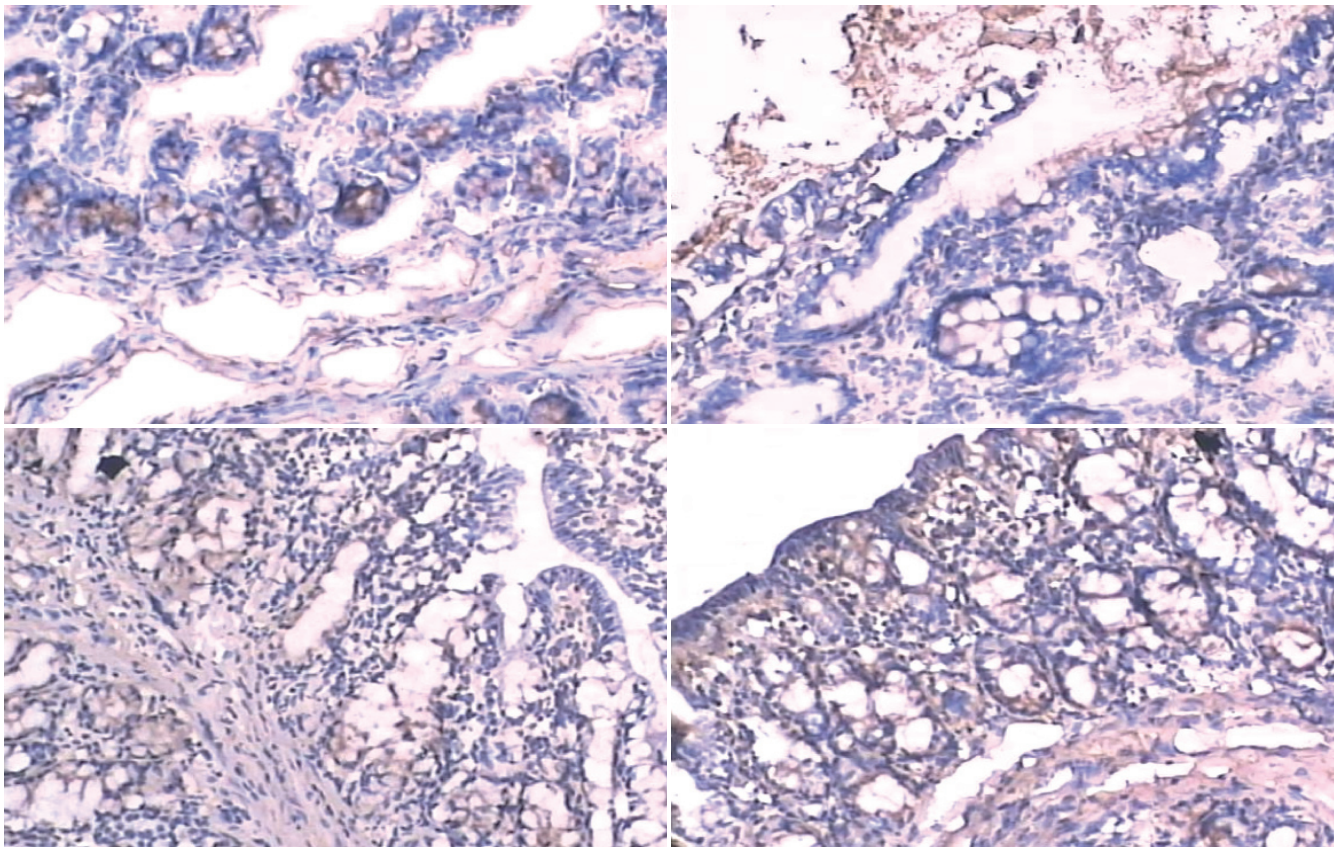
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 8 月 8 日　第 14 卷　第 22 期　(Volume 14 Number 22)



22 / 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
www.wjgnet.com
二零零六年八月八日　第十四卷　第二十二期
世界胃肠病学杂志社

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
曹志成院士 香港
陈海龙教授 大连
陈红松副研究员 北京
陈积圣教授 广州
陈建荣副教授 南通
陈立波副教授 武汉
陈凛教授 北京
陈其奎教授 广州
陈强谱教授 滨州
陈仕珠主任医师 西安
陈卫昌教授 苏州
陈耀凯副教授 重庆
陈贻胜教授 福州
陈知水教授 武汉
陈治水主任医师 哈尔滨
陈祖林副教授 重庆
程爱国教授 唐山
程红岩教授 上海
程树群副教授 上海
迟宝荣教授 长春
崔云甫教授 哈尔滨
代文杰教授 哈尔滨
戴冬秋教授 沈阳
党双锁副教授 西安
邓长生教授 武汉
董蕾教授 西安
杜群副研究员 广州
樊红副教授 南京
范建高教授 上海
范志宁主任医师 南京
房静远教授 上海
傅春彬主任医师 吉林
高成新教授 上海
高春芳研究员 上海
高峰教授 西安
高润平教授 长春
戈之铮教授 上海
龚国忠教授 长沙
龚建平教授 重庆
巩鹏副教授 大连
谷俊朝主任医师 北京
关玉盘教授 北京
管冬元副教授 上海
郭克建教授 沈阳
郭晓钟教授 沈阳
郭新宁教授 银川
韩天权教授 上海
郝春秋副教授 西安
郝俊鸣副主任医师 北京
何超教授 杭州
何裕隆教授 广州
何振平教授 重庆
洪天配教授 北京
侯晓华教授 武汉
黄恒青主任医师 福州
黄金华副教授 广州
黄晓东副主任医师 武汉
黄颖秋教授 本溪
黄裕新教授 西安
黄志勇副教授 武汉
季国忠副教授 南京
季加孚教授 北京
姜慧卿教授 石家庄
蒋龙元副教授 广州
金瑞教授 北京
匡安仁教授 成都
兰平教授 广州
蓝宇教授 北京
劳绍贤教授 广州
李定国教授 上海
李东辉教授 厦门
李方儒教授 天津
李国威教授 西安
李继强教授 上海
李靖副教授 重庆
李军祥教授 北京
李奇林教授 广州
李胜研究员 济南
李涛主治医师 北京
李晓宇主任医师 北京
李旭副教授 广州
李延青教授 济南
李永哲副研究员 北京
李瑗教授 南宁
李玉民教授 兰州
李增山副教授 西安
李兆申教授 上海
李志霞教授 北京
李宗芳教授 西安
梁力建教授 广州
林胜璋副教授 温州
林勇讲师 上海
刘宝瑞教授 南京
刘彬彬副研究员 上海
刘冰熔教授 哈尔滨
刘成海研究员 上海
刘平教授 上海
刘杞教授 重庆
刘铁夫教授 哈尔滨
刘颖斌副教授 杭州
刘占举教授 郑州

世界华人消化杂志®
编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2006 年 8 月 8 日　第 14 卷　第 22 期　(总第174期)

述　评

2155 腺相关病毒在肝脏移植应用的研究进展 邵升, 苏志雷

基础研究

2159 杏仁核外源性胃动素对大鼠胃运动的调节作用及机制
韩晓华, 徐珞, 陶尚敏

2164 Cyclin E表达失调导致人类结肠癌染色体不稳定
陈剑英, 黄文广, 陶凯雄, 王国斌

2169 银杏苦内酯B对重症急性胰腺炎大鼠血浆细胞因子的影响
邸瑶, 夏时海, 佟长青

2174 干扰Fas受体表达的串联shRNA表达载体的构建
刘明社, 王兰, 赵中夫, 张国英, 张芸, 封江南

2180 早期持续高容量血滤对SAP猪的胰腺及胰腺外器官病理变化的影响
张震环, 李维勤, 王浩, 燕晓雯, 黎介寿

2186 幽门螺杆菌重组VacA-HpaA IgY的制备
叶翠莲, 杨致邦, 黄伟, 毛小琴, 张绍兰, 黄进

临床研究

2192 胃癌组织中肿瘤相关基因甲基化及其表达与叶酸和代谢酶MTHFR基因多态性的关系
翁玉蓉, 房静远, 孙丹凤, 陈朝飞, 陆嵘, 顾伟齐, 朱红音

2199 大肠癌和大肠腺瘤COX-2和BFGF表达的意义
林瑶光, 韦良宏

2203 结肠癌组织$P57^{kip2}$和Ki67表达对侵袭性的影响
狄建忠, 赵中辛, 郑起, 樊友本, 汪昱

2207 慢性乙型肝炎患者肝组织穿孔素表达的临床意义
王海燕, 贺永文, 朱传武, 钱峰, 李明, 罗湘蓉, 常建国, 张雪华

文献综述

2211 乙型肝炎病毒基因型研究新进展
刘兴, 唐红, 何芳

2217 Ku蛋白与肿瘤
占大钱, 黄志勇, 陈孝平

2223 肝纤维化的信号转导通路
吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙

2229 肠道树突状细胞的特性及功能研究
张中伟, 秦环龙

研究快报

2233 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型
赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成

2237 医用微生态制剂分离菌株对白假丝酵母菌芽管形成的抑制作用
唐欢, 但国蓉, 魏泓

临床经验

2241 胃肠道间质瘤的临床病理分析和免疫组化特点
顾国利, 王石林, 任力, 魏学明, 李德昌, 周晓武, 黄蓉蓉

2247 新辅助化放疗在局部进展期低位直肠癌保留肛门括约肌的作用
罗琪, 张颂恩, 魏黎煜

2251 胰胆疾病的胆树形态分析
赵保民, 黄峻松, 李春明, 黄永德, 孙振兴

附　　录	2255 世界华人消化杂志投稿须知
致　　谢	2260 致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	2158 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 2168 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 2179《世界华人消化杂志》简介 2185 第八届中西医结合实验医学研讨会 2206 《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志》2004年度的影响因子分别位居1608种中国科技论文统计源期刊中第14位和4位 2210 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知 2228 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2236 专家门诊 2246 2006年即将召开的国际会议
封面故事	Tong-Yi Shen, Huan-Long Qin, Zhi-Guang Gao, Xiao-Bing Fan, Xiao-Ming Hang, Yan-Qun Jiang. Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12(27): 4352-4358 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4352.asp
国际会议	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 14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)
创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2006-08-08
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 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张敏 李琪
本期审读 王晓瑜 张焕兰

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023，北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023，北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

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

特别声明

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

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

August 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 22

EDITORIAL

2155 Application of adeno-associated virus in liver transplantation
Tai S, Su ZL

BASIC RESEARCH

2159 Effect of exogenous motilin in amygdaloid nucleus on gastric motility and its underlying mechanism in rats
Han XH, Xu L, Tao SM

2164 Deregulation of cyclin E induces chromosomal instability in human colon cancer
Chen JY, Huang WG, Tao KX, Wang GB

2169 Effect of Ginkgolide B on plasma levels of cytokines in severe acute pancreatitis in rats
Di Y, Xia SH, Tong CQ

2174 Construction of recombinant plasmid series with two Fas-targeted short hairpin RNAs
Liu MS, Wang L, Zhao ZF, Zhang GY, Zhang Y, Feng JN

2180 Effect of early continuous high-volume hemofiltration on histopathological changes of pancreas and extrapancreatic organs in pigs with severe acute pancreatitis
Zhang ZH, Li WQ, Wang H, Yan XW, Li JS

2186 Preparation of egg yolk immunoglubin against recombinant vacuolating cytotoxin A-*Helicobacter pylori* adhesin A in *Helicobacter pylori*
Ye CL, Yang ZB, Huang W, Mao XQ, Zhang SL, Huang J

CLINICAL RESEARCH

2192 Methylation and expression of tumor-related genes and their associations with folate and MTHFR gene polymorphisms in gastric cancerous tissues
Weng YR, Fang JY, Sun DF, Chen ZF, Lu R, Gu WQ, Zhu HY

2199 Expression and significance of cyclooxygenase-2 and basic fibroblast growth factor in colorectal carcinoma and adenoma
Lin YG, Wei LH

2203 Expression of $P57^{kip2}$ and Ki67 in colon adenocarcinoma
Di JZ, Zhao ZX, Zheng Q, Fan YB, Wang Y

2207 Clinical significance of intrahepatic perforin expression in patients with chronic hepatitis B
Wang HY, He YW, Zhu CW, Qiang F, Li M, Luo XR, Chang JG, Zhang XH

REVIEW

2211 New advance in genotype of hepatitis B visus
Liu X, Tang H, He F

2217 Relationship between Ku protein and tumor
Zhan DQ, Huang ZY, Chen XP

2223 Research progress in signal transduction pathway of liver fibrosis
Wu XL, Zeng WZ, Jiang MD, Wang PL

2229 Characteristics and functions of intestinal dendritic cells
Zhang ZW, Qin HL

RAPID COMMUNICATION

2233 L-arginine-induced acute nectotizing pancreatitis by intraperitoneal injection in rats
Lai MY, Liang ZH, Tang GD, Sun XC

2237 Inhibition of *Candida albicans* germination by strains separated from probiotic products for medicinal purposes
Tang H, Dan GR, Wei H

CLINICAL PRACTICE

2241 Histopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors
Gu GL, Wang SL, Ren L, Wei XM, Li DC, Zhou XW, Huang RR

2247 Role of sphincter preserving surgery with neoadjuant chemoradiotherapy for locally advanced low rectal cancer
Luo Q, Zhang SE, Wei LY

2251 Morphology of biliary tree displayed by endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients with pancreaticobiliary disease
Zhao BM, Huang JS, Li CM, Huang YD, Sun ZX

APPENDIX

2255 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

2260 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Shen TY, Qin HL, Gao ZG, Fan XB, Hang XM, Jiang YQ. Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12(27): 4352-4358
http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4352.asp

INTERNATIONAL MEETINGS

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

14th United European Gastroenterology Week
21-25 October 2006
Berlin
United European Gastroenterology Federation
www.uegw2006.de

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 August 8, 2006
Honorary-Editor-in-Chief
Bo-Rong Pan
President and Editor-in-Chief
Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of
World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Published by The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Overseas Distributor
China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481
Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Telephone: +86-10-85381901
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**

Copyright © 2006 by The WJG Press

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2155-2158
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

腺相关病毒在肝脏移植应用的研究进展

邰 升, 苏志雷

邰升, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
苏志雷, 哈尔滨医科大学附属二院普外一科 黑龙江省哈尔滨市 150086
邰升, 1995年毕业于内蒙古医学院, 2002年哈尔滨医科大学博士毕业, 副教授, 主要从事肝脏移植免疫耐受诱导的研究.
通讯作者: 邰升, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科. tai-sheng@tom.com
电话: 0451-86605356
收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-01-21

摘要

腺相关病毒(AAV)载体已成为当前基因治疗中最有潜力的病毒载体, 在肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗中发挥其独具的优势. 他安全, 无致病性, 低免疫原性, 高效转染肝脏并且目的基因长期表达. 同时AAV用于肝移植基因治疗又涉及到一些问题, 如肝移植中不可避免的缺血再灌注损伤、AAV目的基因表达的峰值延迟现象以及AAV与肿瘤发生的关系等, 本文就以上问题进行综述.

关键词: 腺相关病毒; 肝移植; 基因治疗

邰升, 苏志雷. 腺相关病毒在肝脏移植应用的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2155-2158
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2155.asp

0 引言

腺相关病毒载体(AAV)因其无致病性、宿主范围广、转染和表达效率高、目的基因长期表达等优点成为当前基因治疗中最有潜力的病毒载体, 在世界范围内的基因治疗研究中得到广泛应用, 并有若干项目已进入临床试验. 在肝移植基因治疗中通过病毒载体对移植肝进行基因修饰, 以达到抑制免疫排斥反应、诱导免疫耐受的目的. 以往的研究多集中于腺病毒(Ad)载体, 本文对AAV应用于肝移植基因治疗的优势、涉及的问题及发展前景作一综述.

1 AAV载体在肝移植基因治疗中的优势

1.1 安全性 AAV无致病性, 流行病学资料表明, 大多数人感染过野生型AAV. 在美国, 约85%的成年人血清中可以检测到AAV抗体. 在20到30岁的人群中, 血清中AAV抗体阳性者, 德国约50%, 法国约63%, 巴西约55%, 日本约46%[1]. 迄今尚无证据表明AAV的感染与某种疾病的发生有关; 相反, 在某些情况下AAV的感染对于人们似乎是有益的, 如AAV感染可能对于宫颈癌的发生有防护作用[2]. 目前在基因治疗研究中常用的AAV载体均由人2型AAV改造而来, 他去除了大部分野生型AAV的基因组, 包括AAV的复制蛋白(rep)和外壳蛋白(cap)的基因组, 仅保留了反向末端重复序列(ITR), 进一步保证了载体的安全性.

AAV有低免疫原性, 单纯AAV感染仅引起机体轻微的免疫反应, 在AAV的临床试验中, 局部注射部位无或仅有微弱的炎症反应[3]. Stilwell *et al*[4]基于DNA微阵列的一项研究结果显示, 腺病毒感染肺成纤维细胞后, 可以诱导包括致病效果相关的免疫和应激反应的基因表达, 而重组和野生型AAV感染仅诱导一群抗增殖性基因与巨噬细胞抑制因子1(MIC1)等的基因表达. MIC1可能发挥抑制前炎症细胞因子产生的作用.

野生型AAV2型偏向于特异性地整合到人基因组19号染色体q臂的特定位置AAVS1, 从而避免了像其他病毒那样因随机整合而可能引起抑癌基因失活和原癌基因激活的危险. 在构建重组AAV载体时, 通过保留rep基因以保留其定点整合的特性, 可以更好的加强AAV载体的安全性.

1.2 有效性 AAV载体宿主范围广, 可以转染分裂细胞和非分裂细胞. 但对不同的细胞, AAV载体的转染效率存在差异; 对同一种细胞, 不同血清型的AAV载体转染效率也不尽相同. AAV的转染效率与细胞表面存在的受体有关, 该受体分为两类, 一类是主要受体, 另一类是辅助受体. 对于AAV 2型而言, 硫酸乙酰肝素蛋白多糖是AAV 2型的主要受体, AAV通过主要受体结合于细胞表面; 1型成纤维细胞生长因子受体

■背景资料
腺相关病毒载体因其无致病性、宿主范围广、转染和表达效率高, 目的基因长期表达等优点成为当前基因治疗中最有潜力的病毒载体, 本文对腺相关病毒载体在肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗应用中的优势、涉及的问题及发展前景作一综述.

■研发前沿
腺相关病毒载体在肝移植基因治疗中的应用研究为肝移植的基因治疗的研究热点与前沿.

■应用要点
肝移植面临缺血再灌注损害、免疫排斥反应等重大问题, 通过基因治疗手段来解决这些问题的一大关键即载体的选择. 腺相关病毒载体可望在肝移植基因治疗中发挥重要作用.

(FGFR1)和αVβ5整合素是AAV 2型的辅助受体, 他协助病毒有效的进入细胞内部[5-6]. 最近的研究表明, 肝细胞生长因子受体c-met也是AAV 2型的一种辅助受体, 他通过细胞内吞作用辅助AAV进入细胞质[7]. 肝细胞表面受体的丰度决定了AAV对肝脏的转染效率, 使其成为肝脏指向基因治疗的有效病毒载体[8].

AAV载体介导的目的基因转移可以在宿主细胞内长期稳定的表达. Nakai *et al*[9]研究表明, AAV载体转染小鼠肝脏后, 外源性目的基因可以持续稳定的表达. 但其发生整合的比率很小, 而是通过形成首尾相接的环状高分子量多聚体以染色体外的形式存在. Yang *et al*[10]构建rAAV-hcTLA-4Ig, 并利用大鼠原位肝移植模型体外转导供肝, 结果显示, 受体血清中和移植物内的hcTLA-4Ig水平均在术后逐渐升高, 在移植后8 wk左右达峰值, 并维持较高水平180余天.

1.3 可行性 常规构建重组AAV需要共转染一个载体质粒和一个表达病毒复制和结构基因的包装质粒到Ad感染的培养细胞中. 但这种方法有明显的局限性, 如产量低、Ad辅助病毒污染等. 伍志坚 *et al*[11]用“一种病毒感染一株细胞”的生产策略, 用一种能提供重组AAV复制和包装功能的重组Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1), 去感染载体细胞株, 实现了重组AAV的大规模生产. Collaco *et al*[12]构建了pSH3和pSH5两种辅助质粒, 均可表达AAV的rep, cap基因和Ad E2A, VAI, E4基因. 可以在没有Ad感染的情况下共转染到人293细胞中, 使重组AAV载体产量提高80倍. 在纯化上, 吴小兵 *et al*[13]用“氯仿处理-PEG/NaCl沉淀-氯仿抽提”的三步浓缩、纯化方法获得临床级的AAV. Auricchio *et al*[14]利用AAV与肝素的高亲和性, 采用单步圆柱纯化法(single-step column purification), 不仅简化了操作步骤, 而且得到了更纯、感染能力更强的AAV载体. 随着人们对重组AAV生产策略及纯化方法的不断深入研究, AAV载体的快速、高效的大规模高滴度生产模式已经日趋成熟, 为AAV载体的临床应用奠定了基础.

2 AAV用于肝移植基因治疗涉及的问题

2.1 缺血-再灌注损伤 AAV是一种偏向于潜伏感染的病毒, 只在有辅助病毒(Ad或疱疹病毒等)共感染时发生增殖性感染. 但用某些可损伤基因的因素如紫外线照射、各种化学致癌剂等处理某种类型的哺乳动物细胞, 可使之在无辅助病毒存在的情况下发生增殖性感染. Zhou *et al*[15]体外实验研究表明, 在亚致死剂量的紫外线诱导的AAV复制蛋白的表达, 可以使细胞发生细胞凋亡样反应而迅速死亡. 在肝脏移植中, 存在不可避免的缺血-再灌注损伤以及随之而来的肝脏对损伤结构的修复. 这种损伤-修复过程一方面可以提高AAV的转染效率, 其原因可能是DNA损伤及随后引起的DNA修复可以促进AAV第二链的合成与AAV的转录[10]; 另一方面, 过度的损伤是否会增加AAV的细胞毒性, 仍需进一步的研究.

2.2 峰值延迟 AAV转染细胞后目的基因可以长期表达, 但目的基因表达达到高峰的时间约4-8 wk[16]. 肝移植时, 术后急性免疫排斥反应发生在术后约1 wk. 这使得我们在供肝获取时转染目的基因, 在术后约1 wk急性排斥反应高峰时, 目的基因产物表达水平较低, 不足以发挥作用. 在大鼠同种异体原位肝移植中, 单独应用rAAV-hCTLA-4Ig转染供肝不能使移植物长期存活, 而在移植后3 d联合应用小剂量FK506, 却能使移植肝长期存活[17]. 我们课题组通过在移植前一段时间转染供体肝脏, 以使目的基因表达峰值与急性排斥反应高峰重叠(资料待发表).

2.3 靶向性 在肝移植的基因治疗中, 我们希望能靶向性的转染肝脏, 使目的基因在肝脏局部高表达从而有助于提高基因治疗的有效性和安全性. AAV能转染分裂细胞和非分裂细胞, 经肝动脉注射后, 其主要集中于肝脏, 但短期内在血清、其他组织、器官内也可以检测到AAV[18]. AAV从第一次接触细胞到进入细胞核的时间大约只需15 min[19], 因此用AAV载体离体状态下转染供肝, 并且经冷保存一段时间后, 可以使AAV靶向性转染肝脏.

2.4 肿瘤发生 目前常用的重组AAV载体由于缺少rep基因, 失去了定点整合的能力. 这就使得理论上他可整合至细胞基因组的任意位置, 有潜在的因随机插入而引起基因突变导致肿瘤发生的能力.

但在许多动物试验中, 并没有发现任何对宿主细胞的毒性及肿瘤的发生. 然而, 在rAAV介导的小鼠溶酶体贮积病、黏多糖贮积症Ⅶ型(MPS Ⅶ)的基因治疗实验中, 却出现了人们意料之外的结果. 60例中有6例发生恶性肿瘤, 其中5例肝细胞癌, 2例血管肉瘤(其中1例同时有肝细胞癌和血管肉瘤)[20]. 为明确该实验中小鼠的恶性肿瘤是否与rAAV载体有关, Donsante *et al*[20]对发生

肿瘤的小鼠进行了深入的研究, 提出一些假说并进行了验证. 假说1: MPS Ⅶ小鼠模型有肿瘤发生倾向, 然而在其他应用MPS Ⅶ小鼠模型的实验中并没有出现肿瘤发生. 假说2: 插入基因突变, 可是通过检测发生肿瘤的细胞中rAAV的启动子/增强子DNA, 结果显示每个细胞中rAAV的拷贝数小于0.113, 有的样品甚至检测不出(<1个拷贝/1000个双倍体), 说明肿瘤不是由于插入突变而使转导细胞克隆增殖引起的, 但也不能排除rAAV与之的关系. 其他假说如: 少数细胞过度表达目的蛋白(GUBS)、转导对象是新生鼠、病毒载体制备中涉及的化学物质等, 在相应的对照实验中也没有被证实. 没有证据表明肿瘤发生与rAAV插入基因突变有关, 肿瘤发生的真正原因仍需进一步研究.

Miller *et al*[21]研究AAV载体在体外整合至HeLa细胞克隆的过程, 发现在其整合位点有染色体的缺失和重排. 因此认为, AAV载体通过末端删除整合于染色体的断端, 在某些情况下, 可以引起染色体重排, 这可能会同时影响转导基因和细胞的基因表达. 但HeLa细胞是肿瘤细胞, 他的染色体组与人正常细胞相比有显著的差异. Miller *et al*[22]通过进一步研究认为, AAV载体可以整合于染色体的断裂处, 而不是其本身引起染色体断裂, AAV感染后并不能增加人正常细胞的突变几率, 因此认为AAV载体可以应用于临床.

总之, AAV载体的特点, 使他在基因治疗领域得到广泛的应用, 已进入临床试验包括用于治疗帕金森氏综合症、血友病和肺的囊状纤维化等疾病. AAV载体用于动物肝移植的实验研究已取得很大进展, 随着移植免疫学的不断发展及基因治疗理论和实践的不断完善, 我们相信, AAV载体在临床肝移植基因治疗以减少急、慢性免疫排斥反应, 提高移植肝的存活时间等方面有广阔的应用前景.

3 参考文献

1 Erles K, Sebokova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999; 59: 406-411

2 Walz CM, Correa-Ochoa MM, Muller M, Schlehofer JR. Adenoassociated virus type 2-induced inhibition of the human papillomavirus type 18 promoter in transgenic mice. *Virology* 2002; 293: 172-181

3 Sarukhan A, Camugli S, Gjata B, von Boehmer H, Danos O, Jooss K. Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol* 2001; 75: 269-277

4 Stilwell JL, Samulski RJ. Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression. *Mol Ther* 2004; 9: 337-346

5 Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999; 5: 78-82

6 Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999; 5: 71-77

7 Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H. Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 2005; 79: 609-614

8 Xiao W, Berta SC, Lu MM, Moscioni AD, Tazelaar J, Wilson JM. Adeno-associated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1998; 72: 10222-10226

9 Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol* 2001; 75: 6969-6976

10 Yang ZF, Wu XB, Tsui TY, Hou YD, Luk JM, Fan ST. Recombinant adeno-associated virus vector: Is it ideal for gene delivery in liver transplantation? *Liver Transpl* 2003; 9: 411-420

11 伍志坚, 吴小兵, 曹晖, 董小岩, 王宏, 侯云德. 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统. 中国科学(C辑) 2001; 31: 423-430

12 Collaco RF, Cao X, Trempe JP. A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene* 1999; 238: 397-405

13 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 屈建国, 侯云德. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法. 科学通报 2000; 45: 2071-2075

14 Auricchio A, O'Connor E, Hildinger M, Wilson JM. A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 2001; 4: 372-374

15 Zhou C, Yang Q, Trempe JP. Enhancement of UV-induced cytotoxicity by the adeno-associated virus replication proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1444: 371-383

16 Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999; 5: 64-70

17 Yang Z, Wu X, Tsui TY, Hou Y, Luk JM, Fan ST. Long-term liver allograft survival induced by combined treatment with rAAV-hCTLA4Ig gene transfer and low-dose FK506. *Transplantation* 2003; 75: 303-308

18 Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 545-565

19 Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-

■名词解释

腺相关病毒(AAV)是微小病毒科家族的成员之一. 这一家族成员是一类微小、无被膜及具有二十面体结构的病毒，病毒颗粒的直径在20-26 nm之间, 含有大小在4.7-6 kb之间的线状单链DNA基因组, 属于依赖性病毒类. 他最初是在纯化的腺病毒液中发现的一种污染成分, 顾而得名.

■同行评价
肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗是目前研究的热点问题, 而以重组病毒为载体的基因治疗因其独特的优势, 尤其是AAV作为目前临床可以应用的病毒载体备受瞩目. 作者以AAV在肝移植应用的优势及面临问题进行综述, 具有一定的意义.

associated virus. *Science* 2001; 294: 1929-1932
20 Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, Campbell-Thompson M, Daly T, Sands MS. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 2001; 8: 1343-1346
21 Miller DG, Rutledge EA, Russell DW. Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* 2002; 30: 147-148
22 Miller DG, Petek LM, Russell DW. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* 2004; 36: 767-773

电编 李琪 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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2159-2163
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

杏仁核外源性胃动素对大鼠胃运动的调节作用及机制

韩晓华, 徐 珞, 陶尚敏

韩晓华, 陶尚敏, 青岛大学医学院生理教研室 山东省青岛市 266021
徐珞, 青岛大学医学院病理生理教研室 山东省青岛市 266021
韩晓华, 博士, 讲师, 主要从事神经肽结构和功能的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30470642
通讯作者: 韩晓华, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院生理教研室. xiaohua.han@163.com
电话: 0532-82991703 传真: 0532-83813986
收稿日期: 2006-06-05 接受日期: 2006-06-14

Effect of exogenous motilin in amygdaloid nucleus on gastric motility and its underlying mechanism in rats

Xiao-Hua Han, Luo Xu, Shang-Min Tao

Xiao-Hua Han, Shang-Min Tao, Department of Physiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Luo Xu, Department of Pathophysiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470642
Correspondence to: Xiao-Hua Han, Department of Physiology, Qingdao University Medical College, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. xiaohua.han@163.com
Received: 2006-06-05 AccePted: 2006-06-14

Abstract

AIM: To investigate the effect of motilin microinjection into bilateral basomedial amygdaloid nucleus (BMA) on the gastric motility in rats, and explore its underlying mechanism.

METHODS: Forty male Wistar rats were used for four sets of experiments (Exp). Exp 1: Animals received bilateral injections of motilin (MT, 1 μg/side) or normal saline (NS, 0.5 μL/side) into BMA, and both intragastric pressure (IGP) and gastric motility frequency (GMF) were recorded to estimate the gastric motility (n = 14). Exp 2: Pretreatment of vagotomy was carried out in 12 rats, and then MT or NS was injected into BMA as in Exp1. Exp3: Sixty minutes after MT or NS injection into BMA, c-Fos protein expression was detected in the paraventricular nucleus (PVA, n = 7). Exp 4: Motilin contents were measured in five brain areas (hypothalamus, midbrain, pons, medulla, and pituitary gland), using radioimmunoassay (RIA) method (n = 7).

RESULTS: Exogenous motilin in BMA enhanced the gastric motility in rats, and this action lasted about 15 min. At the 10th, 15th, 20th, 25th min after motilin injection, the changes of IGP percentage were 19.7% ± 6.5%(P = 0.023), 62.9% ± 4.7% (P < 0.01), 45.1% ± 7.9% (P < 0.01), 29.3% ± 10.3% (P = 0.029). The changes of GMF percentage at the 15th, 20th min were 36.7% ± 8.5% (P < 0.01) and 19.5% ± 6.0% (P = 0.015), respectively. No obvious changes in both IGP and GMF were observed in normal saline controls. Pretreatment of subdiaphragmal vagotomy abolished the enhanced gastric motility induced by motilin injection. Motilin injection into bilateral BMA induced increased numbers of c-Fos positive cells in PVN, as compared with the saline control (53.4 ± 8.9 *vs* 22.5 ± 5.2, P < 0.01). Among the five tested brain areas, the highest motilin level was found in the hypothalamus area (74.3 ± 19.6 mg/kg). The motilin contents in the other four areas ranged from 7.8 ± 2.2 mg/kg to 17.3 ± 6.6 mg/kg.

CONCLUSION: Exogenous motilin in BMA can enhance the gastric motility in rats, which might rely on the amygdala-hypothalamus and brain stem-vagus pathway.

Key Words: Motilin; Amygdaloid; Gastric motility; C-Fos; Vagotomy; Rats

Han XH, Xu L, Tao SM. Effect of exogenous motilin in amygdaloid nucleus on gastric motility in rats and its underlying mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2159-2163

摘要

目的: 观察双侧基底内侧杏仁核(BMA)内注射胃动素对大鼠胃运动的影响, 并探讨胃动素作用的神经传导通路化测定等方法探讨胃动素作用的神经传导通路.

■背景资料
胃动素对胃肠运动的调控是目前研究的热点之一, 其外周促进胃肠运动的作用已经有大量报道. 近年来, 本实验室运用电生理、免疫组织化学等多种方法对胃动素的中枢作用做了系列研究. 杏仁核是参与胃肠道等内脏活动整合的重要的皮层下核团, 该部位存在大量的胃动素免疫阳性细胞及其受体, 提示杏仁核外源性胃动素可能参与对胃肠运动的调节.

■研发前沿
目前胃动素的中枢作用机制仍有很多尚未阐明的问题. 例如其中枢作用的部位, 核团间的相互关系, 信号传导通路等. 另外, 由于胃肠动力障碍是临床上最常见的疾病之一, 胃动素拟似剂的研究具有巨大的应用价值, 是目前胃动素研究领域的热点.

■**创新盘点**
本文主要对杏仁核内胃动素调节胃运动的神经传导通路进行研究.除常用的胃运动记录及迷走神经切断外, 还采用c-Fos免疫组化方法在细胞水平进行研究.

方法: 选用成年♂Wistar大鼠40只, 进行实验1: 双侧BMA注射胃动素(MT, 1 μg/侧)或生理盐水(NS, 0.5 μL/侧), 通过胃内球囊-压力换能器-二道生理记录仪观察胃内压(IGP)和胃运动频率(GMF)的改变(n = 14); 实验2: 膈下迷走神经切断后重复实验1(n = 12); 实验3: BMA注射MT或NS后60 min, 采用免疫荧光法观察下丘脑室旁核(PVN)c-Fos蛋白表达(n = 7); 实验4: 放射免疫法测定正常大鼠各脑区胃动素含量(n = 7).

结果: 双侧BMA注射胃动素后, 大鼠胃运动明显加强, 给药10, 15, 20, 25 min后, IGP变化百分率分别为 19.7%±6.5%(P = 0.023), 62.9%±4.7%(P<0.01), 45.1%±7.9%(P<0.01), 29.3%±10.3%(P = 0.029). GMF在给药后15和20 min明显增加, 其变化百分率分别为36.7%±8.5%(P<0.01)和19.5%±6.0%(P = 0.015). 双侧BMA注射NS后IGP和GMF均未见明显改变. 大鼠行膈下迷走神经切断后重复实验1, 可观察到胃动素促进胃运动的效应完全被阻断(P>0.05). 双侧BMA注射MT后, PVN内c-Fos阳性细胞数较NS对照组明显增多(53.4±8.9 *vs* 22.5±5.2, P<0.01), c-Fos蛋白表达增强. 正常大鼠下丘脑胃动素含量较高(74.3±19.6 mg/kg), 其他脑区内胃动素含量为7.8±2.2→17.3±6.6 mg/kg.

结论: 基底内侧杏仁核外源性胃动素可加强大鼠胃运动, 该效应可能通过杏仁核-下丘脑和脑干-迷走神经通路来完成.

关键词: 胃动素; 杏仁核; 胃运动; 迷走神经切断; c–Fos; 大鼠

韩晓华, 徐珞, 陶尚敏. 杏仁核外源性胃动素对大鼠胃运动的调节作用及机制. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2159–2163
httP://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2159.asp

0 引言

胃动素(MT)是由胃肠黏膜分泌的含22个氨基酸的多肽, 在外周可促进胃肠平滑肌收缩, 消化间期呈周期性释放, 诱发胃肠道移行性复合运动Ⅲ相的出现[1-2]. 除消化道外, MT免疫阳性细胞及其受体还存在于垂体、下丘脑、大脑皮层、小脑及松果体中[3-5]. 现已证实, 外源性胃动素在海马、下丘脑和延髓均明显促进大鼠胃运动[6-9]. 因此, MT也是参与胃肠运动调节的脑-肠肽之一. 杏仁核是边缘系统中重要的皮层下核团, 不仅参与情绪反应、学习记忆、生殖行为等复杂行为的整合, 对心血管、胃肠道和呼吸等内脏活动也具有明显的调节作用[10-11]. 采用放射自显影技术及免疫组化方法均发现, 杏仁核内存在大量的胃动素免疫阳性细胞及其受体[4,12]. 根据以往研究, 我们观察了基底内侧杏仁核(BMA)注射MT对大鼠胃运动的影响, 并采用膈下迷走神经切断、免疫组化等方法对胃动素的作用机制作进一步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 选用健康♂Wistar大鼠40只, 体质量200-250 g, 由青岛市药检所提供. MT和抗MT兔血清为美国Sigma公司产品; c-Fos多克隆抗体为美国Chemicon international公司产品; 异硫氰酸荧光素(FITC)交联的山羊抗兔IgG系美国Jackson ImmunoResearch公司产品; MT放射免疫试剂盒由上海第二军医大学提供. SN-3型脑立体定位仪系日本成茂科学仪器研究所产品; 3066-23型台式生理记录仪为成都精密仪器厂产品; 激光共聚焦显微镜系日本Olympus公司产品; Leica-1401型冰冻切片机系德国Leica公司产品.

1.2 方法 实验前所有大鼠禁食16 h, 随机分组进行实验. 实验1: 双侧BMA注射MT, (1 μg/侧, n = 7)或生理盐水(NS, 0.5 μL/侧, n = 7), 通过胃内球囊-压力换能器-二道生理记录仪观察胃内压(IGP)和胃运动频率(GMF)的改变; 实验2: 膈下迷走神经切断后重复实验1(n = 12); 实验3: BMA注射胃动素(n = 4)或生理盐水(n = 3)60 min后, 采用免疫荧光法观察下丘脑室旁核(PVN)c-Fos蛋白表达; 实验4: 放射免疫法测定正常大鼠各脑区(下丘脑、中脑、脑桥、延髓、垂体)胃动素含量(n = 7).

1.2.1 核团微量注射及胃运动观察 大鼠用200 g/L乌拉坦(1 g/kg, ip)麻醉后作头部正中切口, 参照Paxinos-Watson大鼠脑图谱[13]将自制不锈钢套管插入双侧BMA(前囟后2.8 mm, 旁开4.5 mm, 颅骨表面下9.0 mm), 以502胶和牙脱水固定套管. 用微量注射器向双侧BMA注射MT(1 μg/侧)或NS(0.5 μL/侧), 1 min内匀速注入. 实验结束后, 经心脏以生理盐水及甲醛灌流脑部, 快速断头取脑. 40 g/L福尔马林内浸泡2 d后作50 μm系列冠状切片, 观察脑片套管轨迹, 定位不准确者弃去. 头部手术后作上腹部正中切口, 沿胃大弯上部作长1 cm切口, 置水囊于胃窦部, 荷包缝合, 囊内注水3 mL维持基础压力. 水囊与压力换能器相连, 信号输入二道生理记录仪记录IGP和GMF变化[14].

取给药前单位时间(以每5 min作为一个时段)IGP或GMF作为基础值, 给药后单位时间的IGP或GMF作为效应值, 计算各自的变化百分率, 即单位时间内IGP或GMF变化百分率(%) = [(效应值-基础值)/基础值]×100%. 另外12只大鼠行膈下迷走神经切断术[15], 在靠近胃贲门部的食管周围分离膈下迷走神经的腹侧支和背侧支, 结扎剪断, 术后30 min分别向双侧BMA注射MT(1 μg/侧)或NS (0.5 μL/侧), 观察胃运动变化.

1.2.2 PVN c-Fos表达 双侧BMA分别注射MT (1 μg/侧)或NS (0.5 μL /侧)后60 min, 以生理盐水和40 g/L多聚甲醛经心脏灌注固定, 断头取脑, 后固定2 h, 梯度蔗糖浸泡过夜, 待组织块沉底后行脑冠状连续冰冻切片, 片厚为20 μm. 脑片在含有40 mL/L正常羊血清. 5 mL/L Triton X-100的0.1 mol/L PBS溶液中孵育2 h, 将兔抗c-Fos多克隆抗体(1∶200) 滴加到切片上, 4℃孵育40 h, 用0.01 mol/L PBS 漂洗3次, 每次5 min, 加入二抗羊抗兔FITC-IgG (1∶500), 避光孵育2 h后以0.01 mol/L PBS冲洗, 甘油/PBS封片剂封片, 激光共聚焦显微镜下观察c-Fos免疫阳性细胞(绿色荧光). 各组脑片均在同一水平每隔3张取1, 每组均取6张, 每张切片在阳性细胞最密集处取4个互不重叠的高倍视野(×400)计数, 取平均值作为该切片的阳性细胞数[16].

1.2.3 脑内胃动素的放射免疫测定 脑区内胃动素的提取和放免检测按说明书进行操作. 首先配制胃动素标准液(将胃动素标准品用PBS缓冲液稀释成每100 μL分别含胃动素2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 pg. 胃动素抗血清用PBS稀释至1∶8000. 正常大鼠迅速断头取脑, 将脑和垂体置于煮沸的生理盐水中分别煮5 min和3 min, 吸干分离脑区并称重, 加0.5 mol/L盐酸1.0 mL制成匀浆, 室温下静置100 min. 然后加1 mol/L氢氧化钠1 mL中和, 4000 r/min离心20 min, 取上清液测定. 测定程序: 各管加^{125}I-胃动素100 μL, 抗MT血清100 μL. 样品管加100 μL(下丘脑)或300 μL(其他脑区)上清液, 标准管加胃动素标准品100 μL, 最后以磷酸缓冲液补足至总反应体积500 μL; 4℃冰箱内孵育24 h; 各管加1∶3羊抗兔血清100 μL, 继续孵育24 h, 4000 r/min离心20 min, 弃上清液. 测沉淀物的cpm, 根据同批测定管的MT标准曲线, 求每克组织中胃动素含量.

统计学处理 数据均用均数±标准差(mean±SD)表示. 两样本均数的比较用t检验, $P<0.05$为差异有统计学意义.

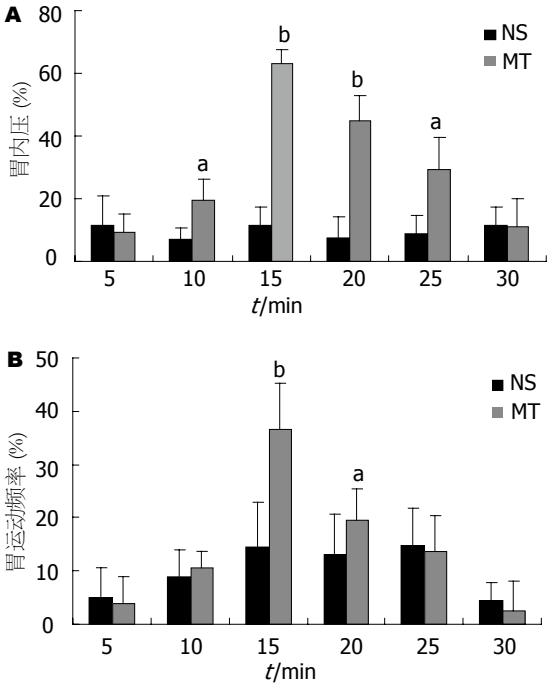


图 1 双侧BMA注射胃动素对胃内压和胃运动频率的影响. $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ *vs* 给药前基础值. NS: 生理盐水; MT: 胃动素.

■应用要点
本研究将为胃动素及其拟似剂对胃肠动力障碍性疾病的治疗提供有价值的实验依据.

2 结果

2.1 双侧BMA注射MT对胃运动的影响 双侧BMA注射MT 10 min后, 可观察到大鼠胃运动明显加强, 持续约15 min逐渐恢复. 给药后10, 15, 20, 25 min, IGP变化百分率分别为19.7%±6.5%(P = 0.023), 62.9%±4.7%(P<0.01), 45.1%±7.9%(P<0.01), 29.3%±10.3%(P = 0.029, 图1A); GMF在给药后15 min和20 min明显增加, 其变化百分率为36.7%±8.5%(P<0.01)和19.5%±6.0%(P = 0.015, 图1B). 双侧BMA注射NS后, IGP和GMF均未见明显改变(图1A-B).

2.2 膈下迷走神经切断对MT增强胃运动效应的影响 大鼠行膈下迷走神经切断后重复2.1, 可观察到MT的效应完全被阻断, 给药前后单位时间内IGP和GMF的变化百分率无明显差异(图2A-B).

2.3 PVN c-Fos蛋白表达 c-Fos蛋白免疫反应物质呈黄绿色颗粒, 存在于PVN神经元核中. 双侧BMA注射MT后, 可见PVN内c-Fos阳性细胞数较生理盐水对照组明显增多(53.4±8.9 *vs* 22.5±5.2, P<0.01), c-Fos蛋白表达增强(图3A-B).

2.4 不同脑区胃动素含量测定 正常大鼠各脑区内MT含量有很大差异, 其中以下丘脑MT含量最高(74.3±19.6 mg/kg), 中脑、脑桥、延髓及垂体

■同行评价
本文提出的胃动素通过杏仁核-下丘脑-脑干迷走神经通路调节胃运动的结论具有一定的创新性.

