能是刺激肝脏增生的因素之一^[8]. PVE对肝功能的影响较小, 且多为一过性的. 约半数的患者肝功能没有改变, 转氨酶于1-3 d达到最高, 但小于基础值的3倍, 7-10 d内恢复到基础值. 白细胞计数、血清胆红素水平也有轻度改变, 肝脏合成功能(如凝血时间)不受影响^[1,9]. 现就PVE引起的肝脏病理生理变化、PVE技术、PVE适应证、禁忌

■背景资料

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤, 在肝移植尚不能普及时, 手术切除为最有效的治疗方法. 提高肝癌手术切除效果, 扩大适应证, 将使更多人群受益. 肝切除术前门静脉栓塞术则是其重要手段之一.

■研究前沿

目前研究主要集中在门静脉栓塞术适应证的选择和栓塞材料的选择上,从而更大限度地发挥其在肝癌手术治疗中的作用。

证及其临床应用做一概述。

1 PVE技术

1.1 FLR的估测和术后肝功能的估计 目前, FLR体积的估测主要采用CT体积测量技术, 常用的计算方法有: (1)(切除体积-肿瘤体积)/(肝脏总体积-肿瘤体积), 该方法在有多个肿瘤结节存在时计算误差累加, 且无法估计在有血管栓塞、慢性肝病、胆管扩张等情况下有功能的肝组织的体积^[10]。(2)考虑到患者体型不同对剩余肝组织体积的需求量也不同, Vauthey推荐用标准化的FLR估算法: 肝脏总体积(TLV)=794.41+1267.28×体表面积, $r^2=0.454$, $P<0.001$ 。采用FLR/TLV来估计FLR功能, 其与患者术后的并发症相关^[10-11]。对于肝硬化的患者, 有学者推荐采用肝功能实验(如indocyanine green retention)等估计剩余肝脏的功能, 亦有研究通过测定透明质酸盐、III型前胶原、7 s胶原蛋白等评估肝脏功能及其对PVE联合肝切除预后的影响^[12-13]。

1.2 PVE的实施途径 PVE的实施途径有以下3种: (1)超声引导下经皮经肝门静脉栓塞术; (2)开腹手术中经回结肠静脉插管门静脉栓塞术; (3)腹腔镜下经回结肠静脉插管门静脉栓塞术。根据穿刺方法又可分为: 同侧穿刺(穿刺与栓塞部位在同侧)和对侧穿刺(在穿刺的对侧栓塞)。目前超声引导下经皮经肝门静脉栓塞术最为常用^[1,3]。

1.3 PVE的栓塞材料 目前PVE常用的栓塞材料有: 纤维蛋白胶(fibrin glue)、氰基丙烯酸+碘油、明胶海绵+凝血酶、弹簧圈、微粒(如PVA颗粒)和无水乙醇等。各种材料在肝脏增生程度和速度方面没有明显差异, 但是都有各自的不足之处。明胶海绵+凝血酶易发生栓塞静脉再通。氰基丙烯酸+碘油可产生快速可靠的肝脏再生, 缩短PVE与肝切除术之间的时间间隔, 但是却导致炎症反应较重, 造成肝胆管周围纤维化等增加手术难度。部分患者还可造成其他肝段的非特异性栓塞。无水乙醇可造成肝功能改变, 患者耐受性较差。PVA与弹簧圈合用, PVA用于栓塞远端小的门静脉, 弹簧圈用于栓塞近端较大的门静脉, 效果尚可。目前致力于研制能够持久栓塞效果、防止产生栓塞再通、最终可获得更快更好的肝脏增生效果的栓塞材料^[1,3]。

1.4 PVE的并发症 PVE的并发症包括: 肝被膜下血肿、血性腹膜炎、胆道出血、假性动脉瘤、

门静脉血栓形成、动脉静脉分流、门静脉血栓形成、一过性肝衰竭、非目的性栓塞、气胸、脓胸等^[14-15]。Kodama *et al*^[15]报道, 47例行术前PVE的患者有7例(15%)发生并发症: 2例气胸, 2例肝被膜下血肿, 1例动脉破裂, 1例假性动脉瘤(合并被膜下血肿), 1例胆道出血, 1例门静脉血栓形成。并且发现技术性并发症的发生率可能与穿刺肝段的位置有关。较低的并发症发生率(9.1%-12.8%)也见报道^[1]。

2 PVE的适应证和禁忌证

2.1 适应证 目前, PVE的患者的选择尚无统一标准, 以下几个因素应予考虑: (1)有无肝脏原发损害, 决定FLR是否有足够的肝功能; (2)患者体型对剩余肝脏的需求, 标准化的FLR可考虑到患者的体质量、体表面积、身高不同对剩余肝脏的需求量; (3)手术切除范围、复杂性和手术术式; (4)患者年龄、全身合并症以及其他影响肝脏增生的因素(如糖尿病)^[1,16]。存在慢性肝损害的肝组织在增生能力、功能代偿、手术耐受方面较正常肝组织差。在正常肝脏切除90%的肝组织患者尚能生存, 而在硬化的肝中切除60%的肝组织患者就难以耐受^[16]。肝硬化患者肝大部切除术后, 致命性的肝衰竭和由于肝功不足引起的腹水、液体潴留、伤口不愈合更常见。围手术期全身或局部化疗增加手术并发症的发生率。Tanaka *et al*^[17]研究显示在慢性肝炎患者肝组织炎症程度是PVE术后肝脏增生的独立影响因素。Shoup *et al*^[18]研究显示肝切除术后, 90%的FLR≤25%的患者发生肝功能不足, 而FLR≥25%的患者无人发生肝功能不足。FLR≤25%和肝功能不足与术后并发症和住院时间呈正相关。在无慢性肝损害的患者, FLR/TLV<25%, 应考虑行术前PVE。Kubota *et al*^[10]建议, 对于需要行大部肝切除的患者, 如果合并有肝硬化, FLR/TLV<40%就应考虑行术前门静脉栓塞术。该标准同样适用于合并慢性肝病、大剂量化疗、严重肝纤维化的患者。肝脏体积分析显示如果没有代偿性增生, 约95%的患者肝左外叶(II, III段)体积占总肝体积的比例小于25%; 有约30%的患者左半肝(II, III, VIII)小于肝总体积的25%。故大多数需要扩大肝切除的患者, 如没有因肿瘤造成的肝脏代偿性增生, 会出现FLR/TLV<20%而需要考虑PVE。肝左叶扩大切除术很少需要左侧PVE。Nagino *et al*^[19]手术切除肝左三叶加尾状叶的患者, 切除肝脏占总肝体积的67%, FLR为33%。综上所述, 目前术

前PVE主要用于原发性肝癌、转移性肝癌、肝门胆管癌、胆囊癌等患者: 合并慢性肝损害需行肝大部切除术; 无慢性肝损害需行扩大肝切除术; 多发肝转移瘤需行二期肝切除术。此外, PVE联合经导管动脉栓塞用于扩大肝切除术前亦见报道^[20]。

2.2 禁忌证 患有严重门静脉高压症的患者不适于行肝大部切除术。相对的禁忌证有: 肿瘤侵及FLR或肝外有肿瘤转移; 无法纠正的凝血功能紊乱; 肿瘤侵及门静脉; 因肿瘤侵袭无安全的穿刺途径; FLR胆道扩张(如为胆道梗阻可于术前引流); 轻度的门静脉高压症; 肾功能衰竭^[1]。

3 PVE联合肝切除术

3.1 合并慢性肝损害需行肝大部切除术 合并慢性肝损害的患者, PVE术后非栓塞侧肝脏体积增大28%-40%, 且增生速度较慢约需4 wk时间^[6,21]。在合并慢性肝病的患者中, PVE可使术后并发症的严重程度、术后肝功能衰竭、肝大部切除术后的死亡率均下降^[21-26]。Farges *et al*^[26]的前瞻性研究表明, PVE可使合并肝硬化的肝大部切除术患者受益。该研究中对预计FLR<40%的患者行术前PVE。PVE使全部患者FLR体积显著增大。PVE组没有患者出现肝切除术后肝功能衰竭或死亡, 而非PVE组19例患者中有3例出现肝功能衰竭, 1例患者死亡。两组总生存率和无病生存率相似。Azoulay *et al*^[23]研究显示, 合并慢性肝损害的患者行PVE联合肝大部切除术后1, 3, 5 a的无病生存率与对照组相似。Tanaka *et al*^[25]也报道在肝癌合并肝硬化的患者中, PVE组与非PVE组无病生存率相似, 累积生存率有所提高。另外, PVE组患者若术后肿瘤复发获得进一步治疗的机会较大。

3.2 无慢性肝损害患者需行扩大肝切除术 对无肝硬化的肝门胆管癌、肝转移瘤的患者, 常采用右半肝联合IV段和/或I段的扩大右半肝切除术或左半肝联合V段、VIII段和/或I段的扩大左半肝切除术。扩大肝切除术使得大部分患者FLR<25%, 需要行术前PVE。肝组织的增生需要门静脉的血流分流至剩余肝组织, 故研究者建议完全栓塞拟切除的肝组织, 包括右半肝、IV段门静脉的分支。Nagino *et al*^[27]最先提出扩大肝切除术前, 三段(trisegmental)门静脉栓塞的潜在益处, 其研究表明肝右叶联合IV段的PVE, 可以使FLR体积较单纯右半肝栓塞组显著增大(mean 112±39 cm³ vs 66±35 cm³), 提高手术的

安全性。其他研究也证实该法可改善肝脏增生和手术效果^[28-29]。但是, 最近Capussotii *et al*^[30]的研究, 是否联合栓塞IV段对II、III段的增生影响无显著差异(67.8%±30.8% vs 56.1%±35.1%, $P = 0.40$)。研究显示, 剩余肝脏的体积是影响肝切除术后肝功能和术后恢复过程的主要因素。Vauthey *et al*^[31]对127例扩大肝切除患者进行的研究中, 采用了标准化的肝体积计算法来选择PVE和扩大肝切除的适应证。在该研究中, 24%的患者在扩大肝切除术前行PVE。127例患者中, 6例(4.7%)术后出现肝功能不足, 30.7%的患者出现术后并发症, 1例(0.8%)死亡, 中位生存期为41.9 mo, 5 a总生存率25.5%。Shoup *et al*^[18]研究显示, FLR≤25%是术后并发症和数后住院时间的独立预测因子。建议在PVE术前行FLR体积预测。Azoulay *et al*^[32]研究显示PVE联合肝切除手术组与单纯肝切除手术组的5 a生存率相近(40% vs 38%)。Abdalla *et al*^[19]研究显示扩大肝切除术PVE组与非PVE组, 尽管PVE组的FLR较小(18% vs 23%), 围手术期并发症无明显差异(28% vs 21%), 3 a总生存率65%, 中位生存期无显著差异(40 vs 52 mo)。

3.3 PVE联合二期肝切除术 目前肝转移瘤手术切除辅以术后化疗可以使患者获得较好的近期与远期缓解效果。但是多发双叶肝转移瘤患者常因术后FLR过小而失去手术切除的机会, 仅能行姑息性化疗。PVE栓塞促使非栓塞侧代偿性增生, 却有可能促进肿瘤的增生。Elias *et al*^[33]5例患者研究提示非栓塞侧转移瘤较肝组织增生更快, 且在不同的转移瘤结节和不同患者间差异显著。但是没有比较PVE术前和术后肿瘤的增生速度。Barbaro *et al*^[34]对6例结直肠癌肝转移和3例类癌肝转移的患者研究显示PVE栓塞侧结直肠癌肝转移结节增长但是类癌肝转移的结节未见增长。Kokudo *et al*^[35]研究亦显示PVE能促进转移瘤结节生长, 并且影响患者的长期生存率。但是PVE对肿瘤增生的影响尚存在争议^[1]。为避免PVE术后出现的肿瘤增生, Jaeck *et al*^[36]提出对多发双叶肝转移瘤患者行PVE联合二期肝切除术: 一期通过冰冻或射频消融等手术损毁肝转移瘤结节, 后PVE栓塞促使肝左叶代偿性增生, 二期手术肝大部切除术或扩大肝切除术。Jaeck *et al*^[37]研究显示手术死亡率为0%, 一期手术、PVE、二期手术后发病率分别为15.1%、18.1%和56.0%。33例患者中有25例(75.7%)完成了PVE联合二期肝切除术。该25例患者的1 a、3 a生存率分别为

■创新盘点

门静脉栓塞术的应用尚不普及, 本文对近年该领域的研究成果和热点作一综述, 以加深广大外科医师对该项技术的理解和扩大其应用范围。

■应用要点

严格把握适应证, 选择患者耐受性好和效果持久的栓塞材料。

■名词解释

肝切除术前门静脉栓塞术:为使不能直接手术切除的肝癌患者获得手术机会,在术前采用适宜的栓塞材料对门静脉进行选择性地栓塞,使栓塞侧肝叶萎缩,对侧肝叶增生,从而扩大肝癌手术切除指征的辅助治疗方法。

70.0%和54.4%,长期生存率与可直接行肝切除的转移瘤患者相近。其他研究也提示患者可从该术式获益^[38-39]。

综上所述,目前研究显示,在不能直接手术切除的肝脏肿瘤患者,在经恰当选择后,术前PVE可以使其围手术期并发症、远期生存率达到或接近于可以直接手术切除的肝脏肿瘤患者。术前PVE可以扩大肝切除手术的手术指征、增加手术的安全性、改善患者的长期预后。

总之,肝切除术前PVE可使剩余肝脏组织体积增大、功能提高,可以扩大手术指征。目前术前PVE主要用于估计肝切除术后FLR功能不足的原发性肝癌、转移性肝癌、肝门胆管癌、胆囊癌等患者。在无慢性肝损害,FLR/TELV<25%;合并有慢性肝损害,FLR/TELV<40%。术前PVE可以使经恰当选择的病例围手术期并发症、远期生存率达到或接近于可以直接手术切除的肝脏肿瘤患者。术前PVE尚存在许多问题: PVE患者的选择尚无统一标准; PVE理想栓塞材料的研究; PVE与现行肝癌治疗手段如动脉栓塞术、辅助化疗等的联合应用等。

4 参考文献

- Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 779-790
- Liu H, Fu Y. Portal vein embolization before major hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2051-2054
- Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN. Portal vein embolization: rationale, technique and future prospects. *Br J Surg* 2001; 88: 165-175
- Uesaka K, Nimura Y, Nagino M. Changes in hepatic lobar function after right portal vein embolization. An appraisal by biliary indocyanine green excretion. *Ann Surg* 1996; 223: 77-83
- Hirai I, Kimura W, Fuse A, Suto K, Urayama M. Evaluation of preoperative portal embolization for safe hepatectomy, with special reference to assessment of nonembolized lobe function with 99mTc-GSA SPECT scintigraphy. *Surgery* 2003; 133: 495-506
- Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, Hayakawa N, Yamamoto H. Changes in hepatic lobe volume in biliary tract cancer patients after right portal vein embolization. *Hepatology* 1995; 21: 434-439
- Goto Y, Nagino M, Nimura Y. Doppler estimation of portal blood flow after percutaneous transhepatic portal vein embolization. *Ann Surg* 1998; 228: 209-213
- Kawai M, Naruse K, Komatsu S, Kobayashi S, Nagino M, Nimura Y, Sokabe M. Mechanical stress-dependent secretion of interleukin 6 by endothelial cells after portal vein embolization: clinical and experimental studies. *J Hepatol* 2002; 37: 240-246
- Imamura H, Shimada R, Kubota M, Matsuyama Y, Nakayama A, Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology* 1999; 29: 1099-1105
- Kubota K, Makuuchi M, Kusaka K, Kobayashi T, Miki K, Hasegawa K, Harihara Y, Takayama T. Measurement of liver volume and hepatic functional reserve as a guide to decision-making in resectional surgery for hepatic tumors. *Hepatology* 1997; 26: 1176-1181
- Vauthey JN, Chaoui A, Do KA, Bilimoria MM, Fenstermacher MJ, Charnsangavej C, Hicks M, Alsfasser G, Lauwers G, Hawkins IF, Caridi J. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery* 2000; 127: 512-519
- Yachida S, Wakabayashi H, Kokudo Y, Goda F, Okada S, Maeba T, Maeta H. Measurement of serum hyaluronate as a predictor of human liver failure after major hepatectomy. *World J Surg* 2000; 24: 359-364
- Hirohashi K, Tanaka H, Tsukamoto T, Kubo S, Shuto T, Takemura S, Yamamoto T, Kanazawa A, Ogawa M, Osugi H, Kinoshita H. Limitation of portal vein embolization for extension of hepatectomy indication in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1084-1087
- Di Stefano DR, de Baere T, Denys A, Hakime A, Gorin G, Gillet M, Saric J, Trillaud H, Petit P, Bartoli JM, Elias D, Delpero JR. Preoperative percutaneous portal vein embolization: evaluation of adverse events in 188 patients. *Radiology* 2005; 234: 625-630
- Kodama Y, Shimizu T, Endo H, Miyamoto N, Miyasaka K. Complications of percutaneous transhepatic portal vein embolization. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13: 1233-1237
- Abdalla EK, Barnett CC, Doherty D, Curley SA, Vauthey JN. Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Arch Surg* 2002; 137: 675-680; discussion 680-681
- Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, Ikebe T, Tsukamoto T, Hamba H, Shuto T, Wakasa K, Kinoshita H. Influence of histological inflammatory activity on regenerative capacity of liver after percutaneous transhepatic portal vein embolization. *J Gastroenterol* 1999; 34: 100-104
- Shoup M, Gonen M, D'Angelica M, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Schwartz LH, Tuorto S, Blumgart LH, Fong Y. Volumetric analysis predicts hepatic dysfunction in patients undergoing major liver resection. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 325-330
- Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, Kutsuna Y, Hayakawa N, Yamamoto H. Right or left trisegment portal vein embolization before hepatic trisegmentectomy for hilar bile duct carcinoma. *Surgery* 1995; 117: 677-681
- Aoki T, Imamura H, Hasegawa K, Matsukura A, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Sequential preoperative arterial and portal venous embolizations in patients with hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2004; 139:

- 766-774
- 21 Shimamura T, Nakajima Y, Une Y, Namieno T, Ogasawara K, Yamashita K, Haneda T, Nakanishi K, Kimura J, Matsushita M, Sato N, Uchino J. Efficacy and safety of preoperative percutaneous transhepatic portal embolization with absolute ethanol: a clinical study. *Surgery* 1997; 121: 135-141
 - 22 Lee KC, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Iwasa R. Extension of surgical indications for hepatocellular carcinoma by portal vein embolization. *World J Surg* 1993; 17: 109-115
 - 23 Azoulay D, Castaing D, Krissat J, Smail A, Hargreaves GM, Lemoine A, Emile JF, Bismuth H. Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver. *Ann Surg* 2000; 232: 665-672
 - 24 Wakabayashi H, Yachida S, Maeba T, Maeta H. Indications for portal vein embolization combined with major hepatic resection for advanced-stage hepatocellular carcinomas. A preliminary clinical study. *Dig Surg* 2000; 17: 587-594
 - 25 Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, Shuto T, Higaki I, Kinoshita H. Preoperative portal vein embolization improves prognosis after right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with impaired hepatic function. *Br J Surg* 2000; 87: 879-882
 - 26 Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, Denys A, Sauvanet A. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003; 237: 208-217
 - 27 Nagino M, Kamiya J, Kanai M, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, Hayakawa N, Nimura Y. Right trisegment portal vein embolization for biliary tract carcinoma: technique and clinical utility. *Surgery* 2000; 127: 155-160
 - 28 Madoff DC, Hicks ME, Abdalla EK, Morris JS, Vauthey JN. Portal vein embolization with polyvinyl alcohol particles and coils in preparation for major liver resection for hepatobiliary malignancy: safety and effectiveness--study in 26 patients. *Radiology* 2003; 227: 251-260
 - 29 Madoff DC, Abdalla EK, Gupta S, Wu TT, Morris JS, Denys A, Wallace MJ, Morello FA Jr, Ahrar K, Murthy R, Lunagomez S, Hicks ME, Vauthey JN. Transhepatic ipsilateral right portal vein embolization extended to segment IV: improving hypertrophy and resection outcomes with spherical particles and coils. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 215-225
 - 30 Capussotti L, Muratore A, Ferrero A, Anselmetti GC, Corgnier A, Regge D. Extension of right portal vein embolization to segment IV portal branches. *Arch Surg* 2005; 140: 1100-1103
 - 31 Vauthey JN, Pawlik TM, Abdalla EK, Arens JF, Nemr RA, Wei SH, Kenamer DL, Ellis LM, Curley SA. Is extended hepatectomy for hepatobiliary malignancy justified? *Ann Surg* 2004; 239: 722-730; discussion 730-732
 - 32 Azoulay D, Castaing D, Smail A, Adam R, Cailliez V, Laurent A, Lemoine A, Bismuth H. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 2000; 231: 480-486
 - 33 Elias D, De Baere T, Roche A, Mducreux, Leclerc J, Lasser P. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg* 1999; 86: 784-788
 - 34 Barbaro B, Di Stasi C, Nuzzo G, Vellone M, Giuliani F, Marano P. Preoperative right portal vein embolization in patients with metastatic liver disease. Metastatic liver volumes after RPVE. *Acta Radiol* 2003; 44: 98-102
 - 35 Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Ohta K, Yamaguchi T, Matsubara T, Takahashi T, Nakajima T, Muto T, Ikari T, Yanagisawa A, Kato Y. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology* 2001; 34: 267-272
 - 36 Jaeck D, Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou E, Weber JC, Wolf P, Greget M. One or two-stage hepatectomy combined with portal vein embolization for initially nonresectable colorectal liver metastases. *Am J Surg* 2003; 185: 221-229
 - 37 Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber JC, Bachellier P. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 240: 1037-1049; discussion 1049-1051
 - 38 Shimada H, Tanaka K, Masui H, Nagano Y, Matsuo K, Kijima M, Ichikawa Y, Ike H, Ooki S, Togo S. Results of surgical treatment for multiple (>or =5 nodules) bi-lobar hepatic metastases from colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 114-121
 - 39 Elias D, Santoro R, Ouellet JF, Osmak L, de Baere T, Roche A. Simultaneous percutaneous right portal vein embolization and left liver tumor radiofrequency ablation prior to a major right hepatic resection for bilateral colorectal metastases. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1788-1791

同行评价

本文主要综述了肝切除术前门静脉栓塞术的应用情况,有一定的实用性和学术价值。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

莪术对SGC7901胃癌细胞COX-1, COX-2, VEGF和PGE₂表达的影响

沈洪, 刘增巍, 朱萱萱, 张坤, 王伟, 郭青龙, 袁胜涛

■背景资料

最近COX-2与癌症及癌前病变相关的研究越来越多, 大部分认为COX-2高表达与肿瘤的生物行为, 如肿瘤的发生、血道转移或淋巴转移等密切相关, COX-2的抑制剂则能阻止或延缓这些生物学行为的发生, 以上研究多是与西医内容为主, 而对于中药的研究较少; 中药对胃癌的作用机制以往虽然有各种报道, 但从COX-2角度研究的则较少, 故本研究进行中药在COX-2作用机制方面的研究。

沈洪, 刘增巍, 江苏省中医院消化科 江苏省南京市 210029
朱萱萱, 江苏省中医院动物实验室 江苏省南京市 210029
张坤, 王伟, 郭青龙, 袁胜涛, 中国药科大学肿瘤药理实验室
江苏省南京市 210009
沈洪, 1992年南京中医药大学中医内科学博士研究生毕业,
2001年留学于日本, 博士生导师, 主要从事消化道肿瘤的防治研究。
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2001186
通讯作者: 刘增巍, 210029, 江苏省南京市汉中路155号, 江苏省
中医院消化科。dixiao96@126.com
电话: 025-82082660 传真: 025-86618942
收稿日期: 2006-03-06 接受日期: 2006-03-30

Effect of Ezhu on expression of cyclooxygenase, vascular endothelial growth factor and prostaglandin E₂ in human gastric cancer cell line SGC7901

Hong Shen, Zeng-Wei Liu, Xuan-Xuan Zhu, Kun Zhang, Wei Wang, Qing-Long Guo, Sheng-Tao Yuan

Hong Shen, Zeng-Wei Liu, Department of Digestive Diseases, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Xuan-Xuan Zhu, Department of Animal Experiment, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Kun Zhang, Wei Wang, Qing-Long Guo, Sheng-Tao Yuan, Laboratory of Tumor Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2001186
Correspondence to: Dr. Zeng-Wei Liu, Department of Digestive Diseases, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. dixiao96@126.com
Received: 2006-03-06 Accepted: 2006-03-30

Abstract

AIM: To investigate the effect of Ezhu on the expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in human gastric cancer cell line SGC7901.

METHODS: The MTT method was used to ob-

serve the suppression of the human gastric cancer (SGC7901) cells treated with Ezhu. By drawing the suppression rate curves, we selected the appropriate Ezhu concentration at the 25% proliferation suppression rate as experimental concentration. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were adopted, respectively, to examine the expression of COX gene and protein. Furthermore, ELISA method was used to detect the variation of the VEGF and PEG₂ expression in culture medium.

RESULTS: Ezhu definitely inhibited the proliferation of human gastric cancer cells in a concentration dependent manner. Electrophoresis of the RT-PCR products demonstrated the expression of COX-1 and COX-2 gene in the human gastric cancer cells. Gray scale analysis showed that both Ezhu and celecoxib inhibited the expression of COX-1 and COX-2 gene, and the inhibitory action of Ezhu was greater than celecoxib. However, Western blot clearly showed that a specific protein strip was observed in COX-1 group at the 70 kDa, while in COX-2 group at the 80 kDa. Gray scale analysis confirmed that both Ezhu and celecoxib had apparent suppression on COX-2 protein, but had no effect on COX-1. Moreover, the suppression function of Ezhu surpassed celecoxib. Ezhu and celecoxib obviously degraded the content of VEGF in gastric cancer cells. In comparison with those in the control group, the results are statistically significant (91.0 ± 18.2 , 127.8 ± 12.1 ng/L vs 162.0 ± 15.1 ng/L, $P < 0.01$). The level of PGE₂ in the cells treated with celecoxib was lower than the control group with no statistical significance. Nevertheless, Ezhu decreased the level of PGE₂ significantly (67.5 ± 6.9 ng/L vs 78.7 ± 5.6 ng/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Ezhu can inhibit COX-2 and its downstream expression of PGE₂, and down-regulates VEGF expression, so as to suppress the proliferation of gastric cancer cells.

Key Words: Ezhu; Gastric cancer; SGC7901 cells;

Cyclooxygenase; Vascular endothelial growth factor; Prostaglandin E₂

Shen H, Liu ZW, Zhu XX, Zhang K, Wang W, Guo QL, Yuan ST. Effect of Ezhu on expression of cyclooxygenase, vascular endothelial growth factor and prostaglandin E₂ in human gastric cancer cell line SGC7901. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(16):1548-1553

摘要

目的: 观察莪术对人胃癌SGC7901细胞COX-1, COX-2, VEGF和PGE₂的影响。

方法: MTT法观察莪术对胃癌细胞的抑制作用, 绘制其抑制率曲线, 选取抑制率为25%时的药物浓度作为加药浓度, 用RT-PCR以及Western blot方法检测加药后人胃癌细胞COX-1, COX-2基因及其蛋白表达的变化。用ELISA方法检测加药后培养基中VEGF和PGE₂的表达情况。

结果: 莪术对胃癌细胞有一定的抑制作用, 且随着浓度的增加, 其抑制作用加强; 将RT-PCR产物经电泳分析, 证实胃癌细胞中有COX-1、COX-2基因的表达, 对各条带进行灰度分析发现: 中西药对COX-1和COX-2均有抑制作用, 莪术对COX-2的抑制作用大于塞来昔布; Western blot曝光结果可见, COX-1各组在70 kDa处可见特异性的蛋白条带, COX-2各组在80 kDa处可见特异性的蛋白条带。对各条带进行灰度分析发现: 各组中西药对COX-2均有明显的抑制作用, 而对COX-1则无抑制作用, 其中, 莪术对COX-2的抑制作用要强于celecoxib; 西药celecoxib及莪术组可明显降低人胃癌细胞VEGF的表达, 与细胞组相比, 其差别有统计学意义(91.0 ± 18.2 , 127.8 ± 12.1 ng/L vs 162.0 ± 15.1 ng/L, $P < 0.01$); 西药celecoxib组PGE₂表达低于细胞组, 但其差别无统计学意义, 莪术可明显降低人胃癌细胞PGE₂的表达, 与细胞组相比, 其差别有统计学意义(67.5 ± 6.9 ng/L vs 78.7 ± 5.6 ng/L, $P < 0.01$)。

结论: 莪术可能是通过抑制COX-2及其下游PGE₂表达, 使VEGF表达下调而抑制肿瘤。

关键词: 莪术; 胃癌; SGC7901细胞; 环氧合酶; 血管内皮生长因子; 前列腺素E₂

沈洪, 刘增巍, 朱莹莹, 张坤, 王伟, 郭青龙, 袁胜涛. 莪术对SGC7901胃癌细胞COX-1, COX-2, VEGF和PGE₂表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1548-1553
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1548.asp>

0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)为一种膜结合蛋白, 是花生四烯酸转化为前列腺素和其他二十烷类的限速酶。目前已知细胞中至少有两种COX同工酶: COX-1和COX-2。COX-1多在正常组织中表达, 维持多种组织细胞的正常生理功能。而COX-2在绝大部分组织细胞中不表达, 只在细胞受到广泛内外刺激因素(细胞因子、生长因子、内毒素、促有丝分裂因子、致癌剂等)作用时, 才呈诱生性表达^[1], 且诱导产生的量随细胞类型及刺激因素的不同而改变。COX-2与人类肿瘤具有密切联系^[2], 其可能参与了肿瘤的异型、凋亡、肿瘤血管生成及肿瘤侵袭等。有不少研究报道^[3], 食管癌、胃癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌等消化道肿瘤中有COX-2 mRNA或蛋白的过度表达, 但COX-1表达无改变^[4]。在慢性萎缩性胃炎伴肠化、不典型增生时也有COX-2的表达上调^[5], 且与慢性炎症的程度相关, 而萎缩性胃炎伴肠化及不典型增生被认为是癌前病变。说明COX-2过度表达在胃癌的形成中起重要作用^[6]。几项研究表明^[7], NSIADs的应用可能减少非贲门癌, 甚至贲门癌发生的危险性。目前已知NSIADs可阻断COX-2而发挥其对胃肠道肿瘤的化学预防作用^[8]。实验研究也发现, NSIADs可在体外抑制胃癌细胞株的增殖, 使其生长受抑, 凋亡增加。

研究报道表明血管内皮生长因子(VEGF)可在很多正常组织中表达, 但一般水平较低, 恶性肿瘤细胞能分泌大量VEGF, 常呈现过量表达。有研究表明肿瘤组织中VEGF的表达高于正常组织, 其阳性表达肿瘤中微血管密度也明显增高。VEGF是最具特异性的血管活性物质, 高效地作用于血管内皮细胞, 刺激内皮细胞增殖, 促进血管形成。他诱导产生的新生血管有很高的通透性, 能使循环中的血浆蛋白渗出到细胞外基质, 有利于成纤维细胞和内皮细胞在其中生长, 共同形成一种富含血管的肿瘤基质, 为肿瘤的浸润和转移创造条件。另外, VEGF可通过特殊的受体激活磷脂酶C^[9], 快速诱导钙离子对血管内皮细胞直接作用, 增加血管的通透性。因此, VEGF在肿瘤的发生、生长、转移中起着重要的作用。而COX-2还可诱导VEGF等血管新生因子^[10], 促使肿瘤血管的新生, 从而促进肿瘤的增殖和发展^[11]。

PGE₂是花生四烯酸的主要代谢产物之一, 已有大量研究报道^[12], 同正常组织相比较, 胃癌

■研究前沿

自从选择性COX-2抑制剂罗非昔布在临床应用后发现心血管方面的副作用后, 关于COX-2的研究进一步深入, 对COX-2在副作用方面的认识也有所加强, 相关研究增多。有的研究认为选择性COX-2抑制剂也有不少副作用, 而中药在防治肿瘤中副作用较少, 因此寻找具有选择性COX-2抑制作用的副作用更少的中药有效成分成为研究热点。

■创新盘点

本文主要不同点及创新之处在于从中药的角度,研究莪术对胃癌的作用机制。

组织产生PGE₂的水平增高。PGE₂可抑制具有免疫调节功能的淋巴因子产生,抑制T细胞和B细胞增殖, T细胞母细胞化及抑制NK细胞、LAK细胞和CTL的细胞毒活性。同时, PGE₂还可抑制TNF的产生, 诱导IL-10产生。因此, 应用环氧合酶抑制剂(如阿斯匹林、苏灵达和消炎痛等)可减低肿瘤引起的免疫抑制作用^[13]。

近年来, 益气活血法^[14]在预防及治疗胃癌及癌前病变中应用较为广泛, 取得了较好的疗效^[15], 为进一步探讨中药作用的机制, 我们初步筛选出其中最为常用的活血药莪术作为本研究的主要对象, 采用RT-PCR(COX-1, COX-2 mRNA)、Western blot(COX-1, COX-2 protein)、免疫组化双抗夹心ELISA(VEGF、PGE₂)等方法, 测定其在胃癌细胞中的表达及在莪术作用下表达的变化, 从分子生物学角度分析莪术作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞SGC7901为中国药科大学抗肿瘤药理实验室保存。莪术提取液由江苏省中医院药理实验室提供, celecoxib(塞来昔布)产自西尔大药厂波多黎各分厂。RPMI 1640培养基由Gibco公司生产, COX引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 小牛血清由杭州四季青公司提供, DMSO(二甲基亚砷)由江苏永华精细化学品有限公司生产, 总RNA tripure抽提试剂盒由Roche Diagnostics公司生产, COX抗体由Santa Cruz公司生产, 100 bp DNA ladder购自大连宝生物工程有限公司, 100 bp蛋白ladder由Piece chemical公司生产。VEGF检测试剂盒由上海森雄科技实业有限公司生产。PGE₂检测试剂盒由美国BPB公司生产。

1.2 方法 用2.5 g/L胰蛋白酶消化单层培养细胞SGC7901, 制备单细胞悬液。以每孔1×10⁴个细胞接种于96孔培养板(每孔100 μL), 分别加不同浓度的莪术, 移入37℃ CO₂孵箱中培养24 h。然后每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL, 于37℃继续孵育4 h, 终止培养。吸弃孔中的培养上清, 加入100 μL DMSO振荡10 min, 在酶联免疫检测分析仪测定A_{490nm}的值。以只加培养液不加细胞的空白对照孔调零。

1.2.1 RT-PCR测COX基因 取对数生长期的细胞, 按每瓶2×10⁶个细胞的量, 分别加入到3个中瓶中, 24 h后细胞贴壁后分别加药(选取抑制率为25%时的药物浓度作为加药浓度): 细胞

对照组、celecoxib组(5.75E-5 mol/L)、莪术组(940 g/L), 48 h后收集各组细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 1000 r/min离心10 min, 收集细胞沉淀, 再以0.01 mmol/L pH 7.4 PBS洗涤沉淀2次, 于-70℃保存。应用tripure试剂盒提取RNA, 并用紫外分光光度计测定A_{260nm}及A_{280nm}值, 分析其纯度, 同时进行定量。于冰上混合2 μg RNA样品及10 μL随机六聚体引物, 于70℃退火5 min后, 立即置于冰浴中, 加入5 μL逆转录酶缓冲液, 40 MU/L rRNase抑制剂1 μL, 10 mmol/L dNTP 1.25 μL, 200 kU/LM-MLV逆转录酶1 μL, 并补加水至25 μL充分混合。然后37℃ 1 h; 80℃ 5 min终止反应, -20℃保存。引物序列COX-2为: COX-2 F: 5' ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC 3'; COX-2 R: 5' TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG 3'。扩增片段长度为807 bp; 引物序列COX-1为: COX-1 F: 5' CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G3'; COX-1 R: 5' CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACT G3'。扩增片段长度为529 bp。反应体系: 10×reaction Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 20 mmol/L上下游引物各0.4 μL, cDNA 2 μL, 及Taq酶0.3 μL, 补加水至25 μL。PCR条件: 94℃热启动, 94℃变性45 s, 58℃复性35 s, 72℃延伸55 s, 共35个循环。最后于72℃延伸10 min。反应完毕后, 取扩增产物10 μL, 于15 g/L的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。为比较各组细胞间表达水平的强弱, 应用图像分析仪对扩增条带做了扫描半定量。

1.2.2 Western blot测COX蛋白 将细胞的蛋白样品定量(90 μg), 并进行变性(90℃, 5 min)处理; 行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 转膜: 75 mA, 1 h; 用封闭液(脱脂牛奶)封闭1 h; 用Blot wash液洗2次, 每次10 min; 加入COX-1或COX-2的一抗, 在25℃温育1.5 h, COX-1和COX-2的一抗工作浓度分别为1:500和1:800; 用Blot wash液洗3次, 每次10 min; 加入辣根过氧化酶标记的二抗后, 在25℃温育1 h, COX-1和COX-2的二抗工作浓度均为1:10 000; 用Blot wash液洗3次, 每次10 min; 加入1:1的发光液, 在25℃温育5 min。立即曝光, 等条带清晰后将胶片取出, 用凝胶成像系统扫描并进行数据分析。

1.2.3 ELISA法测VEGF和PGE₂ 取对数生长期的细胞, 按1×10⁸个/L的密度, 每孔500 μL培养基分别加入到2个24孔板中, 24 h细胞贴壁后分别加药(选取抑制率为25%时的药物浓度作为加药

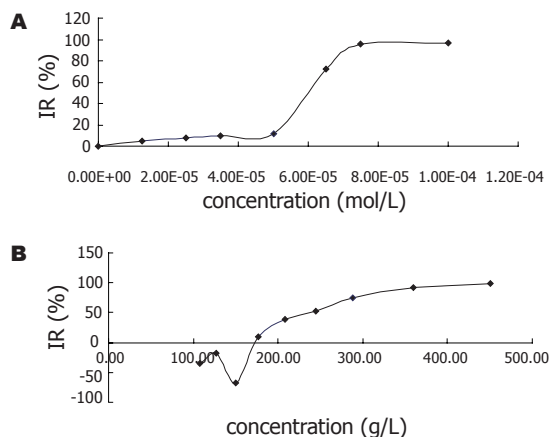


图1 塞来昔布(A)、莪术(B)对胃癌细胞的抑制率。

浓度): 细胞对照组、celecoxib组(5.75×10^{-5} mol/L)、莪术组(195 g/L), 每个浓度的药物分别加8孔或10孔($n = 8$ 或 10), 48 h后收集上层培养基, 离心后上清转入tube管中备用。将准备好的培养基加入已平衡至室温板条的相应孔中($100 \mu\text{L}$ /孔), 37°C 孵箱孵育120 min, 取出板充分洗涤5次, 向滤纸上印干后每孔加入一抗工作液 $50 \mu\text{L}$, 充分混匀, 37°C 孵箱孵育60 min, 洗板5次, 干后每孔加入酶标抗体工作液 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵箱孵育60 min, 洗板5次, 加入底物工作液 $100 \mu\text{L}$ /孔, 37°C 孵箱暗处反应10 min, 每孔加入终止液1滴, 混匀后即刻测量 $A_{492\text{nm}}$ 值, 减去空白孔 A 值, 得各标本的 A 值, 根据标准品的测定值绘制标准曲线图, 在标准曲线上查出每个标本VEGF浓度。酶标板每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 标准品, 分别加入 $100 \mu\text{L}$ 样品, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 酶标液, $18-25^\circ\text{C}$ 反应90 min。洗板6次, 每孔加入底物A、B液各 $50 \mu\text{L}$, $18-25^\circ\text{C}$ 反应15 min, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 终止反应。于波长250 nm的酶标仪上读取各孔的 A 值, 根据标准品浓度, 计算出样品中PGE₂的浓度。

2 结果

2.1 COX-1, COX-2表达 莪术对胃癌细胞有一定的抑制作用, 且随着浓度的增加, 其抑制作用加强(图1)。将RT-PCR产物经电泳分析, 加入COX-1引物的各组均可见1条约529 bp(符合COX-1位置)的扩增带, 加入COX-2引物的各组均可见1条约807 bp(符合COX-2位置)的扩增带, 特异性好(图2)。说明胃癌细胞中有COX-1 mRNA、COX-2 mRNA的表达。对各条带进行灰度分析(图3)发现, 中西药对COX-1 mRNA和COX-2 mRNA均有抑制作用, 莪术对COX-2的抑制作

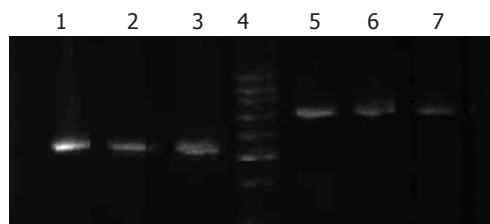


图2 COX-1 mRNA和COX-2 mRNA在人胃癌细胞中的表达。1-3: COX-1 mRNA; 5-7: COX-2 mRNA; 1, 5: SGC7901细胞; 2, 6: 塞来昔布组; 3, 7: 莪术组; 4: 100 bp DNA ladder。

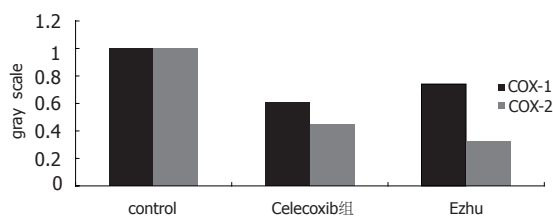


图3 各组别mRNA条带灰度分析比较。

表1 胃癌细胞VEGF和PGE₂的表达

分组	<i>n</i>	VEGF (ng/L)	<i>n</i>	PGE ₂ (ng/L)
对照	8	162.0 ± 15.1	8	78.7 ± 5.6
celecoxib	8	91.0 ± 18.2 ^b	10	77.9 ± 5.1
莪术	8	127.8 ± 12.1 ^b	10	67.5 ± 6.9 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照。

用大于塞来昔布。胃癌细胞的Western blot曝光结果可见, COX-1各组在70 kDa处可见特异性的蛋白条带(图4), COX-2各组在80 kDa处可见特异性的蛋白条带(图4)。对各条带进行灰度分析发现: 各组中西药对COX-2均有明显的抑制作用, 而对COX-1则无抑制作用。其中, 莪术对COX-2的抑制作用要强于celecoxib。

2.2 VEGF和PGE₂的表达 西药celecoxib及莪术组可明显降低人胃癌细胞VEGF的表达, 与细胞组相比, 其差别有统计学意义($P < 0.01$, 表1)。西药celecoxib组PGE₂表达低于细胞组, 但其差别无统计学意义, 益气活血中药均可明显降低人胃癌细胞PGE₂的表达, 与细胞组相比, 其差别有统计学意义($P < 0.01$, 表1)。

3 讨论

目前, COX-2促肿瘤发生、发展的机制已有较多阐述, 但其与胃癌诸多病理因素间关系的报道尚不一致^[16]。有实验结果显示^[17], COX-2在正常胃黏膜、浅表性胃炎、萎缩性胃炎伴肠化、不

■应用要点

通过本研究, 对于中药作用的机制有了进一步的了解, 为临床选用中药提供了依据, 而且对于中药作用的机制可围绕COX-2进行进一步深入的研究, 从其上游或下游探讨。更重要的是, 可进一步筛选具有选择性COX-2抑制作用的有效成分, 开发一类新药。

同行评价

本研究观察了中药治疗肿瘤的部分机理或机制,文章设计合理,分析得恰当,有较高的科学价值.

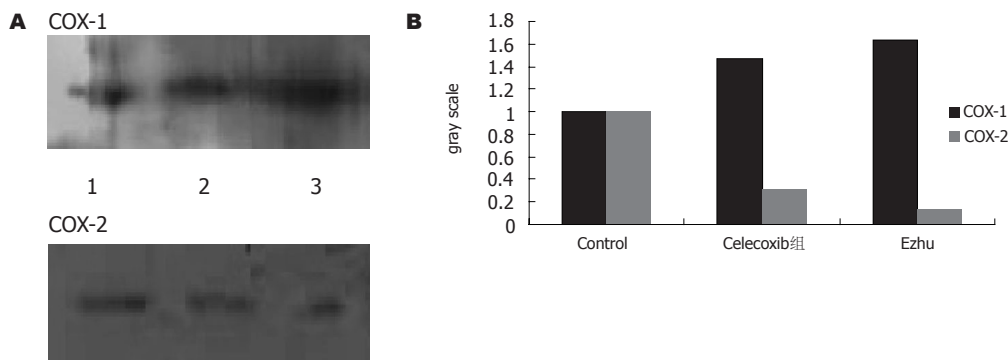


图4 人胃癌细胞COX-1, COX-2蛋白的表达. A: Western blot; B: 灰度分析. 1: SGC7901细胞; 2: celecoxib组; 3: 手术组.

典型增生及胃癌组织中的表达呈逐渐递增趋势,阳性率依次为6.67%, 17.86%, 30.43%, 42.11%和62.26%. 提示COX-2在促胃癌发生、发展的过程中遵循Correa *et al*^[18]提出的肠型胃癌的发生模式: 正常胃黏膜→慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌的顺序演变过程, 即COX-2参与了胃癌形成的全过程, 可能为其早期事件. COX-2高表达与胃癌组织学分级、浸润深度及有无淋巴结转移有关^[19]. 在高中分化胃癌组中的表达显著高于低分化组, 在侵及浆膜组与有淋巴结转移组中的表达亦高于未侵及浆膜组与无淋巴结转移组. 提示COX-2不仅参与了胃癌形成的早期过程, 且与胃癌的侵袭、转移及预后亦有一定的关系. 以往的研究表明在胃癌细胞中COX-1的表达呈阳性^[20], 与本试验结果相一致. 从RT-PCR的结果来看, 手术对COX-2 mRNA和COX-1 mRNA均有明显的抑制作用, 从对COX的选择性来看, 手术对COX-1和COX-2的抑制无明显差别. 从Western blot的结果来看, 中西药对COX-2均有明显的抑制作用, 而对COX-1则无抑制作用. 其中, 在抑制率相同的情况下, 手术对COX-2的抑制作用要强于celecoxib. 从ELISA检测可以看出, 西药celecoxib及中药手术均可明显降低人胃癌细胞VEGF的含量, 且其趋势与各组COX-2的表达基本平行, 中药手术组可明显降低人胃癌细胞PGE₂的含量, 两者趋势与各组COX-2的表达基本平行, 说明COX-2与PGE₂、VEGF呈一定的相关性^[21], 中药作用的机制可能是通过抑制COX-2表达, 从而抑制PGE₂的产生^[22], 降低肿瘤的发生; 或者通过对VEGF的诱导作用^[23], 使VEGF表达下调, 或直接抑制VEGF表达, 从而抑制肿瘤血管的新生^[24], 抑制肿瘤的增殖和发展^[25].

总之, 中药抗肿瘤的机制可能是通过抑制

COX-2表达, 减少PGE₂所引起的炎症^[26]及其免疫反应^[27], 防止肿瘤发生; 或使VEGF表达下调^[28], 或直接抑制VEGF表达^[29], 从而抑制肿瘤血管的新生, 达到抗肿瘤的作用^[30].

参考文献

- Zhang YY, Deng T, Hu ZF, Zhang QP, Zhang J, Jiang H. Mechanisms of Inhibiting Proliferation and Inducing Apoptosis of Human Gastric Cancer Cell Line SGC7901 by Ursolic Acid. *Aizheng* 2006; 25: 432-437
- Yao HB, Wu AG, Chen YJ, Tang BH. Expression of COX-2 protein in colorectal carcinoma and the clinical implication. *Diji Junyi Daxue Xuebao* 2005; 25: 1524-1528
- Zhang J, Ji J, Yuan F, Yan C, Yu YY, Liu BY, Zhu ZG, Yin HR, Lin YZ. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Zhonghua Weichangwaike Zazhi* 2005; 8: 348-351
- Sun WH, Sun YL, Fang RN, Ou XL, Xue QP, Shao Y, Xu HC, Cheng YL. Relationship between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in patients with gastric cancer. *Zhonghua Weichangwaike Zazhi* 2005; 8: 343-347
- Yasuda H, Yamada M, Endo Y, Inoue K, Yoshida M. Elevated cyclooxygenase-2 expression in patients with early gastric cancer in the gastric pylorus. *J Gastroenterol* 2005; 40: 690-697
- Park JH, Kang KH, Kim SH, Lee JH, Cho CM, Kweon YO, Kim SK, Choi YH, Bae HI, Kim MS. Expression of Cyclooxygenase-2 and Bcl-2 in human gastric adenomas. *Korean J Intern Med* 2005; 20: 198-204
- Spugnini EP, Porrello A, Citro G, Baldi A. COX-2 overexpression in canine tumors: potential therapeutic targets in oncology. *Histol Histopathol* 2005; 20: 1309-1312
- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Increased expression of interleukin-1alpha and cyclooxygenase-2 in human gastric cancer: a possible role in tumor progression. *Anticancer Res* 2005; 25: 3225-3230
- Tsutsumi S, Kuwano H, Shimura T, Morinaga N, Mochiki E, Asao T. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) expression in pT2 gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 629-632
- Leung WK, To KF, Go MY, Chan KK, Chan FK,

- Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23: 1317-1322
- 11 Zhang J, Ji J, Yuan F, Zhu L, Yan C, Yu YY, Liu BY, Zhu ZG, Lin YZ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with VEGF-C and lymph node metastases in gastric cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S285-288
- 12 Ding YB, Shi RH, Tong JD, Li XY, Zhang GX, Xiao WM, Yang JG, Bao Y, Wu J, Yan ZG, Wang XH. PGE₂ up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN28 gastric cancer cells via epidermal growth factor receptor signaling system. *Exp Oncol* 2005; 27: 108-113
- 13 Hu PJ, Yu J, Zeng ZR, Leung WK, Lin HL, Tang BD, Bai AH, Sung JJ. Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats. *Gut* 2004; 53: 195-200
- 14 Min C, Li Q, Liu H. The effect of "Jian Pi Dao Zhi Fang" on human gastric carcinoma cells. *Zhongyao* 2004; 27: 935-937
- 15 Li QM, Kan FJ, Min CY. Effect of Weikangning on gastric cancer cell growth and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 938-942
- 16 Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, Buskens CJ, Van Rees BP, Rio MC, Haglund C, Van Lanschot JJ, Offerhaus GJ, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *APMIS* 2003; 111: 915-925
- 17 Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, Gudis K, Tsukui T, Kishida T, Fukuda Y, Sugisaki Y, Tokunaga A, Tajiri T, Sakamoto C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. *Hum Pathol* 2004; 35: 488-495
- 18 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- 19 Koga T, Shibahara K, Kabashima A, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Takahashi I, Kakeji Y, Maehara Y. Overexpression of cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1626-1630
- 20 Lu XG, Zhan LB, Feng BA, Qu MY, Yu LH, Xie JH. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2140-2144
- 21 Ichinoe M, Mikami T, Shiraishi H, Okayasu I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. *Histopathology* 2004; 45: 612-618
- 22 Smith GV, Farthing MJ. The effect of ascorbic acid on *Helicobacter pylori* induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E₂ production by gastric epithelial cells *in vitro*. *Helicobacter* 2005; 10: 83-89
- 23 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1421-1426
- 24 Jayaprakasam B, Zhang Y, Nair MG. Tumor cell proliferation and cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds in *Amaranthus tricolor*. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6939-6943
- 25 Fu YG, Sung JJ, Wu KC, Wu HP, Yu J, Chan M, Chan VY, Chan KK, Fan DM, Leung WK. Inhibition of gastric cancer-associated angiogenesis by antisense COX-2 transfectants. *Cancer Lett* 2005; 224: 243-252
- 26 Jang TJ. Expression of proteins related to prostaglandin E₂ biosynthesis is increased in human gastric cancer and during gastric carcinogenesis. *Virchows Arch* 2004; 445: 564-571
- 27 Chen JH, Wu CW, Kao HL, Chang HM, Li AF, Liu TY, Chi CW. Effects of COX-2 inhibitor on growth of human gastric cancer cells and its relation to hepatocyte growth factor. *Cancer Lett* 2005;
- 28 Tendo M, Yashiro M, Nakazawa K, Yamada N, Hirakawa K. Inhibitory effect of a selective cyclooxygenase inhibitor on the invasion-stimulating activity of orthotopic fibroblasts for scirrhous gastric cancer cells. *Cancer Sci* 2005; 96: 451-455
- 29 Li JY, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Tian G, Mei Q, Huang JA. Influence of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on proliferation of human gastric cancer cells. *Aizheng* 2002; 21: 625-629
- 30 Yu J, Tang BD, Leung WK, To KF, Bai AH, Zeng ZR, Ma PK, Go MY, Hu PJ, Sung JJ. Different cell kinetic changes in rat stomach cancer after treatment with celecoxib or indomethacin: implications on chemoprevention. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 41-45

电编 张敏 编辑 潘伯荣

抗HBsAg-Fab重组体在小鼠肝脏的表达

唐莉, 曾志贵, 潘桃, 袁劲, 陈必成, 陈忠华, 陈知水

■背景资料

我国肝移植受者多为乙肝相关终末期肝病患者, 这些患者移植后极易发生乙肝病毒(HBV)的复发感染, 而复发后生存率明显下降。运用基因治疗方法在受者体内表达保护性抗HBsAg小分子Fab抗体预防HBV复发感染的研究对提高我国肝移植患者生存率和生存质量具有重要意义。

唐莉, 曾志贵, 潘桃, 袁劲, 陈忠华, 陈知水, 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所 国家教育部/卫生部重点实验室 湖北省武汉市 430030

陈必成, 温州医学院附属第一医院移植中心 浙江省温州市 325000

唐莉, 2001年皖南医学院本科毕业, 2006年华中科技大学同济医学院博士毕业, 主要从事移植免疫及抗体工程研究。

国家自然科学基金面上项目资助, No. 30471695

通讯作者: 陈知水, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 同济医院器官移植研究所. zschen@tjh.tjmh.edu.cn

电话: 027-83662592

收稿日期: 2006-03-24 接受日期: 2006-04-13

Expression of recombination human anti-HBsAg Fab in murine liver

Li Tang, Zhi-Gui Zeng, Tao Pan, Jin Yuan, Bi-Cheng Chen, Zhong-Hua Chen, Zhi-Shui Chen

Li Tang, Zhi-Gui Zeng, Tao Pan, Jin Yuan, Zhong-Hua Chen, Zhi-Shui Chen, Institute of Organ Transplantation; Key Laboratory of Organ Transplantation, Ministry of Education/Ministry of Health, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Bi-Cheng Chen, Center of Transplantation, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471695

Correspondence to: Dr. Zhi-Shui Chen, Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Street, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zschen@tjh.tjmh.edu.cn

Received: 2006-03-24 Accepted: 2006-04-13

■研发前沿

1 裸质粒注射需要解决长期、稳定、高水平表达的问题。因此可以使用腺相关病毒载体转染已达到长期稳定和水平表达的目的。

2 目前尚无小鼠HBV感染模型, 体内检验抗HBsAg小分子Fab抗体预防HBV感染功能还是难题, 只能于灵长类动物体内研究其抗HBV感染能力。

Abstract

AIM: To evaluate the expression of recombinant and soluble human anti-HBsAg Fab in murine liver.

METHODS: The 5-40 μ g recombinant plasmid pXXUF1-HBs-Fab was transfected by hydrodynamics-based administration via tail vein into C57BL/6 mice within 5 s. Meanwhile the empty plasmid transfection group and non-transfection group were established. The serum and tissue samples from liver, kidney and spleen of these mice were collected 3 d after transfection. The expression of genetically engineered Fab

antibody *in vivo* was identified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry both at mRNA and protein level.

RESULTS: After transfection with different doses (5, 10, 20 and 40 μ g) of pXXUF1-HBs-Fab, the plasma expression of anti-HBsAg Fab was 201.3 ± 13.7 , 213.1 ± 13.5 , 513.6 ± 12.8 and 954.1 ± 12.7 μ g/L, respectively, with specific binding activities to HBsAg protein. There was a positive correlation between the expression of the protein and plasmid dose ($r = 0.912$, $P < 0.01$). Meanwhile, the mRNA of Fd and κ chain were detected in liver tissues by RT-PCR. Immunohistochemistry showed brown positive granules in the cytoplasm of liver cells and Fab protein cohered on the inner walls of glomerular capillary lumen and collectors, but the parenchyma cells of the kidney and spleen had no expression of Fd, κ chain and the target protein. The expression of target protein was not observed in both empty plasmid transfection and non-transfection group.

CONCLUSION: The recombinant and soluble human anti-HBsAg Fab can be successfully expressed in mice, and the expression level is increased with the increase of plasmid dose. The above study also shows the Fab protein can be filtrated through glomerular.