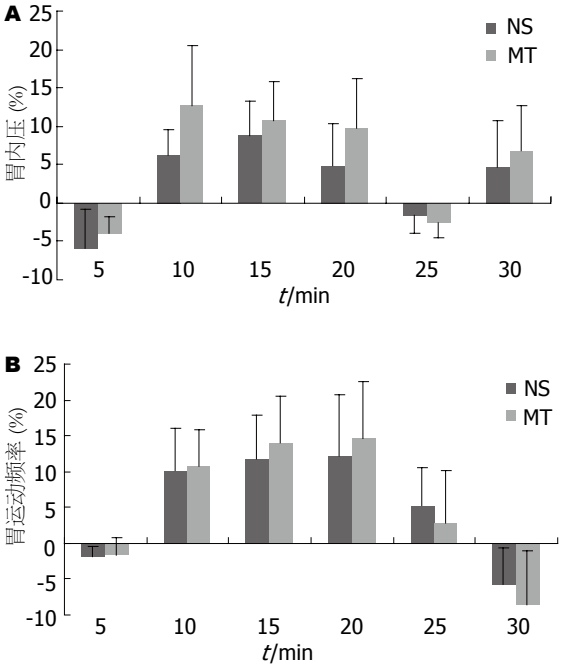


图 2 膈下迷走神经切断后BMA注射胃动素对胃内压和胃运动频率的影响. NS: 生理盐水; MT: 胃动素.

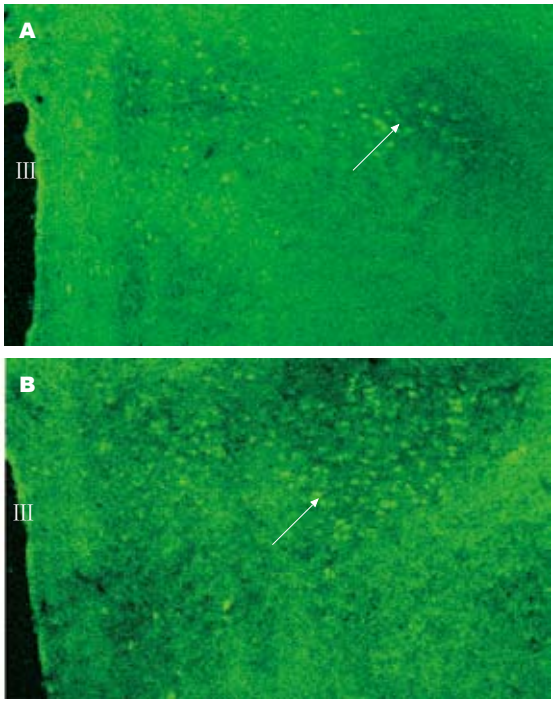


图 3 下丘脑室旁核冠状切片c-Fos蛋白表达(IF × 100). A: 注射生理盐水; B: 注射胃动素; Ⅲ: 第三脑室.

含量分别为8.7±2.3, 7.8±2.2, 17.3±6.6, 11.4±1.3 mg/kg.

3 讨论

近年来的研究表明, MT是体内调节胃肠运动的最重要的脑-肠肽之一, 其中枢作用部位包括下丘脑(外侧区、腹内侧核、室旁核)、海马、延髓迷走背核复合体等[6-9]. 脑内MT免疫阳性细胞及其受体分布非常广泛, 包括垂体、下丘脑、大脑皮层、小脑及松果体等处[3-5]. MT在大鼠脑内的分布和其他神经肽不同, 以小脑的MT浓度最高, 在下丘脑内侧基底部和正中隆起有中等浓度的MT分布[4]. 我们利用放射免疫法对各脑区MT含量进行测定, 发现下丘脑含量明显高于低位脑干, 该结果同以往的研究相吻合.

杏仁核是边缘系统中重要的皮层下核团, 由多个解剖和功能不同的核团组成, 主要分为皮质内侧核群与基底外侧核群, 以及前杏仁区、皮质移行区2个大过渡区. 杏仁核与脑干、丘脑、下丘脑及皮层感觉区等存在广泛的纤维联系[10,17-18], 使杏仁核涉及机体许多重要生理功能的调节机制, 包括对摄食行为[19-20]和胃肠运动的调节[11-12]. 运用放射性自显影及免疫组化等方法证明, 杏仁核也有丰富的MT免疫反应阳性细胞及其受体分布[4,12], 因此, 杏仁核很可能是MT调控胃肠运动的中枢部位之一. 我们向双侧BMA注射外源性胃动素后, 大鼠胃运动明显加强, 验证了以上的假说.

PVN是下丘脑的一个异质性核团, 既具有神经内分泌功能, 又参与对植物神经活动的调控, 是神经体液调节的关键性部位[21-23]. PVN接受来自海马、隔核、蓝斑及孤束核发出的内脏传入纤维, 发出的纤维至下丘脑的大部分核团, 上行纤维至隔核及杏仁核; 下行纤维至孤束核、疑核等[21,23], 因此他常被认为是内脏信息的重要转换站. 我们通过观察胃动素注射后PVN c-Fos蛋白的表达, 以及膈下迷走神经切断对胃动素效应的影响, 进一步探讨了胃动素作用可能的神经传导通路.

c-Fos原癌基因是即早基因家族中的一员, 可被多种刺激诱导而快速表达, 其表达产物c-Fos蛋白被迅速转运到胞核内, 与Jun蛋白结合形成Fos-Jun异二聚复合体, 发挥对靶基因的调控作用[24-26]. 检测神经细胞核内c-Fos蛋白表达可以从单细胞水平上观察神经元的活动情况, 从而得以追踪生理或药理刺激发挥作用的神经传导通路[26]. 我们发现, 杏仁核注射MT后可诱导PVN c-Fos蛋白的表达增强, 提示杏仁核和下丘脑室旁核之间具有密切的功能联系. Wu *et al*[16]的研究发现, 侧脑室注射MT后, PVN及视上核c-Fos表达增加, 但下丘脑其他区域及海马等c-Fos表达无明显变化. 该实验结果提示PVN可能是中枢胃动素调节胃肠运动的重要中

继站之一. 各级脑中枢对胃运动的调节是通过交感神经和迷走神经传出纤维实现的. 支配胃的交感神经对胃运动一般起抑制作用. 迷走神经节前纤维起源于迷走背核, 到达胃肌间的神经节换元后, 其节后纤维支配胃平滑肌, 大部分节后纤维末释放乙酰胆碱, 通过M受体加强胃运动[15]. 我们切断膈下迷走神经后再向杏仁核注射MT, MT的效应完全被阻断, 表明该效应需要迷走神经的参与.

总之, 杏仁核外源性MT可促进大鼠的胃运动. MT作用的可能机制是: 外源性MT首先与杏仁核中MT受体结合, 通过受体后的信号传导激活下丘脑及低位脑干, 最后经过迷走神经将神经冲动传至胃平滑肌, 调节大鼠胃运动.

4 参考文献

1 Tack J. Georges Brohee Prize 1994. Motilin and the enteric nervous system in the control of interdigestive and postprandial gastric motility. *Acta Gastroenterol Belg* 1995; 58: 21-30

2 Galligan JJ, Vanner S. Basic and clinical pharmacology of new motility promoting agents. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 643-653

3 Jacobowitz DM, O'Donohue TL, Chey WY, Chang TM. Mapping of motilin-immunoreactive neurons of the rat brain. *Peptides* 1981; 2: 479-487

4 Depoortere I, Van Assche G, Peeters TL. Distribution and subcellular localization of motilin binding sites in the rabbit brain. *Brain Res* 1997; 777: 103-109

5 Depoortere I. Motilin and motilin receptors: characterization and functional significance. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 2001; 63: 511-529

6 唐明, 张洪燕, 蒋正饶, 许珞, T.L. Peeters. 中枢外源性胃动素对大鼠脑干胃相关神经元电活动及胃运动的影响. 生理学报 2000; 52: 416-420

7 阎春玲, 王守彪, 蒋正饶, 唐明. 下丘脑室旁核胃动素对胃运动影响的探讨. 中国应用生理杂志 2002; 18: 317-320

8 张爱军, 唐明, 蒋正饶. 大鼠下丘脑外侧区微量注射胃动素对胃窦运动和迷走背核复合体神经元电活动的影响. 生理学报 2002; 54: 417-421

9 Guan Y, Tang M, Jiang Z, Peeters TL. Excitatory effects of motilin in the hippocampus on gastric motility in rats. *Brain Res* 2003; 984: 33-41

10 李涛, 李铨德. 杏仁核簇功能性解剖的研究现状. 立体定位和功能性神经外科杂志 2002; 15: 180-183

11 Lyubashina OA. Possible mechanisms of involvement of the amygdaloid complex in the control of gastric motor function. *Neurosci Behav Physiol* 2004; 34: 379-388

12 刘梅, 董蕾, 朱文艺. 大鼠杏仁核胃动素受体分布及作用研究. 第一军医大学学报 2005; 25: 1100-1104

13 Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press, 1982

14 孙建礼, 安书成. 弱激光对大鼠胃运动的调节及其作用途径分析. 动物学杂志 2000; 35: 12-16

15 彭岩, 林坤伟. 迷走背核微量注射P物质抑制大鼠胃肌电活动和胃运动. 生理学报 1999; 51: 557-563

16 Wu M, Tang M, Adriaensen D, Depoortere I, Peeters TL, Timmermans JP. Central, but not peripheral application of motilin increases c-Fos expression in hypothalamic nuclei in the rat brain. *Histochem Cell Biol* 2005; 123: 139-145

17 Moreno N, Gonzalez A. The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Prog Neurobiol* 2006; 78: 61-90

18 Akmaev IG, Kalimullina LB, Sharipova LA. The central nucleus of the amygdaloid body of the brain: cytoarchitectonics, neuronal organization, connections. *Neurosci Behav Physiol* 2004; 34: 603-610

19 Grundmann SJ, Pankey EA, Cook MM, Wood AL, Rollins BL, King BM. Combination unilateral amygdaloid and ventromedial hypothalamic lesions: evidence for a feeding pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R702-R707

20 Fekete E, Vigh J, Bagi EE, Lenard L. Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Res* 2002; 955: 55-63

21 Coote JH. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Exp Physiol* 2005; 90: 169-173

22 Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, Nussdorfer GG. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 46-57

23 杨权. 下丘脑−垂体−肾上腺皮质轴应激反应的中枢控制. 生理科学进展 2000; 31: 22-24

24 韩东日, 李光昭, 崔尚允. N-氨基−D−门冬氨基诱导大鼠下丘脑室上核、室旁核和弓状核内c-fos基因表达. 解剖学杂志 1997; 20:550-554

25 Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 2005; 208: 126-140

26 Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 1996; 50: 83-107

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2164-2168
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

Cyclin E表达失调导致人类结肠癌染色体不稳定

陈剑英, 黄文广, 陶凯雄, 王国斌

■背景资料
人类结直肠癌是常见的恶性肿瘤, 其发病率在逐年增加. 研究显示85%的结直肠癌存在异常的染色体数目, 即非整倍体的染色体数目(aneuploidy), 而对形成这种染色体不稳定(CIN)的分子机制尚不清楚. 在人类仅有数种相关的癌基因和/或抑癌基因被证实与CIN相关.

陈剑英, 黄文广, 陶凯雄, 王国斌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
陈剑英, 2003年华中科技大学同济医学院博士研究生毕业, 讲师, 主要从事肿瘤外科的基础研究.
国家高科技研究发展计划, No. 2001AA218051
通讯作者: 陈剑英, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科.
unionchen@yahoo.com.cn.
电话: 027-85726494 传真: 027-85756343
收稿日期: 2006-02-07 接受日期: 2006-06-08

Deregulation of Cyclin E induces chromosomal instability in human colon cancer

Jian-Ying Chen, Wen-Guang Huang, Kai-Xiong Tao, Guo-Bin Wang

Jian-Ying Chen, Wen-Guang Huang, Kai-Xiong Tao, Guo-Bin Wang, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China, No. 2001AA218051
Correspondence to: Dr. Jian-Ying Chen, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. unionchen@yahoo.com.cn
Received: 2006-02-07 Accepted: 2006-06-08

Abstract

AIM: To study the influence of stably inducible expression of Cyclin E on the chromosomal instability in human colon cancer cell line DLD1.

METHODS: Tetracycline-responsive gene-inducible cell line DLD1tTA-cyclin E was generated. Western blot was used to examine the induction of Cyclin E expression upon removal of doxycycline. 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was performed to detect the percentage of cells with chromosomal instability 1, 3, 5, 7 and 14 d after the induction of Cyclin E expression.

RESULTS: Western blot showed that the peak of Cyclin E expression appeared 96 h after induction. The percentage of cells with chromosomal instability in tet-off DLD1tTA-Cyclin E cells ranged from 0.97% to 1.22% (t = 3.81, P > 0.01). However, the percentages of cells with chromosomal instability were 2.41%, 3.63%, 3.92%, 6.17% and 8.34%, respectively, 1, 3, 5, 7 and 14 d after the induction of Cyclin E expression (t = 4.77, P < 0.01).

CONCLUSION: Deregulation of cyclin E can induce the formation of aneuploidy in human colon cancer cell line DLD1, and it also plays an important role in the pathway of chromosomal instability.

Key Words: Cyclin E; Human colon cancer; Chromosomal instability

Chen JY, Huang WG, Tao KX, Wang GB. Deregulation of cyclin E induces chromosomal instability in human colon cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2164-2168

摘要

目的: 研究Cyclin E的表达失调对人类结肠癌细胞系DLD1染色体稳定性的影响.

方法: 建立四环素调控的Cyclin E稳定表达的细胞系DLD1tTA-Cyclin E, Western blot 检测Cyclin E表达. Cyclin E持续稳定表达 1, 3, 5, 7和14 d后, 对细胞进行DAPI染色, 在荧光显微镜下计数CIN细胞的百分比.

结果: Western blot显示, Cyclin E表达在96 h后达最高峰. Cyclin E表达关闭的DLD1细胞中, CIN细胞的百分比波动在0.97%-1.22%之间(t = 3.81, P>0.01); 而Cyclin E持续表达1, 3, 5, 7和14 d后的DLD1细胞中, CIN细胞的百分比分别为2.41%, 3.63%, 3.92%, 6.17%和8.34%(t = 4.77, P<0.01).

结论: Cyclin E的表达失调可导致DLD1结肠癌细胞非整倍体数染色体的形成, 也是造成结肠癌CIN的重要因素.

关键词: Cyclin E; 人类结肠癌; CIN

陈剑英, 黄文广, 陶凯雄, 王国斌. Cyclin E表达失调导致人类结

肠癌CIN. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2164-2168
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2164.asp

0 引言

结直肠癌是全球第三大癌症, 也是导致死亡的第四大恶性疾病. WHO统计, 结直肠癌每年新增病例约945 000人, 死亡病例约49 200人, 其5 a总体生存率在发达国家可超过60%, 但在不发达国家仍低于40%[1-2]. 虽然结肠癌的发病率在逐年增加, 但其早期诊断仍主要依赖结肠镜检查的普及和遗传突变筛查的开展[3-5]. 由于大部分实体肿瘤的发病都与遗传不稳定(genetic instability)有关, 而导致这些遗传不稳定的基因各不相同[6-7], 因此, 深入研究人类结直肠癌发病的分子机制并提高患者术后药物治疗的敏感性具有重大的临床意义和社会价值[8-9].

1 材料和方法

1.1 材料 DLD1tTA细胞系培养于含100 mL/L胎牛血清的McCoy'5A(Gibco公司)培养基中. 细胞转染使用Lipofectamine 2000试剂盒(Invitrogen公司). 将野生型Cyclin E cDNA克隆到pBI载体中四环素反应启动子下游的多克隆位点处, 产生四环素诱导Cyclin E表达的载体pBI-cyclin E.

1.2 方法 建立四环素调控的稳定表达cyclin E的细胞系DLD1tTA-Cyclin E: 稳定表达四环素反应元件tTA(tetracycline-controlled transactivator, 四环素控制的反式作用元件)的人类结肠癌细胞系DLD1tTA(Tet-Off)购自BD公司, 稳定细胞克隆的筛选标记为500 mg/L G418(Invitrogen公司). 野生型Cyclin E的表达载体pBI-cyclin E和含hygromycin B(Invitrogen公司)筛选标记的表达载体pTK-Hyg按10∶1的比例共转染DLD1tTA细胞系, 转染24 h后, 用250 mg/L hygromycin B, 500 mg/L G418和0.5 mg/L doxycycline(Sigma公司)筛选2-3 wk, 其间保持细胞密度在10%-25%左右, 每隔2-3 d更换培养基和筛选抗生素.

1.2.1 Western blot 培养细胞用预冷的PBS溶液漂洗2次, Laemmli缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 100 mL/L甘油, 10 g/L SDS, 50 g/L 2-巯基乙醇, 0.25 g/L溴酚蓝)裂解细胞, 蛋白质定量后每份样品取40 μg总蛋白于100 g/L SDS-PAGE凝胶中分离, 转移到PVDF膜上进行免疫杂交. 一抗为小鼠Cyclin E和兔β-Actin多克隆抗体, 二抗为相应的HRP标记的抗鼠和抗兔IgG抗体, ECL发光显影(Santa Cruz公司).

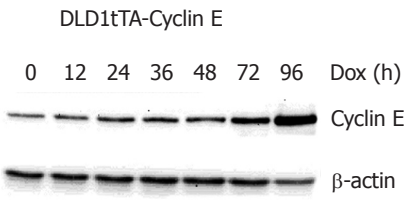


图 1 四环素调控的cyclin E稳定诱导表达.

1.2.2 细胞核DAPI染色 待染色的细胞培养于特殊载玻片上, 细胞完全贴壁后, PBS溶液漂洗细胞3次, 40 g/L甲醛在室温下固定细胞5-20 min, PBS溶液洗去固定液, DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride)染液于37℃避光染色30 min后, PBS溶液漂洗细胞3次, 用含DAPCO(1, 4-diazabicyclo-2(2, 2, 2) octane)的盖玻片覆盖细胞, 在荧光显微镜下观察染成蓝色的正常和异常的细胞核形态.

1.2.3 CIN细胞计数 将稳定诱导Cyclin E表达的细胞系DLD1tTA-Cyclin E(Tet-Off)接种于10个10 cm细胞培养皿中, 其中5个培养皿持续使用0.5 mg/L四环素以关闭Cyclin E的表达, 另外5个培养皿在细胞贴壁后充分洗脱四环素以开放Cyclin E的表达. 分别于1, 3, 5, 7和14 d后平行收集Cyclin E表达前后的细胞进行DAPI染色, 在63倍油镜下, 随机连续计数2000个细胞, 计算其中CIN细胞的百分比, 每组细胞按双盲法计数3次, 计算微核(micronuclei)产生的平均百分比.

统计学处理 用SPSS 10.0统计软件进行数据的处理, 组间比较采用t检验.

2 结果

2.1 Cyclin E的稳定诱导表达 将hygromycin B和G418耐受细胞克隆种植于7-8个10 cm细胞培养皿中, 用HBSS液充分漂洗3-5次, 以充分洗脱四环素再分别于0, 12, 24, 36, 48, 72和96 h后收集细胞总蛋白, 用Western blot检测耐受细胞克隆中Cyclin E的稳定诱导表达. 结果显示, 自洗脱四环素后12 h开始, Cyclin E的表达逐渐增加, 在96 h时达到最高峰. β-actin蛋白作为加样对照(图1).

2.2 CIN的细胞核形态 CIN的细胞核是指在细胞不正常分裂后产生的游离于原细胞核外周的直径不超过原细胞核1/3的圆形的、含染色体的细胞核部分, 又称为微核[10-13]. 用DAPI染色可以使细胞核内染色体在荧光显微镜下发出蓝色荧光, 因而可以显示细胞核的形态(图2). 图中显示了CIN的细胞中游离于原细胞核之外的染色体成分(箭头所指).

■应用要点
本研究初步发现细胞周期调控蛋白cyclin E的表达失调与人类结直肠癌CIN相关, 这对深入研究人类结直肠癌发病的分子机制并提高患者术后药物治疗的敏感性具有重要的临床意义和社会价值.

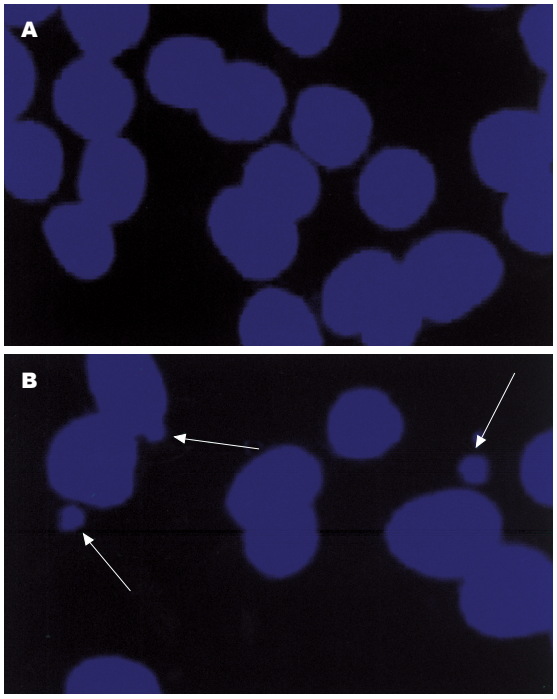


图 2 染色体不稳定的细胞核形态. A: 染色体稳定细胞核对照; B: 染色体不稳定细胞核形态(箭头所指).

2.3 Cyclin E诱导表达前后CIN细胞百分比 四环素关闭Cyclin E表达的DLD1细胞中, CIN细胞的百分比波动在0.97%-1.22%之间(P>0.01); 而洗脱四环素诱导Cyclin E表达1, 3, 5, 7和14 d后, CIN细胞的百分比分别为2.41%, 3.63%, 3.92%, 6.17%和8.34%, 即Cyclin E的过表达增加了CIN的细胞百分比, 并随着细胞的有丝分裂的累积, 这些CIN的细胞总数和百分数也将增加更明显. 统计学分析组间差异有显著性(P<0.01).

3 讨论

多年来, 研究者认为癌症的主要特征是遗传不稳定, 而这种遗传不稳定表现在2个不同水平: 一是表现在核苷酸水平的遗传不稳定, 即出现一些核苷酸的碱基替换、缺失和插入[14-15]; 二是表现在染色体水平的遗传不稳定, 即出现整个染色体或染色体的大部分缺失和/或获得, 这也是绝大部分实体肿瘤的特征[16-17]. 发生在调节细胞生长、分化、代谢和血管生成的关键基因(如癌基因和抑癌基因)的遗传不稳定, 将改变这些基因的表达和转录, 促使细胞具有选择生长的优势, 因而诱发肿瘤的生成和进展[18-19].

人类结直肠癌也具有遗传不稳定的基本特征[20]. 研究发现, 大约15%的结直肠癌表现为核苷酸水平的遗传不稳定, 即因错配修复基因hMLH1和/或hMSH2的失活导致的错配

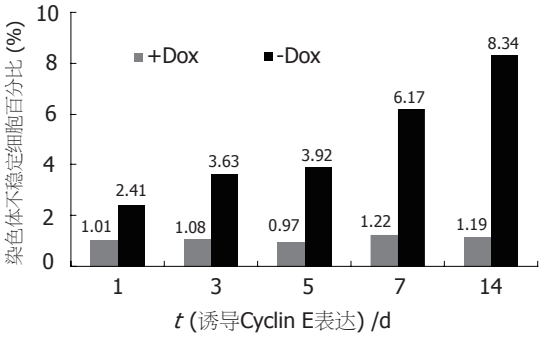


图 3 Cyclin E诱导表达前后染色体不稳定细胞核计数.

修复缺陷(mismatch repair deficiency, MMR). MMR功能失活使细胞基因组易感于突变, 特别是那些简单重复序列, 又称为微卫星不稳定(microsatellite instability, MIN或MSI)[21-22]. 具有MIN的结直肠癌细胞在核苷酸水平的突变率高于正常细胞的100-1000倍, 尽管如此, MIN结直肠癌细胞的染色体数目仍是二倍体(diploidy)或接近二倍体. 然而, 85%的结直肠癌和其他大部分的实体肿瘤并不表现为MIN, 而表现为异常的染色体数目, 即非整倍体的染色体数目(aneuploidy), 体外培养这些细胞的单细胞克隆时发现, 这些细胞的染色体丢失和/或获得的机率极高, 并导致细胞与细胞之间染色体核型的巨大差异, 这种类型的遗传不稳定被称为CIN(chromosomal instability, CIN)[23-25]. 与MIN不同的是, CIN结直肠癌细胞通常不存在核苷酸水平的遗传不稳定, 因此, 理论上认为MIN和CIN不可能在结直肠癌中同时存在, 他们是导致结直肠癌发生的2个独立机制, 而CIN是大多数散发型实体肿瘤发生的优势机制[26]. 目前的研究认为, CIN不是指染色体的部分或全部丢失和/或获得的状态或肿瘤细胞中非整倍体的染色体数目, 而是指染色体的部分或全部丢失和/或获得的机率. 研究显示, CIN细胞在每次细胞分裂时, 每条染色体有1%的机率出现CIN, 而MIN细胞的机率极低甚至检测不到. 同时CIN的存在促使细胞迅速获得导致肿瘤形成的关键遗传改变, 如肿瘤抑制基因的杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)和/或癌基因的有效扩增[27]. 在酵母细胞的研究中已经发现, 有100多种基因的突变可以导致CIN, 这些基因主要涉及染色体代谢、纺锤体形成、细胞周期调节和有丝分裂控制有关, 但在人类肿瘤细胞只有少数基因如hBUB1, BRCA1和hMAD2被证实与CIN有关[28].

人类Cyclin E蛋白是1991年后发现的与细胞周期密切相关的蛋白, 他的表达在细胞周期不同时相差异很大, 在G1晚期和临近S期表达达到高峰, 当细胞进入分裂期后, Cyclin E蛋白被迅速降解, 因此Cyclin E的关键功能是调节细胞周期从G1期进入S期, 即DNA合成期[29]. 实验证实, Cyclin E的表达异常与多种恶性肿瘤的形成相关, 在这些恶性肿瘤中Cyclin E基因明显扩增并使Cyclin E蛋白在细胞周期的各个时相都高表达[30-31]; 在转基因鼠的乳腺组织中过表达Cyclin E可明显导致相关组织的增生和肿瘤形成[32].

本实验研究Cyclin E蛋白的过表达是否导致结肠癌细胞CIN的发生. DLD1细胞系是具有二倍体染色体数目的、染色体稳定的人类结肠癌细胞系, 我们用四环素控制的稳定诱导Cyclin E表达的系统, 在DLD1细胞中稳定过表达Cyclin E蛋白2 wk, 结果发现Cyclin E蛋白的稳定过表达可以导致DLD1细胞异常染色体的出现(即微核的形成), 并且随着表达时间的延长, 发生CIN细胞的百分比明显增加. 由于这种CIN细胞必然存在调节细胞生长和分化关键基因的缺失或功能改变, 因而可以促使细胞的恶性转化. 我们认为Cyclin E可以导致结肠癌细胞的CIN, 并维持这些CIN的细胞克隆能够随着细胞分裂周期的增加而增加. 由于Cyclin E是控制细胞周期从G1期向S期转移的关键蛋白, 在多种人类肿瘤中发现有Cyclin E的高表达, 因此一些研究认为, Cyclin E是与细胞恶性增生相关的癌基因. 但是, 在人类结直肠癌中, 没有发现Cyclin E基因拷贝数的增加, 也只有约30%的患者存在Cyclin E蛋白的表达或活性增加, 但Cyclin E蛋白表达的增加与患者的肿瘤分级和预后无关. 我们推论Cyclin E虽然不能评估结直肠癌的预后, 但他可能是结直肠癌发生早期事件中的重要因素, 他是人类结直肠癌CIN形成的关键基因之一[33].

4 参考文献

1 Kashida H, Kudo SE. Early colorectal cancer: concept, diagnosis, and management. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 1-8

2 Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 663-671

3 Hung KE, Chung DC. Colorectal cancer screening: today and tomorrow. *South Med J* 2006; 99: 240-246; quiz 247-249

4 Kiesslich R, Hoffman A, Neurath MF. Colonoscopy, tumors, and inflammatory bowel disease - new diagnostic methods. *Endoscopy* 2006; 38: 5-10

5 Harford WV. Colorectal cancer screening and surveillance. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15: 1-20

6 Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB. Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2006; 20: 269-276; discussion 285-286, 288-289

7 Vanhoefer U. Molecular mechanisms and targeting of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: 7-10

8 Anthony T. Colorectal cancer follow-up in 2005. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15: 175-193

9 Kehoe J, Khatri VP. Staging and prognosis of colon cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15: 129-146

10 Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 2004; 149: 309-334

11 Hagmar L, Stromberg U, Tinnerberg H, Mikoczy Z. Epidemiological evaluation of cytogenetic biomarkers as potential surrogate end-points for cancer. *IARC Sci Publ* 2004; : 207-215

12 Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat Res* 2003; 544: 243-254

13 Hall EJ, Hei TK. Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation. *Oncogene* 2003; 22: 7034-7042

14 Pihan GA, Doxsey SJ. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 289-302

15 Raptis S, Bapat B. Genetic instability in human tumors. *EXS* 2006; : 303-320

16 Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 695-701

17 Gagos S, Irminger-Finger I. Chromosome instability in neoplasia: chaotic roots to continuous growth. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1014-1033

18 Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 773-785

19 Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 2004; 23: 2016-2027

20 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386: 623-627

21 Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 395-406

22 Oda S, Maehara Y, Ikeda Y, Oki E, Egashira A, Okamura Y, Takahashi I, Kakeji Y, Sumiyoshi Y, Miyashita K, Yamada Y, Zhao Y, Hattori H, Taguchi K, Ikeuchi T, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Karran P, Yoshida MA. Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1628-1636

23 Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13692-13697

24 Rajagopalan H, Lengauer C. CIN-ful cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54 Suppl 1: S65-S68

25 Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature* 2004; 432: 338-341

26 Dunican DS, McWilliam P, Tighe O, Parle-McDermott A, Croke DT. Gene expression

differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 2002; 21: 3253-3257
27 Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004; 428: 77-81
28 Burds AA, Lutum AS, Sorger PK. Generating chromosome instability through the simultaneous deletion of Mad2 and p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11296-11301
29 Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005; 24: 2776-2786
30 Hubalek MM, Widschwendter A, Erdel M, Gschwendtner A, Fiegl HM, Muller HM, Goebel G, Mueller-Holzner E, Marth C, Spruck CH, Reed SI, Widschwendter M. Cyclin E dysregulation and chromosomal instability in endometrial cancer. *Oncogene* 2004; 23: 4187-4192
31 Lindahl T, Landberg G, Ahlgren J, Nordgren H, Norberg T, Klaar S, Holmberg L, Bergh J. Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 375-380
32 Loeb KR, Kostner H, Firpo E, Norwood T, D Tsuchiya K, Clurman BE, Roberts JM. A mouse model for cyclin E-dependent genetic instability and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2005; 8: 35-47
33 Simone C, Resta N, Bagella L, Giordano A, Guanti G. Cyclin E and chromosome instability in colorectal cancer cell lines. *Mol Pathol* 2002; 55: 200-203

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年第十二届华北区消化学术会议征文通知

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

1 征文内容

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

2 征稿要求

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

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

会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室.

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2169-2173
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

银杏苦内酯B对重症急性胰腺炎大鼠血浆细胞因子的影响

邸 瑶, 夏时海, 佟长青

邸瑶, 佟长青, 武警医学院生理教研室 天津市 300162
夏时海, 武警医学院附属医院消化内科胰腺中心 天津市 300162
邸瑶, 2003年河北医科大学硕士生, 助教, 主要从事人体生理学研究和教学.
国家自然科学基金资助项目, No. 30300465
武警医学院科研基金, No. WY2002-19
通讯作者: 夏时海, 300162, 天津市河东区成林路, 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: 2006-04-24 接受日期: 2006-05-11

Effect of Ginkgolide B on plasma levels of cytokines in severe acute pancreatitis in rats

Yao Di, Shi-Hai Xia, Chang-Qing Tong

Yao Di, Chang-Qing Tong, Department of Physiology, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Shi-Hai Xia, Center of Pancreas, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chinese People's Armed Police Force Medical College, Tianjin 300162, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30300465, and Scientific Research Foun from Medical College of Chinese People's Armed Police Force, No. WY2002-19
Correspondence to: Dr. Shi-Hai Xia, Center of Pancreas, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chinese People's Armed Police Force Medical College, Chenglin Road, Hedong District, Tianjin 300162, China. xshhcx@sina.com
Received: 2006-04-24 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To observe the level changes of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), platelet activating factor (PAF), interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12) and soluble TNF receptors (sTNFR) in rats with severe acute pancreatitis (SAP) and the influences of Ginkgolide B (BN52021) on the changes.

METHODS: Male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: SAP model group (SAP, n = 15), BN52021 treatment group (BN, n = 15) and negative control group (NC, n = 15). SAP was induced by retrograde infusion of 50 g/L sodium taurocholate into the pancreatic duct of rats. Sham operation was performed in the rats of NC group, while the rats in SAP and NC groups received the femoral vein injection of normal saline (5 mL/kg) 15 min after induction of SAP. Moreover, the rats in BN group received BN52021 injection instead of normal saline. After operation, the animals were sacrificed at 1st, 6th and 12th h for plasma cytokines detection with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The levels of plasma TNF-α and PAF were significantly higher in SAP group than those in NC group (746.2 ± 374.1 ng/L *vs* 385.1 ± 86.3 ng/L, P<0.05; 82.5 ± 35.4 ng/L *vs* 1.1 ± 1.9 ng/L, P<0.05), but they were significantly decreased in BN group (503.7 ± 177.9, 39.9 ± 29.9 ng/L)(both P<0.05). The levels of plasma sTNFR were 50.0 ± 21.0, 488.7 ± 363.8, and 883.4 ± 552.5 ng/L in NC, SAP and BN group, respectively, and there were significant differences among them (P<0.05). Plasma IL-12 level was markedly increased in SAP group as compared with that in NC group (97.1 ± 55.9 ng/L *vs* 20.4 ± 19.4 ng/L, P<0.05), while it was further increased at the 1st h in BN group as compared with that in SAP group (133.5 ± 33.4 ng/L *vs* 55.9 ± 14.7 ng/L, P<0.05). The level of IL-10 was not significant different among the three groups (P > 0.05).

CONCLUSION: The plasma levels of pro- and anti-cytokines are increased in SAP rats, and BN52021 can inhibit the production of pro-cytokines and promote the secretion of anti-cytokines such as IL-12 and sTNFR to some extent.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Cytokine; Ginkgolide B

Di Y, Xia SH, Tong CQ. Effect of Ginkgolide B on plasma levels of cytokines in severe acute pancreatitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2169-2173

摘要

目的: 观察重症急性胰腺炎(SAP)大鼠血浆中TNF-α, 血小板活化因子(PAF), IL-10, IL-12, sTNFR的水平变化及其银杏苦内酯

■**背景资料**
银杏苦内酯B对急性胰腺炎具有显著疗效, 但其作用机制尚缺乏深入研究. 细胞因子是SAP局部和全身炎症反应中的关键因素, 是导致胰腺持续性坏死的重要机制. 对于SAP发病机制的研究是目前胰腺研究的热点.

■应用要点
本文为中药单体BN52021治疗SAP提供了重要的实验依据, 为我国国宝中药的开发做出了一定工作.

B(BN52021)的影响.

方法: 实验选用Wistar♂大鼠45只, 随机分成SAP模型组(SAP, n = 15), BN52021治疗组(BN, n = 15)和阴性对照组(NC, n = 15). 前两组以50 g/L牛磺胆酸钠逆行注入主胰管制成SAP模型, NC组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次关腹. 制模15 min后, SAP组经股静脉以5 mL/mg注射生理盐水; BN组以BN52021(5 mg/kg)代替生理盐水静注. 制模后分别于1, 6, 12 h采血, 应用ELISA技术测定血浆TNF-α, PAF, IL-10, IL-12和sTNFR水平.

结果: SAP组, NC组和BN组大鼠血浆TNF-α和PAF水平相比, 具有显著性差异, SAP组(746.2±374.1, 82.5±35.4 ng/L)显著高于NC组(385.1±86.3, 1.1±1.9 ng/L), BN组(503.7±177.9, 39.9±29.9 ng/L)显著低于SAP组(P<0.05). 血浆sTNFR水平三组相比存在明显差异, SAP组(488.7±363.8 ng/L)显著高于NC组(50.0±21.0 ng/L), BN组(883.4±552.5 ng/L)显著高于SAP组(488.7±363.8 ng/L)(P<0.05). 血浆IL-12三组相比存在明显差异, SAP组(97.1±55.9 ng/L)显著高于NC组(20.4±19.4 ng/L), BN组在1 h时相点(133.5±33.4 ng/L)显著高于SAP组(55.9±14.7 ng/L)(P<0.05). 血浆IL-10三组相比不存在明显差异(P>0.05).

结论: SAP大鼠促炎细胞因子和抗炎细胞因子均显著升高. BN52021能降低血浆促炎因子含量, 提高IL-12和细胞因子拮抗剂sTNFR含量.

关键词: 胰腺炎; 细胞因子; 银杏苦内酯B

邱瑶, 夏时海, 佟长青, 银杏苦内酯B对重症急性胰腺炎大鼠血浆细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2169-2173
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2169.asp

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)为胰酶消化自身胰腺及其周围组织所引起的化学性炎症. 重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)占AP病例的10%-15%, 病因复杂, 病情危重, 并发症多, 预后不良. 大量实验证明, 细胞因子是SAP局部和全身炎症反应中的关键因素, 是导致胰腺持续性坏死的一大重要机制. 细胞因子与炎性介质, 血管活性物质形成恶性循环, 产生一系列连锁反应和放大效应, 加剧对全身细胞的损伤, 导致全身炎症反应综合症(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 进一步发展成多器官功能障碍综合症(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 多器官衰竭(multiple organ failure, MOF), 甚至死亡. 银杏苦内酯B(Ginkgolide B, 代号BN52021)为银杏叶提取物中重要的有效成分之一, 具有抗炎、抗休克、抗血栓形成等多种药理作用. BN52021在治疗AP的实验中也表现出显著疗效, 但其作用机制尚缺乏深入研究. 本实验旨在通过制备SAP大鼠模型, 以BN52021进行治疗, 观察大鼠血浆中肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α), 血小板活化因子(platelet activating factor, PAF), 白介素-10(interleukin-10, IL-10), 白介素12(interleukin-12, IL-12), 可溶性肿瘤坏死因子受体(soluble TNF receptors, sTNFR)的表达水平变化, 从炎症介质水平探讨BN52021对SAP的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂Wistar大鼠45只, 质量200±10 g, 购自解放军军事医学科学院实验动物中心. 随机分为SAP模型组(SAP, n = 15), BN52021治疗组(BN, n = 15)和阴性对照组(NC, n = 15)共三组. 动物模型的制作参照Aho *et al*[1]方法制作, Wistar大鼠称质量, 标记, 术前24 h禁食, 自由饮水. 4 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定后, 备皮, 消毒, 铺无菌巾, 于上腹正中做2 cm切口进入腹腔, 找到大鼠的十二指肠和胆胰管后, 用无创血管夹夹住胆胰管肝端, 用钝头针头经十二指肠浆肌层行胆胰管逆行穿刺术, 穿刺成功后, 微量注射器逆行胰胆管内注射50 g/L牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g), 推注速度0.20 mL/min. 推药后用无创血管夹夹住胰胆管入十二指肠处, 观察10 min, 去除血管夹, 确认腹腔内无活动性出血后, 两层关腹并用无菌纱布覆盖伤口, NC组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次关腹. 术后15 min NC组和SAP组股静脉注射生理盐水(5 mL/g); BN组股静脉注射BN52021(5 mg/kg).

1.2 方法 SAP, BN, NC三组每组内分别随机分为1 h, 6 h, 12 h各小组, 每小组5只大鼠, 并分别于实验结束后1 h, 6 h, 12 h经右心房直接穿刺取血, 收集血浆, 并贮存于-20℃冰箱内待测. 全自动生化仪检测血浆淀粉酶(试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司). 用ELISA方法对大鼠进行血浆TNF-α, PAF, IL-10, IL-12, sTNFR测定(操作按试剂盒说明进行, 试剂盒产自美国Rapid Bio

表 1 各组不同时相点胰腺组织病理评分值 (mean ± SD)

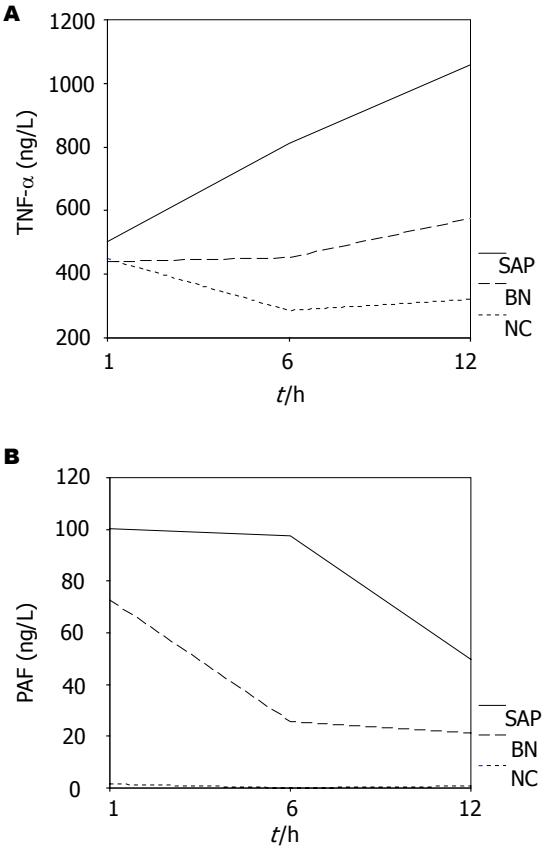
组别	1 h	6 h	12 h
SAP组	4.82 ± 0.35[a]	9.15 ± 0.55[a]	10.10 ± 0.65[a]
BN组	5.55 ± 0.30[a]	5.55 ± 0.36[ac]	6.72 ± 0.30[ac]
NC组	0.12 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.06

[a]P<0.05 *vs* NC组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.

表 2 血浆淀粉酶的组间比较 (nkat/L, n = 15, mean ± SD)

分组	1 h	6 h	12 h
SAP	42683.5 ± 2025.4[a]	82011.4 ± 2327.1[a]	58116.6 ± 3030.6[a]
BN	36915.7 ± 1818.7[ac]	63090.9 ± 2068.8[ac]	57578.2 ± 4402.6[a]
NC	28947.5 ± 9546.9	30599.5 ± 10 222.0	31094.6 ± 7061.4

[a]P<0.05 *vs* NC组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.



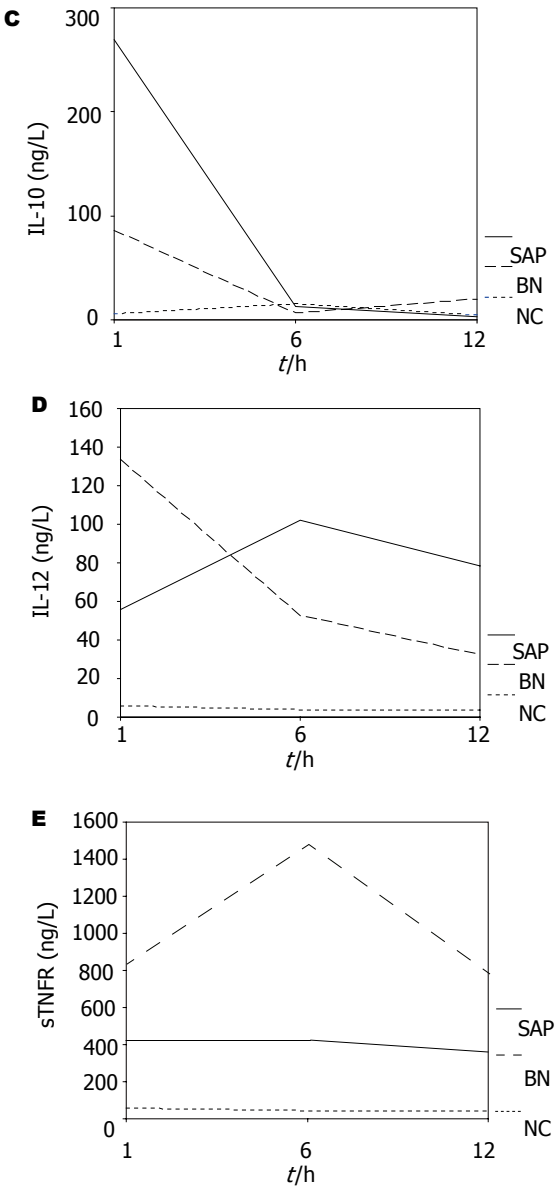


图 1 SAP大鼠血浆TNF-α, PAF, IL-10, IL-12, sTNFR变化及其BN52021的影响. A: TNF-α; B: PAF; C: IL-10; D: IL-12; E: sTNFR.

Lab公司). 采用双抗体夹心法测定, A值450 nm, 通过测定标准品绘制标准曲线, 以样品A值在标准曲线上查到样品对应浓度. 采血后处死大鼠, 取部分胰腺组织, 40 g/L中性缓冲甲醛固定, 石蜡包埋切片后HE染色制片, 观察胰腺组织病理学变化.

统计学处理 实验数据用mean±SD表示, 应用SPSS 11.5进行统计学分析, 采用Kolmogorov-Smirnov进行正态性检验, 采用单因素方差分析, 方差齐性检验, 用LSD检验进行组间两两比较, 以P<0. 05作为显著性检验的界值.

2 结果

2.1 大鼠SAP模型血浆淀粉酶升高(表1-2). SAP组大鼠胰腺腺泡片状出血, 坏死, 正常胰腺小叶消失, 结构破坏, 可见散在的空泡变性的腺泡细胞, 部分泡核溶解消失, 间质血管扩张充盈, 坏死胰腺组织周围可见大量中性白细胞浸润; 而BN组较SAP组的组织结构破坏明显减轻, NC组胰腺腺泡结构大致正常.

2.2 SAP大鼠血浆细胞因子的变化(图A-E, 表3) 大鼠血浆TNF-α和PAF水平在三组之间存在显著性差异, SAP组显著高于NC组, BN组显著低于SAP组(P<0.05). 血浆sTNFR水平三组相比存

■同行评价

本文主要通过ELISA技术检测SAP大鼠血浆细胞因子TNF-α,PAF, IL-10, IL-12, sTNFR含量的动态变化, 并分析了BN52021对SAP的影响作用, 结果显示BN52021能降低血浆促炎因子含量, 在SAP早期降低抗炎因子IL-10含量, 提高IL-12和细胞因子拮抗剂sTNF R含量. 文章选题合适,结果明确, 有一定的科学性、新颖性.

表 3 BN52021对SAP大鼠血浆细胞因子的影响 (ng/L, n = 15, mean ± SD)

分组	TNF-α	PAF	IL-10	IL-12	sTNFR
SAP组	746.2 ± 374.1[ac]	82.5 ± 35.4[ac]	117.8 ± 248.3	97.1 ± 55.9[ac]	488.7 ± 363.8[ac]
BN组	503.7 ± 177.9	39.9 ± 29.9[a]	37.6 ± 60.7	54.4 ± 50.9	883.4 ± 552.5[a]
NC组	385.1 ± 86.3	1.1 ± 1.9	0.6 ± 1.2	20.4 ± 19.4	50.0 ± 21.0

[a]P< 0.05 *vs* NC组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.

在明显差异, SAP组显著高于NC组, BN组显著高于SAP组(P<0.05). 血浆IL-12三组相比存在明显差异, SAP组显著高于NC组, BN组在1 h时相点显著高于SAP组(P<0.05). 血浆IL-10三组相比不存在明显差异(P>0.05).

3 讨论

TNF-α是炎症反应的启动介质, 介导胰腺局部和全身炎症反应. 其作用机制主要有[1-4]: 参与IL-1β, IL-6的生成, 促进TNF-α自身生成; 增加毛细血管通透性, 导致局部缺血, 形成血栓, 损伤微循环; 激活炎症细胞, 上调黏附分子表达, 增强NO及氧自由基生成; 使白细胞趋化, 黏附, 脱颗粒, 释放溶酶体; 诱使腺泡细胞凋亡, 胰腺组织坏死等. Liu *et al*[6]通过PCR实验, 认为SAP动物胰腺组织中的TNF-α水平在1 h已有显著升高, 7 h达到顶峰. 本实验数据表明, SAP组各时相血浆TNF-α水平较NC组均明显升高, 说明在SAP发病早期TNF-α水平已有明显增加; BN组与SAP组比较, 显著降低, 说明BN52021对SAP大鼠具有治疗作用, 这与Valone *et al*[7]研究结果较为一致; 而BN组与NC组比较, 不具有显著性差异, 说明BN52021对SAP大鼠具有明显的治疗效果, 使其血浆TNF-α水平明显下降, 接近NC组水平. PAF在AP的局部和全身的炎症反应中被称为关键性炎症介质[8], 其参与AP炎症反应的作用可能在于[9]: (1)通过胆碱能作用影响胰腺外分泌, 参与胰酶自身消化; (2)上调内皮细胞黏附分子表达, 促进中性粒细胞聚集及炎性介质释放; (3)增加肠上皮细胞通透性, 破坏肠道屏障功能, 造成多器官功能障碍; (4)引起心输出量降低, 胰腺血流减少, 胰腺组织破坏. 在胰腺炎早期(24 h内), 胰腺组织内检测不出PAF, 在7-14 d时, 胰腺组织内PAF含量则是正常对照组的12倍之高[10]. 本实验发现, NC组难检测到PAF的存在, 含量接近于0, 而在SAP早期(1 h), 即可见到PAF的显著升高, SAP组PAF含量显著高于NC组, 说明SAP的发病确实导致机体释放PAF的量显著增加; BN组显著低于SAP组, BN52021对PAF的拮抗作用在6, 12 h时相点表现的尤为显著, 不仅使BN组血浆PAF含量快速下降, 同时也使BN组血浆PAF含量接近NC组水平.

IL-10是抗炎细胞因子中很重要的一员, 他是主要由Th2细胞产生一种单键糖蛋白, 主要作用在于[11-12]: (1)能抑制单核细胞合成和表达TNF-α, IL1-β, IL-6, IL-8等, 减轻炎症; (2)抑制Th1细胞产生干扰素, 抑制免疫反应; (3)作为旁分泌或自分泌介质发挥作用; (4)减轻动物模型AP严重程度. Shi *et al*[13]对早期SAP大鼠的IL-10水平进行了检测, 发现IL-10在3 h和6 h时相点均显著升高. 夏时海 *et al*[14]研究结果提示, 急性胰腺炎患者发病后1 d, IL-10升高, 随后呈进行性下降. 本实验在1 h时相点, SAP组血浆IL-10水平显著高于NC组, 这与Machado *et al*[15]的实验结果十分相似; BN组血浆IL-10水平显著低于SAP组, 提示BN52021在SAP发病早期可促使机体减少抗炎因子IL-10过度释放. 随时间变化, 存在于3组间的差异逐渐消失, P>0.05.

IL-12又名NK细胞刺激因子, 主要作用有[16-17]: (1)诱导T细胞增殖, 增加CD56+NK细胞活性, 诱导NK细胞增殖; (2)直接促进骨髓干细胞增殖和形成集落; (3)抗细胞生成作用, 阻止肿瘤和其他恶性病变中的血管形成. 2003年, Uehara *et al*[18]对AP患者血浆进行ELISA测定, 发现AP早期IL-12明显上升, SAP患者血浆IL-12水平比MAP患者上升得更为明显. Pezzilli *et al*[19]发现AP患者发病1-6 d内, 血清IL-12等细胞因子显著高于正常组. 在本实验中, SAP组患者血浆IL-12水平较对照组明显上升, P<0.005, 这与Uehara *et al*的实验结果一致. IL-12是一种具有抗炎作用的细胞因子, 其水平的升高对于SAP的预后可能具有积极意义. 我们发现SAP组IL-12水平在6, 12 h时相点显著高于NC组, 峰值出现在6 h; 1 h时相点BN组血浆IL-12水平显著高于SAP组, 说明在SAP发病早

期应用BN52021进行治疗, 可以有效提高抗炎因子IL-12的含量, 有助于阻止SAP病程的进展. sTNFR是TNF的拮抗剂. 其作用是双方面的: (1)对局部产生的TNF起到结合和灭活作用, 减少发挥作用的TNF的数量; (2)作为TNF的储库, 维持低水平TNF的生物学活性, 延长其效应[20]. 目前sTNFR在胰腺炎中的作用逐渐成为研究的焦点. Kaufmann *et al*[21]的实验证实sTNFR与MOF的发生率、死亡率正相关(r = 0. 81), sTNFR与胰腺坏死的关系提示sTNFR能反映炎症组织损坏导致严重全身合并症的发生. 长期以来, TNF都作为AP的有力的生化指标, 但在发病早期TNF的值很难测到, sTNFR容易检测, 是反应TNF-α的良好指标[22]. de Beaux *et al*[22]发现, MAP患者在发病的1-2 d血清sTNFR水平明显升高, 本实验发现1 h时相点SAP组大鼠血浆sTNFR水平显著高于NC组. 说明血浆sTNFR水平确实能替代TNF-α, 作为SAP发病的一项生化指标. 在SAP, BN, NC各组之间, 血浆sTNFR水平存在明显差异, BN52021对大鼠血浆sTNFR含量具有明显的提升作用, 利于抗炎作用的发挥.

现代医学认为, 解决SAP的关键是调节炎症反应平衡. 在适当时效内抑制炎性细胞因子的过度释放; 同时保存细胞免疫力, 不至引起免疫抑制. 使用特异性细胞因子拮抗剂, 血液净化清除过多细胞因子都是基于该指导思想的研究和探索. 细胞因子的可溶性受体, 受体拮抗剂能有效降低某种细胞因子的水平, 减轻胰腺损伤, 但只能针对某一种细胞因子起作用, 疗效并不确切. 全身炎症反应过程复杂, 是数量巨大种类繁多的细胞因子共同作用的结果. 抗炎治疗亦应联合应用多种细胞因子拮抗剂和调节剂进行综合调节, 我们发现BN52021既能有效降低促炎因子TNF-α, PAF的含量, 又能提高具有抗炎作用的IL-10, IL-12, sTNFR的含量, 从而抑制炎症反应的过度发生, 可望对SAP有较好的治疗效果, 为从阻止全身炎症反应方面治疗SAP带来了希望.

4 参考文献

1 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416

2 吴国庆, 刘旭盛. 细胞因子在急性胰腺炎发病中的作用. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 49-52

3 Masamune A, Shimosegawa T. Anti-cytokine therapy for severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2116-2121

4 Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, Sastre J. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 393-403

5 Bhatia M. Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. *Scand J Surg* 2005; 94: 97-102

6 Liu XM, Xu J, Wang ZF. Pathogenesis of acute lung injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 614-617

7 Valone FH, Ruis NM. Stimulation of tumour necrosis factor release by cytotoxic analogues of platelet-activating factor. *Immunology* 1992; 76: 24-29

8 赵晓晏, 夏时海. 血小板活化因子与急性胰腺炎的发生和治疗. 世界华人消化杂志 2001; 9: 958-960

9 姚新生, 孙万邦. 血小板活化因子的生理、病理作用及机制. 国外医学•生理、病理科学与临床分册 2002; 22: 374-376

10 Zhou WG, Chao W, Levine BA, Olson MS. Evidence for platelet-activating factor as a late-phase mediator of chronic pancreatitis in the rat. *Am J Pathol* 1990; 137: 1501-1508

11 Zhou X, Schmidtke P, Zepp F, Meyer CU. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 465-475

12 Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 3-15

13 Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 2005; 5: 492-500

14 夏时海, 赵晓晏, 郭萍. 急性胰腺炎促炎因子和抗炎因子变化的动态观察. 第三军医大学学报 2001; 23: 462-464

15 Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, Sampietre SN, Molan NA, Soriano F, Matheus AS, Patzina RA, Cunha JE, Velasco IT. Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 32: 80-86

16 Ma X, Trinchieri G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv Immunol* 2001; 79: 55-92

17 孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 507-519

18 Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 363-370

19 Pezzilli R, Miniero R, Cappelletti O, Barakat B. Behavior of serum interleukin 12 in human acute pancreatitis. *Pancreas* 1999; 18: 247-251

20 Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985; 318: 665-667

21 Kaufmann P, Tilz GP, Lueger A, Demel U. Elevated plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFRp60) reflect severity of acute pancreatitis. *Intensive Care Med* 1997; 23: 841-848

22 de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KC. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83: 349-353

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2174-2179
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

干扰Fas受体表达的串联shRNA表达载体的构建

刘明社, 王 兰, 赵中夫, 张国英, 张 芸, 封江南

■背景资料
Fas是重要的凋亡诱导受体，当Fas这一重要的细胞凋亡受体过度表达时，则可以引起疾病. RNA干扰(RNAi)技术的发展为抑制疾病状态下Fas基因的过渡表达带来新希望. 构建shRNA真核表达载体可以在细胞内有效表达shRNA, 发挥RNAi作用，有效沉默基因表达.

刘明社, 赵中夫, 张国英, 张芸, 长治医学院肝病研究所, 山西省长治市 046000
王兰, 山西大学生命科学与技术学院 山西省太原市 030006
封江南, 武汉市晶赛生物工程技术有限公司 湖北省武汉市 430074
山西省自然基金资助项目, No. 20051114
通讯作者: 赵中夫, 046000, 山西省长治市解放东街161号, 长治医学院肝病研究所. zhaozf_1226@163.com
电话: 0355-3012335
收稿日期: 2006-03-26 接受日期: 2006-06-14

Construction of recombinant plasmid series with two Fas-targeted short hairpin RNAs

Ming-She Liu, Lan Wang, Zhong-Fu Zhao, Guo-Ying Zhang, Yun Zhang, Jiang-Nan Feng

Ming-She Liu, Zhong-Fu Zhao, Guo-Ying Zhang, Yun Zhang, Institute of Hepatology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China
Lan Wang, College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China
Jiang-Nan Feng, Wuhan Genesil Biotechnology Corporation Limited, Wuhan 430074, Hubei Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province of China, No. 20051114
Correspondence to: Zhong-Fu Zhao, Institute of Hepatology, Changzhi Medical College, 161 Jiefang East Street, Changzhi 046000, Shanxi Province, China. zhaozf_1226@163.com
Received: 2006-03-26 Accepted: 2006-06-14

Abstract

AIM: To construct the recombinant plasmid expressing two Fas-targeted short hairpin RNA (shRNA) by pEGFP6-1 and pGenesil-1 plasmids vector.

METHODS: Two pairs of DNA sequences were designed, and then synthesized into complementary chains by annealing, respectively. Then the obtained products containing short hairpin structure were inserted into plasmid vector pEGFP6-1/pGenesil-1 with U6 promoter. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* strain DH5α for screening and amplifying. The sequence analysis of the plasmids identified by restriction enzyme were carried out. The two plasmids were first digested with *Sac* I, and then with *Sal* I. A long segment from pEGFP6-1-siFas1 and a short segment from pGenesil-1-siFas2 were reclaimed, and connected with T4 DNA Ligase. The recombinant plasmid series was identified by restriction endonuclease digestion.

RESULTS: The two Fas-targeted shRNAs were successfully inserted into the plasmid vector pEGFP6-1, and the coding sequences of the obtained shRNAs were consistent with the designed fragments.

CONCLUSION: The recombinant plasmid series of two Fas-targeted shRNAs is successfully constructed in one pEGFP6-1 plasmid.

Key Words: Fas; RNA interference; Short hairpin RNA; Plasmid series

Liu MS, Wang L, Zhao ZF, Zhang GY, Zhang Y, Feng JN. Construction of recombinant plasmid series with two Fas-targeted short hairpin RNAs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2174-2179

摘要

目的: 利用pEGFP6-1和pGenesil-1质粒构建针对Fas的2个短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA) 串联表达的载体.

方法: 设计表达2个shRNA结构的互补DNA序列, 经退火成双链, 分别克隆至带有U6启动子的质粒载体pEGFP6-1和pGenesil-1中, 构建重组质粒, 转化大肠杆菌DH5α菌株, 扩增, 提取质粒, 酶切鉴定后测序分析. 分别用*Sac*I+*Sal*I双酶切重组质粒, 胶回收酶切pEGFP6-1-siFas1大片段和酶切pGenesil-1-siFas2小片段, T4 DNA Ligase连接酶切大、小片段, 得到pEGFP6-1-siFas1+siFas2重组质粒. 转化感受态细胞DH5α, 扩增, 提取串联重组质粒进行酶切鉴定.

结果: 成功构建靶向Fas的2个shRNA串联重组质粒载体pEGFP6-1-siFas1+siFas2. 酶切鉴定和测序分析重组质粒, shRNA编码序列与设计的片段完全一致, 经酶切凝胶电泳证实载体构

建成功.

结论: 表达2个靶向Fas的shRNA表达框成功构建在一个重组质粒载体上.

关键词: Fas; RNAi; shRNA; 串联质粒

刘明社, 王兰, 赵中夫, 张国英, 张芸, 封江南. 干扰Fas受体表达的串联shRNA表达载体的构建. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2174-2179

httP://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2174.asp

0 引言

RNAi技术是通过导入细胞19-23 nt的小分子干扰RNA(small interference RNA, siRNA), 降解同源mRNA, 高效、特异性阻断目的基因表达[1-5]. 但是, 裸siRNA导入机体和细胞, 转染效率低, 抑制时间短. 针对靶基因不同位点设计的siRNA, 抑制效果也各有差异. 因此需要筛选、设计和构建高效导入和稳定、持久并有效抑制基因表达的siRNA载体. 短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)是设计导入细胞的RNA单链上, 在编码siRNA正、反义链序列之间添加一段不相互补的碱基序列, 这样使RNA自身折叠成发卡状双链后形成一个loop环. 在细胞内, shRNA的loop环被酶切而成为siRNA双链. 有研究表明, shRNA对靶基因的抑制效果优于siRNA[6-7], 因此, 我们针对小鼠Fas基因设计了2个位点的shRNA表达序列, 用小鼠U6启动子和RNA polymeraseⅢ(PolⅢ)终止信号, 构建针对Fas的特异性shRNA真核表达载体, 在一个载体上串联两个shRNA表达框架.

1 材料和方法

1.1 材料 质粒载体pEGFP6-1/pGensil-1(含有EGFP, Kanar, Neor表达框架和U6启动子), *Escherichia coli*感受态菌株DH5α均由武汉晶赛生物公司提供; 质粒抽提试剂盒由中鼎公司提供; DNA连接酶和核酸内切酶: T4 DNA Ligase, *Sal*Ⅰ, *Sac*Ⅰ, *Bam*HⅠ、*Hin*dⅢ以及DL2000 Marker均由美国NEB公司提供.

1.2 方法

1.2.1 靶向Fas RNAi位点筛选及表达shRNA序列的设计 根据GeneBank中小鼠Fas的核苷酸序列, 参考siRNA的设计策略, 使用BLAST排除和其他编码序列/EST同源的序列, 结合文献[8], 最后筛选2个作用位点(1个位于Fas胞外的受体域, 另1个位于Fas胞内的死亡域), 分别设计表达

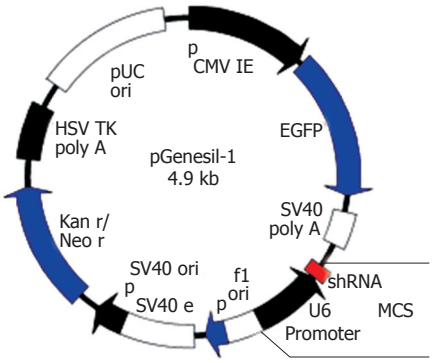


图 1 pEGFP6-1/pGenesil-1质粒载体图. MCS结构: pEGFP6-1质粒为: 5'-*Hin*dⅢ-Insert_DNA-*Bam*HⅠ-U6_Promotor-*Eco*RⅠ-*Sac*Ⅰ-*Kpn*Ⅰ-*Sal*Ⅰ-*Bss*HⅡ-*Xba*Ⅰ-*Not*Ⅰ-*Pst*Ⅰ-*Dra*Ⅲ-3'; pGenesil-1质粒为: 5'-*Hin*dⅢ-Insert_DNA-*Bam*HⅠ-U6_Promotor-*Eco*RⅠ-*Sal*Ⅰ-*Xba*Ⅰ-*Dra*Ⅲ-3'.

shRNA(65 bp)的寡核苷酸序列, siFas1, siFas2和通用阴性对照HK. 表达shRNA的寡核苷酸结构: *Bam*HⅠ-Sense-Loop-Antisense-终止信号*Eco*RI/*Sac*I-*Hin*dⅢ. siFas1的靶序列1: 5'-GTGCAAGTGCAAACCA GAC-3'. siFas1-A(Sense)和siFas1-B(Antisense): 5'-GATCCGTGCAAGTGCAAACCAGACTTCAAGACGGTCTGGTTTGCACTTGCACTTTTTTGAATTCA-3'; 3'-GCACGTTCACGTTTGGTCTGAAGTTCTGCCAGACCAAACGTGAACGTGAAAAAACTTAAGTTCGA-5'. siFas2的靶序列2: 5'-AAGCCGAATGTCGCA GAAC-3'. siFas2-A(Sense)和siFas2-B(Antisense): 5'-GATCCAAGCCGAATGTCGCAGAACTTCAAGACGGTTCTGCGACATTCGGCTTTTTTTTGAGCTCA-3'; 3'-GTTCGGCTTACAGCGTCTTGAAGTTCTGCCAAGACGCTGTAAGCCGAAAAAAAACTCGAGTTCGA-5'. 通用对照靶序列HK: 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3'. HK-1(Sense)和HK-2(Antisense):

5'-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTGTCGACA-3'; 3'-GCTGAAGTATTCCGCGTACGAAGTTCTGCCGTACGCGGAATACTTCAGAAAAAACAGCTGTTCGA-5'

以上序列送武汉伯杰生物技术公司合成.

1.2.2 表达质粒的线性化 pEGFP6-1和pGenesil-1两种质粒(图1)均用*Bam*HⅠ和*Hin*dⅢ双酶切, 37℃酶切8 h, 10 g/L Agarose凝胶电泳分别回收大片段, 即为线性化表达质粒.

1.2.3 质粒pEGFP6-1/pGenesil-1与siFas1/siFas2

■相关报道

Song *et al*2003年首先运用化学方法合成针对Fas基因的siRNA并成功导入小鼠体内, 有效抑制了ConA诱导的肝细胞Fas过表达; 刘苏虎 *et al* 2005年根据Song的一个siRNA序列构建Fas靶向的干扰质粒载体并进行了生物活性; 雷印胜 *et al* 2005年构建串联表达shRNA载体, 观察RNAi对大鼠心肌细胞Kir2.1的体外效应.

■**创新盘点**
本研究采用骨架质粒pEGFP6-1和pGenesil-1, 将靶向Fas基因2个位点的shRNA表达框架串联构建在1个质粒上, 以提高RNAi沉默基因的效率.

的连接 分别用annealing buffer 50 μL溶解上述单链寡核苷酸(2OD)片段. 各取2 μL(即siFas1-A 2 μL+siFas1-B 2 μL或siFas2-A 2 μL+siFas2-B 2 μL)+annealing buffer 16 μL混匀. 94℃退火5 min, 自然冷却至室温, 得到退火产物siFas1和siFas2双链. 各取退火产物1 μL加H_2O 99 μL稀释100倍. 稀释的退火产物siFas1和siFas2分别与线性化质粒pEGFP6-1和pGenesil-1载体用T4 DNA Ligase, 10×Ligase Buffer进行连接, 22℃水浴反应过夜. 连接产物分别命名为pEGFP6-1-siFas1和pGenesil-1-siFas2. 各取过夜连接产物(pEGFP6-1-siFas1和pGenesil-1-siFas2)5 μL转化感受态DH5α, 分别涂布于含Kanar抗性(终浓度为30 mg/L)的LB平板上, 37℃恒温箱培养过夜. 从每个培养皿上随机挑取3个单菌落接种于3 mL含Kanar抗性(终浓度为30 mg/L)的LB培养液中, 37℃恒温摇床(250 r/min)培养过夜. 用质粒提取试剂盒小量提取质粒, 并分别做酶切鉴定: pEGFP6-1-siFas1 8.5 μL用*Eco*RⅠ 0.5 μL, 10×H Buffer 1 μL做酶切, 37℃水浴反应3 h; pGenesil-1-siFas2 8.5 μL用*Sal*Ⅰ 0.5 μL, 10×L Buffer 1 μL做酶切, 37℃水浴反应3 h. 挑取经酶切鉴定克隆正确的pEGFP6-1-siFas1和pGenesil-1-siFas2质粒转化菌液去测序. 通用阴性对照HK与pEGFP6-1的连接亦如上述.

1.2.4 pEGFP6-1-siFas1与pGenesil-1-siFas2的串联 用*Sac*Ⅰ+*Sal*Ⅰ双酶切pEGFP6-1-siFas1回收大片段, 用*Sac*Ⅰ+*Sal*Ⅰ双酶切pGenesil-1-siFas2回收小片段(403 bp). 先用*Sac*Ⅰ酶切, 质粒DNA 5 μL, 10×L Buffer 2 μL, *Sac*Ⅰ 1 μL和H_2O 12 μL, 37℃水浴反应3 h. 加入5 mol/L NaCl 2 μL, 混匀, 再加入乙醇 51 μL, 混匀. -70℃冰箱放置15 min, 15 000 r/min离心15 min. 用700 mL/L乙醇洗涤2遍, 然后各用H_2O 17 μL溶解. 再用*Sal*Ⅰ酶切, 上步*Sal*Ⅰ酶切产物17 μL 10×H Buffer 2 μL和*Sal*Ⅰ1 μL, 37℃水浴反应过夜. 10 g/L Agarose凝胶电泳, 胶回收试剂盒分别回收大片段和小片段(403 bp), 各用30 μL H_2O洗脱. 用T4 DNA Ligase 1 μL和10×Ligase Buffer 1 μL连接回收大片段4 μL与回收小片段4 μL, 22℃水浴反应过夜. 连接产物命名为pEGFP6-1-siFas1+siFas2. 取过夜连接产物5 μL转化感受态细胞DH5α, 涂布于含Kana r抗性(终浓度为30 mg/L)的LB平板上, 37℃恒温箱培养过夜. 从培养皿上挑取3个单菌落接种于3 mL含Kanar抗性(终浓度为30 mg/L)的LB培养液中, 37℃恒温摇床(250 r/min)培养过夜. 用质粒提取试剂盒小量提取质粒, 并分别用*Bam*HⅠ做酶切鉴定, 37℃水浴反应3 h, 10 g/L Agarose凝胶电泳.

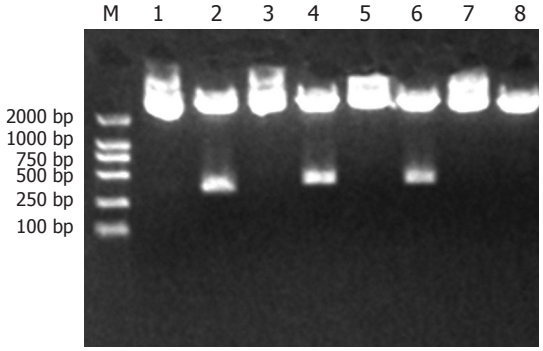


图 2 pEGFP6-1-siFas1, pGenesil-1-siFas2以及pEGFP6-1-HK质粒经酶切后凝胶电泳图. M: DL2000 Marker; 1: pEGFP6-1-HK; 2: pEGFP6-1-HK+*Sal*Ⅰ; 3, 5: pEGFP6-1-siFas1; 4, 6: pEGFP6-1-siFas1 + *Eco*RI; 7: pGenesil-1-siFas2; 8: pGenesil-1-siFas2 + *Sac*Ⅰ.

2 结果

2.1 重组质粒pEGFP6-1-siFas1和pGenesil-1-siFas2酶切鉴定 pEGFP6-1-siFas1经酶切分析: 因为pEGFP6-1质粒载体本来只含有一个*Eco*RⅠ的酶切位点, 而pEGFP6-1-siFas1质粒能够被*Eco*RⅠ酶切出一条393 bp的DNA带, 说明目的序列siFas1已经插入到pEGFP6-1质粒载体(图2, 条带3, 4和5, 6). pGenesil-1-siFas2经酶切分析: 因为pGenesil-1质粒载体本来不含*Sac*Ⅰ的酶切位点的, 而pGenesil-1-siFas2质粒能够被*Sac*Ⅰ酶切, 表明目的序列siFas2已经插入到pGenesil-1质粒载体(图2, 条带7, 8). pEGFP6-1-HK质粒能够被*Sal*Ⅰ酶切出一条415 bp的DNA带, 说明目的序列HK已经插入到pEGFP6-1质粒载体(图2, 条带1, 2).

2.2 重组质粒pEGFP6-1-siFas1和pGenesil-1-siFas2测序分析 经测序结果分析pEGFP6-1-siFas1, pGenesil-1-siFas2和pEGFP6-1-HK均为插入正确的克隆质粒, 而且分子质量均符合设计标准(图3).

2.3 重组质粒pEGFP6-1-siFas1+siFas2的酶切鉴定 经酶切分析, 目的序列siFas1和siFas2与质粒连接成功后的串联重组质粒MCS应该为: -*Hin*dⅢ-siFas1-*Bam*HⅠ-U6_Promotor-*Eco*RⅠ-siFas2-*Bam*HⅠ-U6_Promotor-*Eco*RⅠ-*Sal*Ⅰ-*Bss*HⅡ-*Xba*Ⅰ-*Not*Ⅰ-*Pst*Ⅰ-*Dra*Ⅲ-. 3个单菌落质粒经

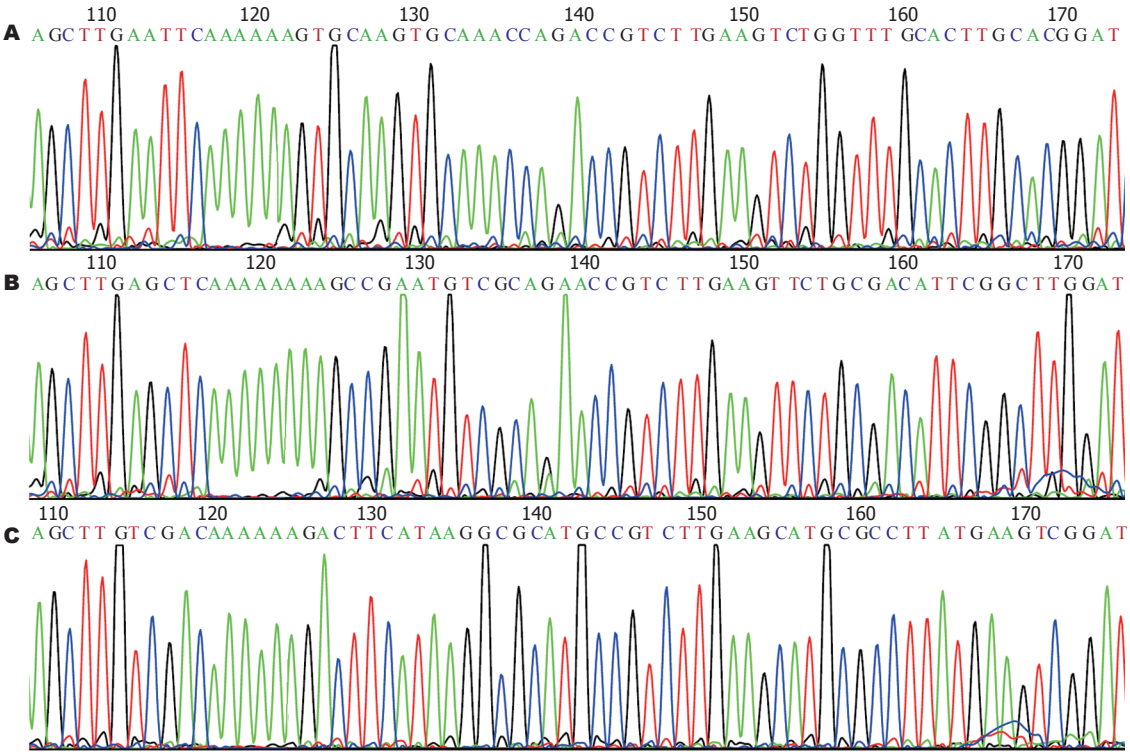


图 3 重组质粒pEGFP6-1-siFas1和pGenesil-1-siFas2测序结果. A: pEGFP6-1-siFas1测序部分; B: pGenesil-1-siFas2测序部分; C: pEGFP6-1-HK测序部分.

■应用要点
在同1个质粒上串联2个shRNA表达框架的方法, 不仅可以提高沉默基因的效率, 也减少了质粒构建费用. 靶向Fas shRNA的串联表达质粒的构建, 为进一步体外和体内实验, 探索抑制Fas表达在疾病治疗中的作用奠定了基础.

*Bam*HⅠ酶切, 10 g/L Agarose凝胶电泳(图4), 可见407 bp的DNA条带, 符合设计要求, 故为插入正确的重组质粒.

3 讨论

在生物体发育过程中和在许多疾病的发病机制中, 细胞凋亡起着重要的作用[9-12]. 参与调节细胞凋亡的许多信号途径中, Fas/FasL是最重要的介导细胞凋亡系统[13-16]. 细胞表面的死亡受体中, Fas是最重要的诱导凋亡的受体[17]. Fas与FasL或抗Fas抗体结合导致一个凋亡信号启动, 通过细胞内的Fas相关死亡域蛋白(Fas-associated with death domain, FADD)[18-19], 活化蛋白酶caspase-8[20-22], 激活caspases的级联反应, 最后由caspase-3活化caspase依赖的核酸内切酶(caspase-activated DNase, CAD)[23], 切割细胞骨架和核骨架蛋白, 完成细胞凋亡全过程[24]. 肝脏的许多细胞表达Fas/FasL, 当Fas这一重要的细胞凋亡受体过度表达时, 则可以引起疾病. 如, 受HBV感染的人肝细胞表面有高度表达的Fas, 可以诱发感染细胞过度凋亡, 成为严重肝功能衰竭的主要原因[25-27]. 越来越多的证据表明, Fas/FasL在许多肝脏疾病中起着重要作用. 抑制疾病状态下Fas蛋白的过度表达, 对于治疗疾病

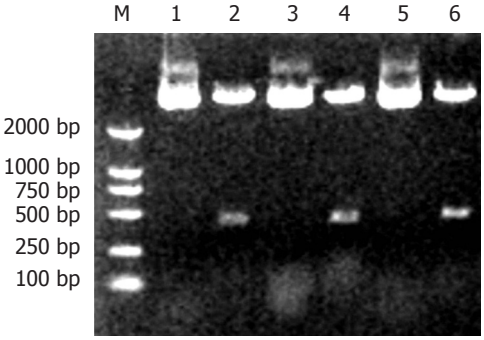


图 4 pEGFP6-1-siFas1 + siFas2质粒提取后*Bam*HI酶切凝胶电泳图. M: DL2000 Marker; 1, 3, 5: pEGFP6-1-siFas1+siFas2; 2, 4, 6: pEGFP6-1-siFas1+ siFas2+*Bam*HⅠ.

和控制疾病的发展, 具有重要意义. 近年来发展的RNAi技术是一种快速、简洁、经济的抑制基因表达技术[28], 尤其给病毒性疾病的基因治疗带来新的希望[29-30].

RNAi技术运用于沉默哺乳动物基因, 可以通过体外转录或化学合成siRNA经脂质体、质粒或病毒载体等转染细胞后发挥作用, 也可用shRNA表达载体转染细胞, 在细胞内shRNA经酶切去loop环形成siRNAs双链而起作用. 体外化学合成的siRNAs因成本高、不能持续抑制基因表达, 且易于污染RNA酶而降解, 限制了其应用. 而shRNAs表达载体转染细胞后在细胞

■同行评价
本研究设计合成串联表达针对Fas的2个shRNA, 以提高对靶序列的抑制效率, 具有较重要的意义. 建议课题组通过进一步质粒转染细胞实验, 检测RNAi对Fas mRNA的沉默作用. 明确串联表达载体对Fas过度表达的有效抑制.

内可持续稳定表达, 构建成本相对较低, 作用效果也优于转染体外合成的siRNA[6-7]. 串联多个shRNA于同一质粒载体上, 增强RNAi沉默基因的作用, 或同时发挥RNAi抑制多个基因的作用研究并不多见[31]. 有文献报道, 针对Fas基因的siRNA可以有效的沉默基因表达, 并保护由ConA诱导的小鼠肝损伤[8]. 也有学者构建了质粒载体并成功抑制Fas基因的表达[32]. 尚无人在同一载体构建多个针对Fas的shRNA表达载体. 为提高对Fas基因表达的持续有效抑制, 我们筛选针对小鼠Fas基因2个位点的shRNA, 通过GeneBank数据库BLAST分析, 选用的siRNA编码序列没有与人和动物其他基因明显同源的靶位点, 保证RNAi的特异性, 把2条shRNA成功串联在同一个载体质粒上, 在不同位点同时发挥RNAi作用, 可以增强抑制基因的效果. 另外, 我们所构建的载体含有EGFP基因, 在细胞内, EGFP基因的表达产物-绿色荧光蛋白可以方便地通过荧光显微镜或流式细胞仪检测, 确定载体转染效率. 构建的Fas shRNA真核表达载体使用了U6启动子指导shRNA编码序列的转录、Pol Ⅲ识别的转录终止信号, 经过酶切和测序分析无碱基突变, 证实质粒载体构建成功. 通过Fas shRNA载体质粒转染细胞, 检测其对Fas mRNA的抑制效率, 为进一步研究Fas基因在多种疾病中的作用以及探索肝病的基因治疗奠定基础.

4 参考文献

1 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
2 Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e46
3 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6047-6052
4 Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. Nat Biotechnol 2002; 20: 497-500
5 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. RNA干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究.世界华人消化杂志 2003; 11: 1264-1266
6 Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 505-508
7 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
8 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-351
9 Cardin R, D'Errico A, Fiorentino M, Cecchetto A, Naccarato R, Farinati F. Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 43-48
10 Sanford AN, Suriano AR, Herche D, Dietzmann K, Sullivan KE. Abnormal apoptosis in chronic granulomatous disease and autoantibody production characteristic of lupus. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 178-181
11 Andrikoula M, Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 561-568
12 Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 187-215
13 Nagata S. Apoptosis mediated by the Fas system. *Prog Mol Subcell Biol* 1996; 16: 87-103
14 Lambert JC, Zhou Z, Kang YJ. Suppression of Fas-mediated signaling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced liver apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 406-412
15 Zhou Z, Sun X, Kang YJ. Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Am J Pathol* 2001; 159: 329-338
16 Ishigami A, Fujita T, Handa S, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, Enomoto N, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 2002; 161: 1273-1281
17 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308
18 Juo P, Woo MS, Kuo CJ, Signorelli P, Biemann HP, Hannun YA, Blenis J. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 797-804
19 Bang S, Jeong EJ, Kim IK, Jung YK, Kim KS. Fas- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis uses the same binding surface of FADD to trigger signal transduction. A typical model for convergent signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275: 36217-36222
20 Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588
21 Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815
22 Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827
23 Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99
24 Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation

factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8461-8466
25 Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995; 182: 1223-1230
26 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001; 82: 171-182
27 Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. Fas-mediated apoptosis causes elimination of virus-specific cytotoxic T cells in the virus-infected liver. *J Immunol* 2001; 166: 3035-3041
28 任玥欣, 宋于刚, 陈学清. RNAi研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12: 748-750
29 李宁, 范学工. RNA干扰的抗病毒效应. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1769-1772
30 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 773-778
31 雷印胜, 张海洲, 王来城, 郭兰敏, 范全心, 邹承伟, 李红昕, 王安彪. 串联表达大鼠心肌细胞Kir2.1 shRNA载体的构建及其体外效应. 中华医学杂志 2005; 85: 2910-2915
32 刘苏虎, 张王刚, 张镁, 朱青, 田玮, 孙静昕. Fas靶向RNA干扰质粒载体的构建及生物活性鉴定. 西安交通大学学报(医学版) 2005; 26: 115-118, 123

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 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 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2001071号.《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》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.《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线http://www.wjgnet.com免费阅读全文.《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 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、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、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》开通了http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2180-2185
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

早期持续高容量血滤对SAP猪的胰腺及胰腺外器官病理变化的影响

张震环, 李维勤, 王 浩, 燕晓雯, 黎介寿

■背景资料
重症急性胰腺炎(SAP)是临床上常见的危重病, 既往死亡率高达50%, 近年来, 随着器官功能支持治疗不断进步, SAP的死亡率明显降低, 但仍然在15%-25%, 其死亡原因往往是MODS. 而MODS的主要机制是免疫的失衡, 促炎和抑炎因子的紊乱.

张震环, 李维勤, 王浩, 燕晓雯, 黎介寿, 南京军区南京总医院外科重症监护室 江苏省南京市 210002
张震环, 2005年南京大学医学院医学硕士研究生毕业, 主治医师, 现工作于南京医科大学附属常州第二人民医院ICU.
江苏省社会发展基金资助项目, No. BS2000051
通讯作者: 李维勤, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 南京军区南京总医院外科重症监护室. Liweiqin@jlonline.com
电话: 025-80860066
收稿日期: 2006-05-29 接受日期: 2006-06-14

Effect of early continuous high-volume hemofiltration on histopathological changes of pancreas and extrapancreatic organs in pigs with severe acute pancreatitis

Zhen-Huan Zhang, Wei-Qin Li, Hao Wang, Xiao-Wen Yan, Jie-Shou Li

Zhen-Huan Zhang, Wei-Qin Li, Hao Wang, Xiao-Wen Yan, Jie-Shou Li, Surgical Intensive Care Unit, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Supported by the Social Development Foundation of Jiangsu Province, China, No. BS2000051
Correspondence to: Wei-Qin Li, Surgical Intensive Care Unit, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, 305 Zhongshandong Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. liweiqin@jlonline.com
Received: 2006-05-29 Accepted: 2006-06-14

Abstract

AIM: To observe the effect of early continuous high-volume hemofiltration on the histopathological changes of pancreas and extrapancreatic organs in pigs with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Twenty-four domestic pigs were randomly and averagely assigned into 3 groups: control group (untreated model group) as group A, low-volume hemofiltration [20 mL/(kg • h)] group as group B, and high-volume hemofiltration [100 mL/(kg • h)] group as group C. SAP model was produced by injection of sodium taurocholate (40 g/L, 1 mL/kg) and trypsin (2 U/kg) via the pancreatic duct. The pigs in group B and C received hemofiltration immediately after modeling. The parameters including survival time and histopathological scores of pancreas and extra-pancreatic organs were observed.

RESULTS: The median survival times were 41, 50 and 65 h in group A, B, and C, respectively, and there were significant differences among them ($P < 0.01$). The histopathological scores had no marked differences between the three groups ($P > 0.05$). However, the scores for hepatocellular degeneration, pulmonary hyaline membranes and microthrombi, and renal tubular damage were obviously lower than those in the other groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Although hemofiltration can not reduce the pancreatic damage in pigs with SAP, early continuous high-volume hemofiltration can significantly ameliorate the hepatocellular degeneration, the formation of pulmonary hyaline membranes and microthrombi, and the renal tubular damage in pigs with SAP, which is useful in improving the survival time.

Key Words: Hemofiltration; Acute pancreatitis; Histopathology; Multiple organ dysfunction syndrome

Zhang ZH, Li WQ, Wang H, Yan XW, Li JS. Effect of early continuous high-volume hemofiltration on histopathological changes of pancreas and extrapancreatic organs in pigs with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2180-2185

摘要

目的: 观察早期持续高容量血液滤过(HVHF)对重症急性胰腺炎(SAP)猪的胰腺及胰外重要脏器病理变化的影响.

方法: 长白猪24只, 随机分为: 对照组($n = 8$, 模型组), 低容量血滤组($n = 8$), 接受20 mL/(kg • h)置换量的血液滤过, 及HVHF组($n = 8$), 接受100 mL/(kg • h)置换量的血液滤过. 通过向胰管注入40 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg)和胰蛋白酶(2 U/kg)溶液, 诱导猪的SAP模型. 治疗

组在模型诱导后立即开始血滤治疗, 并观察各组的生存时间以及胰腺和胰外重要脏器的组织病理学评分.

结果: 各组的半数生存期分别是41, 50和65 h (P<0.01). 胰腺本身的病理损害评分在各组间无明显差异(P>0.05), 但HVHF组在肝细胞的变性、肺透明膜和微血栓的形成以及肾小管损伤等指标的评分上明显降低(P<0.05).

结论: 持续性血液滤过虽然不能减轻SAP猪胰腺本身的病理损害, 但早期HVHF能有效地减轻SAP猪肝细胞的变性、肺透明膜和微血栓的形成以及肾小管的损伤, 延长生存时间.

关键词: 血液滤过; 急性胰腺炎; 组织病理学; 多器官功能障碍综合征

张震环, 李维勤, 王浩, 燕晓雯, 黎介寿. 早期持续高容量血滤对SAP猪的胰腺及胰腺外器官病理变化的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2180-2185

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2180.asp

0 引言

血液滤过治疗特别是高容量血液滤过(HVHF), 能够有效地清除重症急性胰腺炎(SAP)时过多的炎症介质及细胞因子, 从而改善脏器的功能, 防治多器官功能障碍综合征(MODS), 这一点已取得广泛共识[1-3]. 但是血液滤过是否能改善SAP的胰腺及胰腺外器官病理损害, 目前尚不清楚, 为了探讨这个问题, 我们观察了血液滤过对SAP猪的胰腺及胰腺外器官病理变化的影响.

1 材料和方法

1.1 *材料* 牛磺胆酸钠购自美国Sigma公司. 胰蛋白酶购自美国Difco公司. 健康长白猪24只(由南京军区总医院动物实验中心提供), 体质量25-30 kg, 雌雄不限.

1.2 *方法* SAP猪模型的诱导. 术前晚开始禁食, 术晨禁水. 所有动物用氯胺酮20 mg/kg和阿托品1 mg im作诱导麻醉, 后持续iv 25 g/L硫喷妥钠, 根据麻醉深度由静脉泵控制在4-10 mg/(kg·h). 麻醉后行气管插管并接呼吸机辅助呼吸, 使用容量控制模式, 频率为20次/min, 潮气量为15 mL/kg, FiO_2为0.21. 无菌条件下, 腹正中切口进腹, 暴露胰十二指肠, 将其向右翻转, 在十二指肠系膜侧, 可见与肠系膜血管平行走向的主胰管, 沿系膜缘游离并切开主胰管, 小心置入直径为1 mm的聚氯乙烯导管, 深约1-2 cm, 备用. 使用含40 g/L硫磺胆酸钠和胰蛋白酶(2 kU/L)的生理盐水溶液, 按1 mL/kg、以100 mmHg的压力, 向胰管导管缓慢注入, 直视下可见整个胰腺因药物渗入变为棕黑色, 然后拔除导管并结扎胰管, 诱导成功后逐层关腹. 所有的动物在整个实验过程中给予一般治疗, 包括静脉输生理盐水5 mL/(kg·h), 持续麻醉、机械通气. 模型诱导后, 立即开始血液滤过治疗. 分组: (1)对照组(n = 8), 一般治疗; (2)低容量组(n = 8), 一般治疗+20 mL/(kg·h)置换量的血液滤过; (3)高容量组(n = 8), 一般治疗+100 mL/(kg·h)置换量的血液滤过. 血液滤过方案为零平衡持续性血液滤过(CVVH). 血管通路采用Seldinger血管穿刺技术, 经颈内静脉穿刺, 置入双腔血滤导管. 使用Baxter BM25机器, 置换液以前稀释方式输入, 低容量组置换液流量为20 mL/(kg·h), 高容量组为100 mL/(kg·h). 各组的血流量均为80 mL/min. 滤器使用聚丙烯腈膜(AN69, Hospal, France), 面积1.2 m^2, 每24 h更换1次. 采用低分子肝素抗凝. 观察时限最长为72 h, 后静推100 g/L KCl 10 mL将动物处死. 立即留取胰腺(分别取头、体、尾)、肺(分别取自左右肺的每一叶)、肝、肾组织, 组织标本修剪成2 cm×1 cm×0.5 cm大小, 每个器官至少留取3块标本, 用100 g/L甲醛磷酸缓冲液(pH 7.4)固定. 常规石蜡切片, HE染色. 用Olympus显微镜观察组织学变化并照相. 胰腺采用Schmidt评分[4](表1), 肺、肾及肝脏评分按文献[5-6]标准(表2-4). 由病理科医师进行单盲读片, 根据镜下所见, 并结合大体病理严格依照标准进行评分, 同一器官不同区域及视野的分值有出入时取平均值.