Key Words: Eukaryotic expression; Micromolecule antibody; Hepatitis B surface antigen; Mice

Tang L, Zeng ZG, Pan T, Yuan J, Chen BC, Chen ZH, Chen ZS. Expression of recombination human anti-HBsAg Fab in murine liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1554-1560

摘要

目的: 研究人抗HBsAg-Fab重组体在小鼠体内的表达分泌。

方法: 将所构建的pXXUF1-HBs-Fab质粒以5、10、20和40 μ g的剂量分别利用尾静脉液压法转染C57BL/6小鼠, 建立实验1-4组; 同时

设立pXXUF1质粒转染对照组和空白组。转染3 d后采集血清和肝、肾、脾等组织标本, 运用RT-PCR, ELISA和免疫组织化学染色等方法从基因和蛋白水平分析基因工程抗体人抗HBsAg-Fab在体内的表达能力。

结果: 尾静脉液压注射pXXUF1-HBs-Fab组小鼠血清中证实了人源性Fab蛋白的分泌性表达, 各实验组血清中表达量分别为 201.3 ± 13.7 、 213.1 ± 13.5 、 513.6 ± 12.8 和 954.1 ± 12.7 $\mu\text{g/L}$, 并具有与HBsAg特异性结合的活性, 蛋白表达与注射质粒剂量有正相关($r = 0.912$, $P < 0.01$); 对照组和空白组血清中则未测到目的蛋白。实验组肝、肾、脾组织RT-PCR检测可见肝组织中有Fd重链及 κ 轻链的mRNA表达; 免疫组织化学检测显示肝细胞胞质中有棕黄色阳性颗粒, 且部分肾小球毛细血管腔内壁和肾脏集合管壁可见附着的Fab蛋白, 肾实质细胞及脾脏均未见Fd重链及 κ 轻链的mRNA和目的蛋白表达; 对照组和空白组均未检测到目的蛋白。

结论: pXXUF1-HBs-Fab成功于小鼠肝脏分泌表达人抗HBsAg-Fab重组体, 其表达水平与质粒DNA注射剂量存在正相关关系, 并可通过肾小球滤过代谢。

关键词: 真核表达; 小分子抗体; 乙肝表面抗原; 小鼠

唐莉, 曾志贵, 潘桃, 袁劲, 陈必成, 陈忠华, 陈知水. 抗HBsAg-Fab重组体在小鼠肝脏的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1554-1560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1554.asp>

0 引言

我国肝移植受者多以乙肝相关终末期肝病患者^[1-3], 这些患者移植后极易发生乙肝病毒(HBV)的复发感染, 无预防者肝移植后HBV再感染率可达67%-80%, 而复发后生存率明显下降, 3 a生存率仅44%, 5 a生存率为17%^[4-7]。运用基因治疗方法在受者体内表达小分子抗HBsAg抗体预防HBV复发感染的研究对提高我国肝移植患者生存率和生存质量具有重要意义。在前期研究中, 我们已将来源于人源性噬菌体抗体库筛选后的抗HBsAg抗体的重链Fd段和 κ 轻链基因构建于重组腺相关病毒穿梭质粒上, 即pXXUF1-HBs-Fab。质粒介导外源基因在体内的表达是研究基因功能和基因治疗的主要手段。我们采用尾静脉液压法建立pXXUF1-HBs-Fab体内转染模型, 探索小分子抗体基因在小鼠体内的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 含有抗人HBsAg 抗体重链Fd段、 κ 轻链基因和IRES序列的重组腺相关病毒穿梭质粒pXXUF1-HBs-Fab为本研究所构建; pXXUF1质粒由美国匹兹堡大学肖啸教授惠赠; 清洁级健康C57BL/6(H-2^{b/b}) δ 小鼠, 6-8 wk龄, 20-22 g, 由本所动物中心提供; 质粒去内毒素抽提试剂盒(Qiagen); HRP-羊抗人Fab抗体及鼠抗人Fab抗体购(Sigma); 含HBsAg抗原的ELISA板(上海实业科华生物技术公司); SP免疫组化试剂盒(北京中山生物技术公司); Trizol RNA分离试剂盒(Gibco); 逆转录酶M-MLV及oligi dT (Progema); 高保真DNA聚合酶、dNTP和琼脂糖(Fermentas); PCR Marker(华美)。PCR引物合成(上海英骏): F1: 5'-AGT GGC AGT GCT GGA AAC<3'; F2: 5'-GCA GAT GTA GGT CTG GGT G<3'; K1: 5'-GCC GGA CCA GTC AGG ACA T<3'; K2: 5'-CCG ATT GGA GGG CGT TAT<3'; GADPH 5'端引物: 5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG<3'; GADPH 3'端引物: 5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC<3'。

1.2 方法 吸取已构建的重组质粒pXXUF1-HBs-Fab和pXXUF1保种菌液各200 μL 分别至100 mL含100 mg/L氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37℃剧烈振荡。将菌悬液收集于离心管中, 4℃离心15 min, 弃培养液, 使细菌沉淀尽可能干燥。按Qiagen去内毒素超纯质粒抽提试剂盒说明书对pXXUF1-HBs-Fab和pXXUF1进行大量制备, ddH₂O溶解沉淀。紫外分光光度计测定质粒DNA的浓度及纯度。分别将5-40 μg 纯化pXXUF1-HBs-Fab和20 μg pXXUF1质粒溶解于1.6 mL的生理盐水中, 通过C57BL/6小鼠尾静脉快速(5 s内)注射完全部液体。实验分组: 设立实验1组(注射pXXUF1-HBs-Fab 5 μg +生理盐水)、实验2组(注射pXXUF1-HBs-Fab 10 μg +生理盐水)、实验3组(注射pXXUF1-HBs-Fab 20 μg +生理盐水)、实验4组(注射pXXUF1-HBs-Fab 40 μg +生理盐水)、对照组(pXXUF1+生理盐水)和空白组(生理盐水)每组10只。注射3天后, 采集血清和肝、肾和脾组织。

1.2.1 ELISA检测 经小鼠眼眶采血1 mL, 放置2 h后经2000 r/min离心5 min取血清。以HBsAg包被ELISA板, 加入各组小鼠血清及标准人抗HBsAg-Fab蛋白孵育1 h; 再加入1:8000稀释的HRP-羊抗人Fab 100 μL 孵育1 h, TMB显色, 于450 nm及630 nm双波长检测。

1.2.2 RT-PCR 采用Trizol试剂提取C57BL/6小鼠

■ 相关报道

目前国内外临床预防肝移植后乙肝复发的手段主要是乙肝免疫球蛋白(HBIG)、拉米呋啶等抗病毒药物、乙肝疫苗主动免疫等。乙肝免疫球蛋白(HBIG)预防是目前阻止HBV再感染和改善长期生存质量最有效的一种方法, 但这一措施应用于临床还存在许多问题: 治疗费用十分昂贵; 人源血液制品来源困难且可能有病原微生物的污染; 长期静脉注射可能造成汞中毒等。因而HBIG实际临床应用受限, 我国尤为突出。

国内外在HBsAb的人鼠嵌合抗体、全人源化抗体片段如Fab和scFv已开展研究, 但大多处于抗体库构建、大肠杆菌表达、酵母菌表达或植物细胞表达等水平, 尚无用于哺乳动物基因治疗的研究。

■创新盘点

基因工程抗体分子和抗体片段正在被越来越多的用于科学研究和临床疾病的诊治, HBsAb的人鼠嵌合抗体、全人源化抗体片段如Fab和scFv在国内均已开展研究, 但大多处于抗体库构建、大肠杆菌表达、酵母菌表达或植物细胞表达等水平, 尚无用于临床基因治疗的研究。我们已构建了含有抗HBsAg抗体的重链Fd段和κ轻链基因的真核表达质粒pXXUF1-HBs-Fab。在本研究中证明重组抗HBsAg Fab可以在哺乳动物细胞体内分泌表达, 通过裸质粒注射的方法主要在肝脏表达, 并可进入血液循环, 通过肾脏代谢。

表 1 各转染组血清中人抗HBsAg小分子Fab抗体的含量

分组	处理因素	A值 (mean ± SD, n = 10)
实验1	pXXUF1-HBs-Fab 5 μg	1.78 ± 0.17 ^a
实验2	pXXUF1-HBs-Fab 10 μg	1.814 ± 0.165 ^a
实验3	pXXUF1-HBs-Fab 20 μg	2.341 ± 0.131 ^{ac}
实验4	pXXUF1-HBs-Fab 40 μg	2.712 ± 0.13 ^{ac}
对照	pXXUF1	0.008 ± 0.001
空白	生理盐水	0.006 ± 0.002

^aP<0.05 vs 对照与空白组; ^cP<0.05 vs 实验1与实验2组; ^aP<0.05 vs 实验3组。

肝脏、肾脏和脾脏组织的总RNA, 以Oligo dT为引物逆转录合成单链cDNA。并F1和F2, K1和K2为引物扩增抗HBs抗体Fd重链及κ轻链基因。RNA提取和RT-PCR方法详见试剂盒使用说明书。PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 循环参数为: 94℃变性40 s, 55℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 35个循环, 72℃延伸10 min, 同时扩增管家基因GADPH。产物经琼脂糖凝胶电泳后鉴定。

1.2.3 免疫组化检测 取40 g/L多聚甲醛灌注小鼠肝脏至发白, 剪取1 cm³大小组织固定; 肾脏及脾脏剪下后肝素盐水冲洗, 一并放入40 g/L多聚甲醛固定。石蜡包埋, 标本均作厚度4 μm的连续切片4张, 分别进行HE和免疫组化染色。鼠肝单克隆抗人Fab抗体的工作浓度1:40。组化染色参照SP试剂盒说明书进行。PBS代替一抗作阴性对照。显微镜下观察并照相。染色结果判定: 光镜下Fab蛋白以棕黄色颗粒为阳性, 无着色为阴性, 并将着色浅淡的弱阳性也归为阴性。

统计学处理 使用SPSS 11.5软件进行统计分析。所有实验数据均以均数±标准差表示, 各组间差异的两两比较采用t检验, 注射剂量与蛋白表达量间进行一元线性相关分析, P<0.05时具有显著统计学意义。

2 结果

Qiagen去内毒素超纯质粒抽提试剂盒制备的重组质粒pXXUF1-HBs-Fab和pXXUF1浓度分别达到850 mg/L和800 mg/L。尾静脉高压注射后, 各组小鼠均出现一过性心衰, 约30 min后恢复正常, 成活率达100%。

2.1 血清ELISA检测 实验组C57BL/6小鼠注射5 μg, 10 μg, 20 μg和40 μg质粒后血清平均A值分别为1.78±0.17、1.814±0.165、2.341±0.131和2.712±0.13; 根据标准曲线计算, 血清中小分子Fab抗体表达量分别为201.3±13.7 μg/L、

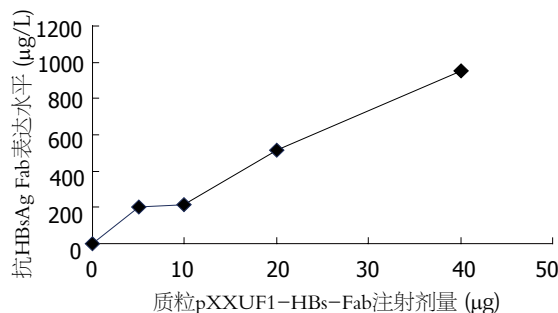


图 1 pXXUF1-HBs-Fab注射剂量对人抗HBsAg Fab表达水平的影响($r = 0.912, P < 0.01$).

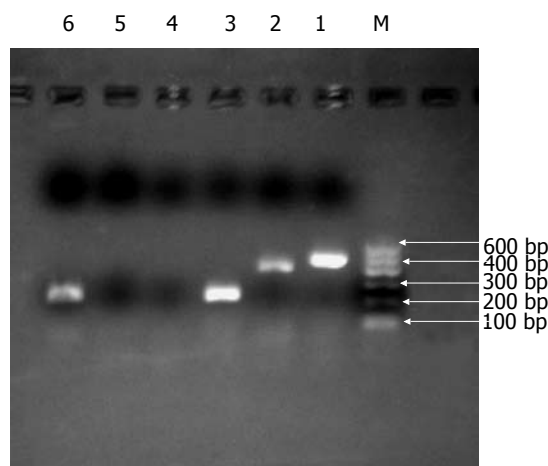


图 2 RT-PCR检测小鼠模型肝细胞中人抗HBsAg小分子Fab抗体的表达。M: 100 bp DNA Ladder; 1-3: 实验3组(1: Fd, 2: κ链, 3: GADPH); 4-6: 对照组(4: Fd, 5: κ链, 6: GADPH)。

213.1±13.5 μg/L、513.6±12.8 μg/L和954.1±12.7 μg/L。对照组和空白组C57BL/6小鼠血清中则未测到人抗HBsAg小分子Fab抗体。证实转染pXXUF1-HBs-Fab的小鼠可以分泌性表达人源性Fab蛋白, 并具有与HBsAg特异性结合的活性; 在40 μg pXXUF1-HBs-Fab质粒注射时抗HBsAg Fab表达最高, 但5 μg和10 μg无明显的差别, 其他剂量组的表达差异均显著(表1)。不同pXXUF1-HBs-Fab注射剂量对人抗HBsAg Fab表达水平的影响见(图1), 蛋白表达与注射质粒剂量有正相关($r = 0.912, P < 0.01$)。

2.2 组织RT-PCR检测 分别以各组小鼠的肝脏、肾脏和脾脏组织提取的总RNA为模板, 进行RT-PCR。在实验组小鼠的肝脏组织中均可检测到抗HBsAg抗体Fd重链及κ轻链的mRNA表达, 而肾脏和脾脏组织未检测; 对照组和空白组小鼠的肝脏、肾脏和脾脏组织中均未检测到Fd重链及κ轻链的表达。图2显示的是实验3组和对照组肝脏组织的RT-PCR产物凝胶电泳结果, 可见实

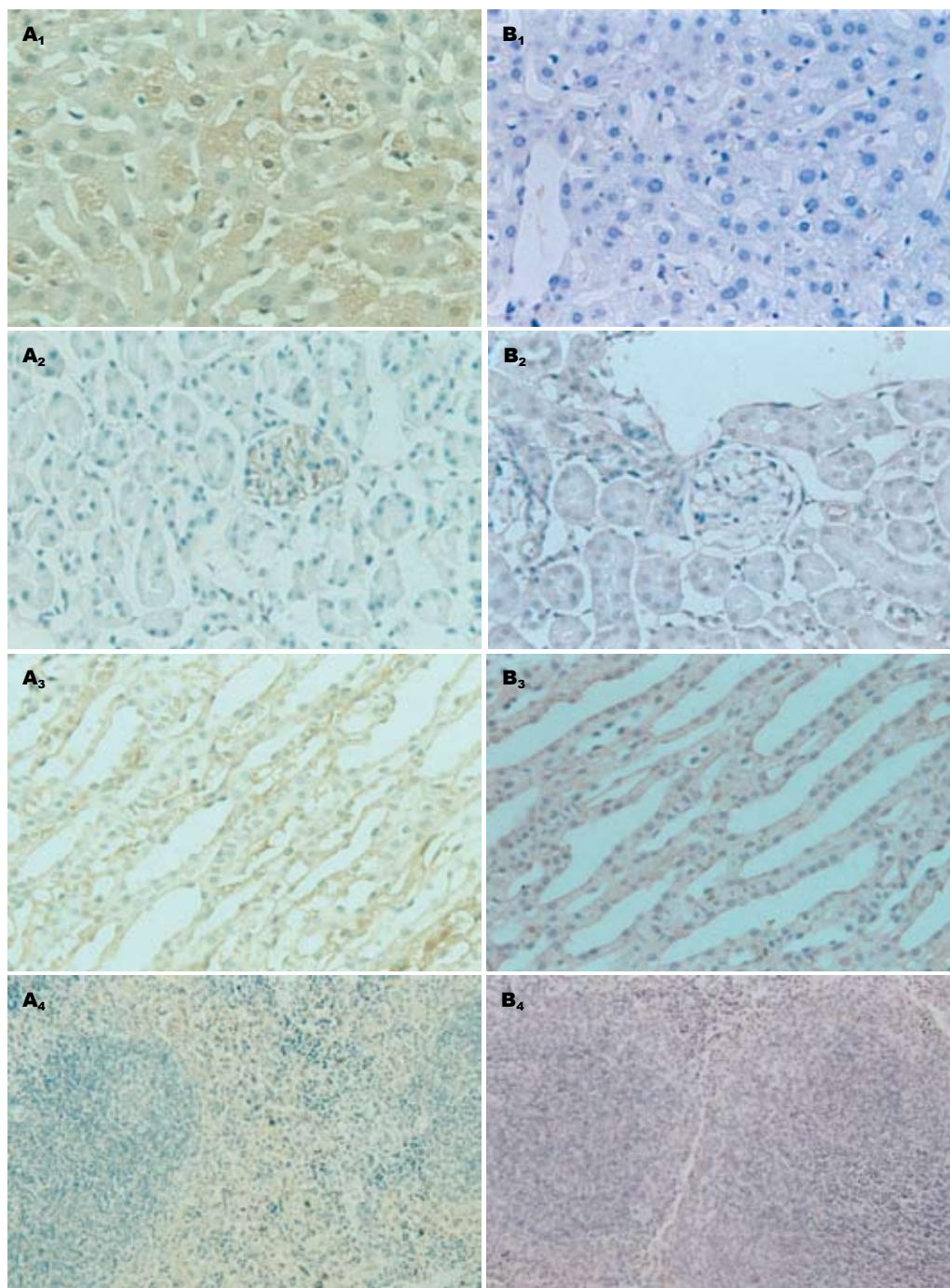


图 3 转染小鼠体内人抗HBsAg Fab的表达(SP × 400). A: 实验3组; B: 对照组; 1: 肝; 2, 3: 肾; 4: 脾.

验组和对照组均有内参GADPH的扩增产物, 表示逆转录过程和PCR过程均成功; 实验组可见长约468 bp和402 bp的重链Fd段和κ轻链基因条带, 而未转染组无带.

2.3 免疫组化检测 体内转染C57BL/6实验组小鼠肝细胞胞质内可见棕黄色阳性颗粒, 而对照组肝细胞未见人小分子Fab抗体的表达; 实验组小鼠部分肾小球毛细血管腔内壁也可见和肾脏集合管壁可见附着的棕黄色颗粒, 其他肾实质细胞未见表达, 对照组肾组织未见Fab蛋白表达;

脾脏免疫组化显示实验组与对照组无明显差异. 图3显示了实验3组与对照组各组织的免疫组化结果. 在实验组的不同剂量组肝脏均可见阳性转染细胞, 而随着pXXUF1-HBs-Fab注射剂量的增加脾脏和肾脏未见实质细胞有的人抗HBsAg Fab阳性表达.

3 讨论

基因工程抗体技术将重组DNA技术和遗传学及免疫球蛋白结构功能方面的知识相结合, 对抗

■应用要点

研究证明重组抗HBsAg Fab可以在哺乳动物细胞体内分泌表达, 通过裸质粒注射的方法主要在肝脏表达, 并可进入血液循环, 通过肾脏代谢, 充分验证其体内转染表达特点. 今后将转染该重组抗HBsAg Fab入灵长类动物体内, 继续研究其抗HBV感染的功能及基因治疗安全性, 最终运用于肝移植受者预防HBV复发感染.

■名词解释

小分子抗体Fab: Fab由重链Fd段(VH+CH1)和完整的轻链组成,二者通过一个链间二硫键连接,形成异二聚体,是完整抗体的1/3,仅有一个抗原结合位点,属于小分子抗体.它具有许多优点:1:分子小,免疫源性低,用于人体不易产生抗异种蛋白反应;2:易于渗透到达病灶周围的微循环;3:血循环和全身清除快,半衰期短,肾脏蓄积少;4:无Fc段,不易与具有Fc受体的非靶细胞结合.这些都是杂交瘤技术产生的抗体无法比拟的优点,具有良好的应用前景.

体分子进行有目的的改造,从而创建新的有价值的抗体分子.目前通过基因工程手段获得的工程抗体分子和抗体片段正在被越来越多的用于科学研究和临床疾病的诊治^[8-10],HBsAg的人鼠嵌合抗体、全人源化抗体片段如Fab和scFv在国内均已开展研究,但大多处于抗体库构建、大肠杆菌表达、酵母菌表达或植物细胞表达等水平,尚无用于临床基因治疗的研究^[11-13].抗体分子为真核蛋白,其体内形成过程涉及胞内分隔作用以及转运酶、折叠酶及异构酶等蛋白的相互作用和翻译后的糖基化、磷酸化、羟基化等多种修饰作用,这与原核细胞大不相同.哺乳动物细胞表达体系的最大优点是:有关抗体分子合成、加工和分泌的信号都能被哺乳动物细胞准确而有效的识别.并且哺乳动物细胞内质网中有完善的重折叠机制,可以对抗体分子进行糖基化,故常作为宿主细胞用于表达真核基因.已有报导表明抗体基因可以在非淋巴细胞类宿主表达,如COS, CHO和骨髓瘤细胞^[14-17].另外不同文献报道,抗体信号肽或者第一框架区中一个氨基酸的改变即可降低抗体的表达,同样轻链可变区中仅一个氨基酸的改变即可阻断抗体的分泌^[18].由此看来,抗体可变区中氨基酸序列对抗体的表达量具有重要的影响,因为个别氨基酸的改变可能会影响了可变区结构域的折叠.为了研究我们构建的pXXUF1-HBs-Fab能否在哺乳动物非淋巴细胞中表达,并能正确折叠具有结合抗原的能力,我们采用尾静脉液压法对C57BL/6小鼠进行转染,验证该重组载体在哺乳动物体内表达人源性抗HBsAg-Fab的能力.我们已将anti-HBsAg轻链和重链Fd的表达序列插入同一质粒,并位于内部核糖体进入位点(internal ribosome entry sites, IRES)^[19-21]的两端,不仅省去了二次转染的步骤,而且保证了重链Fd和轻链cDNA的等量表达,有利于其在真核细胞胞质中正确结合成Fab片段.

尾静脉液压法自1999年报道以来,由于其介导基因转染的高效性和以肝脏为主要靶器官等特点,已被广泛用于基因功能研究^[22-27].我们以anti-HBsAg Fab为报告基因,建立尾静脉液压注射系统,进一步研究pXXUF1-HBs-Fab在哺乳动物体内表达的能力,同时还初步验证了该方法介导的目的基因在小鼠体内转染分布情况.实验组小鼠免疫组化结果显示anti-HBsAg Fab基因可通过尾静脉大容量快速注射法高效转染肝细胞,这一结果与文献报导一致.理论上

pXXUF1-HBs-Fab通过尾静脉进入体内后,会通过血液循环到达全身,但由于这种尾静脉高压注射方法将DNA大部分压入肝脏,所有其他部分DNA含量很少^[28].我们研究各组小鼠的肝脏、肾脏和脾脏组织RT-PCR结果显示实验组小鼠的肝脏组织中可检测到人抗HBsAg抗体Fd重链及κ轻链的mRNA表达;而肾脏和脾脏组织未检测到目的蛋白的表达,且与注射质粒剂量无关.Zhang *et al*^[29]分析这种转染可能是由于大体积DNA溶液快速注射到小鼠体内后在心脏发生阻塞,溶液返回来后通过肝静脉进入肝脏所致,但可能原因不止于此.Budker *et al*^[30]推测质粒的吸收是通过受体介导非特异吸收的途径进入细胞的,质粒与细胞表面的接触时间可能会大大提高DNA的转染效率.我们考虑肝脏外其他组织在转染初期可能有质粒DNA流经,但未能进入组织细胞,故不能检测到细胞内有抗HBsAg Fab的mRNA及蛋白合成表达.小鼠肾脏的免疫组化结果显示pXXUF1-HBs-Fab转染组小鼠部分肾小球毛细血管腔内壁和肾脏集合管壁可见附着的Fab抗体,但未见肾实质细胞内有anti-HBsAg Fab的表达.这一现象说明Fab蛋白的分子质量较小,可通过肾小球过滤而从血液中清除.从不同的角度来看这一现象既是Fab蛋白的优点又是缺点.一方面其半衰期短,可以结合抗原很快从血中清除;但另一方面有可能影响其局部有效浓度.但对Fab蛋白功能的具体影响还需进一步研究.实验还进一步研究了质粒DNA注射剂量与目的蛋白表达水平的关系,其中注射5 μg和10 μg质粒后小分子抗体Fab的表达量无显著差异,但于20 μg和40 μg注射组之间差异显著,随着pXXUF1-HBs-Fab剂量的增加血清中目的蛋白水平逐渐升高.

Liu *et al*^[28]与Zhang *et al*^[29]等均强调压力的产生是细胞吸收DNA的必要条件.注射速度和注射体积直接影响到DNA的转染效率,7 s内注射2-3 mL体积可达到最高表达水平.我们采用这一注射条件,注射后小鼠100%成活,并检测小鼠体内anti-HBsAg Fab的表达水平可达954.1 ± 12.7 μg/L.裸质粒与病毒载体相比具有很多优点,如安全,易制备,因而费用低,且可重复.尾静脉液压法是一种简单而高效的基因转染方法,观察时间短,在快速检测基因体内表达能力方面明显优于其他方法,但该方法不能直接用于人体实验,所以将anti-HBsAg Fab用于临床预防乙肝复发的应用研究则须利于pXXUF1-HBs-

Fab生产出rAAV, 证实安全有效后才能运用于人体. 我们已在体外对转染质粒的细胞系表达的目的蛋白进行纯化, 并初步证明其能预防HBV感染人原代肝细胞的功能(即将发表). 目前尚无小鼠感染HBV的模型, 因此不能在小鼠体内验证该anti-HBsAg Fab的抗HBV感染肝细胞的能力; 且小鼠体内表达的目的蛋白量少, 纯化后于体外验证功能可能性也不大. 因此本文我们未对蛋白功能进行深入探讨.

4 参考文献

- 1 郑树森. 积极推动我国肝脏移植的发展. 中华肝脏病杂志 2004; 22: 132-133
- 2 王正昕, 傅志仁, 丁国善, 傅宏, 张建军, 郭闻渊, 施晓敏. 原位肝移植术后乙型肝炎病毒再感染的预防(附68例报告). 外科理论与实践 2004; 9: 125-127
- 3 Ho BM, So SK, Esquivel CO, Keeffe EB. Liver transplantation in Asian patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1997; 25: 223-225
- 4 Todo S, Demetris AJ, Van Thiel D, Teperman L, Fung JJ, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation for patients with hepatitis B virus-related liver disease. *Hepatology* 1991; 13: 619-626
- 5 Karliova M, Malago M, Trippler M, Valentin-Gamazo C, Rothaer T, Broelsch CE, Gerken G, Treichel U. Seroconversion in patients with acute hepatitis B reinfection after liver transplantation with a combined treatment of lamivudine and hepatitis B immune globulin. *Transplant Proc* 2002; 34: 3319-3322
- 6 Seehofer D, Berg T. Prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 2005; 80: S120-S124
- 7 Terrault NA, Carter JT, Carlson L, Roland ME, Stock PG. Outcome of patients with hepatitis B virus and human immunodeficiency virus infections referred for liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 801-807
- 8 Becker W, Goldenberg DM, Wolf F. The use of monoclonal antibodies and antibody fragments in the imaging of infectious lesions. *Semin Nucl Med* 1994; 24: 142-153
- 9 Sibler AP, Kempf E, Glacet A, Orfanoudakis G, Bourel D, Weiss E. *In vivo* biotinylated recombinant antibodies: high efficiency of labelling and application to the cloning of active anti-human IgG1 Fab fragments. *J Immunol Methods* 1999; 224: 129-140
- 10 Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol* 2000; 328: 430-444
- 11 Ning D, Junjian X, Qing Z, Sheng X, Wenying C, Guirong R, Xunzhang W. Production of recombinant humanized anti-HBsAg Fab fragment from *Pichia pastoris* by fermentation. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 294-299
- 12 Maeda F, Takekoshi M, Nagatsuka Y, Aotsuka S, Tsukahara M, Ohshima A, Kido I, Ono Y, Ihara S. Production and characterization of recombinant human anti-HBs Fab antibodies. *J Virol Methods* 2005; 127: 141-147
- 13 Zheng DY, Luo RC, Cai HB. Conditions for large-scale production of genetically engineered *E. coli* bearing humanized anti-HBsAg Fab. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2004; 24: 517-520
- 14 Afanasieva TA, Wittmer M, Vitaliti A, Ajmo M, Neri D, Klemenz R. Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther* 2003; 10: 1850-1859
- 15 Takai T, Okumura K, Ra C, Yokota T, Okumura Y. Expression of humanized Fab fragments that recognize the IgE-binding domain of human Fc(epsilon)RIalpha in COS and CHO cells. *J Biochem (Tokyo)* 2001; 129: 5-12
- 16 Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J Immunol Methods* 1997; 204: 77-87
- 17 Evans MJ, Hartman SL, Wolff DW, Rollins SA, Squinto SP. Rapid expression of an anti-human C5 chimeric Fab utilizing a vector that replicates in COS and 293 cells. *J Immunol Methods* 1995; 184: 123-138
- 18 Xu Y, Graves PN, Tomer Y, Davies TF. CTLA-4 and autoimmune thyroid disease: lack of influence of the A49G signal peptide polymorphism on functional recombinant human CTLA-4. *Cell Immunol* 2002; 215: 133-140
- 19 Xu L, Shao H, Wu W, Cao Z, Zhao Z, Liu H, Jiang D, Mao X, Li W. Co-expression of the complement regulatory proteins human DAF and CD59 with an IRES-mediated dicistronic mammalian vector enhances their cell protective effects. *Int J Mol Med* 2005; 16: 409-414
- 20 Mokrejs M, Vopalensky V, Kolenaty O, Masek T, Feketova Z, Sekyrova P, Skaloudova B, Kriz V, Pospisek M. IRESite: the database of experimentally verified IRES structures (www.iresite.org). *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D125-D130
- 21 Fernandez J, Yaman I, Huang C, Liu H, Lopez AB, Komar AA, Caprara MG, Merrick WC, Snider MD, Kaufman RJ, Lamers WH, Hatzoglou M. Ribosome stalling regulates IRES-mediated translation in eukaryotes, a parallel to prokaryotic attenuation. *Mol Cell* 2005; 17: 405-416
- 22 Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6: 1258-1266
- 23 Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735-1737
- 24 Vorup-Jensen T, Jensen UB, Liu H, Kawasaki T, Uemura K, Thiel S, Dagnaes-Hansen F, Jensen TG. Tail-vein injection of mannan-binding lectin DNA leads to high expression levels of multimeric protein in liver. *Mol Ther* 2001; 3: 867-874
- 25 Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 2005; 54: 3-20
- 26 Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003; 10: 453-458
- 27 Liu F, Nishikawa M, Clemens PR, Huang L. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd(mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther* 2001; 4:

■同行评价

该文采用裸质粒直接注射的方法, 介导外源性基因在小鼠体内的表达, 且研究的靶基因为抗HBV感染中具有保护作用的抗HBsAg Fab, 因此从研究方法和研究结果来说均具有重要的价值.

- 45-51
- 28 Liu D, Knapp JE. Hydrodynamics-based gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 192-197
- 29 Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000; 7: 1344-1349
- 30 Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells *in vivo* by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000; 2: 76-88

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 •

第十届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办, 南京军区福州总医院承办的“第十届全国普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行. 会议采用院士论坛、专题报告等形式, 对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论. 欢迎军内外普通外科医师参加会议.

1 征文内容

征文内容包括: 有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容.

2 征稿要求

征稿要求包括: (1) 要求中文全文(4000字以内)及摘要(500字以内)各1份. 稿件请寄软盘(Word 格式), 欢迎用电子邮件方式投稿. (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“会议征文”字样.

来稿请寄: 350025, 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈收. E-mail地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn, 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770.

甘氨酸对内毒素性肝损害保护作用的机制

王强, 张涛, 陈叶恒, 余和斌, 游海波

王强, 张涛, 陈叶恒, 余和斌, 游海波, 重庆市长寿区人民医院肝胆外科 重庆市 401220

王强, 重庆市长寿区人民医院肝胆外科主任, 副主任医师, 主要从事肝胆外科基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471696

通讯作者: 游海波, 401220, 重庆市, 长寿区人民医院肝胆外科, youhaibo0427@sohu.com

电话: 023-40405623

收稿日期: 2006-03-18 接受日期: 2006-04-06

Protection mechanisms of glycine against liver injury induced by lipopolysaccharide

Qiang Wang, Tao Zhang, Ye-Heng Chen, He-Bin Yu, Hai-Bo You

Qiang Wang, Tao Zhang, Ye-Heng Chen, He-Bin Yu, Hai-Bo You, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Changshou District, Chongqing 401220, China Supported by National Science Foundation of China, No. 30471696

Correspondence to: Hai-Bo You, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Changshou District, Chongqing 401220, China. youhaibo0427@sohu.com

Received: 2006-03-18 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To explore the protective mechanisms of glycine on lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury.

METHODS: BALB/c mice were randomly divided into LPS group ($n = 50$), glycine group ($n = 50$), and control group ($n = 50$). The animals in LPS and glycine groups were intraperitoneally injected with 10 mg/kg LPS to establish the liver injury model, while animals in glycine group were pretreated with 50 g/L glycine-containing food 3 d before modeling. The mice in control group received the same amount of normal saline. Liver samples were collected to observe histopathological changes. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in plasma were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of TNF- α , IL-10 and toll like receptor 4 (TLR4) in hepatic tissues were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of TLR4 protein in

liver was detected with immunohistochemistry.

RESULTS: Glycine improved the survival rates of the mice, and attenuated LPS-induced pathological changes of the liver tissues significantly. The plasma level of TNF- α was markedly lower in glycine group than that in LPS group (708.83 ± 51.29 ng/L vs 1852.8 ± 126.64 ng/L, $F = 786.21$, $P < 0.05$) at 3 h, while the level of IL-10 was significantly higher at 12 h (418.64 ± 38.86 ng/L vs 211.15 ± 26.44 ng/L, $P < 0.05$). The expression of TNF- α and TLR4 were notably decreased in glycine group in comparison with those in LPS group (A value: 1.59 ± 0.14 vs 0.91 ± 0.11 , $P < 0.05$; 0.97 ± 0.12 vs 0.53 ± 0.11 , $P < 0.05$), but the expression of IL-10 was remarkably increased (A value: 0.62 ± 0.08 vs 1.06 ± 0.15 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Glycine pretreatment can attenuate LPS-induced liver injury, which may be associated with the down-regulation of TLR4 expression and up-regulation of IL-10 production.

Key Words: Glycine; Lipopolysaccharide; Toll like receptor 4; Liver injury

Wang Q, Zhang T, Chen YH, Yu HB, You HB. Protection mechanisms of glycine against liver injury induced by lipopolysaccharide. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1561-1565

摘要

目的: 探讨甘氨酸(Gly)对内毒素(LPS)性肝损害的保护机制。

方法: BALB/c小鼠随机分为三组, LPS组($n = 50$)经腹腔注射10 mg/kg的LPS, Gly组($n = 50$)注射相同剂量LPS前3 d开始喂饲含50 g/L的Gly的饲料, 正常生理盐水对照组($n = 50$), 经腹腔注射等体积的生理盐水, 光镜观察组织病理学改变, 免疫组织化学法检测TLR4表达水平; ELISA法检测血浆TNF- α , IL-10浓度及RT-PCR检测肝组织中TNF- α , IL-10及TLR4的mRNA表达水平。

结果: Gly能明显提高小鼠存活率, 肝脏病理损

■背景资料

内毒素血症至今仍是临床治疗中的难点, 现行的抗感染治疗方案中, 主要原则是及早全身使用抗生素, 但其直接后果却是在迅速杀死细菌的同时导致短时间内大量的内毒素释放入血, 可能加重患者的临床毒血症反应, 因此, 严重感染后脓毒性休克病死率至今仍高达70%以上。学者们一直在寻找较为理想的内毒素拮抗剂, 但多因拮抗效果差, 或本身的毒副作用大等而不能用于临床。

■研究前沿

大量研究新表明甘氨酸(glycine, Gly)对缺血-再灌注、缺氧等损害均显示出保护作用,是一种新发现的细胞保护剂。因此,本文拟通过建立内毒素性肝损害动物模型,观察Gly对肝脏的保护效应,探讨保护机制,并试图为内毒素性肝损害的临床治疗提供新的手段。因为Gly为机体的一种非必需氨基酸,其毒副作用小,可以进一步经临床试验验证后,用于临床内毒素血症的防治。

害程度减轻; Gly组TNF- α 水平显著低于LPS组, 差异有统计学意义(708.83 ± 51.29 ng/L vs 1852.8 ± 126.64 ng/L, $F = 786.21$, $P < 0.05$); Gly组IL-10增加且高峰前移, 与LPS组比较差异有统计学意义(418.64 ± 38.86 ng/L vs 211.15 ± 26.44 ng/L, $P < 0.05$); Gly组肝组织中TNF- α 及TLR4表达也明显减弱, IL-10表达明显增强, 与LPS组比较差异均有统计学意义(分别为TNF- α A值: 1.59 ± 0.14 vs 0.91 ± 0.11 ; TLR4 A值: 0.97 ± 0.12 vs 0.53 ± 0.11 ; IL-10 A值: 0.62 ± 0.08 vs 1.06 ± 0.15 ; P 均 < 0.05)。

结论: Gly能明显减轻LPS所致的肝损害, 其机制可能与其下调肝细胞的TLR4表达, 同时上调IL-10的水平有关。

关键词: 甘氨酸; 肝脏; 内毒素; Toll样受体4

王强, 张涛, 陈叶恒, 余和斌, 游海波. 甘氨酸对内毒素性肝损害保护作用的机制. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1561-1565
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1561.asp>

0 引言

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性细菌细胞壁上的主要成分, 主要通过与单核-巨噬细胞表面的跨膜受体Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)等相结合后, 引起肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等大量促炎症介质释放, 导致全身性炎症反应及多器官功能损害^[1-3]。由于全身80%-90%的单核-巨噬细胞为位于肝血窦内库普弗细胞, 因此在内毒素血症时库普弗细胞及肝脏成为内毒素的主要靶细胞和器官^[4-5]。甘氨酸(glycine, Gly)能明显减轻内毒素性休克大鼠模型肝细胞坏死^[6], 但其作用机制尚未明确。本实验拟通过观察Gly预处理对LPS攻击小鼠肝脏的LPS受体TLR4及其下游细胞因子表达的影响, 探讨LPS对肝损害的机制及Gly减轻其肝损害的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀清洁级健康Balb/c小鼠, 体质量 18 ± 2 g, 10-12周龄(重庆医科大学动物实验中心); LPS、甘氨酸(Sigma); 大鼠抗小鼠TLR4IgG (Santa Cruze); AMV逆转录酶(TaKaRa); 小鼠TNF- α 、IL-10 ELISA试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司); 两步法RT-PCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 凝胶成像分析系统(Bio-Rad Doc Gel 2000); 电泳仪(300 V, Bio-Rad); 全自动生化分析仪(BECKMAN CX7); 低温高速离

心机(Mikro 22 R)。

1.2 方法 (1)BALB/c小鼠150只, 随机分为3组($n = 50$)。内毒素组(LPS组), 禁食12 h后, 经腹腔注射10 mg/kg的LPS, 建立内毒素血症肝损害动物模型; 甘氨酸组(Gly组), 腹腔注入相同剂量的LPS前3 d, 喂饲含50 g/kg的Gly饲料; 正常生理盐水对照组($n = 50$), 经腹腔注射等体积的生理盐水, 每组各取20只小鼠, LPS处理后观察5 d, 记录存活率; 剩余动物于注射LPS溶液后0, 1, 3, 6, 12 h各时相点活杀取材(每组每时点各6只)。(2)光镜检查: 取左肝外叶组织, 常规石蜡包埋、HE染色。(3)免疫组织化学染色: 取左肝外叶组织, 采用SABC法, 按试剂盒说明书检测TLR4蛋白的表达。(4)血浆ALT浓度测定: 抽取肝下腔静脉血液3 mL, 用全自动血液分析仪直接测定ALT。(5)血浆中TNF- α 、IL-10含量测定: 采用ELISA法, 按相应的试剂盒说明书进行。(6)肝组织TNF- α 、IL-10、TLR4 mRNA表达水平检测: 采用RT-PCR法。PCR引物由上海鼎安生物科技有限公司设计并合成, TLR4, 上游引物5'-CAAGGCATGGCATGGCTTAC-3', 下游引物3'-GGTAGCCAACCTAGAACCTC-5', 扩增产物500 bp; TNF- α , 上游引物5'-TCTACTGAACTTCGGGTGA-3', 下游引物3'-CTCAGGCCCGTCCAGA TGA-5', 扩增产物542 bp; IL-10, 上游引物5'-CCAAGCTTATCGGAAATG-3', 下游引物3'-CACTTGTA AATCTTTCTTCGGG-5', 扩增产物500503 bp; 内参照 β -actin, 上游引物5'-CATTGTGATGGAC TCCGGAG-3', 下游引物3'-CTGCCGGTCCAGTAGTGATA-5', 扩增产物300 bp; 扩增产物电泳结果采用Doc Gel 2000凝胶图像分析系统成像, 并以Bio-Image Analysis System进行半定量分析, 结果以相对吸光度值 $A \times \text{面积}(\text{mm}^2)$ 表示。

统计学处理 采用SPSS 10.0软件进行, 组间均数的两两比较用 t 检验, 组内均数的两两比较用 q 检验, 组间率的比较用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 对LPS攻击小鼠存活率的影响 观察期内, LPS组和Gly组小鼠24, 48, 72, 120 h的存活率分别为50.0%, 40.0%, 30.0%, 30.0%和90.0%, 80.0%, 70.0%, 70.0%, 两者比较差异显著($P < 0.05$)。

2.2 肝组织病理形态学的改变 光镜结果显示:

表 1 预处理对血浆ALT的影响 (mean ± SD) (nkat/L) (*n* = 6)

组别	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
NS	811.83 ± 52.52	840.17 ± 85.26	829.99 ± 46.03	820.16 ± 60.13	841.68 ± 63.25	831.66 ± 48.87
LPS	824.68 ± 51.41	5159.37 ± 259.74 ^a	6439.62 ± 449.15 ^a	7636.53 ± 325.21 ^a	8595.49 ± 530.40 ^a	10113.52 ± 590.36 ^a
LPS+Gly	799.93 ± 582.63	1928.85 ± 218.87 ^b	2895.58 ± 375.10 ^b	3252.32 ± 399.01 ^b	3699.05 ± 512.18 ^b	4837.99 ± 478.26 ^b

^a*P* < 0.05 vs NS or 0 point; ^b*P* < 0.05 vs LPS or 0 point.表 2 Gly预处理对血浆TNF-α的影响 (mean ± SD) (ng/L) (*n* = 6)

组别	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
NS	62.86 ± 7.37	63.68 ± 8.68	68.29 ± 6.60	66.75 ± 6.32	60.57 ± 4.98	65.48 ± 7.34
LPS	62.06 ± 6.94	365.58 ± 23.83 ^a	1852.8 ± 126.64 ^a	1237.28 ± 87.26 ^a	602.70 ± 60.99 ^a	241.89 ± 35.95 ^a
LPS+Gly	63.02 ± 6.63	295.91 ± 29.19 ^b	708.83 ± 51.29 ^b	532.33 ± 41.91 ^b	239.7 ± 23.72 ^b	178.88 ± 21.84 ^b

^a*P* < 0.05 vs NS or 0 point; ^b*P* < 0.05 vs LPS or 0 point.表 3 Gly预处理对血浆IL-10的影响 (mean ± SD) (ng/L) (*n* = 6)

组别	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
NS	22.15 ± 4.43	24.81 ± 4.41	23.78 ± 4.26	22.64 ± 4.21	24.85 ± 4.03	25.08 ± 4.36
LPS	24.37 ± 4.46	28.79 ± 5.41	42.96 ± 6.12 ^a	109.79 ± 14.46 ^a	211.15 ± 26.44 ^a	344.09 ± 31.70 ^a
LPS+Gly	25.25 ± 4.42	46.34 ± 6.95 ^b	74.62 ± 13.10 ^b	208.12 ± 21.31 ^b	418.64 ± 38.86 ^b	354.49 ± 23.98 ^a

^a*P* < 0.05 vs NS or 0 point; ^b*P* < 0.05 vs LPS or 0 point.

LPS组3 h时, 肝细胞出现肿胀、空泡样变性、汇管区有炎性细胞浸润, 随着时间的延长, 上述损害加重, 12 h时除上述损害外可见中央静脉内有血栓形成, 24 h时可见点片状、大片状甚至肝窦结构被破坏; Gly组, 形态学上肝细胞肿胀、空泡样变性明显减轻, 汇管区炎性细胞浸润减少, 整个观察时间内仅见点片状坏死, 未见大片状及肝窦结构的破坏。

2.3 肝组织TLR4蛋白表达的改变(图1) 免疫组化结果显示: LPS组3 h时肝细胞、血管内皮细胞内可见大量棕黄色颗粒, 且主要分布于肝血窦周围。Gly组3 h时阳性反应细胞也主要分布于肝血窦周围, 但比LPS组数目少且染色程度轻。

2.4 ALT的变化 Gly组相同时相点的ALT含量明显低于LPS组, 差异有统计学意义($F = 558.63$, $P < 0.05$)(表1)。

2.5 血浆TNF-α, IL-10含量的变化 Gly组TNF-α的水平, 明显低于同时点的LPS组, 差异有统计学意义($F = 786.21$, $P < 0.05$)(表2)。Gly预处理组血浆IL-10含量在LPS刺激1 h后即开始明显增加, 且高峰提前至12 h, 和同时点的LPS组, 差异

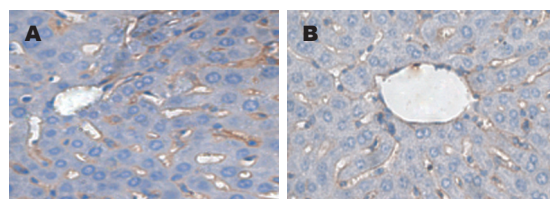


图 1 小鼠肝组织TLR4表达。A: LPS组, SABC × 200; B: Gly组, SABC × 200。

有统计学意义($F = 311.12$, $P < 0.05$)(表3)。

2.6 肝组织TNF-α, IL-10, TLR4 mRNA表达的影响(图2-4) RT-PCR结果显示: Gly预处理TLR4、TNF-α mRNA水平明显低于同时点的LPS组, 差异具显著性($P < 0.05$); IL-10 mRNA水平明显高于同时点的LPS组, 差异具显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

内毒素血症至今仍是临床治疗中的难点, 现行的抗感染治疗方案中, 主要原则是及早全身使用抗生素, 但其直接后果却是在迅速杀死细菌的同时导致短时间内大量的LPS释放入血, 可能加重患者的临床毒血症反应, 因此, 严重感染后

■创新盘点

Gly为机体的一种非必需氨基酸, 其毒副作用小, 进一步经临床试验验证后, 可以用于临床内毒素血症的防治, 其机制可能与其下调肝脏各种细胞的TLR4表达, 同时上调抗炎因子IL-10的水平有关。

■同行评价

本文从LPS信号转导角度, 研究发现Gly作用后, 通过下调肝脏细胞中TLR4的表达, 抑制LPS与TLR4的结合, 发挥LPS受体类似拮抗剂的作用, 最终通过抑制TNF- α 表达, 而明显减轻了内毒素的损伤效应. 研究具有一定的探索性和创新性.

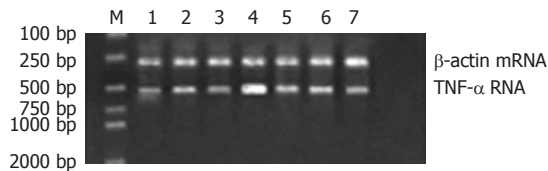


图2 RT-PCR检测Gly预处理对TNF- α mRNA表达的影响. M: 分子量标准; 1: 0 h对照组; 2, 4, 6: LPS组1, 3, 6 h; 3, 5, 7: Gly组.

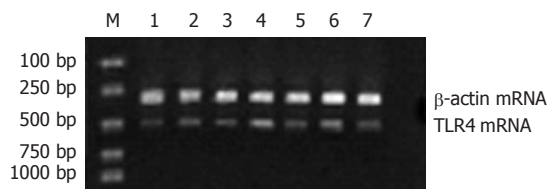


图3 RT-PCR检测Gly预处理对TLR4 mRNA表达的影响. M: 分子量标准; 1: 0 h对照组; 2, 4, 6: LPS组1, 3, 6 h; 3, 5, 7: Gly组.

脓毒性休克病死率至今仍高达70%^[7-8]. 学者们一直在寻找较为理想的LPS拮抗剂, 但多因拮抗效果差或不良反应大等而不能用于临床^[9]. 因此, 我们拟通过建立内毒素性肝损伤动物模型, 观察Gly对肝脏的保护效应, 并探讨保护机制, 试图为内毒素性肝损伤的临床治疗提供新的手段.

LPS活化细胞是通过一系列信号转导事件实现的^[10-13]. TLR4是负责LPS信号跨膜转导的主要LPS受体, 也是LPS向细胞内传递信号的必经门户. 研究表明C3H/HeJ小鼠TLR4基因q³²⁻³³处的点突变, 导致其编码的蛋白质多肽第712位的脯氨酸被组氨酸取代, 或C57BL/10ScCr小鼠系的TLR4基因的完全缺乏, 从而改变了TLR4的信号转导功能, 均导致两者对LPS的高度耐受, 因此TLR4被认为是LPS信号传递的关键蛋白^[14-15].

动物实验表明, 随时间推移, 两组小鼠肝脏病变、血浆ALT的含量均进行性加重(增高), 但由于Gly组的TNF- α 浓度明显低于LPS组, 因此, 其肝损害程度及死亡率也明显低于后者. TLR4免疫组织化学染色显示, 在肝细胞、窦内皮细胞、库普弗细胞可见棕黄色颗粒, 这提示肝细胞、窦内皮细胞同库普弗细胞一样, 也存在TLR4, 由于阳性颗粒主要分布于肝血窦周围, 说明TLR4主要在库普弗细胞中表达, 这与Ogushi *et al*^[16]的研究结果一致. 肝组织TLR4 mRNA的表达变化趋势与TNF- α mRNA、血浆TNF- α 水平一致, 这提示血浆TNF- α 水平与肝脏细胞TLR4 mRNA表达有关. 故我们认为LPS致肝损害的主要机制为: 由于肝脏细胞受到LPS信号刺激后, 其膜上的LPS识别受体TLR4表达迅速增

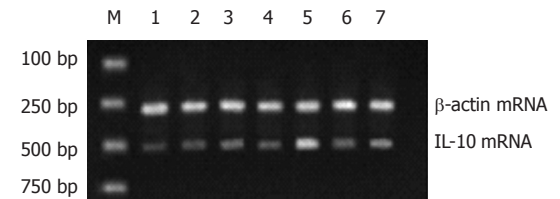


图4 RT-PCR检测Gly预处理对IL-10 mRNA表达的影响. M: 分子量标准; 1: 0 h对照组; 2, 4, 6: LPS组6, 12, 24 h; 3, 5, 7: Gly组.

强, 通过上述机制造成肝脏损害. 由于TLR4阳性反应细胞主要为库普弗细胞, 全身80%-90%的单核-巨噬细胞为位于肝血窦内的库普弗细胞, 其过度激活所产生的大量炎性介质, 必将造成肝损害. 因而在内毒素致肝损害中, 库普弗细胞的过度激活在其中起着比肝细胞、窦内皮细胞更为重要的作用. 因此, 目前针对TLR为靶点的药物研究也正成为一个热点, 并有可能为提高脓毒性休克及其他感染性疾病的疗效带来希望. 以上的研究结果提示我们, 通过干预、调节、抑制TLR4的表达可望成为一种治疗脓毒症新的手段.

Gly作为机体的一种非必需氨基酸, 可以在细胞、器官、整体水平发挥机体的保护作用; 将其应用于酒精、药物性(环孢霉素A、D-Gal)肝损害、肝脏/缺血再灌注模型以及肝移植模型等, 均显示出良好的保护作用^[17-21], 但其作用机制仍不十分清楚. 孙葳 *et al*^[22]研究认为Gly可能是通过带正电荷的NH₄⁺与血浆中LPS脂质A上带负电荷的PO₄³⁻结合, 破坏了LPS的结构, 并在一定程度上干扰了巨噬细胞的结合. 也有研究认为库普弗细胞膜上存在Gly受体, Gly通过与其受体结合后, 大量氯离子内流使细胞膜超级化, 钙离子内流减少, 使钙依赖的激酶不能被激活, 从而下调TNF- α 水平, 使其后续事件不能发生^[23-26]. 动物实验表明Gly的这种保护作用似与其独特的分子构型有关, 原因如下: (1)动物实验表明Gly能增加肝组织IL-10的表达, IL-10是体内天然存在的抑制炎症, 维持细胞因子网络平衡的小分子. 通过抑制单核-巨噬细胞主要组织相容性复合物II类抗原的表达, 既抑制Th-1细胞和单核细胞活化而减少炎性介质TNF- α 等的生成, 又对LPS诱导的一氧化氮、氧自由基、血小板活化因子的休克介质有下调作用^[27-30]. (2)Gly作用后, 通过某种受体, 下调肝脏各种细胞中(特别是库普弗细胞)TLR4的表达, 抑制LPS与TLR4的结合, 发挥LPS受体类似拮抗剂的作用, 最终通过抑制TNF- α 表达和产生, 从而明显减轻了内

毒素的损伤效应。

4 参考文献

- Giamarellos-Bourboulis EJ, Baziaka F, Antonopoulou A, Koutoukas P, Kousoulas V, Sabracos L, Panagou C, Perrea D, Giamarellou H. Clarithromycin co-administered with amikacin attenuates systemic inflammation in experimental sepsis with *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 168-172
- Volman TJ, Goris RJ, van der Meer JW, Hendriks T. Tissue- and time-dependent upregulation of cytokine mRNA in a murine model for the multiple organ dysfunction syndrome. *Ann Surg* 2004; 240: 142-150
- Fukui M, Imamura R, Umemura M, Kawabe T, Suda T. Pathogen-associated molecular patterns sensitize macrophages to Fas ligand-induced apoptosis and IL-1 beta release. *J Immunol* 2003; 171: 1868-1874
- Liu S, Gallo DJ, Green AM, Williams DL, Gong X, Shapiro RA, Gambotto AA, Humphris EL, Vodovotz Y, Billiar TR. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2002; 70: 3433-3442
- Monshouwer M, Hoebe KH. Hepatic (dys-)function during inflammation. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 681-686
- Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters JJ. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 229-240
- Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Van den Berghe G. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care* 2002; 6 Suppl 3: S1-18
- Moynagh PN. Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. *J Endocrinol* 2003; 179: 139-144
- Yang S, Koo DJ, Chaudry IH, Wang P. Glycine attenuates hepatocellular depression during early sepsis and reduces sepsis-induced mortality. *Crit Care Med* 2001; 29: 1201-1206
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 2004; 40: 861-868
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
- Brown V, Brown RA, Ozinsky A, Hesselberth JR, Fields S. Binding specificity of Toll-like receptor cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 2006; 36: 742-753
- Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 59-72
- Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000; 165: 6682-6686
- Ogushi I, Iimuro Y, Seki E, Son G, Hirano T, Hada T, Tsutsui H, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y, Fujimoto J. Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model. *Hepatology* 2003; 38: 335-344
- Zhang SJ, Shi JH, Tang Z, Wu Y, Chen S. Protective effects of glycine pretreatment on brain-death donor liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 37-40
- Peng Y, Gong JP, Liu CA, Li SW, Gan L, Li SB. The effect of glycine on CD14 and NF-kappa B in Kupffer cells from rat liver grafts after ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2005; 13: 179-182
- Bruck R, Wardi J, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Avinoach I, Shahmurov M, Hershkovich R. Glycine modulates cytokine secretion, inhibits hepatic damage and improves survival in a model of endotoxemia in mice. *Liver Int* 2003; 23: 276-282
- Yamashina S, Ikejima K, Enomoto N, Takei Y, Sato N. Glycine as a therapeutic immuno-nutrient for alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1625-1655
- Matilla B, Mauriz JL, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Gonzalez P. Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient. *Nutr Hosp* 2002; 17: 2-9
- 孙藏, 陆大祥, 丁勇, 李楚杰. 不同pH及封闭氨基端对甘氨酸拮抗内毒素作用的影响. *中国病理生理杂志* 1999; 15: 110-112
- Liu ZJ, You HB, Li XH, Chen XF, Liu HZ, Peng Y, Liu CA, Gong JP. The mechanism and treatment phases chosen of glycine for inhibition lipopolysaccharide induced Kupffer cells activation. *Zhonghua Waike Zazhi* 2006; 44: 189-192
- Qu W, Ikejima K, Zhong Z, Waalkes MP, Thurman RG. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1249-1256
- Froh M, Thurman RG, Wheeler MD. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G856-863
- Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, Ikejima K, Morrow AL, Thurman RG. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J* 2000; 14: 476-484
- Bruck R, Wardi J, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Avinoach I, Shahmurov M, Hershkovich R. Glycine modulates cytokine secretion, inhibits hepatic damage and improves survival in a model of endotoxemia in mice. *Liver Int* 2003; 23: 276-282
- Murphey ED, Traber DL. Protective effect of tumor necrosis factor-alpha against subsequent endotoxemia in mice is mediated, in part, by interleukin-10. *Crit Care Med* 2001; 29: 1761-1766
- Kotake Y, Moore DR, Vasquez-Walden A, Tabatabaie T, Sang H. Antioxidant amplifies antibiotic protection in the cecal ligation and puncture model of microbial sepsis through interleukin-10 production. *Shock* 2003; 19: 252-256
- Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, Malur A, Drazba J, Kavuru MS, Thomassen MJ. Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine* 2000; 12: 1348-1355

电编 张敏 编辑 潘伯荣

趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路在结直肠癌肝转移中的作用

马向涛, 余力伟, 张在兴, 王 杉, 杜如昱, 崔志荣

■背景资料

趋化因子CXCR4/CXCL12与肺癌、鼻咽癌及乳腺癌等多种肿瘤的远处转移密切相关, 但是关于CXCR4/CXCL12在结直肠癌肝转移过程中的作用还有待进一步研究。

马向涛, 余力伟, 张在兴, 北京市海淀区医院外科 北京市 100080

王杉, 杜如昱, 崔志荣, 北京大学人民医院外科, 外科肿瘤研究室 北京市 100044

马向涛, 2002年北京大学医学博士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的分子生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271269

通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京市海淀区医院外科, xiangtao_ma@pku.org.cn

电话: 010-82619999-1887 传真: 010-62653601

收稿日期: 2006-03-26 接受日期: 2006-04-16

Role of chemokine receptor CXCR4/CXCL12 signaling pathway in hepatic metastasis of colorectal carcinoma

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

Xiang-Tao Ma, Li-Wei Yu, Zai-Xing Zhang, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, Beijing 10080, China
Shan Wang, Ru-Yu Du, Zhi-Rong Cui, Department of Surgery and Division of Surgical Oncology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271269

Correspondence to: Dr. Xiang-Tao Ma, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, 29 Zhongguancun Street, Beijing 100080, China. xiangtao_ma@pku.org.cn

Received: 2006-03-26 Accepted: 2006-04-16

Abstract

AIM: To investigate the potential role of chemokine receptor CXCR4/CXCL12 signal transduction pathway in hepatic metastasis of colorectal carcinoma.

METHODS: CXCR4 and CXCL12 expression were detected in tissue samples from 60 patients with colorectal carcinoma representing various clinicopathological parameters by Western blot analysis.