统计学处理 生存时间采用Kaplan-Meier法计算生存曲线, 并进一步用Log rank检验进行生存曲线的比较. 病理组织学评分采用单因素方差分析, 组间比较用SNK-q检验. P<0.05认为有统计学意义.

2 结果

2.1 *生存时间* 对照组、低容量血滤组和HVHF组的半数生存时间分别是41, 50和65 h, 无论是低容量血滤组, 还是HVHF组均较对照组的生存时间显著延长(P<0.05), 而且HVHF组较低容量血滤组的生存时间也明显延长(P<0.05, 图1).

2.2 *脏器的病理变化* 胰腺本身的病理损害评分在各组间无明显差异, 但HVHF组在肝细胞变性、肺透明膜和微血栓形成以及肾小管损伤的

■**研发前沿**
高容量血液滤过(HVHF)由于其置换量大, 可更加有效地清除过多的炎性介质. 但HVHF是否能通过改善SAP胰外器官的病理损害, 而保护相应的器官功能及防治MODS呢? 这是目前研究的热点和亟待回答的问题.

■**创新盘点**
本研究通过动物实验证实, HVHF能有效地减轻SAP猪胰外器官的病理损害, 更多地延长动物的生存时间.

表 1 胰腺病理组织学评分标准

水肿	腺细胞坏死(坏死细胞数/高倍视野)	炎症(小叶内或血管周白细胞数/高倍视野)	出血(血管外或间隔内红细胞数/高倍视野)
1 = 小叶间隔局灶性扩张	1 = 1–4	1 = 1–10	1 = 1–50
2 = 同1+小叶间隔广泛性扩张	2 = 5–10	2 = 11–20	2 = 51–100
3 = 同2+腺泡间隔扩张	3 = 11–16	3 = 21–30	3 = 101–150
4 = 同3+细胞间隔扩张	4≥16	4≥30或小脓肿形成	4≥150

表 2 肺脏病理组织学评分标准

分值	透明膜	微血栓	水肿	肺间质浸润	肺不张	出血
0	无	无	无	无	无	无
1	稀少	有少, 小血管	轻	轻	小灶	小灶
2	中度	有一些	中	中	大灶	大灶
3	严重	许多, 大血管	重	重	广泛	广泛

表 3 肾脏病理组织学评分标准

分值	肾小管损伤	肾小球损伤	微血栓
0	无	无	无
1	广泛扩张, 灶性刷状缘缺损	内皮细胞肿胀	少量
2	广泛刷状缘缺损, 灶性小管坏死	小球水肿	有一些
3	广泛性肾小管坏死	小球纤维素样坏死	许多

表 4 肝脏病理组织学评分标准

分值	肝细胞变性或坏死	炎症 (汇管区炎性细胞浸润)	血管扩张
0	无	无	肝窦无扩张
1	灶性肝细胞水肿	轻	肝窦扩张, 窦内枯否细胞浊肿, 数量增多
2	广泛肝细胞水肿, 或轻度脂肪变性	中	肝窦扩张, 窦内枯否细胞浊肿, 数量明显增多
3	弥漫性肝脂肪变性, 或灶性坏死	重	肝窦显著扩张, 窦内枯否细胞浊肿, 数量明显增多, 可见PMNs

评分上明显降低(P<0.05, 图2-3).

3 讨论

SAP是临床上常见的危重病, 既往死亡率高达50%, 近年来, 随着ICU的发展, 器官功能支持治疗不断进步, SAP的死亡率明显降低, 但仍然在15%-25%[7], 其死亡原因往往是MODS, 特别是早期进行性恶化的MODS[8]. 如何防治SAP早期进行性恶化的MODS, 是近年来危重病医学界一直关注并致力于解决的问题之一, MODS的形成原因可能与促炎和抗炎因子失衡有关. 任何一方的过度产生或减少, 都可引起不同的病理生理反应, 如全身炎症反应综合征(SIRS), 补偿性抗炎症反应综合征(CARS)和混合性拮抗反应综合征(MARS). SIRS多在疾病的早期出现, 是由于机体的免疫应激反应过于激烈, 促炎因子产生过多而引起的组织细胞自身性破坏及器官功能障碍. 过去针对SIRS促炎因子mAb的实验研究空前高涨, 但在临床实验中, 这些mAb治疗全身性感染及多器官衰竭患者均不能降低病死率, 无一通过III期临床研究, 结果令人失望[9]. 原因之一可能就是一种或几种促炎因子的阻滞并不能阻断其他炎性因子的有害影响.

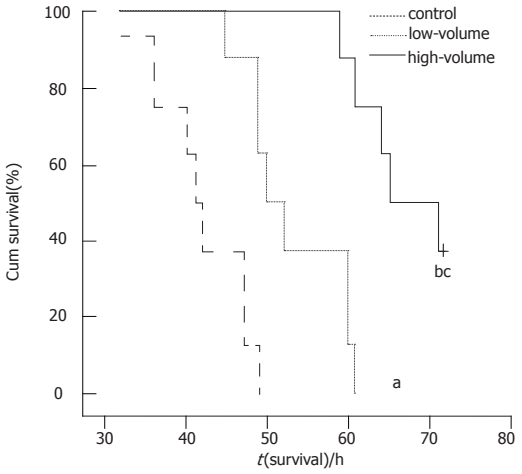


图 1 SAP猪生存曲线. ^aP<0.05, ^bP<0.01 *vs* 对照组; ^cP<0.05 *vs* 低容量血滤组.

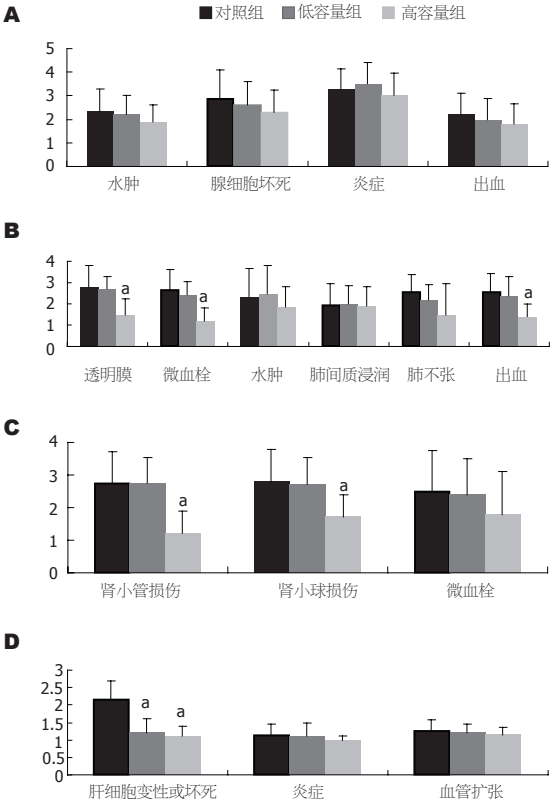


图 2 脏器病理损伤评分结果. A: 胰腺; B: 肺脏, $^aP<0.05$ *vs* 对照组和低容量血液滤过组; C: 肾脏, $^aP<0.05$ *vs* 对照组和低容量血液滤过组; D: 肝脏, $^aP<0.05$ *vs* 对照组.

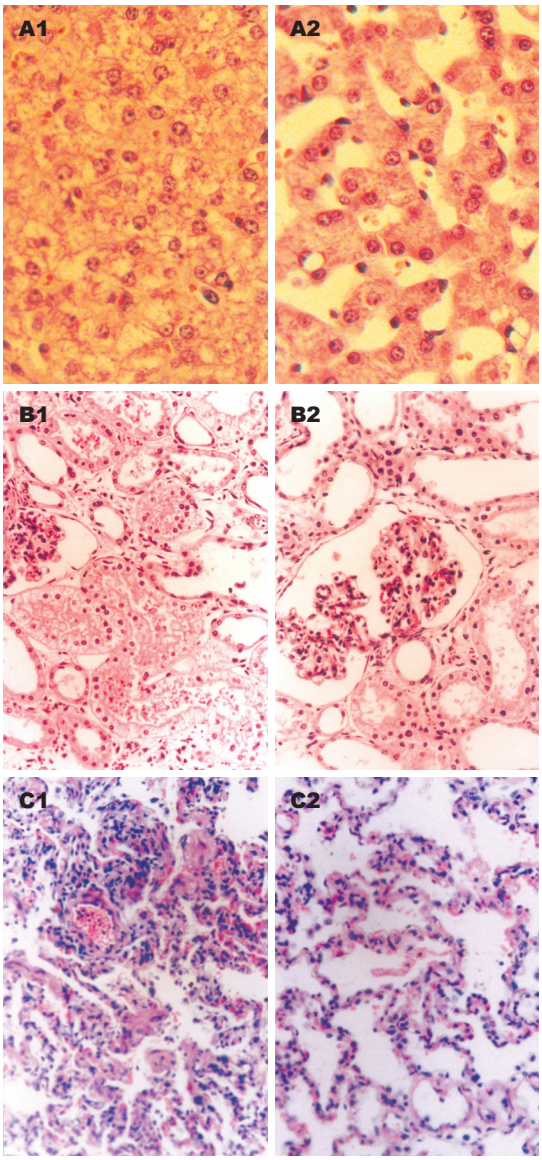


图 3 SAP猪脏器镜下病变(HE × 200). A1: 肝脏, 对照组; A2: 肝脏, HVHF组; B1: 肾脏, 对照组; B2: 肾脏, HVHF组; C1: 肺脏, 对照组; C2: 肺脏, HVHF组.

■应用要点

虽然常规量血液滤过是否能改善SAP患者的预后尚有争议, 但HVHF的应用价值已得到认可. 在实际工作中, 不要因为HVHF的置换液需要量大, 护理工作繁重而影响其开展.

CVVH可同时非选择性的清除多种炎症介质, 从理论上讲HVHF对炎症介质的清除更加有效, 从而有可能控制SIRS, 改善重要脏器的病理损害, 达到防治MODS, 延长生存时间的目的[10-11]. 从本次实验的生存分析来看, HVHF组的半数生存时间较对照组和低容量血液滤过组都显著延长, 达到了预期的目的. 一些实验研究证明, 通过早期HVHF, 可维持机体促炎和抗炎因子的平衡, 防治MODS[5,12-13]. MODS虽说是器官的功能障碍, 但也有其病理解剖基础. 为此, 我们专门观察了SAP猪的胰腺及胰外重要脏器的镜下病理变化及早期HVHF对其变化的影响. 我们诱导SAP模型的胰腺病理变化主要表现为胰腺的水肿、白细胞浸润、腺细胞坏死和灶性出血. 从本实验来看, 无论是低容量血液滤过, 还是HVHF, 都不能有效地改善SAP时胰腺本身的病理损害, 与相关的实验结果一致[11,14]. 这符合急性胰腺炎的“共同通道”学说, 胰酶的激活导致胰腺的“自身消化”, 是导致胰腺坏死的始动的和主要的原因. 在胰管注射的模型中, 由“白细胞的过度激活”带来炎症介质的过多释放所导致胰腺的病理损害是次要的. SAP模型的肝损害主要表现为肝细胞变性(水肿变性和脂肪变性)、坏死, 其次是汇管区的炎性细胞浸润和肝窦的扩张. 其机制可能有: (1)SAP产生的炎性介质、氧自由基等对肝细胞的损害, 实验研究表明, SAP早期TNF, IL-6明显升高, 且其升高程度与肝损伤呈正相关[15]; (2)急性胰腺炎时肝损害与低血容量和血管活性物质释放导致的肝微循环障碍、氧供下降有关; (3)急性胰腺炎时经门静脉回流至肝脏的毒性物质和生物活性物质增多, 同时, 肝脏对其清除和解毒作用下降. 血液滤过不仅可以清除炎性介质, 而且可以清除SAP时的部分毒性物质和生物活性物质, 从而减轻他们对肝细胞的损害. 从本实验看来, 无论是

■名词解释
高容量血液滤过(HVHF): 是相对于常规量的血液滤过而言的. 何谓高容量目前尚无统一标准, 大多数作者认为置换量超过了3 L/h [42.8 mL/(h·kg)] 则可认为高容量.

低容量血液滤过组, 还是HVHF组对肝细胞的变性、坏死较对照组都有明显的改善. 但对汇管区的炎性细胞浸润和肝窦的扩张都无改善作用, 这可能与这两项肝损害本身并不严重(评分较低)有关.

肺损伤是SAP最常见和最先出现的并发症[16-17]. 导致ARDS的病理变化既复杂又严重, 从本实验来看, 有肺水肿、间质炎症细胞浸润、肺不张、出血、微血栓和透明膜的形成. 造成肺脏损害的机制也很复杂, 有关因素有: (1)SAP时的肠功能障碍, 菌群失调导致内毒素血症[18]; (2)白细胞的过度激活. 研究发现, 大量多形核白细胞(PMN)过度激活并聚集于肺组织是急性肺损伤早期的基本病理改变, 也是导致急性肺损伤的关键因素[19-22]. 杜成辉 *et al*[23]的实验研究证实, HVHF不仅能清除相关的炎性介质, 而且能促进PMN的凋亡, 减轻由于白细胞过度激活造成的病理损害. 我们的研究结果证实了HVHF组的部分肺损害指标(如: 肺出血、微血栓和透明膜的形成)有改善, 而低容量组则否. ARF在SAP中也较常见. 由于CVVH具有肾脏替代作用, 因此, 不能仅从肾功能指标来评价肾损害, 而应看其病理解剖的变化. 实验显示, SAP的肾损害表现为肾小管上皮细胞刷状缘的脱落和上皮的变性坏死, 肾小球内皮细胞的浊肿以及微血栓的形成. ARF的病理机制也与炎症介质的作用有关[24-26]. 从本实验的结果来看, HVHF有助于肾小球内皮和肾小管上皮损伤的改善, 而低容量血液滤过组则否. 这可能与HVHF对炎性介质的清除作用更为强大有关.

总之, CVVH虽然不能减轻SAP猪胰腺本身的病理损害, 但早期HVHF因其对炎症介质的强大清除效率, 能有效地减轻SAP猪肝细胞变性、肺透明膜和微血栓形成以及肾小管的损伤, 从而改善这些重要脏器的部分功能, 有助于MODS的防治, 达到延长生存时间, 改善其预后的目的.

4 参考文献

1 Jiang HL, Xue WJ, Li DQ, Yin AP, Xin X, Li CM, Gao JL. Influence of continuous veno-venous hemofiltration on the course of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4815-4821

2 Yan XW, Li WQ, Wang H, Zhang ZH, Li N, Li JS. Effects of high-volume continuous hemofiltration on experimental pancreatitis associated lung injury in pigs. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 293-302

3 Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Davenport P, Cole L, Baldwin I, Panagiotopoulos S, Tipping P. Super high flux hemofiltration: a new technique for cytokine removal. *Intensive Care Med* 2002; 28: 651-655

4 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56

5 Yekebas EF, Strate T, Zolmajd S, Eisenberger CF, Erbersdobler A, Saalmuller A, Steffani K, Busch C, Elsner HA, Engelhardt M, Gillesen A, Meins J, The M, Knoefel WT, Izbicki JR. Impact of different modalities of continuous venovenous hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis. *Kidney Int* 2002; 62: 1806-1818

6 李钢, 王凯诚, 陈海平. 活血化瘀药对实验性急性出血坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用. 中国中西医结合外科杂志 2001; 7: 393-395

7 Bank S, Singh P, Pooran N, Stark B. Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 50-60

8 Buter A, Imrie CW, Carter CR, Evans S, McKay CJ. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 298-302

9 Rau BM, Kruger CM, Schilling MK. Anti-cytokine strategies in acute pancreatitis: pathophysiological insights and clinical implications. *Rocz Akad Med Bialymst* 2005; 50: 106-115

10 Honore PM, Joannes-Boyau O. High volume hemofiltration (HVHF) in sepsis: a comprehensive review of rationale, clinical applicability, potential indications and recommendations for future research. *Int J Artif Organs* 2004; 27: 1077-1082

11 李磊, 汤耀卿, 毛恩强, 秦帅, 陈胜, 张明钧. 急性重症胰腺炎血液滤过治疗的机制. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2822-2825

12 赵为国, 方国恩, 杜成辉, 姚宁, 申晓军, 袁伟杰. 高容量血液滤过对多器官功能障碍家猪器官功能和细胞因子的影响. 第二军医大学学报 2004; 25: 1208-1211

13 杨智勇, 王春友, 陶京, 俞建雄, 熊炯炘. 早期血滤对重症急性胰腺炎家猪血浆细胞因子水平的影响. 中华实验外科杂志 2003; 20: 595-597

14 Yang Z, Wang C, Tao J, Xiong J, Wan C, Zhou F. Effect of early hemofiltration on pro- and anti-inflammatory responses and multiple organ failure in severe acute pancreatitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 456-459

15 McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN. Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83: 919-923

16 虞文魁, 李维勤, 李宁, 黎介寿. 急性胰腺炎并发急性肺损伤的影响因素及临床意义. 中国危重病急救医学 2004; 16: 100-102

17 Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-156

18 Windsor JA, Fearon KC, Ross JA, Barclay GR, Smyth E, Poxton I, Garden OJ, Carter DC. Role of serum endotoxin and antiendotoxin core antibody levels in predicting the development of multiple organ failure in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1993; 80: 1042-1046

19 Kyriakides C, Jasleen J, Wang Y, Moore FD Jr, Ashley SW, Hechtman HB. Neutrophils, not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 40-46

20 Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701
21 Wittel UA, Rau B, Gansauge F, Gansauge S, Nussler AK, Beger HG, Poch B. Influence of PMN leukocyte-mediated pancreatic damage on the systemic immune response in severe acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1348-1357
22 Liu XM, Liu QG, Xu J, Pan CE. Microcirculation disturbance affects rats with acute severe pancreatitis following lung injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6208-6211
23 杜成辉, 方国恩, 赵为国, 姚宁, 申晓军, 袁伟杰. 中性粒细胞凋亡在高容量血液滤过防治多器官功能障碍中的变化及意义. 中华实验外科杂志 2005; 22: 879
24 Simmons EM, Himmelfarb J, Sezer MT, Chertow GM, Mehta RL, Paganini EP, Soroko S, Freedman S, Becker K, Spratt D, Shyr Y, Ikizler TA. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 65: 1357-1365
25 Cunningham PN, Dyanov HM, Park P, Wang J, Newell KA, Quigg RJ. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J Immunol* 2002; 168: 5817-5823
26 Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, Miyaji T, McLeroy P, Nibhanupudy B, Li S, Star RA. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001; 60: 2118-2128

■同行评价

SAP的治疗目前还是全球研究的热点和难点, 本研究应用早期持续HVHF的方法有一定的创新性, 课题紧密结合临床, 对临床有一定的指导意义, 是一篇较好的动物实验论文.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

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

1 截稿日期

2006-08-31截稿

2 联系方式

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2186-2191
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

幽门螺杆菌重组VacA–HpaA IgY的制备

叶翠莲, 杨致邦, 黄 伟, 毛小琴, 张绍兰, 黄 进

■背景资料
幽门螺杆菌是慢性胃炎和大部分消化性溃疡的重要病因，并明确为胃癌的危险因素. 世界上超过了一半的人群受到*H pylori*感染，在发展中国家80%以上的成年人感染本菌，且婴幼儿和儿童的感染也很普遍. 在中国，据报道成人感染率在60%以上. 根除*H pylori*感染的的方案很多，如药物的二联、三联以及四联疗法，取得了一定的疗效，但近年来由于广泛、长期应用抗生素，耐药菌株不断增加，同时出现了一些药物副作用，而且患者耐受性、依从性以及经济承受力都是需要面对的问题. 因此研究者们寻找更多的替代药物来预防和治疗*H pylori*感染，最有效的方法是研制免疫制剂.

叶翠莲, 杨致邦, 毛小琴, 黄 进, 重庆医科大学微生物学教研究室 四川省重庆市 400016
黄伟, 西南大学蚕学与生物技术学院生物技术系 四川省重庆市 402460
张绍兰, 四川省成都医学院免疫学教研室 四川省成都市 610083
叶翠莲, 2003年重庆医科大学硕士生, 主要从事幽门螺杆菌感染的防治研究.
通讯作者: 杨致邦, 400016, 重庆市, 重庆医科大学基础医学院微生物学教研室. dryangfm365@sina.com
电话: 023–68485090 传真: 023–68486859
收稿日期: 2006–04–24 接受日期: 2006–05–11

Preparation of egg yolk immunoglubin against recombinant vacuolating cytotoxin A-*Helicobacter pylori* adhesin A in *Helicobacter pylori*

Cui-Lian Ye, Zhi-Bang Yang, Wei Huang, Xiao-Qin Mao, Shao-Lan Zhang, Jin Huang

Cui-Lian Ye, Zhi-Bang Yang, Xiao-Qin Mao, Jin Huang, Department of Microbiology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China
Wei Huang, Department of Biology, College of Biotechnology and Silkworm Science, Southwest University, Chongqing 402460, China
Shao-Lan Zhang, Department of Immunology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Correspondence to: Professor Zhi-Bang Yang, Department of Microbiology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China. dryangfm365@sina.com
Received: 2006-04-24 Accepted: 2006-05-11

Abstract
AIM: To prepare a highly specific and efficient egg yolk immunoglubin (IgY) against recombinant vacuolating cytotoxin A-*Helicobacter pylori* adhesin A (VacA-HpaA) from the yolk of hen's eggs.

METHODS: Recombinant bacteria of pQE30-VacA-HpaA-DH5α was cultured in large numbers to get VacA-HpaA fusion protein. The recombinant protein was purified by Ni^{2+}-NTA column chromatography and used to immunize the hens. The VacA-HpaA IgY was extracted from the yolk of hen's eggs by water-dilution methods. In order to evaluate the relationship between IgY titer and immune time, the titer of IgY was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IgY was purified and concentrated by deposition technique with ammonium sulfate. The purity of IgY was analyzed by SDS-PAGE, and protein content of IgY was checked by Bradford method. The specificities of VacA-HpaA IgY to the antigens of VacA and HpaA were identified by Western blotting.

RESULTS: The recombinant protein was mainly expressed as inclusion body. The content of fusion protein was 0.72 g/L. VacA-HpaA IgY from eggs' yolk of hens immunized with the fusion protein could react with the fusion protein. The titer of VacA-HpaA IgY was increased with the immune time. After purification and concentration, the purity of VacA-HpaA IgY was about 60%; the titer was 1∶128 000; And the concentration of IgY was 22 g/L. Western blot exhibited the protein bands with molecular weight of 27 000 and 30 `000. The titer of VacA-HpaA IgY to VacA and HpaA were 1∶3200 and 1∶6400 ($P < 0.01$).

CONCLUSION: VacA-HpaA-IgY with high concentration, purity, and specificity is successfully prepared.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Fusion protein; Vacuolating cytotoxin A; *Helicobacter pylori* adhesin A; Egg yolk immunoglubin

Ye CL, Yang ZB, Huang W, Mao XQ, Zhang SL, Huang J. Preparation of egg yolk immunoglubin against recombinant vacuolating cytotoxin A-*Helicobacter pylori* adhesin A in *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2186-2191

摘要
目的: 采用基因工程技术大量表达、提纯幽门螺杆菌(*H pylori*)细胞空泡毒素毒性片段，和黏附素片段的融合蛋白，以此为抗原，制备高效价的抗VacA-HpaA蛋黄抗体(IgY).

方法: 大量培养重组菌pQE30-VacA-HpaA-DH5α, 诱导表达获得融合蛋白VacA-HpaA, Ni^{2+}-NTA树脂纯化. 将纯化的重组蛋白免疫鸡, 水稀释法提取IgY, 硫酸铵沉淀法纯化浓缩VacA-HpaA IgY. ELISA法测定抗体产生的时间-效价变化, SDS-PAGE分析纯度, Bradford法测定蛋白含量, Western blot检测其分别对VacA和HpaA抗原的特异性, ELISA法检测效价.

结果: 重组蛋白主要以包涵体形式表达, 免疫鸡后提取的IgY可与该蛋白发生免疫反应, IgY效价总体上随免疫时间增加而升高. 经纯化、浓缩后, 获得纯度为60%左右, 效价为1∶12 800的VacA-HpaA IgY, 蛋白浓度为22 g/L, Western blot显示在M_r27 000和M_r30 000处分别有相应条带, ELISA检测与VacA和HpaA反应的效价分别为1∶3200和1∶6400(P<0.01).

结论: 成功制备了高浓度、高效价的抗重组VacA-HpaA的特异性IgY.

关键词: 幽门螺杆菌; 重组蛋白; 细胞空泡毒素抗原; 黏附素; 蛋黄抗体

叶翠莲, 杨致邦, 黄伟, 毛小琴, 张绍兰, 黄进. 幽门螺杆菌重组VacA-HpaA IgY的制备. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2186-2191

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2186.asp

0 引言

现有的资料表明, 幽门螺杆菌(*H pylori*)是胃炎、胃十二指肠溃疡、胃癌等消化道疾病的重要病原菌[1-8], 1994年国际癌症研究机构将其列为1类致癌原, 清除*H pylori*感染已具有现实的临床意义. 虽然多种抗生素和铋剂的联合应用是清除*H pylori*的有效方法, 但10%-15%的病例由于细菌产生耐药性而治疗失败. 而且随着抗生素的应用, 耐药菌株正在不断增加, 寻找防治*H pylori*感染的有效措施是临床急需解决的问题. 目前, 发现该菌有多种毒力因子, 如尿素酶、细胞空泡毒素抗原(vacuolating cytotoxin antigen, VacA)、黏附素(*H pylori* adhesin A , HpaA)、细胞毒素相关抗原[9-11]等. 在众多的致病物质中, HpaA是主要定植因子, 是致病的先决条件, 为*H pylori*所特有, 能与多种胃上皮细胞表面受体结合, 使*H pylori*紧密黏附于胃上皮细胞, 进而发挥对胃黏膜的损伤作用, 其免疫原性已被证实. 针对HpaA的被动免疫具有预防*H pylori*感染的作用. VacA是引起细胞病变的主要毒力因素, 也是研究得最清楚的一种致病物质. VacA可通过受体介导的内吞作用进入细胞内, 引起内吞作用障碍, 最终导致细胞内空泡样变性; 同时能在胞膜上形成通道, 增强极化上皮单层细胞的渗透性, 最终导致细胞死亡. 针对VacA的被动免疫具有治疗*H pylori*感染所致的细胞损伤作用. Telford *et al*的实验指出, 全菌疫苗不但不能起到清除*H pylori*的作用, 而且会增加人体全身和局部黏膜的不良反应. 单一抗原的保护率低于80%, 二种或二种以上抗原组合的疫苗具有更好的保护效果. 因此针对VacA-HpaA融合蛋白的防治措施具有重要价值.

蛋黄抗体(egg yolk immunoglubilin, IgY)是母鸡接受免疫后血液中的免疫球蛋白IgG选择性转移到卵黄中形成的抗体[12-13]. 因其具有优越的生物学活性和较高的稳定性, 且采集方便, 产量高, 具有产业化生产价值, 许多学者将其制成各种针对特异性病原的口服制剂, 用于防治肠道感染性疾病, 已取得满意效果[14-19]. 本文旨在制备抗*H pylori*重组VacA-HpaA的IgY[20-25], 为制备集预防和治疗为一体的, 抗*H pylori*感染的特异性口服制剂奠定基础.

■相关报道

大量文献显示, IgY技术正成为医药领域的新热点, 他适于生产特异性抗体, 其被动免疫功能可以用于抗病毒和细菌性疾病, 具有开发功能性食品和新药的潜能, 用特异性IgY治疗腹泻等胃肠道疾病已经在兽医学中广泛应用. Lee *et al*(2002)在体外实验中发现特异性IgY能有效防治人沙门氏菌性肠炎. Sarker *et al*(2001)报道口服特异性IgY可以治疗儿童轮状病毒腹泻. 王忠泽 *et al*(2002)报道了抗大肠杆菌O157∶H7鸡蛋黄抗体的制备及被动保护作用, 通过动物实验表明IgY是治疗肠道感染的一种有潜力的口服药物. Mine *et al*(2002)总结了IgY的治疗作用后表明口服IgY是抗人胃肠道病原的有效防治制剂.

1 材料和方法

1.1 材料 DH5α菌株和pQE30质粒, 源于重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 本室保存. 重组菌pQE30-v/h-DH5α由本室构建并保存[2]. VacA和HpaA[3]重组蛋白由本室制备. 114日龄立克体产蛋母鸡, 西南大学荣昌校区生物中心提供. HRP标记羊抗鸡IgY为Promega公司产品. 蛋白质marker为深圳晶美公司产品. Ni^{2+}-NTA亲合层析柱为Qiagen公司产品. 琼脂粉为日本公司产品. IPTG、SDS、DTT、EDTA、丙烯酰胺、N, N'-亚甲丙烯酰胺、考马斯亮蓝R250、考马斯亮蓝G250均为Sigma公司产品. 胰蛋白胨、酵母抽提物均为Difco公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组VacA-HpaA蛋白的大量表达 挑取一个含有重组质粒pQE30-v/h的阳性克隆DH5α菌落接种于LA培养基5 mL中, 同时以含空pQE30质粒的DH5α和空DH5α为对照, 37℃ 150 r/min振摇过夜培养. 按1∶20比例, 吸取菌液转种于盛有100 mL LA培养基的培养瓶中, 于37℃培养至A_{570} = 0.6时, 加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG, 诱导表达4 h. 收集菌液, 4℃ 6000 r/min

■**创新盘点**
VacA和HpaA作为*H pylori*的重要毒力因子, 也是制备疫苗的重要候选抗原, 两者均具有良好的免疫原性, 用VacA-HpaA融合蛋白所制备的IgY将既能阻止*H pylori*黏附又能中和*H pylori*细胞毒性, 现今尚无报道.

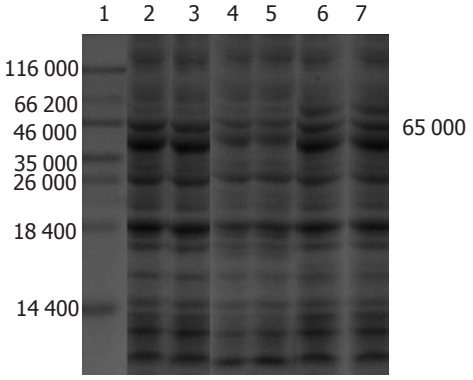


图 1 重组蛋白表达形式的鉴定. 1: protein marker; 2,3: pQE30−v/h−DH5α induced without IPTG; 4,5: supernatant of pQE30−v/h−DH5α induced with IPTG; 6,7: precipitation of pQE30−v/h−DH5α induced with IPTG.

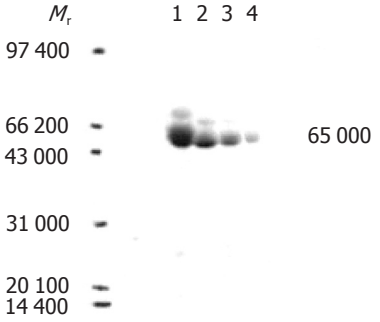


图 2 纯化的重组VacA−HpaA的SDS−PAGE分析. M_r: protein marker; 1−4: purified recombinant protein (E1, E2, E3, E4).

离心10 min, 弃上清, 沉淀物按3 mL/g湿菌的比例加入超声破碎缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl)碎菌. 然后4℃ 8000 r/min离心40 min, 分别收集沉淀与上清. 120 g/L SDS-PAGE分析重组蛋白的表达形式. 在细菌破碎物的沉淀中加入包涵体裂解液(50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl, 8 mol/L尿素), 4℃裂解4 h, 然后4℃, 12 000 r/min离心15 min, 收集上清, 用Ni^{2+}-NTA树脂亲和层析进行纯化. 120 g/L SDS-PAGE分析纯度, Bradford法测定蛋白含量.

1.2.2 *母鸡免疫和IgY的分离* 用纯化的重组VacA-HpaA和等量完全弗氏佐剂混合, 并充分研磨乳化作为抗原, 胸部肌肉多点注射免疫114日龄立克体母鸡, 第1次免疫剂量为100 μg/只; 15 d后进行第2次免疫, 剂量为200 μg/只; 之后每隔1 mo进行第3次免疫和加强免疫, 剂量均为300 μg /只. 第2次免疫后1 wk开始收集鸡蛋4℃保存备用. 采用水稀释结合氯仿有机沉淀法. 具体步骤为: 用一次性注射器取出蛋黄液; 加入与蛋黄液等体积的生理盐水稀释并用力摇匀; 加入2倍体积的氯仿, 摇匀后静置过夜; 离心留上清, 即含有IgY, 4℃保存备用.

1.2.3 *建立检测VacA-HpaA IgY的间接ELISA法* 以融合蛋白为抗原, 用包被液倍半稀释为40.0-2.0 mg/L, 每孔100 μL包被聚苯乙烯反应板, 酶标羊抗鸡IgY用酶稀释液作1∶10 000-1∶100 000稀释, 方阵滴定法确定最佳抗原包被浓度和酶标二抗工作浓度. 测定20份免疫前的鸡蛋的A_{570}值, 取其平均值作为阴性对照. 测定免疫后提取的IgY, 以免疫后与免疫前IgY的A_{570}值之比大于2.1判为阳性. 将未免疫和第1次免疫后不同时间提取的IgY用样品稀释液稀释成一定浓度, 用所建立的ELISA法测定其效价. 将免疫后110-120 d提取的IgY混合, 用常规饱和硫酸铵法纯化. 用已建立的ELISA法测定IgY效价. 120 g/L SDS-PAGE检测IgY的纯度; Bradford法测定蛋白含量. 分别以重组蛋白的VacA和HpaA为包被抗原, 建立检测VacA和HpaA IgY的ELISA法.

1.2.4 *IgY的特异性检测* 采用western blot分析, 分别将纯化的融合蛋白VacA, HpaA抗原120 g/L SDS-PAGE. 将凝胶靠近阴性一侧, NC膜靠近阳性一侧, 在150 V条件下转移2 h, 取出NC膜, 用PBS洗涤4次, 每次5 min, 然后加封闭液, 室温封闭非特异性位点, 用PBS同上洗膜. 然后, 加上融合蛋白 IgY(37℃作用2 h, 用PBS同上洗膜)和HRP标记的羊抗鸡IgY二抗(37℃作用2 h, 用PBS同上洗膜). 最后, 将NC膜浸泡在DAB显色剂中10-15 min, 用双蒸水冲洗, 以终止染色.

2 结果

2.1 *重组VacA-HpaA的表达纯化和定量* SDS-PAGE分析表明, 破碎菌的沉淀物可见明显特异蛋白表达带, 薄层扫描分析表明, 目的蛋白表达量为86%, 上清液中无明显表达带, 表明融合蛋白主要以包涵体形式表达(图1). 将收集的破碎菌的沉淀洗涤后变性溶解, 以NI^{2+}-NTA柱纯化, 经SDS-PAGE和图像分析表明, 纯化产物主要存在于前3管洗脱液中, 纯度为90%(图2). Bradford法测定蛋白含量为0.72 g/L.

2.2 *检测IgY的间接ELISA法* 方阵滴定法确定抗原包被浓度为10 g/L, 酶标二抗的稀释度为1∶40 000, 20份免疫前IgY标本检测结果, A_{570}平均值为0.134, 按P>2.1N判为阳性, 即A_{570}>0.281时, 判为阳性, A_{570}≤0.281判为阴性. 在上述实验条件下, VacA-HpaA IgY效价可达1∶6400. ELISA法检测结果发现, 免疫时间和抗体效价的变化

表 1 纯化浓缩IgY与VacA和HpaA反应的效价 (mean ± SD)

项目 A_{570}	稀释度						
	1∶400	1∶800	1∶1600	1∶3200	1∶6400	1∶128 00	1∶25 600
VacA A_{570}	0.75 ± 0.03[b]	0.46 ± 0.04[b]	0.31 ± 0.03[b]	0.23 ± 0.01[b]	0.10 ± 0.02[b]	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.01
HpaA A_{570}	0.85 ± 0.05[b]	0.74 ± 0.04[b]	0.59 ± 0.02[b]	0.32 ± 0.03[b]	0.25 ± 0.03[b]	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.04

[b]P<0.01.

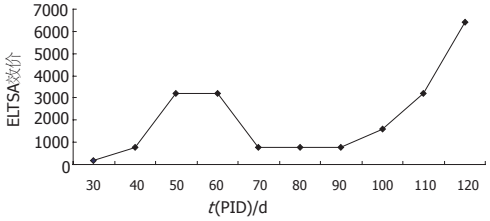


图 3 免疫时间与抗体效价变化. PID: 第1次免疫后的时间.

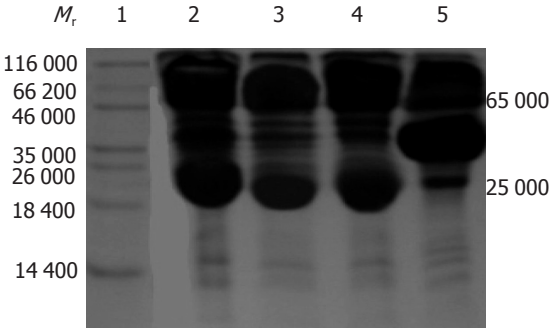


图 4 纯化浓缩后IgY的SDS-PAGE分析. 1: protein marker; 2-5: purified recombinant protein.

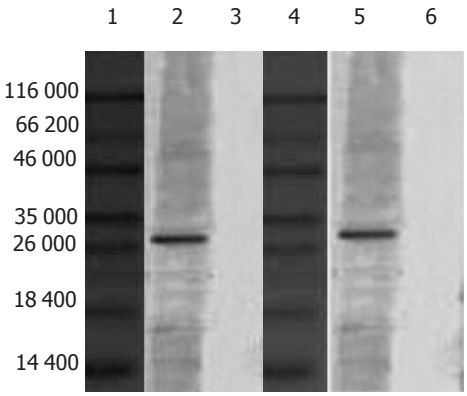


图 5 VacA-HpaA IgY的Western blot鉴定. 1,4: protein marker; 3,6: control(without induction); 2: VacA-HpaA IgY responsed with VacA; 5: VacA-HpaA IgY responsed with HpaA.

总体上呈上升趋势: 在第1次免疫后30 d(PID30)左右抗体效价达到1∶200, 在50 d时可达1∶3200, 并保持了1 mo. 但随后至70 d时A_{570}值下降到1∶800, 直至100 d方开始回升, 至120 d时可达1∶6400, 免疫时间与抗体效价变化(图3).

2.3 纯化浓缩后IgY的效价、蛋白浓度和纯度 纯化浓缩后IgY效价为1∶12 800, 蛋白浓度为22 g/L. 在样品缓冲液中含100 mmol/L DTT时, IgY的二硫键被拆开, 经120 g/L SDS-PAGE电泳见2条带(图4). IgY纯度约为60%左右, 重链的分子质量为65 kDa左右, 轻链为24 kDa左右. 两条重链与两条轻链之和与总分子质量180 kDa相符合.

2.4 融合蛋白IgY的特异性 NC膜显色后分别在相对分子质量约27 000和30 000处出现相应的条带, 与预期值一致, 表明该融合蛋白同时能与VacA, HpaA两种蛋白发生反应(图5).

2.5 融合蛋白IgY与VacA, HpaA反应的效价 方阵滴定法确定工作浓度是: VacA和HpaA抗原包被浓度分别为7.5 mg/L和10 mg/L, 样品稀释度为1∶100时, 酶标羊抗鸡IgY的稀释度为1∶40 000, 阴性IgY平均值为0.142. 在上述实验条件下, 按P>2.1N判为阳性, A_{570}>0.298时, 判为阳性, A_{570}≤0.298判为阴性. 测得浓缩后IgY分别与VacA和HpaA反应的效价可达1∶3200和1∶6400(表1).

3 讨论

口服特异性IgY替代抗生素可以成功地治疗许多胃肠道疾病, 近年来报道较多[26-31], 如抗轮状病毒的IgY. 在抗*H pylori*感染中, 以研究抗尿素酶IgY较多[32-34]. Nomura *et al*[22]用抗尿素酶IgY治疗感染*H pylori*的沙鼠模型, 结果显示规律服用IgY不仅能预防*H pylori*对沙鼠的感染, 而且能抑制所感染的*H pylori*生长. Sasazuki *et al*[6]用抗尿素酶IgY对志愿者进行实验, 结果17名^{13}C-尿素呼气实验阳性的志愿者, 在按规定口服该IgY 4 wk后其检测值明显降低. 这些结果为抗*H pylori* IgY的应用提供了实验依据. Lehours *et al*报道, 如果一种蛋白能够包括*H pylori*的两种或多种有效抗原成分, 刺激机体将会产生多重免疫保护性反应, 有利于防治*H pylori*的感染.

大量研究表明, VacA和黏附素是*H pylori*引发疾病的主要致病因子, 影响*H pylori*在胃内定植的因素有很多, 如鞭毛、尿素酶、热休

■应用要点

自从1893年Klemperer发现鸡蛋中存在抗体以来, IgY技术正成为医药领域的新热点. 与产生于哺乳动物的IgG相比, IgY具有许多独特的优点. 本实验中的IgY尚需做进一步的体内外实验证实其实用性, 为确定其集预防与治疗为一体的口服疫苗打下良好的基础.

■同行评价
本研究成功制备了融合蛋白VacA-HpaA IgY. 文章选题准确, 实验设计合理, 目的明确, 具有科学性、创新性和可读性, 较好地反映了我国目前在胃肠病学基础和临床对*H pylori*的研究水平.

克蛋白、黏附因子、过氧化物歧化酶等, 其中的关键环节是黏附, 宿主细胞的特异性黏附由黏附素受体系统介导, 依赖于黏附分子上某些特定的氨基酸位点与受体的结合. HpaA基因为*H pylori*所特有, 编码保守的HpaA能与多种胃上皮细胞表面受体结合, 使*H pylori*紧密黏附于胃上皮细胞, 进而发挥对胃黏膜的损伤作用. 而VacA是*H pylori*引起细胞损伤的重要的致病物质. 如能制备二者融合蛋白的IgY, 将既能阻止*H pylori*黏附又能中和*H pylori*细胞毒性, 应有更好的抗*H pylori*感染效果. 为此我们制备了融合蛋白VacA-HpaA IgY, 国内外尚未见报道. 通过Western blot法表明, 该IgY可分别与VacA和HpaA反应, 即同时具有VacA和HpaA的抗体活性, 这表示他既可阻止*H pylori*在胃内定植, 又可中和VacA的细胞毒性作用, 为进一步制备防治*H pylori*的IgY抗体制剂打下了良好的基础. 经ELISA检测VacA-HpaA IgY对VacA和HpaA的效价分别为1∶3200和1∶6400, 该效价略低于与融合蛋白抗原反应时的效价, 可能是因为在VacA-HpaA融合基因构建过程中VacA和HpaA的部分有效基因被覆盖, 导致所表达的融合蛋白所产生的IgY分别对VacA和HpaA反应的效价降低.

抗原免疫后IgY效价通常是与免疫时间成正比的, 而我室制备的VacA-HpaA IgY的时间效价变化曲线未完全随时间递增, 首次免疫60-70 d时, 效价从60 d的1∶3200降到1∶800, 且持续了20 d, 第100 d后又迅速递增, 120 d时达到1∶6400. 分析其原因可能是在60至100 d时的鸡蛋收回后未能及时提取IgY, 以至提取时其效价已降低. 如果采蛋后立刻提取IgY, 4℃冷藏保存其效价则可保存效长时间.

在制备IgY的过程中, 纯化的方法很多[35], 其中以水稀释最为常用, 且效率高、纯度高, 简便实用, 适合大规模制备. 进一步纯化IgY的最好的方法是亲和层析, 得到的IgY纯度可达90%以上, 但在洗脱过程中可能会造成IgY变性, 产率也低. 因此本实验用水稀释结合氯仿有机沉淀法提取IgY后, 再用浓度为25%-40%的硫酸铵沉淀IgY, 纯化并浓缩IgY, 纯度可达60%左右, 蛋白含量为22 g/L, 抗体效价达1∶12 800, 并有效保证了其抗体活性, 可满足本实验的要求. 本实验进一步为制备集预防和治疗性为一体的抗*H pylori*感染的IgY口服制剂奠定了基础.