RESULTS: The levels of CXCR4 and CXCL12 proteins expression were increased significantly in colorectal cancer as compared with those in the adjacent normal mucosa ($P < 0.05$). In the 10 patients with lymph node metastasis, the expres-

sion of CXCR4 and CXCL12 were also markedly higher than those in those without metastasis (CXCR4: 3.9 ± 0.5 vs 2.2 ± 0.3 , $P < 0.05$; CXCL12: 3.6 ± 0.5 vs 2.4 ± 0.3 , $P < 0.05$). The over-expression of CXCR4 and CXCL12 proteins were correlated with TNM staging, and they were highly elevated in colorectal cancer at III and IV stages as compared with those at I and II stages (CXCR4: 3.4 ± 0.6 vs 1.8 ± 0.3 , $P < 0.05$; CXCL12: 3.6 ± 0.5 vs 1.8 ± 0.4 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Over-expression of CXCR4/CXCL12 plays an important role in the hepatic metastasis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal neoplasm; Signal transduction; Chemokine; Metastasis

Ma XT, Yu LW, Zhang ZX, Wang S, Du RY, Cui ZR. Role of chemokine receptor CXCR4/CXCL12 signaling pathway in hepatic metastasis of colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1566-1570

摘要

目的: 探讨CXCR4/CXCL12在结直肠癌肝转移中的作用。

方法: 应用Western blot检测60例结直肠癌患者标本中肿瘤组织、邻近正常黏膜以及肝转移组织中CXCR4/CXCL12通路成员的表达情况, 免疫组织化学法检测CXCR4/CXCL12在细胞水平的分布。

结果: 与正常组织相比, 结直肠癌组织中CXCR4/CXCL12表达水平明显增高($P < 0.05$); 与原发肿瘤相比, 10例肝转移组织中CXCR4/CXCL12表达增高(CXCR4: 3.9 ± 0.5 vs 2.2 ± 0.3 , $P < 0.05$; CXCL12: 3.6 ± 0.5 vs 2.4 ± 0.3 , $P < 0.05$); TNM III、IV分期CXCR4/CXCL12表达水平比I、II分期显著增加有关(CXCR4: 3.4 ± 0.6 vs 1.8 ± 0.3 , $P < 0.05$; CXCL12: 3.6 ± 0.5 vs 1.8 ± 0.4 , $P < 0.05$)。

结论: 趋化因子受体CXCR4/CXCL12在原发

结直肠癌与肝转移组织中呈高表达, CXCR4/CXCL12信号转导通路可能在结直肠癌肝转移过程中起一定作用。

关键词: 结直肠癌; 信号转导; 趋化因子; 转移

马向涛, 余力伟, 张在兴, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. 趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路在结直肠癌肝转移中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1566-1570
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1566.asp>

0 引言

结直肠癌是消化道常见恶性肿瘤, 自1970年代其发病率在我国城市地区迅速升高. 尽管在结直肠癌综合治疗方面取得了许多进展, 但是5 a生存率仍然徘徊在50%-60%左右, 40%-50%的患者会在5 a内发生肝转移^[1-3]. 结直肠癌的远处转移主要通过血管与淋巴管的机械运输作用, 但是越来越多的证据表明趋化因子参与了肿瘤的远处转移^[4-6]. 我们检测60例结直肠癌标本中趋化因子受体CXCR4/CXCL12的表达, 提示CXCR4/CXCL12信号转导通路成员高表达可能在结直肠癌肝转移中起到一定作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Western blot中用的PVDF膜购自Millipore公司, 显影用的胶片购自柯达公司. 所有抗体购自Santa Cruz公司. 预染标准分子质量蛋白购自GIBCO/BRL公司. ECL化学发光试剂盒购自Amersham公司. 浓缩蛋白分析液购自Bio-Rad公司. 其他试剂均为分子生物学纯度购自Sigma公司. 北京市海淀医院外科2003-12/2005-12经手术切除的结直肠癌标本60例, 于手术切除肿瘤后15-20 min内采集结直肠癌组织、邻近正常肠黏膜组织以及同期手术切除的肝转移组织, 立即置于液氮中保存. 患者在手术前未接收化疗或者放疗并且签署知情同意书. 临床病理资料完整(表1). 肿瘤分期按照国际抗癌联盟(UICC)的TNM分期。

1.2 方法 组织于裂解缓冲液中裂解(150 mmol/L NaCl; 10 g/L过氧胆酸钠; 10 g/L Triniton X-100; 1 g/L十二烷基磺酸钠; 10 mmol/L Tris, pH 7.2; 1 mmol/L正钒酸钠; 1 mmol/L苯甲磺酰氟; 1 mmol/L氟化钠; 0.1 mmol/L抑肽酶, 1 mmol/L亮抑蛋白酶肽). 裂解液在4℃条件下13 000 r/min离心30 min. 蛋白浓度测定Bradford法: 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品, 根据蛋白定量试剂

表 1 60例结直肠癌患者临床病理特征

临床病理特征		n (%)
性别	男	32 (53.3)
	女	28 (46.7)
年龄 (岁)	范围	27-81
	平均	60.5
	中位	65.0
原发部位	结肠	31 (51.7)
	直肠	29 (48.3)
TNM分期	I	3 (5.0)
	II	28 (46.7)
	III	19 (31.7)
	IV	10 (16.7)
浸润深度与淋巴结转移	T1-T2 N0	6 (10.0)
	T3-T4 N0	25 (41.7)
	T1-T2 N1-2N2	17 (28.3)
	T3-T4 N1-N2	12 (20.0)
远处转移	M0	50 (83.3)
	M1	10 (16.7)
组织学分化	G1	16 (26.7)
	G2	30 (50.0)
	G3	14 (23.3)
肿瘤大小	>5 cm	25 (41.7)
	≤5 cm	35 (58.3)

G1: 高分化肿瘤; G2: 中分化肿瘤; G3: 低分化肿瘤; M0: 无远处转移; M1: 有远处转移。

盒(美国Bio-Rad公司)说明绘制蛋白定量标准曲线, 用分光光度计595 nm下测光密度值, 计算提取液蛋白浓度。

1.2.1 Western blot 将蛋白提取物与2×十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液按1:1混合(125 mmol/L Tris·HCl, pH 6.8; 40 g/L十二烷基磺酸钠; 200 mL/L甘油; 100 g/L 2-巯基乙醇)后100℃水浴下加热5 min. 取总蛋白50 μg, 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到PVDF膜上. 电泳时在聚丙烯酰胺凝胶中加入预染标准分子质量蛋白作为指示. 转膜后用TBST缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 150 mmol/L氯化钠, 5 g/L Tween-20)与50 g/L牛血清白蛋白封闭30 min. 封闭后, 加入一抗CXCR4与CXCL12, 工作浓度1:1000, GAPDH作为内参照, 于4℃条件下孵育过夜, 用TBST(每次5 min)洗膜后, 与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育30 min, 工作浓度1:1000. 然后用ECL化学发光试剂盒检测杂交信号. 用PhosphoImager图像分析仪(美国Molecular Dynamics公司)测定条带的吸光度(A值), 以A值代表蛋白的相对表达量。

■ 研发前沿

趋化因子受体影响肿瘤细胞的转移机制是近期研究的重点。

■创新盘点

本文研究的CXCR4/CXCL12通路在肿瘤远处转移中的作用机制是目前研究发展的趋势。

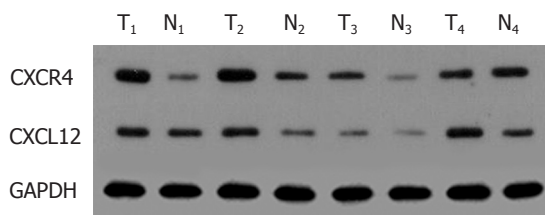


图1 结直肠癌组织CXCR4与配体CXCL12的表达(Western blot). T: 结直肠癌组织; N: 正常肠黏膜组织.

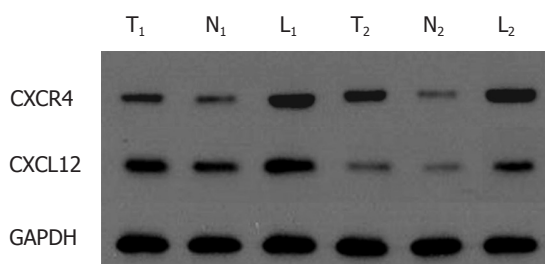


图2 结直肠癌组织与肝转移组织中CXCR4与配体CXCL12的表达(Western blot). T: 结直肠癌组织; N: 正常肠黏膜组织; L: 肝转移组织.

1.2.2 免疫组织化学法 组织标本经石蜡包埋后切成5 μm 厚, 附着于载玻片上, 空气中干燥, 然后烤箱中60 $^{\circ}\text{C}$ 加热2 h. 二甲苯中脱腊后经梯度乙醇水化, 用3 mL/L的过氧化氢-甲醇溶液抑制内源性过氧化物酶. 进行抗原修复: 切片在10 mM枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中加热10 min后, 用PBS(pH 7.4)缓冲液清洗并使切片冷却, 然后与5%的血清在湿盒内室温下孵育30 min阻断非特异结合位点. 切片分别与一抗(CXCR4抗体, 1:75稀释)、二抗(生物素标记IgG, 1:400稀释)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉素亲和素复合物(1:400稀释)孵育, DAB显色, 苏木素复染, 阴性对照用TBS替换一抗.

统计学处理 用SPSS 12.0软件完成. 采用 t 检验分析与Pearson相关性分析, $P<0.05$ 时表示差异有显著性.

2 结果

CXCR4与CXCL12在结直肠癌组织中表达明显升高($P<0.05$). CXCR4与CXCL12在肝转移组织中表达高于原发肿瘤(图1, 2). CXCR4与CXCL12表达与TNM分期有关($P<0.05$, 表2). CXCR4与CXCL12主要在胞质中表达, 结直肠癌肝转移组织中呈高表达(图3). 经Pearson相关性分析显示CXCR4与CXCL12在结直肠癌组织中表达情况呈线性相关($r = 0.523$, $P<0.05$).

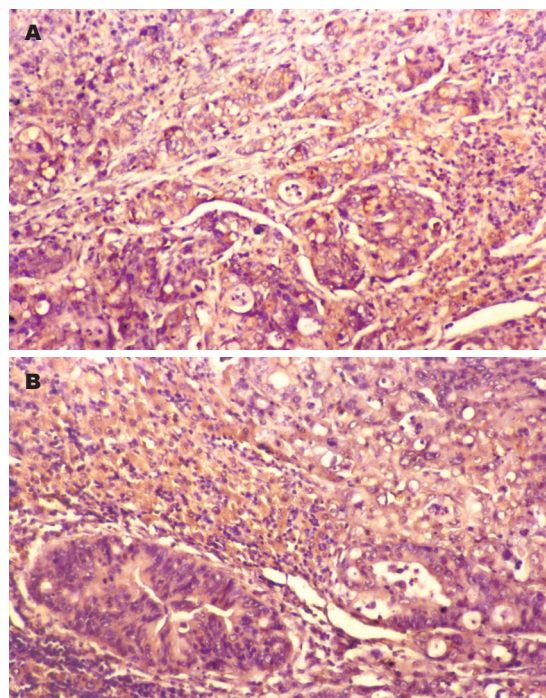


图3 结直肠癌肝转移组织中CXCR4与配体CXCL12的表达(SP $\times 100$). A: CXCR4; B: CXCL12.

表2 CXCR4/CXCL12与结直肠癌临床病理特征的关系(mean $\pm$ SD)

临床病理特征	<i>n</i>	CXCR4	CXCL12
性别			
男	32	2.9 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.4
女	28	2.6 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.3
年龄			
≥ 65	26	2.5 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.4
< 65	34	2.7 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.3
分期			
III + IV	29	3.4 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.5
I + II	31	1.8 $\pm$ 0.3 ^a	1.8 $\pm$ 0.4 ^a
分化			
好	16	2.6 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3
中	30	2.8 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.3
差	14	3.4 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.4
远处转移			
有	10	3.9 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.5
无	50	2.2 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.3
肿瘤大小			
≥ 5 cm	25	2.9 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.5
< 5 cm	35	2.4 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.3

^a $P<0.05$, I + II vs III + IV.

3 讨论

趋化因子(chemokines)是一类最早发现与免疫细胞具有控制细胞向炎症定向迁移的细胞因子^[7-9]. 趋化因子的功能由相应受体介导, 两者的相互作用控制着各种免疫细胞在循环系统与组织器官之间的定向迁移. 因此趋化因子与受体在调控免疫细胞分化、发育及定向迁移过程中起重

要作用^[4]。目前已经发现几十种趋化因子, 根据半胱氨酸残基位置不同, 趋化因子分为4个亚族: C、CC、CXC与CX3C, 相应的受体称为CR、CCR、CXCR与CX3CR^[10-12]。趋化因子与靶细胞表面G蛋白耦联受体结合通过信号转导激活PKC激酶、Ras与Rho家族成员, 在细胞生长、黏附及定向迁移中起重要作用。近年来研究显示, 趋化因子及其受体不仅表达于免疫细胞, 在某些肿瘤细胞也呈高表达, 并且与肿瘤转移密切相关^[13-15]。某些趋化因子不仅可以直接刺激肿瘤细胞生长, 还可以通过促进血管新生而间接促进肿瘤生长。趋化因子表达在不同肿瘤中差异很大, 因此其转移情况也不尽相同^[16-18]。

肿瘤细胞通过分泌IL-8、GCP-2、GRO-β、GRO-γ等趋化因子可以募集嗜中性白细胞激活蛋白激酶, 降解细胞外基质促进肿瘤细胞转移^[19-22]。研究表明CXCR4及其配体CXCL12与肿瘤转移关系密切, 部分乳腺癌细胞中CXCR4表达异常增高, 应用CXCR4抑制剂(合成14肽TN140)可以明显下调乳腺癌细胞中CXCR4表达, 从而抑制动物模型中乳腺癌转移发生^[23-25]。在严重联合免疫缺陷(SCID)的小鼠用抗CXCR4的单克隆抗体能有效地抑制人乳腺癌移植瘤(MDA-MB-231)的肺部转移, 提示趋化因子及受体同步高表达在决定乳腺癌器官特异性转移的部位上起着关键的作用。Kato *et al*^[26]对79例手术切除的乳腺浸润性导管癌组织进行的研究表明, 所有患者的癌组织均表达CXCR4, 其中高表达尤其是局灶性高表达者伴有广泛的淋巴结转移, 提示CXCR4可能在乳腺癌淋巴转移中起促进作用。使用CXCR4拮抗剂T140或通过RNA干扰技术抑制CXCR4基因均可抑制乳腺癌细胞在体外的迁移反应^[27-28]。而CXCR4/CXCL12通路与结直肠癌的发生以及远处转移的关系尚不清楚^[29-30]。我们发现CXCR4/CXCL12在结直肠癌组织中高表达, 分别为正常黏膜的2.72与2.61倍, 在同时具有原发肿瘤与肝转移标本的10例患者中, CXCR4在肝转移中的表达均高于原发肿瘤(10/10), 但是统计学未发现明显差异, 可能与标本例数少有关系。研究显示, 肝细胞中CXCR4特异性配体CXCL12表达升高, 而高表达CXCL12的肝细胞可能成为表达CXCR4的肿瘤细胞靶点。阻断CXCR4特异性配体CXCL12可以下调结肠癌细胞CT226表面CXCR4表达, 导致肿瘤细胞向肝、肺转移的数量显著减少或被完全阻断。

目前对于CXCR4信号转导通路在癌细胞转移的细胞生物学行为以及细胞内某些相关分子的改变取得了初步进展。CXCR4与其配体CXCL12结合后可引起肿瘤细胞内骨架蛋白的聚合与再分布, 随后调节细胞的运动和迁移。在结直肠癌中, 趋化因子受体CXCR4可能辅助肿瘤细胞远处转移至肝脏。CXCR4通路可能成为判断患者转移或者复发的重要指标, 这将有助于完善结直肠癌的分期系统, 并且有助于筛选结直肠癌治疗的靶基因^[31-32]。

4 参考文献

- 1 Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 465-474
- 2 Wei AC, Greig PD, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 668-676
- 3 Martin RC, Augenstein VA, Scoggins CR, McMasters KM. Quality of survival reporting in chemotherapy and surgery trials in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 1389-1394
- 4 Hu J, Deng X, Bian X, Li G, Tong Y, Li Y, Wang Q, Xin R, He X, Zhou G, Xie P, Li Y, Wang JM, Cao Y. The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4658-4665
- 5 Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96: 317-322
- 6 Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, Forster R. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 2005; 116: 726-733
- 7 Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol* 2005; 20: 907-926
- 8 Eccles SA. Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 77-86
- 9 Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 540-550
- 10 Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 181-185
- 11 Locati M, Bonecchi R, Corsi MM. Chemokines and their receptors: roles in specific clinical conditions and measurement in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 2005; 123 Suppl: S82-95
- 12 Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621
- 13 Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005; 23: 879-894

■应用要点

本文为研究肿瘤远处机制提供了新的研究靶点, 可通过阻断趋化因子CXCR4/CXCL12通路进一步了解肿瘤细胞转移相关特征的变化。

■同行评价

本文通过免疫印迹和免疫组化等方法检测了结直肠癌组织、正常黏膜以及肝转移灶中CXCR4/CXCL12的表达情况,并分析了他们和患者临床特征之间的关系,结果显示在结直肠癌和肝转移灶中CXCR4/CXCL12呈高表达,并与肿瘤的TNM分期有关。文章选题合适,结果明确,有一定的科学性,但新颖性一般。

- 14 Strieter RM, Belperio JA, Burdick MD, Sharma S, Dubinett SM, Keane MP. CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1028: 351-360
- 15 Arya M, Patel HR, McGurk C, Tatoud R, Klocker H, Masters J, Williamson M. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J Exp Ther Oncol* 2004; 4: 291-303
- 16 Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 768-778
- 17 Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1676-1686
- 18 Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. *Contrib Microbiol* 2006; 13: 191-199
- 19 Jodele S, Blavier L, Yoon JM, Declerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 35-43
- 20 Yan L, Anderson GM, DeWitte M, Nakada MT. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42: 793-802
- 21 Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, Aikou T. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 800-807
- 22 Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Goke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005; 310: 117-130
- 23 Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Ganju RK. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 157-167
- 24 Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, Otaka A, Fujii N. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett* 2003; 550: 79-83
- 25 Kang H, Mansel RE, Jiang WG. Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2005; 26: 1429-1434
- 26 Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R144-150
- 27 Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 967-971
- 28 Lee BC, Lee TH, Zagozdzon R, Avraham S, Usheva A, Avraham HK. Carboxyl-terminal Src kinase homologous kinase negatively regulates the chemokine receptor CXCR4 through YY1 and impairs CXCR4/CXCL12 (SDF-1 α)-mediated breast cancer cell migration. *Cancer Res* 2005; 65: 2840-2845
- 29 Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Goke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005; 310: 117-130
- 30 Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003; 63: 3833-3839
- 31 Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK. Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 263-275
- 32 Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2744-2753

电编 张敏 编辑 潘伯荣

细胞凋亡基因、肿瘤侵袭相关蛋白酶及血管内皮生长因子在胃癌分型中的表达和意义

刘易欣, 赵春歌, 赵秀兰, 潘彦珩

刘易欣, 赵春歌, 赵秀兰, 潘彦珩, 天津医科大学病理教研室
天津市 300070

刘易欣, 1986年毕业于天津医学院, 1990年北医大病理系进修, 1994-1995年在中科院生物膜与膜生物工程国家重点实验室从事客座研究, 从事荧光免疫病理学, 肿瘤及胃肠疾病的研究。

通讯作者: 潘彦珩, 300070, 天津市和平区气象台路22号, 天津医科大学病理教研室. panyanlu70@yahoo.com.cn

电话: 022-23542527

收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-05-24

Expression and significances of apoptosis gene, invasion-associated proteases and vascular epithelial growth factor in Lauren's classification of gastric carcinoma

Yi-Xin Liu, Chun-Ge Zhao, Xiu-Lan Zhao, Yan-Luo Pan

Yi-Xin Liu, Chun-Ge Zhao, Xiu-Lan Zhao, Yan-Luo Pan, Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Correspondence to: Yan-Luo Pan, Department of Pathology, Tianjin Medical University, 22 Qixiangtai Road, Heping District, Tianjin 300070, China. panyanlu70@yahoo.com.cn

Received: 2006-05-09 Accepted: 2006-05-24

Abstract

AIM: To explore distinctive biological behavior in the intestinal-type gastric carcinoma and diffuse-type gastric carcinoma, according to the expression of Bcl-2, Bax, Cath-D and vascular epithelial growth factor (VEGF).

METHODS: Immunohistochemistry SP method was performed to detect the expression of Bcl-2, Bax, Cath-D and VEGF in 36 cases of intestinal-type gastric carcinoma, 38 cases of diffuse-type gastric carcinoma, and their corresponding normal gastric tissues.

RESULTS: The expression of Bcl-2, Bax, Cath-D and VEGF were significantly higher in gastric carcinoma than those in the normal controls (44.59% vs 27.30%; 58.11% vs 71.62%; 77.00% vs 21.60%; 71.62% vs 14.86%; all $P < 0.05$). The posi-

tive expression of Bcl-2 and Cath-D were markedly higher in diffuse-type gastric carcinoma than those in intestinal-type one (29.14 ± 24.70 vs 19.80 ± 27.37 ; 52.59 ± 33.76 vs 29.21 ± 39.67 ; both $P < 0.05$), while the expression of Bax was notably lower in the former (32.56 ± 35.55 vs 47.74 ± 27.43 , $P < 0.05$). The positive rate of VEGF expression was closely correlated with the invasion depth (7.13 ± 15.81 , 62.77 ± 44.37 , and 40.82 ± 42.70 for mucosal or sub-mucosal invasion, muscular invasion, and serosa invasion, respectively) and lymph node metastasis (metastasis vs non-metastasis: 42.05 ± 42.61 vs 34.15 ± 42.52) of gastric carcinoma.

CONCLUSION: Bcl-2, Bax, Cath-D and VEGF are involved in the development and metastasis of gastric cancer. Due to the involvement of different genes, the intestinal-type or diffuse-type gastric carcinoma shows a distinctive biological behavior.

Key Words: Bcl; Bax; Cath-D; Vascular epithelium growth factor; Gastric carcinoma; Biological behavior; Lauren's classification

Liu YX, Zhao CG, Zhao XL, Pan YL. Expression and significances of apoptosis gene, invasion-associated proteases and vascular epithelial growth factor in Lauren's classification of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1571-1577

摘要

目的: 从“肿瘤异质化”角度出发, 通过多种基因编码蛋白(Bcl-2/Bax, Cath-D和VEGF)在肠型胃癌和弥漫型胃癌中的表达, 探讨二型胃癌不同生物学特性的分子学基础。

方法: 采用免疫组化SP法检测Bcl-2/Bax, cathepsin-D (Cath-D)和VEGF在胃癌及正常胃组织的表达。

结果: Bcl-2/Bax, Cath-D和VEGF阳性表达率在胃癌组织中与癌旁正常胃黏膜组织中比较 (分别为44.59% vs 27.30%; 58.11% vs 71.62%;

■背景资料

肠型胃癌和弥漫性胃癌同起源于胃小凹的干细胞, 但其形态学特征及生物学行为截然不同, 有关影响其演进及异质化的分子调控机制尚不清楚。

■研究前沿

肿瘤侵袭相关蛋白酶(Cath-D)是恶性肿瘤发生侵袭破坏及转移的重要物质基础,封闭阻遏该蛋白酶基因的表达式可望影响其生物学行为。

77.00% vs 21.60%; 71.62% vs 14.86%)均有显著性差异($P<0.05$),弥漫型胃癌中Bcl-2和Cath-D阳性细胞指数明显高于肠型胃癌(分别为 29.14 ± 24.70 vs 19.80 ± 27.37 和 52.59 ± 33.76 vs 29.21 ± 39.67),而Bax阳性细胞指数(分别为 32.56 ± 35.55 vs 47.74 ± 27.43)明显低于肠型胃癌,差异均有显著性($P<0.05$),VEGF阳性细胞表达指数在不同胃癌浸润深度组间比较(早期胃癌 7.13 ± 15.81 vs 肌层浸润 62.77 ± 44.37 vs 浆膜浸润 40.82 ± 42.70)及有无淋巴结转移组间比较(42.05 ± 42.61 vs 34.15 ± 42.52)有显著性差异($P<0.05$)。

结论: Bcl-2/Bax, Cath-D和VEGF分别参与了胃癌的发生,浸润进展和转移。二型胃癌在组织学发生相同的基础上由于在胃癌演进过程中有不同附加基因参与(Bcl-2/Bax和Cath-D),使弥漫型胃癌获得了与肠型胃癌有所不同的亚克隆过程,因而表现为生物学特性的异质化。

关键词: Bcl; Bax; Cath-D; 血管内皮生长因子; 胃癌; 生物行为; Lauren's分型

刘易欣, 赵春歌, 赵秀兰, 潘彦珩. 细胞凋亡基因、肿瘤侵袭相关蛋白酶及血管内皮生长因子在胃癌分型中的表达和意义. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1571-1577

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1571.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤,其死亡率居各种恶性肿瘤之首。1965年,Lauren *et al*^[1]通过对1344例胃癌进行组织学和组织化学研究后,将其分为肠型胃癌和弥漫型胃癌二型,并认为这两型胃癌无论从组织发生学、病理形态学还是生物学行为上都截然不同。肠型胃癌主要发生自胃腺颈部和胃小凹底部的干细胞,经过腺上皮细胞非典型增生、不完全大肠化生→原位癌→浸润性胃癌这样一个形态学连续谱系,而对弥漫型胃癌(主要是印戒细胞癌)的癌变谱系研究甚少。1997年潘彦珩 *et al*^[2]的研究证实,球样异型增生细胞是印戒细胞癌的癌前病变,该细胞也来自胃腺颈部的干细胞,开始于胃小凹底部,其实质也是一种不完全大肠化生的细胞。另外,我们近期研究结果也发现,在致癌背景下,二型胃癌均有幽门螺杆菌(*H pylori*)感染,并且*H pylori*感染率无显著差异,说明弥漫型胃癌的致癌背景、组织发生与肠型胃癌是一样的。那么这两型胃癌为什么在生物学行为上有如此大

的差别?近年来,随着细胞生物学和分子生物学在肿瘤发生学中的深入研究,认为“肿瘤的演进”这一生物学现象的出现与肿瘤的异质化有关。我们以此为切入点,运用免疫组织化学的方法,通过检测细胞凋亡基因蛋白(Bcl-2/Bax)、肿瘤侵袭相关蛋白酶(Cath-D)及血管内皮生长因子(VEGF)在二型胃癌中的表达情况,并对癌基因型和形态学表型进行对比分析,探讨胃癌细胞发生过程中细胞凋亡、侵袭能力、生长速度等方面形成的有所不同的亚克隆过程,并为临床针对不同组织学类型胃癌的分子靶向治疗寻找理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2002-01/2003-12天津医科大学总医院病理科首发胃癌手术切除标本共74例,每例均包括癌及癌旁正常胃组织,全部病例均经复读后确认。其中男55例,女19例,男女之比为2.89:1,平均年龄60.9(32-82)岁。按照Lauren's分型法:肠型胃癌36例(均为乳头状或高、中分化管状腺癌),弥漫型胃癌38例(均为印戒细胞癌)。术后病理证实:侵及黏膜及黏膜下层9例,侵及肌层10例,侵及浆膜及浆膜外55例;有淋巴结转移46例,无淋巴结转移28例。全部标本均经40 g/L福尔马林固定,石蜡包埋,作4 μ m厚连续切片,以备染色用。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 免疫组织化学检测上述各种基因编码蛋白的表达,所用一抗见表1。染色采用SP法,枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复10-15 min。全部抗体及SP试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 染色对照和结果判定 用已知阳性组织切片作阳性对照,以PBS替代一抗作阴性对照。免疫组化染色Bcl-2, Bax, Cath-D和VEGF阳性细胞着色呈棕黄色颗粒状。Bcl-2, Bax蛋白阳性物质定位于细胞质及胞核上; VEGF阳性物质定位于细胞膜和胞质;而Cath-D主要位于胞质内。每例标本切片依次从左至右随机计数,每个高倍视野($\times 400$)中每100个肿瘤细胞中的阳性细胞数。(每例>5个视野),然后取其均值作为该例细胞指数(%)。

统计学处理 用SPSS 12.0统计软件包分析。各种基因编码蛋白在正常胃和胃癌组织的表达结果比较用 χ^2 检验;各种基因编码蛋白表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及二型胃癌的关系,用

表 1 免疫组织化学染色一抗及应用条件

抗体	一抗属性	来源	克隆系	稀释度	预处理	阳性对照
Bcl-2	兔	Santa Cruz	单克隆	1 : 100	微波热修复10 min	扁桃体
Bax	鼠	Santa Cruz	单克隆	1 : 100	微波热修复10 min	乳腺癌
Cath-D	鼠	Santa Cruz	单克隆	1 : 100	微波热修复10 min	结肠癌
VEGF	鼠	Santa Cruz	单克隆	1 : 50	微波热修复15 min	结肠癌

■ 相关报道

Carcia *et al* 的研究表明Cathepsin-D过表达与乳腺癌的转移高度相关。

秩和检验。

2 结果

2.1 Bcl-2和Bax Bcl-2蛋白在癌旁正常胃黏膜中呈低表达, 阳性率仅为27.03%, 阳性细胞主要位于胃小凹底部的上皮细胞增生区, 染色强度弱呈淡黄色, 胃癌组织中阳性表达率为44.59%, 明显高于癌旁正常胃黏膜($P<0.05$, 表2), 染色强呈深棕色。Bax蛋白与其相反, 在癌旁正常胃黏膜中阳性表达率为71.62%, 胃癌组织中明显降低, 仅为58.11%, 与正常胃黏膜差异有显著性($P<0.05$, 表2)。

Bcl-2和Bax蛋白表达与胃癌分型有关。Bcl-2阳性细胞指数在弥漫型胃癌组为29.14%, 明显高于肠型胃癌组(19.80%), 二者差异有显著性($P<0.05$)。阳性物质着色在印戒细胞癌中普遍强于肠型胃癌, 呈深棕色。当癌细胞浸润至黏膜下层后出现细胞核内着色, 随着其在胃壁浸润加深, 细胞核内表达数量增多(图1A-B); Bax在弥漫型胃癌组中阳性表达指数为32.56%, 明显低于肠型胃癌组(47.74%, $P<0.05$, 表3)。

Bcl-2蛋白表达与胃癌浸润深度密切相关, 即癌细胞侵及肌层者明显低于黏膜及黏膜下层者, 同时也低于浆膜层者, 与淋巴结转移无关。Bax则与胃癌的浸润深度和有无淋巴结的转移均无关(表3)。

2.2 Cath-D Cath-D在癌旁正常胃黏膜组织呈广泛低浓度表达, 阳性表达率21.6%, 胃癌组织中表达呈强阳性, 阳性率77.0%, 二者差异有显著性($P<0.05$, 表2), 强阳性染色的癌细胞多位于癌组织浸润的前缘, 同时胃癌间质中的炎细胞、纤维细胞和某些血管内皮细胞中也有Cath-D表达。

Cath-D表达与胃癌Lauren's分型有关, 在弥漫型胃癌其阳性表达指数为52.5%, 明显高于肠型胃癌组(29.1%), 二者有显著性差异($P<0.05$), 而与癌细胞在胃壁中浸润的深度和有无淋巴结的转移之差异无显著性(表3)。

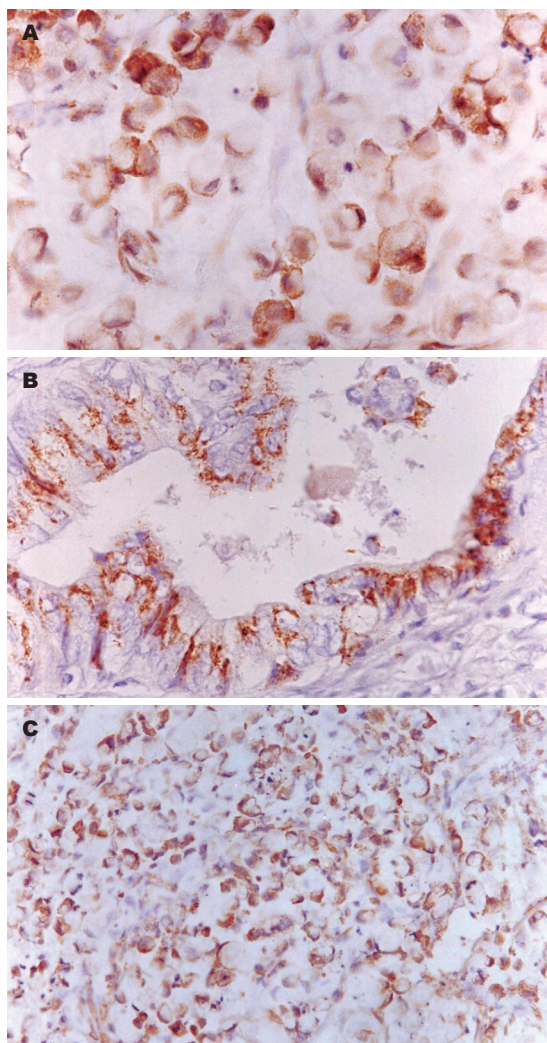


图 1 胃癌组织免疫组化染色。A: 弥漫型, Bcl-2, 胞核着色, $\times 400$; B: 肠型, Bax, 胞质着色, $\times 400$; C: 弥漫型, VEGF, 胞质胞膜, $\times 200$ 。

2.3 VEGF VEGF在癌旁正常胃黏膜组织的阳性表达率仅为14.86%, 阳性细胞着色呈弱阳性, 在胃癌组织中阳性率高达71.62%, 二者有显著差异(表2), 阳性细胞呈棕黄色(图1C)强阳性染色的癌细胞多位于浸润的前缘。

VEGF在肠型胃癌的表达指数为56.86%, 虽然比弥漫型胃癌高45.22%, 但是经秩和检验差异无显著性(表3)。VEGF表达与胃癌浸润深度和

■创新盘点

本文通过检测 Bcl-2/Bax, Cath-D 和 VEGF 在不同分型胃癌及癌旁组织中的表达情况, 探讨胃癌恶性转化过程中的一系列相关分子事件, 发现弥漫型胃癌 Cath-D 的阳性表达指数显著高于肠型胃癌。

表 2 各种基因编码蛋白在正常胃组织和胃癌组织的表达

组织	n	Bcl-2		Bax		Cath-D		VEGF	
		阳性例数	百分率 (%)	阳性例数	百分率 (%)	阳性例数	百分率 (%)	阳性例数	百分率 (%)
胃癌	74	33	44.59 ^a	43	58.11 ^a	57	77.00 ^b	53	71.62 ^b
正常胃黏膜	74	20	27.30	53	71.62	16	21.60	11	14.86

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常胃黏膜。

表 3 各种基因编码蛋白表达与胃癌临床病理参数关系

临床病理参数	n	Bcl-2		Bax		Cath-D		VEGF	
		阳性表达 指数 (%)	P 值	阳性表达 指数 (%)	P 值	阳性表达 指数 (%)	P 值	阳性表达 指数 (%)	P 值
组织学类型									
肠型	36	19.80 ± 27.37	0.031 ^a	47.74 ± 27.43	0.001 ^a	29.21 ± 39.67	0.013 ^a	28.96 ± 38.55	0.132
弥漫型	38	29.14 ± 24.70		32.56 ± 35.55		52.59 ± 33.76		50.24 ± 44.39	
浸润程度									
黏膜及其下层	9	21.12 ± 30.35	0.046	41.90 ± 36.95	0.829	40.51 ± 41.23	0.546	7.13 ± 15.81	0.016 ^a
肌层	10	8.77 ± 16.20		40.01 ± 32.67		53.94 ± 40.93		62.77 ± 44.37	
浆膜及外层	55	27.30 ± 26.40		39.64 ± 32.12		38.36 ± 37.76		40.82 ± 42.70	
淋巴结转移									
无	28	21.25 ± 28.26	0.339	41.96 ± 33.65	0.580	39.64 ± 41.89	0.645	34.15 ± 42.52	0.012 ^a
有	46	26.22 ± 25.25		38.31 ± 31.59		41.75 ± 36.39		42.05 ± 42.61	

淋巴结转移密切相关, 有淋巴结转移者或癌细胞在胃壁中深度浸润者, VEGF 的表达和染色强度明显升高, 与无淋巴结转移和在胃壁中浸润较浅者相比, 差异均有显著性 ($P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

3.1 Bcl-2和Bax蛋白在胃癌和Lauren's分型中的表达及其意义 胃癌的发生是一个多因素共同作用的复杂过程, 目前认为细胞的凋亡抑制作用在肿瘤的发生、发展过程中要比细胞过度增殖更为重要, 随着对细胞凋亡的深入研究, 发现 *bcl-2* 基因家族是在细胞凋亡信号传导途径中影响和调控细胞凋亡的一类非常关键的基因, 根据其在调控细胞凋亡中的不同作用, *bcl-2* 基因家族分为两大类, 即抗凋亡基因(包括 *bcl-2*, *bcl-x1*, *bcl-w* 等)和促凋亡基因(*bax*, *bak*, *bok* 等), 其中 *bcl-2* 和 *bax* 是 *bcl-2* 基因家族中最具代表性的一对作用相反凋亡基因。 *bcl-2* 与肿瘤细胞凋亡密切相关, 转染 *bcl-2* 能抑制许多因素诱导的多种肿瘤细胞的凋亡。 *bax* 基因编码产物 Bax 蛋白的氨基酸序列 45% 与 Bcl-2 蛋白同源。 体内 Bax 不仅自身可形成二聚体诱导细胞凋亡^[3], 21 kDa 的 Bax 蛋白还能与 Bcl-2, Bcl-x1 形成异源二聚体,

阻止细胞凋亡的发生, 是细胞凋亡调控中非常重要的环节。

文献[7]报道, 正常组织中 Bcl-2 分布比较局限, 主要见于早期胚胎组织、成熟淋巴细胞、增生活跃的上皮细胞等部位。 本研究发现正常胃黏膜 Bcl-2 仅在胃小凹底部的上皮细胞增殖区有少量阳性物质沉积, 此处阳性表达对抑制干细胞凋亡, 维持干细胞增殖能力并使其分化成熟, 维持正常胃黏膜上皮细胞群凋亡与增生的平衡均有重要生理意义。 Hall *et al*^[4] 通过原位末端标记发现, 胃腺颈部细胞很少凋亡, 也支持这种设想。

我们研究了 74 例胃癌和癌旁正常胃黏膜中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达, 发现胃黏膜从正常细胞到发生恶性转化过程中的确存在细胞凋亡基因的异常, 表现为胃癌细胞抗凋亡基因蛋白 Bcl-2 的过度表达和促凋亡基因 Bax 表达的明显减少, Bcl-2 表达指数与癌细胞在胃壁中浸润深度有一定关系, 结果与 Muller 和徐佑 *et al* 的研究相吻合^[5-6], 文献报道 Bcl-2 本身并无促进细胞发生恶性转化的作用, 但在无生长因子或神经营养因子存在条件下, 通过抑制细胞凋亡, 延长细胞存活时间, 从而增加细胞染色体畸变和病毒感染

机会, 增加细胞恶变的概率. 另外**bcl-2**能协同促癌基因**ras**和**c-myc**的作用, 使细胞发生恶性转化^[7]. **Bax**基因蛋白表达的减少或缺失, 使正常细胞程序性死亡, 黏膜更新受阻, 最终导致胃黏膜上皮细胞发生恶变. 以上提示胃癌发生、发展过程中细胞凋亡基因发挥了重要作用, 同时亦证实肿瘤发生不只是因细胞生长、增殖过快引起, 而且与细胞凋亡减少有关.

本研究结果还显示, 胃癌组织中**Bcl-2**和**Bax**蛋白表达与Lauren's分型有关, 即**Bcl-2**阳性细胞指数在弥漫胃癌组明显高于肠型胃癌组, 且阳性物质着色浓度高, 而明显低于肠型胃癌组, 表明**bcl-2**基因家族与胃癌分化程度密切相关. 关于凋亡基因在不同分化程度肿瘤细胞中的表达国外文献报道不尽一致. 本研究与日本学者Saegusa *et al*^[8]的结果相符, 细胞对凋亡信号的反应性主要取决于**bcl-2**基因家族中凋亡诱导基因和凋亡抑制基因的相对表达水平, 即**bcl-2**与**bax**的比例. 当细胞内**Bcl-2**超表达时, 他与**Bax**形成异源二聚体增多, 使细胞凋亡减弱或被抑制, 使肿瘤细胞生长快, 浸润性强; 当细胞内**Bax**过表达时, 则以**Bax**同源二聚体为主, 形成离子通道, 使线粒体膜的通透性改变; 或**Bax**取代凋亡蛋白酶活化因子与**Bcl-2**同源二聚体结合, 通过活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶而促进细胞凋亡, 导致肿瘤相对生长缓慢, 浸润性低. Kasagi *et al*^[9]研究了不同分化程度的胃癌细胞的凋亡指数, 发现高分化胃癌的凋亡指数明显高于低分化胃癌, 显示分化差的胃癌对细胞凋亡存在逃避机制. 本研究提示不同类型胃癌在从正常胃黏膜上皮向恶性转化的过程中虽然均有**bcl-2**基因家族突变, 但在胃癌细胞演进过程中, 由于不同种类的凋亡调节基因突变程度的不同或由于肿瘤细胞对凋亡信号的反应不同, 使他们获得了不同的生物学特征, 因而弥漫型胃癌分化程度低, 恶性度高, 与肠型胃癌存在“肿瘤的异质化”.

编码产物**Bcl-2**蛋白是一种跨膜蛋白, 分子量约为26 kDa, 定位于内质网和线粒体外膜上^[10]. **bcl-2**基因家族的作用点在线粒体膜上, 因此正常胃黏膜上皮细胞和大部分胃癌细胞呈胞质染色阳性, 但在印戒细胞癌中, 癌细胞浸至黏膜下层后出现胞核着色, 并随着浸润深度的增加, 核内着色阳性细胞数也增加, **Bcl-2**基因蛋白这种异常信号传导通路对肿瘤细胞的恶性增殖、去分化有何重要意义尚待进一步探讨.

3.2 Cath-D在胃癌和Lauren's分型中的表达及其

意义 侵袭和转移是恶性肿瘤特有的两种性质, 也是影响预后的重要因素, 因此探讨肿瘤的侵袭和转移机制是研究的热点. Cath-D是定位于染色体11p15基因编码上的一种可被雌激素诱导的溶酶体蛋白酶, 一方面通过蛋白水解作用或通过激活组织蛋白酶B, 进而激活尿激酶型纤溶酶原活化因子(PA)降解细胞外基质(ECM)、基膜和结缔组织, 促进肿瘤的侵袭和转移; 另一方面, Cath-D还有促进有丝分裂的作用, 并与癌基因c-erb-B₂扩增有关, 从而促进肿瘤细胞增殖和生长.

关于Cath-D与胃癌和Lauren's分型的关系研究较少. 本文应用免疫组化方法对Cath-D在胃癌原发灶中的表达与胃癌生物学行为的关系进行了研究, 结果表明Cath-D在胃癌组织中尤其在癌巢边缘的癌细胞中表达明显强于癌旁正常胃黏膜组织和肿瘤中央区, 证实胃黏膜在癌变过程中细胞发生了Cath-D基因的突变. 由于癌细胞Cath-D基因蛋白表达的异常刺激了肿瘤细胞的生长、ECM和结缔组织的溶解, 使肿瘤细胞获得了向周围组织浸润转移的能力, 癌灶边缘的癌细胞表现出更明显的恶性生物学行为. Garcia *et al*^[11]用Cath-D基因进行细胞转染, 表明这种蛋白表达增强, 转染细胞发生肝转移的时间提前, 发生率也增高, 提示Cath-D与胃癌的发生、发展有关. 此外本研究结果还显示Cath-D阳性表达指数与胃癌的Lauren's分型密切相关, 即弥漫型胃癌Cath-D表达明显高于肠型胃癌($P<0.05$), 说明在胃癌演进过程中, 由于印戒细胞具有更多更强的Cath-D基因突变, 使弥漫型胃癌“肿瘤的异质化”比肠型胃癌呈现出更强的侵袭力、恶性度高、易转移等生物学行为. McGuire *et al*^[12]研究发现Cath-D基因过表达或高水平的乳腺癌患者其总生存期较短, 因此检测胃癌组织中Cath-D表达可作为监测胃癌复发、预后判定及指导治疗有价值的分子生物学指标.

本研究还发现肿瘤间质细胞亦有Cath-D表达, 关于肿瘤间质细胞, 尤其炎细胞中Cath-D阳性表达在肿瘤细胞侵袭、转移过程中的意义目前看法不同. 传统观点认为, 肿瘤间质中炎细胞, 尤其是免疫细胞具有抗肿瘤的作用. 但有人认为肿瘤间质细胞表达组织蛋白酶同样可以破坏正常组织结构, 协助肿瘤细胞发生浸润和转移. Gaci *et al*^[13]在乳腺癌的研究中证实, 间质细胞Cath-D阳性表达与乳腺癌侵袭、转移有关. 我们在胃癌研究中尚未发现这种关系. 因此, 肿瘤间

■应用要点

Cath-D是胃癌、乳腺癌等高度恶性病理组织学类型的重要表达产物, 有关其抗体及基因沉默技术的体内、外实验研究将可作为未来分子靶向治疗的一个新的方向.

■名词解释

1 弥漫型胃癌: 指不形成腺腔结构弥漫散在生长的低分化腺癌及印戒细胞癌。

2 肠型胃癌: 指发生在胃的具有管状结构的高-中分化腺癌。

质细胞在肿瘤形成和浸润转移中扮演什么角色, 值得进一步深入探讨。

还有研究表明^[12], 在酸性环境下雌激素可诱导组织蛋白酶D的分泌。因此, Cath-D在雌激素阳性的乳腺癌进展中发挥重要作用。但本实验结果并未发现Cath-D表达与患者性别之间有明显相关性, 提示肿瘤细胞Cath-D分泌机制较为复杂, 可能与多种生长因子的调控有关。

3.3 VEGF在胃癌和Lauren's分型中的表达及其意义 肿瘤的新生血管生成是肿瘤生长和转移的形态学基础, 目前已分离和纯化的新生血管生长因子较多, VEGF是其中作用最强、特异性最高的一种。VEGF是一种糖基化分泌性多肽, 分子量为43 kDa, 可特异作用于血管内皮细胞上的VEGF受体, 刺激其有丝分裂和增殖, 改变内皮细胞基因的活化方式, 诱导内皮细胞表达蛋白网的水解酶、间质胶原酶和细胞因子。这些酶和细胞因子共同促使血浆纤维蛋白外渗, 导致纤维素在肿瘤间质中沉积, 促进巨噬细胞、纤维母细胞等细胞生长, 从而在原位诱导新生血管生成。缺氧、低血糖细胞因子等是VEGF的外部调控因素。

本研究结果显示VEGF在胃癌组织中的阳性表达率和阳性物质的浓度均明显高于癌旁正常胃黏膜, 同时在肿瘤间质中的部分血管内皮细胞及少数纤维细胞也表达VEGF, 结果与文献报道一致^[14]。VEGF在恶性肿瘤内普遍呈过表达的主要原因是肿瘤生长过程中, 由于瘤细胞增殖迅速, 造成肿瘤循环系统处于相对缺氧状态, 激活了VEGF基因, 刺激肿瘤细胞和肿瘤间质大量分泌血管生长因子, 从而在原位诱导新生血管的生成, 使肿瘤细胞在充分获得营养供应的条件下得以呈指数方式迅速生长。最近研究发现在人淋巴瘤的转移瘤中观察到VEGF表达与细胞凋亡呈反比关系, 说明VEGF还具有直接促进肿瘤细胞生成, 阻止凋亡的作用^[15]。本研究发现VEGF阳性表达指数与胃癌的进展和转移有密切的关系, 即癌细胞在胃壁浸润越深者或有淋巴结转移者, 肿瘤中VEGF表达越明显, 且染色强度高的癌细胞多位于癌肿浸润的边缘。文献报道, 胃癌浸润前缘中的肿瘤微血管密度较肿瘤内部高。说明肿瘤在向外浸润性生长过程中与新生血管化同步进行。同时由于新生血管本身结构上的缺陷, 如稳定性差、通透性高, 均有利于肿瘤细胞穿过血管壁进入循环系统, 为癌细胞的转移提供条件。因而肿瘤周边

的癌细胞可能更具有侵袭性。从生存曲线分析, VEGF阳性表达者预后明显差于VEGF阴性表达者^[16]。综上得出VEGF参与了胃癌的发生与发展, 可作为判断预后的指标。文献研究表明应用VEGF抗体或调控VEGF的受体, KDR能明显抑制实验性肿瘤的生长和转移^[17], 提示VEGF可作为肿瘤生物治疗的理想靶点。另外本研究发现VEGF的表达与Lauren's分型无关, 说明VEGF不是影响胃癌分化的主要因素, 与“肿瘤的异质化”无关。

总之, 本研究证实了Bcl-2, Bax, Cath-D和VEGF分别参与了胃癌的发生、浸润进展和转移。胃癌的发生、发展是一个多基因参与、调控的多步骤过程, 弥漫型与肠型胃癌在组织学发生相同的基础上由于在胃癌演进过程中有不同附加基因参与(Bcl-2, Bax和Cath-D), 使二型胃癌有不同的亚克隆过程, 因而表现为生物学特性的异质化。研究结果为临床对不同组织学类型的分子靶向治疗提供了理论依据。

4 参考文献

- 1 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49
- 2 潘彦珞, 王新允, 张乃鑫, 林建韶, 赵凤喜, 李薇, 赵天茹, 郑海燕. 胃黏膜球样异型增生细胞的癌前意义. *中华医学杂志* 1997; 77: 389-390
- 3 Vogelbaum MA, Tong JX, Higashikubo R, Gutmann DH, Rich KM. Transfection of C6 glioma cells with the bax gene and increased sensitivity to treatment with cytosine arabinoside. *J Neurosurg* 1998; 88: 99-105
- 4 Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-3577
- 5 Muller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. Prognostic value of bcl-2 expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 1998; 18: 4699-4704
- 6 徐佶, 张一楚, 孙久运, 张忠德, 张文竹, 钱惠琴. bcl-2, bax, Ki-67在胃癌中的表达及意义. *肿瘤* 2001; 21: 211-212
- 7 Xu J, Xu Z, Jiang Y, Qian X, Huang Y. Cryptorchidism induces mouse testicular germ cell apoptosis and changes in bcl-2 and bax protein expression. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 25-33
- 8 Saegusa M, Takano Y, Wakabayashi T, Okayasu I. Apoptosis in gastric carcinomas and its association with cell proliferation and differentiation. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 743-748
- 9 Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H, Tsujitani S, Ito H. Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 939-945
- 10 Chalbos D, Westley B, May F, Alibert C, Rochefort

- H. Cloning of cDNA sequences of a progestin-regulated mRNA from MCF7 human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 965-982
- 11 Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 1990; 5: 1809-1814
- 12 McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Ravdin PM, Clark GM. Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement. *Cancer* 1992; 70: 1775-1781
- 13 Gaci Z, Bouin-Pineau MH, Gaci M, Daban A, Ingrand P, Metaye T. Prognostic impact of cathepsin D and c-erbB-2 oncoprotein in a subgroup of node-negative breast cancer patients with low histological grade tumors. *Int J Oncol* 2001; 18: 793-800
- 14 Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 86-91
- 15 Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 2002; 24: 280-283
- 16 Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-863
- 17 Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res* 1996; 56: 921-924

■同行评价

本文设计科学, 结果合理, 讨论也尚有条理, 有可读性, 为胃癌的病理学研究及基因治疗提供了充足的有意义的信息, 能较好反应我国胃肠病学基础研究的先进水平。

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 •

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。

乙肝病毒大蛋白检测在乙型肝炎诊治中的临床意义

乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景

■背景资料

随着近年来对乙肝病毒表面蛋白中前S₁、S₂抗原在乙型肝炎发病机制、病毒感染与复制等方面的深入研究,具有双重拓扑结构的乙肝病毒大蛋白对HBV感染、复制及其疗效动态监测的临床应用越来越被研究者重视。

乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景, 南昌大学第一附属医院检验科 江西省南昌市 330006

乐爱平, 江西医学院医学检验专业毕业, 学士, 讲师, 主要从事临床免疫学的教学、临床与科研工作。

通讯作者: 乐爱平, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院检验科. leaping@126.com

电话: 0791-8692785

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-03-24

Clinical significance of serum hepatitis B virus large surface protein in diagnosis and treatment of patients with hepatitis B

Ai-Ping Le, Bei-Hua Ju, Wen Wang, Wen-Jing Zhang

Ai-Ping Le, Bei-Hua Ju, Wen Wang, Wen-Jing Zhang, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China
Correspondence to: Dr. Ai-Ping Le, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China. leaping@126.com
Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To discuss the clinical significance of hepatitis B virus large surface protein (HBV-LP) detection in the diagnosis and treatment of patients with hepatitis B.

METHODS: Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the levels of serum HBV-LP, HBV preS₁, HBV preS₂ and HBV markers, and fluorescence quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to detect HBV DNA in 162 patients with hepatitis B as well as 47 normal controls.

RESULTS: In serum samples of the patient with HBV infection, the level of HBV-LP had significant correlation with that of HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂ and HBVpreS₁ antigen ($\chi^2 = 9.22, 11.89, 60.35, 99.87$; all $P < 0.01$). The contents of serum HBV-LP was positively correlated with HBV DNA copies ($r_s = 0.64, P < 0.001$). The level of serum HBV-LP was also significantly different between the groups with different HBV DNA copies ($P < 0.01$). The level and positive

rate of serum HBV-LP were significantly different between HBV DNA-positive and negative patients ($Z = 5.85, P < 0.001$), and they were in the same situation for HBeAg, HBVpreS₂ and HBVpreS₁ antigen ($Z = 8.70, 8.44, 8.84$; all $P < 0.001$). The serum HBV-LP was more sensitive than HBV DNA, HBVpreS₂ and HBVpreS₁ antigen in HBeAg-negative patients (76.8%). Serum HBV-LP was significantly different between the patients with HBV infection and normal controls ($P < 0.01$).

CONCLUSION: HBV-LP may serve as a reliable marker in the reflection of HBV replication at protein level, and it is valuable to monitor HBV replication and prognosis of the disease, especially in HBeAg-negative HBV infected patients.

Key Words: Hepatitis B virus; Large surface protein; Hepatitis B virus DNA; Hepatitis B virus preS₁ antigen; Hepatitis B virus preS₂ antigen; Enzyme-linked immunosorbent assay; Fluorescence quantitative-polymerase chain reaction

Le AP, Ju BH, Wang W, Zhang WJ. Clinical significance of serum hepatitis B virus large surface protein in diagnosis and treatment of patients with hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(16):1578-1581

摘要

目的: 探讨乙肝病毒(HBV)大蛋白(LP)在乙型肝炎诊治中的临床意义。

方法: 对162例HBV感染者及47名正常对照血清采用酶联免疫吸附试验检测HBV-LP, HBV前S₁抗原, HBV前S₂抗原及乙型肝炎血清标志物; FQ-PCR定量检测HBV DNA。

结果: 在HBV感染组中, HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂, HBVpreS₁间相关显著($\chi^2 = 9.22, 11.89, 60.35, 99.87$; 均 $P < 0.01$), 其含量与HBV DNA拷贝数成正相关($r_s = 0.64, P < 0.001$), 不同HBV DNA拷贝数组别间HBV-LP含量存在差异显著性($\chi^2 = 135.34, P < 0.01$); HBeAg, HBV DNA, HBVpreS₂, HBVpreS₁不同模式间HBV-LP含量及阳性率均存在差异

■研究前沿

研究乙肝病毒大蛋白可否作为判断乙肝患者病毒复制与抗病毒疗效的一种新的可靠的定量血清免疫学指标。

显著性($Z = 8.70, 5.85, 8.44, 8.84$, 均 $P < 0.001$); HBeAg阴性感染血清中HBV-LP较HBV DNA, HBVpreS₂, HBVpreS₁更为敏感(76.8%). HBV感染组与正常对照组间HBV-LP含量存在差异显著性($P < 0.01$).

结论: HBV-LP是从蛋白水平反映HBV感染者体内病毒复制程度的可靠指标, 尤其是HBeAg阴性患者体内病毒复制及预后判断的良好血清学监测指标.

关键词: 乙型肝炎病毒; 大蛋白; HBV DNA; 乙型肝炎病毒前S₁抗原; 乙型肝炎病毒前S₂抗原; 酶联免疫吸附试验; 荧光定量聚合酶链反应

乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景. 乙肝病毒大蛋白检测在乙型肝炎诊治中的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1578-1581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1578.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个严重的公共卫生问题. 我国属高地方性流行地区, 一般人群中HBsAg流行率为9.09%, 其中慢性HBV感染者约占全世界的1/3^[1]; 其流行现状是HBeAg阴性活动期肝炎增多, HBV变异株增加, HBV的突变率较高. 在慢性HBV感染患者中, 约15%-25%最终死于与HBV感染相关的肝病^[2]. 前瞻性研究表明, 慢性HBV感染患者发展肝硬化的估计年发生率为2.1%, HBeAg阳性者的肝硬化发生率较阴性者高^[3]. 有学者对HBeAg阴性的慢性乙肝患者进行平均为期9(1-18.4)a的随访, 发现其进展为肝硬化和肝癌(HCC)的发生率分别为23%和4.4%^[4-5]. 目前临床上主要以肝功能的改善, HBeAg血清转换和HBV DNA阴转作为乙肝患者病毒复制与抗病毒疗效的监测指标^[6], 但尚有一定的局限性, 尤其对HBeAg阴性慢性乙肝患者缺乏准确反映体内病毒复制与抗病毒疗效的血清学指标. 为此我们研究乙肝病毒大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, HBV-LP)作为一种新的可靠的定量血清免疫学指标在乙型肝炎诊治中的检测意义.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2006-01/02 HBV感染者血清162例, 男109例, 女53例; 年龄5-70(平均27.8)岁; 均符合HBV感染的临床诊断标准, 且无其他嗜肝病毒合并感染. 正常对照组47名来自健康无偿献血者的血清, 男31例, 女16例, 年龄6-78(平均30.3)

表 1 HBsAg阳性的HBV感染血清HBV-LP与HBV DNA的关系

HBV DNA拷贝数的对数值	<i>n</i>	HBV-LP (μg/L) Median (Min-Max)	HBV-LP阳性率 <i>n</i> (%)
正常对照组	47	0.23 (0.05-1.84)	0 (0)
HBV感染组			
<3	60	9.82 (0.03-171.15) ^b	44 (73.7)
3-4	24	15.51 (0.49-91.41) ^b	20 (83.3)
5-6	22	22.94 (1.56-140.83) ^{bd}	20 (90.9)
>7	56	134.87 (0.27-200.31) ^{bdf}	53 (94.6)

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs <3组; ^f $P < 0.01$ vs 3-4组, 5-6组.