4 参考文献

1 Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Yamamoto S, Ikeda S, Hanaoka T, Tsugane S. Effect of *Helicobacter pylori* infection combined with CagA and pepsinogen status on gastric cancer development among Japanese men and women: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1341-1347

2 Akbulut M, Demirkan N, Duzcan E. PCNA expression in chronic gastritis due to *Helicobacter pylori* . *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 84-89

3 The frequency and resistance of cytotoxin-associated (CAG-A) *Helicobacter pylori* strains to antibacterial agents in chronic gastritis and duodenal ulcer. *Klin Med (Mosk)* 2006; 84: 51-54

4 Rai SK, Shah RD, Bhattachan CL, Rai CK, Ishiyama S, Kurokawa M, Ono K, Uga S. *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal problem among the Nepalese. *Nepal Med Coll J* 2006; 8: 9-13

5 Harder J, Opitz OG. Gastric cancer--risk factors and medical therapy. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2006; 95: 1021-1028

6 Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Yamamoto S, Ikeda S, Hanaoka T, Tsugane S. Effect of *Helicobacter pylori* infection combined with CagA and pepsinogen status on gastric cancer development among Japanese men and women: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1341-1347

7 Ignasi Elizalde J, Pique JM. Risk assessment in relatives of gastric cancer patients: hyperproliferation, genetics, and *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 877-879

8 Frieling T. The clinical impact of capsule endoscopy: to believe or not to believe. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 873-874

9 Boonjakuakul JK, Canfield DR, Solnick JV. Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression *in vitro* and in the Rhesus macaque. *Infect Immun* 2005; 73: 4895-4904

10 Yan J, Mao YF, Shao ZX. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 421-425

11 Muller I, Medina-Selby A, Palacios JL, Martinez P, Opazo P, Bruce E, Mancilla M, Valenzuela P, Yudelevich A, Venegas A. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H pylori* strain with other *H pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. *Biol Res* 2002; 35: 67-84

12 Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* 2005; 33: 129-154

13 Gasparyan VK. Hen egg immunoglobulin Y in colloidal gold agglutination assay: comparison with rabbit immunoglobulin G. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 124-127

14 Motoi Y, Inoue S, Hatta H, Sato K, Morimoto K, Yamada A. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies

virus proteins produced in Escherichia coli. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 115-118
15 Sunwoo HH, Wang WW, Sim JS. Detection of Escherichia coli O157:H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunol Lett* 2006
16 Miyamoto K, Shimamoto T, Aosasa M, Kimura S, Nakamura N, Okubo Y, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Development of recombinant chicken IgY from single chain fragment of variable region for diagnosis of BSE. *Biologicals* 2006
17 Girard F, Batisson I, Martinez G, Breton C, Harel J, Fairbrother JM. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46: 340-350
18 Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Can J Vet Res* 2006; 70: 62-64
19 Malik MW, Ayub N, Qureshi IZ. Passive immunization using purified IgYs against infectious bursal disease of chickens in Pakistan. *J Vet Sci* 2006; 7: 43-46
20 Fu CY, Huang H, Wang XM, Liu YG, Wang ZG, Cui SJ, Gao HL, Li Z, Li JP, Kong XG. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. *J Virol Methods* 2006; 133: 112-115
21 Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* 2005; 33: 129-154
22 Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005; 10: 43-52
23 Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 185-192
24 Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-*Helicobacter pylori* urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of *H pylori* urease. *J Med Microbiol* 2004; 53: 31-34
25 Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1061-1066
26 Wang WH, Wang WJ, Zhang BX. Effect of IgY solution on dental plaque. *Zhonghua KouQiang YiXue ZaZhi* 2003; 38: 417-419
27 Fan M, Jiang Q, Bian Z. The study on specific anti-Streptococcus mutans IgY against dental caries in rats. *HuaXi KouQiang YiXue ZaZhi* 2003; 21: 339-341
28 Larsson A, Carlander D. Oral immunotherapy with yolk antibodies to prevent infections in humans and animals. *Ups J Med Sci* 2003; 108: 129-140
29 Wu C, Yang R, Zhou J, Bao S, Zou L, Zhang P, Mao Y, Wu J, He Q. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *J Immunol Methods* 2003; 277: 157-169
30 Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejaker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent Pseudomonas aeruginosa infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35: 433-440
31 Zhang WW. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discov Today* 2003; 8: 364-371
32 Kazimierczuk K, Cova L, Ndeboko B, Szczyrk U, Targosz A, Brzozowski T, Sirko A. Genetic immunization of ducks for production of antibodies specific to *Helicobacter pylori* UreB in egg yolks. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 261-266
33 Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 185-192
34 Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-*Helicobacter pylori* urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of *H pylori* urease. *J Med Microbiol* 2004; 53: 31-34
35 Cook CL, Pao W, Firca JR, Anderson BE, Fryer JP. Simple purification methods for an alphagalactose-specific antibody from chicken eggs. *J Biosci Bioeng* 2001; 91: 305-310

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2192-2198
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

胃癌组织中肿瘤相关基因甲基化及其表达与叶酸和代谢酶MTHFR基因多态性的关系

翁玉蓉, 房静远, 孙丹凤, 陈朝飞, 陆 嵘, 顾伟齐, 朱红音

■**背景资料**
胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤, 其发生、发展与癌基因的过度表达和抑癌基因的失活等有关. 胃癌源于黏膜上皮细胞, 本文不以血液标本为研究对象, 而是以胃黏膜组织为研究对象, 平行观察了胃癌组织中多种肿瘤相关基因的甲基化状态及其表达与叶酸水平和代谢酶MTHFR基因多态性之间的关系.

翁玉蓉, 房静远, 孙丹凤, 陈朝飞, 陆嵘, 顾伟齐, 朱红音, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
翁玉蓉, 2006年获上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科硕士学位, 主要从事表观遗传修饰与消化系肿瘤关系的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30470781
上海市科委重大项目, No. 04DZ14006
上海市重点学科建设项目, No. Y0205
通讯作者: 房静远, 200001, 上海市山东中路145号, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com
电话: 021-63200874
收稿日期: 2006-05-15 接受日期: 2006-05-26

Methylation and expression of tumor-related genes and their associations with folate and MTHFR gene polymorphisms in gastric cancerous tissues

Yu-Rong Weng, Jing-Yuan Fang, Dan-Feng Sun, Zhao-Fei Chen, Rong Lu, Wei-Qi Gu, Hong-Yin Zhu

Yu-Rong Weng, Jing-Yuan Fang, Dan-Feng Sun, Zhao-Fei Chen, Rong Lu, Wei-Qi Gu, Hong-Yin Zhu, Shanghai Institute of Digestive Diseases; the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China
Supported by Natural Science Foundation of China, No. 30470781; the Key Project Foundation of Science Committee, No. 04DZ14006; and the Key Subject Foundation of Shanghai Municipality, No. Y0205
Correspondence to: Dr. Jing-Yuan Fang, Shanghai Institute of Digestive Disease, the Affiliated Hospital of Shanghai Jiaotong University. Shanghai 200001, China. jingyuanfang@yahoo.com
Received: 2006-05-15 Accepted: 2006-05-26

Abstract

AIM: To investigate the methylation and expression of *c-myc* oncogenes, $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1}$, h*MLH1* and h*MSH2* tumor suppressor genes, and their associations with folate and methyl enetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms in gastric cancerous tissues.

METHODS: Paired samples of primary gastric cancer and corresponding para-cancerous, non-cancerous gastric mucosa were obtained from surgically resected specimens of 38 patients, and the latter were used as controls. Folate concentration was detected by FOL ACS: 180 automated chemiluminescence system. Two common polymorphisms of MTHFR gene were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The mRNA expression of tumor-related gene was detected by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR). The methylation status of gene promoter was determined by methylation-specific PCR (MSP).

RESULTS: Up-regulation of *c-myc*, down-regulation of $p16^{INK4A}$, h*MLH1* and h*MSH2* expression were associated with the aberrant methylation of gene promoters in gastric canceous mucosae, while $p21^{WAF1}$ expression was not. Down-regulation of $p21^{WAF1}$ and h*MSH2* expression, hypermethylation of $p16^{INK4A}$ were associated with low folate level. Over-expression and hypomethylation of *c-myc* coexisted with low folate level. 677CC genotype of MTHFR showed hypermethylation and down-regulation of $p16^{INK4A}$ expression, and there was no significant relationship between the two common polymorphisms of MTHFR and the methylation and expression of the other tumor-related genes.

CONCLUSION: DNA methylation plays an important role in human gastric carcinogenesis. Folate level and MTHFR gene polymorphisms may regulate the expression of tumor-related genes by affecting the methylation status.

Key Words: Gastric cancer; Tumor-related genes; DNA methylation; Folate; Methylenetetrahydrofolate reductase; Gene polymorphism

Weng YR, Fang JY, Sun DF, Chen ZF, Lu R, Gu WQ, Zhu HY. Methylation and expression of tumor-related genes and their associations with folate and MTHFR gene polymorphisms in gastric cancerous tissues. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2192-2198

摘要

目的: 探讨人胃癌组织中癌基因*c-myc*, 抑癌基因$p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1}$, 错配修复基因h*MLH1*

和h*MSH2*的甲基化状态及其表达与叶酸、MTHFR基因多态性的关系.

方法: 胃癌38例手术切除标本的癌区、癌旁和外周正常黏膜组织, 运用FOL ACS: 180自动化学发光系统测定叶酸含量, PCR-RFLP技术检测MTHFR基因677 (C→T)和1298 (A→C)两个常见多态, 并分别以Real-time RT-PCR和甲基化特异性PCR (MSP)技术检测肿瘤相关基因的表达和甲基化状态.

结果: *c-myc*表达升高, $p16^{INK4A}$, h*MLH1*和h*MSH2*表达降低的胃癌黏膜组织其基因启动子区异常甲基化. $p21^{WAF1}$, h*MSH2*表达降低, $p16^{INK4A}$高甲基化者叶酸水平明显降低, *c-myc*低甲基化和表达升高者中均存在低叶酸水平. MTHFR 677CC基因型的胃癌黏膜组织$p16^{INK4A}$甲基化升高且表达降低, 而其余肿瘤相关基因的甲基化及其表达与MTHFR两个常见多态均无明显相关性.

结论: DNA甲基化在胃癌的发生、发展中具有重要作用, 叶酸水平和MTHFR基因多态性通过影响部分肿瘤相关基因的甲基化状态而调控其表达.

关键词: **胃癌; 肿瘤相关基因; DNA甲基化; 叶酸; MTHFR; 基因多态性**

翁玉蓉, 房静远, 孙丹凤, 陈朝飞, 陆峡, 顾伟齐, 朱红音. 胃癌组织中肿瘤相关基因甲基化及其表达与叶酸和代谢酶MTHFR基因多态性的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2192-2198
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2192.asp

0 引言

DNA甲基化是表观遗传修饰的主要内容之一, 他通过影响癌基因和抑癌基因的表达以及基因组的稳定性而参与肿瘤的发生与发展. 叶酸是主要的甲基基团供体, 叶酸缺乏通过破坏总基因DNA低甲基化、DNA合成与修复失常而发挥致癌作用[1]. 亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢途径的关键酶之一, 他有2个常见多态, 即677 (C→T)和1298 (A→C). 突变的基因型增加酶的热不稳定性并降低其活性, 从而影响DNA甲基化和核酸的稳定性[2-4]. 胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤, 其发生、发展与癌基因的过度表达和抑癌基因的失活等有关. 我们研究胃癌发生、发展过程中叶酸和代谢酶MTHFR基因多态性对癌基因*c-myc*, 抑癌基因$p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1}$, 错配修复基因h*MLH1*和h*MSH2*的甲基化状态及其表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-07/2005-01组织学确诊为胃癌的手术患者38例. 年龄31-91(平均61.7±14.7)岁, 其中≥60岁22例, <60岁16例. 男25例, 女13例. 肿瘤直径≥5 cm 20例, <5 cm 18例. 淋巴结转移20例, 无转移18例. TNM临床分期: Ⅰ期5例, Ⅱ期21例, Ⅲ期12例. 标本分为3部分, 癌区组织取自癌灶中央非坏死部分, 癌旁组织取自距癌灶边缘5 cm以内的黏膜组织, 外周正常组织取自距癌灶边缘5 cm以上的黏膜组织, 切除后立即置液氮冻存. 病例临床资料完整, 并且术前均未进行任何抗肿瘤治疗. 所有标本均经本院2位高年资病理科医生证实. 全部病理诊断基于HE染色和根据WHO组织学诊断标准. 癌旁组织的病理学特征为炎症, 部分伴有肠化和异型增生.

1.2 方法 组织叶酸含量检测和MTHFR基因型检测见文献[5]. 肿瘤相关基因的表达运用Real-time RT-PCR技术. (1)分别提取不同来源组织RNA (Trizol, Gibco BRL); (2)逆转录50 μL体系中将10 μg RNA逆转录为cDNA; (3)Real-time PCR采用定量PCR中的相对定量法, 以β-actin作为内参照, 同时以外周正常组织为基准, 癌区和癌旁组织RNA的肿瘤相关基因(x)表达量均表达成外周正常组织的N倍即(Nx). 每次定量反应后产物都经30 g/L琼脂糖电泳证明为所需扩增的片段. 通常情况下, 正常组织此值将位于0.3-3.0之间, Nx≥3为表达升高, 而≤0.3为表达降低[6]. 反应条件94℃ 5 min, 92℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40个循环. 每次反应均作3复孔, CT取其均值. 引物和探针序列见表1. 肿瘤相关基因甲基化分析: (1)分别提取不同来源组织DNA (QlAamp DNA Mini Kit); (2)DNA亚硫酸氢盐处理(CpGenome™ Universal DNA Modification Kit, Chemicon): DNA经过亚硫酸氢盐的化学修饰, 单链DNA中的所有的非甲基化的胞嘧啶都会发生脱氨基作用而转变成尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶则不被修饰, 仍保持5-甲基胞嘧啶状态; (3)甲基化特异性PCR (MSP): 引物序列及PCR扩增条件见表2; (4)PCR产物采用20 g/L琼脂糖电泳, 生物电泳图像系统分析结果.

$$Nx = 2^{-\triangle\triangle Ct}$$

△△Ct = △Ct样品-△Ct基准 = (Ct样品x-Ct样品β-actin)-(Ct基准x-Ct基准β-actin)

■同行评价

文章平行观察了胃癌组织中多种癌相关基因的甲基化状态与叶酸水平及MTHFR之间关系, 发现叶酸水平和MTHFR基因多态性可以影响部分肿瘤相关基因的甲基化状态. 本研究内容较为前沿, 同时检测指标较多, 工作量较大, 研究结果具有一定指导意义.

表 1 定量PCR引物及探针序列

基因	正义引物(5'–3')	反义引物(5'–3')	探针	基因登录号
β–actin	CTG GCA CCC AGC ACA ATG	GGA CAG CGA GGC CAG GAT	ATC ATT GCT CCT CCT GAG	BC016045
$p16^{INK4A}$	CAT AGA TGC CGC GGA AGG T	CAG AGC CTC TCT GGT TCT TTC AA	CCT CAG ACA TCC CCG	NM_058197
$p21^{WAF1}$	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA	GGA TTA GGG CTT CCT CTT GGA	ACG GCG GCA GAC CAG CAT GA	NM_078467
c–myc	ACA CCG CCC ACC ACC AG	CCA CAG AAA CAA CAT CGA TTT CTT	AGC GAC TCT GAG GAG G	V00568
h*MLH1*	GGC CAG CTA ATG CTA TCA AAG AG	CTT TAA CAA TCA CTT GAA TAC TTG TGG A	ATT GAG AAC TGT TTA GAT GCA	U07418
h*MSH2*	ATC CAA GGA GAA TGA TTG GTA TTT G	CAA AGA GAA TGT CTT CAA ACT GAG AGA	CAT ATA AGG CTT CTC CTG GC	U04045

表 2 MSP引物序列及PCR扩增条件

基因	正义引物(5'–3')	反义引物(5'–3')	反应条件	基因登录号
$p16^{INK4A}$ (M)	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA	95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	X94154
$p16^{INK4A}$ (U)	GGG GGA GAT TTA ATT TGG	CCC TCC TCT TTC TTC CTC	95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	X94154
$p21^{WAF1}$ (M)	TGT AGT ACG CGA GGT TTC G	TCA ACT AAC GCA ACT CAA CG	95℃ 5 min; 95℃ 40 s, 60℃ 40 s, 72℃ 40 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	NM_007592
$p21^{WAF1}$ (U)	TTT TTG TAG TAT GTG AGG TTT TGG	AAC ACA ACT CAA CAC AAC CCT A	95℃ 5 min; 95℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 40 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	NM_007592
c–myc (M) (exon1–2)	TAG AAT TGG ATC GGG GTA AA	CGA CCG AAA ATC AAC GCG AAT	95℃ 5 min; 95℃ 1 min, 56℃ 2 min, 72℃ 3 min, 5 cycles; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 5 min	AF002859
c–myc (U) (exon1–2)	TAG AAT TGG ATT GGG GTA AA	CCA ACC AAA AAT CAA CAT GAA T	95℃ 5 min; 95℃ 1 min, 56℃ 2 min, 72℃ 3 min, 5 cycles; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 5 min	AF002859
h*MLH1* (M)	ACG TAG ACG TTT TAT TAG GGT CGC	CCT CAT CGT AAC TAC CCG CG	95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	AB017806
h*MLH1* (U)	TTT TGA TGT AGA TGT TTT ATT AGG GTT GT	ACC ACC TCA TCA TAA CTA CCC ACA	95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	AB017806
h*MSH2* (M)	TCG TGG TCG GAC GTC GTT C	CAA CGT CTC CTT CGA CTA CAC CG	95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	AB006445
h*MSH2* (U)	GGT TGT TGT GGT TGG ATG TTG TTT	CAA CTA CAA CAT CTC CTT CAA CTA CAC CA	95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 cycles; 72℃ 5 min	AB006445

统计学处理 采用SAS 6.12统计软件包进行统计处理. 通过方差分析进行均数间两两比较, 两样本率比较用确切概率计算法, $P<0.05$为差异有显著性.

2 结果

2.1 肿瘤相关基因在胃癌组织中的表达 与外周正常组织相比, 胃癌区组织中$p21^{WAF1}$, h*MLH1*和h*MSH2*表达降低, *c-myc*表达升高($P<0.05$), 而$p16^{INK4A}$则无统计学显著差异($P>0.05$); 胃癌旁组织中h*MLH1*表达降低, *c-myc*表达升高($P<0.05$), 其余则无显著差异($P>0.05$, 表3).

2.2 叶酸和肿瘤相关基因表达的关系 $p21^{WAF1}$和h*MSH2*表达降低的胃癌区组织叶酸含量明显

表 3 肿瘤相关基因在胃癌组织中的表达 *n* (%)

基因	组织	表达升高	无变化	表达降低	Nx
*p*16^{INK4A}	癌旁	2 (5.3)	22 (57.9)	14 (36.8)	0.78 ± 0.82
	癌区	2 (5.3)	13 (34.2)	23 (60.5)	0.70 ± 0.93
*p*21^{WAF1}	癌旁	3 (7.9)	22 (57.9)	13 (34.2)	0.93 ± 1.01
	癌区	2 (5.3)	14 (36.8)	22 (57.9)	0.70 ± 0.86[a]
h*MLH1*	癌旁	1 (2.6)	20 (52.6)	17 (44.7)	0.66 ± 0.92[a]
	癌区	2 (5.3)	14 (36.8)	22 (57.9)	0.61 ± 0.86[a]
h*MSH2*	癌旁	2 (5.3)	20 (52.6)	16 (42.1)	0.82 ± 1.22
	癌区	1 (2.6)	17 (44.7)	20 (52.6)	0.68 ± 0.85[a]
c–myc	癌旁	14 (36.8)	21 (55.3)	3 (7.9)	2.76 ± 3.44[b]
	癌区	19 (50.0)	15 (39.5)	4 (10.5)	3.27 ± 2.88[b]

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

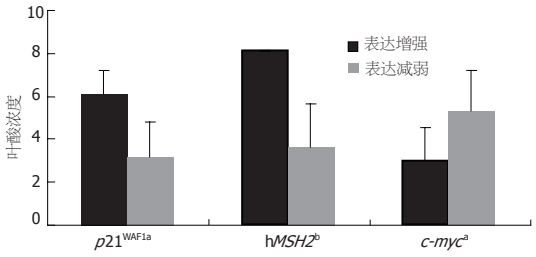


图 1 叶酸和肿瘤相关基因表达的关系. [a]$P = 0.02$, [b]$P = 0.01$.

低于表达升高者(图1), *c-myc*表达升高的胃癌区组织叶酸含量明显低于表达降低者(P<0.05), 而*p*16^{INK4A}和h*MLH1*表达与叶酸含量无明显相关(P>0.05).

2.3 MTHFR基因多态性与肿瘤相关基因表达及甲基化的关系 (1)677 (C→T)位点: h*MSH2*表达降低的胃癌区组织以CC基因型最多见, 其mRNA表达明显低于CT基因型, 与TT基因型相比有降低趋势; *p*21^{WAF1}以CT基因型最多见, 与CC基因型相比有降低趋势; h*MLH1*则以CC基因型最多, 与TT基因型相比有降低趋势; 而*p*16^{INK4A}以CC基因型最多, 与其余两种基因型相比无显著差异. *c-myc*表达升高的胃癌区组织以CT基因型最多见, 其mRNA表达明显高于CC基因型. (P<0.05) *p*16^{INK4A}, *c-myc*甲基化紊乱以CC基因型多见, *p*21^{WAF1}, h*MLH1*和h*MSH2*以CT基因型多见. (2)1298 (A→C)位点: *c-myc*表达升高的胃癌区组织以AA基因型最为多见, 其mRNA表达与AC基因型相比有降低趋势. 其余肿瘤相关基因表达降低者中3种基因型的mRNA表达无显著差异. 各基因甲基化紊乱均以AA基因型多见(表4, 图2).

2.4 叶酸及肿瘤相关基因表达与甲基化的关系

表 4 MTHFR多态性与肿瘤相关基因表达的关系 *n* (%)

基因	MTHFR	表达增强	无变化	表达减弱	Nx
*p*16^{INK4A}	677CC	1	3	10(71.4)	0.63 ± 1.05
	677CT	1	8	10(52.6)	0.7 ± 0.88
	677TT		2	3(60.0)	0.85 ± 0.96
	1298AA	1	9	16(61.5)	0.57 ± 0.96
	1298AC	1	4	7(58.3)	0.81 ± 1.15
*p*21^{WAF1}	677CC	1	7	6(42.9)	1.06 ± 1.06
	677CT	1	5	13(68.4)	0.47 ± 0.69
	677TT		2	3(60.0)	0.55 ± 0.55
	1298AA	2	10	14(53.9)	0.75 ± 0.85
	1298AC		4	8(66.7)	0.58 ± 0.85
c–myc	677CC	6(42.9)	7	1	2.26 ± 2.17[a]
	677CT	11(57.9)	6	2	4.32 ± 3.25
	677TT	2(40.0)	2	1	2.15 ± 1.8
	1298AA	15(57.9)	8	3	3.84 ± 3.17
	1298AC	4(33.3)	7	1	2.06 ± 1.64
h*MLH1*	677CC		3	11(78.6)	0.46 ± 0.67
	677CT	1	8	10(52.6)	0.57 ± 0.82
	677TT	1	3	1(25.0)	1.3 ± 1.28
	1298AA	2	10	14(53.9)	0.72 ± 0.96
	1298AC		4	8(66.8)	0.39 ± 0.55
h*MSH2*	677CC		5	9(64.3)	0.31 ± 0.32
	677CT	1	10	8(42.1)	0.88 ± 0.97[a]
	677TT		3	2(40.0)	0.94 ± 1.12
	1298AA	1	13	12(46.2)	0.8 ± 0.98
	1298AC		5	7(58.3)	0.4 ± 0.42

[a]*P*<0.05.

*c-myc*癌基因低甲基化见于表达升高者, 余基因中除有1例*p*21^{WAF1}高甲基化见于表达无改变者, 高甲基化均见于表达降低者. 癌旁组*p*21^{WAF1}有2例, *p*16^{INK4A}和h*MLH1*各1例有高甲基化, 其余甲

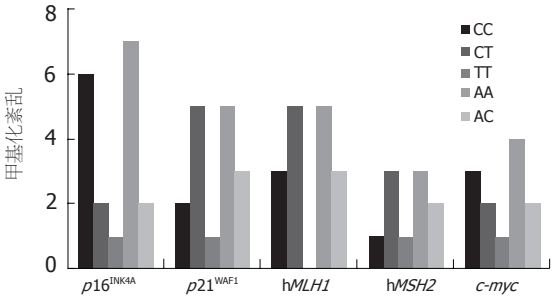


图 2 MTHFR多态性与肿瘤相关基因甲基化的关系.

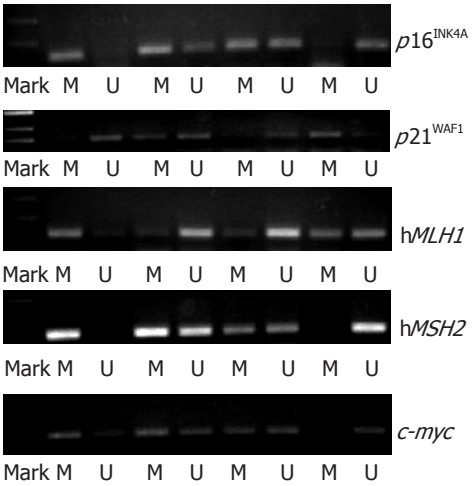


图 3 肿瘤相关基因甲基化特异性PCR扩增. Mark: 100 bp Ladder; M: 甲基化; U: 非甲基化.

基化紊乱均见于癌区组, 外周正常组未有发现. 经统计学检验, 除$p21^{WAF1}$外, 余基因的甲基化紊乱与其表达明显相关(P<0.05, 表5, 图3). $p16^{INK4A}$高甲基化者叶酸水平明显低于非甲基化; *c-myc*低甲基化者叶酸水平与非甲基化相比有降低趋势; $p21^{WAF1}$, h*MLH1*和h*MSH2*高甲基化者与非甲基化相比, 叶酸水平无统计学差异(表5).

3 讨论

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤, 其发生、发展是一个多基因参加的多步骤过程, 包括癌基因的过度表达和抑癌基因的失活等[7]. DNA甲基化在基因表达调控中具有重要作用. 迄今为止, 已发现在大量的肿瘤细胞中抑癌基因失活与该基因启动子区过度甲基化有直接关系, 而过低甲基化则导致某些在正常情况下受到抑制的癌基因大量表达, 并可导致整个基因组的不稳定性增加. $p16^{INK4A}$基因是一种抑癌基因, 对细胞周期起负调控作用. 在人胃癌中常可检测到$p16^{IINK4A}$蛋白的缺失[8], 我们也发现胃癌区组织与外周正常组织相比$p16^{INK4A}$ mRNA表达有

表 5 叶酸和肿瘤相关基因表达与甲基化的关系

基因	甲基化	降低	增高和无变化	叶酸浓度 (μg/L)
$p16^{INK4A}$	高	9	0	2.16 ± 1.11
	非	14	15[b]	4.11 ± 1.96[b]
$p21^{WAF1}$	高	7	1	3.09 ± 1.39
	非	15	15	3.77 ± 2.11
h*MLH1*	高	8	0	3.06 ± 1.62
	非	14	16[a]	3.81 ± 2.04
h*MSH2*	高	5	0	2.77 ± 0.84
	非	15	18[a]	3.78 ± 2.06
c-myc	低	0	6	2.25 ± 1.23
	高	19	13[a]	3.91 ± 2.01

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

降低趋势(P = 0.054). 近来许多研究发现胃癌中$p16^{INK4A}$基因的突变和纯合缺失并不多见, 该基因启动子区的甲基化紊乱是基因静默的主要机制[9-10]. 我们通过MSP方法检测发现$p16^{INK4A}$ mRNA低表达的癌区组织有9/23 (39.1%)存在DNA启动子区高甲基化, 而在$p16^{INK4A}$表达升高或无变化的样品中却无1例存在此现象, 提示胃癌组织$p16^{INK4A}$ mRNA的表达降低与DNA甲基化有关.

$p21^{WAF1}$基因上有$p53$作用的位点, 能协助$p53$发挥抑癌作用. 虽然信号传导、细胞分化或某些影响因子能改变$p21^{WAF1}$ mRNA的稳定性, 但近来研究表明, $p21^{WAF1}$启动子区高甲基化是该基因失活的可能机制[11-12]. 然而, Scott *et al*[13]发现, 5-aza-dC通过释放组蛋白脱乙酰化酶1(HDAC1)介导$p21^{WAF1}$表达上调, 而该基因启动子区并未发生去甲基化. 我们发现, 胃癌区组织中$p21^{WAF1}$表达明显低于外周正常组织, 其中表达降低者有7/22 (31.8%)、无变化者有1/16 (6.3%)存在高甲基化, 增高者中未发现甲基化紊乱现象(P>0.05). 提示胃癌组织中$p21^{WAF1}$低表达, 但调控其表达的主要机制并非该基因的异常甲基化. 错配修复(mismatch repair, MMR)是细胞纠正复制错误的重要手段, 常出现在增殖过程中以维持基因的精确性, 对DNA复制的忠实性和基因组的稳定性起重要作用. MMR基因表达异常将会出现微卫星DNA的不稳定性或复制错误, 引起整个基因组不稳定性增加, 促使肿瘤发生[14-15]. h*MLH1*和h*MSH2*是MMR系统最为重要的2种基因成分. 现认为h*MLH1*基因启动子

的继发性转录缺失与该基因启动子区的甲基化密切相关[16-17], 而对于DNA甲基化是否能引起h*MSH2*表达缺失仍有异议[18-19]. 本实验胃癌区组织中h*MLH1*和h*MSH2*表达水平明显低于外周正常组织, 其中表达降低的癌组织中高甲基化分别有8/22 (36.4%)和5/20 (25.0%), 而表达增强或无变化者中未发现异常甲基化. 这一结果说明h*MLH1*甲基化在胃癌的发生中起重要作用, 也提示DNA甲基化在一定程度上影响了h*MSH2*表达缺失[20].

*c-myc*是一个多功能的癌基因, 有转录因子活性, 可启动细胞增殖、抑制细胞分化、调节细胞周期并参与细胞凋亡的调控. 通常正常组织的*c-myc*基因3'端CCGG是被甲基化的, 只有少数细胞存在轻度低甲基化, 甲基化异常可导致该基因异常高表达, 进而参与肿瘤的发生、发展. 我们既往的研究显示, *c-myc*在胃癌[21]和肝癌[22]发生中甲基化水平降低. 本实验胃癌组织中*c-myc*过表达, 其mRNA表达水平明显高于外周正常组织, 其中6/19 (31.58%)的癌组织DNA启动子区低甲基化, 提示DNA低甲基化引起*c-myc*过度激活可能是胃癌发生的参与因素. 叶酸是主要的甲基基团供体, 他在调节包括细胞内甲基化反应和保持基因组稳定性方面具有重要作用, 其缺乏或代谢障碍与许多肿瘤的发病风险增高相关[23]. MTHFR不可逆催化5, 10-亚甲基四氢叶酸转变为5-甲基四氢叶酸, 他通过合成SAM而参与多种甲基化过程, 而酶活性的降低减少了同型半胱氨酸向甲硫氨酸的转变, 改变了SAM水平, 从而导致DNA低甲基化; 又通过胸腺嘧啶的合成参与DNA复制和细胞分化, 而其底物5, 10-亚甲基四氢叶酸减少, 使尿嘧啶错误掺入DNA, 被DNA修复系统识别和切除, 从而增加染色体的不稳定性[24]. 已有学者研究发现叶酸[25]和MTHFR基因多态性[26]与部分肿瘤相关基因甲基化紊乱有关, 但迄今缺乏针对胃癌的研究.

基于以上所述, 我们还研究了叶酸和MTHFR基因多态性与肿瘤相关基因甲基化及其表达的关系. 就叶酸而言, 胃癌黏膜中$p21^{WAF1}$, h*MSH2*表达降低, $p16^{INK4A}$高甲基化与低叶酸相关; 低叶酸通过使*c-myc*癌基因甲基化水平降低调控该基因表达. 就MTHFR基因2个多态位点而言, 胃癌区组织中携带677CC基因型的个体$p16^{INK4A}$甲基化升高而表达降低, 而其余肿瘤相关基因的甲基化及其表达与MTHFR 2个常见多态则无显著关系.

总之, 胃癌的发生是一个多基因、多阶段的复杂病变过程, 位点特异的DNA甲基化调控基因的表达, 癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化参与胃癌的发生、发展[27-28]. 叶酸缺乏及其代谢酶MTHFR多态性影响DNA的甲基化和核酸的稳定性, 从而参与肿瘤的形成. 由于样本数量有限, 我们未能探知实验设计中所有肿瘤相关基因与叶酸和MTHFR多态性的关系, 但从中可看出一定趋势, 即叶酸水平和MTHFR多态性通过影响部分肿瘤相关基因的甲基化状态而调控其表达. 大样本的实验有待开展, 以进一步验证我们的结果, 同时探讨各基因与胃癌组织分型及TMN分期的关系, 拓展对胃癌发病机制的研究.

4 参考文献

1 Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *J Nutr* 2005; 135: 2703-2709

2 Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methyl enetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci* 2005; 96: 535-542

3 Friso S, Girelli D, Trabetti E, Olivieri O, Guarini P, Pignatti PF, Corrocher R, Choi SW. The MTHFR 1298A>C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 938-943

4 Quinlivan EP, Davis SR, Shelnutt KP, Henderson GN, Ghandour H, Shane B, Selhub J, Bailey LB, Stacpoole PW, Gregory JF 3rd. Methylenetetrahy drofolate reductase 677C->T polymorphism and folate status affect one-carbon incorporation into human DNA deoxynucleosides. *J Nutr* 2005; 135: 389-396

5 翁玉蓉, 房静远, 孙丹凤, 陈朝飞, 朱红音. 胃癌组织中叶酸水平与代谢酶亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的关系研究. 中华消化杂志 2006; 26: 26-30

6 Scanlan MJ, Welt S, Gordon CM, Chen YT, Gure AO, Stockert E, Jungbluth AA, Ritter G, Jager D, Jager E, Knuth A, Old LJ. Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res* 2002; 62: 4041-4047

7 Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. New concepts of molecular biology on gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1305-1312

8 He XS, Rong YH, Su Q, Luo Q, He DM, Li YL, Chen Y. Expression of p16 gene and Rb protein in gastric carcinoma and their clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2218-2223

9 Zhang F, Wang L, Wu PP, Yan ZW, Zheng L, Yu YY, Jiang XC. In situ analysis of p16/INK4 promoter hypermethylation in esophageal carcinoma and gastric carcinoma. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 149-155

10 Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004; 111: 224-228

11 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and

DNA methylation on p21(WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 400-405

12 Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Gonzalez MG, Moreno F, Rodriguez Mdel C, Barrios M, Maldonado J, Torres A. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2291-2296

13 Scott SA, Dong WF, Ichinohasama R, Hirsch C, Sheridan D, Sanche SE, Geyer CR, Decoteau JF. 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) can relieve p21WAF1 repression in human acute myeloid leukemia by a mechanism involving release of histone deacetylase 1 (HDAC1) without requiring p21WAF1 promoter demethylation. *Leuk Res* 2006; 30: 69-76

14 Campbell MR, Wang Y, Andrew SE, Liu Y. Msh2 deficiency leads to chromosomal abnormalities, centrosome amplification, and telomere capping defect. *Oncogene* 2006; 25: 2531-2536

15 Hatch SB, Lightfoot HM Jr, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, Sciarrotta J, Funkhouser WK, Farber RA. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2180-2187

16 Olasz J, Mandoky L, Geczi L, Bodrogi I, Csuka O, Bak M. Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors. *Anticancer Res* 2005; 25: 4319-4324

17 Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS, Kim H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3834-3841

18 Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh SA, Kim JC. Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 196-202

19 Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Takahira T, Yamamoto H, Sakamoto A, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Possible association between tumor-suppressor gene mutations and hMSH2/hMLH1 inactivation in alveolar soft part sarcoma. *Hum Pathol* 2003; 34: 841-849

20 Fang JY, Cheng ZH, Chen YX, Lu R, Yang L, Zhu HY, Lu LG. Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3394-3398

21 Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY, Zhou XM, Qian LF. Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 1079-1082

22 Shen L, Fang J, Qiu D, Zhang T, Yang J, Chen S, Xiao S. Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1753-1759

23 Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1055-1062

24 Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, Basten G, Duthie SJ. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes *in vivo*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1436-1443

25 van Engeland M, Weijenberg MP, Roemen GM, Brink M, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Baylin SB, de Goeij AF, Herman JG. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3133-3137

26 Oyama K, Kawakami K, Maeda K, Ishiguro K, Watanabe G. The association between methylen etetrahydrofolate reductase polymorphism and promoter methylation in proximal colon cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 649-654

27 Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2003; 38: 821-829

28 Kim TY, Jong HS, Jung Y, Kim TY, Kang GH, Bang YJ. DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 131-142

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2199-2202
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

大肠癌和大肠腺瘤COX-2和BFGF表达的意义

林瑶光, 韦良宏

林瑶光, 韦良宏, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
林瑶光, 教授, 硕士生导师, 从事消化系统肿瘤的早期诊断与治疗.
广西科技厅科研基金资助课题(桂科基), No. 0342010-4
通讯作者: 林瑶光, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科. lyg57@163.com
电话: 0771-5356596
收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-06-05

Expression and significance of cyclooxygenase-2 and basic fibroblast growth factor in colorectal carcinoma and adenoma

Yao-Guang Lin, Liang-Hong Wei

Yao-Guang Lin, Liang-Hong Wei, Department of Gerontism Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by the Science and Technology Government Agency Research Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, No. 0342010-4
Correspondence to: Yao-Guang Lin, Department of Gerontism Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lyg57@163.com
Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-06-05

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of cyclooxygenase-2 (COX-2), basic fibroblast growth factor (BFGF) in the carcinogenesis of colorectal carcinoma and adenoma.

METHODS: Intestinal biopsy specimens were collected from patients with colorectal carcinoma (n = 49), adenoma (n = 25), and normal mucosa (n = 20), and the expression of COX-2 and BFGF were detected by immunohistochemical staining (SP method).

RESULTS: The positive rates of COX-2, BFGF expression were 59.2%, 69.3% in colorectal carcinoma, and 52.0%, 56.0% in adenoma, respectively. COX-2 and BFGF expression were not detected in normal intestinal mucosa. The positive rates of COX-2 and BFGF expression were not significantly difference between colorectal carcinoma and adenoma (P > 0.05). The expression of COX-2 and BFGF were not significantly correlated with the gender, age, tumor size, tumor location, and cell differentiation, but had marked correlations with Dukes stages (stage C, D *vs* A, B: 81.5% *vs* 54.5%, P < 0.05) and lymph node metastasis (metastasis *vs* non-metastasis: 81.5% *vs* 54.5%, P < 0.05). Furthermore, there were significant correlations between COX-2 and BFGF expression (r = 0.349, P < 0.05).

CONCLUSION: Excessive expression of COX-2 and BFGF may play a synergic role in the carcinogenesis and development of colorectal carcinoma and adenoma.

Key Words: Carcinogenesis; Colorectal carcinoma; Cyclooxygenase-2; Basic fibroblast growth factor

Lin YG, Wei LH. Expression and significance of cyclooxygenase-2 and basic fibroblast growth factor in colorectal carcinoma and adenoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2199-2202

摘要

目的: 研究COX-2和BFGF在大肠癌及大肠腺瘤组织中的表达及意义.

方法: 采用免疫组化SP方法检测了手术切除的大肠癌49例, 腺瘤性息肉25例, 正常大肠黏膜组织20例中的COX-2和BFGF表达.

结果: COX-2和BFGF在大肠癌中的表达阳性率分别为59.2%和69.3%, 在腺瘤性息肉的表达率为52.0%和56.0%, COX-2和BFGF在大肠癌组织与腺瘤性息肉中表达无显著性差异(P>0.05); 正常肠黏膜中未检出COX-2和BFGF. COX-2和BFGF在大肠癌中表达与性别, 年龄, 肿瘤大小, 肿瘤位置, 分化程度无关(P>0.05). 但与肿瘤Dukes分期有关, C, D期高于A, B期(81.5% *vs* 54.5%, P<0.05), 淋巴结转移之间具有显著性差, 有异淋巴结转移高于无淋巴结转移(81.5% *vs* 54.5%, P<0.05). 肠癌组织中COX-2、BFGF表达二者间有相关性(r = 0.349, P<0.05).

■背景资料
近年来, 细胞生长因子与肿瘤的关系已日益受到重视. 多种生长因子在不同的肿瘤组织或体液中可被检测; 某些生长因子的编码基因与癌基因有同源性, 与肿瘤血管生成关系密切. 碱性成纤维细胞生长因子(BFGF)是成纤维生长因子家族中的一员, 研究证明与肿瘤发生关系密切. 近年研究证明, 动物实验、细胞学研究、临床试验和流行病学研究证明环氧合酶-2(COX-2)抑制剂可以在早期阶段阻止结直肠癌的发生.

■创新盘点
BFGF或COX-2在大多数结直肠肿瘤明显升高并与肿瘤的发生密切相关，但他们是协同或各自发挥作用，目前未见有相关报道. 本研究初步阐明BFGF, COX-2与结直肠癌及大肠腺瘤的关系，及结直肠癌中BFGF与COX-2的关系.

结论: COX-2、BFGF在大肠癌组织及大肠腺瘤中的表达水平增高，在大肠腺瘤恶变及大肠癌的发生发展过程中起协同作用，共同促进肿瘤的发生.

关键词: 大肠癌; COX-2; BFGF

林瑶光，韦良宏. 大肠癌和大肠腺瘤COX-2和BFGF表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2199-2202
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2199.asp

0 引言

大肠癌是我国发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一，其发病机制尚未完全清楚. 目前认为大肠癌的发生及发展是一个涉及多阶段、多基因、多因素异常积累的复杂过程. 细胞生长因子、癌基因与肿瘤的关系已日益受到重视. 我们采用免疫组化方法检测大肠良恶性肿瘤组织中的COX-2及BFGF蛋白表达，以探讨COX-2和BFGF蛋白在大肠癌发生和发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-11/2004-04手术治疗病理确诊为结直肠癌的广西籍患者49例，术前未行放化疗. 男32例，女17例；年龄24-85(中位57.4)岁，年龄<50岁15例，年龄≥50岁34例；直肠癌32例，结肠癌17例；肿瘤大小<5 cm 20例，肿瘤大小≥5cm 29例；高中分化腺癌41例，低未分化腺癌8例；有区域淋巴结转移27例，无区域淋巴结转移22 例；远处转移9例；Dukes A期12例，B期10例，C期18例，D期9例. 大肠腺瘤性息肉25例(为经病理确诊内镜下电凝电切息肉)及正常大肠黏膜标本20例(均为IBS病例且患者有病理检查要求，HE染色均为为正常肠黏膜). 全部标本均用甲醛固定，石蜡包埋，5 μm厚连续切片.

1.2 方法 免疫组化染色采用SP法进行. COX-2, BFGF均为即用型抗体，由福建迈新生物技术开发公司提供，按说明书进行操作. 结果判断使用德国Leica公司QMR+Q550型计算机图像分析仪进行分析. COX-2, BFGF免疫阳性物质定位于胞质或胞膜. 先按染色强度打分：0分为无色，1分为浅黄色，2分为棕黄色，3分为棕褐色；再按阳性细胞百分比打分：阳性细胞数≤5%为0分，6%-25%为1分，>26%-50%为2分，>51%-75%为3分，>75%为4分；最后按染色强度分数与阳性细胞百分比分数之和判断结果≥2分为+，<2 分为-.

表 1 大肠癌COX-2和BFGF蛋白的表达 *n* (%)

组织类型	*n*	COX-2阳性	BFGF阳性
大肠癌	49	29 (59.2)[a]	34 (69.3)[a]
腺瘤性息肉	25	13 (52.0)[a]	14 (56.0)[a]
正常肠黏膜	20	0 (0)	0 (0)

[a]$P<0.05$ *vs* 正常肠黏膜.

表 2 COX-2和BFGF与大肠癌临床病理特征的关系 *n* (%)

临床病理特征	*n*	COX-2	BFGF
性别			
男	32	18 (56.2)	21 (65.6)
女	17	11 (64.7)	13 (76.5)
年龄			
<50岁	15	9 (60.0)	8 (53.3)
≥50岁	34	20 (58.8)	26 (76.5)
肿瘤大小			
<5cm	20	13 (65.0)	15 (75.0)
≥5cm	29	16 (55.2)	19 (65.5)
肿瘤位置			
结肠	17	8 (47.0)	11 (64.7)
直肠	32	21 (65.6)	23 (71.9)
分化程度			
高、中分化	41	26 (63.4)	28 (68.3)
低分化	8	3 (37.5)	6 (75.0)
Dukes分期			
A, B	22	9 (40.9)[a]	12 (54.5)[a]
C, D	27	20(74.1)	22 (81.5)
淋巴结移			
无	22	9 (40.9)[a]	12 (54.5)[a]
有	27	20 (74.1)	22 (81.5)

[a]$P<0.05$.

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包，2个样本率的比较用卡方检验；相关分析为计数资料的相关分析. $P<0.05$具有显著差异.

2 结果

2.1 大肠癌组织COX-2和BFGF蛋白的表达(表1, 图1) COX-2和BFGF蛋白在正常肠黏膜胞质及核内未出现阳性黄色信号，COX-2和BFGF蛋白在腺瘤性息肉胞质内出现淡黄色阳性信号，COX-2和BFGF蛋白在大肠癌细胞质出现棕黄色阳性信号(图1). 大肠癌和腺瘤性息肉中COX-2和BFGF蛋白的表达明显高于正常肠黏膜($P<0.05$)，大肠癌和腺瘤性息肉中COX-2和BFGF蛋白的表达无显著性差异($P>0.05$, 表1).