岁, 均无嗜肝病毒感染, 且无肝脏、肾脏功能损害. 德国Diasorin公司的ETI-max3000全自动酶免分析仪; 美国PerKin Elmer公司的PE5700自动荧光PCR仪. HBV-LP酶免定量检测试剂盒由北京热景生物技术有限公司提供; HBV DNA荧光定量试剂盒购自广州中山大学达安基因股份有限公司; HBVpreS₁定性检测试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司; HBVpreS₂检测试剂盒由北京肝炎试剂研究中心提供; HBVM检测试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司. 所用试剂均在其有效期内.

1.2 方法 HBV-LP检测采用ELISA双抗体夹心法, 定量时利用定值标准品0, 10, 25, 50, 100, 200 μg/L, 通过4-Parameter model由ETI-max3000全自动酶免分析仪自动测定结果; 定性则样品A值 $\geq$ 阴性对照均值(0 μg/L标准品) $\times 2.1$ 时判为阳性, 反之为阴性. HBV DNA荧光定量测定采用FQ-PCR, 其含量小于 1.00×10^3 时判为阴性, 反之判为阳性. HBVM, HBVpreS₁, HBVpreS₂测定均采用ELISA, 定性结果判定均严格按试剂说明书编程由ETI-max3000全自动酶免分析仪自动判读. 实验所有操作均严格遵守南昌大学一附院临床免疫实验室SOP文件.

统计学处理 计量资料用中位数描述, 组间比较采用秩和检验, 两指标间相关性分析采用Spearman等级相关分析; 计数资料的两指标间关联与率的显著性检验采用卡方检验或精确概率; 显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$. 统计软件为SPSS12.0.

2 结果

2.1 HBV-LP含量与HBV DNA拷贝数相关 HBV感染者血清中, HBV-LP含量随HBV DNA拷贝数的增加呈上升趋势. 随HBV DNA拷贝数组别级

■ 相关报道

乙肝鸭模型证实HBV感染者血清的感染性不仅依赖于Dane颗粒的多少, 还依赖于富含大蛋白的亚病毒颗粒的数量. 亚病毒颗粒能够反式激活病毒, 使病毒复制重新激活.

■ 创新盘点

本研究显示, HBV-LP含量与HBV-DNA拷贝数间具有良好的正相关, 能反映HBV感染者机体内病毒感染与复制程度, 较HBVpreS₁, HBVpreS₂, HBV-DNA, HBeAg敏感, 大蛋白阳性能区分HBeAg阴性慢性乙肝中的活动期肝炎, 尤其是HBV-DNA低水平复制时具有重要意义.

■应用要点

HBV-LP是用于HBV感染者机体内病毒复制程度监测及疗效判断的良好指标,其检测有利于对HBeAg阴性HBV感染者的病情进程、疗效判断及预后的监测。

表 2 HBV感染者血清HBV-LP与定性检测指标的相关性

HBV-LP	<i>n</i>	HBV DNA		HBeAg		HBVpreS ₂		HBVpreS ₁	
		+	-	+	-	+	-	+	-
阳性	137	93	44	61	76	120	17	125	12
阴性	25	9	16	2	23	4	21	0	25
合计	162	102	60	63	99	124	38	125	37

表 3 HBeAg, HBV DNA, HBVpreS₂, HBVpreS₁不同模式间HBV-LP含量比较

分组	<i>n</i>	HBV-LP (μg/L)		<i>Z</i>	<i>P</i>
		Median	(Min-Max)		
HBeAg	阳性	63	130.85 (0.27-200.31)	8.70	<0.001
	阴性	99	10.73 (0.03-166.13)		
HBV DNA	阳性	102	48.45 (0.27-200.31)	5.85	<0.001
	阴性	60	9.82 (0.03-171.15)		
HBVpreS ₂	阳性	124	31.23 (0.27-200.31)	8.44	<0.001
	阴性	38	1.70 (0.03-14.54)		
HBVpreS ₁	阳性	125	30.87 (0.27-200.31)	8.84	<0.001
	阴性	37	1.67 (0.03-12.73)		

数增加, HBV-LP阳性率亦逐渐增加($P<0.05$)。二者之间有良好的正相关性($r_s=0.64$, $P<0.001$)。正常对照组, HBV感染组中不同HBV DNA拷贝数组别间HBV-LP含量存在差异显著性($\chi^2=135.34$, $P<0.001$, 表1)。

2.2 HBV-LP与HBVpreS₁, HBVpreS₂, HBV DNA, HBeAg相关性 在162例HBV感染者血清中, HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂, HBVpreS₁阳性符合率分别为91.2%, 96.8%, 96.8%, 100%。HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂, HBVpreS₁的符合率分别为67.3%, 51.8%, 87.0%, 92.6%。HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂, HBVpreS₁间相关显著($\chi^2=9.22, 11.89, 60.35, 99.87$; $P<0.01$)。HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂, HBVpreS₁间存在差异显著性($\chi^2=23.11, 70.20, 6.86, 10.08$; $P<0.05$)。HBV-LP的检出率为84.6%(137/162), 较HBV DNA, HBeAg, HBVpreS₂, HBVpreS₁高(表2)。HBeAg, HBV DNA, HBVpreS₂, HBVpreS₁不同模式间HBV-LP含量比较见表3。

2.3 HBeAg阴性HBV感染血清中HBV-LP检测 99例HBeAg阴性HBV感染者血清中, HBV-LP与HBVpreS₂, HBVpreS₁间相关显著($\chi^2=33.14, 57.28$; $P<0.01$)。而与HBV DNA间无统计学意义($\chi^2=1.49$, $P>0.05$)。HBV-LP与HBV DNA, HBVpreS₂, HBVpreS₁间存在差异显著性($\chi^2=25.0, 7.58, 9.09$; $P<0.01$)。HBV-LP的阳性检出

表 4 HBeAg阴性HBV感染者血清HBV-LP与定性检测指标的相关性

HBV-LP	<i>n</i>	HBV DNA		HBVpreS ₂		HBVpreS ₁	
		+	-	+	-	+	-
阳性	76	34	42	60	16	65	11
阴性	23	7	16	3	20	0	23
合计	99	41	58	63	36	65	34

率为76.8%(76/99), 较HBV DNA, HBVpreS₂, HBVpreS₁高(表4)。

3 讨论

乙肝病毒的3个包膜蛋白是从一个开放阅读框的3个不同起始位点与相同的终止位点翻译表达而来。在病毒粒子成熟过程中, 大蛋白preS结构域开始时都停留在胞膜的细胞质中, 通过S结构域的II型信号和疏水C端跨内质网膜, 大约一半大蛋白的跨膜区域的拓扑结构在翻译后发生了改变, 使得preS区域暴露于病毒粒子的表面, 从而产生大蛋白的独特双重拓扑结构^[7]。通过双重拓扑学结构, 大蛋白preS结构域定位于病毒包膜的两侧, 在病毒生活周期中执行两个重要功能: 在外侧, preS₁的N末端区域作为配体与病毒受体结合; 在内侧, 在病毒组装时作为基质蛋白, 通过其103位精氨酸和124位丝氨酸之间的preS区域直接与核壳相互作用, 同时介导HBsAg亚病毒颗粒的细胞质滞留^[7-8]。亚病毒颗粒的形成和分泌可作为HBV包膜蛋白正确折叠和参与病毒粒子形成的指标^[9]。本研究显示, HBV-LP的含量在正常对照组与HBV感染组间存在差异显著性($P<0.01$)。162例HBV感染血清中, HBV-LP的含量与HBV DNA拷贝数间存在良好的正相关性($r_s=0.64$, $P<0.001$)。不同HBV DNA拷贝数指数级间HBV-LP含量及阳性率两两比较有统计学意义($P<0.01$)。二者间的含量及阳性率存在一定的平行关系; HBV-LP在HBVpreS₁, HBVpreS₂, HBV DNA, HBeAg不同模式间的含量存在差异显著性($P<0.01$)。各指标间的阳性符合率具有高度一致性, 其关联显著($P<0.01$)。表明HBV-LP是反映HBV感染者机体内病毒复制程度的可靠指标。研究同时发现HBV-LP在HBV感染血清中较HBVpreS₁, HBVpreS₂, HBV DNA, HBeAg敏感, 分析其原因: (1)HBV-LP检测采用的是立体构象型表位的mAb, HBVpreS₁, HBVpreS₂作为HBV-LP的一部分, 无法模拟其复杂的双重拓扑结构, 在制作单克隆抗体时由于序列的折叠、卷曲而

■名词解释

乙肝病毒大蛋白: 在病毒粒子成熟过程中, 大蛋白preS结构域开始时都停留在胞膜的细胞质中, 通过S结构域的II型信号和疏水C端跨内质网膜, 大约一半大蛋白的跨膜区域的拓扑结构在翻译后发生了改变, 产生大蛋白的独特双重拓扑结构。大蛋白preS结构域定位于病毒包膜的两侧。在外侧, preS₁的N末端区域作为配体与病毒受体结合; 在内侧, 在病毒组装时作为基质蛋白, 通过其103位精氨酸和124位丝氨酸之间的preS区域直接与核壳相互作用。

失去表位暴露的机会导致漏检; (2)HBV突变株不断增加、HBV DNA检测的方法学与灵敏度缺陷等使HBV DNA阴转并不能真实反映肝组织内HBV感染及复制情况, 尤其是HBV DNA低水平时, 肝内HBV DNA仍可维持一定水平; 目前抗病毒治疗只能抑制cccDNA再复制, 并不能抑制已经形成的病毒表达蛋白, 富含大蛋白的亚病毒颗粒在一段时间内仍存在; (3)由于持续免疫压力、长期治疗、前C和C启动子变异等原因, HBeAg阴性的慢性乙肝流行率呈不断升高趋势, HBeAg的阴转已不能真实反映HBV复制情况。综上表明HBV-LP是用于HBV感染者机体内病毒复制监测及疗效判断的良好指标。

在99例HBeAg阴性的HBV感染血清中, 研究表明, HBV-LP与HBVpreS₁, HBVpreS₂间关联显著($P<0.01$), 而与HBV DNA之间无统计学意义($P>0.05$), 这可能与HBV感染者体内DNA低水平复制及HBV-LP细胞内滞留有关。HBV-LP检出率较HBV DNA, HBVpreS₁, HBVpreS₂更为敏感($P<0.01$)。HBV感染肝细胞合成的大蛋白数量远远超过病毒形态发生所需要的量, 在缺少病毒核衣壳的条件下, 最终形成球状或纤维状的空的亚病毒颗粒(SPVs)。乙肝鸭模型证实HBV感染者血清的感染性不仅依赖于Dane颗粒的多少, 还依赖于富含大蛋白的亚病毒颗粒的数量。亚病毒颗粒能够反式激活病毒, 使病毒复制重新激活^[10]。提示大蛋白阳性对HBeAg阴性慢性乙肝中的活动期肝炎, 尤其是HBV DNA低水平复制时的病情具有监测意义。有研究表明, 大蛋白超量表达会通过反式调控作用使SPVs不会分泌, 形成亚病毒包膜纤维体, 其在细胞内积累可导致肝细胞液泡化和细胞凋亡^[11]。这提示HBV-LP含量的连

续检测有利于对慢性乙肝预后的监测, 防止或延缓肝硬化或HCC的发生与发展。综上说明HBV-LP的检测有利于对HBeAg阴性HBV感染者的病情进程、疗效判断及预后的监测。

4 参考文献

- 1 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658
- 2 庄辉. 我国乙型肝炎病毒感染与挑战. 中华传染病杂志 2005; 23(增刊): 2-5
- 3 Liaw YF, Tai DI, Chu CW, Chen TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 1988; 8: 493-496
- 4 Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 35: 1522-1527
- 5 Liaw YF, Lin DY, Chen TJ, Chu CM. Natural course after the development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Liver* 1989; 9: 235-241
- 6 乐爱平, 鞠北华, 胡庆宏. HBVpreS₁-Ag、HBVpreS₂-Ag、HBV DNA、HBVM的相关性分析及其意义. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 344-346
- 7 Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* 1995; 69: 6652-6657
- 8 Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* 1997; 71: 9350-9357
- 9 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209
- 10 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-1468
- 11 Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002; 36: 1400-1407

■同行评价

本文结论有利于提高HBV感染者的血清学诊断的准确性, 有临床实用价值。论文实验设计合理, 方法可靠, 基本结果可信。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿的临床比较

赵宗珉, 赵金满, 万建华

■背景资料

如何通过患者的临床资料尽早对细菌性肝脓肿做出正确的诊断并及时治疗直接影响患者的预后。近年研究发现,肺炎克雷伯杆菌已经取代大肠埃希菌,成为细菌性肝脓肿的主要致病菌。肺炎克雷伯杆菌肝脓肿在临床方面的特性尚未见报道。

赵宗珉, 万建华, 中国医科大学附属第一医院感染性疾病科 辽宁省沈阳市 110001

赵金满, 中国医科大学附属第一医院消化科 辽宁省沈阳市 110001

赵宗珉, 2003年中国医科大学硕士, 讲师, 主要从事感染性疾病的诊断及治疗研究。

通讯作者: 赵宗珉, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院感染性疾病科. zzm1971@sina.com

电话: 024-23256666-6213

收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-04-16

Comparison between pyogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*Klebsiella pneumoniae*

Zong-Min Zhao, Jin-Man Zhao, Jian-Hua Wan

Zong-Min Zhao, Jin-Man Zhao, Jian-Hua Wan, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zong-Min Zhao, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zzm1971@sina.com

Received: 2006-03-15 Accepted: 2006-04-16

Abstract

AIM: To analyze the differences between pyogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) and non-*Klebsiella pneumoniae* (*NKp*), and provide the evidence for early diagnosis and treatment.

METHODS: The clinical data of 162 patients with pyogenic liver abscess from January 2000 to January 2005 were collected, and statistical analysis was performed to compare the differences between the *Kp* and *NKp* patients in general characteristics, underlying diseases, clinical manifestations, laboratory features, and characteristics of liver abscess, treatments and outcomes.

RESULTS: Of the 162 patients, 112 (69.1%) were classified into *Kp* group, and 50 (30.9%) were *NKp* group. There was significant difference between the two groups in ages ($P < 0.05$). For underlying

diseases, there were significant differences in diabetes (66.1% vs 38.0%, $P < 0.01$), biliary diseases (14.3% vs 28.0%, $P < 0.05$) and abdominal injury (5.4% vs 16.0%, $P < 0.05$) between two groups. For clinical manifestations and laboratory features, there were also significant differences in anemia between two groups (60.7% vs 78%, $P < 0.05$). For characteristics of liver abscess, solitary liver abscess and monomicrobial isolates were more frequent in the *Kp* group than those in the *NKp* group (75.9% vs 58%, $P < 0.05$; 85.7% vs 64%, $P < 0.01$). For treatment and outcome, there were significant differences in metastatic infection and mortality rate between two groups (20.5% vs 6%, $P < 0.05$; 8.9% vs 26.0%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: In comparison with those in *NKp* patients, the age and mortality rate of *Kp* patients are lower, and the rate of diabetes and metastatic infection are higher. Monomicrobial isolates are mostly found in *Kp* patients.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*; Pyogenic liver abscess; Comparison

Zhao ZM, Zhao JM, Wan JH. Comparison between pyogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*Klebsiella pneumoniae*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1582-1586

摘要

目的: 总结分析肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿在临床方面的差异, 为临床医生早诊断、早治疗提供依据。

方法: 总结2000-01/2005-01细菌性肝脓肿住院患者162例, 利用统计学方法比较肺炎克雷伯杆菌与非肺炎克雷伯杆菌引起的肝脓肿在自然情况、伴发基础疾病、临床表现及实验室检查、肝脓肿特点、治疗方法及结果等方面的差异。

结果: 肺炎克雷伯杆菌肝脓肿112例(69.1%), 非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿50例(30.9%), 两组

■研究前沿

研究热点在于细菌性肝脓肿病原体的变化以及由此引起的诸如判定危险因素、诊断、治疗等方面的问题。

在年龄上存在统计学差异($P<0.05$); 两组患者在伴发糖尿病(66.1% vs 38.0%, $P<0.01$)、胆道疾患(14.3% vs 28.0%, $P<0.05$)、腹部创伤(5.4% vs 16.0%, $P<0.05$)上存在统计学差异; 两组患者在贫血上存在统计学差异(60.7% vs 78%, $P<0.05$)。肺炎克雷伯杆菌肝脓肿多为单发脓肿, 且多为单一病原体, 两组间存在统计学差异(75.9% vs 58%, $P<0.05$; 85.7% vs 64%, $P<0.01$)。两组间在迁徙性感染、死亡率上存在统计学差异(20.5% vs 6%, $P<0.05$; 8.9% vs 26.0%, $P<0.01$)。

结论: 与非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿组相比, 肺炎克雷伯杆菌肝脓肿组发病年龄较低, 伴发糖尿病的比例高, 多为单发, 单病原体, 易形成迁徙性感染, 死亡率较低。

关键词: 肺炎克雷伯杆菌; 非肺炎克雷伯杆菌; 细菌性肝脓肿; 临床比较

赵宗珉, 赵金满, 万建华. 肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿的临床比较. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1582-1586
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1582.asp

0 引言

细菌性肝脓肿是临床上常见的一种感染性疾病, 可以危及患者的生命。在引起细菌性肝脓肿的病原体中, 大肠埃希菌曾经占了第1位。近年研究发现, 肺炎克雷伯杆菌已经取代了大肠埃希菌的地位, 成为细菌性肝脓肿的主要致病菌^[1-4]。这种观点已经陆续得到证实^[5-7]。我们总结肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与其他细菌性肝脓肿之间在临床方面的差异, 为细菌性肝脓肿的早期诊断、早期治疗及判断预后提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2005-01细菌性肝脓肿患者162例, 临床资料中包括自然情况、伴发基础疾病、临床表现及实验室检查、肝脓肿特点、治疗方法及结果等。入选的诊断标准包括: (1)出现发热、寒战、疲倦、恶心、黄疸等症状; (2)腹部超声波或肝脏CT检查显示肝脏病灶; (3)脓汁和/或血液细菌培养呈现阳性结果。

1.2 方法 利用SPSS统计软件对临床资料进行统计学分析。对计量资料采用 t 检验, 对计数资料采用 χ^2 检验。

表 1 Kp 组与 NKp 组伴发基础疾病比较

伴发疾病	Kp 组		NKp 组	
	n	%	n	%
糖尿病	74	66.1	19 ^b	38.0
胆道疾患	16	14.3	14 ^a	28.0
腹部创伤	6	5.4	8 ^a	16.0
肝硬变	4	3.6	3	6.0
肾功能衰竭	2	1.8	2	4.0
伴发两种以上	8	7.1	2	4.0
无	2	1.8	2	4.0

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs Kp 组。

表 2 Kp 组与 NKp 组临床表现及实验室检查比较

临床特征	Kp 组		NKp 组	
	n	%	n	%
发热/寒战	101	90.2	44	88.0
腹痛	97	86.6	41	82.0
恶心	71	63.4	32	64.0
黄疸	38	33.9	17	34.0
WBC ($>10 \times 10^9/L$)	84	75	36	72.0
Hb (男: $<12 g/L$) (女: $<11 g/L$)	68	60.7	39 ^a	78.0
PLT ($<100 \times 10^9/L$)	60	53.6	26	52.0
AST ($>633 nkat/L$)	77	68.8	38	76.0
ALT ($>717 nkat/L$)	79	70.5	37	74.0
AKP ($>2134 nkat/L$)	79	70.5	37	74.0
白蛋白 ($<35 g/L$)	96	85.7	43	86.0
总胆红素 ($>20 \mu mol/L$)	51	45.5	24	48.0
CRP ($>8 mg/L$)	105	93.8	47	94.0

^a $P<0.05$ vs Kp 组。

2 结果

本组肺炎克雷伯杆菌肝脓肿(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)112例, 占69.1%。非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿(non-*Klebsiella pneumoniae*, NKp)50例, 占30.9%。 Kp 组患者年龄42-75(平均 58.0 ± 16.3)岁; NKp 组年龄45-82(平均 63.9 ± 17.6)岁($P<0.05$)。 Kp 组男: 女 = 65: 47, NKp 组男: 女 = 31: 19, 两组无统计学差异。 Kp 组平均体质量 $65.7 \pm 15.2 kg$, NKp 组平均体质量 $67.3 \pm 16.4 kg$, 两组无统计学差异。两组患者伴发糖尿病、胆道疾患、腹部创伤存在统计学差异(分别为 $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$, 表1)。

2.1 临床特征 主要临床表现包括发热/寒战、腹

■ 相关报道

肺炎克雷伯杆菌已成为细菌性肝脓肿的主要致病菌。这种变化最早发现于亚洲, 目前已经在世界各地得到证实。

■创新盘点

本研究对不同病原体细菌性肝脓肿的临床资料进行对比分析,总结出不同病原体细菌性肝脓肿的临床特性,发现肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与其他细菌性肝脓肿之间在临床上存在着差异,为临床诊治工作提供了新思路。

表 3 细菌性肝脓肿的脓肿特点

脓肿特点	Kp组		NKp组	
	n	%	n	%
肝左叶	17	15.2	13	26.0
肝右叶	89	79.5	35	70.0
两叶	6	5.3	2	4.0
大小<5 cm	44	39.3	21	42.0
大小5~10 cm	60	53.5	26	52.0
大小>10 cm	8	7.2	30	6.0
单发	85	75.9	28 ^a	56.0
多发	27	24.1	22 ^a	44.0
单一病原体	96	85.7	32 ^b	64.0
多病原体	16	14.3	18 ^b	36.0

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs Kp组。

痛、恶心、黄疸。其中发热是最为多见的临床表现,两组各有101例和44例,无统计学差异。余症状也无统计学差异(表2)。细菌性肝脓肿患者通常表现为白细胞、AST、ALT、AKP、总胆红素、CRP升高,而血红蛋白、血小板、白蛋白下降。Kp组贫血68例,占60.7%;NKp组贫血39例,占78%,两组间存在统计学差异($P<0.05$)。余实验室检查无统计学差异(表2)。

2.2 脓肿特点 两组患者肝脓肿病灶局限于肝右叶的比例要高于局限于肝左叶以及同时累及两叶的比例,两组间无统计学差异(表3)。病灶直径多<10 cm。Kp组单发脓肿85例,占75.9%;NKp组单发脓肿28例,占58%。两组间存在统计学差异($P<0.05$)。Kp组以单一病原体为主96例,占85.7%;NKp组单一病原体者32例,占64%。两组间存在统计学差异($P<0.01$,表3)。

2.3 治疗 均接受抗生素治疗。其中124例接受侵入性治疗(包括手术切开引流、经皮留置导管引流、细针穿刺吸引等),Kp组为88例,占78.8%;NKp组36例,占72%,两组间无统计学差异。共有23例死亡,其中Kp组为10例,占8.9%;NKp组为13例,占26%,两组间存在统计学差异($P<0.01$)。Kp组有23例发生迁徙性感染,占20.5%,分别为感染性心内膜炎9例,脑膜炎4例,肺脓肿4例,腹腔感染3例,肺炎2例,脾脓肿1例;NKp组有3例发生迁徙性感染,占6%,分别为感染性心内膜炎1例,脑膜炎1例和肺脓肿1例。两组间存在统计学差异($P<0.05$)。两组患者的住院天数及疗程无统计学差异(表4)。

3 讨论

肺炎克雷伯杆菌属于革兰阴性杆菌,可以引起

表 4 细菌性肝脓肿的治疗及预后

治疗预后	Kp组		NKp组	
	n	%	n	%
单用抗生素	24	21.4	14	28.0
抗生素+手术切开引流	9	8.1	4	8.0
抗生素+经皮留置导管引流	24	21.4	10	20.0
抗生素+细针穿刺吸引	55	49.1	22	44.0
死亡	10	8.9	13 ^b	26.0
迁徙性感染	23	20.5	3 ^a	6.0
感染性心内膜炎	9	8.1	1	2.0
脑膜炎	4	3.6	1	2.0
肺脓肿	4	3.6	1	2.0
腹腔感染	3	2.5		
肺炎	2	1.8		
脾脓肿	1	0.9		
脓肿破裂	5	4.5	2	4.0
住院(d)	21.4 ± 12.5		25.2 ± 14.3	
疗程(d)	36.5 ± 21.4		39.4 ± 25.6	

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs Kp组。

肺炎、泌尿系感染、败血症、腹腔感染等。目前多项研究证实肺炎克雷伯杆菌已经取代了大肠埃希菌的地位,成为细菌性肝脓肿的主要致病菌^[4-8]。我们所收集到的资料中肺炎克雷伯杆菌占69.1%,而其他病原体只占30.9%,与以上的各项研究结果相似。本研究显示细菌性肝脓肿多发生在55-65岁,Kp组的平均年龄低于NKp组的平均年龄,存在统计学差异。两组中男性患者均多于女性患者,但是两组的男女构成比无统计学差异。上述结果和以前一些研究相似^[2,4,6,9-11],考虑与患者存在的基础疾病有关。

对于细菌性肝脓肿与合并基础疾病之间的关系,Wang *et al*^[4], Lee *et al*^[2]和Yang *et al*^[12]提出糖尿病是细菌性肝脓肿的重要易患因素,患者合并糖尿病的比例最高达67.5%,而Alvarez *et al*^[13], Seeto *et al*^[14], Barakate *et al*^[15]和Wong *et al*^[16]则提出胆道疾患是细菌性肝脓肿最常见的病因,但是上述研究未对病原体与基础病之间的关系加以探讨。本研究显示细菌性肝脓肿患者多存在糖尿病、胆道疾患、消化系统溃疡、腹部创伤、肝硬变、肾功能衰竭等基础疾病,与上述研究的结果相似。我们对两组患者所合并基础疾病进行比较,发现Kp组患者的糖尿病罹患率(83.9%)明显高于NKp组患者(64%),而NKp组患者胆道疾患和腹部创伤的罹患率(46%和28%)高于Kp组患者(28.6%和14.3%),其他基础疾病无统计学差异。这些提示了不同病原体引起的细

菌性肝脓肿可能与基础疾病有关。糖尿病患者发生的细菌性肝脓肿的病原体多为肺炎克雷伯杆菌, 这是因为糖尿病患者通常存在免疫缺陷, 而肺炎克雷伯杆菌容易在免疫缺陷的患者人群中引起感染。而胆道疾患和腹部创伤患者发生的细菌性肝脓肿的病原体多为大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等非肺炎克雷伯杆菌, 这与上述细菌是引起胆道疾患和腹部创伤后感染的主要致病菌有关。与大多数研究^[2,4-6,10,16]相同, 我们发现细菌性肝脓肿的主要临床表现为发热/寒战(89.5%), 其次为腹痛、恶心、黄疸等。细菌性肝脓肿患者最常见的异常实验室检查结果为CRP及白细胞升高, 血红蛋白和白蛋白下降。*Kp*组和*NKp*组之间在临床表现和大多数的实验室检查结果无明显差异, 只是*NKp*组患者出现贫血的比例(78%)要高于*Kp*组患者(60.7%)。其原因可能与*NKp*组患者中老年患者较多以及消化系统溃疡造成造血原料吸收障碍有关。

从肝脓肿所处部位及大小来看, *Kp*组与*NKp*组无统计学差异, 都以直径小于10 cm、局限于肝右叶的病灶为主, 与Okano *et al*^[17]和Yang *et al*^[12]的研究结果相同。这可能与肝右叶体积较大以及血液较多有关。本研究发现*Kp*组患者多为单发脓肿, 而且*Kp*组患者分离出的病原体以单一病原体为主, 与Wang *et al*^[4]、Lederman *et al*^[5]、Rahimian *et al*^[6]的研究结果相同。Yang *et al*^[12]和Lee *et al*^[18]发现肺炎克雷伯杆菌肝脓肿中含气腔的比例要高于其他类型的肝脓肿, 而且这种类型的肝脓肿死亡率高。此外, Lee *et al*^[18]发现, 糖尿病是肺炎克雷伯杆菌肝脓肿形成含气腔的重要因素。本次研究中, 我们没有发现存在含气腔的肝脓肿, 所以无法判断。

细菌性肝脓肿的治疗方法主要包括抗菌药物治疗和充分的脓汁引流。本研究中的所有患者均接受了抗菌药物治疗, 约有76.5%的患者同时接受了侵入性治疗。未接受侵入性治疗的患者主要是因为脓肿较小、患者基础状态极差无法承受侵入性治疗等。在侵入性治疗中, 细针穿刺吸引因其具有危险性低、损伤小、患者耐受性好、操作简单等优点而成为临床医生的首选。而对于脓肿数量较多、脓肿位置不佳、基础状态较差的患者, 可以选择经皮留置导管引流或手术切开引流。细菌性肝脓肿的治疗结果主要包括康复、迁徙性感染、死亡、脓肿破裂、肝坏死等。迁徙性感染是革兰阴性杆菌败血症较

为少见的合并症, 而我们发现, *Kp*组发生迁徙性感染的比例(20.5%)要高于*NKp*组(6%), 存在统计学差异。累及的部位包括心脏、颅内、肺部、腹腔、脾。这种情况在许多研究中得到证实^[1,4,19,20]。许多研究^[2,4,12,17]显示, 肺炎克雷伯杆菌肝脓肿患者死亡率低于其他类型的肝脓肿, 约在6%-17%之间。本研究中肝脓肿患者的死亡率为8.9%, *NKp*组患者的死亡率(26%)明显高于*Kp*组(12.5%), 存在统计学差异, 提示肺炎克雷伯杆菌肝脓肿虽然发生迁徙性感染的比例高, 但是死亡率较低。出现上述情况的原因考虑与以下两种情况有关: (1)*Kp*组患者多为单发脓肿, 而且感染的病原体以单一病原体为主; 而*NKp*组患者中多发脓肿者较多, 多为复合菌感染, 因此在治疗时, *NKp*组出现治疗失败的可能性要高于*Kp*组; (2)发生迁徙性感染患者的预后与感染所累及的部位相关, 其中发生颅内感染的患者死亡率最高。*Kp*组患者虽然发生迁徙性感染的比例要高于*NKp*组, 但是*Kp*组发生颅内感染患者的比例要低于*NKp*组, 所以*Kp*组的死亡率要低于*NKp*组。虽然两组在治疗结果上存在差异, 但是两组在疗程、住院时间上无差异。

总之, 通过本次研究我们发现, 细菌性肝脓肿的主要致病菌为肺炎克雷伯杆菌。肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与其他细菌性肝脓肿之间在临床上存在着差异: 肺炎克雷伯杆菌肝脓肿发病年龄较低, 合并糖尿病的比例高, 多为单发脓肿, 多为单病原体, 易形成迁徙性感染, 死亡率较低。非肺炎克雷伯杆菌组目前死亡率仍相当高, 临床应予足够重视。

4 参考文献

- 1 Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Shi FW, Wang LS. Pyogenic liver abscess: clinical manifestations and value of percutaneous catheter drainage treatment. *J Formos Med Assoc* 1990; 89: 571-576
- 2 Lee KT, Wong SR, Sheen PC. Pyogenic liver abscess: an audit of 10 years' experience and analysis of risk factors. *Dig Surg* 2001; 18: 459-465; discussion 465-466
- 3 Chang SC, Fang CT, Hsueh PR, Chen YC, Luh KT. *Klebsiella pneumoniae* isolates causing liver abscess in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37: 279-284
- 4 Wang JH, Liu YC, Lee SS, Yen MY, Chen YS, Wang JH, Wann SR, Lin HH. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1434-1438
- 5 Lederman ER, Crum NF. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 322-331
- 6 Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS.

■应用要点

通过对肝脓肿患者自然情况、伴发基础疾病、临床表现、实验室检查、肝脓肿特点的分析, 尽早对肝脓肿的病原体做出初步判断, 有利于医生在尚未获得微生物证据之前尽早选择有效的初始治疗, 从而改善患者的预后。

■同行评价

本研究从自然情况、伴发基础疾病、临床表现、实验室检查、肝脓肿特点、治疗和预后等方面进行对比分析,总结出肺炎克雷伯杆菌肝脓肿的临床特点,结果可靠准确,统计方法使用恰当,结论明确。

- Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1654-1659
- 7 万建华, 赵金满, 宋健. 细菌性肝脓肿致病菌及耐药性分析138例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1367-1369
- 8 Fang FC, Sandler N, Libby SJ. Liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 991-992
- 9 Fung CP, Chang FY, Lee SC, Hu BS, Kuo BI, Liu CY, Ho M, Siu LK. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut* 2002; 50: 420-424
- 10 Kuo CM, Kuo CH, Changchien CS. Liver abscess in patients with cirrhosis of the liver: a 12-year experience. *J Gastroenterol* 2001; 36: 552-556
- 11 Chema RF, Hall GS, Keys TF, Procop GW. Microbiology of liver abscesses and the predictive value of abscess gram stain and associated blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 245-248
- 12 Yang CC, Chen CY, Lin XZ, Chang TT, Shin JS, Lin CY. Pyogenic liver abscess in Taiwan: emphasis on gas-forming liver abscess in diabetics. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1911-1915
- 13 Alvarez Perez JA, Gonzalez JJ, Baldonado RF, Sanz L, Carreno G, Junco A, Rodriguez JL, Martinez MD, Jorge JJ. Clinical course, treatment, and multivariate analysis of risk factors for pyogenic liver abscess. *Am J Surg* 2001; 181: 177-186
- 14 Seeto RK, Rockey DC. Pyogenic liver abscess. Changes in etiology, management, and outcome. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75: 99-113
- 15 Barakate MS, Stephen MS, Waugh RC, Gallagher PJ, Solomon MJ, Storey DW, Sheldon DM. Pyogenic liver abscess: a review of 10 years' experience in management. *Aust N Z J Surg* 1999; 69: 205-209
- 16 Wong WM, Wong BC, Hui CK, Ng M, Lai KC, Tso WK, Lam SK, Lai CL. Pyogenic liver abscess: retrospective analysis of 80 cases over a 10-year period. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1001-1007
- 17 Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamamoto N, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Nakano T. Clinicopathological analysis of liver abscess in Japan. *Int J Mol Med* 2002; 10: 627-630
- 18 Lee HL, Lee HC, Guo HR, Ko WC, Chen KW. Clinical significance and mechanism of gas formation of pyogenic liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2783-2785
- 19 Cheng HP, Siu LK, Chang FY. Extended-spectrum cephalosporin compared to cefazolin for treatment of *Klebsiella pneumoniae*-caused liver abscess. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2088-2092
- 20 Lim KH, Tan YM, Chow PK. Liver abscess metastasizing to prostate and lung. *J R Soc Med* 2002; 95: 554-555

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。

多药耐药基因蛋白在贲门癌组织中的表达及其临床价值

史宏灿, 石维平, 束余声, 陆世春, 王康, 顾学文, 田秀春

史宏灿, 石维平, 束余声, 陆世春, 王康, 扬州大学临床医学院胸心外科 江苏省扬州市 225001

顾学文, 田秀春, 扬州大学临床医学院病理科 江苏省扬州市 225001

史宏灿, 2003年第二军医大学博士研究生毕业, 副教授, 副主任医师, 主要从事胸部肿瘤的基础与外科临床研究.

通讯作者: 史宏灿, 225001, 江苏省扬州市南通西路98号, 扬州大学临床医学院胸心外科. shcan111@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-04-06

Expression of P-glycoprotein, glutathione S-transferase- π , topoisomerase II and lung resistance protein in cardiac carcinoma and their clinical significances

Hong-Can Shi, Wei-Ping Shi, Yu-Cheng Shu, Shi-Chun Lu, Kang Wang, Xue-Wen Gu, Xiu-Chun Tian

Hong-Can Shi, Wei-Ping Shi, Yu-Sheng Shu, Shi-Chun Lu, Kang Wang, Department of Cardiothoracic Surgery, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Xue-Wen Gu, Xiu-Chun Tian, Department of Pathology, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hong-Can Shi, Department of Cardiothoracic Surgery, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. shcan111@yahoo.com.cn

Received: 2006-03-15 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To investigate the expression of multidrug resistant proteins and their clinical significances in cardiac carcinoma tissues.

METHODS: The expression of P-glycoprotein (P-gp), glutathione S-transferase- π (GST- π), topoisomerase II (Topo-II) and lung resistance protein (LRP) in 69 patients with cardiac carcinoma were determined by SP immunohistochemistry, and the results were studied in correlation with clinicopathological data.

RESULTS: The positive rates of P-gp, GST- π , Topo-II and LRP expression in cardiac carcinoma (49.2%, 75.4%, 68.1% and 58%, respectively)

were all higher than those in the normal tissues (0, 30%, 20% and 0, respectively, all $P < 0.01$). The expression of P-gp was correlated with clinical staging (I, II vs III, IV: 28.6% vs 58.3%, $P < 0.05$) and lymphatic metastasis (metastasis vs non-metastasis: 67.5% vs 24.1%, $P < 0.01$). A significant correlation was found between GST- π and differentiated degree (40%, 75.8% and 88.5% for high, moderate, and low differentiation, respectively, $P < 0.05$), clinical staging (I, II vs III, IV: 57.1% vs 83.2%, $P < 0.05$) and lymphatic metastasis (metastasis vs non-metastasis: 87.5% vs 58.6%, $P < 0.05$). The level of Topo-II expression was associated with differentiated degree (33.3%, 69.7%, and 80.7%, for high, moderate, and low differentiation, respectively, $P < 0.01$), but not with the clinical staging ($P > 0.05$) and lymphatic metastasis ($P > 0.05$). LRP expression was in correlation with the clinical staging (I, II vs III, IV: 38% vs 66.6%, $P < 0.05$), and lymphatic metastasis (metastasis vs non-metastasis: 70.0% vs 41.4%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Primary multidrug resistance coexists in cardiac carcinoma. Combined determination of P-gp, GST- π , Topo-II and LRP is useful for predicting the chemosensitivities and optimizing the chemotherapy strategies.

Key Words: Cardiac neoplasms; Multidrug resistance; P-glycoprotein; Glutathione-s-transferases; Topoisomerase-II; Lung resistance protein

Shi HC, Shi WP, Shu YC, Lu SC, Wang K, Gu XW, Tian XC. Expression of P-gp, GST- π , Topo-II and LRP in cardiac carcinoma and their clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1587-1591

摘要

目的: 研究耐药基因P-糖蛋白(P-gp)、谷胱甘肽S-转移酶(GST- π)、拓扑异构酶II(Topo-II)和肺耐药相关蛋白(LRP)在贲门癌组织中表达及其临床意义.

方法: 采用免疫组化SP法检测P-gp, GST- π , Topo-II和LRP在69例贲门癌组织中的表达

■背景资料

贲门癌是发病率 and 死亡率均很高的消化系统恶性肿瘤, 其生物学行为的特殊性, 使其在早期极易发生多途径、多部位的转移. 化疗是贲门癌术后综合治疗的重要组成部分. 影响化疗疗效的因素很多, 而致化疗失败的最重要原因是肿瘤细胞对抗癌药物的耐药, 其中多药耐药(MDR)现象是研究的重点和热点.

■创新盘点

本文对贲门癌手术切除组织标本中耐药基因蛋白如P-糖蛋白(P-gp)、胎盘型谷胱甘肽S-转移酶(GST- π)和DNA拓扑异构酶-II(Topo-II)和肺耐药相关蛋白(LRP)的表达状况进行测定,研究表明,贲门癌存在多个耐药基因的共同表达,联合检测有助于对化疗药物敏感性作前瞻性预测和化疗方案的优化组合。

状况。

结果: P-gp, GST- π , Topo-II 和 LRP 在贲门癌组织中阳性表达分别为 49.2%, 75.4%, 68.1% 和 58%, 均高于正常组织(0, 30%, 20% 和 0, $P < 0.01$)。随分化程度由高到低, P-gp 阳性表达率分别为 40%, 42.4%, 61.5%, 差异无显著意义($P > 0.05$), GST- π 表达率分别为 40%, 75.8% 和 88.5%, 差异有显著意义($P < 0.05$), Topo-II 表达率分别为 33.3%, 69.7% 和 80.7%, 差异有显著意义($P < 0.01$), LRP 表达率分别为 50%, 54.5% 和 65.3%, 差异无显著意义($P > 0.05$)。临床分期 I、II 期和 III、IV 期中, P-gp 阳性表达率分别为 28.6% 和 58.3%, 差异有显著意义($P < 0.05$), GST- π 表达率分别为 57.1% 和 83.2%, 差异有显著意义($P < 0.05$), Topo-II 表达率分别为 57.1% 和 72.9%, 差异无显著意义($P > 0.05$), LRP 表达率分别为 38% 和 66.6%, 差异有显著意义($P < 0.05$)。在有无淋巴结转移分组中, P-gp 阳性表达率分别为 67.5% 和 24.1%, 差异有显著意义($P < 0.01$), GST- π 表达率分别为 87.5% 和 58.6%, 差异有显著意义($P < 0.05$), Topo-II 表达率分别为 65% 和 72.4%, 差异无显著意义($P > 0.05$), LRP 表达率分别为 70% 和 41.4%, 差异有显著意义($P < 0.05$)。四种耐药基因在贲门癌组织中存在共同表达。

结论: 贲门癌存在多个耐药基因的共同表达, 联合检测有助于对化疗药物敏感性作前瞻性预测和化疗方案的优化组合。

关键词: 贲门癌; 多药耐药; P-糖蛋白; 谷胱甘肽S-转移酶; 拓扑异构酶-II; 肺耐药相关蛋白

史宏灿, 石维平, 束余声, 陆世春, 王康, 顾学文, 田秀春. 多药耐药基因蛋白在贲门癌组织中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1587-1591

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1587.asp>

0 引言

肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR)是贲门癌化学治疗难以取得实质性进展的主要障碍,也是贲门癌临床治疗失败最主要的原因之一。贲门癌耐药产生的机制异常复杂,是多基因参与,多阶段、多因素共同作用的结果,多药耐药基因及其表达产物在肿瘤细胞耐药机制中发挥重要作用。多药耐药的特点是一旦对某种化疗药物产生耐药,对不同类型的多种结构、细胞靶点和作用机制迥然不同的抗癌药物同时产生耐药性^[1-3]。我们采用免疫组织化学技术对

贲门癌手术切除组织标本中多个耐药基因蛋白如P-糖蛋白(P-gp)、胎盘型谷胱甘肽S-转移酶(GST- π)和DNA拓扑异构酶-II(Topo-II)和肺耐药相关蛋白(LRP)的表达状况进行研究,旨在从临床病理的角度阐明多药耐药的产生机制,为贲门癌可预见性选择有效化疗药物和寻找克服耐药的有效途径提供有价值的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2005-06我院胸外科手术切除的贲门癌组织标本69例,均为腺癌。术前未接受化疗或免疫治疗。男性46例,女性23例;年龄37-78岁(56 ± 3.5)。按照国际抗癌联盟(UICC)1985年TNM分期: I, II 期21例, III, IV 期48例。伴淋巴结转移40例,无淋巴结转移29例。对照组为经病理证实正常胃底黏膜组织标本20例,取自胃十二指肠溃疡行胃大部切除者。

1.2 方法 标本经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m连续切片2张,分别行HE染色核实诊断和免疫组化染色。免疫组织化学分析采用美国GBI公司推出的二步法。试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,染色步骤按操作说明书进行。DAB显色, PBS代替一抗作阴性对照,相同染色条件下已知阳性片作为阳性对照。显微光镜下以细胞膜、胞质、胞核中出现粗细一致的棕黄色颗粒为阳性染色。按切片中阳性细胞占全部细胞数的百分数,表达强度分为4级^[4]: 癌细胞阳性数<10%为阴性, 10%-25%癌细胞呈阳性定为阳性(+); 25%-75%癌细胞明显阳性定为中度阳性(++); >75%癌细胞阳性则为强阳性(+++)。

统计学处理 两组阳性率差别的假设检验用 χ^2 检验,采用SPSS10.0软件包完成统计学处理。

2 结果

2.1 P-gp的表达 P-gp阳性棕黄色染色主要位于细胞膜,少数胞质也着色(图A)。在69例贲门癌组织中有34例表达阳性,阳性率49.2%,而正常胃黏膜组织中P-gp均为阴性,两者比较差异具有极显著意义($P < 0.01$); III, IV 期组织中P-gp阳性表达率为58.3%, I, II 期为28.6%,两者比较差异具有显著意义($P < 0.05$); 40例伴淋巴结转移组P-gp阳性率为67.5%,而在29例无淋巴结转移的标本中阳性率仅为24.1%,两者比较差异有显著意义($P < 0.01$);随着细胞分化程度由高度、中度到低度分化,其阳性率分别为40.0%, 42.4%和61.5%,三者之间差异无显著意义($P > 0.05$)。

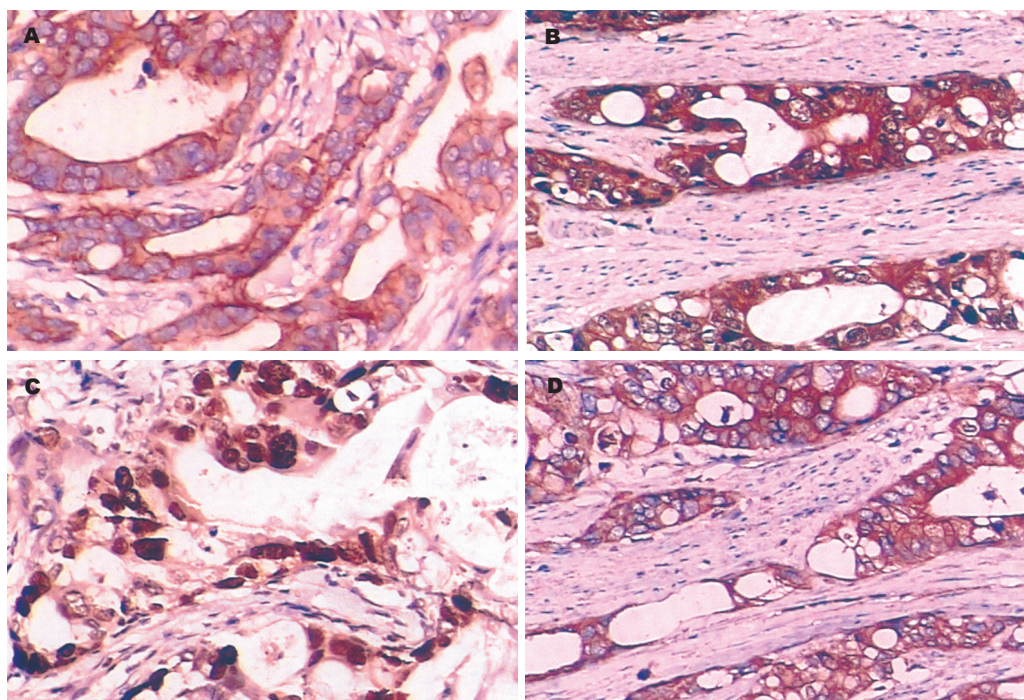


图1 贲门腺癌组织, P-gp, GST- π , Topo-II 及LRP的表达(SP X 200). A: P-gp细胞膜阳性; B: GST- π 细胞质阳性; C: Topo-II细胞核阳性; D: LRP细胞质阳性.

2.2 GST- π 的表达 GST- π 阳性者胞质呈棕黄色(图B). 在69例贲门癌组织中GST- π 阳性表达率达75.4%(52/69), 而正常胃黏膜组织中可见6例(30%)弱阳性表达, 两者比较差异具有显著意义($P<0.01$); 随分化程度由高度、中度到低度分化, 其阳性率分别为40.0%、75.8%和88.5%, 差异具有显著意义($P<0.05$); III、IV期组织标本中阳性表达率(83.2%)高于I、II期(57.1%), 差异有显著意义($P<0.05$). 40例伴淋巴结转移组P-gp阳性率为87.5%, 而在29例无淋巴结转移的标本中阳性率为58.6%, 两者比较差异有显著意义($P<0.05$).

2.3 Topo-II的表达 Topo-II阳性者胞核染成棕黄色, 胞质及胞膜均无着色(图C). 69例贲门癌组织中Topo-II阳性表达率达68.1%(47/69), 而正常胃黏膜组织中可见4例(20%)弱阳性表达, 两组比较差异具有显著意义($P<0.01$); 随分化程度由高度、中度到低度分化, 其阳性率分别为33.3%、69.7%和80.7%, 差异具有显著意义($P<0.01$); III、IV期组织标本中阳性表达率为72.9%, I、II期阳性表达率为57.1%, 差异无显著意义($P>0.05$). 40例伴淋巴结转移组Topo-II阳性率为65.0%, 而在29例无淋巴结转移的标本中阳性率为72.4%, 两者比较差异无显著意义($P>0.05$).

2.4 LRP的表达 LRP着色部位在细胞质(图

D). 在69例贲门癌组织中LRP阳性表达率达58.0%(40/69), 正常胃黏膜组织中LRP表达均阴性, 两组比较差异具有显著意义($P<0.01$). 随分化程度由高度、中度到低度分化, 其阳性率分别为50.0%、54.5%和65.3%, 其表达率逐渐增高, 虽然差别未达统计学意义, 但从百分数的差别提示分化程度与化疗敏感性之间有一定的联系; III、IV期组织标本中阳性表达率为66.6%, I、II期表达率为38%, 差异有显著意义($P<0.05$). 40例伴淋巴结转移组阳性率为70%, 而在29例无淋巴结转移的标本中阳性率仅为41.4%, 两者比较差异有显著意义($P<0.05$).

2.5 P-gp, GST- π , Topo-II 和LRP的共表达 在69例贲门癌标本中, P-gp与GST- π , P-gp与Topo-II, P-gp与LRP, GST- π 与Topo-II, LRP与GST- π , LRP与Topo-II以及P-gp, GST- π , Topo-II 和LRP 四者共同表达的阳性率分别为23.2%(16/69), 15.9%(11/69), 11.6%(8/69), 13.0%(9/69), 26.1%(15/69), 7.24%(5/69)和5.8%(4/69).

3 讨论

目前, 贲门癌治疗仍是以手术为主的多学科综合治疗. 由于贲门癌发病隐匿, 就诊时已至病情晚期以及较早出现侵袭、转移的生物学特性, 使得手术的局限性越来越明显. 因此, 化学治疗在贲门癌综合治疗中的地位和作用日益重要. 近年来,

尽管新的细胞毒性药物的开发使包括实体瘤在内的许多肿瘤的治疗有了明显改观,但由于肿瘤细胞对多种化疗药物产生交叉耐药性,贲门癌的化疗治疗仍然难以取得重要进展.肿瘤耐药是多基因参与的结果,了解耐药基因的表达,对于选择合适的治疗方案、判断预后和寻找有效的逆转肿瘤耐药的方法都是有益的.如何在贲门癌化疗前检测肿瘤的多药耐药性,对选择合适的治疗手段,尤其是行之有效的化疗方案极具参考价值.

P-gp由多药耐药基因MDR1编码,是一种ATP依赖性药物排出泵,通过耗能将细胞内药物多柔比星、紫杉醇、长春新碱类等亲脂类药物泵出细胞外,使细胞内药物浓度下降,由此产生耐药性,P-gp是肿瘤细胞产生MDR现象的重要分子生物学基础^[5-8].王延明 *et al*^[9]研究表明,贲门癌组织中存在着原发性MDR1基因表达,并与转移淋巴结组织的MDR1基因表达具有一致性.本研究资料显示,P-gp在贲门癌组织中阳性表达率为49.2%,伴淋巴结转移者,其P-gp阳性表达率明显高于无淋巴结转移者,这一结果与上述报道基本一致,表明P-gp表达不但反映出贲门癌的多药耐药状况,还可作为一种预测指标评价肿瘤患者的预后.

GSTs是与人体解毒功能有关的一组同功酶系,临床应用的许多抗癌药物(如DDP、阿霉素、丝裂霉素等)都是该酶的底物,该酶能通过将外源性抗癌药物与GSH耦联而促进毒性分子排出,减轻细胞毒性.其中GST- π 是肿瘤细胞和组织中最常见的同工酶,在许多耐药细胞特别是MDR表型的细胞系中高水平表达,故认为GST- π 的高表达可能是耐药性标志之一^[10-13].本结果显示,69例贲门癌组织中GST- π 阳性表达率达75.4%,而正常胃黏膜组织仅见6例弱阳性表达,而且肿瘤分化程度越低以及临床分期越晚其表达愈强,分析可能与GST- π 在肿瘤恶性化转变过程中被诱导激活而获得较多的表达量有关.因此GST- π 阳性表达能很好地预测贲门癌化疗耐药并对优化药物选择有价值.

拓扑异构酶II是DNA复制时必需的酶,催化单链或双链DNA短暂的断裂分离以利复制.当基因发生突变时,抗癌药物不能与其结合,从而产生耐药^[14-15].Topo-II活性、剂量的改变均与多种抗癌药物的细胞毒效应有关,其中较为敏感的抑制剂有阿霉素、依托泊苷,其次为铂类以及5-FU等^[16].本资料显示,Topo-II在初治性

贲门癌组织中其阳性表达率达68.1%,表明Topo-II构成了贲门癌化疗原发性耐药的不可忽视的又一重要机制.在Topo-II阳性标本中,我们观察到低分化肿瘤细胞内其表达水平明显高于中高分化者,提示可能由于分化差的肿瘤因增殖率快而引起Topo-II含量升高.因此针对Topo-II含量高的肿瘤可选择Topo-II抑制剂进行针对性治疗,这对提高疗效很有帮助.

LRP是一种非糖蛋白,与P-gp的作用机制不同,主要通过核靶点屏蔽机制引起MDR^[17-19].Kolfshoten *et al*^[20]研究表明,LRP表达水平和对顺铂、环磷酰胺的敏感程度成负相关,和阿霉素无关,并认为LRP阳性表达对预测顺铂的敏感性更为特异.本研究显示,LRP在肿瘤组织中的表达率以及表达强度明显高于正常组织,与临床期别及有无淋巴结转移具有较强的相关性,其临床意义在于其表达可作为临床肿瘤预后及化疗敏感性的指标,有助于化疗药物的选择.

Szakacs *et al*^[21]研究表明,耐药相关标志物的共表达率很高,并且不同类型耐药标志物表达谱差异很大,共表达是耐药相关标志物受共同因子调控的证据.由于肿瘤耐药涉及多个基因参与,因此,同时检测多个基因的表达能更好地判断预后.本研究表明,贲门癌组织中存在原发的多个耐药基因的共同表达现象.P-gp、GST- π 、Topo-II、LRP在贲门癌中共同表达分别介导典型MDR和at-MDR,这些因素之间可以相互影响,共同作用,造成贲门癌对多种抗肿瘤药物的交叉耐药,同时亦为耐药逆转剂的研究提出新的课题.

因此,我们认为,尽管以上四种耐药基因蛋白在贲门癌组织中存在程度不等的阳性表达率,但由于特异性差,尚不能分别成为评判化疗的单独指标.只有通过贲门癌组织中进行多基因的联合检测,才能更客观全面的筛选对不同耐药机制的高效低毒药物,这有助于指导个体化化疗方案的确定和前瞻性地优化化疗药物.我们期望对贲门癌多药耐药与患者预后作深入的探讨,这将对进一步阐明肿瘤多药耐药机制,设计合理的药物逆转策略,减少化疗盲目性,提高疗效预见性,改善患者预后具有重要的临床价值.

4 参考文献

- 1 Olson DP, Taylor BJ, La M, Sather H, Reaman GH, Ivy SP. The prognostic significance of P-glycoprotein, multidrug resistance-related protein 1 and lung resistance protein in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of 295 newly diagnosed patients by the Children's

- Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 681-691
- 2 Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, Lee KH, Seo JJ, Moon HN, Ghim T. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 253-258
- 3 Liscovitch M, Lavie Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *IDrugs* 2002; 5: 349-355
- 4 郭鹏, 卢红, 陈玉林, 宿向东, 陈卉. 非小细胞肺癌多药耐药蛋白表达的临床意义. *四川肿瘤防治* 2005; 18: 144-147
- 5 Ruiz Gomez MJ, Souviron Rodriguez A, Martinez Morillo M. P-glycoprotein, a membrane pump that represents a barrier to chemotherapy in cancer patients. *An Med Interna* 2002; 19: 477-485
- 6 Loo TW, Clarke DM. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol* 2005; 206: 173-185
- 7 Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, van der Valk P, Scheper RJ, Harding BN, Thom M. Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32: 51-63
- 8 Callaghan R, Ford RC, Kerr ID. The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett* 2006; 580: 1056-1063
- 9 王延明, 王爱民, 高萍, 高志霞. MDR1基因表达与贲门癌病理特征的关系. *临床与实验病理学杂志* 2000; 16: 129-130
- 10 Soh Y, Goto S, Kitajima M, Moriyama S, Kotera K, Nakayama T, Nakajima H, Kondo T, Ishimaru T. Nuclear localisation of glutathione S-transferase pi is an evaluation factor for drug resistance in gynaecological cancers. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005; 17: 264-270
- 11 Gate L, Majumdar RS, Lunk A, Tew KD. Influence of glutathione S-transferase pi and p53 expression on tumor frequency and spectrum in mice. *Int J Cancer* 2005; 113: 29-35
- 12 Lu C, Spitz MR, Zhao H, Dong Q, Truong M, Chang JY, Blumenschein GR Jr, Hong WK, Wu X. Association between glutathione S-transferase pi polymorphisms and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 441-447
- 13 Dang DT, Chen F, Kohli M, Rago C, Cummins JM, Dang LH. Glutathione S-transferase pi1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 9485-9494
- 14 Duca M, Guianvarc'h D, Oussedik K, Halby L, Garbesi A, Dauzonne D, Monneret C, Osheroff N, Giovannangeli C, Arimondo PB. Molecular basis of the targeting of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by VP16 derivatives conjugated to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 1900-1911
- 15 Di Leo A, Isola J. Topoisomerase II alpha as a marker predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer: are we at the end of the beginning? *Clin Breast Cancer* 2003; 4: 179-186
- 16 Koshiyama M, Fujii H, Kinezaki M, Yoshida M. Correlation between Topo II alpha expression and chemosensitivity testing for Topo II-targeting drugs in gynaecological carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21: 905-910
- 17 Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippe J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2006; 42: 295-309
- 18 Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2004; 122: 166-171
- 19 Petraccia L, Onori P, Sferra R, Lucchetta MC, Liberati G, Grassi M, Gaudio E. [MDR (multidrug resistance) in hepatocarcinoma clinical-therapeutic implications. *Clin Ter* 2003; 154: 325-335
- 20 Kolfschoten GM, Hulscher TM, Pinedo HM, Boven E. Drug resistance features and S-phase fraction as possible determinants for drug response in a panel of human ovarian cancer xenografts. *Br J Cancer* 2000; 83: 921-927
- 21 Szakacs G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathol Oncol Res* 1998; 4: 251-257

电编 李琪 编辑 潘伯荣

肝细胞癌基础研究的某些进展

李冬, 张建中

■背景资料

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 我国每年新发病例约占全球的45%, 已成为世界上肝癌发病最集中的地区。经过近半个世纪的努力, 我国医务工作者在肝癌的防治上已取得了举世瞩目的成绩。但肝癌发生发展迅猛、复发率和转移率很高, 要提高肝癌患者生存率应加强肝癌的基础研究, 促进肝癌早期诊断技术和生物治疗的发展。

李冬, 张建中, 中国人民解放军306医院病理科 北京市100101

全军十五科基金课题资助项目, No.01MA071

通讯作者: 张建中, 100101, 北京市安翔北路9号, 中国人民解放军306医院病理科. zhangjz55@sina.com

电话: 010-66356237 传真: 010-64871261

收稿日期: 2006-02-24 接受日期: 2006-05-15

摘要

在肝细胞癌(HCC)发生发展过程中, 伴随着原癌基因和抑癌基因的突变, 各种参与调控的细胞因子表达也发生异常并最终影响疾病的进程和转归。目前对肝细胞癌的分子病理学研究已经集中在这些细胞因子的异常表达及其相互关系网络上, HBx蛋白、SAM、TGF等细胞因子的研究已经十分深入, 而且, 随着各种新技术的应用, 更多的低丰度调控蛋白也逐渐被发现, 其在肝细胞癌细胞增殖调控、异常分化、衰老和凋亡调节以及肿瘤演进等方面起着重要作用。

关键词: 肝细胞癌; 癌基因; 抑癌基因; 突变; 细胞因子

李冬, 张建中. 肝细胞癌基础研究的某些进展. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1592-1601

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1592.asp>

0 引言

肝细胞癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 因其病程进展迅速, 恶性程度高, 治疗困难, 长久以来一直为基础和临床科研人员所关注。随着人类基因组计划的完成、蛋白质组计划的全面展开以及各种新技术的广泛应用, 肝细胞癌的基础研究也进入了一个全新的领域。特别是蛋白指纹技术(SELDI)的出现, 使科研人员可以将目光集中在fmol级的小分子、低丰度蛋白上, 大大提高了实验的精确性和特异性。目前, 对肝细胞癌的研究重点涉及癌基因遗传学改变、异常基因表达对蛋白调控的影响以及蛋白因子相互作用网络等方面, 随着这些研究的深入, 人们对肝细胞癌病理学特点的认识也进入到一个全新的阶段。本文主要就近年来肝细胞癌基础

研究的某些进展做一介绍, 重点讨论肝癌分子病理学研究中的几个热点问题。

1 细胞增殖的调控

肝细胞癌的发生发展是一多环节、多步骤的复杂过程, 受环境和遗传双重因素的影响。在环境因素当中, 对乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染、黄曲霉毒素B1、乙醇性肝硬化致癌作用的研究都已取得相当大的进展, 但患者遗传背景的差异在肝癌发生学上的意义尚不十分明了。

癌细胞与正常细胞的不同之处首先在于增殖失控, 常表现为细胞周期进程对生长因子和细胞黏附的非依赖性。在这个过程当中, 细胞周期相关因子自身的变化、参与的信号转导途径异常都可以引起异常增殖调控。

在HBV诱发肝细胞癌的过程中, X蛋白比其他HBV编码蛋白(如前S蛋白)似乎起更为重要的作用^[1]。X蛋白是HBV基因组编码的一种多功能蛋白, 其功能包括酪氨酸磷酸激酶活性、p53蛋白结合活性、肝癌候补基因的转录激活、FAK、Src激酶活化作用^[2-3]及DNA切除修复系统抑制作用等。在氯霉素乙酰转移酶实验中, HBx蛋白通过影响p53基因启动子上的E-box单元, 明显抑止了p53基因的表达, 进而抑止了p53介导的转录激活, 使肝癌细胞抑癌蛋白PTEN的表达下调, 激活AKT信号通路, 促使细胞异常增生。与此同时, p53抑止HBV增强子活性的能力也已被早先的实验所证实。这些证据提示, p53和HBx在蛋白水平上相互抑制的转化在HBV相关肝细胞癌形成中可能起到决定性的作用。然而, Zhu *et al*^[4]认为, 单纯HBx基因表达并不足以引起肝细胞癌, 但可能是细胞恶性转变的一个促进因素。该实验是将C57-TgN(HBx)转基因鼠和C57BL/6系小鼠分组后进行单剂量二乙基亚硝胺(DEN)对照处理, 发现在DEN处理组转基因鼠较C57BL/6小鼠表现出更明显的肝细胞嗜碱性变, 肝细胞癌和肝细胞腺瘤发生率亦明显增加。

HCV感染是肝细胞癌的另一个重要诱发因素,其中2 a基因型病毒常见复制性感染,而1 a基因型病毒伴有肝硬变和肝癌,并对IFN治疗相对耐受^[5]。尽管由HCV引发的肝细胞癌发病机制尚不清楚,但其编码的非结构蛋白5A(NS5A)确实表现出一种细胞增殖调控活性^[6]。NS5A可以激活转录信号传导及激活因子3家族(STAT3)的磷酸化作用,后者进而易位进入细胞核。在体外研究中,STAT3的激活作用也可以在表达HCV NS5A的转基因鼠内观察到。应用荧光素酶基因表达法显示,肝细胞中NS5A调控STAT3下游分子Bcl-xL和p21的表达。与此同时,NS5A还通过与Jak1激酶的协同作用活化STAT3,最终引起细胞异常增殖。脱- γ -羧基凝血素(DCP)也可以导致细胞膜表面受体Met磷酸化并通过Janus激酶1活化STAT3信号传导通路^[7],但DCP并不影响分裂素活化的蛋白激酶通路、Myc信号通路和磷酸肌醇3-激酶/Akt通路。

此外,在长期黄曲霉素作用下,p53基因的249号密码子可能发生特异性突变(p53mt249),由AAG突变为AGT^[8]。p53基因作为最早发现的抑癌基因之一,可以抑制胰岛素样生长因子受体(IGF- I receptor, IGF-IR)和内生型胰岛素样生长因子II (insulin-like growth factor II, IGF- II)P3转录子的表达,进而抑制肿瘤生长。IGF- II通过与IGF-IR结合,调控酪氨酸激酶活性,刺激肝癌细胞的增殖及分化。p53mt249通过自分泌和旁分泌途径同时上调了配体IGF- II和受体IGF-IR的表达,引起癌细胞分裂失控^[9],部分获得促进G₀细胞向G₁期转变的功能。Kong *et al*^[10]指出,在体外转录实验中,锤头核酶(RZ)对突变p53基因的降解率达42%,同时并不清除野生型p53,这提示锤头核酶作为一种全新的肝细胞癌基因治疗方法,可能具有广阔的研究前景。

肝细胞癌中IGF- II表达水平的变化目前正引起病理学者们的注意,在肝细胞癌病灶和外周血中,游离IGF- II的表达均较正常水平明显升高,并与增殖细胞核抗原(PCNA)水平直接相关,可以作为肝细胞癌(HCC)诊断、肝外转移灶鉴别诊断和监测术后复发的标记物加以利用^[11-12]。而Alexia *et al*对HepG₂和Huh-7肝细胞癌细胞系进行对比研究后指出,不同肝细胞癌细胞系对IGF- II的反应有所不同,而IGF- I / II的自分泌/旁分泌途径促成HCC细胞增殖,并在体内抵抗细胞凋亡^[13]。此外,在动物实验中,人源化抗IGF-IR抗体h7C10与化疗药物或针对其他生长因子

受体(如表皮生长因子受体)的抗体联合应用具有潜在的抗癌作用^[14]。

在细胞周期中,调节细胞增殖的主要事件发生在G₁期,因此,G₁期蛋白的异常表达与肿瘤形成关系十分密切。Peng *et al*^[15]对手术切除术后的肝癌进行回顾性研究后发现,细胞周期蛋白D1表达下调与大体积肝细胞癌(>2.5 cm)以及分化不良(III-IV级)肝细胞癌密切相关,细胞周期蛋白E的异常过表达是致癌性转化的重要标志,并与分化不良及侵袭性癌呈正相关。同时,细胞周期蛋白D1表达下调、细胞周期蛋白E的上调与p53基因突变有高度关联。由此可见,G₁期细胞周期蛋白表达紊乱与p53基因突变密切相关,这些改变对于肝细胞癌的预后具有重要指导意义。

甲基化状态异常在肿瘤发展中的作用已受到日益广泛的重视,这种异常主要包括抑癌基因高甲基化和癌基因的低甲基化,前者使抑癌基因表达受到抑制,而后者则使癌基因表达上调。肿瘤细胞转录程序的转变(如细胞癌变过程中氧化应激性改变)也使基因表达发生异常。有研究发现,在瘤组织及癌前病变中,伴随着DNA的低甲基化,S-腺苷甲硫氨酸(SAM)表达降低;而给予6 moSAM持续治疗后,肿瘤结节明显缩小。另外,其他观察也支持SAM对肝细胞癌有化学性抑制作用^[16]:(1)外源性SAM可重新构建肝细胞癌癌前病变和肿瘤肝损伤的SAM代谢池;(2)在肝损伤中,DNA的甲基化程度与SAM/SAH(S-腺苷高半胱氨酸)比率呈正相关;(3)DNA甲基转移酶抑制因子5-氮胞苷可被SAM抑制,而促使肝细胞DNA甲基化;(4)c-Ha-ras、c-Ki-ras和c-myc基因在癌前病变中呈低甲基化过表达状态,其表达与SAM/SAH比率呈负相关;(5)SAM可促使细胞DNA全面甲基化。

端粒在体细胞中被认为是细胞的“分裂钟”,随着细胞的分裂而逐渐缩短,以保证体细胞仅具有有限的增殖特性。在癌细胞增殖过程中,端粒末端转移酶被再激活而保持端粒的长度,使端粒“分裂钟”的控制功能失效。目前,对肝细胞癌中端粒末端转移酶作用的研究正在逐步深入。Oh *et al*^[17]通过对慢性肝炎(CH)、低度不典型增生结节(LGDNs)、高度不典型增生结节(HGDNs)、HCC结节中末端限制酶切片断长度(TRFL)和端粒酶活性(TA)进行比较后发现,TRFL和TA在LGDNs和HGDNs中的表达明显不同。大多数LGDNs表达TRFL和TA水平接近CH,

■研究前沿

肝癌研究热点主要集中在肝炎病毒感染、细胞凋亡、癌基因和抑癌基因与肝癌的关系、肝癌演进的分子机制、细胞因子在肝癌发生发展中的作用等方面。

■同行评价

本文介绍了肝细胞癌发生发展过程中一些细胞因子的异常表达及其相互关系,内容丰富,新颖,能反映涉及到的肝细胞癌基础研究的前沿进展,具有先进性,文字流畅,可读性强。

而与HGDNs相比, LGDNs中TRFL长度减少17%, 7% LGDNs表达高水平的TA, HGDNs表达TRFL和TA水平与HCC十分接近。由此可见, 在早期肝细胞癌发生过程中, 端粒长度缩短, 通过负反馈机制激活端粒末端转移酶, 这在从LGDNs向HGDNs转化过程中表现的非常明显。同时, HGDNs的特性被认为更接近于HCCs。而在体外试验中, HBV的X基因在转染细胞后可以明显上调端粒末端转移酶反转录酶(hTERT) mRNA的转录表达, 这在HBV感染所导致的肝癌中是一种新的作用机制^[18]。

干扰素(IFN)作为临床常用的抗肿瘤药物, 可以明显延缓术后复发并改善预后^[19], 尽管其抗癌机制尚不完全清楚, 但至少包括通过下游JAK/STAT通路在S期阻止细胞增值、干扰MEK/ERK通路^[20]以及促进细胞凋亡并抑制肿瘤相关的血管形成, 而不同亚型干扰素的抑癌作用也有明显差异, 其中, IFN- β 的抗增殖作用明显强于IFN- α , 并更倾向于提高肿瘤细胞的S期比率^[21]。在体外条件下^[22]干扰素 α Con1(IFN- α Con1)对肝细胞癌细胞系KIM-1和HAK-1B都表现出剂量相关的生长抑制作用, 随着IFN- α Con1剂量的增加, 裸鼠癌灶内的凋亡细胞明显增加, 同时肿瘤血管明显减少, 这提示了IFN- α Con1对肝细胞癌预防和治疗中的临床应用潜能。此外, 较新的研究还表明, α 干扰素家族中不同成员对不同种肝细胞癌细胞系的生长作用也各有不同^[23]。总体来说, IFN- α 8的抑制作用最强, IFN- α 2, - α 5和- α 10的抑制作用居中, 而IFN- α 1对所有肝细胞癌细胞系的抑制作用为最小。与此同时, 不同细胞系对干扰素的敏感度也不同, 这与2',5'-寡腺苷酸合成酶(2'5'-OAS)的诱导作用有关, 这种酶存在于HAK-3细胞系中, KYN-3细胞系中却不含有2'5'-OAS。

2 癌细胞的去分化

癌细胞的去分化程度常与细胞增殖、肿瘤侵袭性及预后相关: 低分化的肝细胞癌往往异常增生明显、侵袭性较强且预后不良。因此, 了解癌细胞在去分化过程中的细胞因子调控就具有十分重要的临床及科研意义。Nakano *et al*^[24]采用免疫组化技术对41例肝细胞癌患者体内P-糖蛋白(P-gp)和P53蛋白的分布情况进行分析后发现, P-gp在肝细胞癌和肝硬化中表达明显不同; 在前者, 其表达因组织分化不同也不同。在分化良好的小梁结构肝细胞癌中, P-gp主要位于小管膜

上; 在中等分化的假腺腔样肝细胞癌中, P-gp表达主要分布于腺管细胞膜的腔面上。在分化良好的肝细胞癌中, P-gp表达率为87%, 高于中等分化和分化不良的癌组织。与此相对应, 肿瘤抑制基因p53在分化良好的肝细胞癌中突变率为12.5%, 中等分化肝细胞癌为52%, 而分化不良的肝细胞癌达82.5%, 由此可见, 随着恶性肿瘤组织分化的不同, P-gp、p53的异常表达和细胞增生也随之发生变化; 同时, 动物实验也指出: 强表达P-gp的小鼠对蒽环毒素的反应不佳, 而强表达p53的小鼠对蒽醌类药物也不敏感^[25]。另外, p53表达异常在HCC中的表达与肿瘤分级有密切相关性^[26], 并且在病毒致癌过程中是一个晚期才出现的表现, 且独立于慢性病毒感染的病因学过程。

肝细胞癌在发生发展过程中, 往往伴有异常的性激素表达, 如在肝细胞癌及邻近组织中, 性类固醇前体细胞脱氢表雄烯酮转磺酶(DHEA-ST)表达明显下调, 而且早期单发肝细胞癌较晚期DHEA-ST的下调更为明显。因而, 学者普遍认为肝细胞癌中DHEA-ST的低表达与其调节肿瘤细胞去分化和演进作用有关。更深一步的研究将目光集中在EBAG9上, 作为一种雌激素应答基因, 其产物和肿瘤细胞表面抗原RCAS1相同, 而肿瘤细胞通过表达RCAS1, 可以抑制T细胞生长, 进而逃脱肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)介导的免疫监视^[27]。有学者对EBAG9/RCAS1在肝细胞癌和正常肝组织中的表达水平进行对比研究后发现^[28], 在正常肝组织中, EBAG9/RCAS1呈现稳定的低表达, 其产物均匀分布于胞质中; 在肝细胞癌的细胞膜表面和胞质中, EBAG9/RCAS1的免疫反应则呈阳性。更重要的是, EBAG9/RCAS1表达增强是和肝细胞癌低分化及更强的增殖活性密切相关, 与肿瘤转移性却无明显相关。这其中的具体机制仍需要进一步研究。但是也有学者指出^[29]: 肝细胞癌患者血清RCAS1水平并无明显临床价值, 但在胰腺-胆管癌中, 高水平的RCAS1是独立的不利预后因素。

II型磷脂酶A₂(II型PLA₂)作为一种具有跨膜结构的胞质蛋白, 在一些代谢途径中起重要的调节作用。以往曾有研究证实, 在经受手术创伤的患者血清内, II型PLA₂表现出明显的免疫活性, 而这种免疫反应的动力学和肝脏急性期反应物是相似的。以此为出发点, Ohshima *et al*^[30]对健康成人、肝细胞癌和肝胚细胞癌患者肝实质细胞内II型PLA₂的表达进行了研究, 发现仅有

少量健康对照表现出Ⅱ型PLA₂的免疫活性, 肝母细胞瘤的细胞内并未发现, 但肝细胞癌患者体内却可以检出不同程度的Ⅱ型PLA₂免疫活性, 并且, 随着肝细胞癌分化程度的升高, 这种表达也更加普遍。

HCC的细胞周期、凋亡调节细胞周期循环的引擎分子是细胞周期素和细胞周期素依赖性激酶(CD-Ks), 其中cyclin D是决定细胞周期进程的限制性因子; 而cyclin-CDK复合物的活性由细胞周期素依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase-inhibitors, CKIs)进行负调控。迄今为止已鉴定出7种CKIs, 按结构和功能的差异可分为两类: 一类是Ink4 (inhibitor of cdk4)家族, 其中包括p15、p16、p18和p19, 他们均具有特异性抑制cdk4/cdk6-cyclin D复合物的磷酸化酶活性; 另一类是Cip/Kip(CDK-interacting protein/kinase inhibitor protein)家族, 包括P21^{kip1}, P27^{kip1}和P57, 可作用于各种cyclin-CDK复合物。在HCC中, 已检测到cyclin D1基因的扩增及其表达增强。p16是CKIs中唯一可归为肿瘤抑制基因的成员, 又称多肿瘤抑制基因, 其在HCC中的变化包括缺失、点突变、启动子区的甲基化等, 是目前已知与HCC最相关的CKIs。杨建民 *et al*^[31]研究了38例肝细胞癌及癌旁肝组织P16和P21蛋白的表达, 结果发现P16蛋白的表达缺失率, 在肝细胞癌组织(58%)明显高于癌旁肝组织; 在Edmondson III-IV级肝细胞癌显著高于Edmondson I - II级HCC, 在直径>3 cm HCC显著高于直径≤3 cm早期HCC, 但在有无门脉癌栓组间比较则无明显差别。P21蛋白的表达缺失率, 在肝细胞癌也显著高于癌旁组织。但在不同分化程度、肿瘤大小及有无门脉癌栓形成组间比较则无统计学差别。该研究认为, P16蛋白的表达缺失与HCC分化程度及侵袭进展密切相关。

金属硫蛋白(MT)是一组低分子量, 富含半胱氨酸的胞内蛋白, 其作用为保护细胞免受化学损伤、氧化应激和凋亡的影响以及通过供锌激活转录因子的表达。自1957年被分离并确定结构后, 一系列研究发现^[32], MT在肺癌、结肠癌、肾癌以及睾丸癌中表达均增加, 但在肝细胞癌中其表达却是降低的, 这引起学者们的极大兴趣。目前的研究认为, MT在肝细胞癌中合成下调与其启动子的过甲基化或p53等肿瘤抑制基因的突变有关。MT在肿瘤自发及获得性耐药性的形成上有一定的作用, 但由于肿瘤耐药性是一个多因子介导的复杂现象, 因此仍需要

更多的实验数据对MT在肿瘤进展过程中的作用以及不同肿瘤内表达的差异性进行分析。与此同时, 有日本学者指出: 在肿瘤进展的不同阶段, MT的同构异型体MT1、MT2浓度有所不同^[33]。而正常肝组织中, MT以Zn-MT形式存在, 但在小HCC(<40 mm)中, MT中的Cu成分明显增加; 在大HCC(>或= 40 mm)中, MT中Cu或Zn的缺乏十分常见, 但SOD中Cu和Zn成分没有明显差别^[34]。

3 癌细胞衰老及凋亡调节

在增殖失控的同时, 肝细胞癌还表现为细胞衰老和凋亡程度减轻, 形成永生性细胞, 其发生机制与caspase、bcl-2家族以及p53基因的异常有关, 细胞周期蛋白的过表达也可以缩短肿瘤细胞周期, 加速细胞增殖并降低凋亡^[35]。目前基础研究热点主要集中在基因异常表达对凋亡的调控和蛋白相互作用机制上。以往的研究表明, 在HCC的多条染色体如1p, 4q, 6q, 8p, 13q和16p上存在高频杂合子丢失(loss of heterozygosity, LOH)^[36-38], 与代表错配修复基因通路的微卫星不稳定(MSI)相比, LOH在肝细胞癌形成过程中具有更重要的作用^[39]。而且, 与在出现临床症状之前就已经积累的复发性染色体畸变相比, HCC细胞在转移进展中出现的克隆性演化看起来十分罕见^[40]。张树辉 *et al*^[41]采用毛细管电泳DNA分析系统, 对56例HCC中染色体1p36上10个微卫星的杂合子丢失进行检测。结果发现, LOH的总频率为69%, LOH以RIZ最高, 其次为D1S199。LOH与血清AFP、HBsAg、肿瘤大小及Edmondson分级和转移等临床病理学参数无明显关系; D1S2893和D1S507基因座, 血清HBsAg阳性患者的LOH频率显著高于HBsAg阴性者; D1S199基因座, 血清AFP阳性者的LOH明显高于血清AFP阴性者; D1S468基因座, 无肝内转移者的LOH显高于肝内转移者。由此可知HCC在染色体1p36上存在广泛的LOH, 其在HCC的发生和发展过程中起重要作用, 而特定基因座的LOH与临床和病理学参数有一定的相关性。p53作为最早发现的抑癌基因之一, 其失活在肝细胞癌中十分常见, 且与不良预后密切相关。尽管P53蛋白的定位并不是很确切, 但其对p21和bax基因表达的诱导作用已被证实, 此外, p53还可以诱导CD95蛋白表达上调, 后者使肿瘤细胞倾向于进入Fas配体通路介导的细胞凋亡^[42]。

张艳玲 *et al*^[43]对细胞凋亡、增殖细胞核抗原(PCNA)、p53和Fas与肝细胞癌临床病理特

征关系进行研究后发现, 细胞凋亡指数(AI)、PCNA指数(LI)、p53和Fas表达与HCC患者的性别、年龄及肿瘤大小无显著性差异; AI、P53和Fas表达与HCC的组织学类型间也无显著差异; LI与HCC组织学类型有关: 实体型较梁状型和腺样型明显增高; 随Edmondson分级、TNM分期增加, AI逐渐减少, 而LI及p53表达强度则逐级增高, Fas表达无显著变化. 最终结论是HCC的恶性程度与细胞凋亡指数呈负相关, 而与PCNA指数呈正相关.

肝细胞癌增殖是一个多因子参与的复杂过程, 其中转化生长因子(TGF)- β 1的作用一直被人们所重视. TGF- β 1作为调节细胞增殖的重要细胞因子, 其行使功能与TGF- β II型受体(TGR2)密切相关. 在Park *et al*^[44]对化学因素导致肝细胞癌的动物研究中发现, 与临近的正常组织相比, 肝细胞癌中TGF- β 1转录子轻微增高, TGR2转录子降低. TGF- β 1诱导细胞凋亡的程度主要与细胞内TGR2的聚集有关, 在癌前病变和肝细胞癌组织中, TGR2表达的下调是导致TGF- β 1生长抑制作用丧失的主要原因, 这间接导致肿瘤细胞的克隆性增生. 而NF-kappaB、c-Src激酶以及 β 1整合素活化的MAP激酶可以抑制TGF- β 1介导的细胞凋亡过程, 因此可能在肝细胞癌的发生过程中具有一定作用^[45-47].

在肝癌治疗性研究中, 韩国学者^[48]发现外周苯并二氮卓受体(PBR)可以诱导细胞凋亡和抑制细胞周期, 前者的作用机制在于PBR能够打破线粒体的跨膜电位、活化caspase-3以及降解细胞核, 同时, PBR可以抑制凋亡抑制蛋白Bcl-2、Bcl-xl的表达, 促进癌细胞凋亡. PBR对细胞周期的抑制作用主要体现在G₁/S和G₂/M期. 通过对PBR和肿瘤增殖抑制药物紫杉醇、紫杉萜、阿霉素联合应用, 可以获得协同的抗肿瘤作用. 另外, Yu *et al*^[49]对永生化细胞和普通纤维母细胞中MK基因片段的调控活性进行了比较, 发现MK基因片段在永生化细胞中有优先活化自杀基因的作用. E1A基因上游插入MK片段的重组腺病毒(AdMK)在永生化细胞中得到优先复制, 并对其产生细胞毒作用. 在体外实验中, 人肝细胞癌细胞株与普通纤维母细胞相比, 对AdMK更为敏感. 同时, 在感染的纤维母细胞中, AdMK比野生型腺病毒的复制水平要低. 当在小鼠体内肝细胞癌组织中注射AdMK后, 可以发现癌结节生长明显迟缓并伴有细胞凋亡及坏死. 因此, 由MK启动子介导的自杀基因疗法和重组腺病毒

疗法可以在对永生系和肿瘤细胞产生细胞毒作用的同时, 将对正常细胞的损伤作用减到最低点. SJ-8026是一种新的哌嗪衍生物, 因其具有拓扑异构酶II抑制活性而被作为合成抗癌药物使用^[50], 在肝细胞癌体外试验中, SJ-8026可以抑制内皮细胞的血管形成作用并诱导细胞凋亡. 另外, 源于人HCC的Hsp-70肽复合体可以作为一种有效的肿瘤抗原激活树突状细胞(DCs), 后者可以有有效的活化特定的抗HCC的T细胞反应^[51].

4 肝细胞癌的演进

局部侵袭及远处转移是癌组织进行性发展的重要特征, 也是其预后不良的主要原因之一, 研究肝细胞癌复发与转移的相关基因表达和蛋白调控对肝癌预后判断及抗转移治疗都有重要价值, 尽管有越来越多的调控蛋白被发现, 但目前的研究大多数都仅仅停留在对蛋白表达和肿瘤临床病理指标之间的比较研究上, 调控机制的研究进展则相对缓慢. 对肝癌组织标本的分析表明, 许多基因的改变与肝癌的复发转移密切相关. 肿瘤的转移是一个与细胞间、细胞与胞外基质间黏附以及血管新生均相关的复杂过程, 黏附相关基因如整合素 α 5、CD44、金属硫蛋白酶、uPA等分子都与肝癌的转移密切相关; 另外一些基因或蛋白如KAI 1、nm23 -H1、syndecan-1、p27、类肝素酶、galectin-3等也与HCC复发转移相关. 与正常肝组织相比, 肝硬化组织的上皮细胞钙黏蛋白、金属蛋白酶组织抑制剂因子-1表达明显降低, 但基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-7表达升高, 提示为更有利于肿瘤入侵和转移的环境; I级和II级肝细胞癌的上皮细胞钙黏蛋白高表达, MMP-3和MMP-9的表达降低. 随着HCC分化程度不断降低, 上皮细胞钙黏蛋白、金属蛋白酶组织抑制剂因子-2和-3表达不断降低. 这也提示上皮细胞钙黏蛋白、金属蛋白酶组织抑制剂因子和MMPs可以作为一种预测HCC进展和转移的标记物^[52].

肿瘤血管的形成是肝细胞癌能够得以发展的重要因素, 也是目前研究的一个热点. 当肝细胞癌在肝内转移时, 伴随着动脉网的发展, 可以在窦腔内观察到层黏连蛋白沉积于IV型胶原上. Torimura *et al*^[53]在肝细胞癌内检出了针对IV型胶原的层黏连蛋白沉积物: 整合素 α 1, α 2, α 3, α 6及 β 1亚单位. 对其功能进行研究后表明: 与单独IV型胶原相比, IV型胶原与黏连蛋白的整合增强了肝细胞癌的黏连、移位、化学促动作用,

并促进MMPs的分泌, 这对癌细胞移行、黏附、穿透血管周基底膜有重要作用. 此外, IV型胶原层黏连蛋白可以明显促进肿瘤周边血管的形成. Zhang *et al*^[54]也指出, $\beta 1$ 整合素活化的MAP激酶在转化生长因子 $\beta 1$ 介导的细胞凋亡中, 具有很强的抗凋亡作用.

与正常的内皮细胞相比, 肝细胞癌血管的内皮细胞缺乏明显的分化标记物. 但Frachon *et al*^[55]对肝硬化和肝细胞癌的内皮细胞CD31, CD34及BNH9表达进行对比后发现, 在肝硬化患者病灶内未检测出这三种血管内皮细胞标记物, 而在不典型增生和肝细胞癌病灶内, 分别有29%和47%可以同时检出三种标记物, 75%的不典型增生结节和100%肝细胞癌病灶至少可以检测出其中一种标记物. 同时, 这3种标记物的表达在肝细胞癌的小细胞成分中较大细胞更常见. 由此可见, CD31, CD34 及BNH9的表达可以作为肝细胞癌发生发展和演进的标记物. 另外, 彭林 *et al*^[56]采用原位分子杂交和免疫组织化学染色方法检测两种促血管生成素Angiopoietin 21 (Ang21)、Angiopoietin 22(Ang22)以及血管平滑肌肌动蛋白在对正常肝脏组织和肝细胞癌组织中的表达进行对比研究后发现: Ang21 mRNA在正常肝脏和肝癌组织中都有表达, 肝癌组织和癌旁组织与正常肝脏之间差异没有显著意义. Ang22mRNA在正常肝脏不表达, 肝癌组织中阳性表达. Ang22集中于癌灶边缘、血管周围. 肝癌组织中微血管密度和新生血管的数量明显高于正常肝脏. 而且Ang22的表达随肝癌组织病理学分级、有无转移以及新生血管数和微血管密度而增加. 因此, 促血管生成素在肝癌的新生血管形成和转移过程中可能起到一定作用, Ang22可能参与了肝癌的新生血管形成. 血管内皮生长因子(VEGF)是迄今为止发现的最重要的促血管生长因子, 并且是抗血管生成治疗的重要靶分子^[57], 他通过增加微血管通透性, 刺激内皮细胞增殖等作用引起肿瘤血管形成, 为肿瘤的生长、转移提供条件. 郝继辉 *et al*^[58]经过检测肝细胞癌中VEGF及其受体flk1、flt1蛋白表达情况, 分析了他们与肝细胞癌临床病理的关系. 实验结果显示肝细胞癌组织中VEGF、flk1、flt1蛋白的阳性表达率均明显高于正常肝组织; VEGF蛋白表达水平越高, 细胞恶性程度及侵袭、转移能力越强, 并且VEGF与flk1/flt1在肿瘤形成过程中具有协同作用. 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是肿瘤血管形成的重要正调节剂, Poon *et al*^[59]将

血清中bFGF水平作为肝细胞癌侵袭性和肿瘤切除术后复发指标进行评估, 实验中肝细胞癌患者手术切除前血清bFGF水平在0.22至71.2 ng/L之间, 血清高水平的bFGF和肿瘤体积增大、静脉入侵和高TNM分期相关, 同时还预示着更差的预后. 血清bFGF水平>10.8 ng/L以及瘤体直径>5 cm甚至可作为肝细胞癌术后早期复发的指标. 钙黏蛋白作为adiponectin的唯一受体, 在血管生成过程中扮演了重要角色, 在HCC的肿瘤血管中, 钙黏蛋白仅选择性的在窦状隙内皮细胞中得到表达, 并干扰FGF和adiponectin之间的信号通路, 诱导肿瘤血管形成^[60]. 另有学者指出^[61]: 在多药耐药(MDR)细胞中, MDR和血管生成素表型相互关联, 同时, Ets-1和c-Met等HGF产物上调和iNOS表达可以加强MDR阳性肝细胞癌细胞的血管生成素活性.

在人类肝细胞癌中, 热休克蛋白27(HSP27)通常有高水平的表达, 他可以同S期激酶相关蛋白2一同在 β -1整合素介导的肝细胞癌增殖中发挥作用^[62], 并可能是一种潜在的HCC标记物^[63]. Yasuda *et al*^[64]通过蛋白印记和免疫组化将肝细胞癌整体HSP27水平、丝氨酸磷酸化(Ser-15, Ser-78, and Ser-82)HSP27水平进行比较研究后发现, 在所观察的所有肝细胞癌病例中都有HSP27的磷酸化现象. 同时, 磷酸化HSP27的表达水平与肝细胞癌肿瘤直径、微血管入侵和TNM临床分期呈负相关. 也就是说, 伴随着肝细胞癌的临床进展, HSP27的表达逐渐下降. 尽管其中的机制尚不明了, 但鉴于HSP27可以干扰细胞凋亡信号的转导并保持线粒体的完整、减少细胞色素C的释放, 磷酸化的HSP27可能对肝细胞癌进展有压制作用. 另有研究表明^[65], 尽管在HCC中, 热休克蛋白70(HSP70)的表达略低于HSP27, 但与高Ki-67指数、高肿瘤分期、门静脉入侵和更大的肿瘤体积明显相关, 因此可能在HCC进展中具有更重要的意义.

在HCC中LOH现象十分常见^[66], 其中APC, OGG1和DCC位点上的LOH是早期事件, 而p53和RB1位点上的LOH发生在晚期. 较新发现的是位于8p12上的HTPAP基因. 该基因被认为长826 bp, 编码NH2端具有跨膜片断、含175个氨基酸的蛋白, 其表达在转移癌组织较原发HCC组织低很多, 体内和体外试验都提示HTPAP可以抑制HCC的侵袭和远处转移, 当8p发生突变时, 这种作用也随之减弱^[67].

肿瘤细胞的黏附性在肿瘤侵袭和转移中都

起着极为重要的作用。首先, 癌细胞从原发瘤中分离就与癌细胞同质黏附降低有关, 在血管内瘤栓的形成及肿瘤细胞游出血管过程与血管内皮及其下基底膜异质黏附都与黏附分子表达改变有关。Endo *et al*^[68]评估了肝细胞癌中上皮细胞钙黏蛋白、 α -、 β -、 γ -连环蛋白的表达, 并将其与肝细胞癌分级、临床病理学指标和患者存活率相比较后指出, 与正常肝组织相比, 癌灶中上皮细胞钙黏蛋白的表达下调, 然而 α -、 β -、 γ -连环蛋白的表达明显上调, 并与癌组织的分化等级呈正相关。与此同时, 实验还发现了存在于 γ -连环蛋白高表达和卫星病灶以及 β -连环蛋白高表达和瘤组织血管入侵之间两对明显的正相关关系。通过对比研究患者存活率, Endo *et al*发现, 伴有上皮细胞钙黏蛋白、 α -连环蛋白低表达和 β -连环蛋白高表达的肝细胞癌患者预示着预后不良; 内皮细胞选择素是另一类比较重要的细胞因子, 与其配体sLeX在肝细胞癌的转移中扮演了重要角色。Zhang *et al*^[69]对肝细胞癌灶中内皮细胞选择素及其配体sLeX的表达进行研究后指出, 内皮细胞选择素在伴有癌栓或卫星灶的肿瘤内较没有癌栓或卫星灶的明显上调, 这种改变与肿瘤大小、有无被膜、AFP含量以及分化程度无相关性。此外, 肝癌组织中CK19^[70], osteopontin^[71], 谷氨酰胺合成酶以及癌旁组织中COX-2的高表达也和肿瘤的复发转移呈正相关。基质金属蛋白酶MMPs是迄今发现的与肿瘤侵袭转移关系最为密切的蛋白水解酶, Ozaki *et al*^[72]采用RT-PCR技术对肝细胞癌中MMPs表达进行分析, 并对细胞生长因子HGF、c-Met受体和细胞因子Ets的活性进行检测后发现, 在mRNA水平上, MMP-1, -3, -7在肝细胞癌中呈过表达状态, 然而MMP-2, -9却没有这种相关性。特定的MMPs由HGF经由转录因子Ets-1通路诱导, 在肝细胞癌中过表达, 这条通路在肝细胞癌侵袭过程中起了重要作用。

每一次技术的创新, 都会给医学基础研究带来突破。如目前利用基因芯片的方法检测肝癌组织中的基因表达谱, 既可用来发现新的肝癌相关基因, 进而指导肿瘤分子分型和分期, 为预后提供更精确的依据。通过最大限度的收集基因表达信息, 比传统的差异显示及消减杂交等技术能发现更多新的相关基因^[73]。作为后基因组计划的蛋白质组学也已应用于肝癌的研究, 通过大规模分析蛋白质表达谱以及蛋白质间的相互作用, 揭示细胞内所有蛋白质组份及其动态变

化规律, 通过比较不同肝癌组织或结合LCM(激光显微切割)技术比较同一肝癌组织不同来源肝癌细胞的蛋白组学差异, 从而发现与肝癌复发和转移相关的蛋白, 为判断预后及治疗提供新的方法^[74]。此外, 蛋白指纹技术已经用于肝细胞肝癌的早期诊断研究, 我们的初步结果表明肝细胞癌患者与正常人血清中存在至少13种差异蛋白, 以其中两种标志蛋白(13 752 kDa与11 472 kDa)构建的诊断模型, 对于肝癌的诊断特异性和灵敏度为均高于传统的甲胎蛋白等临床检测技术。这些新技术的应用, 必将在肝细胞癌病理研究及临床治疗中具有更广阔的前景。

5 参考文献

- 1 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000; 19: 468-471
- 2 Jiang J, Nilsson-Ehle P, Xu N. Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism. *Lipids Health Dis* 2006; 5: 4
- 3 Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J Virol* 2006; 80: 4406-4414
- 4 Zhu HZ, Wang Y, Chen JQ, Cheng GX, Xue JL. Transgenic mice expressing hepatitis B virus X protein are more susceptible to carcinogen induced hepatocarcinogenesis. *Expl and Mol Pathol* 2004; 76: 44-50
- 5 Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2310-2315
- 6 Sarcar B, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* 2004; 322: 51-60
- 7 Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005; 280: 6409-6415
- 8 El-Shanawani FM, Abdel-Hadi AA, Abu Zikri NB, Ismail A, El-Ansary M, El-Raai A. Clinical significance of aflatoxin, mutant P53 gene and sIL-2 receptor in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2006; 36: 221-239
- 9 Lee YI, Han YJ, Lee SY, Lee YI, Park SK, Park YJ, Moon HB, Shin JH, Lee JH. Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53: physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 203: 51-63
- 10 Kong XJ, Lin JS, Song YH, Shen X, Jin YX. Inhibition of mutant p53 in hepatocellular carcinoma cells by hammerhead ribozyme. *Zhonghua GanZang Bing ZaZhi* 2003; 11: 722-724
- 11 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and

- alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 14: 4655-4660
- 12 Mukherjee B, Ghosh S, Das T, Doloi M. Characterization of insulin-like-growth factor II (IGF II) mRNA positive hepatic altered foci and IGF II expression in hepatocellular carcinoma during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Carcinog* 2005; 4: 12
 - 13 Alexia C, Lasfer M, Groyer A. Role of constitutively activated and insulin-like growth factor-stimulated ERK1/2 signaling in human hepatoma cell proliferation and apoptosis: evidence for heterogeneity of tumor cell lines. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1030: 219-229
 - 14 Goetsch L, Gonzalez A, Leger O, Beck A, Pauwels PJ, Haeuw JF, Corvaia N. A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *Int J Cancer* 2005; 113: 316-328
 - 15 Peng SY, Chou SP, Hsu HC. Association of down-regulation of cyclin D1 and of overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1998; 29: 281-289
 - 16 Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Feo F. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. *Alcohol* 2002; 27: 193-198
 - 17 Oh BK, Jo Chae K, Park C, Kim K, Jung Lee W, Han KH, Nyun Park Y. Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003; 39: 786-792
 - 18 Qu ZL, Zou SQ, Cui NQ, Wu XZ, Qin MF, Kong D, Zhou ZL. Upregulation of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression by in vitro transfection of hepatitis B virus X gene into human hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5627-5632
 - 19 Sun HC, Tang ZY, Wang L, Qin LX, Ma ZC, Ye QH, Zhang BH, Qian YB, Wu ZQ, Fan J, Zhou XD, Zhou J, Qiu SJ, Shen YF. Postoperative interferon alpha treatment postponed recurrence and improved overall survival in patients after curative resection of HBV-related hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 458-465
 - 20 Inamura K, Matsuzaki Y, Uematsu N, Honda A, Tanaka N, Uchida K. Rapid inhibition of MAPK signaling and anti-proliferation effect via JAK/STAT signaling by interferon-alpha in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 401-410
 - 21 Murata M, Nabeshima S, Kikuchi K, Yamaji K, Furusyo N, Hayashi J. A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine* 2006; 33: 121-128
 - 22 Hisaka T, Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Nishida N, Takemoto Y, Kojiro S, Katafuchi Y, Kojiro M. Interferon- α Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *J Hepatol* 2004; 41: 782-789
 - 23 Yamamoto S, Yano H, Sanou O, Ikegami K, Kurimoto M, Kojiro M. Different antiviral activities of IFN- α subtypes in human liver cell lines: synergism between IFN- α 2 and IFN- α 8. *Hepatol Res* 2002; 24: 99-106
 - 24 Nakano A, Watanabe N, Nishizaki Y, Takashimizu S, Matsuzaki S. Immunohistochemical studies on the expression of P-glycoprotein and p53 in relation to histological differentiation and cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; 25: 158-165
 - 25 Akimoto M, Yoshikawa M, Ebara M, Sato T, Fukuda H, Kondo F, Saisho H. Relationship between therapeutic efficacy of arterial infusion chemotherapy and expression of P-glycoprotein and p53 protein in advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 868-873
 - 26 Koskinas J, Petraki K, Kavantzias N, Rapti I, Kountouras D, Hadziyannis S. Hepatic expression of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein in HBV or HCV cirrhosis in relation to dysplastic liver cell changes and hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2005; 12: 635-641
 - 27 Ikeguchi M, Oi K, Hirooka Y, Kaibara N. CD8+ lymphocyte infiltration and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 53-57
 - 28 Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1552-1561
 - 29 Enjoji M, Nakashima M, Yamaguchi K, Kotoh K, Nakamuta M. Significance of RCAS1 antigen in hepatocellular, cholangiocellular and pancreatic carcinomas. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1143-1148
 - 30 Ohshima S, Egami H, Ohmachi H, Yao R, Kueizaki T, Kiyohara H, Sakamoto K, Ishimaru Y, Ogawa M. Expression of group II phospholipase A2 in malignant and nonmalignant human hepatocytes. *Inter Congress Series* 2003; 1255: 367-373
 - 31 杨建民, 卜保国, 高晋华. 肝细胞癌组织中P16、P21蛋白表达的临床病理意义. *重庆医学* 2003; 32: 28-34
 - 32 Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Res* 2003; 533: 201-209
 - 33 Kawata T, Nakamura S, Nakayama A, Fukuda H, Ebara M, Nagamine T, Minami T, Sakurai H. An improved diagnostic method for chronic hepatic disorder: analyses of metallothionein isoforms and trace metals in the liver of patients with hepatocellular carcinoma as determined by capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 403-409
 - 34 Kubo S, Fukuda H, Ebara M, Ikota N, Saisho H, Nakagawa H, Ozawa T, Yukawa M, Kato K, Satoh T, Watayo T, Sakurai H. Evaluation of distribution patterns for copper and zinc in metallothionein and superoxide dismutase in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1137-1141
 - 35 Peng SH, Yang JF, Xie PP, Deng H, Li H, Feng DY. Expression of cyclins in hepatocellular carcinoma and its correlation to tumor cell apoptosis. *AiZheng* 2005; 24: 695-698
 - 36 Thoreirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
 - 37 Eitelson MA, Sun B, Satioglu Tufan NL, Yeh SH,

- Kuroki T. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604
- 38 Berg KD, Glaser CL, Thompson RE. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2000; 2: 20-28
- 39 Zhang SH, Cong WM, Xian ZH, Wu MC. Clinicopathological significance of loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3034-3039
- 40 Nishimura T, Nishida N, Komeda T, Fukuda Y, Nakao K. Genotype stability and clonal evolution of hepatocellular carcinoma assessed by autopsy-based genome-wide microsatellite analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 161: 164-169
- 41 张树辉, 丛文铭, 冼志红, 吴孟超. 肝细胞癌染色体1p36杂合子丢失及其与临床病理特征关系的研究. *临床肿瘤学杂志* 2004; 9: 113-117
- 42 Reiser M, Neumann I, Schmiegell W, Wu PC, Lau JY. Induction of cell proliferation arrest and apoptosis in hepatoma cells through adenoviral-mediated transfer of p53 gene. *J Hepatol* 2000; 32: 771-782
- 43 张艳玲, 梁后杰, 肖文华, 阎晓初. 细胞凋亡、PCNA、p53和Fas与肝细胞癌临床病理特征关系的研究. *第三军医大学学报* 2004; 26: 547-552
- 44 Park DY, Sol MY, Suh KS, Shin EC, Kim CH. Expression of transforming growth factor (TGF)-beta 1 and TGF-beta type II receptor and their relationship with apoptosis during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Hepatol Res* 2003; 27: 205-213
- 45 Kaur S, Wang F, Venkatraman M, Arsura M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF-beta1-activated kinase 1 (TAK1). *J Biol Chem* 2005; 280: 38599-38608
- 46 Park SS, Eom YW, Kim EH, Lee JH, Min do S, Kim S, Kim SJ, Choi KS. Involvement of c-Src kinase in the regulation of TGF-beta1-induced apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 6272-6281
- 47 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Yoshimura T, Matsushashi S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis is blocked by beta 1-integrin-mediated mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *Cancer Sci* 2004; 95: 878-886
- 48 Sutter AP, Maaser K, Grabowski P, Bradacs G, Vormbrock K, Hopfner M, Krahn A, Heine B, Stein H, Somasundaram R, Schuppan D, Zeitz M, Scherubl H. Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells and enhance chemosensitivity to paclitaxel, docetaxel, doxorubicin and the Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J Hepatol* 2004; 41: 799-807
- 49 Yu L, Hamada K, Namba M, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Tagawa M. Midkine promoter-driven suicide gene expression and -mediated adenovirus replication produced cytotoxic effects to immortalised and tumour cells. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1787-1794
- 50 Yi EY, Jeong EJ, Kang DW, Joo JH, Kwon HS, Lee SH, Park SK, Chung SG, Cho EH, Kim YJ. Antiangiogenic and anti-tumor apoptotic activities of a topoisomerase II inhibiting agent SJ-8026. *Int J Oncol* 2005; 26: 1613-1620
- 51 Wang XH, Qin Y, Hu MH, Xie Y. Dendritic cells pulsed with hsp70-peptide complexes derived from human hepatocellular carcinoma induce specific anti-tumor immune responses. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5614-5620
- 52 Gao ZH, Tretiakova MS, Liu WH, Gong C, Farris PD, Hart J. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 533-540
- 53 Torimura T, Ueno T, Kin M, Harad R, Nakamura T, Sakamoto M, Kumashiro R, Yano H, Kojiro M, Sata M. Laminin deposition to type IV collagen enhances haptotaxis, chemokinesis, and adhesion of hepatoma cells through beta1-integrins. *J Hepatol* 2001; 35: 245-253
- 54 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Yoshimura T, Matsushashi S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis is blocked by beta 1-integrin-mediated mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *Cancer Sci* 2004; 95: 878-886
- 55 Frachon S, Gouysse G, Dumortier J, Couvelard A, Nejjan M, Mion F, Berger F, Paliard P, Boillot O, Scoazec JY. Endothelial cell marker expression in dysplastic lesions of the liver: an immunohistochemical study. *J Hepatol* 2001; 34: 850-857
- 56 彭林, 孙建, 王卫东, 区金锐. 促血管生成素在肝癌组织中的表达与肝癌新生血管形成及转移的关系. *中华普通外科杂志* 2003; 18: 302-310
- 57 Pang R, Poon RT. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2006;
- 58 郝继辉, 李强, 俞鸣, 焦振, 史玉荣, 郝希山. 人肝细胞癌VEGF及受体的表达与临床病理的关系. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 522-529
- 59 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001; 182: 298-304
- 60 Adachi Y, Takeuchi T, Sonobe H, Ohtsuki Y. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways. *Virchows Arch* 2006; 448: 311-318
- 61 Lasagna N, Fantappie O, Solazzo M, Morbidelli L, Marchetti S, Cipriani G, Ziche M, Mazzanti R. Hepatocyte growth factor and inducible nitric oxide synthase are involved in multidrug resistance-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 2673-2682
- 62 Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581-4588
- 63 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Yoshimura T, Matsushashi S, Hisatomi A, Tadano J, Sakai T, Yamamoto K. Mechanism of beta 1-integrin-mediated hepatoma cell growth involves p27 and S-phase kinase-associated protein 2. *Hepatology* 2003; 38: 305-313
- 64 Yasuda E, Kumada T, Takai S, Ishisaki A, Noda

- T, Matsushima-Nishiwaki R, Yoshimi N, Kato K, Toyoda H, Kaneoka Y, Yamaguchi A, Kozawa O. Attenuated phosphorylation of heat shock protein 27 correlates with tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 337-342
- 65 Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 829-834
- 66 Cong WM, Zhang SH, Xian ZH, Wu WQ, Wu MC. Study on loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua BingLiXue ZaZhi* 2005; 34: 71-74
- 67 Wu X, Jia HL, Wang YF, Ren N, Ye QH, Sun HC, Wang L, Liu YK, Tang ZY, Qin LX. HTPAP gene on chromosome 8p is a candidate metastasis suppressor for human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 1832-1840
- 68 Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 2000; 31: 558-565
- 69 Zhang BH, Chen H, Yao XP, Wu JH, Guo F, Huang SR. E-selection and its ligand-sLeX in the metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreas Dis* 2002; 1: 80-87
- 70 Ding SJ, Li Y, Tan YX, Zhang ZH, Wang MZ. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 73-81
- 71 Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PO, Sheu JC, Chen CL, Hsu HC. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 19-27
- 72 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 289-301
- 73 Boheler K.R, Stern M.D. The new role of SAGE in gene discovery. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 55-70
- 74 Hergenbahn M, Kenzelmann M, Grone HJ, Kimura S. Laser-controlled microdissection of tissues opens a window of new opportunities. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 419-423

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广州肝病防治研究新进展学术报告会

本刊讯 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会将于2006-07-01/05在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求

要求摘要和正文各一份, 并附软盘或寄到电子信箱.

2 联系方式

广州市广州大道北1838号南文医科大学南方医院消化病研究所(510515), 白岚 教授 收. 电话: 020-61641658;

E-mail: gdsgzbhx@163.com.

G蛋白偶联受体激酶的研究进展

杨雯, 夏时海

■背景资料

G蛋白偶联受体激酶(GRKs)属丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族, 其亚型广泛存在于各种组织, 能特异地使活化的G蛋白偶联受体(GPCR)发生磷酸化及脱敏化, 从而终止后者介导的信号转导通路。GRKs临床疾病的治疗中起着重大的作用, 更有助于信号转导通路的深入一步研究, 也是信号转导通路中的研究热点。

杨雯, 夏时海, 武警医学院附属医院消化内科胰腺中心 天津市 300162

国家自然科学基金资助课题, No. 30300456

通讯作者: 夏时海, 300162, 天津市, 武警医学院附属医院消化内科胰腺中心. xshhcx@sina.com

电话: 022-60578765 传真: 022-24370605

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-05-08

摘要

G蛋白偶联受体激酶(GRKs)属丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族, 其亚型广泛存在于各种组织, 能特异地使活化的G蛋白偶联受体(GPCR)发生磷酸化及脱敏化, 从而终止后者介导的信号转导通路。现就G蛋白偶联受体激酶的结构、种类及分布、生物学功能及与疾病关系的新进展进行总结与概括, 并对其发展进行了展望。

关键词: G蛋白偶联受体激酶; 磷酸化; 受体脱敏

杨雯, 夏时海. G蛋白偶联受体激酶的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1602-1607

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1602.asp>

0 引言

G蛋白偶联受体激酶(G protein-coupled receptor kinases, GRKs)属丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族。GRK由7个结构上同源序列的家族成员组成, 每种GRK都含有共同的功能结构, 包括一个中心的催化区、一个底物识别和含有G蛋白信号调节蛋白(regulators of G protein signaling, RGS)样结构的氨基末端区以及一个作用于胞膜的羧基末端区。其亚型广泛存在于各种组织。GRK能特异地使活化的G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)发生磷酸化及脱敏化, 从而终止后者介导的信号转导通路。GRK不仅能与G蛋白偶联, 还可以对细胞内第二信使钙离子进行调节及活化蛋白激酶C(PKC)。组织细胞表面存在多种GPCR如血小板活动因子(platelet activating factor, PAF)受体, 通过与其受体属G蛋白偶联受体结合发挥生物学效应。同时GRK也发展到影响人类的疾病如先天性夜盲症、心力衰竭、高

血压或关节炎等。并且与炎症的反应也有密切的关系。目前国内外许多学者就G蛋白偶联受体激酶(GRKs)进行了大量的研究, 现就其结构、种类及分布、生物学功能及与疾病关系作一简要综述。

1 GRKs的结构、种类及分布

GRKs属丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族, 可专一地磷酸化激活的GPCR, 使受体与G蛋白脱偶联, 抑制样蛋白(arrestins)随之结合到磷酸化的受体, 阻止受体本身再次偶联G蛋白, 从而有效地降低细胞膜上功能受体的水平, 使受体介导的信号转导效应消失或降低^[1]。目前已知哺乳动物的GRKs有7种, 按发现时间顺序分别命名为GRK1-GRK7。GRKs家族由7个结构上有同源序列的家族成员组成^[2], 每种GRK都含有共同的功能结构, 包括1个中心催化区、1个底物识别和含有G蛋白信号调节蛋白(regulators of G protein signaling, RGS)样结构的氨基末端区以及1个作用于胞膜的羧基末端区。根据序列和功能的相似性可分为3个亚家族。

第一亚家族包括GRK1和GRK7。主要分布于视网膜, 介导光感传导。GRK1是于1970年最早发现的成员, 优先与光激活的视紫质(rhodopsin)结合, 使之磷酸化, 并发生减敏, 所以GRK1又称视紫质激酶(rhodopsin kinase), 仅存在于视网膜的光受体细胞, 作用底物是视网膜的视蛋白。GRK1可以通过自身法尼基化(farnesylation)转移到细胞膜上与受体结合^[3], 重组的人GRK7在光照条件下可催化视紫质磷酸化。有实验证实, GRK1和GRK7在人视锥细胞均有表达。与此相反, GRK7在老鼠的许多组织包括视网膜均有表达, 而视网膜的光受体则不表达GRK7。人锥体外节段表达GRK7而小鼠不表达, 提示GRK7可能为GRK1基因缺失的小口氏病(一种夜盲症)患者提供正常的光觉^[4]。

第二亚家族包括GRK2和GRK3。广泛分布在心、脑、肺、肾、骨骼肌等组织均有表达。GRK2是在1980年代探讨 β_2 肾上腺素受体

($\beta 2AR$)同源减敏机制时发现的^[5], 他分布广泛, 能使已被激动剂激活的 $\beta 2AR$ 磷酸化, 所以又称 β 肾上腺素受体激酶(β -adrenergic receptor kinase, β -ARK). GRK3又被称为 β -肾上腺受体激酶2(β -adrenergic receptor kinase, β -ARK2), 除了能使 β 肾上腺受体减敏外, 在嗅觉神经中有很高表达, 在气体受体脱敏中发挥一定作用. GRK2-3主要通过游离的G蛋白 $\beta\gamma$ 亚基^[6]和酸性磷脂^[7]转移到细胞膜上与受体结合. 最近发现, 激动剂刺激哺乳动物细胞(HEK293)后, 能够诱导GPCR、GRK2和G $\beta\gamma$ 在细胞膜上形成稳定的复合体, 激动剂诱导的受体-GRK2-G $\beta\gamma$ 复合体的形成是GRK2向细胞膜转位和GRK2发挥功能的必要条件^[8].

第三亚家族包括GRK4, GRK5和GRK6. GRK4仅在睾丸高水平表达, 可使精子表面GPCR磷酸化, 提示该酶具有底物的特异性. GRK5、GRK6是两种相关激酶, 他们与GRK2、GRK3一样在全身各组织均有表达^[9]. 该亚家族成员的作用底物更广, 并具有重复的底物特异性. GRK4和GRK6通过自身棕榈酰化, GRK5则通过N2和C2末端的多基数区域转位至细胞膜上, 与被激动剂激活的受体结合, 并使之发生磷酸化. 另外, GRKs的活性还受蛋白激酶C、钙结合蛋白如恢复蛋白(recoverin)和钙调素等的调节.

2 GRKs的生物学功能

2.1 GRKs对GPCR磷酸化作用 GPCRs是一大家族, 现已发现1000多种, 包含1个细胞外N末端区域、7跨膜拓扑结构区域、3个细胞外环和3个细胞内环、1个细胞内的C末端胞质尾^[10]. 激动剂作用于GPCR, 与其细胞内区域偶联, 使受体处于激活状态, 刺激与之偶联的异三聚体G蛋白, G蛋白分解成 α 和 $\beta\gamma$ 亚基, 作用于1个或更多的效应器, 启动激动剂偶联GPCR的细胞信号效应. GRKs特异磷酸化被激活的GPCR, 使之与arrestin结合, 致受体与G蛋白脱偶联, 引起受体脱敏^[11]. GRKs在GPCRs上的磷酸化位点位于细胞内第3环或羧基末端尾区的丝氨酸和苏氨酸残基. $\beta 2-AR$ 和M-乙酰胆碱能受体只有短的羧基末端, 丝氨酸和苏氨酸残基含量相对较少, 但扩大的细胞内第3环区含多个丝氨酸和苏氨酸残基, 同样一些受体如视紫质和 $\beta 2-AR$ 细胞内第3区相对较短, 但他们的长羧基末端含有数个丝氨酸和苏氨酸残基. $\beta 2-AR$ 羧基末端尾区的丝氨酸、

苏氨酸残基和m2 mAChR细胞内第3环的突变均能消除GRKs介导的受体磷酸化. 虽然尚不能清楚地识别GRKs磷酸化基序, 但已知位于磷酸化位点近端的酸性氨基酸有利于GRK2介导的受体磷酸化可发生在多个位点, 其中任一位点磷酸化均可导致受体失敏^[12]. 抑制蛋白与视紫质、 $\beta 2-AR$ 的高亲和力结合需要GRKs介导的受体磷酸化, 但体内识别的主要GRKs磷酸化位点的磷酸化, 可以补偿GPCR主要磷酸化位点的磷酸化失败. GRK2的C端保守区与眼视网膜特异性的GPCR-视紫质结合对后者的磷酸化起关键作用的基础上, 进一步研究并揭示了GRK介导的GPCR脱敏过程中复杂的相互作用及调节作用^[13].