2.2 大肠癌COX-2和BFGF表达与临床病理特征的关系 COX-2在大肠癌中表达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、分化程度无关，但与肿瘤Dukes分期、淋巴结转移有关(表2-3).

■应用要点
将BFGF和COX-2作为靶向治疗的目标, 将为防治结直肠癌提供理论依据.

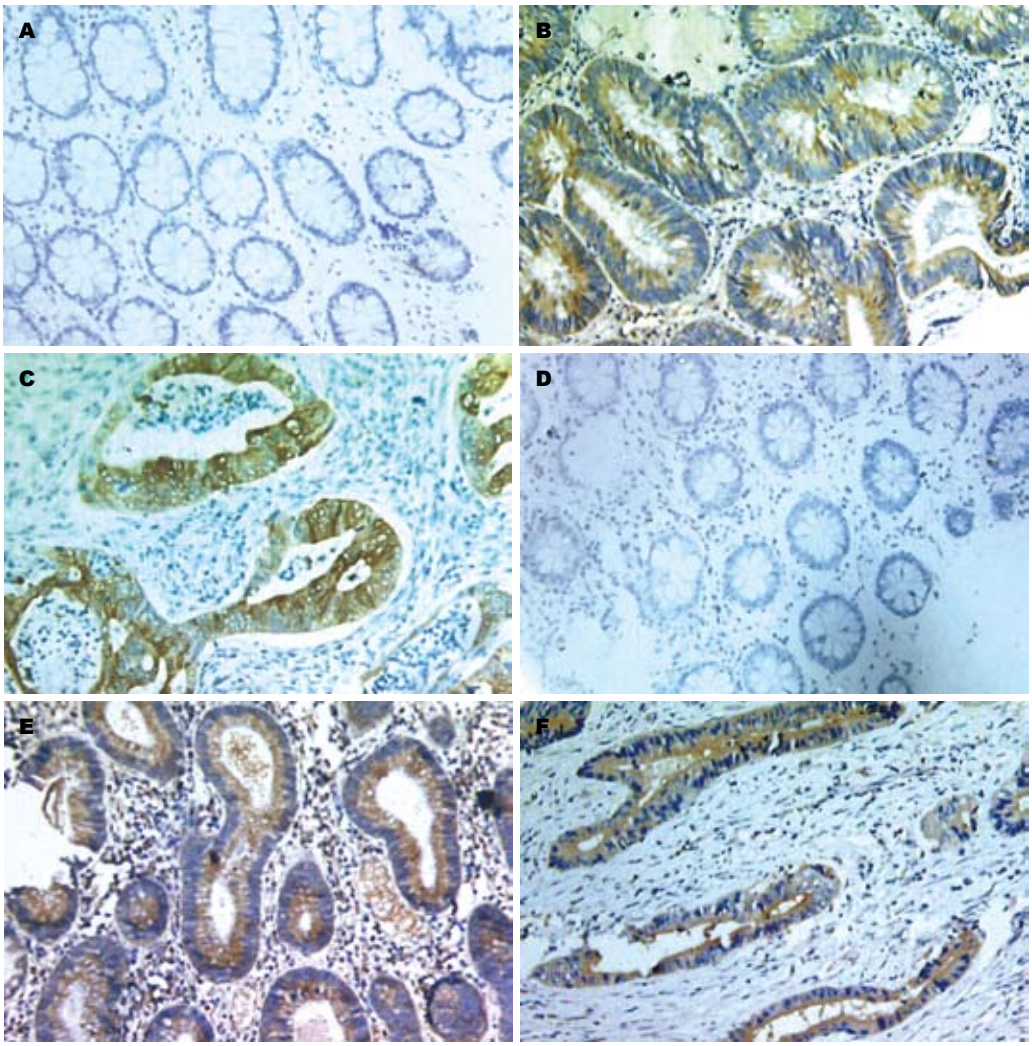


图 1 大肠癌组织COX-2和BFGF蛋白的表达. A: 正常肠黏膜COX-2; B: 大肠腺瘤COX-2; C: 大肠癌COX-2; D: 正常肠黏膜BFGF; E: 大肠腺瘤BFGF; F: 大肠癌BFGF.

3 讨论

近年来研究表明, 在肿瘤形成和演化的多步骤过程中, 细胞生长因子, 癌基因扮演着一个相当重要的角色. COX-2在多种肿瘤(如肝癌, 肺癌等)的发生、发展过程中起重要作用[1-2], 并与肿瘤转移、血管浸润等恶性生物学行为有关. COX-2可通过刺激肿瘤血管形成, 抑制肿瘤细胞凋亡, 增加细胞侵袭和转移能力等途径, 促进肿瘤的发生和发展, 其在大肠癌发生和发展中的作用已得到充分的证实[3-6]. COX-2是“早期即时”基因, 他可被迅速诱导, 严格的调控, 在基础条件下, COX-2表达是高度受限的, 而在炎症过程中却能奇迹般地升高. Eberhart *et al*研究发现, COX-2蛋白在大约80%的大肠癌和40%的大肠腺瘤中高表达. 国内外大量实验现已证实, COX-2的过表达与大肠癌发生、发展有密切联系. 我们用免疫组织化学染色法检测49例大肠癌组织标本中的COX-2表达, COX-2的表达为61.22%, 在大肠癌中表达与性别, 年龄, 肿瘤大小, 肿瘤位置, 分化程度无关. 但与肿瘤Dukes分期, 淋巴结转移有关. 与国内外报道相比: COX-2蛋白与大肠癌临床病理特征的关系与大多数学者研究的结果基本一致, 但表达率偏低, 这种差别可能与样本量不够大及区域性致癌因素不同有关. 我们检测到大肠癌组织与腺瘤的COX-2蛋白表达无显著差异, 与国内外报道结果相符[7-9]. 腺瘤中COX-2蛋白表达增多, 可能是腺瘤向腺癌发生的早期事件, 数据支持多数学者认为的腺瘤具有高癌率的

表 3 COX-2蛋白表达与BFGF蛋白表达的关系

COX-2	BFGF		合计
	+	−	
+	24	5	29
−	10	10	20
合计	34	15	49

$r = 0.349$, $P<0.05$.

■同行评价
本文研究大肠癌和大肠腺瘤COX-2和BFGF的表达及意义, 选题意义热门、学术价值较高、文字质量良、有一定的学术价值和新颖性.

结论.

BFGF在体内分布广泛, 存在于中胚层、神经外胚层的细胞及多种肿瘤细胞中, 对这些细胞有促增殖分化功能, 参与胚胎发育、血管生成、损伤修复、神经再生、肿瘤生长等多项生理及病理过程. 许多研究表明, BFGF能够促进细胞恶性转化及肿瘤形成. BFGF可能通过以下两种主要机制参与肿瘤的形成和发展: 一方面通过表达BFGF而以自分泌或旁分泌方式促进细胞过度增殖和肿瘤生长, 另一方面通过促进新生血管形成, 为肿瘤细胞生长提供丰富营养. 现代分子生物学研究表明, BFGF过度表达与肿瘤发生、发展及预后有密切关系[10]. 我们用免疫组织化学染色法检测49例大肠癌组织标本中的BFGF表达阳性率为67.3%, 在大肠癌中表达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、分化程度无关, 但与肿瘤Dukes分期、淋巴结转移之间具有显著差异, 与国内检测结果基本一致. BFGF蛋白在恶性肿瘤组织中强表达, 可能因为: (1)BFGF基因在4号染色体上与癌基因Hat, int-2相邻, 并且有相当程度的同源性, 因而推断BFGF基因与Hat, int-2等癌基因为连锁基因. 因此, 当外界因素使肿瘤Hat, int-2等癌基因表达时, 通过某种机制, 促使BFGF mRNA的表达, 导致BFGF蛋白的过表达; (2)因BFGF为细胞分裂原, 当肿瘤细胞恶性生长时, 为了适应本身生长需要, 通过某种反馈, 促使BFGF mRNA的表达, 因而BFGF合成增多. 在良性肿瘤中, 肿瘤生长较慢, 细胞几乎无坏死, 以及各种酶释放减少, 不能启动BFGF mRNA表达的机制, 因此, BFGF无法合成. 但本研究检测到大肠癌与腺瘤BFGF蛋白表达无显著差异(P>0.05). 腺瘤BFGF蛋白表达达56.0%. 为什么腺瘤中BFGF蛋白表达这么高, 目前国内外未见相关文献报道, 我们认为可能的原因为腺瘤是一种癌前病变, 其演变过程为正常肠上皮→增生改变/微小腺瘤→早期腺瘤→中期腺瘤→后期腺瘤→癌→癌转移. 在这一过程中伴随着一系列癌基因和抑癌基因的变化, BFGF为其中的一种. 但是BFGF在腺瘤中的作用机制仍需进一步研究. 我们发现, COX-2蛋白、BFGF蛋白与大肠癌Dukes分期、淋巴结转移有关, 提示COX-2蛋白、BFGF蛋白高表达可以影响大肠癌的生物学行为, 可使其更易发生转移等, 可能是预后不良的指征. 因此, 我们认为, 作为Dukes分期的补充, 大肠癌组织中COX-2蛋白、BFGF蛋白的检测可作为大肠癌患者判断预后有价值的指标. 虽然COX-2, BFGF均参与肿瘤细胞增生、肿瘤血管形成、调节细胞凋亡等, 但目前国内外尚无有关BFGF与COX-2直接联系的研究报道. 我们的研究表明大肠癌组织中的COX-2, BFGF蛋白表达水平增高, 参与了大肠癌的发生发展过程, 大肠癌组织中的COX-2, BFGF蛋白表达具有相关性, 提示他们在大肠癌的发生发展中起到协同作用, 共同促进肿瘤的发生, 但他们二者之间如何相互作用, 仍需进一步研究.

4 参考文献

1 Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4997-5001

2 Shiota G, Okubo M, Noumi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Yashima K, Kishimoto Y, Kawasaki H. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 407-412

3 Zhang JZ, Huang YW, Liu DM. Tissue microarray technology and its preliminary application in large intestinal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002; 10: 157-160

4 Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer* 2001; 91: 894-899

5 Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Stearns ME, Holland JF, Claffey K, Levine AC. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 687-694

6 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001; 121: 1339-1347

7 廖湘鲁, 王兴武, 国前, 魏玲, 管杰, 田国栋. COX-2在直肠腺瘤性息肉与癌组织中的表达及意义. 中国癌症杂志 2003; 13: 250-252

8 田慧军, 邓涛, 沈志祥, 唐明武, 胡志芳, 陈会敏. 大肠癌和大肠腺瘤COX-2和Bcl-2的基因表达及意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 544-546

9 Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Maclouf J, Polak JM, Knight S, Talbot IC. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 187: 295-301

10 Oppenheim J, Fujiwara H. The role of cytokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 279-288

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2203-2206
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

结肠癌组织P57^{kip2}和Ki67表达对侵袭性的影响

狄建忠, 赵中辛, 郑 起, 樊友本, 汪 昱

狄建忠, 郑起, 樊友本, 汪昱, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
赵中辛, 同济大学医学院附属上海市东方医院普外科 上海市 200120
狄建忠, 在读硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的研究.
通讯作者: 郑起, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. zhengqi1957@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-06-02 接受日期: 2006-06-14

Expression of P57^{kip2} and Ki67 in colon adenocarcinoma

Jian-Zhong Di, Zhong-Xin Zhao, Qi Zheng, You-Ben Fan, Yu Wang

Jian-Zhong Di, Qi Zheng, You-Ben Fan, Yu Wang, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Zhong-Xin Zhao, Department of General Surger, the Affiliated Dongfang Hospital of Tongji University Medical College, Shanghai 200120, China
Correspondence to: Qi Zheng, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233,
China. zhengqi1957@yahoo.com.cn
Received: 2006-06-02 Accepted: 2006-06-14

Abstract

AIM: To investigate the expression of P57^{kip2} and Ki67 and their roles in the carcinogenesis and progression of colon adenocarcinoma.

METHODS: Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemistry was used to detect the expression of P57^{kip2} and Ki67 in normal colon tissues (n = 10), colon benign tumor (n = 10), and colon adenocarcinoma (n = 69).

RESULTS: The expression of P57^{kip2} and Ki67 were not significantly different between normal colon tissues and colon benign tumor (P > 0.05). The expression of P57^{kip2} in colon cancer was significantly lower than that in normal colon tissues and colon benign tumor (P = 0.0001), while the expression of Ki67 was markedly higher in colon cancer (P = 0.0001). The expression of P57^{kip2} and Ki67 were correlated with the age and sex of patients (P > 0.05). The expression of P57^{kip2} was significantly lower in the poorly-differentiated cancer than that in the well-differentiated cancer (P = 0.032), while the expression of Ki67 was just in the contrary condition (P = 0.0226). The expression of P57^{kip2} in the cancer tissues with lymphatic invasion was significantly lower than in those without lymphatic invasion (P = 0.0001), while the expression of Ki67 was also in the contrary condition (P = 0.0001). In the cancer tissues, the expression of P57^{kip2} in the Duke's stage A+B and T1+T2 stage was significantly higher than that in the Duke's stage C+D and T3+T4 stage (P = 0.0002; P = 0.0311), while the expression of Ki67 was in the contrary condition (P = 0.0006; P = 0.0235). The expression of P57^{kip2} were negatively correlated with the expression of Ki67 in the cancer tissues (r = -0.847, P = 0.0001).

CONCLUSION: The decreased expression of P57^{kip2} and/or over-expression of Ki67 antigen may play important roles in the carcinogenesis, progression and metastasis of colon adenocarcinoma.

Key Words: P57^{kip2}; Ki67; Colon adenocarcinoma; Immunohistochemistry

Di JZ, Zhao ZX, Zheng Q, Fan YB, Wang Y. Expression of P57^{kip2} and Ki67 in colon adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2203-2206

摘要

目的: 研究结肠癌中P57^{kip2}与Ki67的表达与肿瘤的发生和发展的关系.

方法: 采用免疫组化技术ABC法检测P57^{kip2}与Ki67抗原在正常结肠粘膜10例、结肠良性肿瘤10例和结肠癌69例组织中的表达.

结果: 正常结肠黏膜组织和结肠良性肿瘤组织中P57^{kip2}和Ki67的表达没有统计学差异. 结肠癌组织中P57^{kip2}抗原表达的标志指数(labeling index, LI)较正常结肠黏膜组织和结肠良性肿瘤明显降低(P = 0.0001); Ki67抗原表达LI较正常结肠黏膜组织和结肠良性肿瘤明显升高(P = 0.0001). 不同性别、年龄结肠癌患者癌组织中P57^{kip2}和Ki67的表达没有统计学差异. P57^{kip2}在结肠癌低分化腺癌组织中的

■背景资料
结肠癌的发生被证实是一个多染色体异常、多基因改变、多步骤发展的复杂过程, 其具体原因和机制仍不清楚. 研究结肠癌组织P57^{kip2}和Ki67表达, 探讨其与结肠癌发生发展和转移的关系, 具有一定的临床指导意义.

■研发前沿
蛋白质组学发展推动肿瘤标志物的发现和研究, 利用蛋白质组学的研究手段找出肿瘤组织与其相应正常组织或肿瘤患者血清与正常血清中有无差异的蛋白, 对这些差异蛋白的深入研究有望为肿瘤诊断和预后判断提供良好的指标.

■**创新盘点**
$P57^{kip2}$的失活与多种人类恶性肿瘤的发生和发展相关, 包括肺癌、胃癌、肝癌、胆管癌和胰腺癌均有相关报道, 但在结肠癌方面国内外报道较少.

表达较在中高分化腺癌组织中的表达明显降低(P = 0.032). Ki-67在结肠癌低分化腺癌组织中的表达较在中高分化腺癌组织的表达明显升高(P = 0.0226). $P57^{kip2}$在有淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达较在无淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达明显降低(P = 0.0001). Ki-67在有淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达较在无淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达明显升高(P = 0.0001). $P57^{kip2}$在结肠癌Duke's A期和B期的癌组织中的表达较在C期和D期癌组织中的表达明显升高(P = 0.0002). Ki-67在A期和B期的癌组织中的表达较在C期和D期癌组织中的表达明显降低(P = 0.0006). $P57^{kip2}$在结肠癌T1, T2期的癌组织中的表达较在T3, T4期癌组织中的表达明显升高(P = 0.0311). Ki-67在T1, T2期的癌组织中的表达较在T3, T4期癌组织中的表达明显降低(P = 0.0235). $P57^{kip2}$与Ki-67在结肠癌组织中的表达呈现明显的负相关(r = -0.847, P = 0.0001).

结论: $P57^{kip2}$表达下调, Ki67抗原表达上调在结肠癌的发生发展和转移过程中发挥着重要作用.

关键词: $P57^{kip2}$; Ki67; **结肠癌; 免疫组化**

狄建忠, 赵中辛, 郑起, 樊友本, 汪昱. 结肠癌组织$P57^{kip2}$和Ki67表达对侵袭性的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2203-2206
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2203.asp

0 引言

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 根治术后5 a生存率约50%. 肿瘤的发生是多因素、多基因参与的复杂病理过程. 近年研究发现, $P57^{kip2}$失活与多种人类恶性肿瘤的发生和发展相关, 包括肺癌、胃癌、肝癌、胆管癌和胰腺癌等[1-7]. Ki67广泛表达于增殖期细胞而不表达于静止期细胞, 是评估细胞增殖的较好指标, Ki67表达增高与多种恶性肿瘤的进展和预后相关. 我们采用免疫组化方法检测$P57^{kip2}$和Ki67在结肠癌组织中的表达, 旨在探讨他们对结肠癌浸润和转移的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2004-09结肠癌手术切除69例, 术前未予以针对性治疗. 其中男37例, 女32例, 年龄37-85岁; 升结肠癌34例, 横结肠癌2例, 降结肠癌12例, 乙结肠癌21例; 有淋巴转移27例, 无淋巴结转移42例; 管状腺癌44例, 黏液腺癌8例, 未分化腺癌9例, 混合型癌8例. 正常结肠黏膜标本10例和结肠良性肿瘤10例(腺瘤5例、息肉5例). 以上标本均经病理证实. 羊抗人$P57^{kip2}$多克隆抗体(C-20, 1∶50)为美国Santa Cruz Biotechnology公司产品; 鼠抗人Ki67mAb(MIB-1, 1∶100)是丹麦DAKO公司的产品; 生物素标记马抗羊IgG(1∶250)、马抗鼠IgG(1∶250)以及ABC试剂盒均购自美国Vector公司.

1.2 方法 $P57^{kip2}$与Ki67染色方法均为常规ABC免疫组化法. $P57^{kip2}$与Ki67阳性细胞为细胞核出现棕褐色颗粒, 同时伴有或不伴有胞质轻度着色; 显微镜计数阳性细胞; 只计数细胞核着色的细胞. 读片工作由专人负责, 标准统一. $P57^{kip2}$与Ki67 LI = 阳性细胞数/1000个肿瘤细胞, 双盲法, 随机取10个高倍视野, 计数1000个肿瘤细胞, 取均值; 用已知阳性切片作阳性对照, PBS代替第一抗体作阴性对照.

统计学处理 $P57^{kip2}$与Ki67 LI与临床病理因子之间关系用SAS 6.12统计软件处理, P<0.05被认为有统计学差异.

2 结果

2.1 $P57^{kip2}$和Ki67在结肠组织中的表达 $P57^{kip2}$, Ki67蛋白阳性染色表现以细胞核染色为主. 正常结肠黏膜组织和结肠良性肿瘤组织中$P57^{kip2}$, Ki67的表达没有统计学差异. 结肠癌组织中$P57^{kip2}$LI较正常结肠黏膜组织和结肠良性肿瘤组织明显降低(P = 0.0001). 结肠癌组织中Ki67 LI较正常结肠黏膜组织和结肠良性肿瘤组织明显升高(P = 0.0001). 不同性别、年龄结肠癌患者癌组织中$P57^{kip2}$, Ki67的表达没有统计学差异. $P57^{kip2}$在结肠癌低分化腺癌组织中的表达较在中高分化腺癌组织中的表达明显降低(P = 0.032). Ki67在结肠癌低分化腺癌组织中的表达较在中高分化腺癌组织的表达明显升高(P = 0.0226). $P57^{kip2}$在有淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达较在无淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达明显降低(P = 0.0001). Ki67在有淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达较在无淋巴管浸润的结肠癌组织中的表达明显升高(P = 0.0001). $P57^{kip2}$在结肠癌Duke's分期A期和B期的癌组织中的表达较在C期和D期癌组织中的表达明显升高(P = 0.0002). Ki67在A期和B期的癌组织中的表达较在C期和D期癌组织中的表达明显降低(P = 0.0006). $P57^{kip2}$在结肠癌T1, T2期的

癌组织中的表达较在T3, T4期癌组织中的表达明显升高(P<0.001). Ki67在T1, T2期的癌组织中的表达较在T3, T4期癌组织中的表达明显降低(P<0.001). P57^{kip2}与Ki67在结肠癌组织中的表达具有明显的负相关(γ = -0.847, P = 0.0001, 表1).

3 讨论

P57^{kip2}是细胞周期素依赖性激酶抑制(CDKI)家族成员, 有广谱的CDK抑制活性, P57^{kip2}在细胞G1/S期转变中起重要作用, P57^{kip2}与Cyclin/CDK复合物结合, 阻止细胞由G1期进入S期, 从而抑制周期的进行. P57^{kip2}的作用相当于抑癌基因, 表达低下会促进细胞的异常增殖和癌变. P57^{kip2}基因位于染色体11p15, 正常情况下, P57^{kip2}基因为父源基因印记, 母源基因表达. 文献报道肺癌患者存在P57^{kip2}母源基因缺失, 导致印记缺失、父源基因表达, 提示P57^{kip2}存在基因印记缺失(Loss of imprinting LOI)[1]. P57^{kip2}, P21WAF1/CIP1, P27^{Kip1}同属CIP/KIP家族, 研究证实, 大肠癌患者P21, P27蛋白表达下调, 提示P21, P27基因参与结肠癌的发生, 其中P27^{Kip1}表达下调可能与泛素蛋白水解酶复合体活性升高有关[8]. Nakai *et al*[4]在研究肝癌的研究中认为, P57^{kip2}可作为一个独立预后指标. 我们发现, 与正常组织及良性肿瘤相比, 69例结肠癌的P57^{kip2}表达呈显著降低, 并且伴淋巴结转移者或Duke's C, D期或低分化腺癌或T3, T4组分别显著低于无淋巴结转移者或Duke's A, B期或中高分化腺癌或T1, T2组, 本组资料有远处转移Duke's D期结肠癌共3例, 其P57^{kip2}表达明显低于Duke's A, B期和Duke's C期, 但由于样本数少, 没有统计学意义. 提示P57^{kip2}可能是结肠癌发生的负性调控因子, 可能与LOI和泛素蛋白水解酶复合体活性异常相关, 结肠癌中P57^{kip2}表达降低的机制有待于进一步的研究.

编码Ki67的人类基因定位于第10号染色体的长臂上, Ki67蛋白由相对分子质量为358761和319508的两条多肽链组成, 由2个相连接的9768和8686 bp的mRNA所编码. Ki67的研究多用于判断肿瘤的良、恶性及恶性程度, 也用于探讨细胞增殖活性、细胞周期与肿瘤的生长方式、浸润方式、复发、转移等生物学行为与预后的关系. Ki67广泛表达于增殖期细胞而不表达于静止期细胞, 是评估细胞增殖的较好指标. Van Triest *et al*[9]研究显示, Ki67与患者年龄、性别、Duke's分期、分化程度等均相关. 我们发现, Ki67高表达与结肠癌的肿瘤细胞分化程度、Duke's分期、淋巴管浸润和肿瘤浸润深度呈显著性相关, 与年龄、性别无关. 结肠癌Ki67表达明显高于正常黏膜(P<0.01), 与Kikuchi *et al*[10]的研究结果相一致, 表明结肠癌细胞比正常黏膜细胞增殖又更为活跃. 本组研究表明, 结肠癌组织较正常结肠组织与结肠良性肿瘤, P57^{kip2}表达降低, Ki67表达升高, 且结肠癌恶性程度越高, 肿瘤分化越差, 肿瘤分期越晚, P57^{kip2}表达越低, Ki67表达越高, 且两者呈负相关(γ = -0.847, P = 0.0001), 提示P57^{kip2}和Ki67在结肠癌的发生、发展中可能共同作用, 相互之间是否存在协同或拮抗关系, 其具体作用机制, 需要进一步的研究来阐明.

表 1 P57^{kip2}和Ki67在结肠组织中的表达

	n	P57^{kip2} LI (mean ± SD, %)	Ki67 LI (mean ± SD, %)
正常结肠黏膜	10	68.3 ± 10.2	4.9 ± 6.5
结肠良性肿瘤	10	65.3 ± 8.8	6.5 ± 2.2
结肠癌	69	42.3 ± 10.3^b	43.0 ± 17.0^b
性别			
男	37	42.9 ± 8.9	44.6 ± 16.2
女	32	44.2 ± 7.8	44.3 ± 15.1
年龄			
≤50	20	46.7 ± 5.2	40.9 ± 11.7
>50	49	41.7 ± 11.1	43.2 ± 15.1
肿瘤特征			
分化好	46	43.7 ± 16.2	40.7 ± 16.9
分化差	23	39.7 ± 6.9	49.9 ± 12.4^a
淋巴管浸润			
阳性	44	40.1 ± 6.6	51.7 ± 13.7
阴性	25	48.2 ± 8.1^b	33.0 ± 10.6^b
Duke's分期			
A+B	42	46.3 ± 7.9	39.6 ± 16.1
C+D	27	39.1 ± 6.4^b	52.4 ± 11.5^b
浸润深度			
T1+T2	29	45.3 ± 6.8	38.5 ± 8.1
T3+T4	40	39.4 ± 5.2^b	46.5 ± 13.3^b

^{a}P<0.05; ^{b}P<0.01.

■应用要点

本文研究结果提示P57^{kip2}表达降低, Ki67表达上升与结肠癌恶性程度相关, 对结肠癌的诊断和预后判断有一定的临床指导意义.

4 参考文献

1 Kondo M, Matsuoka S, Uchida K, Osada H, Nagatake M, Takagi K, Harper JW, Takahashi T, Elledge SJ, Takahashi T. Selective maternal-allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57^{KIP2} gene at 11p15.5. *Oncogene* 1996; 12: 1365-1368

2 Shin JY, Kim HS, Lee KS, Kim J, Park JB, Won MH, Chae SW, Choi YH, Choi KC, Park YE, Lee JY. Mutation and expression of the p27^{KIP1} and p57^{KIP2} genes in human gastric cancer. *Exp Mol Med* 2000; 32: 79-83

3 Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 262-265

4 Nakai S, Masaki T, Shiratori Y, Ohgi T, Morishita A, Kurokohchi K, Watanabe S, Kuriyama S. Expression

■同行评价
本研究从肿瘤标本中直接检测与结肠癌侵袭性很强的两个关键指标P57^{kip2}和Ki67,对结肠癌术后的继续治疗有一定的指导意义. 文章有一定的科学性和可读性.

of p57(KIP2) in hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival. *Int J Oncol* 2002; 20: 769-775
5 Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Monden M, Matsuura N. Expression of p57/Kip2 protein in extrahepatic bile duct carcinoma and intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Liver* 2002; 22: 145-149
6 Ito Y, Takeda T, Wakasa K, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression of p57/Kip2 protein in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2001; 23: 246-250
7 Nan KJ, Guo H, Ruan ZP, Jing Z, Liu SX. Expression of p57(kip2) and its relationship with clinicopathology, PCNA and p53 in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1237-1240
8 Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3: 231-234
9 van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, van Diest PJ, Schoenmakers PS, Voorn DA, Smid K, Hoekman K, Hoitsma HF, Peters GJ. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1063-1072
10 Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* 1997; 431: 111-117

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 •

2004年度《世界华人消化杂志》、《World Journal of Gastroenterology》的影响因子在1608种中国科技论文统计源期刊中的排位

本刊讯 根据由中国科学技术信息研究所完成的“2004年度中国科技论文统计与分析结果”, 在收录的1608种中国科技论文统计源期刊中, 总被引频次平均值433.61次/刊, 影响因子平均值0.386.

《世界华人消化杂志》的总被引频次为3353, 位居1608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1608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.

《World Journal of Gastroenterology》的总被引频次为4127, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第3位, 内科医学类, 28种期刊的第1位.《World Journal of Gastroenterology》的影响因子为2.654, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第4位,内科医学类28种期刊的第1位.《World Journal of Gastroenterology》的即年指标0.399, 他引总引比0.58, 地区分布数27, 基金论文比0.52, 国际论文比0.26.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2207-2210
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

慢性乙型肝炎患者肝组织穿孔素表达的临床意义

王海燕, 贺永文, 朱传武, 钱 峰, 李 明, 罗湘蓉, 常建国, 张雪华

王海燕, 朱传武, 钱峰, 李明, 罗湘蓉, 常建国, 张雪华, 苏州市第五人民医院传染科 江苏省苏州市 215007
贺永文, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430022
王海燕, 2003年华中科技大学同济医学院硕士生, 主要从事慢性乙型病毒性肝炎的治疗和免疫学研究.
通讯作者: 朱传武, 215007, 江苏省苏州市, 苏州市第五人民医院传染科. zhuchw@126.com
电话: 0512-65180035 传真: 0512-65291020
收稿日期: 2006-04-28 接受日期: 2006-05-11

Clinical significance of intrahepatic perforin expression in patients with chronic hepatitis B

Hai-Yan Wang, Yong-Wen He, Chuan-Wu Zhu, Feng Qian, Ming Li, Xiang-Rong Luo, Jian-Guo Chang, Xue-Hua Zhang

Hai-Yan Wang, Chuan-Wu Zhu, Feng Qian, Ming Li, Xiang-Rong Luo, Jian-Guo Chang, Xue-Hua Zhang, Department of Infectious Diseases, the Fifth People's Hospital of Suzhou City, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China
Yong-Wen He, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Chuan-Wu Zhu, Department of Infectious Diseases, the Fifth People's Hospital of Suzhou City, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China. zhuchw@126.com
Received: 2006-04-28 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of intrahepatic perforin expression in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: The hepatic biopsies were performed in 47 patients with chronic hepatitis B, and out of them, 35 patients subsequently received interferon α-2b antiviral therapy. The expression of perforin in liver tissues was detected by immunohistochemistry, and the HBV DNA loads, the serum HBV immunologic markers and transaminases were also determined in peripheral blood samples.

RESULTS: The expression of intrahepatic perforin was positive in 37 patients (13 cases strongly positive). The intensity of perforin showed a significant accordance with serum alanine aminotransferase (ALT) level (χ^2 = 8.004, P = 0.018) and histological inflammation grades (χ^2 = 8.532, P = 0.014), but did not correlate with the degrees of liver fibrosis (χ^2 = 0.865, P = 0.649). The data showed a significantly negative correlation between perforin and the HBV DNA loads (χ^2 = 7.902, P = 0.019), and there was almost significantly correlation between perforin and the level of HBeAg (χ^2 = 5.283, P = 0.071). Among the 35 patients accepted interferon antiviral therapy, there were 12 cases with complete responses, 14 cases with partial responses and 9 without responses at the end of treatment. The intensity of perforin expression was positively correlated with the interferon responses (χ^2 = 7.533, P = 0.023).

CONCLUSION: The expression of intrahepatic perforin can mediate the liver cell injury, contribute to the clearance of hepatitis B virus, and enhance the antiviral efficacy of interferon, and it may be a predictor to interferon antiviral therapy.

Key Words: Liver; Biopsy; Perforin; Chronic hepatitis B; Clinical significance

Wang HY, He YW, Zhu CW, Qiang F, Li M, Luo XR, Chang JG, Zhang XH. Clinical significance of intrahepatic perforin expression in patients with chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2207-2210

摘要

目的: 探讨慢性乙肝患者肝组织穿孔素表达的临床意义.

方法: 慢性乙肝患者47例, 进行肝穿刺活组织病理学检查, 其中的35例患者随后接受了α-2b干扰素抗病毒治疗. 用免疫组织化学技术检测肝组织穿孔素的表达, 同时检测外周血HBV DNA载量、乙肝病毒血清免疫学标志物和肝功能等.

结果: 慢性乙肝患者中有37例肝组织穿孔素表达阳性, 其中强阳性13例. 穿孔素表达强度

■背景资料
在慢性乙肝患者中, 细胞毒T淋巴细胞(CTLs)在清除乙肝病毒感染的同时也引起了肝细胞的损伤, 其细胞毒效应是依赖穿孔素和凋亡两条途径实现的, 通常以前者为主. 当特异性CTLs被激活后就会释放穿孔素, 使之成为肝细胞损害的终末效应分子, 因此, 近年来在病毒性肝炎的研究中受到了足够的重视.

■创新盘点
本研究对慢性乙肝患者肝组织穿孔素的表达与血清酶学指标、肝组织炎症、纤维化、血清病毒蛋白、病毒载量和干扰素抗病毒治疗的关系进行了比较全面的研究, 进一步加深了对穿孔素与慢性乙肝发病关系的认识.

■应用要点
肝组织穿孔素的表达与病毒清除和肝脏炎症程度密切相关，可能会促进干扰素的抗病毒应答，因此，根据治疗前肝脏穿孔素表达的强度可以预测干扰素的疗效.

与血清ALT水平、肝组织炎症程度具有显著的一致性关系(分别为χ^2 = 8.004, P = 0.018; χ^2 = 8.532, P = 0.014); 与肝组织纤维化程度无关(χ^2 = 0.865, P = 0.649); 与外周血乙肝病毒载量呈显著的负向关系(χ^2 = 7.902, P = 0.019), 与HBeAg水平也几乎呈显著的负向关系(χ^2 = 5.283, P = 0.071). 35例接受干扰素抗病毒的患者治疗结束时完全应答为12例, 部分应答14例, 无应答9例, 分析显示治疗前穿孔素表达的强度与干扰素应答具有显著的一致性关系(χ^2 = 7.533, P = 0.023).

结论: 慢性乙肝患者肝组织穿孔素的表达介导了肝细胞的损害, 有利于乙肝病毒的清除, 可能会促进干扰素的抗病毒效果, 并具有预测干扰素抗病毒疗效的价值.

关键词: 肝组织; 穿孔素; 乙型肝炎, 慢性; 临床意义

王海燕, 贺永文, 朱传武, 钱峰, 李明, 罗湘蓉, 常建国, 张雪华. 慢性乙型肝炎患者肝组织穿孔素表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2207-2210
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2207.asp

0 引言

在乙肝病毒感染的过程中, 细胞毒T淋巴细胞(CTLs)的细胞毒效应是清除肝内乙肝病毒的主要作用机制. 通常, CTLs依赖2条独立的途径发挥其细胞毒作用, 即穿孔素途径和凋亡途径[1]. 国外的部分临床和动物研究已发现, 穿孔素与病毒性肝炎的肝细胞损害有密切的关系[2-3]. 为进一步探讨肝组织穿孔素的表达对肝脏炎症、纤维化、乙肝病毒及抗病毒治疗的影响, 我们对47例慢性乙肝患者的相关指标进行了如下研究.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-04/2005-03间的住院慢性乙型肝炎患者47例, 男36例, 女11例, 年龄21-52(平均30.4)岁. 其中轻度17例, 中度27例, 重度3例. 诊断参照2000年西安全国病毒性肝炎会议修订的临床诊断标准. 所有患者均排除了甲、丙、丁、戊型肝炎病毒重叠感染以及其他原因(如酒精、药物、自身免疫等)引起的肝脏损害. 其中35例接受了α-2b干扰素500 MU抗病毒治疗6 mo, 干扰素疗效判断标准依据2005-12中华医学会肝病学分会、感染病学分会制定的慢性乙型肝炎防治指南. 乙肝病毒血清免疫学标志物检测试剂购自美国Abbott公司; HBV DNA荧光定量PCR试剂购自深圳百雅克泰公司; 鼠抗人穿孔素mAb为美国Biolegend公司产品; 生物素标记的羊抗鼠抗体为英国KPL公司产品; ABC试剂盒及DAB底物试剂盒为美国Vector实验室产品. 采用沪产18号肝活检针, 抽吸负压后1 s快速穿刺, 获得肝组织长度均在1.5 cm以上, 所有肝标本均用40 g/L甲醛溶液立即固定, 24 h后石蜡包埋, 4 μm连续切片, 作病理学检查, 其余切片-20℃冰箱保存待作免疫组织化学染色. 同期采集血清检测HBV免疫学标志物和HBV DNA载量, 并检测肝功能和血常规. 干扰素抗病毒治疗者定期抽血复查以上指标.

1.2 方法 肝组织穿孔素的免疫组化染色 采用亲和素-生物素-过氧化物酶技术(SABC法)检测, 镜下控制显色时间, 染色结束后自然干燥, 中性树胶封片, 研究设阴性对照. 根据穿孔素在肝组织内染色的深浅及分布范围, 按阴性: 不显色; 阳性: 显示淡棕黄色, 断续分布; 强阳性: 显示深棕黄色, 弥漫性或团块状分布.

统计学处理 数据分析采用Excel 2003软件的列联表χ^2检验, 检验水准为α = 0.05.

2 结果

2.1 肝组织穿孔素的表达及分布 在47例慢性乙肝患者中, 肝组织穿孔素表达阳性者37例, 阳性率为78.7%, 其中强阳性13例. 穿孔素呈棕黄色或深棕黄色染色, 多表达于肝细胞质中, 呈点状、弥漫性或团块状分布, 主要分布于肝组织的炎症活动部位和汇管区(图1A-B).

2.2 肝组织穿孔素表达的意义 以ALT和AST的3倍正常值上限(ULN)为界(本院ULN为46 IU/L, 约合766.8 nkat/L), 分析肝组织穿孔素表达与肝脏炎症的关系, 发现穿孔素表达的强度与ALT水平呈显著一致性关系(χ^2 = 8.004, P = 0.018); 但与AST水平未见有显著性关系(χ^2 = 2.779, P = 0.249, 表1). 参照2000年西安全国病毒性肝炎会议修订的肝脏病理学诊断标准, 将肝脏炎症和纤维化大致分为轻、中和重度3个级别, 以分析肝脏炎症及纤维化与穿孔素表达强度的关系(表1). 结果显示穿孔素表达与肝脏活动性炎症呈显著一致性关系(χ^2 = 8.532, P = 0.014), 但与肝组织纤维化的程度无关(χ^2 = 0.865, P = 0.649).

根据外周血HBV DNA载量的高低分为3组, 分析其与肝组织穿孔素表达强度的关系, 可见肝组织穿孔素表达越强, 外周血HBV DNA载量越低, 经显著性检验, 发现两者有显著的关系(χ^2 = 7.902, P = 0.019, 表1). 对其中31例HBeAg阳性

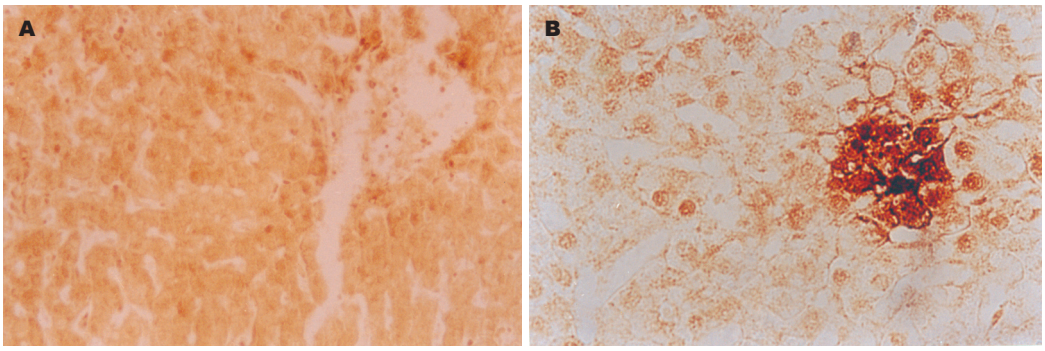


图 1 肝组织穿孔素呈棕黄色或深棕黄色染色, 主要分布于炎症活动部位和汇管区. A: SABC × 200; B: SABC × 400.

■名词解释
穿孔素是由激活的CTLs和自然杀伤细胞产生的一种融细胞蛋白, 释放后插入靶细胞膜上形成跨膜通道, 引起细胞渗透压的改变, 导致靶细胞的溶解和死亡. 同时, 形成的跨膜通道可以引起颗粒酶B进入靶细胞, 导致靶细胞的凋亡.

患者穿孔素表达的强度与HBeAg水平(以200 S/CO为界分为2组)进行分析, 发现穿孔素表达越强, HBeAg水平越低, 经显著性检验, 两者的关系为$\chi^2 = 5.283$, $P = 0.071$, 几乎具有统计学意义. 35例接受干扰素抗病毒治疗6 mo的患者, 应答结果: 为完全应答12例, 部分应答14例, 无应答9例. 分析表明, 治疗前穿孔素表达强度与干扰素的疗效具有显著的一致性关系($\chi^2 = 7.533$, $P = 0.023$, 表1).

表 1 肝组织穿孔素表达与肝脏炎症、纤维化、乙肝病毒载量及抗病毒治疗的关系

临床研究参数	n	穿孔素表达强度		
		阴性	阳性	强阳性
ALT				
≤19 044 nkat/L	20	8	9	3
>19 044 nkat/L	27	2	15	10
AST				
≤19 044 nkat/L	22	7	10	5
>19 044 nkat/L	25	3	14	8
炎症分级				
轻度(G1)	15	6	8	1
中度(G2–G3)	22	4	12	6
重度(G4)	10	0	4	6
纤维化分期				
轻度(S1)	15	5	7	3
中度(S2–S3)	21	4	11	6
重度(S4)	11	1	6	4
乙肝病毒载量				
$<10^5$ copies/mL	7	0	2	5
10^5–10^8 copies/mL	27	4	16	7
$>10^8$ copies/mL	13	6	6	1
干扰素应答				
完全	12	0	4	8
部分	14	1	9	4
无	9	6	2	1

3 讨论

穿孔素主要是由CTLs和NK细胞产生的, 当CTLs被激活后, 胞质内的毒性颗粒借助微管作用被集中到靶细胞一侧, 并被释放到靶细胞与CTLs结合部位的间隙中, 穿孔素在Ca^{2+}的作用下, 嵌入靶细胞膜的双层磷脂中, 形成管状的多聚穿孔素, 使细胞外的水分进入细胞内, 一些电解质和大分子物质流出胞外, 靶细胞终因渗透压改变而溶解死亡. 在慢性乙肝患者肝组织活检标本中均可以检测到穿孔素mRNA, 而在脂肪肝、Gilbert综合征和Dubin-Johnson综合征等患者的肝组织中则不能检测到[4]. 并且, 肝组织穿孔素mRNA表达的强度与乙型肝炎组织活动性指数及血清ALT水平呈正相关关系[4-5], 提示T细胞合成的穿孔素与慢性乙肝的发病机制密切相关. 我们在蛋白质水平上探讨肝组织穿孔素表达对慢性乙肝的临床影响, 发现在检测的所有患者中, 有37例肝组织穿孔素表达阳性, 阳性率为78.7%, 低于肝组织中mRNA检测的阳性率[4], 这可能主要是PCR方法的敏感性要显著高于免疫组化方法的敏感性. 本研究结果同样表明, 肝内穿孔素表达强度与血清ALT水平、肝组织炎症活动度具有显著的一致性关系. 但资料表明, 肝组织纤维化的程度与穿孔素的表达无关, 说明肝组织穿孔素的表达主要反映的是肝细胞炎症活动的当时状况, 而对炎症所致的结果并无直接的关联. 由于穿孔素可直接引起受染肝细胞的损害, 导致细胞溶解. 因此, 从理论上说, 穿孔素无疑是有利于乙肝病毒清除的. 本研究通过检测外周血乙肝病毒载量和HBeAg水平, 显示肝组织穿孔素的合成与病毒载量及其蛋白抗原的产生呈负向关系, 证实穿孔素对清除乙肝病毒确实是有利的.

■同行评价
本文通过对47例慢性乙肝患者进行肝穿,探讨了肝组织穿孔素的表达对肝脏炎症、纤维化、乙肝病毒及抗病毒治疗的影响.结果发现慢性乙肝患者肝组织穿孔素的表达介导了肝细胞的损害,有利于乙肝病毒的清除,可能会促进干扰素的抗病毒效果,并具有预测干扰素抗病毒疗效的价值.研究方法得当,结果可靠,有临床实用价值.

进一步分析显示,在接受干扰素治疗前,肝组织穿孔素表达较强者,治疗结束时的疗效要显著优于穿孔素表达低下和无表达者.这表明慢性乙肝患者肝内穿孔素表达的水平反映了患者的免疫水平,治疗前存在较强免疫应答者,获得抑制或清除病毒的机会将会增大.因此,肝组织穿孔素表达的强度可以预测干扰素抗病毒的疗效.在慢性丙肝的治疗中曾发现,干扰素治疗前外周血单个核细胞中穿孔素基因表达较高者,治疗后更易获得持续的生化应答[6].我们在慢性乙肝的肝组织中检测穿孔素的表达,以及我们同期在检测患者外周血单个核细胞中穿孔素的表达时,也发现与干扰素的治疗存在类似的关系.研究结果表明,在CTLs介导的特异性细胞免疫应答中,作为反应终端的效应分子,穿孔素在慢性乙肝的发病、病毒的清除以及干扰素的抗病毒疗效方面都发挥了一定的作用.