2.2 GRKs与G蛋白偶联 GRKs是G蛋白偶联受体信号转导中的重要调节分子, 其自身功能受到多方面的调节. 对GRKs功能的调节分为三个方面: (1)亚细胞分布的调节; (2)激酶活性的调节; (3)表达水平的调节(包括mRNA水平的调节和蛋白水平的调节). GRK2和GRK3被GPCR活化后, 发生转移到达细胞膜. 一旦GPCR-G蛋白被激活, G $\beta\gamma$ 亚基与 α 亚基的分离促使 $\beta\gamma$ 亚基与GRK2、GRK3以及GRK2和GRK3与细胞膜的结合. GRK2上的G $\beta\gamma$ 结合区定位于血小板一白细胞C激酶底物(pleckstrin)同源框的 β 折叠III及其延伸端的 α 螺旋. 最近在GRK2的N端发现另一个GP7结合区可调控催化受体磷酸化过程, 并抑制由G $\beta\gamma$ 激活的信号转导过程^[14]. GRK2与活化的G α_q (即Gq的 α 亚基)具有高亲和力, 两者的结合能有效抑制完整细胞中由G α_q 介导的磷脂酶C活性. GRK2和GRK3的N端存在由120个氨基酸残基组成的G蛋白信号调控子(regulator of G protein signaling, RGS), 而其中的大部分保守氨基酸残基也被发现存在于GRK家族其他成员的RGS疏水核心区中. 有研究指出GRK2不仅调节G蛋白, 也受G蛋白的调节^[15].

2.3 Ca^{2+} 结合蛋白对GRKs的调控 Ca^{2+} 结合蛋白能对GRKs的所有亚型进行调控, 如介导视紫红质激酶的某种抑制过程. GRK1可与视觉恢复蛋白(recoverin)结合并受到抑制, 后者是23 kDa的质子受体特异性 Ca^{2+} 结合蛋白, 其对GRK的抑制作用能通过豆蔻酰化得到加强. 视觉恢复蛋白与GRK1 N端25个氨基酸区域内的单一位点结合, 通过对GRK1-视紫红质的空间构型产生位阻效应, 从而抑制其活性. 到目前为止人们仅发现钙调蛋白(CaM)对GRK家族均有比较明显的抑制作用, 对于GRK2、GRK3, Ca^{2+} /CaM除了能通过

■ 研发前沿

目前对于G蛋白偶联受体激酶(GRKs)的基础研究与临床疾病相结合成为了热点, 尤其是为疾病的发生作用机制以及疾病的表达调控起着重要的作用.

■创新盘点

本文不仅在G蛋白偶联受体激酶(GRKs)的基础研究做以介绍外,还针对G蛋白偶联受体激酶(GRKs)表达调控与疾病的关系做出新的介绍,为临床疾病的研究提供了新的思路。

直接结合G $\beta\gamma$ 而抑制其膜转位,还能间接抑制其蛋白表达。鉴于创伤后神经元细胞内大量Ca²⁺内流,相应引起CaM增多。有研究表明,创伤早期下丘脑室旁核GRK2、GRK3蛋白的表达减少与CaM增多相关。GRK2、GRK3、GRK4、GRK5和GRK6在体外能被CaM所调控。GRK具有两个CaM结合位点,其中定位于N端的位点相对保守,定位于C端的位点则随GRK的亚型不同而发生位置变换。GRK5 C端的CaM结合区与磷脂结合区发生重叠,从而解释了CaM对GRK5与脂质体结合及其对膜结合受体磷酸化的抑制^[16]。因为任意的CaM结合位点都足以抑制受体磷酸化,故只有同时对GRK5的N端和C端进行突变或缺失才能使其对CaM不敏感。CaM促使GRK5在其C端的一个或多个丝氨酸残基处发生自磷酸化,从而直接抑制后者上与视杆细胞外膜(rod outer segment membrane, ROS membrane)的结合以及视紫红质的磷酸化。即使将胞内升高的Ca²⁺浓度恢复正常水平,这种自磷酸化也足以延续CaM对GRK5的抑制作用^[17]。最近在微管蛋白和共核蛋白(syntaxin)家族等新发现的GRK非受体底物磷酸化过程中,确认CaM介导了更复杂的调控过程。肌动蛋白与GRK5的N端结合,并抑制GRK5对受体底物或非受体底物的磷酸化。但当CaM取代肌动蛋白与GRK5结合时,结果只有可溶性底物的磷酸化程度得到了增加^[18]。

2.4 PKC活化GRK 受体G蛋白效应体系可有多种跨膜传递,并且根据不同的效应体系产生不同的信号途径,如受体-G蛋白-AC-CAMP-PKA和受体-G蛋白-PLC-DG-PKC等途径。现发现不仅GKRS可使GPCR磷酸化脱敏,而且PKA、PKC也参与GPCR的快速脱敏。PKC活化GRK2的能力已在人单核细胞中得到证实。GRK2被PKC磷酸化后,对非受体底物的催化活性并无增强,但增加了膜结合视紫红质的活性^[19],说明PKC通过加强其向膜的转运而实现GRK2的活化。GRK5 C端的26个氨基酸区域内也存在两个PKC磷酸化位点。与GRK2相反,PKC介导的GRK5磷酸化显著减少了GRK5与ROS膜的结合及受体磷酸化,并极大降低了GRK5对非受体底物的磷酸化能力。同时PKC还可抑制GRK5活性^[20]。已经证明Ca²⁺/CaM、PKC对GRK2和GRK5存在作用,提示他们被Gi或Gq偶联受体激活时对GPCR具有协调调控作用^[10]。若在同一细胞中同时激活多种GPCR,则会产生Ca²⁺/CaM、PKC增强GRK2活性和受体底物脱敏性的净效应。相反地,

Ca²⁺/CaM、PKC对GRK5的抑制维持了后者介导的受体底物信号转导过程。在转基因小鼠的心脏中,GRK2和GRK5都可以调控 β 2ARs,并与GS、cAMP偶联^[21]。但被PLC、PKC偶联激活的心肌1A型血管收缩素II受体只受到GRK2的调控,而不受GRK5影响^[22]。在表达Gq偶联 α 1b肾上腺素受体的COS-7和HEK293细胞中,观察到类似的GRK5介导脱敏化的抵抗,提示GRK5与GRK2、GRK3不同,其并不引起激动剂依赖的磷酸化和脱敏化水平增加^[23]。

2.5 GRKs与PAF的关系 PAF是一种独特的炎症介质,具有广泛的生物学特性^[24]。可引起支气管收缩、增高气道反应性、促进黏膜腺体分泌,致微血管通透性增高。现确定PAF受体属于Gq/11和Gi/o的G蛋白偶联受体家族^[25],分布于许多细胞表面,PAF通过与PAF受体结合,引起肿瘤坏死因子(TNF)及白细胞介素如IL21、IL26、IL28的分泌和核因子- κ B(NF- κ B)的激活^[26],在急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发生过程中发挥重要作用。GRK2属丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族,可专一地磷酸化激活的G蛋白偶联受体,使受体与G蛋白脱偶联,“arrestins”蛋白随之结合到磷酸化的受体,阻止受体本身再次偶联G蛋白,从而有效地降低细胞膜上功能受体的水平,使受体介导的信号转导效应降低或消失。目前实验证实用PAF刺激培养的大鼠肺微血管内皮细胞(RPMVEC)可引起GRK2表达增高。结果提示:在PAF诱导PMVEC损伤过程中,GRK2表达的增加是一种代偿反应,GRK2可能介导PAF受体脱敏,减弱PAF对PMVEC的损伤,起一定保护作用。

3 GRKs表达调控与疾病的关系

3.1 GRKs在临床疾病的研究意义 在大部分细胞中,GRK以管家基因蛋白形式呈低水平表达。但在肺细胞中,观察到GRK2表达与 β 2AR脱敏化之间存在明显联系,而促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin releasing factor, CRF)或urocortin也能通过GRK3的上调导致CRF受体脱敏化的增加。另外,吗啡或雌激素的处理也能引起GRK的上调或下调反应,表明GRK的表达是激动剂依赖的GPCR脱敏化过程中的限制因素^[27-28]。GRKs的生理学作用通过遗传学改良的动物表现,但也可以发展到影响人类的疾病,如先天性夜盲症、心力衰竭、高血压或是关节炎。此外,调节GRK的水平在阿片成瘾、癌症,精

神病, 囊性纤维病和心脏病都在进行讨论^[29]. 最近研究证明, 在高血压状态时GRK2的表达存在选择性调控. 对正常血压和临界高血压的个体进行比较, 发现GRK2蛋白在血淋巴细胞中的表达与血压正相关, 而与 β 2AR介导的腺苷酸环化酶活性负相关^[30]. GRK2活性与 β 肾上腺能受体密度结合起来可调节儿茶酚胺敏感cAMP的产生^[31]. 在血管平滑肌细胞中GRK2在转录水平受到调控, 而 β -肾上腺素受体的激活导致GRK2的降解^[32]. 研究表明, GRK2表达的增加损害了 β 肾上腺素介导的血管舒张, 从而引起高血压. 而GRK4T的单核苷多态性能增加GRK的活性, 引起人原发性高血压^[33]. 如在心肌层中对GRK进行有目的的过度表达或抑制, 发现GRK2对GPCR和心肌功能的调控具有关键作用. 强心剂引发的GRK2或GRK5过量表达严重损害了 β AR信号转导和 β 激动剂介导的收缩功能^[10]. 相对地, 如果过度表达抑制GRK2的小肽minigene (β ARKct)则出现相反效应^[34]. 另外, 对于 β ARKct过量表达且GRK2基因剔除的杂合体小鼠, 其杂交后代同时出现了GRK2活性的减弱和心肌收缩功能的加强, 提示心脏收缩功能对GRK2表达水平非常敏感. 有研究指出, 心脏GRKs表达水平可能是心力衰竭患者 β 肾上腺能受体失敏状态, 恢复正常功能GPCR在转调动物模型的心力衰竭的脱敏过程中起着非常重要的作用. 指示出靶向作用GRKs或arrestin对于GPCR失调的人类疾病开创了一个新的治疗策略^[35]. 通过GRKs介导的 β -arrestin信号转导引起的重构以及其他生化指标异常的预测指标^[36]. 在阿片激动剂的作用下, 阿片受体迅速发生GRKs催化的磷酸化, 磷酸化的阿片受体与 β -arrestin等细胞信号调控蛋白结合引起受体进一步与G蛋白解偶联并导致阿片受体发生内化, 从而抑制了阿片受体介导的信号转导, 造成阿片受体脱敏^[37]. 吗啡、海洛因等阿片类药物的作用主要通过调节阿片受体这类GPCR受体的信号传递而导致成瘾. GRK5是一种蛋白激酶, 最终行使功能需要其蛋白形式. 而体内稳态时某种蛋白的含量受多种因素调节, 其中包括转录水平的调节和翻译水平的调节以及翻译后的修饰和降解等过程. 由于GRK5在G蛋白偶联受体信号转导中的重要作用及其在脑内学习、记忆、情感等同药物成瘾相关脑区的广泛分布, 而精神活性药物在mRNA和蛋白水平对大脑皮层、海马和丘脑部位GRK5的调控, 将对脑内神经元的活动和受

体功能产生重要影响. 鉴于上述我们推测GRK5可能在精神活性物质的成瘾中发挥重要作用^[38]. 同时, 吗啡等阿片类镇痛药是目前临床上最常用、最有效的镇痛药. 因此, 研究这类受体的作用机制有特别重要的理论和现实意义. 有研究发现激活GPCR能显著增强 β -arrestin与肿瘤抑制因子p53的负调控蛋白Mdm2的相互作用, 降低Mdm2自身的泛素化以及Mdm2介导的p53降解及泛素化, 从而调节了p53介导的细胞凋亡作用, 提示该蛋白质可作为GPCR通路和p53信号通路间“对话”的中介分子. 同时, 揭示了只是 β -arrestin2而不是 β -arrestin1能使Mdm2从细胞核重新分布到细胞质中并调节其功能的分子机制^[39]. 最新报道发现GRK3在治疗精神疾病也起着重要的作用^[40].

3.2 GRKs与炎症反应 Lombardi *et al*^[41]揭示了GRKs在炎症反应中存在下调过程. 在关节炎患者的脾细胞和肠淋巴结细胞中, GRK2, GRK3, GRK6的表达水平及活性大幅降低, 而在胸腺细胞和非免疫器官如心脏或垂体中并没有发现这种效应. 现在认为是高压引起了这种免疫系统的组织特异性反应^[42], 并造成GPCR(如 β 2AR)反应能力的提高. 在G蛋白偶联受体激酶(GRKs)调节GPCR的脱敏调节研究中, 发现紫外辐射能够调控 β -arrestin分子磷酸化状态的改变并进一步对紫外辐射引起的NF- κ B激活进行调节, 而GPCR激活能促进这种抑制作用. 这一发现揭示了GPCR激活及 β -arrestin分子在皮肤炎症及癌变等发生、发展中的可能作用, 为紫外辐射导致的皮肤癌症的防范与治疗提供了可借鉴的机制^[43]. 而在 β 2肾上腺素受体信号通路中, β -arrestin2能与IkB蛋白结合而抑制IKK对IkB的磷酸化, 最终使得TNF信号作用下的NF- κ B不能被激活, 从而无法启动其下游基因表达. 也首次揭示了 β 2肾上腺素受体与NF- κ B信号通路“对话”的分子机制, 阐明了交感神经系统调控免疫系统的可能机制^[44]. 同时发现 β -arrestins能够结合引起NF- κ B激活的另一条重要信号通路-Toll-like/IL-1受体信号通路中重要的接头分子TRAF6, 并且抑制他的功能, 从而很有效地调控NF- κ B的激活, 抑制免疫反应. 这一发现揭示了机体调节免疫反应的新机制, 为治疗免疫疾病提供了新的作用靶点^[45].

总之, GRKs是介导GPCR内化最重要的一类调节蛋白, 虽然后来发现抑制蛋白也参与了GPCR内化, 但GRKs介导的GPCR磷酸化仍然是

■应用要点

GRKs是介导GPCR内化最重要的一类调节蛋白, 而GPCR是人体内具有复杂生理功能的受体, 并与许多疾病的发生密切相关, 本综述为治疗各种疾病的信号转导通路提供了新的靶点.

■名词解释

G蛋白偶联受体(G-protein linked receptor): 配体与受体结合后激活相邻的G-蛋白,被激活的G-蛋白又可激活或抑制一种产生特异第二信使的酶或离子通道,引起膜电位的变化。由于这种受体参与的信号转导作用要与GTP结合的调节蛋白相偶联,因此将他称为G蛋白偶联受体。这类受体的种类很多,并在结构上都很相似:都是一条多肽链,并且有7次 α 螺旋跨膜区。这种7次跨膜受体蛋白的超家族包括视紫红质(脊椎动物眼中的光激活受体蛋白)以及脊椎动物鼻中的嗅觉受体。G蛋白偶联受体是最大的—类细胞表面受体,他们介导许多细胞外信号的传导,包括激素、局部介质和神经递质等。

受体内化发生的基础。有关GRKs参与GPCR调节的分子机制尚未完全阐明。而GPCR是人体内具有复杂生理功能的受体,并与许多疾病的发生密切相关,因而这方面的研究仍然是一个热点,近年来这方面的研究多采用基因敲除、基因封闭、基因克隆和体外表达等新兴技术。随着生命科学的发展,特别是功能基因组学和蛋白质组学的研究进展,有关GRKs的研究必将取得新的突破。

4 参考文献

- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 653-692
- Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 35403-35411
- Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 2003; 554: 381-388
- Chen CK, Zhang K, Church-Kopish J, Huang W, Zhang H, Chen YJ, Frederick JM, Baehr W. Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase. *Mol Vis* 2001; 7: 305-313
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2797-2801
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 1992; 257: 1264-1267
- Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 11707-11710
- Holmes KD, Babwah AV, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SS. Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem* 2006; 96: 934-949
- Gainetdinov RR, Premont RT, Caron MG, Lefkowitz RJ. Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 366-367
- Penn RB, Pronin AN, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 81-89
- Premont RT. Once and future signaling: G protein-coupled receptor kinase control of neuronal sensitivity. *Neuromolecular Med* 2005; 7: 129-147
- Ohguro H, Palczewski K, Ericsson LH, Walsh KA, Johnson RS. Sequential phosphorylation of

rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* 1993; 32: 5718-5724

- Gan X, Ma Z, Deng N, Wang J, Ding J, Li L. Involvement of the C-terminal proline-rich motif of G protein-coupled receptor kinases in recognition of activated rhodopsin. *J Biol Chem* 2004; 279: 49741-49746
- Eichmann T, Lorenz K, Hoffmann M, Brockmann J, Krasel C, Lohse MJ, Quitterer U. The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *J Biol Chem* 2003; 278: 8052-8057
- Dhami GK, Dale LB, Anborgh PH, O'Connor-Halligan KE, Sterne-Marr R, Ferguson SS. G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 16614-16620
- Iacovelli L, Sallese M, Mariggio S, de Blasi A. Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *FASEB J* 1999; 13: 1-8
- Sallese M, Iacovelli L, Cumashi A, Capobianco L, Cuomo L, De Blasi A. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498: 112-121
- Senin II, Fischer T, Komolov KE, Zinchenko DV, Philippov PP, Koch KW. Ca²⁺-myristoyl switch in the neuronal calcium sensor recoverin requires different functions of Ca²⁺-binding sites. *J Biol Chem* 2002; 277: 50365-50372
- Winstel R, Freund S, Krasel C, Hoppe E, Lohse MJ. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2105-2109
- Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H, Lohse MJ. Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 2001; 276: 1911-1915
- Lee JH, Jeong SM, Lee BH, Noh HS, Kim BK, Kim JI, Rhim H, Kim HC, Kim KM, Nah SY. Prevention of ginsenoside-induced desensitization of Ca²⁺-activated Cl⁻ current by microinjection of inositol hexakisphosphate in *Xenopus laevis* oocytes: involvement of GRK2 and beta-arrestin I. *J Biol Chem* 2004; 279: 9912-9921
- Rockman HA, Choi DJ, Rahman NU, Akhter SA, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Receptor-specific in vivo desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9954-9959
- Gray JA, Sheffler DJ, Bhatnagar A, Woods JA, Hufeisen SJ, Benovic JL, Roth BL. Cell-type specific effects of endocytosis inhibitors on 5-hydroxytryptamine(2A) receptor desensitization and resensitization reveal an arrestin-, GRK2-, and GRK5-independent mode of regulation in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1020-1030
- 张国强, 顾承东, Y.Kurata S, Imanishi.Matsui, 柴枝楠. 血小板活化因子在缺血再灌注中电生理作用的实验研究. *中华急诊医学杂志* 2002; 11: 385-388
- 贺师鹏, 胡雅儿, 夏宗勤. 受体研究技术. 第1版. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 391-392
- Kravchenko VV, Pan Z, Han J, Herbert JM, Ulevitch RJ, Ye RD. Platelet-activating factor induces NF-

- kappa B activation through a G protein-coupled pathway. *J Biol Chem* 1995; 270: 14928-14934
- 27 Fan X, Zhang J, Zhang X, Yue W, Ma L. Acute and chronic morphine treatments and morphine withdrawal differentially regulate GRK2 and GRK5 gene expression in rat brain. *Neuropharmacology* 2002; 43: 809-816
- 28 Ansonoff MA, Etgen AM. Estrogen increases G protein coupled receptor kinase 2 in the cortex of female rats. *Brain Res* 2001; 898: 186-189
- 29 Metaye T, Gibelin H, Perdrisot R, Kraimps JL. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 2005; 17: 917-928
- 30 Gros R, Tan CM, Chorazyczewski J, Kelvin DJ, Benovic JL, Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 545-551
- 31 Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ. Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26: 1752-1758
- 32 Penela P, Ribas C, Mayor F Jr. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 2003; 15: 973-981
- 33 Felder RA, Sanada H, Xu J, Yu PY, Wang Z, Watanabe H, Asico LD, Wang W, Zheng S, Yamaguchi I, Williams SM, Gainer J, Brown NJ, Hazen-Martin D, Wong LJ, Robillard JE, Carey RM, Eisner GM, Jose PA. G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3872-3877
- 34 Hata JA, Koch WJ. Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease. *Mol Interv* 2003; 3: 264-272
- 35 Metaye T, Perdrisot R, Kraimps JL. GRKs and arrestins: the therapeutic pathway? *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 537-543
- 36 Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, Mayor F Jr. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 46-56
- 37 Zhang X, Wang F, Chen X, Li J, Xiang B, Zhang YQ, Li BM, Ma L. Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. *J Neurochem* 2005; 95: 169-178
- 38 朱敏, 范学良, 杨伟林, 江燕, 马兰. 成瘾性药物对大鼠脑内G蛋白偶联受体激酶5 mRNA和蛋白水平的调控. *生理学报* 2004; 56: 559-565
- 39 Wang P, Gao H, Ni Y, Wang B, Wu Y, Ji L, Qin L, Ma L, Pei G. Beta-arrestin 2 functions as a G-protein-coupled receptor-activated regulator of oncoprotein Mdm2. *J Biol Chem* 2003; 278: 6363-6370
- 40 Ertley RN, Bazinet RP, Lee HJ, Rapoport SI, Rao JS. Chronic Treatment with Mood Stabilizers Increases Membrane GRK3 in Rat Frontal Cortex. *Biol Psychiatry* 2006
- 41 Lombardi MS, Kavelaars A, Cobelens PM, Schmidt RE, Schedlowski M, Heijnen CJ. Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. *J Immunol* 2001; 166: 1635-1640
- 42 Lombardi MS, Kavelaars A, Penela P, Scholtens EJ, Roccio M, Schmidt RE, Schedlowski M, Mayor F Jr, Heijnen CJ. Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 379-388
- 43 Luan B, Zhang Z, Wu Y, Kang J, Pei G. Beta-arrestin2 functions as a phosphorylation-regulated suppressor of UV-induced NF-kappaB activation. *EMBO J* 2005; 24: 4237-4246
- 44 Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, Pei G. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell* 2004; 14: 303-317
- 45 Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 139-147

同行评价

本文总结了G蛋白偶联受体激酶的相关研究进展, 对于开展信号转导相关研究具有参考意义。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

可验证的剪应变溃疡病因理论和胃溃疡发生机制

霍世平

■背景资料

有关溃疡发生机制的报告层出不穷,到现在已近200年尚未得出最后结论。在2004年世界消化大会上,表决通过了消化性溃疡病因主要是酸性胃液的消化作用。人胃中的幽门螺杆菌及与溃疡病相关的发现者已获得2005年度的诺贝尔奖。但是,溃疡病还有许多关键问题,至今没有较确切的解释,目前要彻底根除幽门螺杆菌仍然是十分困难的。

霍世平,唐山市路南晨光疑难病康复研究所 河北省唐山市 063000

通讯作者: 霍世平, 063000, 河北省唐山市南新道刘庄滦工街5条29号南晨光疑难病康复研究所. hspyxys@yahoo.com.cn
电话: 0315-7231982

收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-04-22

摘要

建立一个合乎逻辑的科学的消化性溃疡病因理论,以反映溃疡病在现实中所有的问题。归纳在现实中与胃溃疡相关的事物,循证演绎溃疡形成的过程。溃疡发生的原因是剪应变。胃溃疡的发生是当胃壁回缩时,凸向胃腔内的高张力皱褶,直接或间接地作用在高张力机体组织的同一个位置上,长时间的挤压或频繁地冲压碾磨超过极限,黏膜肌层被剪切,发生了剪应变,造成肌层缺损成溃疡。溃疡病的发生是正常生理组织和生理功能,在一定条件下产生的结果。源于现实的溃疡剪应变理论,可以在实践中得到检验。

关键词: 病因; 胃溃疡; 机制; 剪应变

霍世平. 可验证的剪应变溃疡病因理论和胃溃疡发生机制. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1608-1611

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1608.asp>

0 引言

质子泵抑制剂将胃酸为零分泌^[2],疗效也不肯定^[6]。幽门螺杆菌感染说也借助胃酸的消化作用^[13]。目前的溃疡病因理论在现实中存在一些关键问题^[2],尚待解决。当一个理论体系,他只能主观随意地解释一些现象,而无法解释现实中出现的诸多问题,显然是一个在实践中不能检验的理论。对于缺乏科学性,违反逻辑规律的理论,就应及时地冲破其理论框架的束缚,以建立一个反映不断发展的现实世界的新的理论体系。否则,就不可能有创新性的发现,科学就不能进步。消化性溃疡病的病因在理论上就是溃疡。溃疡与溃疡病是确切的因果关系。而通常所关注的溃疡发生的原因是溃疡病的前因,前因与溃疡病并没有直接的因果关系。溃疡的发生是一些偶然因素在一定的条件下共同产生的结果,是正常生

理组织和生理功能参与了溃疡的发生。胃的生理组织结构功能及胃腔的内容较复杂,对溃疡病因的研究,胃溃疡具有一定的代表性。

1 胃溃疡形成方式的循证推理

从胃溃疡的表现循证推理胃溃疡形成的方式根据胃溃疡的形状、大小、深浅、多年来没有被酸性胃液消化的变形、变大、变深^[1];溃疡可以保持很久时间,不因病程的延长而增多^[2];溃疡底部常为坏死物充填^[3-4];胃溃疡高酸者少,少数甚至呈低酸^[8];酸性胃液不能消化胃黏膜等等^[5],这都是酸性胃液不在溃疡现场的证据。然而对溃疡及周围组织状态的观察和病理变化分析,尤其急性溃疡口边缘锐利的现象^[3];胃小弯缩短凹陷性病变,纤维收缩导致胃小弯缩短;胃角哆开,胃角消失;以及桥形皱襞;皱襞分离等现象^[7];溃疡部位与肌肉的关系,经解剖分析96.3%的溃疡均发生在环形肌起始部,胃蠕动最强烈的部位;这些现象又都是物理性机械作用在溃疡现场的证据。如果对溃疡的形状、大小、深浅、撕裂等现象及周围组织的变化进行复制,化学性和生物的作用很难完成,也只有物理性的机械作用可以轻易完成,并可对其进行控制。据此认为,胃溃疡形成的方式与物理性的机械作用密切相关。

2 胃溃疡发生原因的循证推理

从胃溃疡的体征循证推理物理性机械性作用的踪迹: 溃疡好发于同一区域^[2,8],表示这些区域有容易受到致病因子攻击的同一性,提示了这些区域的同一的特性与溃疡的发生相关。溃疡形状、大小、深浅、及溃疡周围凹陷等变化^[3],是致溃疡因子在致溃疡过程中留下的印迹,提示了致溃疡因子形象特征的重要依据和在场证据。肌层常已被破坏,内环肌、外纵肌和斜肌的层次出现中断和混乱;在溃疡的边缘与增厚的黏膜肌层相融合^[8];强烈的胃窦收缩使胃腔闭合或接近闭合;机械性消化的挤压碾磨等^[12],提示了胃壁收缩时胃腔内组织受到了挤压。认为挤压为溃疡形成

时的状态, 是致溃疡因子在发生溃疡现场的时间证据和行为证据. 溃疡口黏膜皱襞断裂、匍行向溃疡口周围集中及排列、胃小弯变形等现象^[10], 是致溃疡因子在溃疡现场运动的轨迹. 是力留下的痕迹, 提供了运动和压力在溃疡发生现场的证据. 据此认为: 根据消化道的运动、压力、相对的挤压等现象, 以及溃疡的深度、溃疡口撕裂、胃小弯变形等形态, 同时出现在溃疡现场的事实, 进行演绎推理的结果: 是黏膜肌层组织受到了剪切而发生了剪应变. 也只有剪切这一物理性的机械作用形式, 方可涵盖以上所有的现实内容.

3 剪应变和剪切发生机制的相关因素循证推理

3.1 剪应变发生的位置 归纳溃疡多发生区域与其他区域的机体组织的生理结构、组织形态, 进行相对的分析比较, 发现溃疡多发生区域的机体组织有着同一性的共同特点: 张力相对的高.

3.1.1 张力较高的区域 胃小弯、胃角切迹呈弓形曲线、类似哥德式拱门形的力学结构的生理形态^[3]; 顶部张力相对较高; 食管下端、胃大弯、胃小弯、幽门等肌层组织较厚^[2]; 胃角部的肌层常为较厚的交界环肌束; 密集的生理结构张力相对较高; 胃底腺与幽门腺移行交界处幽门一侧的肌层密集; 相对张力较高^[9]; 胃小弯两侧与胃壁境界部^[2], 相对肌层较厚与较薄过渡区域, 较厚肌层的断面垂直方位的肌层密度较高, 张力相对较高. 人体材料显示, 2/3的胃溃疡位于小弯侧增厚的纵行肌处. 另一部分位于角切迹附近, 亦是环行肌增厚的部位^[2], 提示了, 溃疡多发原因与其区域机体组织的张力较高相关. 推理: 剪切的发生与机体组织的张力相关.

3.1.2 溃疡发生的位置 多处消化道运动集中活动的区域 胃壁容纳或机械性舒张及回缩运动的区域; 承受挤压碾磨机械性消化运动的区域等^[6]. 印证了剪切的发生与消化道运动相关.

3.1.3 剪切及剪应变发生的理论依据 机体组织承受到压力后发生弹性应变, 当弹性应变达到极限发生塑性应变, 延展性小的机体组织表现出脆性^[11], 认为高张力机体组织发生剪切, 与其机体组织表现出脆性发生机理密切相关; 当机体组织受到压力时, 只有形状的变化形变, 而没有体积变化的体应变, 则发生剪切^[11]. 印证了, 高张力组织的溃疡发生与剪应变的发生机制密切相关; 小结: 高张力的机体组织, 当受到压力时, 机体组

织体应变受限或表现出脆性, 是高张力组织易被剪切而发生剪应变的主要原因.

3.2 剪切与胃壁皱褶的形成及与溃疡的关系 如果溃疡的发生是与相对组织互相挤压碾磨的动态组织相关, 那只有是与回缩时, 可产生张力的动态胃壁及胃大弯相关. 在此时间里, 循证分析具备一定高度又较尖锐的东西, 即是可在挤压时能产生一定深度的物体; 其物体必须具有较高的张力, 以及有与溃疡形状相互吻合的形状. 根据发生在胃角的溃疡, 可引起不同程度的畸形. 葫芦形皱褶常见于胃体部前后壁溃疡; 一条高的病理性皱褶. 在此皱褶末端, 在前壁和后壁可以发现溃疡或瘢痕^[2]; 以及胃壁在回缩时出现一些皱褶, 手术切除的标本, 胃壁皱缩等这些现象^[2,9]. 提示了: 过度扩张的胃壁因平滑肌局部组织弹性应变接近极限, 发生永久或暂时性的塑性形变, 局部胃壁不能完全回缩恢复到原来的形状. 随着胃壁的回缩折叠成较大的皱褶. 皱褶随着胃壁回缩, 其皱褶的皱脊逐渐向胃腔内伸进, 并向胃部上缘靠拢, 逐渐与高张力区域的组织接触. 这时皱褶的皱脊则出现在溃疡发生的现场. 这些皱褶只有在胃壁收缩时出现. 当胃壁松弛时即消失. 提示了: 皱褶的皱脊出现在溃疡发生现场, 皱褶的皱脊是实体, 具备了形状、张力等物理性质与剪切的发生关系密切.

3.2.1 皱褶皱脊的张力 胃壁回缩时, 皱缩的胃壁因形态变化、密度增加, 张力随之增高. 胃壁回缩到一定程度时, 皱褶两侧的胃壁侧立折叠, 形成一个夹角, 被支撑的皱脊张力增高. 随着胃壁回缩, 肌层密度增高, 皱褶的夹角逐渐变小, 随之皱脊变得尖锐, 皱脊的张力逐渐增高.

3.2.2 皱脊与压强 随着胃壁回缩, 皱褶的夹角逐渐变小, 皱脊随之变得尖锐, 皱脊的横截面积越小, 在收缩力的作用下可产生的压强越大.

3.2.3 皱褶的形状与溃疡 过度扩张后的胃壁在回缩时形成的一些褶皱. 随着胃壁的回缩, 皱褶的皱脊凸向胃腔内呈弧形或舌形; 皱脊俯视为线形, 正视为弧形或半圆形, 皱褶也可被不同方向的力, 卷曲成呈“U”、“V”、“P”、“B”字形样的皱褶及皱脊. 两个方向的皱褶可组合成更多形状的皱褶. 根据皱脊可呈现多种形状, 推理认为: 所有的胃腔内生理组织或可进入胃腔内的物体, 只有能形成多种形状的皱脊, 其印模的形状与溃疡的圆形、卵形、蝌蚪形、哑铃型、三角形、“V”字形、线状等^[2]多种形状相应的近似或能互相完全吻合. 小结: 溃疡的形状是皱

■研发前沿

为了解决溃疡病的理论上和临床上的问题, 建立可验证的溃疡发生机制新理念, 是研究热点. 正确理顺溃疡病与溃疡的关系是附加的重点. 病因的属性应该是事情还是物体? 这是亟待讨论的课题.

■相关报道

溃疡病因学说有很多. 与本文似相近的创伤学说认为, 机械、温热与化学等因素如食物粗糙、辛辣、过酸、烟酒嗜好等均可使胃黏膜受伤, 成为消化学说的起点. 机械刺激学说认为, 胃小弯黏膜皱襞少、移动性差, 粗糙食物的摩擦难免给黏膜造成机械损伤.

■创新盘点

本文用现实中不可辩驳的实事做为依据,建立可检验的医学理论;建立了具逻辑性、科学性的溃疡病因剪应变理论;提出溃疡病与溃疡之间的关系及溃疡病的治疗原则。

褶皱及皱脊留在剪切现场的重要证据。凸向胃腔内的褶皱及皱脊与剪切的发生密切相关。

3.3 剪切需要的动力 溃疡好发部位多在环行肌的起始部,因为该处蠕动最强烈。溃疡口皱襞断裂、匍行向溃疡口周围集中或排列等现象^[2-3],是致溃疡因子运动的轨迹,是溃疡发生机制中有压力和运动在溃疡现场的证据。消化道舒张收缩的运动,挤压碾磨机械性消化生理功能运动;平滑肌强烈痉挛的收缩而发生腹痛;抑制动力等措施可缓解溃疡痛等表现^[9];根据内脏性疼痛产生原因与动力相关^[2]。提示了:剪切发生所需要的动力,是消化道生理功能运动的收缩力。

3.4 剪切时胃腔的状态 胃的前后壁相接触^[5];挤压碾磨机械性消化的生理功能;减少摩擦等措施可缓解溃疡痛;应用舒张平滑肌措施可缓解溃疡痛^[9];胃痉挛时疼痛出现^[2];提示了:溃疡是在相对的机体组织互相挤压碾磨的状态下发生的。据此认为:其状态与剪切发生时的状态密切相关。

3.5 剪切与胃内容物 溃疡一般较小,与剪应力和切力的大小成正比,与横截面积成反比^[11]。提示了,胃内容物的小颗粒在收缩力的作用下,产生的切力大,容易发生剪切,是溃疡一般较小的部分原因。据此认为:胃内容物的颗粒与剪切的发生密切相关。

3.6 剪切发生的时间 空腹时,消化间期移行性运动复合波(MMC),MMC II相有间断不规则的收缩MMC, III相为连续强烈的收缩... I相时胃窦无收缩,而近端胃保持一定的张力,并不完全松弛, II相远端胃偶而出现有力收缩, III相时胃窦有规律的收缩频率达到最大,此时近端胃也偶尔出现收缩。不消化的大颗粒食物在MMC III相时排空^[9]。据此认为:剪切的发生主要在空腹的消化间期胃运动时。在这一时间段内有高张力机体组织、尖锐的皱脊、机体组织互相直接的挤压、内容物颗粒、强烈的收缩及频率等出现在同一现场。集聚着剪切发生的必要因素。在这一时间段里有剪切发生的环境,这一时间段是剪切发生的主要时间。

4 胃溃疡发生机制

胃壁过度的扩张,平滑肌部分组织过度的拉伸超过弹性极限,发生暂时或永久的塑性形变。当胃体收缩并向上缘靠拢,扩张的呈球形胃壁不能完全回缩则产生一些皱褶。皱褶顶部的皱脊凸向胃腔内。由平滑肌折叠的立面支撑的皱脊;在张力性收缩时呈高张力状态。在胃腔紧缩时皱褶的皱

脊横截面积变小。在收缩运动时,产生高压强的压力频繁地冲压、推挤、碾磨相对的胃腔内高张组织。因节律性运动无移行性^[6,9];运动轨迹不变;胃壁皱褶形成的位置不变,所以,皱褶与高张组织相对挤压点的位置不变。形成了剪切态势。在剪切态势下,当挤压点的应力超过了弹性应变的极限,挤压点的黏膜肌层及肌层相互融合,发生塑性形变^[7-8],高张组织可以被相对的皱褶频繁地冲压、推挤、碾磨,发生了凹陷呈漏斗样塑性变形^[2]。在高压强的作用下,高张组织受压点,发生了只有形状变化而没有体积变化的体应变。肌层组织被剪切,发生了剪应变。凹陷处如果嵌入胃内容物的游离小颗粒。皱脊在收缩力作用下的压力,作用在粗糙的胃内容物的颗粒,频繁地冲压相对的高张组织上。而被剪切,发生了剪应变。在剪切态势下,相对的机体组织长时间的挤压,致挤压点因长时间的缺血而痉挛,又因痉挛而缺血的恶性反复,被挤压点发生塑性形变,因没有延展性,而表现为脆性。当挤压点的应力超过极限,发生了剪应变。在剪切的作用下,皱褶在胃腔内的相对高度与剪切深度相关,浅者致黏膜发生剪应变,黏膜破碎为糜烂。深者致肌层发生剪应变,肌层缺损为溃疡。如相对的组织双方都发生剪应变,则肌层互有缺损,成对吻性溃疡。

总之,如果在检查溃疡病时不破坏现场,就有可能发现一些致溃疡因素在现场的重要证据。溃疡病因剪应变理论目前还只是在推理上,目前还没有溃疡发生过程现场纪实的证据,是溃疡病因剪应变理论存在的问题。有关剪应变理论在其他溃疡发生机制中的表达、促溃疡形成因素、以及溃疡病在现实中的具体问题的,以后可继续讨论。对缓解目前治疗溃疡病用质子泵抑制剂的不良反^[12],彻底根除幽门螺杆菌的困难^[13],剪应变理论可作为参考。

5 参考文献

- 1 孙克武,董德长. 临床理论与实践. 第1版. 上海: 上海科学普及出版社, 1994: 62-63
- 2 郑芝田. 消化性溃疡病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 19-406
- 3 陈敏章, 吴锡琛, 张志宏, 张齐联, 徐富星. 消化道内镜术. 第1版. 南通: 江苏科学技术出版社, 1993: 44-46
- 4 刘震华, 张国政. 胃外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 9-15
- 5 周吕. 胃肠生理学基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 1998: 343-351
- 6 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1998: 842-927
- 7 刘康年, 谢敬霞. 消化系影像诊断学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 67-70

■名词解释

皱褶和皱脊: 皱褶是平滑肌收缩形成的褶子,皱脊是黏膜原有的褶子,二者在结构、形状、张力、性质等有所不同。为避免二者的概念混淆,故将平滑肌形成的褶子称皱褶,皱褶凹陷的一面,紧缩时可折叠一条线称皱纹;另一面则凸出,折叠形成的凸点或凸棱(有的称小峰)称皱脊。

- | | | | |
|----|--|----|--|
| 8 | 汪鸿志, 曹世植. 现代消化性溃疡病学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 11-32 | 11 | 胡纪湘. 医用物理学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 10-12 |
| 9 | 侯小华. 消化道运动学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1998: 232-672 | 12 | 林庚金. 消化病新概念. 第1版. 江苏: 上海医科大学出版社, 1997: 36-38 |
| 10 | 郑芝田. 胃肠病学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 81-168 | 13 | 胡伏莲, 周殿元, 贾博琦. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1997: 45-530 |

■同行评价

本文回顾了近十年来提出了消化性溃疡尤其是胃溃疡发生中剪应变理论相关问题, 有不少新思路.

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 •**欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》**

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

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

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

血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道的作用

姜柳琴, 林琳

■背景资料

CO、NO等气体信使分子是近年来的研究热点,在各系统中均已较多的研究报道。关于CO/HO体系在胃肠道的病理生理作用研究较多,但尚无较全面的综述。

姜柳琴, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

通讯作者: 林琳, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化科. linlin9100@hotmail.com

电话: 025-83781836-6920

收稿日期: 2006-03-27 接受日期: 2006-04-20

摘要

内源性一氧化碳在人体是一种重要的化学信号物质,调节神经递质传导、平滑肌的紧张性及其对细胞损伤的反应,并在细胞功能和通讯方面发挥重要的信号转导作用。现就一氧化碳及血红素氧合酶的合成、分布及在消化道的的作用作一综述。

关键词: 一氧化碳; 血红素氧合酶

姜柳琴, 林琳. 血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1612-1616

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1612.asp>

0 引言

内源性一氧化碳(carbon monoxide, CO)在人体的生物学功能已受到医学界广为重视,其在胃肠道的作用日益受到关注。现已明确CO和一氧化氮(nitric oxide, NO)在人体某些功能中的作用较相似,也是一种重要的化学信号物质^[1-2],调节神经递质传导、平滑肌的紧张性及其对细胞损伤的反应,并在细胞功能和通讯方面发挥重要的信号转导作用。现对CO在胃肠道的病理生理学作用进行初步探讨。

1 CO的合成和平滑肌细胞

外源性CO主要由呼吸带入体内。内源性CO至少有两条合成途径:一是在氧化偶连基础上依赖NADPH的微粒体脂质过氧化产生;二是由血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)催化分解血红素而产生。自1968年Tenhunen首次发现在细胞微粒体中存在HO以来,HO的研究日益受到重视。直到1980年代末HO仍被简单地认为是清除多余血红素的反应体系。目前已证实HO能产生CO、胆绿素、Fe²⁺和H₂O₂,其代谢产物具有重要生物功

能,在胃肠道的作用尚不完全清楚^[3-4]。

HO有3种形式的同工酶:诱生型HO(HO-1),原生型HO(HO-2)及HO-3,前两者位于细胞内质网中^[4-6],HO-3已被证实不产生CO,其功能还不清楚^[7]。HO-1主要分布于单核-巨噬细胞系统(脾、肝和骨髓)及网状内皮细胞内;HO-2则主要分布于脑和睾丸,胃肠道平滑肌中亦有分布^[8]。HO-1和HO-2是不同的基因产物,两者的编码基因分别位于染色体22q12和16p13.3。这两种酶结构虽不同,但其反应底物相同,同样依靠NADPH辅酶的氧化,利用氧自由基清除血红素,而且其反应生成物也相同。

CO在机体内通过活化环鸟苷酸(cyclic guanosin monophosphate, cGMP)来完成其作用。CO在有机溶剂中溶解度大,能迅速通过细胞膜。当CO进入平滑肌后,与可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)中血红素的亚铁离子结合,使sGC构象发生变化,酶的活化中心暴露,三磷酸鸟苷(guanosin triphosphate, GTP)转变成cGMP,通过胞内肌浆网钙离子的释放,使平滑肌细胞舒张,肌肉松弛^[9-10]。CO的产生在许多组织中提高了cGMP的水平,激活了I型cGMP依赖的蛋白激酶和松弛平滑肌细胞^[11-12],这些提示CO确实能调节cGMP的水平。在敲除HO-2基因的小鼠回肠较野生型小鼠cGMP的基础水平明显低。

CO对于保持胃肠道肌层细胞膜电势梯度是不可缺的。大多数学者认为CO在胃肠道肌层是个超极化因子^[13-14]。在小鼠和狗,CO浓度和血红素氧合酶活性反应了平滑肌膜电势的水平^[14]。从胃底至幽门膜电位存在较大的电势梯度,在远端胃和小肠靠近纵形肌的环形肌区域的膜电位较靠近黏膜的低10 mV;在胃、小肠和结肠等超极化区域CO产物和血红素氧合酶活性较高,在较为去极化的区域则较低。如果没有电势差的存在,环形肌对于电活动将只会存在全或无形式的收缩。胃肠平滑肌具有相同的机械性阈值,不同的刺激强度可引起不同强度的收缩:较

弱的刺激只能引起部分平滑肌细胞收缩, 而一个较强的刺激则能引起更多的平滑肌细胞收缩, 这也提示了CO在控制胃肠收缩方面的作用。

有人认为并不能通过HO-2的存在来判断CO的超极化作用。外周自主神经节神经元中HO-2免疫活性呈强阳性, 但在HO-2敲除的小鼠却没有显示去极化趋势^[14], 提示在这些神经元中HO-2和CO可能起了不同的作用。平滑肌细胞临近的Cajal间质细胞(intertitial cells of Cajal, ICC)HO-2免疫活性为阳性, 目前多数学者认为ICC具有调节电信号、起搏胃肠道平滑肌细胞运动, 并且调节神经递质的传递的作用, 有学者认为ICC还具有产生CO并且使平滑肌细胞超极化的作用^[14]。

2 胃肠道HO的表达及其作用

在正常生理状态下, CO的合成由HO活性决定; 体内不同机制调节HO-1和HO-2的活性, 其生理病理学作用不尽相同。

2.1 HO在胃肠道的表达 正常状态下HO-1在胃肠道表达水平较低, 在疾病、创伤和/或炎症等病理状态时表达升高, 而HO-2在正常胃肠道即有较高表达。有报道在人类、小鼠、狗、猫、豚鼠、猪等的胃肠道肌间神经丛神经元胞体和纤维以及深肌层神经纤维均表达HO-2样的免疫反应^[15-19]。胃肠道某些非神经细胞也表达HO-2, 包括黏膜上皮细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞和ICC^[12,19-23]。小鼠结肠和小肠的ICC均表达HO-2, 胃底ICC却不表达HO-2, 研究发现结肠和小肠平滑肌环肌层膜电位电势存在梯度分布, 胃底却无此表现, 而且胃底的平滑肌细胞膜电位较胃的其余部位相对超极化, 可能是源于缺少CO的分泌^[13]。文献^[19-20]报道人类胃窦和结肠的ICC表达HO-2免疫活性, 另一报道则表示在胃窦和空肠的ICC无HO-2的表达^[16]。

2.2 HO的调节及相关作用 (1)HO-1的调节及作用 脾脏高表达HO-1, 衰老的红细胞在此被破坏形成血红蛋白。细胞损伤和/或炎症能诱导全身组织HO-1的基因转录。病理状态下, HO-1尚具有清除血红素的作用。缺氧、紫外线照射、氧自由基、重金属、细胞因子、脂多糖、冷刺激和热休克均可诱导HO-1的产生^[24-25]。动物模型中, 低浓度的CO亦可诱导HO-1的表达, 并且促进胃肠道运动和环形肌的收缩^[26]。实际上, HO-1即热休克蛋白HSP32, 是细胞受到病理刺激时的重要反应物质。HO-1缺失的突变小鼠机体细

胞对应激的能力大为下降, 表现为早夭、慢性炎症、发育迟缓等^[27], HO-1缺失的人类同样出现相似症状^[28]。已证实HO-1表达上调, 可保护肌肉、内皮和肺脏等机体组织免受损伤^[29]; 敲除HO-1基因的小鼠更易发生移植器官的排斥反应^[30]。现已证实HO-1在胃肠道及其疾病发生中具有重要作用。正常生理状态下除脾脏外, 健康胃肠道极少表达HO-1^[15]。当胃肠病变/损伤时, HO-1大量诱导产生, 有利于病变/损伤的修复; 在结肠炎动物模型中, HO-1表达明显升高, 炎症反应减轻且较快恢复^[31-32]。HO-1的诱导产生提示了潜在的抗炎途径, 该通路可以改善组织损伤, 有利于组织修复^[5,33-34]。HO-1的诱导调节对于治疗某些胃肠道疾病, 包括对于炎症性肠病、器官移植后排斥反应等创伤, 可能成为有效的靶向治疗方法^[35], 为胃肠道疾病治疗带来新的理念。(2)HO-2的调节及作用 HO-2是原型血红素氧合酶, 急性刺激能提高HO-2活性, 如血管肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)刺激负鼠肛门内括约肌引起的非肾上腺能非胆碱能(nonadrenergic noncholinergic, NANC)神经反应^[36-37]。目前已证实通过促进Ca²⁺内流、蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)信号转导系统活化^[38]从而诱导HO-2活性, 而酪氨酸激酶、谷氨酸脱氢酶NAD(P)+很可能是HO-2活化的中介产物, 细胞内第二信使可能在调节HO-2的活性中起着关键作用^[39]。近来证实HO-2也受蛋白激酶CK2调节, 通过CK2作用可使HO-2活化, 从而调节CO的分泌^[40]; 实验证实应用CK2阻断剂四溴-2-氮杂苯并咪唑, 可使鼠的肛门内括约肌松弛。糖皮质激素能调节HO-2的转录表达, 应激状态下HO-2水平可升高, 研究发现猪出生后数天, 肾上腺成熟和糖皮质激素初步合成时, 十二指肠HO-2的表达升高^[18], 但HO-2与应激间的关系尚未完全阐明。

3 CO和NO的协同作用

1987年NO作为细胞内信使^[41-45], 被广大学者认识并熟悉, 在此基础上研究者们发现CO与其极为相似: 分子结构十分相似, 下游靶目标相同, 同样通过与GC活化位点上的血红素结合来活化GC导致cGMP水平的升高^[46-49], 具HO-2免疫活性的神经元也能表达一氧化氮合酶(NOS), 在人类黏膜下神经节HO-2和NOS表达比例在10%以内, 在猪的胃底则高达100%^[50]。两者鉴别在于: CO对亚铁血红素分子有高度亲和力, 能够

■相关报道

CO/HO体系在神经系统、心脏、呼吸、肾脏等方面已有较多的报道, 且关于其在胃肠道的表达及与相关疾病的关联也有较多报道。

■同行评价

本文较系统地介绍了HO/CO体系的合成、分布以及在胃肠道中的病理生理学作用,有一定的新意和科学性,对胃肠道的研究也起到一定指导的作用。

移动组氨酸残基,而且具有较强的化学稳定性,无法自由地与氧或巯基反应,因此他有数分钟的生理性半衰期,而NO仅有数秒;并且CO激活sGC的功效较NO微弱。NO通过诱导转录和稳定HO mRNA而提高HO-1的表达^[51],NO诱导HO-1可能依赖两者之间的相对浓度^[52],其反应机制还不十分清楚。CO调节NOS活性是浓度依赖性的,高浓度CO水平抑制NOS活性,而低浓度则刺激NO产生^[17,53]。在胃肠道平滑肌细胞中,CO诱导的主要是神经型和内皮型NOS活性^[54-56]。CO诱导NO的生成也可用来解释,GC与CO亲和力虽低,但CO却可引起大量cGMP的产生^[50]。

在肠神经系统,CO和NO在传递抑制性神经递质、维持胃肠平滑肌细胞静息膜电位等方面互相影响^[9,16,57-60]。在HO-2或nNOS基因被敲除的小鼠发现平滑肌细胞静息膜电位具去极化趋势,在两个基因同时被敲除的小鼠中,去极化更明显。在HO-2基因被敲除的小鼠几乎无NANC的神经递质传递,应用外源性CO后即可恢复^[57,61]。功能性胃肠病研究提示不同基因敲除的小鼠存在不同形式的胃肠运动紊乱,当nNOS敲除时,小肠和大肠的传输时间正常,但胃排空延缓,但HO-2敲除时,动物则表现出全胃肠传输时间延缓^[62]。HO-2被敲除的小鼠尽管有NO的持久表达,但电刺激几乎无反应,因此有学者认为在无内源性CO产生的情况下,NO系统可能无法发挥作用^[60]。

虽然CO在人体的病理生理学作用尚未完全明了,但CO在胃肠道具有极其广泛的生理病理作用。目前认为CO可能参与人体抗炎修复过程,期望成为一种新型靶向治疗方法。

4 参考文献

- Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ. Free Radical Biology and Medicine: It's a Gas, Man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;
- Kim HP, Ryter SW, Choi AM. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 411-449
- Guo X, Shin VY, Cho CH. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sci* 2001; 69: 3113-3119
- Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 585-630
- Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 177-184
- Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-554
- McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732
- Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *Am J Physiol* 1998; 274: G350-358
- Rattan S. The internal anal sphincter: regulation of smooth muscle tone and relaxation. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17 Suppl 1: 50-59
- Kadinov B, Itzev D, Gagov H, Christova T, Bolton TB, Duridanova D. Induction of heme oxygenase in guinea-pig stomach: roles in contraction and in single muscle cell ionic currents. *Acta Physiol Scand* 2002; 175: 297-313
- Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 334-350
- Durante W, Peyton KJ, Schafer AI. Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2666-2672
- Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556: 325-336
- Farrugia G, Lei S, Lin X, Miller SM, Nath KA, Ferris CD, Levitt M, Szurszewski JH. A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8567-8570
- Miller SM, Reed D, Sarr MG, Farrugia G, Szurszewski JH. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 121-131
- Miller SM, Farrugia G, Schmalz PF, Ermilov LG, Maines MD, Szurszewski JH. Heme oxygenase 2 is present in interstitial cell networks of the mouse small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114: 239-244
- Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S, Rattan S. Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G148-155
- van Ginneken C, van Meir F, Sys S, Weyns A. Stereologic description of the changing expression of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase in the enteric plexuses of the pig small intestine during development. *J Comp Neurol* 2001; 437: 118-128
- Piotrowska AP, Solari V, de Caluwe D, Puri P. Immunocolocalization of the heme oxygenase-2 and interstitial cells of Cajal in normal and aganglionic colon. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 73-77
- Porcher C, Orsoni P, Berdah S, Monges G, Mazet B. Distribution of heme oxygenase 2 in nerves and c-kit(+) interstitial cells in human stomach. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 317-322
- Piotrowska AP, Solari V, Puri P. Distribution of heme oxygenase-2 in nerves and interstitial cells of Cajal in the normal pylorus and in infantile

- hypertrophic pyloric stenosis. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1182-1186
- 22 Christou H, Bailey N, Kluger MS, Mitsialis SA, Kourembanas S. Extracellular acidosis induces heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2647-2652
 - 23 Liu DN, He ZY, Fang Y, Wu LR, Liu XD, Yu L. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide are key mediators for vascular smooth muscle cells proliferation induced by insulin-like growth factor-I. *Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi* 2006; 34: 153-158
 - 24 Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 1999; 31: 459-475
 - 25 Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Seda Neto J, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Bauer AJ, Nalesnik MA, Otterbein LE, Geller DA, Murase N. Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery* 2003; 134: 285-292
 - 26 Moore BA, Otterbein LE, Turler A, Choi AM, Bauer AJ. Inhaled carbon monoxide suppresses the development of postoperative ileus in the murine small intestine. *Gastroenterology* 2003; 124: 377-391
 - 27 Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10925-10930
 - 28 Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999; 103: 129-135
 - 29 Camara NO, Soares MP. Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 426-435
 - 30 Soares MP, Brouard S, Smith RN, Bach FH. Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol Rev* 2001; 184: 275-285
 - 31 Murthy S, Flanigan A, Coppola D, Buelow R. RDP58, a locally active TNF inhibitor, is effective in the dextran sulphate mouse model of chronic colitis. *Inflamm Res* 2002; 51: 522-531
 - 32 Berberat PO, A-Rahim YI, Yamashita K, Warny MM, Csizmadia E, Robson SC, Bach FH. Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 350-359
 - 33 Scott JR, Gray DK, Bihari A, Badhwar A, Zhang X, Shan P, Lee PJ, Chakrabarti S, Harris KA, Potter RF. Heme oxygenase modulates small intestine leukocyte adhesion following hindlimb ischemia/reperfusion by regulating the expression of intercellular adhesion molecule-1. *Crit Care Med* 2005; 33: 2563-2570
 - 34 Ping W, Qizi Y, Hesheng O, Lijia T, Jun Y, Chaoshu T. Endogenous heme oxygenase/carbon monoxide system mediates lipopolysaccharide-induced intussusception in rats. *Chin Med Sci J* 2000; 15: 89-92
 - 35 Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J Exp Med* 2005; 202: 1703-1713
 - 36 Chakder S, Cao GY, Lynn RB, Rattan S. Heme oxygenase activity in the internal anal sphincter: effects of nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* 2000; 118: 477-486
 - 37 Rattan S, Chakder S. Influence of heme oxygenase inhibitors on the basal tissue enzymatic activity and smooth muscle relaxation of internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 1009-1016
 - 38 Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2445-2450
 - 39 Leffler CW, Balabanova L, Fedinec AL, Waters CM, Parfenova H. Mechanism of glutamate stimulation of CO production in cerebral microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H74-80
 - 40 Boehning D, Moon C, Sharma S, Hurt KJ, Hester LD, Ronnett GV, Shugar D, Snyder SH. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron* 2003; 40: 129-137
 - 41 Pavel J, Lukacova N, Marsala J. The effect of repeated sublethal ischemia on NO/cGMP signal transduction system in gray matter of the rabbit spinal cord. *Bratisl Lek Listy* 2001; 102: 273-277
 - 42 Roy DR, Barnstable CJ. Developmental expression of intracellular targets of cGMP in rat visual cortex and alteration with dark rearing. *Vis Neurosci* 2001; 18: 109-118
 - 43 Hartell NA. Receptors, second messengers and protein kinases required for heterosynaptic cerebellar long-term depression. *Neuropharmacology* 2001; 40: 148-161
 - 44 Seidel C, Bicker G. Nitric oxide and cGMP influence axonogenesis of antennal pioneer neurons. *Development* 2000; 127: 4541-4549
 - 45 Koesling D, Mullershausen F, Lange A, Friebe A, Mergia E, Wagner C, Russwurm M. Negative feedback in NO/cGMP signalling. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1119-1122
 - 46 Prieto D, Rivera L, Recio P, Rubio JL, Hernandez M, Garcia-Sacristan A. Role of nitric oxide in the relaxation elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *J Urol* 2006; 175: 1164-1170
 - 47 Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol* 2003; 160: 719-727
 - 48 Bishop CD, Brandhorst BP. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Biol Bull* 2001; 201: 394-404
 - 49 Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86: 583-650
 - 50 Lim I, Gibbons SJ, Lyford GL, Miller SM, Strege PR, Sarr MG, Chatterjee S, Szurszewski JH, Shah VH, Farrugia G. Carbon monoxide activates human intestinal smooth muscle L-type Ca²⁺ channels through a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G7-14
 - 51 Hartsfield CL, Alam J, Cook JL, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997; 273: L980-988
 - 52 Hartsfield CL. Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4:

- 301-307
- 53 Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol* 1999; 277: F882-889
- 54 Yang NC, Lu LH, Kao YH, Chau LY. Heme oxygenase-1 attenuates interleukin-1 β -induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci* 2004; 11: 799-809
- 55 Srisook K, Cha YN. Super-induction of HO-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide* 2005; 12: 70-79
- 56 Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 588-594
- 57 Rattan S, Regan RF, Patel CA, De Godoy MA. Nitric oxide not carbon monoxide mediates nonadrenergic noncholinergic relaxation in the murine internal anal sphincter. *Gastroenterology* 2005; 129: 1954-1966
- 58 Kinobe R, Ji Y, Nakatsu K. Peroxynitrite-mediated inactivation of heme oxygenases. *BMC Pharmacol* 2004; 4: 26
- 59 Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2631-2635
- 60 Srisook K, Han SS, Choi HS, Li MH, Ueda H, Kim C, Cha YN. CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O₂- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 307-318
- 61 Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH, Szurszewski JH. Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1851-1855
- 62 Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14848-14853

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。

胰岛素样生长因子 I 与肝纤维化

吕国良, 刘德许

吕国良, 嘉兴学院医学院诊断教研室 浙江嘉兴 314001
刘德许, 嘉兴学院医学院微生物免疫教研室 浙江嘉兴 314001

通讯作者: 吕国良, 314001, 浙江省嘉兴市, 嘉兴学院医学院诊断教研室. lgliang3756@hotmail.com
电话: 0573-3643840

收稿日期: 2006-03-06 接受日期: 2006-04-20

摘要

胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 是体内普遍存在的多肽, 循环系统中 IGF- I 主要来源于肝脏。在垂体生长激素的调控下, IGF- I 对多种细胞如成纤维细胞、成骨细胞、平滑肌细胞等的有丝分裂均有调节作用。目前观点认为肝星状细胞(HSC)活化后可分泌大量胶原纤维, 是肝纤维化时细胞外基质的主要来源。实验表明 IGF- I 能够促进体外培养HSC增殖、活化并抑制其凋亡。而体内研究发现, 肝硬化患者血清 IGF- I 浓度显著下降, 外源性小剂量 IGF- I 注射能够改善肝功能, 为肝纤维化的治疗提供了新的理念。

关键词: 胰岛素样生长因子 I; 肝纤维化; 肝星状细胞

吕国良, 刘德许. 胰岛素样生长因子 I 与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1617-1620

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1617.asp>

0 引言

IGF家族是一个复杂的体系, 包括胰岛素样生长因子 I, 胰岛素样生长因子 II (IGF- II), 胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)1-6, 1, 2型IGF受体(IGFR)及IGFBP蛋白酶。编码人类 IGF- I 的基因位于第12号染色体, 由6个外显子和多个内含子构成, 成熟 IGF- I 为70个氨基酸的单链多肽, 由3个二硫键相连, M_r 7600。IGF- I 在体内普遍存在, 多数组织均能合成, 而循环血液中的 IGF- I 主要来源于肝脏, 且大部分与IGFBP结合, 只有少数处于游离状态。在垂体生长激素的调控下, IGF- I 对多种细胞如成纤维细胞、成骨细胞、平滑肌细胞等的有丝分裂均有调节作用^[1-4]。肝纤维化是指各种原因引起的肝细胞外基质(ECM)特

别是胶原纤维的过度沉积, 继续发展则演变为肝硬化甚至肝细胞癌, 多种细胞因子参与此病理过程^[5-10]。

1 基础研究

肝星状细胞(HSC)位于肝窦周Disse腔内, 占肝脏所有细胞的13%。静止状态的HSC主要参与视黄醇的代谢调节, 活化后能够合成大量胶原纤维, 是肝纤维化时细胞外基质的主要来源。因此, HSC在肝纤维化病变过程中至关重要^[11-16]。早年研究发现IGF- I 能够促进体外培养大鼠HSC增殖, 并提高其肝细胞生长因子(HGF)的基因表达, 而后者具有促肝细胞再生功能^[17]; Svegliati *et al*^[18]的研究进一步表明, IGF- I 亦可能经PI3-K及ERK途径促进体外培养的HSC增殖, 并提高细胞培养液中1型胶原的基因表达。近期的研究发现IGFBP1在急性肝脏损伤和修复过程中大量表达, 并可提高IGF- I 对有丝分裂信号的敏感性, 协同促进体外培养大鼠HSC的增殖^[19]。此外, 正如HSC的激活是肝纤维化的关键, 其凋亡亦是肝纤维化恢复的主要调控机制^[20-21]。Issa *et al*^[22]在实验中利用去血清诱导体外培养大鼠HSC凋亡, 发现当培养液中加入10 μ g/L及100 μ g/L浓度的IGF- I 后, HSC的凋亡均能显著被抑制, 尽管Fas/FasL与凋亡关系密切, 但该试验中并未发现IGF- I 对FasLmRNA有何影响, 故其具体抗凋亡机制有待于进一步研究。综合体外研究结果, IGF- I 能够促进HSC增殖、活化并抑制其凋亡, 提示有加速肝纤维化疾病进展的可能。然而体内研究与体外培养HSC的实验结果却并不一致。在肝硬化大鼠循环血液中IGF- I, IGFBP3含量较正常大鼠明显下降, 局部肝组织中IGFBP3分布亦发生改变^[23]。万荣 *et al*^[24]利用四氯化碳 sc 制备大鼠肝纤维化模型, 发现外源性小剂量IGF- I sc 能够减轻肝细胞变性坏死, 具有抗大鼠肝纤维化的作用, 这可能与改善肝功能、抑制HSC活化等有关。此外, IGF- I 抗纤维化、降低肝损的作用在其他试验中亦被证实^[25-26]。但IGF- I 体内实验中的这种具体护肝机制并不十分清楚, 有实

■背景资料

肝星状细胞(HSC)与肝纤维化的发病关系密切, 胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 主要来源于肝脏。近年来各种体内、外研究发现检测血清 IGF- I 对判断肝纤维化病变的程度、疾病的预后有一定提示意义。外源性小剂量 IGF- I 注射能够改善肝功能, 延缓纤维化进展, 为临床肝纤维化疾病提供了新的治疗理念。

■研发前沿

首先在肝纤维化的发病机制方面,目前认为HSC的活化起主要作用,因此对于HSC增殖、活化及凋亡的研究较受关注。其次,多种细胞因子参与肝纤维化的病理过程,其中转化生长因子 β (TGF- β)、胰岛素样生长因子(IGF)、结缔组织生长因子(CTGF)、干扰素(IFN)、白细胞介素-10(IL-10)等研究较多。IGF-I主要来源于肝脏,在肝纤维化病变前后循环系统中及肝组织局部的改变还需进一步实验研究。

研究发现,在外源性小剂量IGF-I注射后,纤维化肝脏已发生变化的基因表达部分得以恢复,生长激素敏感性上调,整体基因组DNA出现甲基化^[27]。Sanz *et al*^[28]利用转基因小鼠(SMP8-IGF-I TG)特异性在体内高表达HSC源性IGF-I,发现在四氯化碳肝纤维化造模后72 h,与野生型相比SMP8-IGF-I转基因小鼠血液中转氨酶及肝组织中 α SMA均显著下降;而且细胞外胶原、纤维连接蛋白基因表达亦明显降低,同时发现转基因小鼠肝细胞生长因子基因表达增加及转化生长因子表达下降,部分解释了IGF-I的护肝机制。此外,尚有研究表明外源性IGF-I注射能够降低肝硬化大鼠门脉压力,改善肠道微观形态,提高肠道屏障功能,抑制氧化性肝损伤^[29-33],为临床试验提供了理论依据。

2 临床试验

通过对急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化代偿期、肝硬化失代偿期及肝癌患者血清IGF-I, IGFBP3检测发现,与正常对照组相比急性、慢性轻中度肝炎患者血清中IGF-I显著升高,而重度肝炎则无显著差异;肝硬化代偿、失代偿阶段及肝癌患者血清中IGF-I, IGFBP3明显降低。提示在肝病发展过程中检测血清IGF-I可作为一种判断肝细胞损伤的指标^[34-39],而不同病因所致肝硬化对血清IGF-I浓度并无明显影响^[40]。在一项前瞻性队列研究中发现,丙肝后肝硬化患者癌变时伴随着血清IGF-I浓度明显下降,且这种血清学变化早于肝组织学的改变,提示IGF-I对肝硬化癌变亦有早期提示意义^[41]。此外,研究发现对照肝血管瘤患者,肝硬化肝癌病人肝组织中IGF-I, IGFBP3基因表达均明显下降,而这种IGF-I, IGFBP3的表达失衡有可能参与肝硬化癌变及肿瘤的进展过程^[42]。Wu *et al*^[43]通过测定肝炎后肝硬化患者血清IGF-I, IGF-II, IGFBP3含量并与健康者对比,发现血清中IGF-I, IGF-II, IGFBP3浓度与肝功能有明显相关性,并随着肝功能的减退而进行性降低;在该研究中,IGF-I浓度 $<30 \mu\text{g/L}$, IGF-II $<200 \mu\text{g/L}$, IGFBP3 $<6 \mu\text{g/L}$ 的6例患者中,5例在半年内因肝衰竭或出血死亡,提示联合检测IGF-I, IGF-II, IGFBP3对疾病的预后评估作用,但仍需长期随访后再作评论。在Conchillo *et al*^[44]设计的一个随机双盲安慰剂对照临床试验中,将18例肝硬化患者随机分为治疗组和安慰剂组;其中治疗组酒精性肝硬化7例,原发性胆汁性肝硬化2例;安慰剂组酒精性

肝硬化8例,原发性胆汁性肝硬化1例;分别给予IGF-I每天 $20 \mu\text{g/kg}$ (按比例增加至 $50-100 \mu\text{g/kg}$)或安慰剂sc, 4 mo后:IGF-I治疗组患者血液中IGF-I含量及IGF-I/IGFBP3比率均升高,但仍低于正常值;与对照组相比IGF-I治疗后血白蛋白水平明显升高,且与IGF1/IGFBP3比率呈正相关。尽管该试验样本量小,但为进一步的大规模临床试验奠定了基础。总之,肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理过程, HSC的活化与肝纤维化启动、进展关系密切^[45-49],促进活化的HSC凋亡则有抑制肝脏纤维化作用^[50]。IGF-I促进体外培养HSC增生、活化及细胞外基质分泌,抑制其凋亡。然而大量动物实验表明外源性IGF-I注射能够抑制肝纤维化,减低氧化性肝损伤,纠正营养失衡,改善肝功能。导致这种体内、外实验结果相悖的原因尚不十分清楚,在体外细胞培养环境中,影响因素较为单一,而IGF-I在体内的生物学活性受IGFR, IGFBP及各种细胞因子的多因素调节。此外,亦有肝硬化大鼠局部肝组织IGF-I表达增加及IGF-I对体外培养大鼠HSC与肌成纤维细胞(MF)的作用相异的报道^[51-52]。因此,对于IGF-I促HSC增殖的机制及体内研究中的具体护肝机制仍需进一步研究阐明。尽管如此,检测血清IGF-I对判断肝纤维化病变的程度、疾病的预后仍有一定提示意义,且为临床肝纤维化疾病提供了新的治疗理念。

3 参考文献

- 1 范海健, 王勇, 吴效科. 胰岛素样生长因子系统的研究进展. 医学研究生学报 2005; 18: 746-750
- 2 Jehle PM, Schulten K, Schulz W, Jehle DR, Stracke S, Manfras B, Boehm BO, Baylink DJ, Mohan S. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein (IGFBP)-1 to-6 and their relationship to bone metabolism in osteoporosis patients. *Eur J Intern Med* 2003; 14: 32-38
- 3 Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20: 761-787
- 4 Kelley KM, Schmidt KE, Berg L, Sak K, Galima MM, Gillespie C, Balogh L, Hawayek A, Reyes JA, Jamison M. Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *J Endocrinol* 2002; 175: 3-18
- 5 聂青和. 肝纤维化的逆转策略及研究现状. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1165-1174
- 6 张斌. 肝纤维化的发病机制研究进展. 现代诊断与治疗 2004; 15: 354-359
- 7 蔺咏梅. 肝纤维化诊断和治疗新进展. 航空航天医药 2005; 16: 55-56
- 8 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 9 Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis.

■创新盘点

对于IGF-I与肝病的综述亦有类似的报道。本文主要从基础研究和临床试验两个方面出发,就近年来IGF-I在肝纤维化中的研究情况作一综述。

- Gut* 2005; 54: 303-306
- 10 McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G497-G502
 - 11 曾军, 杨镇. 肝星状细胞、相关因子与肝纤维化关系的研究进展. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 426-429
 - 12 Par A, Par G. Liver fibrosis: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Oro Hetil* 2005; 146: 3-13
 - 13 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
 - 14 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
 - 15 程明亮, 耿小霞. 从肝星状细胞激活过程中的信号转导途径谈肝纤维化的干预措施. *中华医学杂志* 2005; 85: 719-780
 - 16 杨伟峰, 陈厚昌, 张绪福. 细胞因子与肝星状细胞的活化. *医学综述* 2003; 9: 651-653
 - 17 Skrtic S, Wallenius V, Ekberg S, Brenzel A, Gressner AM, Jansson JO. Insulin-like growth factors stimulate expression of hepatocyte growth factor but not transforming growth factor beta1 in cultured hepatic stellate cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4683-4689
 - 18 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 1999; 29: 1743-1751
 - 19 Scharf JG, Dombrowski F, Novosyadlyy R, Eisenbach C, Demori I, Kubler B, Braulke T. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 is highly induced during acute carbon tetrachloride liver injury and potentiates the IGF-I-stimulated activation of rat hepatic stellate cells. *Endocrinology* 2004; 145: 3463-3472
 - 20 廖祈祈. 肝星状细胞凋亡研究进展. *中日友好医院学报* 2005; 19: 107-110
 - 21 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939
 - 22 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557
 - 23 Novosyadlyy R, Dargel R, Scharf JG. Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins during thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15: 313-323
 - 24 万荣, 吴云林, 乔敏敏, 章永平, 付爱芬, 辛美珍, 孔雷, 张奕, 刘炳亚. 胰岛素样生长因子-1对大鼠肝纤维化形成的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 211-213
 - 25 Canturk NZ, Canturk Z, Ozden M, Dalcik H, Yardimoglu M, Tulubas F. Protective effect of IGF-1 on experimental liver cirrhosis-induced common bile duct ligation. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2061-2066
 - 26 Muguerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S, Prieto J. Antifibrogenic effect *in vivo* of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1536: 185-195
 - 27 Mirpuri E, Garcia-Trevijano ER, Castilla-Cortazar I, Berasain C, Quiroga J, Rodriguez-Ortigosa C, Mato JM, Prieto J, Avila MA. Altered liver gene expression in CCl4-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 242-252
 - 28 Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodriguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, Fuller CR, Simmons JG, Pardo A, Martinez-Chantar ML, Fagin JA, Prieto J. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut* 2005; 54: 134-141
 - 29 Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R, Martinez-Chantar ML, Martinez-Peralta L, Pardo A, Ojanguren I, Quiroga J, Planas R, Prieto J. Insulin-like growth factor-I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut* 2006;
 - 30 Castilla-Cortazar I, Pascual M, Urdaneta E, Pardo J, Puche JE, Vivas B, Diaz-Casares A, Garcia M, Diaz-Sanchez M, Varela-Nieto I, Castilla A, Gonzalez-Baron S. Jejunal microvilli atrophy and reduced nutrient transport in rats with advanced liver cirrhosis: improvement by Insulin-like Growth Factor I. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 12
 - 31 Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, Diaz-Sanchez M, Navarro I, Puche JE, Castilla A, Casares AD, Clavijo E, Gonzalez-Baron S. Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 7
 - 32 Pascual M, Castilla-Cortazar I, Urdaneta E, Quiroga J, Garcia M, Picardi A, Prieto J. Altered intestinal transport of amino acids in cirrhotic rats: the effect of insulin-like growth factor-I. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G319-G324
 - 33 Nunez M, Urdaneta E, Santidrian S. Effect of insulin-like growth factor-I on nitrogen balance and intestinal galactose transport in rats with moderate liver cirrhosis. *Br J Nutr* 2003; 90: 929-937
 - 34 文启明. 肝病患者胰岛素样生长因子 I 水平观察. *武汉科技大学学报(自然科学版)* 2003; 26: 91-92
 - 35 Elsammak MY, Amin GM, Khalil GM, Ragab WS, Abaza MM. Possible contribution of serum activin A and IGF-1 in the development of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients suffering from combined hepatitis C virus infection and hepatic schistosomiasis. *Clin Biochem* 2006;
 - 36 Mattera D, Capuano G, Colao A, Pivonello R, Manguso F, Puzziello A, D'Agostino L. Increased IGF-I : IGFBP-3 ratio in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59: 699-706
 - 37 Yoshida S, Nio M, Hayashi Y, Ohi R, Kawamura I, Goto T. Serum insulinlike growth factor-I in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 211-215
 - 38 Donaghy AJ, Delhanty PJ, Ho KK, Williams R, Baxter RC. Regulation of the growth hormone receptor/binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 36: 751-758
 - 39 Lou M, Song N, Jin X, Luo SQ, Wang JJ. Detection of serum free insulin-like growth factor 1 in patients with chronic viral hepatitis. *Zhonghua ShiYan He LinChuang BingDuXue ZaZhi* 2001; 15: 291-292
 - 40 Vyzantiadis T, Theodoridou S, Gioulema O, Har-soulis P, Evgenidis N, Vyzantiadis A. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology*

■应用要点

本文就近年来 IGF- I 在肝纤维化中的研究进展情况进行了综述。总结了目前 IGF- I 在体外培养 HSC 中的研究近况及仍存在的问题, 指出了动物实验及临床试验中的相悖之处, 为开展进一步的基础和临床实验研究提供了思路。

■同行评价

本文作者对有关 IGF- I 与肝纤维化关系的国内外文献进行了综述, 指出 IGF- I 在体外实验具有刺激 HSC 介导肝纤维化作用, 而在体内实验性肝纤维化模型具有加速肝脏再生、抑制肝纤维化作用, 同时就 IGF- I 与各种慢性肝脏疾病呈正相关, IGF- I 的水平可作为慢性肝病预后判断的一个指标做了论述。因而本文无论在基础研究还是临床实际工作具有实际指导意义。

- 2003; 50: 814-816
- 41 Mazziotti G, Sorvillo F, Morisco F, Carbone A, Rotondi M, Stornaiuolo G, Precone DF, Cioffi M, Gaeta GB, Caporaso N, Carella C. Serum insulin-like growth factor I evaluation as a useful tool for predicting the risk of developing hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: a prospective study. *Cancer* 2002; 95: 2539-2545
- 42 Luo SM, Tan WM, Deng WX, Zhuang SM, Luo JW. Expression of albumin, IGF-1, IGFBP-3 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4272-4276
- 43 Wu YL, Ye J, Zhang S, Zhong J, Xi RP. Clinical significance of serum IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2740-2743
- 44 Conchillo M, de Knecht RJ, Payaras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JL, Castilla-Cortazar I, Frystyk J, Flyvbjerg A, Yoshizawa C, Jansen PL, Scharschmidt B, Prieto J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005; 43: 630-636
- 45 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 46 Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology* 2006; 43: 872-878
- 47 Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 279-284
- 48 Chuang JH, Wang PW, Tai MH. An adipocentric view of liver fibrosis and cirrhosis. *Chang Gung Med J* 2004; 27: 855-868
- 49 Beljaars L, Meijer DK, Poelstra K. Targeting hepatic stellate cells for cell-specific treatment of liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: e214-e222
- 50 Melhem A, Muhanna N, Bishara A, Alvarez CE, Ilan Y, Bishara T, Horani A, Nassar M, Friedman SL, Safadi R. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 2006;
- 51 Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1287-1291
- 52 Saile B, DiRocco P, Dudas J, El-Armouche H, Sebb H, Eisenbach C, Neubauer K, Ramadori G. IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab Invest* 2004; 84: 1037-1049

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3 000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.

门静脉高压侧支循环与血管内皮细胞生长因子

邓伟哲, 李 柏

邓伟哲, 李柏, 中国人民解放军第二军医大学长海医院中医科上海市 200433

通讯作者: 邓伟哲, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院中医科. deng-wz@163.com

电话: 021-65589741

收稿日期: 2006-03-05 接受日期: 2006-03-29

摘要

新近发现门静脉高压侧支循环形成与血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱导的血管生成有一定的关系, 这对传统认为的门静脉压力增高引起被动的血管通道开放的理论提出了挑战. 研究提示在门静脉高压动物中VEGF/VEGF-R2通路促进了门静脉系统侧支血管和高动力循环的形成. 从而证实门静脉高压症侧支循环形成不仅归咎于连接门体静脉系统的分支血管, 而且是VEGF依赖的血管生成结果. 现就近来这方面研究的文献作一综述.

关键词: 门静脉高压症; 侧支循环; 血管生成; 血管内皮细胞生长因子

邓伟哲, 李柏. 门静脉高压侧支循环与血管内皮细胞生长因子. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1621-1626

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1621.asp>

0 引言

门静脉高压症常见病因有门静脉血流增加, 门、脾静脉血栓形成或阻塞, 肝脏疾病等^[1-3], 他的病理主要是门静脉血流的障碍^[4]. 门静脉高压症的主要临床表现之一是门-体侧支循环的建立和开放. 侧支循环所致的胃食管静脉曲张易破裂导致严重的出血^[5-7], 而且还可引起门-体分流导致胃肠道毒性代谢产物积聚, 从而引起肝性脑病、败血症及肺高压病等^[8-10]. 因此门静脉系统的侧支循环形成被认为在门静脉高压所引起的并发症发生机制中起着关键性作用. 先前认为侧支循环形成是由于门静脉的压力增高引起被动的血管通道开放. 但近年来的研究已对这一传统观念提出了挑战, 研究结果显示门静脉系统侧支循环的形成与血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱导的血管生成相关^[11-12]. 通过对侧支

循环形成与血管生成关系的进一步研究可能会开辟一条阻止门静脉高压症并发症发生的新途径.

1 门静脉高压症侧支循环形成的传统认识

肝门静脉系统, 除肝门静脉之外, 包括以下几个分支: 肠系膜上静脉、肠系膜下静脉、脾静脉、胃左静脉、胃右静脉、胆囊静脉和附脐静脉. 肝门静脉不同于般静脉, 其回流的起始端和分支末端都与毛细血管相连, 而且主支及其分支内缺少功能性的静脉瓣^[13]. 另外, 肝门静脉系与上、下腔静脉系之间存在丰富的吻合, 门静脉高压症时血液可以逆流, 并通过这些吻合途径建立侧支循环. 门静脉高压侧支循环属门静脉高压症血管病变范畴, 随着各类门静脉高压症动物模型的建立, 人们逐渐发现门静脉高压症的发病机制与血液动力学之间存在着密不可分的关系^[14]. 肝内血管床减少、受压和变形, 肝内动-门分流等因素所致门静脉阻力增高是其发病的始动因素; 而肝脏灭活与解毒能力下降使某些血管活性物质和毒素增加, 导致全身和门静脉系统高动力循环状态, 致使门静脉血流量增加, 成为其持续存在的重要因素^[15]. 传统认为持久的门静脉阻力增高和高血流量的刺激是门静脉高压症侧支循环形成的主要因素. 主要表现在临床上经典的门静脉与体腔静脉之间的交通支开放. 他的形成机制还包括免疫反应, 基因变化以及血管活性物质作用等^[16-19].

近年来发现建立侧支循环的血管不仅来源于门静脉自身分支血管的扩张(血管发生vasculogenesis), 而且与新血管的生成(血管生成angiogenesis)密切相关^[20]. 分支血管是门静脉系统储备部分的静脉水平的血管, 只有在一定的压力负荷和容量负荷下侧支血管才开放. 而新血管的生成则是毛细血管网水平的形成过程.

2 血管生成与VEGF

血管形成有两种类型: 胚胎发育过程中, 由成血管细胞的分化、增生, 形成原始的血管丛, 并逐

■背景资料

门静脉高压侧支循环形成与血管内皮细胞生长因子诱导的血管生成关系的提出对门静脉压力增高引起被动的血管通道开放的传统理论提出了挑战. 这一研究将为肝内静脉系统回路的恢复和消除门静脉高压症提供帮助.

■同行评价

本文逻辑性、可读性尚可,对今后他人在该领域的研究有一定的指导价值。

渐成熟,称为血管发生.原有血管以芽出和非芽出方式形成新的血管的过程,称为血管生成.血管生成过程初始于血管渗透性增加、随后原血管外基质降解;内皮细胞迁移和增殖,并形成管状结构;最后间质细胞增殖和分化成平滑肌细胞及外周细胞,完成形成一条新血管的过程^[21].许多分子在血管生成中起着正向调节作用.包括VEGF(也称VEGF-A),酸性成纤维生长因子,碱性成纤维生长因子,转化生成因子- α 、- β ,肝细胞生长因子,肿瘤坏死因子等^[22].在所有已知的血管生成调控因子中,VEGF是最主要的,他通过内皮型一氧化氮合酶刺激一氧化氮的合成,而介导血管扩张及增加其渗透性.更主要的是,VEGF促进内皮细胞的迁移、增殖和成熟,并增强细胞表面黏附分子的表达^[22-24].

多种机制参与了VEGF基因的诱导,在理论上,低氧能刺激血管生成,低氧情况下,缺氧诱导转录因子通过刺激VEGF的转录和增强VEGF mRNA的稳定性来增加VEGF蛋白的表达^[25].另外,表皮生长因子,转化生成因子- α 、- β ,血管生成素1,成纤维生长因子等生长因子,也能上调VEGF mRNA的表达,炎症细胞因子白介素-1 α 和白介素-6也可诱导VEGF的表达^[22,26-29].在转录过程中,因编码VEGF mRNA剪接方式的不同,存在多种表达形式VEGF亚型参与血管生成.在转基因鼠的研究中发现,敲除单个VEGF的等位基因后50%的小鼠表现为VEGF表达缺失,引起严重的血管缺陷,最终导致胚胎期死亡^[21,23].通过对细胞外基质中肝素样结合亚型的定位,发现VEGF提供了一种分化梯度和发育模式.在只表达VEGF₁₆₄的小鼠中,血管形态正常,说明这种亚型为血管形态学提供了指导标准^[30].而只表达VEGF₁₂₀亚型的小鼠,血管形态异常,可溶性VEGF₁₂₀分布不均一,不能对血管生成提供全方位的发育模式,从而导致血管的扩张^[30-32].在仅表达VEGF₁₈₈亚型的VEGF^{188/188}小鼠不能广泛地吸引内皮细胞,而且在小区域内血管就出现方向性错误,经常导致错误的扭曲^[30,33].

VEGF有三种受体VEGFR-1(FLT-1)、VEGFR-2(FLK-1)及VEGFR-3.前两者表达于血管内皮细胞表面,而VEGFR-3主要表达于淋巴管内皮^[34-36].除VEGF₁₆₄仅与另一受体神经递素-1(neuropilin1)结合外,所有VEGF亚型都与VEGFR-1和-2结合,现在已经清楚VEGFR-2是VEGF血管生成效应的主要调节者.与VEGF₁₆₄结合的神经递素-1能扩增VEGFR-2的信号^[24,37-39].

在病理情况下,胎盘生长因子(PLGF,一种VEGF的同系物)与VEGFR-1结合可增强血管生成作用. PLGF是唯一同时与VEGFR-1和-2相结合增强VEGF诱导血管生成的因子^[40].

3 VEGF诱导的血管生成和门静脉高压症侧支循环

许多疾病伴随着VEGF诱导的血管生成的过程. Fernandez *et al*^[11-12]率先发现并提出门静脉高压症存在VEGF诱导的血管生成.首先,他们发现门静脉部分缩窄模型小鼠的十二指肠、小肠、肠系膜存在时间依从性的CD31(又称血小板-内皮细胞黏附分子)蛋白表达的增加. CD31在内皮细胞膜表达^[11],并通过与内皮细胞的结合在血管生成方面起着关键作用^[22].另外,在门静脉缩窄小鼠中,不同内脏区域发现VEGF和VEGF-R2蛋白表达量随时间推移而日益明显^[2].在门静脉缩窄大鼠的肠系膜中也发现有VEGF和VEGF-R2,同时有CD31蛋白水平的相似表达^[12].最后,通过阻断VEGFR-2(在小鼠术后,使用一种抗VEGFR-2mAb 5-7 d)和抑制VEGFR-2信号(在大鼠术后,使用一种VEGFR-2自磷酸化抑制剂5 d)^[12]发现,影响内脏血流量和门脉侧支形成是通过抑制VEGF诱导的血管生成来介导的,从而证实侧支循环形成中VEGF/VEGFR-2通路的作用.这两种药理方法均使门静脉部分缩窄模型的小鼠和大鼠门静脉系统的侧支血管数量下降50%,并且通过药物干预使内脏组织中CD31和VEGF-R2蛋白表达有明显下降. Fernandez *et al*^[12]还发现,一方面,对门静脉缩窄大鼠给予VEGF-R2抑制剂5 d后出现门静脉血流量明显下降,并增加了内脏小动脉和门静脉的阻力;而另一方面,术后(当高动力循环充分建立的时候)给予VEGF-R2抑制剂,并不能引起内脏系统的血流动力学改变,提示VEGF-R2抑制剂不具有收缩血管的作用^[12].同时,在门静脉高压大鼠的动脉壁还发现VEGF的低表达.这些发现提示在门静脉高压动物中,VEGF/VEGFR-2通路促进了门静脉系统侧支血管和高动力循环状态的形成.

上述结果为门静脉高压症的病理生理学研究提供了新的方向.传统观点认为伴随门静脉高压症的高动力循环状态是有效的内脏血管扩张的结果^[4].然而,现在发现内脏组织新生血管的增多促使内脏血流量增加,表明VEGF依赖的血管生成过程起了重要作用.而VEGF信号抑制剂可显著减弱门静脉高压大鼠内脏血管数增多所

致的内脏血流量的增加. 研究数据提示VEGF依赖的血管生成是慢性门脉高压症维持高门静脉血流量的基础^[11-12].

尽管VEGF-R2抑制剂治疗后门静脉血流减少, 但门静脉压力却未见降低, 这是因为门静脉系统侧支血管网减少的净效应是增加了所有门静脉侧支血管的阻力, 提示侧支血管阻力是决定门静脉压力的决定因素^[13]. 这些发现也提示, 抗VEGF治疗可能防止侧支血管的形成和曲张^[41]. 一些临床试验也从不同侧面证实了VEGF在侧支循环形成中的作用. 使用ELISA法测定曼森氏血吸虫病血清中VEGF, 发现几乎所有血吸虫病患者的血清VEGF水平明显升高, 其表达量与疾病的进展、门静脉高压症的门体系统侧支的建立、门静脉扩张和脾大等相关^[42]. 另外, 测定门静脉高压和无门静脉高压的肝硬化患者中胃黏膜中VEGF表达, 对比治疗前和治疗后胃黏膜VEGF浓集处, 发现门静脉高压症胃黏膜改变导致VEGF的高表达^[43]. 总之, 门静脉高压症侧支血管形成不仅归咎于传统认为的连结门体静脉系统的血管, 而且还是VEGF依赖的血管生成结果. 门静脉高压症中的VEGF依赖性血管生成的确切机制还未完全阐明, 他应该是多因素的. 实际上, 多种不同的机制可能与门静脉高压症发病机制有关^[24]. 有人通过测定门静脉部分缩窄大鼠模型的胃黏膜血流量、血气分析及胃黏膜中VEGF的表达, 发现模型组动脉血气中的动脉血氧分压和动脉血氧饱和度明显低于对照组, 胃黏膜中VEGF的表达明显高于对照组^[44]. 可以推测, 低氧、缺氧状态导致细胞的应激反应, 从而启动VEGF诱导的血管生成过程. 另外细胞因子和机械应力等也被认为可诱导不同细胞的VEGF表达和促进血管生成^[22]. 因此在门脉系统中触发血管生成可能是门脉压力增高的初始因素, 血流量的增加进一步增强VEGF的过表达, 导致侧支血管和动脉血管的异常增加.

4 肝脏疾病与VEGF

许多肝脏疾病都可引起肝脏持续性损伤, 进而导致肝硬化的形成, 这是造成门静脉高压的根本原因. 目前对于肝病的发生、发展过程中VEGF是起着良性保护作用还是加重肝功能损害进而促使疾病恶化尚有争议.

肝脏再生过程中其结构和生理功能是通过非实质细胞如肝窦内皮细胞和肝细胞数量增多来维持的. 但在肝硬化中肝细胞的再生能力往

往很差, VEGF是肝窦内皮细胞的有丝分裂源, 研究发现在肝硬化大鼠切除70%肝脏的手术前, 给予注射人类VEGF编码的重组腺病毒后能明显刺激肝脏的再生^[45-46]. 肝脏移植术中放置可释放VEGF的支架可提高移植的成功率^[47]. 另一研究发现肝脏手术损伤愈合反应中, VEGF的上调对肝细胞的再生具有促进作用^[48]. 这些研究均表明VEGF对肝脏可能具有良性保护作用.

但近年来更多的证据表明VEGF在多种肝病(多囊肝^[49], 慢性肝炎^[50], 原发性胆汁性肝硬化^[51], 肝细胞癌^[52], 肝纤维化^[53]等)病变组织中的高表达, 可能是其恶化的主要因素, 其中尤以肝硬化、肝脏肿瘤中VEGF的研究丰富. 通过评价肝硬化患者和对照组之间血浆VEGF的水平, 发现肝硬化患者的VEGF明显高于对照组, 多变量分析发现VEGF升高的是蜘蛛痣出现的预测因素. 这也提示肝硬化患者中存在VEGF升高现象^[54]. 肝细胞癌及胆管细胞癌的肿瘤组织中VEGF高表达^[55-57]. 肝细胞癌研究中发现VEGF升高常预示疾病的转归并对其生物行为的评估可能起着决定性作用^[58-59]. 另外在肝脏的转移瘤中也有VEGF的高表达, 多预示着疾病的预后不佳^[60-63]. 因此针对这类疾病中VEGF的高表达, 通过抑制肝脏内VEGF的表达^[64], 或抑制VEGF的转导通路^[65-66], 显示了一定的治疗作用. 综上所述, 推测肝病所致的门静脉高压症侧支循环中VEGF的升高可能是由于受损的肝细胞产生, 或是由病变组织(如肿瘤组织)产生, 也可能是缺氧等多种因素导致血管内皮变化的结果.

总之, 门静脉高压症引起的异常血管壁重构的分子基础是当今的研究热点. 可能多种生长因子在门静脉高压症侧支循环形成中都起一定的作用, 但VEGF仍是最重要的. 近年来血管生成研究在肝病领域的诊断和治疗中展现了广阔的应用前景^[67-70]. 门静脉高压症动物模型中, 在门静脉系统侧支循环和内脏高动力循环中VEGF的诱导及VEGF-R2介导的血管生成可能起着关键作用, 这些研究提示控制肝病过程中过度的血管生成可以促进肝内静脉系统回路的恢复和帮助消除门静脉高压症.

5 参考文献

- 1 Samonakis DN, Triantos CK, Thalheimer U, Patch DW, Burroughs AK. Management of portal hypertension. *Postgrad Med J* 2004; 80: 634-641
- 2 Garcia-Tsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 254-262
- 3 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*

- 2005; 115: 209-218
- 4 Lebrech D, Moreau R. Pathogenesis of portal hypertension. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 309-311
- 5 Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology* 1985; 5: 419-424
- 6 Grace ND. Diagnosis and treatment of gastrointestinal bleeding secondary to portal hypertension. American College of Gastroenterology Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1081-1091
- 7 Youssef AI, Escalante-Glorsky S, Bonnet RB, Chen YK. Hemoptysis secondary to bronchial varices associated with alcoholic liver cirrhosis and portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1562-1563
- 8 Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med* 2003; 3: 483-490
- 9 Perisic M, Ilic-Mostic T, Stojkovic M, Culafic D, Sarenac R. Doppler hemodynamic study in portal hypertension and hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 156-160
- 10 Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 32: 141-156
- 11 Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004; 126: 886-894
- 12 Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005; 43: 98-103
- 13 Selle D, Preim B, Schenk A, Peitgen HO. Analysis of vasculature for liver surgical planning. *IEEE Trans Med Imaging* 2002; 21: 1344-1357
- 14 Lebrech D. Pharmacological treatment of portal hypertension: hemodynamic effects and prevention of bleeding. *Pharmacol Ther* 1994; 61: 65-107
- 15 Yang Z, Zhang L, Li D, Qiu F. Pathological morphology alteration of the splanchnic vascular wall in portal hypertensive patients. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 559-562
- 16 Krieger JE, Dzau VJ. Molecular biology of hypertension. *Hypertension* 1991; 18: 13-17
- 17 Yang Z, Tian L, Peng L, Qiu F. Immunohistochemical analysis of growth factor expression and localization in gastric coronary vein of cirrhotic patients. *J Tongji Med Univ* 1996; 16: 229-233
- 18 Komai N, Morishita R, Yamada S, Oishi M, Iguchi S, Aoki M, Sasaki M, Sakurabayashi I, Higaki J, Ogihara T. Mitogenic activity of oxidized lipoprotein (a) on human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2002; 40: 310-314
- 19 Sumanovski LT, Battagay E, Stumm M, van der Kooij M, Sieber CC. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* 1999; 29: 1044-1049
- 20 Stumm M, Sieber C. Portal hypertension and angiogenesis. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130: 233-239
- 21 Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; 47: 149-161
- 22 Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936
- 23 Moreau R. VEGF-induced angiogenesis drives collateral circulation in portal hypertension. *J Hepatol* 2005; 43: 6-8
- 24 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676
- 25 Kietzmann T, Dimova EY, Flugel D, Scharf JG. Oxygen: modulator of physiological and pathophysiological processes in the liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 67-76
- 26 Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 33-49
- 27 Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-693
- 28 Huang X, Yu C, Jin C, Kobayashi M, Bowles CA, Wang F, McKeenhan WL. Ectopic activity of fibroblast growth factor receptor 1 in hepatocytes accelerates hepatocarcinogenesis by driving proliferation and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 1481-1490
- 29 Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Uemura M, Masaki T, Fukui H. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 2005; 54: 1768-1775
- 30 Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 2002; 109: 327-336
- 31 Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002; 16: 2684-2698
- 32 Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003; 161: 1163-1177
- 33 Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 1999; 5: 495-502
- 34 Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9349-9354
- 35 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66
- 36 Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient

- in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-949
- 37 Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem* 2003; 278: 48848-48860
 - 38 Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995; 121: 4309-4318
 - 39 Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126: 4895-4902
 - 40 Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerschin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936-943
 - 41 Zangari M, Anaissie E, Stopeck A, Morimoto A, Tan N, Lancet J, Cooper M, Hannah A, Garcia-Manero G, Faderl S, Kantarjian H, Cherrington J, Albitar M, Giles FJ. Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 88-95
 - 42 Tawfeek GM, Alafifi AM, Azmy MF. Immunological indicators of morbidity in human schistosomiasis mansoni: role of vascular endothelial growth factor and anti-soluble egg antigen IgG4 in disease progression. *J Egypt Soc Parasitol* 2003; 33: 597-614
 - 43 Tsugawa K, Hashizume M, Migou S, Kishihara F, Kawanaka H, Tomikawa M, Tanoue K, Sugimachi K. Role of nitric oxide and endothelin-1 in a portal hypertensive rat model. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1097-1105
 - 44 Tsugawa K, Hashizume M, Tomikawa M, Migou S, Kawanaka H, Shiraishi S, Sueishi K, Sugimachi K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the rat portal hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 429-437
 - 45 Oe H, Kaido T, Furuyama H, Mori A, Imamura M. Simultaneous transfer of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor genes effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1641-1647
 - 46 Oe H, Kaido T, Mori A, Onodera H, Imamura M. Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1393-1397
 - 47 Kedem A, Perets A, Gamlieli-Bonshtein I, Dvir-Ginzberg M, Mizrahi S, Cohen S. Vascular endothelial growth factor-releasing scaffolds enhance vascularization and engraftment of hepatocytes transplanted on liver lobes. *Tissue Eng* 2005; 11: 715-722
 - 48 Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 42: 1339-1348
 - 49 Fabris L, Cadamuro M, Fiorotto R, Roskams T, Spirli C, Melero S, Sonzogni A, Joplin RE, Okolic-sanyi L, Strazzabosco M. Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases. *Hepatology* 2006; 43: 1001-1012
 - 50 Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, Martin-Vilchez S, Borque MJ, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 696-701
 - 51 Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, Martin-Vilchez S, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol* 2005; 42: 124-131
 - 52 Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, Frilling A, Haussinger D. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol* 2004; 41: 274-283
 - 53 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003; 52: 1347-1354
 - 54 Li CP, Lee FY, Hwang SJ, Lu RH, Lee WP, Chao Y, Wang SS, Chang FY, Whang-Peng J, Lee SD. Spider angiomas in patients with liver cirrhosis: role of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2832-2835
 - 55 Deli G, Jin CH, Mu R, Yang S, Liang Y, Chen D, Makuuchi M. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 960-963
 - 56 Tang D, Nagano H, Yamamoto H, Wada H, Nakamura M, Kondo M, Ota H, Yoshioka S, Kato H, Damdinsuren B, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Dono K, Wakasa K, Monden M. Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance. *Oncol Rep* 2006; 15: 525-532
 - 57 Uematsu S, Higashi T, Nouse K, Kariyama K, Nakamura S, Suzuki M, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Hanafusa T, Tsuji T, Shiratori Y. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 583-588
 - 58 Kamel L, Nessim I, Abd-el-Hady A, Ghali A, Ismail A. Assessment of the clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 875-890
 - 59 Zhang TY, An JL, Gu JY, He S. Expression of PTEN, Cx43, and VEGF in hepatocellular carcinoma. *Aizheng* 2004; 23: 662-666
 - 60 Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K, Miyakura S, Shimizu D, Vallbohmer D, Park S, Danenberg KD, Takasaki K, Danenberg PV. Vascular endothelial

- growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 29-33
- 61 Van Damme N, Demetter P, De Bock W, Rottiers M, Praet M, de Hemptinne B, Peeters M. Limited influences of chemotherapy on healthy and metastatic liver parenchyma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5322-5326
- 62 Takahashi Y, Mai M. Antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibits angiogenic switch and liver metastasis in orthotopic xenograft model with site-dependent expression of VEGF. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 237-243
- 63 Park BK, Paik YH, Park JY, Park KH, Bang S, Park SW, Chung JB, Park YN, Song SY. The clinicopathologic significance of the expression of vascular endothelial growth factor-C in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 138-142
- 64 Liu Y, Poon RT, Li Q, Kok TW, Lau C, Fan ST. Both antiangiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* 2005; 65: 3691-3699
- 65 Man K, Su M, Ng KT, Lo CM, Zhao Y, Ho JW, Sun CK, Lee TK, Fan ST. Rapamycin attenuates liver graft injury in cirrhotic recipient--the significance of down-regulation of Rho-ROCK-VEGF pathway. *Am J Transplant* 2006; 6: 697-704
- 66 Janczewska-Kazek E, Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H. Effect of interferon alpha and ribavirin treatment on serum levels of transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 961-965
- 67 Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, Martin-Vilchez S, Garcia-Buey L, Borque MJ, Moreno-Otero R. Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 699-706
- 68 Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastroin-testinal malignancies. *J Surg Oncol* 2005; 90: 249-259
- 69 Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttil RW, Briscoe DM, Kupiec-Weglinski JW. Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2006; 168: 695-705
- 70 Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* 2002; 23: 348-356

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 •

第十五次全国中西医结合肝病学术会议

本刊讯 第十五次全国中西医结合肝病学术会议将于2006-09在天津举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-06-15截稿

2 联系方式

上海中医药大学 胡义扬; 邮编: 201203.

Survivin反义寡核苷酸抑制肝癌移植瘤生长的作用

高鹏, 张刚庆, 颜政, 方驰华

高鹏, 广东省第二人民医院普外科 广东省广州市 510317
张刚庆, 中山大学附属第三医院、广东省第二人民医院普外科
博士后科研基地 广东省广州市 510317
颜政, 方驰华, 南方医科大学附属珠江医院肝胆外科 广东省
广州市 510282
通讯作者: 方驰华, 510282, 广东省广州市工业大道253号, 南方
医科大学珠江医院肝胆外科. fch58520@sina.com
电话: 020-61643211 传真: 020-61643296
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-07

Inhibitory effect of Survivin antisense oligonucleotide on growth of human hepatic carcinoma transplanted subcutaneously

Peng Gao, Gang-Qing Zhang, Zheng Yan, Chi-Hua Fang

Peng Gao, Department of General Surgery, Guangdong Second People's Hospital, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Gang-Qing Zhang, Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Guangdong Postdoctoral Workstation, the Third Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

Zheng Yan, Chi-Hua Fang, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Chi-Hua Fang, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. fch58520@sina.com

Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To explore the effects of liposomes Survivin antisense oligonucleotides (ASODN) on the growth of human hepatic carcinoma transplanted subcutaneously in nude mice.

METHODS: Human hepatic carcinoma transplanted subcutaneously was established in nude mice. Then the animals were randomly divided into 6 groups: control group (A), liposome group (B), sense oligonucleotide (SODN) group (C), 200 (D), 400 (E) and 600 $\mu\text{g/L}$ (F) ASODN group. After treatment with the corresponding methods for 2, 4, 8, 12, 16, 20 d, the expression of Survivin mRNA and protein detected by reverse transcription-polymerase chain reaction and

Western blot, respectively.

RESULTS: The growth of the tumors was significantly inhibited in all ASODN groups as compared with that in the control, liposome and SODN group after treatment for 20 d. The number of apoptotic cells in ASODN group increased and Survivin expression became weakened. The expression of Survivin was significantly lower in group E and F than those in group A, B, C, and D (mRNA: 0.33 ± 0.04 , 0.28 ± 0.03 vs 0.82 ± 0.02 , 0.78 ± 0.05 , 0.72 ± 0.04 , 0.57 ± 0.03 , $P < 0.05$; protein: 34.9 ± 3.89 , 21.2 ± 3.65 vs 72.14 ± 6.53 , 69.31 ± 5.34 , 68.29 ± 4.98 , 53.8 ± 5.23 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Survivin ASODN can inhibit the growth of human hepatic carcinoma in nude mice by inducing cell apoptosis and decreasing Survivin expression.

Key Words: Antisense oligonucleotides; Hepatic carcinoma; Survivin; Disease models; Nude mice

Gao P, Zhang GQ, Yan Z, Fang CH. Inhibitory effect of Survivin antisense oligonucleotide on growth of human hepatic carcinoma transplanted subcutaneously. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1627-1630

摘要

目的: 检测Survivin反义寡核苷酸(ASODN)在人肝癌耐药细胞株裸鼠皮下移植瘤中的表达情况。

方法: 将30只裸鼠建立人肝癌耐药细胞系SMMC-7721/ADM皮下移植瘤模型, 随机分成6组: 空白对照组(A)、脂质体转染对照组(B)、正义链对照组(C)、200(D)、400(E)和600 $\mu\text{g/L}$ (F)反义链组(ASODN组), 用不同的转染液注射后2, 4, 8, 12, 16, 20 d, 用逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)和Western blot蛋白免疫印迹法检测治疗后各组肿瘤组织中Survivin mRNA和蛋白表达的变化。

结果: 注射后20 d, ASODN组肿瘤细胞生长明显抑制, 空白对照组、脂质体转染对照组和正义链对照组裸鼠的mRNA和蛋白表达无明显

■背景资料

手术切除是肝癌治疗的首选方法, 而化疗仍为其主要方法。对化疗药物产生耐药性是肝癌治疗的一大难题, 也是综合治疗效果欠佳的重要原因。Survivin是近年发现的一种抑制细胞凋亡分子家族成员, 仅特异性地表达于肿瘤组织, Survivin基因治疗具有良好的靶向性、特异性及安全性。Survivin反义寡核苷酸具有抑制癌基因表达异常或诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 可以促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖, 而对正常组织几乎没有不良影响; Survivin还可以通过直接抑制凋亡信号转导过程中最下游的效应分子Caspase-3的活性而阻断凋亡的发生过程, 并降低肿瘤细胞对许多化疗药物的敏感性。

■创新盘点

本研究通过动物模型,对survivin反义寡核苷酸(ASODN)作用耐药肝癌细胞,及对耐药肝癌细胞化疗的影响方面进行探讨,为提高肝癌的治疗效果及化疗药物的敏感性寻找新的靶点及思路。

差异,而ASODN组mRNA和蛋白表达随着时间和浓度的增加, Survivin表达减弱, E, F组与其余个组(A, B, C, D)相比有显著差异(mRNA: 0.33 ± 0.04 , 0.28 ± 0.03 vs 0.82 ± 0.02 , 0.78 ± 0.05 , 0.72 ± 0.04 , 0.57 ± 0.03 , $P < 0.05$; 蛋白: 34.9 ± 3.89 , 21.2 ± 3.65 vs 72.14 ± 6.53 , 69.31 ± 5.34 , 68.29 ± 4.98 , 53.8 ± 5.23 , $P < 0.05$).

结论: Survivin反义寡核苷酸能够下调 Survivin mRNA和蛋白的表达,抑制裸鼠皮下移植瘤的生长。

关键词: 反义寡核苷酸; 肝癌; Survivin; 疾病模型; 裸鼠

高鹏, 张刚庆, 颜政, 方驰华. Survivin反义寡核苷酸抑制肝癌移植瘤生长的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1627-1630 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1627.asp>

0 引言

Survivin是近年来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族的一个新成员,他可以通过有丝分裂促进细胞增殖、抑制细胞凋亡.研究表明, Survivin在肝癌等肿瘤细胞中表达较高,应用Survivin反义寡核苷酸在体外可明显抑制肝癌细胞的生长.已有研究表明肝癌细胞的耐药性与Survivin基因的抗凋亡作用密切相关^[1-2].我们通过应用Survivin反义寡核苷酸作用人肝癌耐药细胞裸鼠移植瘤,观察治疗后各组肿瘤组织中Survivin mRNA和蛋白表达的变化及其对移植瘤生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM由南方医科大学药理教研室饶进军教授提供;阳离子脂质体(LipofectamineTM 2000)购自Invitrogen公司;羊抗人Survivin多克隆抗体为SantaCruz(美国)公司产品;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG购自北京中山生物工程公司;ECL显色试剂盒购自武汉亚法生物工程公司;Trizol购于Gibco公司;RT-PCR一步法试剂盒为TaKaRa公司产品;Western blot试剂盒购于博士德公司. 4-6周龄BALB/C裸小鼠,体质量 19.2 ± 1.3 g,由南方医科大学实验动物中心提供,饲养于SPF级无菌饲养室,用高压灭菌的饮用水和饲料定期喂养. Survivin正、反义寡核苷酸的设计、合成:根据Survivin的基因序列(GenBank Accession Number U75285),应用Primer5.0软件

设计互补于Survivin mRNA的232-251序列的20个碱基组成的ASODN链: 5'-CCCAGCC TTCCAGCTCCTTG-3',同时合成正义链: 5'-CGCAGTAGCTGCGCTGATTG-3',两条序列每端5个磷酸基采用硫代修饰.在GenBank中证实反义寡核苷酸(ASODN)及正义寡核苷酸(SODN)与任何已知哺乳动物基因无匹配. ASODN 5'端以绿色荧光蛋白标记,由上海生工公司合成。

1.2 方法 水浴复苏人肝癌耐药细胞株SMMC-7721/ADM后接种于30 mL培养瓶,在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中用含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液常规培养,胰蛋白酶消化细胞并计数,制成 3.5×10^8 /L的细胞悬液备用.将对数生长期的人肝癌细胞SMMC-7721/ADM制成单细胞悬液,浓度调整为 3.5×10^8 /L,分别取0.2 mL接种于每只裸鼠背部靠左后肢处,建立裸小鼠人肝癌模型.接种后每天观察注射点有无破溃红肿,以皮下结节直径超过0.5 cm为成瘤标准.将30只成瘤后的裸小鼠随机分成6组: A组:空白对照组; B组:脂质体转染对照组; C组:脂质体SODN对照组; D组: 200 μg/L ASODN; E组: 400 μg/L ASODN; F组: 600 μg/L ASODN.各组均于成瘤后2 d向瘤体内直接注射相应的脂质体、脂质体与正义寡核苷酸、不同浓度的反义寡核苷酸制成的转染复合物0.2 mL,观察裸小鼠皮下移植瘤生长情况及裸小鼠体质量变化.注射前室温下先将脂质体溶于转染液中静置45 min,然后与相应的寡核苷酸混合包裹静置15 min.第20天将裸小鼠处死,将处死后的裸小鼠部分肿瘤组织用40 g/L多聚甲醛固定,标本经石蜡包埋后连续4 μm切片,HE染色,光镜下观察人肝癌移植瘤细胞形态变化.免疫组织化学检查方法检测Survivin的表达:一抗为羊抗人Survivin多克隆抗体,工作浓度1:1000;二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗羊IgG,工作浓度1:4000,按试剂盒说明进行操作。

1.2.1 Western blot检测移植瘤细胞Survivin蛋白表达 第20天将裸小鼠处死后,取50 mg肿瘤组织匀浆后离心,取上清液移植瘤细胞 1×10^6 个.加入预冷至4℃的50 μL裂解缓冲液.用40 μg/孔上样,120 g/L十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,通过电转移法将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转移至硝酸纤维素膜后在含50 g/L脱脂奶粉的TTBS中37℃封闭90 min,加入一抗(1:1000羊抗人生存素抗体)4℃孵育过夜,TTBS漂洗后(10 min×3次),加

入二抗(辣根过氧化物酶标记的1:4000兔抗羊IgG), 37℃作用40 min, TTBS充分漂洗(10 min×3次), 洗膜后加入增强化学发光底物ECL试剂. X线片暗室曝光, 常规显影、定影. 图像以BioRad图像分析系统分析, 用蛋白条带的平均光强度值表示生存素蛋白表达的相对强度.

1.2.2 RT-PCR法检测移植瘤细胞生存素mRNA表达 裸鼠处死后, 取50 mg肿瘤组织, 匀浆离心后取移植瘤细胞 1×10^6 个. 提取总RNA, 紫外分光光度计检验纯度并定量. 设GAPDH为内参照, 对样品模板用量标准化, Survivin和GAPDH分管扩增, 引物由上海生工公司合成. 设计Survivin上游引物序列为5'CACCGCATCTCTACATTCAA3', 下游引物序列为5'CACTTTCTTCGCAGTTT CCT3', 扩增片段长度为191 bp; 内对照基因GADPH, 上游引物序列为5'CTCAGACACCAT GGGGAAGGTGA3', 下游引物序列为5'ATGAC TTGAGGCTGTTGTCATA3', 扩增片段长度为372 bp. 采用一步法RT-PCR检测Survivin mRNA的表达, 50℃ 30 min完成反转录, 94℃预变性2 min后进入PCR循环, 94℃变性30 s, 60℃复性30 s, 72℃延伸1.5 min, 共30个循环. PCR产物8 μL在琼脂糖凝胶上电泳, 经凝胶图像分析仪分析结果, 以Survivin和GAPDH的比值作为Survivin mRNA的相对含量.

统计学处理 各组实验数据以mean±SD表示, 采用SPSS 10.0统计软件进行分析, 多个样本间比较行单因素方差分析.

2 结果

各组裸小鼠接种人肝癌耐药细胞系SMMC-7721/ADM单细胞悬液后均存活并有肿瘤形成, 接种点无红肿破溃表现, 成瘤时间为 13.5 ± 2.1 d, 移植瘤体积为 72.5 ± 6.7 mm³. 移植瘤HE染色后, 光镜下见各对照组人肝癌移植瘤细胞密集成群, 细胞多为多边形, 核大深染. 而各ASODN实验组可见肿瘤细胞较少, 分布稀疏, 有变性的液化坏死灶, 癌细胞皱缩变圆, 胞核固缩, 核深染. 免疫组化染色后见对照组Survivin蛋白主要位于肝癌细胞质, 表达较强, 呈棕黄色颗粒, 癌周组织无表达. 而ASODN实验组则明显可见Survivin蛋白表达降低, 数量减少, 颜色变淡.

2.1 对人肝癌裸小鼠皮下移植瘤Survivin蛋白表达的影响 Western blot显示Survivin蛋白在移植瘤细胞中有高度表达(图1A). A, B, C和D组之间Survivin蛋白表达无明显差异($P>0.05$). E和F组

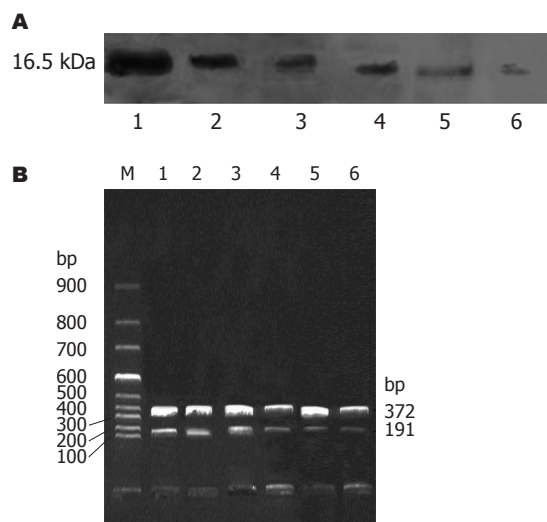


图1 移植瘤Survivin的表达. A: Survivin蛋白; B: Survivin mRNA; M: 100 bp DNA Marker; 1: 空白对照组; 2: 脂质体转染对照组; 3: 脂质体SODN对照组; 4: 200 μg/mL ASODN组; 5: 400 μg/mL ASODN组; 6: 600 μg/mL ASODN组.