4 参考文献

1 Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents *in vitro* and *in vivo*. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 323-329

2 Hodgson PD, Grant MD, Michalak TI. Perforin and Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity in acute and chronic woodchuck viral hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 63-70

3 Tordjmann T, Soulie A, Guettier C, Schmidt M, Berthou C, Beaugrand M, Sasportes M. Perforin and granzyme B lytic protein expression during chronic viral and autoimmune hepatitis. *Liver* 1998; 18: 391-397

4 Tagashira M, Yamamoto K, Fujio K, Nagano T, Okamoto R, Ibuki N, Yabushita K, Matsumura S, Okano N, Tsuji T. Expression of perforin and Fas ligand mRNA in the liver of viral hepatitis. *J Clin Immunol* 2000; 20: 347-353

5 Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, Kim HY, Yoo JY. Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 130-135

6 Balian A, Naveau S, Zou W, Durand-Gasselin I, Bouchet L, Foussat A, Galanaud P, Chaput JC, Emilie D. Pretreatment expression of the perforin gene by circulating CD8(+) T lymphocytes predicts biochemical response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 177-184

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 •

全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知

本刊讯 由福建医科大学附属协和医院承办的国家级继续医学教育项目《消化系疾病的诊疗进展》将于2006年10月14日-18日在福建省武夷山市举行,学习班授予Ⅰ类继续教育学分11分,欢迎全国消化系病专业中高级医务人员报名参加.

联系人: 陈运新, xinxingege75@sohu.com, 0591-83357896转8482.

地址: 福建省福州市新权路29号福建医科大学附属协和医院, 邮编: 350001.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2211-2216
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

乙型肝炎病毒基因型研究新进展

刘 兴, 唐 红, 何 芳

刘兴, 唐红, 何芳, 四川大学华西医院感染性疾病中心 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染性疾病研究室 四川省成都市 610041
国家杰出青年科学基金资助项目, No. 30325036
通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染性疾病研究室. htang6198@hotmail.com
电话: 028-85422647
收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-06-24

摘要

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝DNA病毒科, 由于HBV复制过程中HBV DNA聚合酶缺乏校正功能, 导致HBV容易发生突变. 根据基因序列差异的多少, 可将HBV划分为A-H 8种基因型, 其中A, B, C, F 4个基因型还可以划分为不同的亚型. HBV基因型呈一定的地理区域性分布. 并且HBV基因型对于探讨HBV的传播途径, HBV携带者的流动形式以及变异株在不同人群中的流行情况都有很重要的意义. HBV基因型之间结构和功能的差异均可影响慢性HBV感染者在临床诊治过程中出现的基因变异、病情预后以及对抗病毒治疗的反应性. 虽然近几年对HBV基因型的研究迅速增多, 但尚处于探索阶段对其研究仍任重而道远.

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 变异; 治疗

刘兴, 唐红, 何芳. 乙型肝炎病毒基因型研究新进展. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2211-2216
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2211.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界范围广泛流行, 仅慢性HBV携带者就有近4亿人之多. HBV感染不仅可导致急、慢性病毒性肝炎, 而且还可发展为肝硬化及肝细胞癌, 每年导致大约100万人死亡, 严重影响了人类的健康. 1988年Okamoto首先提出了HBV基因分型法. 目前, HBV基因型与HBV基因变异、HBV导致的临床疾病、慢性HBV感染者对抗病毒治疗的反应性及病情预后之间的关系已成为研究的热点. 现将HBV基因型的分型方法、不同基因型的地域分布以及与HBV血清型、基因变异、临床疾病、抗病毒治疗及预后的关系等方面的研究进展进行阐述. 1988年, Okamoto *et al*[1]对18株HBV的全部核苷酸序列进行分析, 根据核苷酸全序列异质≥8%分为A, B, C, D 4个基因型, 从而提出了HBV基因型的概念并初步建立了HBV基因型的分型标准. 1992年Norder *et al*[2]对HBV的S基因序列进行分析, 根据S基因差异≥4%, 发现了2种新基因型E, F. 以后Stuyver *et al*[3]及Arauz-Ruiz *et al*[4]分别在2000年和2002年发现了基因型G和H. 到目前为止, 根据HBV核苷酸全序列异质≥8%或S基因序列核苷酸差异度≥4%, 已将乙肝病毒株分为A到H 8种基因型. 其中基因型A还可分为Ae(e代表欧洲)和Aa(a代表亚洲和非洲)2个亚型[5]; 基因型B又可分为Ba(a代表亚洲)和Bj(j代表日本)2个亚型[6]; 基因型C可分为C1和C2 2个亚型[7]; 基因型F又可分为4个分支(Ⅰ-Ⅳ), 亚基因型F1属于分支Ⅰ, 亚基因型F2属于分支Ⅱ和Ⅳ, 基因型H属于基因型F的分支Ⅲ. 基因型H的全基因序列与基因型F相差7.5%-9.6%, 所以把他从基因型F中分离出来作为一种新的基因型[4,8-9]. 鉴于HBV的进化特点, 今后还有可能发现新的基因型.

由于不同基因型的HBV在流行特征、致病性、对药物治疗反应等方面存在差异, 因此了解HBV基因型具有重要的临床意义. 通过HBV基因分型(1)可用于流行病学研究, 了解HBV基因型的地区分布、致病性、基因变异及变异株在不同人群中的流行情况; (2)探索HBV传播途径. 基因型A与性接触有关, 而基因型D则与血液传播有关[10]; (3)可观察疫苗的预防作用, 尤其对母婴传播基因型的研究; (4)可了解基因型与抗病毒疗效之间的关系[11].

1 HBV基因分型的检测方法

1988年Okamoto首先提出了乙型肝炎病毒基因分型法. 随着分子生物学技术的发展, 基因分型的方法也在不断进步, 渐趋简化、准确. HBV基因分型方法主要有(1)HBV全基因测序. 由Okamoto *et al*[1]首先提出, 根据HBV核苷酸全序

■背景资料
近年来, 国内外学者从流行病学、分子生物学、临床医学等方面对乙型肝炎病毒基因型进行了大量的研究, 发现HBV基因型与HBV血清型、基因变异、临床疾病、抗病毒治疗及预后等方面都有密切的关系. 这对于HBV的基础研究、分子流行病学调查、临床诊治过程中出现的基因变异、对抗病毒治疗反应和病情预后评估等均有重要的意义.

■研发前沿
目前, HBV基因型与HBV基因变异、HBV导致的临床疾病、慢性HBV感染者对抗病毒治疗的反应性及病情预后之间的关系已成为研究的热点.

■相关报道
Locarnini在文献Molecular virology of hepatitis B virus (*Seminars in Liver Disease* 2004; 24: 3-10)中对乙型肝炎病毒的基因型、基因变异、对抗病毒药物的耐药性及解决办法等方面进行了较为详细的阐述，有助于对乙型肝炎病毒的基因变异及对抗病毒药物的耐药性等方面进行较为全面的了解.

列异质≥8%进行分型, 是HBV基因分型的金标准; (2)S基因序列测定. 由Norder *et al*[2]提出, 初步简化了HBV的基因分型方法. 以上这2种方法均需时费力、较为繁琐, 不适合流行病学调查; (3)S基因聚合酶链反应-限制性片断长度多态性分析(PCR-RFLP). 即采用能识别各基因型特异性序列的限制酶, 并依据限制性片断长度多态性而确定基因型的技术. 此方法灵敏度较高、特异性较强, 能较准确地鉴定HBV基因型,可用于HBV基因型的流行病学调查, 但步骤较繁杂、易受污染、酶切位点易受基因变异的影响[12-13]; (4)HBV基因型特异性表位mAb联免疫吸附法. Usuda *et al*[14]通过制备前S2区域基因型特异性表位mAb, 并用辣根过氧化物酶进行标记, 更简化了检测方法, 适用于大规模的流行病学调查, 但本法对于不同基因型混合感染或基因型特异性表位存在点突变时则不能分型, 同时需要建立一套mAb; (5)HBV基因型特异性引物PCR(PCR-SSP). Naito *et al*[15]设计了A-F 6种基因型的型特异性引物进行套式PCR, 操作较简单准确, 可用于HBV感染的分子诊断和大范围的调查; (6)PCR微板核酸分子杂交-ELISA法. 生物素化的引物PCR反应扩增待检模板后, 用包被有特异探针的微孔板捕获扩增产物, 链霉亲和素标记的酶与其结合, 酶促底物显色检测, 能快速简便确定HBV基因型, 该方法杂交时间短、分型较可靠、自动化程度高, 可大规模进行HBV基因分型[16]. 另外, 近几年发展起来的基因芯片技术使检测HBV基因型变的更加简便、高效、准确成为可能, 基因芯片用于乙型肝炎病毒的基因分型检测有很多潜在的优势, 但在实现过程中还有许多需待解决的问题[17].

2 HBV基因型的地理分布和血清型

2.1 地理分布 近几年研究发现, HBV基因型呈一定的地理区域性分布, A型主要分布于欧洲的西北部、北美、非洲和菲律宾; B型和C型是亚洲和大洋洲的特征性基因型, B型主要见于中国、日本、印度尼西亚、越南和巴西, 其中Bj亚型在日本被发现, 而Ba亚型则分布在整个亚洲; C型主要见于中国、韩国、日本、越南和玻利尼西亚; D型在全世界均有分布, 主要分布于地中海地区、中东和南亚; E型主要见于非洲西部沿海地区及马达加斯加; F型多见于南美洲的土著居民; G型主要分布在美国、法国、德国、英国和意大利, 大多常与基因型A共同感染; H型主要分布在美洲中部的印第安人, 在加利福尼亚和墨西哥也被发现[18-20]. 目前认为, 不同地区优势基因型反映了HBV自然感染史发生的变异特点, 是否HBV基因型分布与人种易感性有关目前尚不清楚. 基因型分布还受种族背景的影响, 基因型A和D主要在白种人中被发现[21], 而亚洲的病毒携带者主要是基因型B和C. 不同HBV基因型的盛行也反映了移民的源地及移民形式的情况, 移民可造成某一地区基因型分布及其流行的改变. 在西班牙基因型A和D是很常见的, 在美洲中部基因型D的存在也是西班牙人迁入的结果[19]. 在亚洲尤其在我国HBV基因型以B和C型为主. 在我国, B型和C型的分布也不平行, 也存在一定的地域差异即南方以B型为主, 北方以C型为主, A型和D型在我国多数地区也占有一定比例. 宋淑静 *et al*[11]报道, 北京、天津、长春、沈阳和大连这5个城市主要基因型均是C型, B型次之, B, C混合型也比较多见.

2.2 血清型 血清型是由病毒外膜蛋白上的一些氨基酸残基决定的, 是病毒外膜蛋白的表现型, 并不能真正反映病毒基因组的差异. 通过HBV包膜蛋白上的一个共同抗原决定簇“a”和两个亚型决定簇“d/y”和“w/r”, 将HBV血清型分为4个亚型: ayw, adw, ayr, adr, 又将*w*分为w1-4, q分为q+和q-, 使其扩展为ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+和adrq- 9个血清型[19,22-23]. 虽然血清型的分型方法已建立多年, 但人们发现他的临床意义并不是很大. 虽然根据HBsAg序列可分为基因型和血清型, 但两者之间不一定相符合, 他们之间的分布可能会有一定的差异. 但很多研究[19,22-23]发现, HBV基因型和血清型之间也有一定的相关性, 总结两者之间的关系大致为: 基因型A(adw2, ayw1), 基因型B(adw2, ayw1), 基因型C(adw2, adrq+, adrq-, ayr), 基因型D(ayw2, ayw3), 基因型E(ayw4), 基因型F(adw4, adw2, ayw4), 基因型G(adw2), 基因型H(adw3). 可见同一种血清型可属于不同的基因型, 而同一种基因型可有几种不同的血清型. 但这两者之间关系的临床意义尚未明确.

3 HBV基因型和基因变异的关系

HBV在宿主体内感染的过程中会发生自然变异, 变异的不断积累也使HBV的基因组核苷酸序列产生了较大的变化, 在此基础上形成了不同的基因型, 所以这两者之间有一定的相关性. 研究发现不同的基因型易发生的突变类型不同, 与

病情转归也有一定的相关性. HBV基本核心启动子(basic core promoter, BCP)1762T和1764A变异, 在临床上较常见. 该双突变在基因型C中较基因型B频繁, 而在基因型A中较基因型D频繁, 并且发现与肝硬化及肝细胞癌的发生具有明显的相关性[24-27]. 在基因型A中亚型Aa突变较亚型Ae更显著, 且核心启动子双突变(1762T和1764A)在亚型Aa中较亚型Ae更频繁[5]. 另外Duong *et al*[28]报道, 在HBeAg阴性的患者中, BCP突变在HBV基因型D中明显低于基因型C. 在肝细胞癌患者中, HBV基因型C和核心启动子突变所占的比例明显较多, 但进一步的研究发现, 肝细胞癌的发生可能与HBV基因型C之间并无直接的关系, 而可能与HBV基因型C核心启动子的高突变率有关[29]. Leon *et al*[30]对50名HBV阳性患者的HBV基因分型后发现, 在乙肝病毒携带者中, HBx M130K和V131I(T-A)变异在基因型F中被发现, 但在急性乙型肝炎恢复后的患者中未被发现, 但T-A变异是否可作为HBV感染的严重肝病患者的预后因素仍需更多的研究证实.

HBV前C区(precore)可发生1896A, 1862T, 1899A等部位的变异, 以前C区1896A变异与基因型的关系报道较多. HBV前C区1896A突变在基因型B中较基因型C普遍[24], 基因型F与前C区终止密码子变异亦具有明显的相关性[31], 前C区1896A位变异使第28位的密码子色氨酸转变为终止密码TAG, 使前C/C区编码的HBeAg合成提前终止, 导致感染1896A变异株的患者血清中HBeAg阴性. 在基因型B, D, E, G和一些基因型C中1858位的碱基为T，所以终止密码子发生1896A变异后可与1858位的碱基T组成稳定的T-A结构，所以这些基因型易发生前C区终止密码子1896A变异; 而在基因型A及一些基因型C和F中因1858位的碱基C和1896位的碱基G组成稳定的G-C结构, 所以不易发生前C区终止密码子1896A变异, 从而使HBeAg的血清转换延迟或不发生[32]. 另有文献[33]报道, T-1762变异在基因型C中更频繁, 且更容易引起炎症和纤维化, 前C区变异却较少引起炎症, 并多伴有HBeAg阴性和低病毒复制. 基因变异与HBeAg血清转换也有一定的相关性. HBV前C区1896A, 1862T, 1899A变异及HBV BCP 1762T和1764A双突变均可导致血清HBeAg阴性. Ni *et al*[34]对110名年龄相近的慢性HBV感染的儿童进行研究后发现, 核心启动子1752, 1775和1799核苷酸变异与HBeAg血清转换具有明显的相关性; 1762+1764核苷酸变异与HBeAg血清转换的关系却不大, 然而却可引起基因型C的HBeAg血清转换, 同时发现前C区1896核苷酸变异与一半的儿童患者HBeAg血清转换有关.

4 HBV基因型与临床疾病的关系

4.1 *临床发病* HBV感染患者的临床表现之间有很大的差异, 这不仅和患者的自身情况有关, 还可能与感染病毒株的基因型种类密切相关. 目前已有一些关于这方面的研究报道, 并得出了初步的结果. HBV基因型与病毒复制水平及病毒标志物的表达有一定的相关性. 研究发现, 基因型B的HBeAg血清转换率比基因型C要高, 基因型C较基因型B有较高的HBeAg阳性率, 并发现anti-HBe在基因型B中较基因型C普遍, 而HBV DNA水平在基因型B和C之间却未见有差异[18,24,33,35], 但有文献[36]报道, 基因型C却比基因型B有较高的HBV DNA水平. Verschuere *et al*[37]也发现, HBV基因型A和B(尤其Bj)均有较高的HBeAg清除率. 但Lim *et al*[38]却报道, HBeAg及anti-HBe与基因型B和C之间无相关性, 可能与研究的病例数较少有关. 有文献[39]报道, 对145名急性乙型肝炎进行基因分型后发现基因型A较基因型C有较高的HBV DNA定量及较长的HBsAg持续时间. 另外Zollner *et al*[40]对41份对拉米夫定耐药的病毒株经基因分型后发现, 发生拉米夫定耐药后, 血清HBV拷贝数在HBV基因型A中较基因型D高. HBV基因型A比基因型D的HBV DNA和HBsAg更容易被清除, 并在HBeAg发生血清转换后能获得持久的缓解, 但HBeAg血清转换与HBV基因型无明显相关[41]. 法国的一项研究[10]却发现, 基因型A与HBeAg阳性相关, 而基因型D与anti-HBe阳性相关. HBV基因型与病情之间的关系报道较多. 在亚洲HBV基因型以B和C为主, 而严重肝病的发生与基因型C的关系比基因型B的关系更密切, 基因型C较基因型B有较高丙氨酸转氨酶水平, 组织学炎症活动程度较高的患者基因型C较基因型B多见, 而组织学炎症活动程度较低的患者基因型C却比基因型B少, 基因型C在乙肝后肝硬化的发病中起一定的作用, 然而基因型B与年轻无肝硬化患者肝癌的发生有关, 而在日本感染HBV基因型B的年轻患者(≤30岁)却未见肝癌

■**应用要点**
HBV基因型对于HBV的基础研究、分子流行病学调查、临床诊治过程中出现的基因变异、对抗病毒治疗反应和病情预后评估等均有重要的意义, 有其广泛的应用前景.

■名词解释
HBV基因型：乙肝病毒通过逆转录机制复制，由于HBV DNA聚合酶缺乏校正功能，因此在复制过程中极易发生核苷酸配对错误而造成基因突变，因此各个HBV间存在着DNA序列的差异性，即HBV间的自然异质性. 根据HBV核苷酸全序列异质≥8%或S基因序列核苷酸差异度≥4%，将乙肝病毒株分为A到H 8种基因型. 基因型反映了HBV自然感染史发生的变异特点，是病毒变异进化的结果.

的发生[18,24, 33,35-36,42]. Sumi *et al*[43]对585名患者(其中258名组织学上证实为慢性肝病患者，74名为肝细胞癌患者)的研究发现，感染HBV基因型B的患者发生肝纤维化及肝细胞癌的平均年龄要比感染HBV基因型C的患者的年龄大；在慢性肝病患者中，基因型B的HBeAg血清转换率比基因型C要高. 在组织学上证实为慢性肝病的患者中，基因型B发生肝纤维化的比例要比基因型C低，这种差异在年轻患者中更显著而在年老患者中则无差异，然而慢性肝病及肝细胞癌患者在这2种基因型中的分布却相似. 可见虽然基因型B的HBeAg血清转换发生较早，引起肝纤维化及肝细胞癌的进程较慢，然而患者一生中发生肝纤维化及肝细胞癌的风险在B型及C型慢性肝病患者中则可能无差异. Yotsuyanagi *et al*[39]报道，基因型A较基因型C有较低的最高ALT水平，并且较基因型C有较长及较轻的临床过程，并发现在日本大都市市区急性乙型肝炎中以基因型A最常见. Duong *et al*[28]对413名HBV携带者的血清进行基因分型后发现，基因型C与慢性肝病有关，而基因型D与无症状携带者有关，且可引起早期HBeAg血清转换. 另外有研究[21,35]发现，HBV基因型A较基因型D更易伴随慢性感染，基因型A主要引起慢性活动性肝炎，而基因型D在急性肝炎中最常见. 基因型F引起的肝病的死亡率要比基因型A或D高[41].

4.2 HBV基因型与抗病毒疗效之间的关系 病毒感染人体后，感染者具有不同的临床经过和预后，对抗病毒治疗的应答也不尽相同，既可能与感染者的免疫状态和基因背景有关，也可能与病毒的基因特性有关. HBV基因型是决定抗病毒疗效的一个重要因素，用于估计抗病毒的治疗反应是很重要的，但是否能在临床上广泛应用尚待进一步的研究决定. (1)HBV基因型与干扰素抗病毒疗效之间的关系. 干扰素抗病毒作用是通过激活干扰素激活基因，编码产生一系列抗病毒蛋白来完成，很多研究发现，干扰素抗病毒疗效与HBV基因型有一定的相关性. 有文献[10,36]报道，基因型C和D对干扰素的治疗反应要比基因型A和B差. 一项纳入266例HBeAg阳性患者的随机对照试验[44]研究发现，用干扰素抗病毒治疗对基因型A可产生较好的HBsAg清除率. Erhardt *et al*[45]对165例患者研究发现，用干扰素抗病毒治疗后的持久反应，HBV基因型A要比基因型D好，其中对于HBeAg阳性患者各占46%和24%(P<0.03)，对于HBeAg阴性患者各占59%和29%(P<0.05). (2)HBV基因型与拉米夫定抗病毒疗效之间的关系. 拉米夫定抑制HBV DNA聚合酶，从而有效抑制HBV的复制. 目前有关拉米夫定与HBV基因型的研究主要为基因型B和C，其他基因型报道较少. 有研究[36,46]发现，对拉米夫定的疗效及停药后疗效的持久性基因型C均较基因型B差；对拉米夫定耐药的发生率基因型A较基因型D高，但在基因型B和C之间未见有差别. Akuta *et al*[35]对213名慢性乙肝患者给予1 a的拉米夫定治疗后发现，HBV对拉米夫定耐药的发生率不依赖于基因型(A, B, C). HBV亚基因型Ba对拉米夫定耐药的发生率显著比亚基因型Bj高. 对于基因型C，HBeAg阳性者对拉米夫定耐药的发生率要显著高于HBeAg阴性者，而对于基因型B这种差异不显著. 但另有研究[47]发现，不同的结果，在中国乙肝患者中，经过1 a的拉米夫定抗病毒治疗后发现，HBV基因型B和C对抗病毒治疗的反应及YMDD变异的发生率均无差别，并表明在中国乙肝患者中，用拉米夫定抗病毒治疗前通过检测基因型来预测抗病毒疗效可能并不重要. (3)HBV基因型与阿德福韦酯抗病毒疗效之间的关系. 阿德福韦酯口服后最终在细胞内转化为阿德福韦双磷酸酯，后者可选择性抑制HBV DNA聚合酶. 目前关于HBV基因型与阿德福韦酯抗病毒疗效之间的关系的报道较少. 一项由多国参与的阿德福韦酯临床试验[48]共纳入了694例受试者，经过48 wk的阿德福韦酯抗病毒治疗后发现，HBeAg血清转换率在HBV基因型间无统计学上的差异，且阿德福韦酯抗病毒疗效与HBV基因型、HBeAg及种族均没有明显相关性. 另外一项纳入了700例受试者的临床试验[49]研究后发现，经过48 wk的阿德福韦酯抗病毒治疗后并未发现阿德福韦酯耐药变异的发生. HBV基因型是决定抗病毒疗效的重要因素，有文献[44,50]报道，即使用干扰素联合拉米夫定抗病毒治疗其效果也并不一定优于单一疗法.

总之，目前对基因型的研究尚需寻找更加简易高效、准确统一的分型方法；对HBV基因型的不同致病性、病毒变异及抗病毒疗效之间的关系尚缺乏大样本研究；而且能否通过改变基因型达到防治乙型肝炎的目的也是个值得探讨的课题. HBV基因型对于HBV的基础研究、分子流行病学调查、临床诊治过程中出现的基因变异、对抗病毒治疗反应和病情预后评估等均有重要的意义，有其广泛的应用前景.

5 参考文献

1 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69(Pt 10): 2575-2583

2 Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992; 73(Pt 5): 1201-1208

3 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74

4 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073

5 Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, Shrestha SM, Gamutan MT, Khan M, Gish RG, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 2004; 85: 811-820

6 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76: 5985-5992

7 Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292

8 Mbayed VA, Barbini L, Lopez JL, Campos RH. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Arch Virol* 2001; 146: 1803-1810

9 Norder H, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol FH, Echevarria JM, Magnius LO. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol* 2003; 84: 2083-2087

10 Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Penaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006; 13: 329-335

11 宋淑静, 何忠平, 庄辉, 闫杰, 董庆鸣. 中国北方5城市慢性乙型肝炎患者的基因分型. 中国公共卫生 2004; 20: 166-167

12 阎丽, 侯金林, 郭亚兵, 王战会, 林裕龙, 骆抗先. 乙型肝炎病毒基因型S基因PCR-RFLP分型方法的建立. 中华传染病杂志 2001; 19: 224-228

13 Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, Robertson BH. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 1999; 450: 66-71

14 Usuda S, Okamoto H, Tanaka T, Kidd-Ljunggren K, Holland PV, Miyakawa Y, Mayumi M. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product. *J Virol Methods* 2000; 87: 81-89

15 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 362-364

16 王虹, 万成松, 王省良, 彭华国. 采用PCR微板核酸杂交-ELISA技术进行HBV DNA基因分型的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2001; 21: 234-236

17 杨夏, 张跃新, 朱滨, 孙悦, 阿曼•古丽, 张明智. HBV基因型芯片检测方法的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2005; 25: 603

18 Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutreloigne J, Yuan HJ, Wong DK, Sum SM, Lai CL. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *J Hepatol* 2004; 41: 119-125

19 Jazayeri MS, Basuni AA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. Hepatitis B virus genotypes, core gene variability and ethnicity in the Pacific region. *J Hepatol* 2004; 41: 139-146

20 Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002; 76: 6131-6137

21 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304

22 Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34

23 Liu CJ, Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in taiwan. *J Biomed Sci* 2002; 9: 166-170

24 Watanabe K, Takahashi T, Takahashi S, Okoshi S, Ichida T, Aoyagi Y. Comparative study of genotype B and C hepatitis B virus-induced chronic hepatitis in relation to the basic core promoter and precore mutations. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 441-449

25 Song BC, Kim H, Kim SH, Cha CY, Kook YH, Kim BJ. Comparison of full length sequences of hepatitis B virus isolates in hepatocellular carcinoma patients and asymptomatic carriers of Korea. *J Med Virol* 2005; 75: 13-19

26 Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Kew MC, Yoshihara N, Shrestha SM, Khan M, Miyakawa Y, Mizokami M. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 2004; 40: 747-755

27 Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Ngoc TT, Hayashi S, Sata T, Abe K. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 2004; 74: 228-236

28 Duong TN, Horiike N, Michitaka K, Yan C, Mizokami M, Tanaka Y, Jyoko K, Yamamoto K, Miyaoka H, Yamashita Y, Ohno N, Onji M. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004; 72: 551-557

29 Yuen MF, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai

■同行评价

HBV基因型的研究是近年来的研究热点, 本文从基因型检测方法, 与血清型、基因变异以及抗病毒药物疗效的关系等角度进行了较为全面的阐述, 文中观点引证有据, 内容前沿, 文笔流畅, 有参考价值.

CL. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1593-1598

30 Leon B, Taylor L, Vargas M, Luftig RB, Albertazzi F, Herrero L, Visona K. HBx M130K and V131I (T-A) mutations in HBV genotype F during a follow-up study in chronic carriers. *Virol J* 2005; 2: 60

31 Franca PH, Gonzalez JE, Munne MS, Brandao LH, Gouvea VS, Sablon E, Vanderborght BO. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected argentinean blood donors. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5015-5021

32 Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003; 46: 329-338

33 Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179: 775-782

34 Ni YH, Chang MH, Hsu HY, Tsuei DJ. Longitudinal study on mutation profiles of core promoter and precore regions of the hepatitis B virus genome in children. *Pediatr Res* 2004; 56: 396-399

35 Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003; 38: 315-321

36 Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Intervirology* 2003; 46: 400-407

37 Verschuere V, Yap PS, Fevery J. Is HBV genotyping of clinical relevance? *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 233-236

38 Lim CK, Tan JT, Khoo JB, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, Ton SH. Correlations of HBV Genotypes, Mutations Affecting HBeAg Expression and HBeAg/ anti-HBe Status in HBV Carriers. *Int J Med Sci* 2006; 3: 14-20

39 Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Orito E, Nishiguchi S, Toyoda J, Tomita E, Hino K, Okita K, Murashima S, Sata M, Hoshino H, Miyakawa Y, Iino S. Distinct geographic distributions of hepatitis B virus genotypes in patients with acute infection in Japan. *J Med Virol* 2005; 77: 39-46

40 Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayr J, Sterneck M, Fischer L, Schroter M, Laufs R, Feucht HH. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004; 39: 42-50

41 Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 1848-1856

42 Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, Wang JH, Hung CH, Hu TH. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6000-6006

43 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26

44 Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 297-303

45 Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Haussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009-1013

46 Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S. Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy. *Clin Lab* 2006; 52: 43-47

47 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Yuan HJ, Sum SM, Hui CK, Chan AO, Wang BC, Lai CL. Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antivir Ther* 2003; 8: 531-534

48 Westland C, Delaney W 4th, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, Gish R, Fry J, Brosgart C, Gibbs C, Miller M, Xiong S. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase Ⅲ studies of adefovir dipivoxil1. *Gastroenterology* 2003; 125: 107-116

49 Westland CE, Yang H, Delaney WE 4th, Gibbs CS, Miller MD, Wulfsohn M, Fry J, Brosgart CL, Xiong S. Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003; 38: 96-103

50 Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2217-2222
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

Ku蛋白与肿瘤

占大钱, 黄志勇, 陈孝平

占大钱, 黄志勇, 陈孝平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心 湖北省武汉市 430030
教育部新世纪优秀人才支持计划项目资助, No. NCET-04-0701
通讯作者: 黄志勇, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心.
zyhuang@medmail.com.cn
电话: 027-83663871 传真: 027-83663400
收稿日期: 2006-05-11 接受日期: 2006-05-26

摘要

Ku蛋白是DNA结合蛋白, 能与DNA末端及DNA损伤导致的双链DNA断裂(DSBs)结合. Ku蛋白, 由Ku70/Ku80两亚基紧密结合形成的异二聚体结构, 与DNA依赖的蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)结合形成DNA依赖的蛋白激酶全酶(DNA-PK), 在DSBs的非同源末端结合(NHEJ)修复途径中发挥重要作用. 此外, Ku蛋白在维持端粒结构也有着重要作用. Ku蛋白缺失会造成小鼠成纤维细胞明显的染色体的畸变和淋巴瘤的发生. 在人的肿瘤中, Ku蛋白的活性与肿瘤的发生发展相关. Ku蛋白的DNA末端结合(DEB)活性以及表达和功能与肿瘤对抗癌治疗抵抗相关. 因此, Ku蛋白可作为一个治疗靶点克服肿瘤细胞对抗癌的抵抗而增强对肿瘤的杀伤作用.

关键词: Ku蛋白; DNA修复; 肿瘤

占大钱, 黄志勇, 陈孝平. Ku蛋白与肿瘤. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2217-2222
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2217.asp

0 引言

Ku80蛋白(又称Ku80)与Ku70蛋白形成异二聚体, 称Ku 蛋白. 他是存在于细胞中的DNA末端结合蛋白. Ku蛋白是一种进化保守蛋白, 在不同物种中均发现有同源的Ku蛋白. 最初他是作为一种自身抗原在多发性肌炎-硬皮病重复症候群(scleroderma-polymyositis overlap syndrome)患者中被发现的, 其命名是源于第一个患者前两个字母Ku[1]. Ku蛋白广泛存在于不同组织中, 但其mRNA的含量在胸腺和淋巴细胞中更丰富. Ku蛋白主要存在细胞核中, 但也有报道分布在细胞质和细胞膜上[2-5]. 近年来, 许多学者对Ku蛋白的功能进行了广泛研究, 发现Ku蛋白与肿瘤的发生和发展以及肿瘤的放化疗抵抗性相关.

1 Ku蛋白的结构

Ku蛋白是由2条多肽链通过非共价键紧密结合形成的异二聚体结构, 分别称为Ku70和Ku80. 人Ku70基因位于染色体22q13, 编码609个氨基酸(AA), 相对分子质量为69 kDa. Ku80基因位于2q33-34, 编码732个AA, 相对分子量约83 kDa. 尽管两亚基有不同的生化特性, 但是他们很可能起源于同一个基因, 在酵母中对Ku80与Ku70两亚基比较研究发现, 位于两亚基C端的AA中22%是相同的, 38%是相似的[6-8].

Ku80与Ku70有一定的相互作用区域, 也均有与DNA末端结合的特定区域, 这也是与DNA结合的分子基础. 研究认为Ku70的C端20 kDa与Ku80的C端32 kDa是形成异二聚体的结合部位. 进一步研究认为, Ku80的第449-477位AA是两亚基相互作用的重要部位[6]. Wang *et al*[9]报道Ku80的第371-510位AA是与Ku70相互作用的部位; Ku80C端的第179-732位AA对DNA的末端结合是必要部位. Ku70的第536-609位AA是与DNA结合的核心结构域[7]. Ku蛋白的稳定性有赖于两亚基的相互依存. 如在Ku80突变的xrs-6细胞系中, 尽管Ku70 mRNA的表达正常, 但很难测得Ku70蛋白[10-11]. 不过也有报道Ku80蛋白水平的下降并不影响Ku70的表达[12].

2 Ku蛋白的功能

2.1 在DNA损伤修复中的作用 Ku蛋白可结合游离的DNA末端或一些特殊的DNA结构. 与DNA末端的结合并不依赖DNA末端特异结构, 如能与平性末端, 与3'和5'黏性末端结合, 还能与发夹样末端结合, 但是不能与单链末端结合. 特殊DNA结构主要包括单链向双链转变, 环状DNA分子内的一个缺口或DNA单链上的一个空隙或双链中因为碱基不互补而形成的“泡状”结构, 这些结合都非DNA序列特异性的. 可以推断, Ku能与细胞内的各种DNA断裂结构相结合而

■背景资料
Ku蛋白通过调控DNK-PK的活性参与DSBs的NHEJ的修复, 维持基因组的稳定. 近来报道Ku蛋白可能是一个抑癌基因以及Ku蛋白的表达和活性的增高与肿瘤的抵抗性相关的文章增多.

■研发前沿
进一步深入研究Ku的生物活性以及作为一个治疗靶点的有效性成为研究热点.

识别各种类型的DNA损伤[13]. 同时, 发现Ku蛋白与DNA-PKcs结合形成DNA-Pk全酶[14-15]. DNA-Pk是一种由双链DNA激活的丝-苏氨酸激酶, Ku蛋白是DNA-Pk的调控成分; DNA-PKcs是催化亚基部分, 由4127个AA组成, 相对分子质量约470 kDa的大分子量蛋白, 其基因位于8q11, 他是磷脂酰肌激酶3(PI3-K)家族中的一员, 但没有脂质激酶的活性[7,16]. Ku蛋白可通过2条途径激活DNA-PKcs, (1)Ku蛋白与DNA结合后招募DNA-PKcs而激活; (2)Ku蛋白可直接与DNA-PKcs相互结合激活, 但游离的Ku蛋白与DNA-PKcs直接结合并不形成稳定结构. 尽管如此, 在没有Ku蛋白时DNA-PKcs本身能与游离的DNA末端结合而被激活[7].

DNA-PK最初一直作为一个转录调控因子被研究, 因为体外研究结果显示, 他可以磷酸化包括SP1, P53, OC-1以及RNA聚合酶Ⅱ在内的一系列转录因子[6]. 后续研究才认识到Ku和DNA-PKcs在哺乳细胞系的DSBs修复中起重要作用[17-20]. DSBS可由外源性损伤导致, 如电离辐射, 抗癌药物; 生理过程中也会产生, 如V(D)J重组即在淋巴细胞发育过程产生多态性抗体和T细胞表面受体分子特异性基因重组过程. DSBs是最致命的DNA损伤, 不仅威胁到基因组的完整性, 也会导致机体的死亡. 未修复的DSBS可激活细胞周期阻滞机制或发出细胞死亡信号; 更糟的是未修复的DSBS或不恰当修复或重组的DSBS可导致基因结构的改变而导致肿瘤发生[16,21].

对于DSBS细胞, 主要有两条途径修复即非同源性末端连结合(NHEJ)和同源重组修复(HR). 在不同物种中两者所起的作用不同, 在哺乳细胞系中NHEJ途径占主导地位, 而在酵母细胞则主要由HR途径修复[16,22]. HR主要用姐妹染色单体和同源染色体作为模板修复损伤的染色体. 目前认为, NHEJ途径至少有6种核心因子参与: 其中Ku70, Ku80, 连接酶Ⅳ XRCC4蛋白在酵母和哺乳类都有, 而DNA-PKCs和Artemis蛋白是在最近的进化过程中产生的[16,23]. 其中Artemis有核酸内切酶和外切酶活性, 对不能直接连接的部位进行修饰[24]. 当DNA的DSBS修复时, 首先, 2个Ku分子分别识别并结合到一条DNA链末端, Ku-DNA复合物招集DNA-PKCs到损伤部位与之结合并激活其激酶活性, 而且还可能招集其他蛋白质参与DNA修复[13,23]; 然后, 两DNA末端通过在DNA-PK上的相互独立的结合位点或两DNA-PK相互联系而连系在一起, 此后有些DSBs可直接连接, 大多数情况下, DSBs不能直接连接而需要加工. 研究发现: DSBs修复时会切除DNA末端的核苷酸直到可互补的1-6不等的核苷酸同源处再通过碱基互补, 没有互补的核苷酸被核酸酶水解掉, 这可能就是加工的过程[21]. 此后, 由DNA聚合酶合成填补空缺; 最后, 由XRCC4蛋白和连接酶Ⅳ连接DNA末端形成DNA分子[16]. 在连接之前, DNA-Pk发生自身磷酸化, 使DNA-PKcs和Ku从DNA链解离下来.

当然, 在哺乳类动物中NHEJ对DSBs修复占主导作用, 但HR也同样能修复DSBs. 在Ku80突变的xrs-6细胞系中, 发现HR在修复DSBs起重要作用[22]. 在缺失DNA-PK的细胞系中, DSBs仍可以通过其他途径修复多达50%[23]. 研究结果显示, NHER主要修复G1和G0期的DSBs, 虽然在其他细胞周期中也发挥作用, 但作用很小; HR则是在细胞间期和G2期起作用[16].

2.2 Ku蛋白与端粒 端粒是位于染色体末端类似染色体的“帽子”的特殊结构, 由重复序列和一系列蛋白质构成, 能保护DNA末端避免外切酶损伤而降解和阻止不合理的重组及末端融合, 在维持染色体的稳定性发挥重要作用. 在酵母细胞中端粒还可以抑制临近基因的表达, 被称为端粒沉默或端粒位置效应. 当编码YKu70或YKu80蛋白基因突变时不仅NHEJ受损而且端粒沉默和端粒长度明显受损[25]. 在哺乳类动物中DNA-PKCS以及(TRf-2)端粒重复序列激活因子共同作用形成染色体末端的t环样结构而发挥人类染色体末端的帽子功能[26]. 在Ku80-/-小鼠中也出现与染色体末端相关的广泛的端粒缩短, Ku80+/-细胞表型出中度水平的端粒缩短[27]. 在DNA-PK任一组成部分发生突变的小鼠, 小鼠均出现染色体末端融合, 而且DNA-PK活性部分丧失足有影响端粒的保护功能. 可见DNA-PK对端粒的保护是必要的. 那么Ku, DNA-Pkcs是怎样同时一方面促进DNA损伤断端的连接而另一方面又能保护染色体末端的, 目前并不清楚[28].

当然, 除此之外, Ku蛋白及DNA-Pkcs也参与其他生命活动. 如DNA-PK激活后磷酸化P53和其调控因子Mdm-2, 使P53活化产生损伤应答, 但辐射损伤后P53的激活并非DNA-PK依赖的, 研究表明DNA-PK选择性的激活P53诱导的细胞凋亡途径而对细胞周期阻止是非必要的[29]. 可见, DNA-PK还可能转导细胞周期阻滞或凋亡信号而参与DNA修复或凋亡. 有报道认为, 分布在细胞膜上的Ku蛋白介导肿瘤细胞与纤维结合蛋

白的结合以及细胞之间的相互作用[30-31].

3 Ku蛋白与肿瘤

肿瘤是由于一系列的基因的改变导致控制细胞生长、分化、死亡机制的紊乱或基因组的不稳定而引发的多基因紊乱性疾病[32]. DNA修复机制和端粒结构在保护基因组的稳定性而抑制肿瘤发生和进展方面起着重要作用. Ku蛋白和DNA-PKcs在NHEJ修复中扮演着重要角色, 与端粒结构的维持也紧密相关. 因此, Ku蛋白可能为一个肿瘤抑制蛋白.

肿瘤易感基因分为carethaker和gatekeeper. Caretaker基因主要在DNA修复中发挥作用而维持基因组的稳定性; gatekeeper主要控制细胞的死亡和增殖, 2种基因功能的共缺失会大大增加肿瘤的易感性[33]. 研究认为, Ku基因是一个caretaker基因, 当与gatekeeper基因共缺失或异常将导致肿瘤的发生. 对Ku80-/-小鼠研究表明, 小鼠能成活, 不自发产生肿瘤, 但其成纤维细胞表现出明显的染色体畸形, 83%基因断裂或易位, 15%出现非整倍体[34-35]. Ku70基因敲除也可造成小鼠成纤维细胞姐妹染色体互换率增高及淋巴瘤的发生[36]. Lim *et al*[37]把小鼠的Ku80基因和P53基因共敲除后中发现: 小鼠开始发育正常, 但出生3 mo后都因发生原B细胞淋巴瘤而死亡. 另有研究显示, Ku8和PARP-1(DNA损伤信号分子)作为caretakers基因在抑制肝脏肿瘤的发生有协同作用, Ku80和PARP-1基因共敲除的小鼠在胚胎期第9.5 d死亡, PARP-1/-Ku80+/-小鼠肝脏肿瘤的发生率高达60%[38]. 不过, 人肿瘤组织的Ku蛋白的研究结果并不完全一致. Moll *et al*[39]对各种正常组织和肿瘤组织中Ku蛋白和DNA-Pkcs的表达研究发现, 大多数正常组织有两者的表达, 但各组织间的表达水平不同, 呈组织细胞特异性, 而且Ku蛋白和DNA-Pkcs的表达水平会随机体的生理状态改变, 如在泌乳期乳腺组织80%有Ku蛋白和DNA-Pkcs的表达, 而静止期很少有表达. 肿瘤组织中两者的表达与对应正常组织相类似. Ku70mRNA, Ku80mRNA和DNA-PkcsmRNA在各组织的表达差异小, 因此认为是转录后水平的修饰引起各组织间的Ku蛋白和DNA-Pkcs的差异. Rigas *et al*[40]用免疫组化方法对人正常结肠组织、结肠腺瘤、结肠癌和结肠癌周边的正常组织中的Ku蛋白及DNA-Pkcs表达水平研究发现, 在结肠腺瘤中Ku70/Ku80水平只有结肠癌的1/3-1/2水平, 但两者均较正常结肠组织低, 而DNA-Pkcs下降不明显. 认为腺瘤阶段的Ku70/Ku80蛋白水平的明显下降很可能对结肠癌的发展起关键性的作用. Korabiowska *et al*[41]也报道, 在结肠直肠肿瘤中Ku70/Ku80表达下调, 而且在遗传性的肿瘤更多见. 在恶性黑色素瘤中, Ku基因的表达随着肿瘤的进展而下调[42]. 相反, Stronati *et al*[43]发现膀胱癌细胞中的Ku表达以及Ku-DNA结合活性较对照组增强. Lim *et al*[44]发现胃癌细胞的高度增殖与细胞核中的COX-2(环氧化酶-2)依赖的Ku70/Ku80高水平相关. 在结肠直肠肿瘤中DNA-Pk活性以及Ku70/Ku80, DNA-Pkcs的mRNA和蛋白水平因为转录因子SP1的增高而增高[45]. 在成人, 儿童的急性和慢性恶性淋巴细胞中Ku80的平均表达水平比对照组增高[46]. Pucci *et al*[47]对15例膀胱癌和乳腺癌病人的癌组织中Ku的DNA结合活性进行研究发现, Ku70/Ku80的DNA结合活性的调控与人肿瘤的进展相关, 在开始阶段Ku的活性与癌细胞的的快速增殖有关, 在后期及转移阶段, Ku的DNA修复活性失活抑制DNA自发损伤的修复促使肿瘤的进展. 另有报道分布在细胞膜上的Ku蛋白与基质金属蛋白酶相作用调控细胞外基质的重建, 在细胞浸润中和肿瘤的转移中发挥作用[30,48].

目前, 有许多靶向作用或干扰DNA功能的肿瘤治疗手段, 如抗癌药物、丝裂霉素C、放疗等. 然而, 受到正常组织和肿瘤组织的敏感性问题的限制, 在临床上的应用不大理想. DNA-Pk在DSBs的修复中发挥重要作用, 他的活性的增高使细胞对抗癌药物和放疗产生抵抗, 而DNA-Pk的活性是由Ku蛋白的DEB活性调控. 因此认为Ku蛋白的表达水平和功能与肿瘤的抵抗性相关. 在多发性骨髓瘤细胞的研究中发现: 86%只表达Ku86变异体即Ku86v(能与Ku70结合, 但结合DNA末端活性下降)14%表达Ku86及Ku86v. 只表达Ku86v的细胞较正常骨髓和有Ku86表达的细胞对放射更敏感[49]. 顺铂抵抗的和电离辐射抵抗的白血病细胞(L1210)也显示了DEB活性增高与Ku86亚基的过度表达[50]. 体外研究发现, 在未处理的苯丁酸氮芥抵抗的慢性白血病中的B淋巴肿瘤细胞中, DNA-Pk的活性增高与他对苯丁酸氮芥抵抗相关, 而DNA-Pk的活性的增高与Ku的DEB活性增高相关[51-52]. Willson *et al*[53]发现在宫颈癌患者中, 虽然Ku表达和DNA-Pk活性不与SF2(即放疗剂量为2Gray的生存分数)相关, 但放疗敏感的肿瘤中DNA-Pk的活性下降, 肿瘤

■相关报道
Ku蛋白的高表达与活性的增高与肿瘤抵抗相关, 并且有报道认为以Ku为靶点能提高肿瘤的放化疗敏感性.

■**创新盘点**
本文突出了Ku蛋白与肿瘤治疗的关系, 从而提出作为一个肿瘤治疗的靶点.