表1 Survivin mRNA和蛋白表达 (mean ± SD)

分组	Survivin mRNA	Survivin蛋白
A	0.82 ± 0.02	72.14 ± 6.53
B	0.78 ± 0.05	69.31 ± 5.34
C	0.72 ± 0.04	68.29 ± 4.98
D	0.57 ± 0.03	53.8 ± 5.23
E	0.33 ± 0.04	34.9 ± 3.89
F	0.28 ± 0.03	21.2 ± 3.65

蛋白表达较A, B, C和D组显著降低($P<0.05$, 表1).

2.2 对人肝癌裸小鼠移植瘤Survivin mRNA表达的作用 用图像分析仪对RT-PCR扩增产物进行图像分析, 结果显示对照组和Survivin ASODN处理组在191 bp处均出现特异性的Survivin条带(图1B). A, B, C和D组之间Survivin mRNA无明显差异($P>0.05$). E和F组蛋白表达较A, B, C和D组显著降低($P<0.05$, 表1).

3 讨论

Survivin基因由Ambrosini *et al*^[3]于1995年发现并克隆, 定位于人染色体17q25, 其编码含142个氨基酸、相对分子质量为16.5 kDa的蛋白质. 他表达于细胞周期的G₂/M期, 作用于细胞有丝分裂的纺锤体, 是细胞内凋亡抑制蛋白家族的一个新成员. 已经证明, 绝大多数的恶性肿瘤都高表达Survivin, 而在正常分化成熟的组织中几乎不表达. Survivin基因在多数肿瘤组织中呈高表达, 且与组织分化平衡有关, 即具有肿瘤选择性

■应用要点

通过动物实验验证Survivin反义寡核苷酸可有效的抑制人耐药肝癌细胞SMMC-7721/ADM裸鼠皮下肿瘤的生长, 促进诱导肿瘤细胞的凋亡, 而对正常细胞无明显影响, 具有良好的靶向性、特异性及安全性, 可以成为抗肿瘤治疗的新的靶点.

■名词解释

反义技术(anti-sense technology): 是根据碱基互补原理, 用人工合成或生物合成的特定的互补DNA或RNA片段及其化学修饰产物结合目的基因或mRNA上特定的序列(靶核酸), 阻断从基因到蛋白的信息流, 以达到阻断或抑制基因的转录或翻译的技术.

■同行评价

已有研究显示Survivin基因在肝癌中高表达,可能是早期诊断与预后判断的指标之一。本文为体外实验研究,利用反义技术,观察了对人肝癌耐药细胞裸鼠皮下移植瘤的抑制作用、机制为诱导癌细胞凋亡,下调Survivin mRNA和蛋白的表达,为基因靶向治疗提供了实验依据,是有一定意义。

的特点^[4-6]。Ikeguchi *et al*^[7]对Survivin在肝癌中的表达及相关性进行了分析,发现Survivin基因与肝癌的形成和发展有着较大关系,他在正常肝组织基本不表达,而在肝癌中却表达较高,他不但是早期发现肝癌的一个较好的标志物,也是判断预后的较佳指标。因此Survivin可能是一个理想的肝癌基因治疗靶点。应用反义核酸技术治疗肿瘤是根据碱基互补机制,用人工合成的特定DNA或RNA片段ASODN分子与进入细胞质的mRNA上的特定定位点相结合,形成DNA-RNA复合物,抑制mRNA与核糖体结合,同时激活RNA降解酶H,降解mRNA,从而抑制或封闭基因的表达,干扰致病蛋白质的产生^[8]。采用Survivin ASODN进行抗癌治疗具有广谱性和副作用小的特点^[9-11]。我们采用反义技术,针对Survivin基因合成一段长20个碱基的ASODN,采用硫代磷酸修饰、脂质体包裹来增强其稳定性和抗酶解能力。将其直接注射于人肝癌耐药细胞裸鼠皮下移植瘤内,发现对照组裸鼠皮下移植瘤无明显抑制,肿瘤呈持续性增长;而脂质体ASODN则能明显地抑制移植瘤的生长,肿瘤呈进行性缩小,提示Survivin ASODN在体内实验中可以有效的抑制移植瘤的生长,并且具有明显的时效性和剂量依赖性。而HE染色及免疫组化结果则显示,ASODN组液化坏死灶增多,凋亡细胞增加,Survivin表达减少、减弱。这提示Survivin ASODN对肝癌移植瘤的生长抑制作用可能是通过解除Survivin对癌细胞的凋亡抑制作用,使增殖细胞减少,坏死细胞增多,移植瘤体积缩小所致。研究中发现,Survivin ASODN确实能够有效地封闭移植瘤Survivin基因的表达,而SODN、脂质体组均对Survivin表达无影响。这说明三种浓度的ASODN可以通过降低Survivin蛋白及mRNA的表达,诱导细胞凋亡来阻止肝癌细胞的生长。

总之, Survivin反义寡核苷酸能够通过诱导人肝癌裸鼠皮下移植瘤细胞凋亡,下调Survivin

mRNA和蛋白的表达,抑制裸鼠皮下移植瘤的生长。以Survivin为靶基因,利用反义技术治疗肿瘤可望成为一种有效的基因治疗方法。

4 参考文献

- 1 Sui L, Dong Y, Watanabe Y, Yamaguchi F, Sugimoto K, Tokuda M. Alteration and clinical relevance of PTEN expression and its correlation with survivin expression in epithelial ovarian tumors. *Oncol Rep* 2006; 15: 773-778
- 2 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21: 315-320
- 3 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 4 Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E. Expression of the anti-apoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002; 75: 161-165
- 5 Das A, Tan WL, Teo J, Smith DR. Expression of survivin in primary glioblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 302-306
- 6 Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 96: 1921-1925
- 7 Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11: 33-40
- 8 Green DW, Roh H, Pippin J, Drebin JA. Antisense oligonucleotides: an evolving technology for the modulation of gene expression in human disease. *J Am Coll Surg* 2000; 191: 93-105
- 9 Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci* 2004; 95: 44-51
- 10 Griffith TS, Kemp TJ. The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52: 175-184
- 11 Wang JX, Zheng S. Caspase-3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1821-1824

电编 张敏 编辑 潘伯荣

幼鼠肠缺血/再灌注损伤肠组织TNF- α 和c-*fos* mRNA的表达

李春艳, 张莹, 崔泽实, 卢瑶, 于明

李春艳, 张莹, 崔泽实, 卢瑶, 中国医科大学实验技术中心三部 辽宁省沈阳市 110001

于明, 中国医科大学第二临床医院小儿外科 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 李春艳, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学实验技术中心三部, lcy_cn@hotmail.com

电话: 024-23256666-5100 传真: 024-23261099

收稿日期: 2006-03-24 接受日期: 2006-04-16

Expression of tumor necrosis factor- α and c-*fos* mRNA in immature rats' model of gut ischemia/reperfusion injury

Chun-Yan Li, Ying Zhang, Ze-Shi Cui, Yao Lu, Ming Yu

Chun-Yan Li, Ying Zhang, Ze-Shi Cui, Yao Lu, the Third Division of Medical Laboratory Technology Center, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Ming Yu, Department of Pediatric Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Chun-Yan Li, the Third Division of Medical Laboratory Technology Center, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lcy_cn@hotmail.com

Received: 2006-03-24 Accepted: 2006-04-16

Abstract

AIM: To analyze the expression patterns of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and c-*fos* mRNA in immature rats after gut ischemia/reperfusion (I/R) injury.

METHODS: The left laparotomy was performed and the superior mesenteric artery (SMA) was occluded by artery clamp to establish the model of gut I/R injury. The expression of TNF- α and c-*fos* mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: In comparison with sham operation group, an increase in TNF- α mRNA was detected after 30-min ischemia (1.55 ± 0.33 vs 1.07 ± 0.08 , $P < 0.05$) and the maximal increase was detected after 30-min reperfusion (3.05 ± 0.11). TNF- α mRNA expression after 60-min reperfusion (2.02

± 0.10) remained above the control level. The expression of c-*fos* mRNA in the intestinal tissues was rapidly induced by ischemia, and it increased obviously 30 min after ischemia as compared with that in sham operation group (0.95 ± 0.13 vs 0.12 ± 0.02 , $P < 0.05$). The expression of c-*fos* mRNA also reached the peak level 30 min after reperfusion (1.53 ± 0.11), and it declined markedly 60 min after reperfusion. After 90-min reperfusion, c-*fos* mRNA expression returned to the normal level.

CONCLUSION: Gut I/R induces the mRNA expression of both TNF- α and c-*fos*, suggesting that there is possibly a correlation between the expression of c-*fos* and TNF- α .

Key Words: Ischemia/reperfusion; Tumor necrosis factor- α ; Gut; c-*fos* gene

Li CY, Zhang Y, Cui ZS, Lu Y, Yu M. Expression of tumor necrosis factor- α and c-*fos* mRNA in immature rats' model of gut ischemia/reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1631-1634

摘要

目的: 观察幼鼠肠缺血/再灌注损伤(I/R)不同时点肠组织内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、c-*fos* mRNA表达模式, 探讨肠I/R的机制。

方法: 分离幼鼠肠系膜上动脉, 制作动物模型, 应用RT-PCR半定量法分析肠组织TNF- α 、c-*fos* mRNA表达。

结果: 与假手术组相比, 肠组织内TNF- α mRNA缺血30 min显著升高(1.55 ± 0.33 vs 1.07 ± 0.08 , $P < 0.05$), 再灌注30 min达峰值(3.05 ± 0.11), 再灌注后60, 90 min逐渐下降; c-*fos* mRNA表达于缺血30 min后升高(0.95 ± 0.13 vs 0.12 ± 0.02 , $P < 0.05$), 再灌注30 min达峰值(1.53 ± 0.11), 再灌注后60 min迅速下降, 再灌注后90 min达基线水平。

结论: 幼鼠肠I/R损伤介导肠组织内TNF- α 和

■背景资料

缺血/再灌注损伤(I/R)的病理过程直接与缺血后乏氧和循环重建相关, 在这一过程中同时存在生理的、化学的、分子的反应。就分子反应而言, I/R被分为三个阶段: 再灌注即刻反应, 磷脂酶激活、钙离子内流、脂质分子活化、蛋白激酶和氧化还原酶活化等; 再灌注早期反应, 炎症细胞因子的蛋白表达, 启动下游信号通路, 活化核内转录因子, 继续炎症反应; 再灌注晚期反应, 抗炎性因子的出现, 如IL-10、晚期黏附分子等。

■研发前沿

目前, 信号通路研究是缺血/再灌注损伤研究的热点和重点。几个主要的分子信号通路, 如MAPKs, JNK, IKK, ROS, 相互“交谈”, 构成复杂的信号网络, 在缺血/再灌注的不同阶段介导损伤及修复。

■创新盘点

本研究选择幼鼠作动物模型,得到实验结果对小儿外科的临床较具有指导意义。在肠I/R中,同时观察TNF- α 和*c-fos*的报道较少,且本文观察到的*c-fos*表达变化与以往报道不尽相同。

c-fos mRNA的表达模式。*c-fos* mRNA表达伴随TNF- α mRNA表达,提示二者间可能存在关系。

关键词: 肠; 缺血/再灌注; 肿瘤坏死因子; *c-fos* 基因

李春艳, 张莹, 崔泽实, 卢瑶, 于明. 幼鼠肠缺血/再灌注损伤肠组织TNF- α 和*c-fos* mRNA的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1631-1634

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1631.asp>

0 引言

肠缺血/再灌注损伤(ischemia/reperfusion, I/R)是小儿外科常见的组织器官损伤。不仅表现在肠梗阻、肠移植等肠道疾病的发展过程中,同时也是创伤、感染、失血性休克等疾病的关键性病理过程,所以在幼鼠模型上进行I/R机制的研究是指导临床治疗的要求。在I/R复杂的病理过程中同时存在生理的、化学的、分子的反应^[1], TNF- α 和活化蛋白1(AP-1)家族蛋白都是其关键性的因子。在肝I/R中, TNF- α 作为多功能蛋白与其他信号通路相互作用,介导细胞反应如细胞的增殖和凋亡及炎性介质产生^[2]。在脑I/R研究中,中和TNF- α 可以降低缺血造成的脑水肿^[3]。在肝^[4]、脑^[5]、肾^[6]I/R研究中, I/R启动了即刻早基因*c-fos*基因、*c-jun*基因的表达,且与细胞的增殖和凋亡相关。在本实验,我们建立幼龄鼠的肠I/R模型,观察肠组织的TNF- α 、*c-fos*基因mRNA表达模式,探讨幼龄鼠的肠I/R机制。

1 材料和方法

1.1 材料 动物模型: 采用 δ Wistar大白鼠(体重130 $\pm$ 15 g),采用盐酸氯胺酮经腹腔注入麻醉,取右侧卧位,经腹膜后入路,分离肠系膜上动脉。实验分组: 48只 δ Wistar大白鼠分成6组($n=8$): 假手术组(shame group, SG), 缺血30 min组(I 30 min G), 缺血30 min/再灌注30 min组(I 30 min/R 30 min G), 缺血30 min/再灌注60 min组(I 30 min/R 60 min G), 缺血30 min/再灌注90 min组(I 30 min/R 90 min), 缺血120 min组(I 120 min G)。

1.2 方法 肠组织TNF- α 、*c-fos*基因RT-PCR半定量分析。 用总RNA提取试剂(Promega公司)按说明书操作,提取总RNA。逆转录后分别扩增TNF- α 和*c-fos*基因。TNF- α 引物序列上游5'AGAAGTCCAGGCGGTGTCTGTG3', 下游5'GTGGCAAATCGGGT GACGGTGT3',

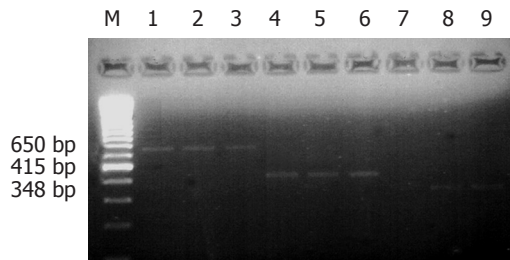


图1 TNF- α 、*c-fos* mRNA表达。M: DNA标准; 1: SG β -actin; 2: I 30 min G β -actin; 3: I 30 min/R 30 min G β -actin; 4: SG TNF- α ; 5: I 30 min G TNF- α ; 6: I 30 min/R 30 min G TNF- α ; 7: SG *c-fos*; 8: I 30 min G *c-fos*; 9: I 30 min/R 30 min G *c-fos*。

扩增片段415 bp。*c-fos*基因引物序列上游5'ATGATGTTCTCGGGTTTCAA3', 下游5'TGACATGGTCTTCACCAC TC3', 扩增片段348 bp。用 β -actin作内对照(650 bp)。TNF- α 、 β -actin、*c-fos*扩增产物经2%的琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下观察照相,100 bp DNA Ladder (New England Biolabs公司)为分子质量标准,用凝胶成像分析系统(Kodak Digital Science 1D)扫描扩增带,以内参照值标准化TNF- α 、*c-fos*的相对含量。

统计学处理 TNF- α 、*c-fos*基因相对含量用mean $\pm$ SD表示,样本均数作*t*检验,显著差异设为95%。

2 结果

肠组织TNF- α 、*c-fos* mRNA表达: 肠组织内TNF- α mRNA缺血期升高, I 30 min/R 30 min G达峰值, I 30 min/R 60 min G、I 30 min/R 90 min G时逐渐下降; *c-fos* mRNA表达于缺血期升高, I 30 min/R 30 min G达峰值, I 30 min/R 60 min G迅速下降, I 30 min/R 90 min G达基线水平(图1, 表1)。

3 讨论

TNF- α 与受体结合启动下游的多个信号通路,如MAPK, JNK通路,是介导炎性反应,凋亡等细胞反应的主要因子^[7]。而即刻早基因编码的蛋白也调节损伤后的细胞反应,与组织的修复和细胞的凋亡相关^[4,8-9]。在休克的模型中,研究者观察到TNF- α 、AP-1的异常活化^[10]。在脑的暂时性缺血研究中, TNF- α 表达与*c-fos*的瞬时表达相关^[11]。我们在幼龄鼠的肠I/R模型,在mRNA水平同时检测TNF- α 、*c-fos*表达。随着I/R时间的变化, TNF- α 、*c-fos* mRNA表达发生变化,而

表 1 肠组织TNF- α 和c-*fos* mRNA半定量测定

	SG	I 30 min G	I 30 min/R 30 min G	I 30 min/R 60 min G	I 30 min/R 90 min G	I 120 min G
TNF- α	1.07 $\pm$ 0.08	1.55 $\pm$ 0.33 ^a	3.05 $\pm$ 0.11 ^a	2.02 $\pm$ 0.10 ^a	1.09 $\pm$ 0.07	2.85 $\pm$ 0.12 ^a
c- <i>fos</i>	0.12 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.13 ^a	1.53 $\pm$ 0.11 ^a	0.60 $\pm$ 0.22 ^a	0.22 $\pm$ 0.11	0.18 $\pm$ 0.08

^a*P* < 0.05 vs SG.

且表达模式不同: c-*fos* mRNA在缺血30 min升高, 再灌注30 min时继续升高, 再灌注60 min迅速下降; TNF- α mRNA在缺血30 min升高, 再灌注30 min达峰值, 再灌注60, 90 min逐渐下降, 提示幼鼠肠I/R损伤特异性启动TNF- α , c-*fos*转录. 在Shima *et al*^[12]的研究中, c-*fos*同样在肠缺血30 min后转录上升, 再灌注30 min达峰值, 但在再灌注120-180 min回到基线水平, 这与本实验观察到的c-*fos* mRNA在再灌注60 min迅速下降结果不同. 分析造成不同的原因之一, 可能是实验所选择动物的周龄和体质量不同. 在肝脏的I/R研究中, 研究者发现缺血预处理的保护效应与c-*fos*和c-*jun*的转录水平相关^[13]. 此外, c-*fos*在细胞受到各种刺激时可以增强细胞的增殖. 那么, 上面的不同结果可能提示, 在相同的处理条件下, 幼鼠的肠组织较成年鼠更早地受到I/R损伤, c-*fos*在此病理过程的保护性作用时间较短. Kwon *et al*^[14]通过人、小鼠、兔、大鼠TNF- α 基因顺序的比较研究, 发现大鼠TNF- α 基因内存在着AP-1、AP-2、CTF、IFN、NF- κ B、Ybox多个潜在的转录因子的结合位点. AP-1是细胞内强化结合蛋白, 具有调节转录活性. 而AP-1恰由FOS-JUN的异二聚体构成, 而后者正是由即刻早基因c-*fos*的表达产物FOS与c-*jun*的产物JUN形成. Wang *et al*^[15]在大脑中动脉阻塞160 min后解除阻塞的大鼠模型中, 同时观察到短暂局部缺血后脑皮质内TNF- α mRNA、c-*fos*基因mRNA表达升高; 且c-*fos* mRNA比TNF- α mRNA较早的高表达, 说明c-*fos*基因mRNA表达可能调控TNF- α 转录. 我们也在本实验中观察到c-*fos*转录伴随TNF- α 转录. 尽管在本实验, 我们不能证明c-*fos*基因转录翻译成蛋白构成AP-1活化TNF- α 转录, 但至少提示在肠I/R损伤中c-*fos*早表达基因伴随TNF- α 表达, 可能与其正向调节后者的转录相关. 反之, 仅就本实验而言, 我们不能排除TNF- α 活化AP-1的可能, 所以尚需进一步的实验证明.

4 参考文献

- Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant* 2004; 2: 174-177
- Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G583-589
- Hosomi N, Ban CR, Naya T, Takahashi T, Guo P, Song XY, Kohno M. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 959-967
- Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996; 23: 1546-1555
- An G, Lin TN, Liu JS, Xue JJ, He YY, Hsu CY. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 1993; 33: 457-464
- Megyesi J, Di Mari J, Udvarhelyi N, Price PM, Safirstein R. DNA synthesis is dissociated from the immediate-early gene response in the post-ischemic kidney. *Kidney Int* 1995; 48: 1451-1458
- Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-1635
- Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME. Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5609-5619
- Chihab R, Ferry C, Koziel V, Monin P, Daval JL. Sequential activation of activator protein-1-related transcription factors and JNK protein kinases may contribute to apoptotic death induced by transient hypoxia in developing brain neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 63: 105-120
- Gaddipati JP, Sundar SV, Calemene J, Seth P, Sidhu GS, Maheshwari RK. Differential regulation of cytokines and transcription factors in liver by curcumin following hemorrhage/resuscitation. *Shock* 2003; 19: 150-156
- Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Carpen O, Siren A. Differential cellular expression of tumor necrosis factor-alpha and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *J Neurol Sci* 2001; 186: 87-99
- Shima Y, Tajiri T, Taguchi T, Suita S. Increased expression of c-fos and c-jun in the rat small intestinal epithelium after ischemia-reperfusion injury: a possible correlation with the proliferation or apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Pediatr*

■应用要点

在肠的I/R中, TNF- α 和c-*fos*在转录水平随I/R进程变化而变化, 此将提示如果将二者作为治疗I/R的靶点, 治疗干预的时间点是至关重要的, 同时可以作为选择干预方式(RNA干涉或抗体阻断)的参考依据.

■名词解释

转录因子 AP-1 是同源二聚体或异二聚体蛋白复合物, 来源于 Fos 和 Jun 家族, 包括 c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, Jun B 和 Jun D. AP-1 异二聚体可与 DNA 的 5'-TGA (C/G)TCA-3 序列结合.

- Surg* 2006; 41: 830-836
- 13 Xiao JS, Cai FG, Niu Y, Zhang Y, Xu XL, Ye QF. Preconditioning effects on expression of proto-oncogenes c-fos and c-jun after hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 197-202
- 14 Kwon J, Chung IY, Benveniste EN. Cloning and sequence analysis of the rat tumor necrosis factor-encoding genes. *Gene* 1993; 132: 227-236
- 15 Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23: 103-114

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.

顽固性功能性消化不良与情绪障碍的关系及坦度螺酮的治疗作用

陈朝元, 何顺勇

陈朝元, 何顺勇, 福建中医学院附属人民医院消化内科 福建省福州市 350004

通讯作者: 陈朝元, 350004, 福建省福州市, 福建中医学院附属人民医院消化内科. doctor_ccy@126.com

收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-05-26

Relationship between refractory functional dyspepsia and emotional disturbance and therapeutic action of tandospirone

Chao-Yuan Chen, Shun-Yong He

Chao-Yuan Chen, Shun-Yong He, Department of Gastroenterology, the Affiliated People's Hospital of Fujian Traditional Chinese Medicine College, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Correspondence to: Chao-Yuan Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated People's Hospital of Fujian Traditional Chinese Medicine College, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. doctor_ccy@126.com

Received: 2006-05-09 Accepted: 2006-05-26

Abstract

AIM: To investigate the relationship between refractory functional dyspepsia (RFD) and emotional disturbance, and observe the therapeutic action of tandospirone.

METHODS: Thirty patients with RFD were included in this study. Based on symptomatic treatment, tandospirone was used for 6 wk. HAMD and HAMA scores were obtained before and after treatment. Then the mean value of HAMD and HAMA scores was calculated to evaluate the disease status. Meanwhile, the eight common symptoms of functional dyspepsia were scored.

RESULTS: Athymia and anxiety coexisted in 24 of 30 cases (80.0%). Pure athymia was found in 1 case (3.3%), and pure anxiety occurred in 5 cases (16.7%). The HAMD and HAMA scores, as well as the mean values of them, were significantly higher in RFD patients than those in the healthy

controls (26.1 ± 6.2 , 21.8 ± 4.1 , 24.0 ± 5.6 vs 11.6 ± 3.8 , 8.6 ± 2.3 , 10.1 ± 3.5 , all $P < 0.01$). The score for the eight common symptoms of functional dyspepsia were also markedly higher than that in the controls (11.3 ± 3.6 vs 8.7 ± 1.7 , $P < 0.01$). The above scores were also significantly different before and after treatment ($P < 0.01$).

CONCLUSION: RFD patients have different degrees of emotional disturbance. Tandospirone can be used in the treatment of RFD.

Key Words: Refractory functional dyspepsia; Emotional disturbance; Tandospirone; Therapeutic action

Chen CY, He SY. Relationship between refractory functional dyspepsia and emotional disturbance and therapeutic action of tandospirone. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(16):1635-1637

摘要

目的: 探讨顽固性功能性消化不良(RFD)与情绪障碍的关系以及坦度螺酮的治疗作用。

方法: 30例RFD患者作为研究组, 在对症治疗的基础上加用坦度螺酮治疗6 wk, 治疗前后行HAMD和HAMA量表评分, 以两量表分数之和除以2为情绪障碍评分标准; 同时对功能性消化不良常见的8个症状评分。

结果: 同时具有抑郁焦虑者24例(80.0%), 单纯抑郁者1例(3.3%), 单纯焦虑5例(16.7%); 治疗前与健康组HAMD, HAMA评分、两组情绪障碍评分以及临床综合疗效症状评分比较(26.1 ± 6.2 , 21.8 ± 4.1 , 24.0 ± 5.6 , 11.3 ± 3.6 vs 11.6 ± 3.8 , 8.6 ± 2.3 , 10.1 ± 3.5 , 8.7 ± 1.7 , 均 $P < 0.01$), 有显著差异。治疗前、后情绪障碍评分以及治疗前、后临床综合疗效症状评分比较, 差异也均具有统计学意义($P < 0.01$)。

结论: RFD患者存在不同程度情绪障碍; 坦度螺酮可用于伴随情绪障碍的FD患者, 尤其是经常规治疗无效的RFD患者的治疗。

■背景资料

功能性消化不良通常长期在综合医院内科或神经科治疗, 但由于该症具有神经躯体形式障碍的基本特点, 又常伴有焦虑和抑郁等情绪障碍, 应用内科一般的常规治疗, 往往难以获得满意疗效, FD症状与情绪障碍之间又可相互加重, 在精神心理异常与FD相关得以认可后, 各国学者对抗抑郁药及精神心理治疗的作用和适应症等未获共识, 至今系统研究尚不多, 本文通过联合抗抑郁药物治疗对伴有情绪障碍FD患者, 特别是焦虑抑郁兼有者, 抗焦虑抑郁治疗打断了二者间的恶性循环, 对于改善患者的心理症状、提高治疗依从性、提高自我适应能力, 能起到良好的效果。

■应用要点

坦度螺酮是新型抗焦虑药,且药物不良反应轻微,安全性和耐受性良好,患者依从性较好。通过本研究为联合抗抑郁药物治疗在FD治疗中作为常规治疗提供了依据。

关键词: 顽固性功能消化不良; 情绪障碍; 坦度螺酮; 治疗作用

陈朝元, 何顺勇. 顽固性功能消化不良与情绪障碍的关系及坦度螺酮的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1635-1637

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1635.asp>

0 引言

顽固性功能消化不良(refractoriness functional dyspepsia, RFD)发病率高,发病机制复杂,至今尚未完全阐明。随着社会生活节奏的加快和生物医学模式的转变,社会-心理因素成为重要的致病因素已逐渐为人们所认识。目前国内外大量研究表明,FD与精神心理因素(焦虑、抑郁)有关,精神心理因素的参与是FD顽固难治的主要原因。我们通过汉密尔顿抑郁量表(HAMD)、汉密尔顿焦虑量表(HAMA),测评RFD患者的心理状态,并观察枸橼酸坦度螺酮的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 符合罗马 II 标准^[1],下列症状在近12 mo内至少出现12 wk,但无须连续:(1)持续或反复性上腹中部痛或不适;(2)无器质性疾病可解释症状(包括内镜检查);(3)症状与排便无关。同时符合:(1)根据不同症状予以解痉剂、胃肠动力促进剂、黏膜保护剂、抑酸剂等治疗6 mo以上无效,且未曾接受抗焦虑、抑郁治疗者;(2)排除有严重心、肝、肾、呼吸及内分泌代谢等疾病;排除腹部手术史者;排除妊娠及哺乳期妇女。2004-08/2005-03,符合上述标准的RFD患者30例,男12例,女18例,年龄18-60(平均 38.6 ± 12.8)岁,病程1.16-16(平均3.6)a。对照组为健康体检者30例,男13例,女17例,年龄20-56(平均 36.6 ± 14.6)岁,全面体检未发现躯体疾病。两组的年龄、性别经统计学处理无显著异常,具有可比性。

1.2 方法 (1)由专人对研究组患者及对照组健康者进行测评,HAMD总分超过20分为抑郁情绪;HAMA总分超过14分为焦虑情绪,两量表分数之和除以2为情绪障碍评分标准。(2)对消化不良常见的上腹胀、早饱、上腹痛、暖气、厌食、反酸、恶心及呕吐8个症状进行症状评分,严重程度以0-3计分:0分:无症状;1分:轻度,稍加注意感到有症状;2分:中度,自觉有症状,不影响工作;3分:重度,明显影响生活和工作。各项症状分累加即为该患者症状积分。(3)RFD患者

予以枸橼酸坦度螺酮(日本住友制药株式会社),10 mg,3次/d,疗程6 wk,部分焦虑明显的患者治疗的前2 wk加用安定1.25 mg,2次/d;同时按个体化原则,加用解痉剂,胃肠动力促进剂、黏膜保护剂、抑酸剂等治疗。每周随访1次,记录消化不良症状及可能的药物不良反应,每2 wk进行HAMD, HAMA评分及消化不良症状评分。

统计学处理 计量数据以mean $\pm$ SD表示,两组均数用比较用 t 检验分析。

2 结果

研究组同时具有抑郁焦虑者24例(80.0%),单纯抑郁者1例(3.3%),单纯焦虑5例(16.7%)。两组HAMD, HAMA评分有差别,研究组治疗前与对照组情绪障碍评分,研究组治疗前、后情绪障碍评分、临床症状评分见表1,治疗组中有1例(3.3%)出现头晕伴嗜睡;1例(3.3%)出现恶心,均不影响治疗,未见其他特殊不良反应(表1)。

3 讨论

功能性消化不良是临床很常见的功能性胃肠疾病,发病机制尚未完全阐明,目前认为与多种因素有关,包括胃肠动力失衡、内脏敏感性增加、胃酸分泌增多、幽门螺杆菌感染、胃肠激素变化以及食物不耐受等。近年来国外学者^[2]提出发病的生理-心理-社会模式,认为上述三因素在发病中既独立又相互促进。大量研究提示FD中普遍存在焦虑、抑郁状态,尤其是RFD患者,心理和社会因素在FD发病中可能起重要作用。通过心理治疗以及抗抑郁、焦虑治疗取得良好疗效亦佐证FD与情绪障碍之间存在内在联系^[3-4]。Haug *et al*^[5]对100例FD患者调查发现,以消化不良为首要症状者仅26例,而以焦虑为首要症状者占2/3。潘小平 *et al*^[4]研究表明,FD患者普遍存在抑郁、焦虑情绪,焦虑较抑郁更为突出。有的报道则认为抑郁较焦虑更为突出^[6]。临床上,单纯的焦虑或抑郁很少见,因此我们采用两量表分数之和除以2作为情绪障碍评分标准,对患者心理状态作整体评估。评定结果表明,研究组同时具有抑郁焦虑者占24例(80.0%),单纯抑郁者1例(3.3%),单纯焦虑者5例(16.7%)。研究组与健康组HAMD、HAMA评分结果以及两组情绪障碍评分(HAMD+HAMA)/2结果比较差异均具有非常显著的统计学意义。这说明RFD患者存在不同程度情绪障碍(焦虑和抑郁)。大多数患者往往只诉说躯体症状,避而不谈或不愿承

表 1 RFD患者HAMD, HAMA评分及疗效(mean $\pm$ SD, $n = 30$)

分组	HAMD	HAMA	(HAMD+HAMA)/2	(HAMD+HAMA)/2	症状评分
研究	26.1 $\pm$ 6.2 ^b	21.8 $\pm$ 4.1 ^b	24.0 $\pm$ 5.6 ^b	24.0 $\pm$ 5.6 ^b	11.3 $\pm$ 3.6 ^b
对照	11.6 $\pm$ 3.8	8.6 $\pm$ 2.3	10.1 $\pm$ 3.5	12.6 $\pm$ 3.4	8.7 $\pm$ 1.7

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

认情绪障碍的症状, 如果只注重消化不良的躯体症状, 不用生物-心理-社会医学模式进行思维, 就很难发现情绪障碍的存在, 以至病情迁延反复.

枸橼酸坦度螺酮是选择性地作用于5羟色胺受体A₁达到抗焦虑作用, 经过一段时间的服用, 能使5羟色胺受体A₂密度下调, 达到抗抑郁作用. 本研究结果表明, 研究组治疗前、后情绪障碍评分(HAMD+HAMA)/2评分以及治疗前、后临床综合疗效症状评分比较, 差异均具有非常显著的统计学意义. 由此可见, 枸橼酸坦度螺酮可用于伴随情绪障碍的FD患者, 尤其是经常规治疗无效的顽固的FD患者的治疗.

枸橼酸坦度螺酮起效较慢, 通常用药10-15 d开始起作用, 4-6 wk达到疗效高峰, 所以在治疗前建立良好的医患关系, 早期对症治疗及心理治疗非常重要, 必要时治疗的前2 wk加

服安定1.25 mg, 2次/d, 可以暂时缓解症状, 并可暗示患者服药1-2 wk后药物开始起作用, 以增强患者配合治疗的信心. 该药副作用少, 患者依从性较好.

4 参考文献

- 1 刘谦民, 令狐恩强, 刘运祥, 黄留业. 功能性胃肠病学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2003: 226-227
- 2 Drossman DA. Gastrointestinal illness and the biopsychosocial model. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22: 252-254
- 3 杨壁辉, 郑永平, 高镇松, 林和文, 许秀兰. 联合抗抑郁药治疗功能性消化不良的临床研究. *中华消化杂志* 2001; 21: 226-228
- 4 潘小平, 李瑜元, 沙卫红, 杨富英. 抗抑郁药治疗功能性消化不良的临床研究. *中华消化杂志* 1999; 19: 162-164
- 5 Haug TT, Wilhelmsen I, Ursin H, Berstad A. What are the real problems for patients with functional dyspepsia? *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 97-100
- 6 田虹, 周汉建, 戈兰, 陈小良. 功能性消化不良患者焦虑和抑郁调查分析. *广东医学* 1999; 20: 858-859

电编 张敏 编辑 潘伯荣

■名词解释

功能性消化不良: 是指具有上腹痛、上腹胀、早饱、嗝气、食欲不振、恶心、呕吐等上腹不适症状, 经检查排除引起这些症状的器质性疾病的一组临床综合征, 症状可持续或反复发作, 病程一般规定超过1 mo或在12 mo中累计超过12 wk.

■同行评价

本文选题有临床实用性, 有一定价值.

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.

老年人腹部手术后早期炎性肠梗阻35例

杨建光, 赵宇, 于作夫, 孙玉华

■背景资料

随着临床病例的增多及对术后早期炎性肠梗阻的认识, 人们对他的产生、发展、诊治有所了解。术后早期炎性肠梗阻系指腹部创伤或腹腔内炎症等原因导致肠壁水肿及渗出, 形成腹腔内广泛粘连, 是一种机械性与动力性同时存在的肠梗阻, 较少发生绞窄。但我国正处于老龄化社会, 高龄患者偏多, 由于老年患者有自身特殊性, 针对老年人腹部术后早期炎性肠梗阻进行分析, 探讨其诊治及预防非常重要。

杨建光, 赵宇, 于作夫, 孙玉华, 中国医科大学附属第四院普

外科 辽宁省沈阳市 110005

通讯作者: 杨建光, 110005, 辽宁省沈阳市和平区南七马路102

号, 中国医科大学附属第四院普外科. yjguang6911@sina.com

电话: 024-62037377

收稿日期: 2006-04-04 接受日期: 2006-04-24

Inflammatory intestinal obstruction early after abdominal operation in elderly patients: an analysis of 35 cases

Jian-Guang Yang, Yu Zhao, Zuo-Fu Yu, Yu-Hua Sun

Jian-Guang Yang, Yu Zhao, Zuo-Fu Yu, Yu-Hua Sun, Department of General Surgery, the Affiliated Fourth Hospital of China Medial University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jian-Guang Yang, Department of General Surgery, the Affiliated Fourth Hospital of China Medial University, 102 South Seven Road, Heping District, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. yjguang6911@sina.com

Received: 2006-04-04 Accepted: 2006-04-24

Abstract

AIM: To conclude the experiences on the diagnosis, treatment and prevention of the early abdominal postoperative inflammatory intestinal obstruction in elderly patients.

METHODS: The clinical data of 35 elderly patients with the early abdominal postoperative inflammatory intestinal obstruction were analyzed retrospectively.

RESULTS: The early abdominal postoperative inflammatory intestinal obstruction of the elderly patients mostly occurred 4-12 d after abdominal operation. Besides normal symptoms and signs of the intestinal obstruction, it also had specific characteristics of its own. Of the 35 cases, 33 were cured without operation, and the mean time from the onset of symptoms to the recovery of bowel function was 8 ± 1 d (range: 4-28 d).

CONCLUSION: Non-operative treatment can

gain satisfactory results for the the early abdominal postoperative inflammatory intestinal obstruction in elderly patients, and less surgical trauma and inhibition of the postoperative inflammation play a predictive role to some extent.

Key Words: Elderly patient; Inflammatory intestinal obstruction; Abdominal operation

Yang JG, Zhao Y, Yu ZF, Sun YH. Inflammatory intestinal obstruction early after abdominal operation in elderly patients: an analysis of 35 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14(16): 1638-1640

摘要

目的: 对老年人腹部术后早期炎性肠梗阻的诊断、治疗和预防进行探讨。

方法: 回顾分析35例腹部术后早期炎性肠梗阻的老年患者的临床资料。

结果: 老年人腹部术后早期炎性肠梗阻多发生在术后4-12 d, 除表现为一般肠梗阻的症状体征外, 还有其自身的特点, 33例经非手术治疗痊愈, 平均肠功能恢复时间为 8 ± 1 d (4-28 d)。

结论: 老年人术后早期炎性肠梗阻采用保守治疗效果较满意, 减少手术的创伤及抑制炎症反应对其发生有一定的预防作用。

关键词: 老年人; 炎性肠梗阻; 腹部手术

杨建光, 赵宇, 于作夫, 孙玉华. 老年人腹部手术后早期炎性肠梗阻35例. *世界华人消化杂志* 2006;14(16):1638-1640

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1638.asp>

0 引言

术后早期炎性肠梗阻一般发生在腹部手术后1 mo内, 系指由于腹部手术创伤或腹腔内炎症等原因导致肠壁水肿和渗出, 形成腹腔内广泛粘连, 结合术后胃肠功能的抑制, 所造成的一种机械性与动力性同时存在的肠梗阻, 较少发生肠绞窄。近年来, 随着我国进入老龄社会, 老年

患者腹部手术所占比例增加, 术后早期炎性肠梗阻在老年患者的发病率也在提高, 由于两者均有自身的特殊性, 应正确认识此类肠梗阻及老年人具有重要意义. 我院1998-08/2005-08共收治35例此类肠梗阻的老年患者如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组共有35例, 男21例, 女14例, 年龄61-89(平均74.6)岁. 均有腹部手术史, 其中化脓性阑尾切除术5例, 结直肠癌手术18例, 胃癌手术6例, 小肠粘连松解术3例, 胃十二指肠穿孔修补术2例, 胆囊切除术1例. 合并高血压者20例, 糖尿病者12例, 冠心病者15例, 脑血栓者10例, 肺心病者6例, 支气管炎者8例. 发生肠梗阻时间为术后4-12 d, 术后4 d 3例, 5 d 11例, 6 d 10例, 7 d 2例, 8 d、10 d、12 d各3例. 本组35例均为腹部手术后, 曾一度术后肠蠕动恢复, 并有排气排便进食以后又出现肠梗阻症状: 腹胀32例, 轻度腹痛11例, 阵发性腹痛24例; 恶心31例, 呕吐35例. 腹部轻压痛30例, 腹部压痛不明显5例; 肠鸣音减弱13例, 肠鸣音消失5例, 肠鸣音亢进、偶闻及气过水音17例. 腹部X线片均有多处大小不等液气平面, 全腹CT检查25例, 显示肠腔扩张, 肠壁水肿、增厚, 肠腔积液、积气, 腹腔积液. 白细胞增高30例, 正常5例.

1.2 方法 本组35病例均采用保守疗法. 西医治疗包括: (1)禁食水; (2)持续胃肠减压; (3)患者条件允许可离床活动; (4)胃肠外营养支持; (5)合理应用激素; (6)合理应用生长抑素; (7)合理应用抗生素. 中医治疗: 参附注射液50 mL(每毫升注射液相当于生药红参0.1 g, 附片0.2 g)加入50 g/L葡萄糖注射液250 mL每日1次静点, 中药胃管注入及灌肠用药如下: 生大黄20 g(后下), 芒硝15 g(冲), 厚朴20 g, 枳实20 g, 柴胡12 g, 丹参30 g, 赤芍12 g, 上述煎剂100-150 mL胃管注入或保留灌肠, 每日2-3次, 温度40℃为宜, 直至排气排便.

2 结果

经保守治疗痊愈33例, 平均肠功能恢复时间为 8 ± 1 d(4-28 d). 2例中转手术, 其中肠粘连松解术1例, 小肠短路手术1例. 术中发现小肠广泛粘连, 表面附有纤维蛋白层, 肠壁水肿增厚, 少量腹水. 术后均发生肠痿, 无死亡病例.

3 讨论

术后早期炎性肠梗阻不是独立的肠梗阻类型, 有其共同的特征, 但也有其自己的诊断、治疗特

点, 如处理不当会引起多发性肠痿、短肠综合征、重度感染等严重并发症, 腹部手术后早期炎性肠梗阻占术后肠梗阻的20%^[1]. 其与腹部术后早期肠梗阻有不同之处, 前者病因多为手术后肠麻痹、内疝、肠扭转、吻合口狭窄黏连成角或束带绞窄等机械性因素导致的肠梗阻, 多数为腹痛剧烈而腹胀较轻, 常有肠型和气过水声, 腹膜炎体征明显; 而术后早期炎性肠梗阻是指腹腔内因炎症、广泛黏连所致的炎症性肠梗阻, 其特点: (1)发生在腹部手术后早期, 肠蠕动曾一度恢复, 多于术后3-7 d左右开始出现梗阻症状; (2)症状以腹胀为主, 无腹痛或轻度胀痛, 腹胀症状大于腹痛; (3)腹部肠梗阻症状、体征十分典型, 一般不发生肠绞窄症状; 虽有机械性因素, 但大多数都是腹腔内炎症所致广泛黏连引起; (4)本病常见于腹腔内手术操作创面范围广, 创伤、污染重, 年龄大, 体质差的患者; (5)X线摄片发现多个液气平面, 并有肠腔内积液的现象, 腹部CT扫描可见肠壁增厚, 肠祥成团, 肠腔内无显影剂等; (6)保守治疗大多可取得满意效果, 但肠功能恢复时间长^[2].

老年人由于生理功能及应激能力降低, 肠梗阻时体液丧失, 肠膨胀、毒素吸收、感染和禁食水等因素, 加之刚刚手术完毕, 机体尚未恢复, 伴有许多内科疾病, 难以承受再次手术的打击. 同时也使再次手术的风险增高, 并发症增多, 死亡率上升. 因此, 一旦出现术后早期炎性肠梗阻, 应尽量保守治疗, 不宜手术治疗, 但需要有足够的耐心, 目前国内外均主张首先采用非手术治疗^[3-5]. 保守治疗的主要措施有: (1)禁食水、持续胃肠减压, 中药静点、胃管注入保留灌肠. 参附注射液及“通里攻下”中药可促进肠道的蠕动, 增强肠管张力, 协调肠壁运动而缓解或解除肠麻痹症状, 并能抑制炎症细胞因子的活化与释放, 改善肠系膜微循环^[6-7]. 鼓励下床活动, 促进胃肠功能恢复; (2)维持水、电解质平衡, 一般采用外周静脉高营养, 超过7 d者采用完全胃肠外营养, 防止分解代谢造成的营养不良; 但因老年人热量需要降低, 蛋白质合成与更新减慢, 葡萄糖利用障碍和脂肪代谢能力下降, 调节体液及酸碱平衡能力较差, 故应尽早使用, 一旦出现营养不良, 很难纠正, 重在预防^[8]; (3)可用生长抑素降低胃肠液分泌, 减少肠腔内滞留, 减轻肠壁水肿, 改善肠壁血液循环, 加速炎症消退. 曾有人研究生长抑素联合肠外营养有利于术后炎性肠梗阻的恢复, 防止肠道菌群移位, 保护胃肠黏膜, 并且为手术

■相关报道

目前临床报道较多, 主要认为术后早期炎性肠梗阻不同于一般肠梗阻, 为机械性与动力性同时存在粘连性肠梗阻, 主张保守治疗, 但需足够长时间.

■创新盘点

本文针对老年人腹部术后早期炎性肠梗阻进行论述总结, 阐明此类患者的诊治预防措施, 减少临床发生及并发症出现.

■同行评价

本文选题紧贴临床, 分析较透彻, 有指导意义。

做好准备^[9-11]。(4)肾上腺皮质激素减轻炎症反应, 通常剂量为地塞米松5 mg iv, 每8 h 1次, 应用1周左右逐渐停药^[12]; 但老年人免疫功能低下, 胃肠功能欠佳, 伴有内科疾病, 应同时使用抗菌素及抑酸药; (5)对白细胞增高、发热、腹膜炎者应用有效广谱抗生素和抗厌氧菌药, 防止肠道菌群移位, 出现毒血症; (6)主张保守治疗并不是绝对不手术。如有白细胞升高、发热、腹痛腹胀加重, 局限性压痛、肌紧张, 心率加快, 出现肠坏死, 腹膜炎征象, 应及时中转手术。但老年人腹壁肌肉萎缩, 反应能力差, 缺乏典型的症状及体征, 应密切注意腹部体征的变化, 反复对照, 以免延误病情。

目前认为术后早期炎性肠梗阻是由于小肠、结肠肌间浸润的白细胞介导的炎症反应所引起的^[13-14], 而老年人的反应能力较差, 术后可没有过多的临床症状, 仿佛突然发生, 故重在预防, 做到心中有数。针对此类患者, 可在术中及术后可用乌司他丁抑制炎性介质的释放, 同时术后2-3 d可用胃复安等胃肠动力药物, 关腹时使用几丁糖等防黏连药物, 注意老年人肠系膜微循环及水电解质平衡。当然手术的轻柔操作, 避免术中出血及大块组织的结扎, 减少异物残留, 术毕腹腔冲洗, 腹内组织的腹膜化等造成炎症反应的原因也是必不可少的。术中使用可吸收生物膜也有一定的作用^[15]。

4 参考文献

1 黎介寿. 认识术后早期炎性肠梗阻的特性. 中国实用

外科杂志 1998; 18: 387-388

2 张国强. 术后早期肠梗阻的诊断和治疗. 中国临床医学 2002; 9: 434-435

3 廖建军. 保守治疗术后早期炎性肠梗阻的体会. 中原医刊 2005; 32: 25

4 Fraser SA, Shrier L, Miller G. Immediate postlaparotomy small bowel obstruction: a 16-year retrospective analysis. *Am Surg* 2002; 68: 780-782

5 朱维铭, 李宁, 黎介寿. 术后早期炎性肠梗阻的诊治. 中国实用外科杂志 2002; 22: 219

6 宋文蔚, 宋欣伟. 参附注射液合中药灌肠对急性胰腺炎肠麻痹疗效观察. 浙江中医学院学报 2005; 5: 22-23

7 安海民, 邵学成, 邵朋军. 复方大承气汤治疗术后早期炎性肠梗阻9例体会. 中国实用乡村医生杂志 2005; 12: 55

8 伍晓汀, 赵小菲. 老年人肠梗阻的营养治疗. 大肠肛门病外科杂志 2004; 10: 9-10

9 邓洪强, 吴鸿根. 生长抑素联合肠外营养治疗术后早期炎性肠梗阻20例. 右江民族医学院学报 2005; 3: 340-341

10 魏健, 杨玉辉, 谢凯英, 岳璇第. 生长抑素在术后早期炎性肠梗阻中的应用. 现代医药卫生 2004; 20: 2688

11 陈思曾, 林永堃, 许东坡. 生长抑素和肠外营养支持治疗术后早期炎性肠梗阻. 肠内与肠外营养 2002; 9: 7-8

12 龚剑峰, 朱维铭, 李宁, 黎介寿. 营养支持在术后早期炎性肠梗阻治疗中的应用. 腹部外科 2004; 17: 219-221

13 De Jonge WJ, van den Wijngaard RM. The FO. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 1137-1147

14 Schwarz NT, Beer Stolz D, Simmons RL. Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Ann Surg* 2002; 235: 31-40

15 Kudo FA, Nishibe T, Miyazaki K. Use of bioresorbable membrane to prevent postoperative small bowel obstruction in transabdominal aortic aneurysm surgery. *Surg Today* 2004; 34: 648-651

电编 李琪 编辑 潘伯荣

利福平外用致原位肝移植术后患者过敏反应1例

程芮, 臧运金, 沈中阳

程芮, 臧运金, 沈中阳, 武警总医院肝移植研究所 肝移植重症监护室 北京市 100039

通讯作者: 程芮, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 武警总医院肝移植研究所. chengrui2017@163.com

电话: 010-88277015 传真: 010-68221819

收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-16

摘要

肝炎后肝硬化患者, 原发性肝癌行原位肝移植术, 术后7 d皮肤破溃处涂利福平胶囊粉后出现过敏反应。利福平为临床常用的广谱抗菌素, 外用后快速导致过敏反应未见报道, 该病例既往无过敏史, 特殊之处在于为原位肝移植术后患者, 移植术后用药有很多特殊之处, 可供参考的资料不多。抗过敏治疗上以尽快纠正低氧血症对移植肝功能的恢复至关重要。

关键词: 原位肝移植; 利福平; 过敏反应

程芮, 臧运金, 沈中阳. 利福平外用致原位肝移植术后患者过敏反应1例. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1641-1642

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1641.asp>

0 引言

临床常用药, 在某些情况下应用可能会出现不常见的副作用, 原位肝移植术后用药有很多特殊性, 但可参考的资料不多, 如处理不及时或判断不准确会严重影响患者术后早期的生命体征平稳。该例利福平外用致原位肝移植术后患者出现严重过敏反应引起临床注意。

1 病例报告

男, 50岁。乙肝病史20 a, 乏力、纳差伴间断意识障碍4 mo入院。诊断肝硬化10 a。6 a前出现上消化道出血, 行TIPS治疗。4 mo前出现乏力、纳差, 伴间断意识不清, 外院CT示: 肝硬化、肝右叶多发低密度灶、脾大、腹水。为进一步诊治来我院。查体: 肝性面容, 神志清楚, 全身皮肤及巩膜黏膜黄染, 肝掌, 蜘蛛痣, 双肺未闻及干湿性罗音, 心界略大, 心率94次/min, 律齐, 无杂音。腹部膨隆, 肝未触及, 移动性浊音(+). 血

WBC $5.71 \times 10^9/L$, N 0.75, Hb 93 g/L, PLT $27 \times 10^9/L$, 血型AB; 病毒全项阴性, 抗HIV(-), 抗TP(-); PT 16.5 s, PTA 54.7%; ALT 2334 nkat/L, AST 2500 nkat/L, GGT 2884 nkat/L, ALP 2567 nkat/L, ALB 34.0 g/L, TB 164.2 $\mu\text{mol/L}$, DB 100.8 $\mu\text{mol/L}$, Cr 57 $\mu\text{mol/L}$, AFP 68.39 $\mu\text{g/L}$. 心电图、胸片及超声心动图正常; 腹部B超: 肝硬化, 脾大, 肝脏弥漫性占位性病变, 门静脉血栓, 大量腹水; CT示颅脑、肺部未见异常, 腹部为肝硬化, 大量腹水。诊断: 肝炎后肝硬化(失代偿期), 原发性肝癌。患者于手术当天再次出现上消化道出血。手术方式为原位经典非转流肝移植术, 术中探查大量腹水, 肝脏呈混合结节硬化, 直径0.3-1.5 cm大小, 明显萎缩, 肝脏左右叶可及多个肿块, 最大1.5 cm $\times$ 1.0 cm。手术耗时14 h 10 min, 过程顺利, 术中输血6800 mL, 血浆3400 mL。患者术后出现腹腔内活动性出血, 急诊行剖腹探查见肝上下腔静脉供肝膈静脉线结脱落, 断端出血, 术中输血1000 mL, 血浆2000 mL。术后经内科处理, 特别是移植肝凝血功能改善, 门脉高压缓解, 于二次术后3 d, 腹腔及消化道出血停止。检查结果: 肝功能、胆红素下降, 凝血机制改善, B超示移植肝声像图及血流正常; 胸片检查仍提示双侧胸腔积液。胆汁量渐增加, 体温一过性升高, 给予肝移植术后常规抗感染、免疫抑制剂、营养支持等治疗, 病情平稳。术后7 d, 患者后背皮肤破溃约3 cm $\times$ 4 cm, 翻身并于局部涂利福平胶囊粉约10 min后, 出现后背涂药处剧痛, 寒战, 高热, T 38.8 $^{\circ}\text{C}$, 呼吸困难, R 32次/min, 双肺呼吸音增粗, 并可闻及散在的湿性罗音, 胸闷憋气, 心率>150次/min持续时间>30 min, 心尖区闻及舒张期奔马率, 血压最低84/40 mmHg, 血氧饱和度下降至93%, 尿少。心电图: 与术前比较窦性心动过速, 心电图轴、各导联P-QRS-T无明显变化; 动脉血气分析: 代谢性酸中毒及低氧血症(PaO_2 66 mmHg), 无过度换气(PaCO_2 37 mmHg)。立即清洗后背创面, 高浓度面罩吸氧, 冰袋物理降温, 非那根、地塞米松抗过敏治疗, 去甲肾维持血压同时给

■应用要点

利福平为广谱抗菌素, 临床应用广泛, 口服有诱发急性肾炎、急性肾功能衰竭和过敏反应的报道。临床上特别是在ICU卧床患者, 如出现皮肤破溃或褥疮, 很多医院采用利福平外用, 应该注意到利福平外用也有导致过敏反应的发生, 因ICU患者多为重症患者且采用综合治疗, 用药品种多, 如过敏反应不能及时判断过敏原、及时清除、及时纠正, 会加重病情甚至导致死亡。

■同行评价

本文病例较典型,对利福平用药及肝移植术后处理具有一定指导意义,而且内容简要,叙述清楚,结论合理,有一定临床指导意义。

予速尿、西地兰、吗啡等药物,20 min后,心率降至120次/min左右,胸闷及呼吸困难减轻,血压平稳,血氧饱和度上升至98%,排尿约700 mL,距发病2 h后症状完全缓解。

2 讨论

利福平为一临床常用的广谱抗菌素,可与细菌的RNH多聚体酶结合,阻止mRNA的合成,从而抑制细菌的生长繁殖,主要用于抗结核治疗。有文献报道口服或利福平眼药水局部应用致皮肤过敏,甚至诱发急性间质性肾炎、急性肾功能衰竭的报道^[1-2]。但外用后快速导致过敏反应未见报道。该患者既往无过敏史,特殊之处在于为原位肝移植术后患者,而肝移植术后用药有很多特殊之处,可供参考的资料不多。上述症状出现前明确的两个诱因因为搬动和利福平局部用药,从临床表现及各项检查可以除外急性肺栓塞,而主要考虑药物过敏所致,且对症治疗有效。氧分压降低的病理基础在于:(1)肝硬化及乙肝病毒所致的心肌损害,虽然平静状态下心功能正常,大的创伤、特别是心肌氧耗明显增加后出

现心功能不全的表现,导致肺淤血;(2)病程长,术前可能存在肝肺综合症;(3)肝硬化水钠储留;(4)手术前后多次输血、血浆制品以及麻醉所致的肺损伤;(5)右上腹手术膈肌刺激后的右侧胸腔积液,影响呼吸功能;(6)除外急性肺栓塞、气道梗阻、支气管痉挛等通气/血流比例失调所致的低氧,而主要考虑心源性因素即心率快、肺血多、氧弥散障碍所致。因此与处理一般过敏性休克或急性肺水肿的强心、利尿、扩血管不同之处在于,肝移植术后常见高动力循环即高排低阻的病理生理改变,因此既要减轻肺淤血,同时又要维持外周血管张力,在维持正常血压的前提下,给予利尿剂以及小剂量应用吗啡镇痛镇静、扩张血管减轻心脏负担、缓解喘息,同时控制心室率如降体温,应用洋地黄,抗过敏治疗等,尽快纠正低氧血症对移植肝功能的恢复至关重要。

3 参考文献

- 1 陈科,刘春涛,杨自明.利福平、异烟肼过敏性皮炎脱敏疗法17例报告.宁夏医学杂志 2002; 24: 358
- 2 许俊福,苏海涛.利福平过敏致急性肾功能衰竭9例临床分析.中国现代医学杂志 2002; 12: 94

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 •

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11在西部高原城市青海省西宁市举行第十一届全国胰腺外科学术研讨会,届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论,欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会,共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范。

投稿及联系事项:北京协和医院基本外科,李丽君。截稿日期2006-06-30。通信地址:北京市东城区王府井大街帅府园1号,邮编:100730。联系电话:010-65296021,010-65296016;传真:010-65296021(世界胃肠病学杂志社 2006-05-18)

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或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、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
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. wjgd@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 , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^{\circ}\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of 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!

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院普外科

陈积圣 教授
中山大学孙逸先纪念医院肝胆外科

陈立波 副教授
华中科技大学协和医院肝胆外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院放射科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化疾病研究所

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院实验诊断科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

龚国忠 教授
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

何超 教授
邵逸夫医院肛肠外科

何振平 教授
第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所肝胆外科学

季国忠 主任医师
南京医科大学第二附属医院消化内科

姜洪池 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

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内科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科

林勇 教授
第二军医大学附属长征医院消化内科

李东辉 主治医师
厦门大学医学院抗癌研究中心

刘正稳 教授
西安交通大学医学院第一附属医院

刘作金 教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

邵成浩 主治医师
第二军医大学长海医院普外科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院院长办

孙秀发 教授
华中科技大学同济医学院营养与食品卫生学系

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王效民 教授
厦门大学附属中山医院肝胆外科

王正康 教授
北京中日友好医院普通外科

吴建国 教授
第四军医大学唐都医院消化科

向德兵 讲师
重庆第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

许文燮 教授
上海交通大学生命科学与技术学院

张柏和 教授
上海市东方肝胆外科医院肝胆外科

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系