细胞中Ku70表达低的生存率高, 因此, 认为Ku70在人宫颈癌中可作为一个放疗疗效的预测指标. Harima *et al*[54]研究认为, Ku80低表达使得宫颈癌放疗敏感以及Ku80在宫颈癌的治疗结果中扮演重要角色. 在儿童的急性和慢性恶性淋巴细胞中发现, 高水平的Ku80蛋白对放化疗反应较对照组差[46]. 在慢性恶性B细胞淋巴瘤中Ku70/Ku80的表达和DNA末端结合的活性与敏感性的相比, 在表现抵抗性的患者中要高2-3倍[55]. Shintani *et al*[56]报道在口腔鳞状细胞癌细胞系和术前放疗患者中DNA-PK复合物表达增高, 增高的量与肿瘤的放疗抵抗性相关. 可见, Ku蛋白的表达以及结合活性与肿瘤的放化疗敏感性紧密相关. 此外, 在前列腺癌细胞中, 发现Ku和PARP-1与转录因子C/EBPalpha相作用可增强细胞对DNA的损伤因子的敏感性和减弱Ku和PARP-1的对DSBs的修复能力, 这在肿瘤对治疗的增强其敏感性有着重要的指导意义[57].

为此, 许多学者通过各种方法抑制Ku80, Ku70和DNA-PK的活性来致敏肿瘤细胞, 提高肿瘤的放化疗效果. Belenkov *et al*[58]用Ku80反义链转染至未缺失DNA-PKcs的神经胶质瘤MO59K细胞系中使Ku80基因表达受抑而抑制DNA-PK的活性, 发现转染后细胞对电离辐射和抗癌药物敏感性增强, 但不能增强同源的缺失DNA-PKcs的MO59J细胞系的敏感性[58]. Li *et al*[59]用腺病毒介导热击诱导表达的反义Ku70 RNA使内源性的Ku70 RNA表达下降, 能明显地增高转染细胞的敏感性, 同时使鼠肿瘤Fsa-Ⅱ对电离辐射敏感. 此外, 以DNA-PKcs为作用靶点如PI3-K的抑制剂, 渥曼青霉素(wortmamnin)以及DNA-PKcs特异性抑制剂UN7062, 可以抑制DNA-PK的活性而使肿瘤细胞对电离辐射更加敏感[60-63]. Sak *et al*[64]通过DNA-PKcs的反义链抑制非小细胞型肺癌中的DNA-PK的活性发现, DSBs的连接被抑制和非小细胞型肺癌的放射敏感性较对照组增高. 另外研究结果表明, Ku-DNA结合活性, Ku70/Ku80, DNA-PKcs水平在多药耐药性(MDR)肿瘤细胞系中比同源的药物敏感细胞中要高, 而且DNA-PK抑制剂渥曼青霉素能使MDR细胞系对抗癌药物敏感[65].

Ku蛋白作为DNA修复蛋白, 在正常情况下修复DNA修复. 同样, 癌细胞也利用Ku蛋白及DNA-PKcs的修复能力使细胞对放化疗产生抵抗作用, 而且, 认为肿瘤细胞更依赖于DNA修复机制. 因此, 可以以Ku蛋白为靶点阻断DNA损伤的NHEJ的修复途径致敏肿瘤细胞; 其次, 肿瘤细胞中Ku蛋白活性的改变在理解肿瘤的发生发展及对放疗反应的机制中具有重要意义. 相信, 随着对Ku蛋白的功能及其作用机制的进一步了解以及更有效地抑制肿瘤细胞中Ku蛋白活性方法的不断出现, 使Ku蛋白可作为一个治疗靶点, 增强对肿瘤细胞的杀伤作用, 有效地对肿瘤局部控制和预防各种恶性肿瘤的转移成为可能.

4 参考文献

1 Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 1981; 68: 611-620

2 Reeves WH. Antibodies to the p70/p80 (Ku) antigens in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 391-414

3 Prabhakar BS, Allaway GP, Srinivasappa J, Notkins AL. Cell surface expression of the 70-kD component of Ku, a DNA-binding nuclear autoantigen. *J Clin Invest* 1990; 86: 1301-1305

4 Dalziel RG, Mendelson SC, Quinn JP. The nuclear autoimmune antigen Ku is also present on the cell surface. *Autoimmunity* 1992; 13: 265-267

5 Ginis I, Mentzer SJ, Li X, Faller DV. Characterization of a hypoxia-responsive adhesion molecule for leukocytes on human endothelial cells. *J Immunol* 1995; 155: 802-810

6 Featherstone C, Jackson SP. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 1999; 434: 3-15

7 Dynan WS, Yoo S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1551-1559

8 Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA. Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* 1993; 268: 7594-7601

9 Wang J, Dong X, Reeves WH. A model for Ku heterodimer assembly and interaction with DNA. Implications for the function of Ku antigen. *J Biol Chem* 1998; 273: 31068-31074

10 Boubnov NV, Hall KT, Wills Z, Lee SE, He DM, Benjamin DM, Pulaski CR, Band H, Reeves W, Hendrickson EA. Complementation of the ionizing radiation sensitivity, DNA end binding, and V(D)J recombination defects of double-strand break repair mutants by the p86 Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 890-894

11 Chen F, Peterson SR, Story MD, Chen DJ. Disruption of DNA-PK in Ku80 mutant xrs-6 and the implications in DNA double-strand break repair. *Mutat Res* 1996; 362: 9-19

12 Boulton S, Kyle S, Durkacz BW. Mechanisms of enhancement of cytotoxicity in etoposide and ionising radiation-treated cells by the protein kinase inhibitor wortmannin. *Eur J Cancer* 2000; 36: 535-541

13 Rathmell WK, Chu G. A DNA end-binding factor involved in double-strand break repair and V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4741-4748

14 Dvir A, Peterson SR, Knuth MW, Lu H, Dynan WS.

Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase Ⅱ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11920-11924
15 Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72: 131-142
16 Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR. The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 2005; 24: 949-961
17 Singleton BK, Priestley A, Steingrimsdottir H, Gell D, Blunt T, Jackson SP, Lehmann AR, Jeggo PA. Molecular and biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1264-1273
18 Errami A, Finnie NJ, Morolli B, Jackson SP, Lohman PH, Zdzienicka MZ. Molecular and biochemical characterization of new X-ray-sensitive hamster cell mutants defective in Ku80. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 4332-4338
19 Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8076-8081
20 Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM, Mizuta R, Varghese AJ, Alt FW, Jeggo PA. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995; 80: 813-823
21 Chu G. Double strand break repair. *J Biol Chem* 1997; 272: 24097-24100
22 Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, Jasin M. Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8929-8933
23 Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 2005; 120: 497-512
24 Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 2002; 108: 781-794
25 Gravel S, Larrivee M, Labrecque P, Wellinger RJ. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 1998; 280: 741-744
26 Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, Kurimasa A, Li GC, Lehnert BE, Goodwin EH. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14899-14904
27 Hande MP. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 116-122
28 Bailey SM, Goodwin EH. DNA and telomeres: beginnings and endings. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 109-115
29 Wang S, Guo M, Ouyang H, Li X, Cordon-Cardo C, Kurimasa A, Chen DJ, Fuks Z, Ling CC, Li GC. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1584-1588
30 Tai YT, Podar K, Kraeft SK, Wang F, Young G, Lin B, Gupta D, Chen LB, Anderson KC. Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: functional implications. *Exp Hematol* 2002; 30: 212-220
31 Monferran S, Muller C, Mourey L, Frit P, Salles B. The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin. *J Mol Biol* 2004; 337: 503-511
32 Fu YP, Yu JC, Cheng TC, Lou MA, Hsu GC, Wu CY, Chen ST, Wu HS, Wu PE, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 2003; 63: 2440-2446
33 Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761, 763
34 Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, Sanchez M, Sokol K, Nussenzweig MC, Li GC. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 1996; 382: 551-555
35 Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 2000; 404: 510-514
36 Li GC, Ouyang H, Li X, Nagasawa H, Little JB, Chen DJ, Ling CC, Fuks Z, Cordon-Cardo C. Ku70: a candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma. *Mol Cell* 1998; 2: 1-8
37 Lim DS, Vogel H, Willerford DM, Sands AT, Platt KA, Hasty P. Analysis of ku80-mutant mice and cells with deficient levels of p53. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3772-3780
38 Tong WM, Cortes U, Hande MP, Ohgaki H, Cavalli LR, Lansdorp PM, Haddad BR, Wang ZQ. Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer Res* 2002; 62: 6990-6996
39 Moll U, Lau R, Sypes MA, Gupta MM, Anderson CW. DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is differentially expressed in normal and malignant human tissues. *Oncogene* 1999; 18: 3114-3126
40 Rigas B, Borgo S, Elhosseiny A, Balatsos V, Manika Z, Shinya H, Kurihara N, Go M, Lipkin M. Decreased expression of DNA-dependent protein kinase, a DNA repair protein, during human colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 8381-8384
41 Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Schinagl M, Karaus M, Stachura J, Schulz H, Fischer G. Loss of Ku70/Ku80 expression occurs more frequently in hereditary than in sporadic colorectal tumors. Tissue microarray study. *Hum Pathol* 2006; 37: 448-452
42 Korabiowska M, Bauer H, Quentin T, Stachura J, Cordon-Cardo C, Brinck U. Application of new in situ hybridization probes for Ku70 and Ku80 in tissue microarrays of paraffin-embedded malignant melanomas: correlation with immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 2004; 35: 210-216
43 Stronati L, Gensabella G, Lamberti C, Barattini P, Frasca D, Tanzarella C, Giacobini S, Toscano MG, Santacroce C, Danesi DT. Expression and DNA binding activity of the Ku heterodimer in bladder carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2484-2492
44 Lim JW, Kim H, Kim KH. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 46093-46100
45 Hosoi Y, Watanabe T, Nakagawa K, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nagawa H, Suzuki N. Up-

■**应用要点**
本文为肿瘤的治疗提供了新的研究思路.

■名词解释

1 DNA-PK: DNA-PK是一种由双链DNA激活的丝-苏氨酸激酶, 由调控成分Ku蛋白和催化亚基部分DNA-PKcs组成, 参与机体多种生命活动, 如DNA的修复, 凋亡等.

2 NHEJ: 即非同源末端连接, 至少由Ku70, Ku80, 连接酶Ⅳ, XRCC4蛋白, DNA-PKcs和Artemis蛋白参与,在连接处可能会水解几个碱基. 直到同源互补处才连接而完成修复.

regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2004; 25: 461-468

46 Chen TY, Chen JS, Su WC, Wu MS, Tsao CJ. Expression of DNA repair gene Ku80 in lymphoid neoplasm. *Eur J Haematol* 2005; 74: 481-488

47 Pucci S, Mazzarelli P, Rabitti C, Giai M, Gallucci M, Flammia G, Alcini A, Altomare V, Fazio VM. Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies. *Oncogene* 2001; 20: 739-747

48 Monferran S, Paupert J, Dauvillier S, Salles B, Muller C. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J* 2004; 23: 3758-3768

49 Tai YT, Teoh G, Lin B, Davies FE, Chauhan D, Treon SP, Raje N, Hideshima T, Shima Y, Podar K, Anderson KC. Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sensitivity to DNA damage. *J Immunol* 2000; 165: 6347-6355

50 Frit P, Canitrot Y, Muller C, Foray N, Calsou P, Marangoni E, Bourhis J, Salles B. Cross-resistance to ionizing radiation in a murine leukemic cell line resistant to cis-dichlorodiammineplatinum(Ⅱ): role of Ku autoantigen. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 141-146

51 Muller C, Christodoulopoulos G, Salles B, Panasci L. DNA-Dependent protein kinase activity correlates with clinical and in vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to nitrogen mustards. *Blood* 1998; 92: 2213-2219

52 Christodoulopoulos G, Muller C, Salles B, Kazmi R, Panasci L. Potentiation of chlorambucil cytotoxicity in B-cell chronic lymphocytic leukemia by inhibition of DNA-dependent protein kinase activity using wortmannin. *Cancer Res* 1998; 58: 1789-1792

53 Wilson CR, Davidson SE, Margison GP, Jackson SP, Hendry JH, West CM. Expression of Ku70 correlates with survival in carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 2000; 83: 1702-1706

54 Harima Y, Sawada S, Miyazaki Y, Kin K, Ishihara H, Imamura M, Sougawa M, Shikata N, Ohnishi T. Expression of Ku80 in cervical cancer correlates with response to radiotherapy and survival. *Am J Clin Oncol* 2003; 26: e80-e85

55 Deriano L, Guipaud O, Merle-Beral H, Binet JL, Ricoul M, Potocki-Veronese G, Favaudon V, Maciorowski Z, Muller C, Salles B, Sabatier L, Delic J. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood* 2005; 105: 4776-4783

56 Shintani S, Mihara M, Li C, Nakahara Y, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 894-900

57 Yin H, Glass J. In prostate cancer cells the interaction of C/EBPalpha with Ku70, Ku80, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 increases sensitivity to DNA damage. *J Biol Chem* 2006; 281: 11496-11505

58 Belenkov AI, Paiement JP, Panasci LC, Monia BP, Chow TY. An antisense oligonucleotide targeted to human Ku86 messenger RNA sensitizes M059K malignant glioma cells to ionizing radiation, bleomycin, and etoposide but not DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 2002; 62: 5888-5896

59 Li GC, He F, Shao X, Urano M, Shen L, Kim D, Borrelli M, Leibel SA, Gutin PH, Ling CC. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2003; 63: 3268-3274

60 Price BD, Youmell MB. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res* 1996; 56: 246-250

61 Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res* 1998; 58: 4375-4382

62 Izzard RA, Jackson SP, Smith GC. Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 1999; 59: 2581-2586

63 Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ, Smith GC, Durkacz BW. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res* 2003; 63: 6008-6015

64 Sak A, Stuschke M, Wurm R, Schroeder G, Sinn B, Wolf G, Budach V. Selective inactivation of DNA-dependent protein kinase with antisense oligodeoxynucleotides: consequences for the rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks and radiosensitivity of human cancer cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 6621-6624

65 Kim SH, Um JH, Dong-Won B, Kwon BH, Kim DW, Chung BS, Kang CD. Potentiation of chemosensitivity in multidrug-resistant human leukemia CEM cells by inhibition of DNA-dependent protein kinase using wortmannin. *Leuk Res* 2000; 24: 917-925

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2223-2228
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肝纤维化的信号转导通路

吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙

吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083
王丕龙, 重庆医科大学附一医院消化内科 重庆市 400016
通讯作者: 吴晓玲, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科. wxllady@163.com
电话: 028-86570347
收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-06-08

摘要

肝纤维化是多种慢性肝病进展至肝硬化的中间过程, 其特征为以胶原蛋白为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解失衡. 现有的研究表明, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化时过量ECM的主要来源, 激活的HSC大量增殖, 发生表型改变并分泌过多的ECM沉积于肝脏是肝纤维化形成的关键. 这一复杂的病理过程是多条细胞信号传导通路和一系列细胞信息分子网络共同控制的结果, 转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGFβ)等细胞因子分别通过TGFβ-Smad通路、ROCK通路、MAPK(丝裂原激活的蛋白激酶, mitogen activated protein kinase)通路、Rho-、PI-3K通路等众多细胞信号通路网络交互影响, 共同介导肝纤维化复杂的病理生理变化. 现综述参与肝纤维化的主要信号转导通路及其可能的致肝纤维化机制.

关键词: 肝纤维化; 信号通路

吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙. 肝纤维化的信号转导通路. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2223-2228
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2223.asp

0 引言

肝纤维化是一个有多种细胞因子和多条细胞信号通路共同参与的复杂的全身性病理过程, 目前研究较为清楚的主要有TGFβ-Smad信号通路, Rho-ROCK信号通路, MAPK信号通路, 以及PI-3K信号通路等, 各种信号通路在不同的环节发挥作用, 共同介导肝纤维化的发生发展.

1 TGFβ-Smad信号通路

TGFβ与TβR结合→R-Smad活化→R-Smad与Co-Smad结合成多聚体并转位入胞核→靶基因转录. 脊椎动物转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGFβ)共有3种: TGF1, 2和3, 肝脏含量最高且具有生物活性的是TGFβ1, 其Ⅰ, Ⅱ型受体结合形成二聚体. 当配体与Ⅱ型受体(TβRⅡ)胞外端结合, 其胞内段Ser/Thr激酶即被活化, 进而Ⅰ型受体(TβRⅠ)活化并将信号向细胞内转导[1].

TGFβ信号通路关键的信号传导分子为胞质蛋白Smad[2-3]. Smad至少有8个成员, 即Smad1-8, 根据其功能分为3类: 第1类膜受体激活Smad(R-Smad), 有Smad 1, 2, 3, 5, 8, 第2类通用型Smad(co-Smad), 只有Smad 4, 可与其他Smad结合形成稳定的异源多聚体, 转位入胞核调节靶基因转录; 第3类抑制性Smad(Ⅰ-Smad)有Smad 6, 7, 可与R-Smad竞争性结合受体, 阻止R-Smads磷酸化, 或抑制Smad多聚体形成从而阻断TGFβ的信号. Smad多聚体在胞核内可与特定的DNA序列CAGAC或AGAC结合(称为Smad结合元件, SBEs)调控靶基因表达, 但这种直接的DNA结合活性很低, 更重要的作用是与胞核辅激活蛋白或辅阻遏蛋白结合调节靶基因转录, 主要的辅激活蛋白有CBP/P300, c-Jun, Lef-1, 辅阻遏蛋白有SINP1, Sno-N, Ski等[4].

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化、增殖是肝纤维化的关键事件[5], TGFβ是其必需的调节因子[6-12]. 在HSC内, Smad 3, Sp1共同结合于α2(Ⅰ)胶原基因序列的-313-255位点, 该位点具有很强的增强子活性, 使胶原基因转录明显增加. TGFβ在肝损伤的不同时期也有不同的效应[11], 急性肝损伤时, HSC分泌TGFβ增加, 促进α2(Ⅰ)胶原基因转录, HSC内Smad 2以自分泌方式活化, 随后诱导Smad 7表达, Smad 7与Smad 2结合并终止TGFβ的信号转导, 是TGFβ信号的负反馈调节. 但在慢性肝损伤, HSC转化为肌样成纤维细胞(MFB)后Smad 2持续磷酸化, Smad 7表达水平低下, 不能有效抑制TGFβ的信号传递. Smad 2持续活化及Smad 7水平低下可能是慢性肝损伤向肝纤维化进展的原因之一. 研究显示, 动物肝纤维化往往伴随

■背景资料
肝纤维化的发病机制研究取得了许多新进展, 不仅明确了肝星状细胞在发病中的关键地位, 更重要的是研究发现许多细胞信号传导通路都参与了肝纤维化的发病. 针对肝纤维化信号通路的研究不仅可以深入探索肝纤维化的发病机制, 也为肝纤维化的防治提供了更多的靶点和有效的途径.

■研发前沿
目前肝纤维化防治领域研究的热点为肝纤维化相关的信号转导通路, 及其可能的干预手段, 从而为肝纤维化的治疗提供更多的途径. 研究比较多的信号通路主要有: TGFβ-Smad通路, MAPK通路, PDGF通路, Rho-ROCK通路, 整合素通路以及维生素A类通路等.

血清及组织TGFβ增加, HSC数量进行性增多, Smad 3 mRNA表达显著增高, Smad 7则初期升高、中晚期进行性下降, 提示肝纤维化发生发展与TGFβ-Smad信号通路密切相关[14-18]. 应用Smad 2, 3, 4反义寡聚核苷酸或cDNA可有效抑制TGFβ的生物学功能; 将Smad 7 RNA注射入非洲蟾蜍胚胎, 则活动素与TGFβ的效应均被阻断; 以RGD三肽引物与Smad 7基因合并构建重组质粒导入HSC, 则RGD-Smad 7 mRNA表达明显增加, 培养液中Ⅲ型胶原水平明显降低.

2 Rho-ROCK信号通路

Rho活化→ROCK活化→平滑肌收缩、纤维合成、肿瘤浸润转移、器官纤维化. Rho-ROCK信号通路的关键分子包括Rho、GTP酶、Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)和肌球蛋白磷酸酶等. Rho主要有Rho A, B, C 3种异构体, Rho GTP酶属小G蛋白家族, ROCK属于丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶家族成员, 是Rho下游的靶效应分子. ROCK接受Rho传递的活化信号, 发生多个氨基酸位点磷酸化而激活, 并介导下游一系列磷酸化/脱磷酸化反应, 引起细胞收缩、游走黏附、生长分裂、应力纤维产生及平滑肌运动、胶原合成等生物效应, 与哮喘、高血压、动脉硬化、肿瘤浸润转移以及多种器官纤维化等疾病密切相关[19-23]. 目前关于Rho-ROCK信号通路在肝纤维化时的变化规律及其与肝纤维化的关系研究尚不多, Murata *et al*[24-26]研究发现, 特异性的ROCK阻断剂Y-27632能够明显抑制HSC活化, 具有抑制大鼠肝纤维化作用; 对Rho-ROCK信号通路的深入研究可能为肝纤维化的防治提供一个新的途径.

3 PDGF信号通路

PDGF与受体结合启动下游蛋白级联磷酸化反应信号通路. PDGF是重要的促肝纤维化因子[27-29]. 多种信号转导分子可作为PDGF受体(PDGFR)的底物与其自磷酸化位点结合, 这些底物大都含有一个SH-2结构域, 与PDGFR结合并活化后, 可启动多种蛋白级联磷酸化信号转导通路, 主要的下游信号通路有: Ras/ERK, PI-3K, JAK/STAT, PLCγ等. 此外, PDGF还可通过细胞内pH值及Ca^{2+}浓度变化传递信号.

3.1 Ras/ERK通路 Ras活化→ERK活化并移位入胞核→转录因子及c-fos基因转录, 细胞周期蛋白D, E表达, HSC增殖. 丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)属于Ser/Thr蛋白激酶家族, 主要成员有3个: ERK(细胞外信号调节激酶)(信号途径: Raf→MEK→ERK), JNK(c-Jun氨基末端激酶)(信号途径: SEK→MKK→JNK), 和P38(信号途径: MEKK→MKK→P38). 在胞核内, ERK的核靶主要是转录因子ELK-1, 功能是调节细胞生长和分化; JNK和P38的底物主要是c-Jun, ATF-2和ELK-1, 在细胞凋亡和细胞因子表达中起重要作用. MAPK作为可以易位至胞核并激活转录因子的蛋白激酶, 成为多种信号途径的“瓶颈”和汇集点, MAPK信号通路的激活有促肝纤维化作用[30-31], 其中, PDGF激活的主要是ERK信号通路. Ras是21 kDa的小G蛋白, 是多种细胞信号转导通路的汇合点, 有“分子开关”之称. Ras激活可引发ERK的磷酸化级联反应, 促使Raf-1→MEK→ERK相继磷酸化活化. Raf-1(或称MAPKK激酶, MAPKKK)为GTP酶活化蛋白(GAPs), 被Ras活化后激活Ser/Thr激酶, 使MEK(亦称MAPKK)激活, 进而使ERK1/2(亦称MAPK1/2)磷酸化而活化, 活化的ERK移位入胞核, 调节ELK-1, SAP等转录因子及c-fos基因转录; 还能介导细胞周期蛋白(Cyclin)D, E表达, 促使HSC从G1期进入S期并增殖. 研究表明, PDGF刺激HSC ERK通路的激活可导致c-fos表达增加, 干预ERK通路能够抑制PDGF诱导的HSC增殖. 多烯磷脂酰胆碱可阻断Ras/ERK通路中ERK1的活化而抑制PDGF的促HSC增殖效应; 用含己酮可可碱(PTF)的培养基培养HSC, 亦能明显抑制PDGF诱导的ERK磷酸化活化、c-fos表达和HSC增殖.

3.2 PI-3K通路 PI-3K活化→产生第二信使→PDK, PKB激活→HSC增殖、迁移. 磷脂酰肌醇3-激酶(PI-3K) 途径是另一条由PDGF激活的信号通路[32], 此激酶家族有多种类型, 与PDGF信号转导相关的为PI-3K A型, PI-3K激活后, 除自身磷酸化以外, 主要的效应是产生PI(3, 4)P2和PI(3, 4, 5)P3等第二信使向下游传递信号. 其中, 蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)是主要的下游信号分子. 第二信使PI(3, 4)P2和PI(3, 4, 5)P3可与PKB结合而将其激活; 活化的PKB调节P70s6k, GSK3, Bcl-2等活化产生细胞效应, 可促进HSC增殖和迁移, 并聚集于炎症区. 研究表明, PDGF活化PI-3K的能力与其促HSC增殖效应有关. 特异性PI-3K阻断剂Wortmannin可使体外培养的HSC阻滞于G0/G1期不能增殖; Marra *et al* 研究发现, PI-3K的激活对PDGF促进HSC有丝分裂及趋化作用都是必需的. PDGF-AA, AB及BB

均可激活PI-3K, 以BB的作用最强.

3.3 JAK/STAT通路 JAK活化→与STAT形成多聚体→STAT活化、转位入胞核→靶基因转录. PDGF也能激活JAK(Janus激酶)/STAT(信号转导子和转录激活子)信号通路向细胞内传递信号[33]. PDGF与受体结合后可募集、激活胞质酪氨酸蛋白激酶JAK, 随即JAK磷酸化而活化, 使其底物蛋白STAT及受体Tyr残基磷酸化, 并使STAT以SH-2结构域与受体或激活的JAK结合形成复合体, 然后STAT形成二聚体移位入胞核, 激活靶基因转录促使细胞生长和分裂. STAT在该信号通路中兼有信号转导分子和转录因子作用, 可将PDGF信号从受体和JAK直接传递到胞核内, 是一条刺激靶基因转录的直接信息通路.

3.4 Na^+/H^+泵 HSC胞膜Na^+/H^+泵活性增加→胞内pH值增加→HSC增殖. 研究表明, PDGF可增强大鼠HSC细胞膜Na^+/H^+泵(Na^+/H^+ exchanger, NHE)活性, 使细胞内pH值增加, 促进HSC增殖[34]. NHE活性的增加可能依赖于钙离子-钙调蛋白及蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)途径. NHE抑制剂阿米洛利可抑制PDGF对HSC的促增殖效应; 吡非尼酮(pirfenidone)可抑制PDGF诱导的NHE及PKC活化而抑制HSC增殖, 此作用与PDGFR自磷酸化、ERK1/2及pp70(S6k)活化均无关; 选择性的NHE抑制剂cariporide可明显抑制在体及离体状态下PDGF诱导的大鼠HSC增殖, 若对大鼠进行二甲基亚硝胺(DMN)预处理而后给予cariporide, 其HSC活化、增殖减少, 胶原沉积减少, 且肝损伤减轻.

3.5 钙通道 胞膜钙通道活性增加→Ca^{2+}内流→胞内Ca^{2+}增加→HSC收缩、有丝分裂. 在体外培养的HSC, PDGF的促有丝分裂效应与HSC内Ca^{2+}浓度有关. PDGF与受体结合后, 诱导磷酸肌醇(IP)循环, 产生三磷酸肌醇(IP_3)作用于内质网受体促使Ca^{2+}释放, 引起胞内Ca^{2+}水平迅速增加, 形成胞内Ca^{2+}增加的峰期; IP_3进一步磷酸化产生的IP_4能促使胞外Ca^{2+}内流. 研究表明, PDGF对不含Ca^{2+}培养基培养的HSC并没有促增殖作用, 其促有丝分裂能力依赖于Ca^{2+}通道开放与细胞外Ca^{2+}内流引起的细胞内Ca^{2+}浓度增加. 细胞外Ca^{2+}内流有两条通道: 不依赖膜电位的通道和依赖膜电位的T通道, T通道抑制剂氯化镍能阻断PDGF对HSC的促增殖作用, 提示PDGF引起胞外Ca^{2+}内流与T通道开放有关.

4 NF-κB信号通路

激活APK或PKC→ IκB解离→NF-κB活化、移位入核→靶基因转录. 核因子κB(neuclear factor κB, NF-κB)是一个重要的转录因子, 由P50和P65 2个亚基组成二聚体, 有3种形式: P50P50, P65P65及P50P65, 发挥生理作用的主要为P50P65. 未活化的NF-κB存在于胞质中, 以P65亚基与ⅠκB(NF-κB的抑制蛋白)结合, 覆盖P50的核定位信号. 当细胞受到刺激时, 激活的APK或PKC使IκB磷酸化并从NF-κB复合物上解离, 导致NF-κB活化并移位入核, 与DNA结合并启动靶基因转录[35] . NF-κB在肝脏的效应主要有: (1)在HSC, NF-κB可使IL-6, 黏 附分子ICAM-1等表达增强, 参与炎症反应; (2)NF-κB可与某些DNA启动子和增强子结合, 促进早期反应基因如G6Pase, PEPCK, IGF-1表达, 促进肝脏再生; (3)NF-κB可激活某些抗凋亡基因拮抗TNF-α诱导的肝细胞凋亡. TGFβ可使IκB稳定性增加及NF-κB活性下降, 诱导HSC凋亡.

5 Vit A类信号通路

Vit A类与核内受体结合→顺式作用于靶基因启动子RARE, RXRE, 或与激素受体形成异二聚体作用于DNA激素反应元件→靶基因转录. Vit A类的主要活性形式为视黄酸(RA), 其核内受体包括视黄酸受体(RAR)和RXR(retinoid X receptor), Vit A类反应元件包括视黄酸反应元件(RARE)和RXRE(retinoid x response element). Vit A类核内受体二聚化后可通过顺式作用于靶基因启动子的RARE, RXRE调控靶基因表达, 也可与其他核内受体如激素受体(HR)形成RXR/HR异二聚体而作用于DNA的激素反应元件(HRE). 已知CRBP, α1(Ⅰ), 基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、STAT-1及组织型纤溶酶原激活物(tPA)等基因上游调控区内均含有RARE.

肝纤维化时HSC内Vit A类含量、RARβ mRNA水平降低, 补充外源性Vit A可使HSC重新获得Vit A类, 细胞内RARβ, CRBP mRNA水平增高, HSC增殖、激活受抑制而ECM合成减少[36]. Vit A类抑制肝纤维化的机制可能有: (1)调节HSC增殖和分化: Vit A类可诱导细胞周期素依赖激酶抑制物(CKI)基因表达, 调控细胞周期; (2)影响ECM合成: RA可通过RARE调控α1(Ⅰ)等胶原基因表达, 还可与c-Jun, c-Fos竞争结合于DNA的AP-1结合位点抑制靶基因转录; RA还可经此途径抑制HSC自分泌TGFβ1, 间接减少ECM合成; (3)影响ECM降解: RA可促进HSC分泌尿激酶纤溶酶原激活物(uPA), 使纤维蛋白溶

■相关报道
针对肝纤维化信号通路的报道较多, 可以参阅Gressner *et al*所著的文章 Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets, 发表于杂志 *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99

■**创新盘点**
本文综述了肝纤维化重要的信号通路及其在发病中所发挥的作用，内容较新较全面，有助于了解肝纤维化的新进展.

酶增高, 促进ECM降解; 或增强MMP活性而间接起作用.

6 整合素信号通路

整合素与受体RGD序列结合→FAK, She活化→激活多条信号通路→介导细胞-ECM及细胞-细胞之间的信息交流. 整合素(integrin)属于跨膜糖蛋白受体家族分子, 有α, β两种亚基, 目前已发现19种α亚基和8种β亚基, 可组合成25种整合素分子. 整合素的配体有3类: ECM成分(包括纤维连接蛋白, 玻连蛋白, 层黏连蛋白等), 免疫球蛋白类黏附分子如ICAM(细胞间黏附分子)、VCAM(血管细胞黏 附分子)和血清游离蛋白分子(如血清纤维蛋白原). 整合素可识别配体上特定的RGD序列(精-甘-天冬氨酸基序)而结合, 然后激活黏着斑激酶(FAK)通路和She通路. FAK活化后与Sre家族激酶形成信号转导复合物, 继而通过与桩蛋白(paxillin), Grb2, Cas(Crk结合位点), PI-3K, MAPK, ERK, JNK等信号分子结合激活多条信号转导通路.

整合素在肝纤维化中的作用主要是作为“桥梁”介导细胞与ECM之间的相互作用, 形成细胞-基质及细胞-细胞之间复合物, 经Ras途径激活MAPK调节HSC的增殖、收缩、黏附及迁移; 同时, 肝窦内皮细胞整合素表达增加、FAK活性增加, 与肝窦毛细血管化有关; 因此, 整合素信号通路的效应主要是调节细胞与其外周环境之间的相互作用, 对整合素信号转导的深入研究可能发现干预肝纤维化的重要靶点[37].

总之, 肝纤维化发病机制的研究取得了很多进展, 目前明确HSC的活化是肝纤维化的始动环节, 慢性肝病进展至肝纤维化是一个有多种细胞因子、多种细胞信号转导通路参与的复杂的全身性病理过程, 随着研究的不断深入, 目前已有许多新的信号通路逐渐被发现和探索, 如瘦素及其信号通路, LPS信号通路, 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)及其信号通路, VEGF(血管内皮生长因子)信号通路, 激活素及其信号通路等等[38-60], 并且, 各种细胞信号转导途径并非各自独立、互不相干, 而是纵横交错、相互影响, 有的信号分子本身就是多条信号途径所共用的信息分子, 有的信号途径可以激活或抑制其他信号途径的信息传导过程, 构成一个复杂的细胞信号通路网络, 共同介导慢性肝损伤至肝纤维化的漫长病理过程. 虽然每种细胞信号传导通路的作用细节尚未完全阐明, 可以肯定的是, 单一细胞因子或单一信号通路的激活并不足以启动肝纤维化病变的发展. 众多的促纤维化细胞因子分别经TGFβ-Smad, MAPK, Rho-ROCK, PI-3K等信号通路将刺激信号传递至效应细胞, 使其靶基因转录增加, 产生肝细胞坏死、再生, 胶原合成等, 最终引起肝纤维化甚至肝硬化. 针对肝纤维化细胞信号传导通路的研究不仅有助于更深入地探讨肝纤维化发病的分子机制, 也为肝纤维化防治研究提供了更多可能有效的干预环节.

7 参考文献

1 王连升, 陈颖伟, 李定国. TGFβ1信号与肝纤维化. 国外医学•消化系疾病分册 2004; 3: 142-144

2 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99

3 孙校男, 王先开, 娄国强. Smad蛋白与肝纤维化. 国外医学•流行病学传染病学分册 2005; 4: 243-246

4 Jun He, Sarah B, Tegen, Ariel R. Krawitz G. Steven Martin, Kunxin Luo. The Transforming Activity of Ski and SnoN Is Dependent on Their Ability to Repress the Activity of Smad Proteins. *J Biol Chem* 2003; 33: 30540-30547

5 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

6 Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 2006; 26: 8-22

7 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S

8 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60

9 梁增文, 李德民, 张国, 王天才. 人纤维化肝组织中Smad蛋白的表达及其意义. 临床内科杂志 2004; 9: 635-637

10 Breitkopf K, Godoy P, Ciuclan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66

11 Wei Jiang, Chang-Qing Yang, Wen-Bin Liu, Yi-Qing Wang, Bo-Ming He, Ji-Yao Wang. Blockage of transforming growth factor b receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 11: 1634-1638

12 熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅. 中药肝炎平对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠$TGF\beta_1$-Smad信号通路的影响. 世界华人消化杂志 2006; 2: 152-157

13 Chenghai Liu, Marianna DA. Gaca E. Scott Swenson, Vincent F, Vellucci, Michael Reiss, Rebecca G, Wells. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-β(TGF-β) in quiescent and activated hepatic stellate sells. *J Biol Chem* 2003; 13: 11721-11728

14 张国, 王天才, 唐望先, 王颖, 李勤, 梁扩寰. 肝纤维化大鼠星状细胞Smad3、Smad7基因表达差异的研究. 华中科技大学学报(医学版) 2002; 1: 33-36

15 Hirotaka Fukasawa, Tatsuo Yamamoto, Akashi Togawa, Naro Ohashi, Yoshihide Fujigaki, Toshiaki

Oda, Chiharu Uchida, Kyoko Kitagawa, Takayuki Hattori, Sayuri Suzuki, Masatoshi Kitagawa, Akira Hishida. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *PNAS* 2004; 23: 8687-8692

16 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191

17 Jianyin Long, Guannan Wang, Isao Matsuura, Dongming He, Fang Liu. Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *PNAS* 2004; 1: 99-104

18 Anita B. Roberts, Angelo Russo, Angelina Felici, Kathleen C, Flanders. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-β. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 995: 1-10

19 孙骅, 陈荣华. 小G蛋白Rho-ROCK信号转导通路与疾病. 国外医学儿科学分册 2004; 3: 162-164

20 Kirsi Riento, Rosa M, Guasch, Ritu Garg, Boquan Jin, Anne J, Ridley. Rho E binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 12: 4219-4229

21 Alexey Y, Kolyada, Kathleen N, Riley, Ira M, Herman. Rho GTPase signaling modulates cell shape and contractile phenotype in an isoactin-specific manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C1116-C1121

22 Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2006; 130: 838-854

23 苏明, 万钧, 黄志强, 周宁新, 吴德斌, 范上达. 肝星状细胞的激活和Rho-ROCK信号通路在纤维化大鼠小肝移植中的作用. 中华实验外科杂志 2005; 12: 1452-1455

24 Murata T, Arii S, Nakamura T, Mori A, Kaido T, Furuyama H, Furumoto K, Nakao T, Isobe N, Imamura M. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001; 35: 474-481

25 Tada S, Iwamoto H, Nakamuta M, Sugimoto R, Enjoji M, Nakashima Y, Nawata H. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 529-536

26 Murata T, Arii S, Mori A, Imamura M. Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis. *J Surg Res* 2003; 114: 64-71

27 谢艳爽, 郭顺根. 血小板衍生生长因子在肝星状细胞内的信号转导. 中国组织化学与细胞化学杂志 2004; 3: 321-326

28 Godichaud S, Si-Tayeb K, Auge N, Desmouliere A, Balabaud C, Payrastre B, Negre-Salvayre A, Rosenbaum J. The grape-derived polyphenol resveratrol differentially affects epidermal and platelet-derived growth factor signaling in human liver myofibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 629-637

29 Borkham-Kamphorst E, Meurer SK, Gressner AM, Weiskirchen R. Disruption of intermolecular disulfide bonds in PDGF-BB dimers by N-acetyl-L-cysteine does not prevent PDGF signaling in cultured hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 4: 1711-1718

30 Popov Y, Patsenker E, Bauer M, Niedobitek E, Schulze-Krebs A, Schuppan D. Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J Biol Chem* 2006; 281: 15090-15098

31 Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yoshida K, Sugano Y, Yamagata H, Matsushita M, Seki T, Inagaki Y, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 2003; 38: 879-889

32 Reichard JF, Petersen DR. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular-regulated kinase in hepatic stellate cell antioxidant response and myofibroblastic transdifferentiation. *Arch Biochem Biophys* 2006; 446: 111-118

33 Ogata H, Chinen T, Yoshida T, Kinjyo I, Takaesu G, Shiraishi H, Iida M, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene* 2006; 25: 2520-2530

34 陈厚昌, 刘永刚. 抗肝纤维化的新靶点: Na^+/H^+交换泵. 中国药理学通报 2003; 5: 493-497

35 赵宗豪, 高人焘. 核因子κB与肝纤维化的研究进展. 实用肝脏病杂志 2004; 2: 119-121

36 刘中宏, 郑长青, 李春明. 视黄醇脂对慢性酒精性肝病患者肝脏纤维化的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006; 2: 234-237

37 宣红萍, 刘成海. 整合素在肝纤维化中的作用. 世界最新医学信息文摘 2004; 1: 964-966

38 高巍, 周永兴, 聂青和. 瘦素与肝纤维化. 实用肝脏病杂志 2004; 2: 121-124

39 林羡屏, 王小众. 肝纤维化相关因子及其作用. 世界华人消化杂志 2006; 11: 1037-1043

40 Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, McKim SE, Parsons C, Rippe RA, Wheeler MD. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1318-G1328

41 Kanematsu M, Semelka RC, Osada S, Amaoka N. Magnetic resonance imaging and expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular nodules in cirrhosis and hepatocellular carcinomas. *Top Magn Reson Imaging* 2005; 16: 67-75

42 付好, 但自力, 唐望先, 晏维, 潘志红, 熊章鄂. 全反式维甲酸对慢性酒精性肝损伤大鼠肝脏TGFβ1、CTGF和Col1a1表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 2: 179-183

43 顾小红, 房殿春. 蛋白酶活化受体(PARS)在肝纤维化中的调节作用. 世界华人消化杂志 2006; 5: 502-507

44 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; 16: 1617-1620

45 龙云, 唐红. 肝纤维化中转录因子的调控作用. 世界华人消化杂志 2006; 10: 969-972

46 Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5060-5065

47 贾继东. 肝纤维化发生机制及诊断和治疗研究的几个问题. 中华肝脏病杂志 2004; 5: 257-258

48 刘萱, 尤红, 贾继东. 肝纤维化重要细胞因子的主要信

号转导途径. 肝脏 2005; 3: 251-252
49 Lluis Espinosa, Julia Ingles-Esteve, Alex Robert-Moreno, Anna Bigas. IκBα and p65 Regulate the Cytoplasmic Shuttling of Nuclear Corepressors: Cross-talk between Notch and NFκB Pathways. *Mol Biol Cell* 2003; 2: 491–502
50 张晓岚, 宋梅, 白云, 刘丽, 杨林, 张文辉, 姜慧卿. 细胞外信号调节激酶1与肝星状细胞增殖关系的体内实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 5: 440-442
51 郭顺根, 戴敏, 张玮, 谢艳爽. 肝纤维化发生发展与信号转导途径. 中国组织化学与细胞化学杂志 2003; 1: 106-111
52 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. TGF-β及Smad与肝纤维化. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 4: 206-209
53 王丽娜, 刘成海. 中医药影响细胞因子及其信号转导的抗纤维化作用机制研究进展. 江苏中医药 2006; 4: 63-65
54 刘涛, 黄捷, 邓存良. 肝星状细胞与肝纤维化. 山西医药杂志 2005; 5: 355-357
55 李定国, 陈颖伟. 肝纤维化研究现状及展望. 上海第二医科大学学报 2005; 2: 101-102
56 潘勤, 谢渭芬, 张忠兵, 张新, 韩泽广. 细胞外信号调节激酶对肝纤维化逆转的影响及其机制. 上海第二医科大学学报 2005; 9: 988-891
57 姚希贤, 姚冬梅, 房红梅, 杨川杰, 张晓岚, 刘丽, 苏素文, 王川. 内皮素1对活化肝星状细胞增殖及钙离子影响的调控机制研究. 中华消化杂志 2004; 11: 659-662
58 蒋明德. 肝纤维化发生中的MAPK信号传导通路. 第四军医大学学报 2005; 8: 766-767
59 钟显飞, 蒋明德, 马洪德, 曾维政, 李小安. JNK信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响. 第四军医大学学报 2005; 10: 930-933
60 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. 中药对TGFβ Smad信号通路的干预作用. 第四军医大学学报 2005; 14: 1339-1341

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工作者及科教研人员、各大图书馆订阅.联系地址: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2229-2232
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肠道树突状细胞的特性及功能研究

张中伟, 秦环龙

张中伟, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233
通讯作者: 张中伟, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院外科. zzw49688@126.com
电话: 021－64361349
收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-06-24

摘要

树突状细胞(DC)是目前所知机体内功能最强的专职性抗原递呈细胞. 在肠道内, 树突状细胞不但能对致病菌产生免疫应答, 而且能对肠腔内共生菌及各类食物蛋白产生免疫耐受. 因此, 了解DC的功能及相关作用机制对研究肠道免疫屏障具有重要意义. 现就肠道树突状细胞在免疫、耐受及疾病发生过程中的作用作一综述, 旨在为研究肠道屏障功能提供有益的帮助.

关键词: 树突状细胞; 免疫屏障

张中伟, 秦环龙, 肠道树突状细胞的特性及功能研究. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2229-2232
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2229.asp

0 引言

肠道免疫屏障包含2方面的内容: (1)对各类致病微生物产生免疫应答, 消除病原体; (2)对肠道内正常定植的共生菌和日常大量食物蛋白产生免疫耐受(oral tolerance). 在这一过程中, 作为体内功能最强的抗原递呈细胞, 树突状细胞(dendritic cell, DC)起到了关键的作用. 肠道内各类抗原主要是经DC传递后, 作用于T, B淋巴细胞, 其产生的效应取决于DC的类型、接受到的信号分子以及局部微环境的影响. 肠道不同组织内DC的表型有很大区别, 但主要是$CD11c^+$的DC. 在Peyer's淋巴结(Peyer's patch, PP), 根据是否表达CD11b和CD8α可将$CD11c^+$表型的DC分为$CD11b^+CD8\alpha^-$, $CD11b^-CD8\alpha^+$, $CD11b^-CD8\alpha^-$和$CD11c^{int}CD8\alpha^+B220^+$4组. 而在肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN), 除上述4类外, 发现有另外2种DC($CD11b^+CD4^+$DC和$CD4^-CD8^-DEC^-205^{int}$). 确定DC的亚群种类对于研究DC的功能至关重要[1]. 随着近年来研究的深入, 肠道内DC的功能及其作用机制已有初步揭示, 本文就此相关内容作一综述.

1 肠道DC的迁移

DC起源于体内的多能造血干细胞, 正常情况下处于未成熟状态. 当受到外来刺激, 如肿瘤坏死因子(TNF-α)、细菌产物脂多糖(LPS)等影响时, DC发生迁移经外周血循环进入各淋巴组织. DC摄取抗原物质后, 在一系列信号分子如CD40/CD40L, TNF/TNFR, RANK/RANKL等作用下, DC发育成熟并刺激T, B淋巴细胞产生免疫反应. 因此, DC的迁移实际上是其成熟的过程, 且有利于促进免疫系统的发育. 肠道内DC主要定植于PP和MLN, 少量散布于肠道上皮黏膜固有层(lamia propria, LP). 其中, PP是肠道重要的免疫器官, 由大量初始型B淋巴细胞集合及其外周少量T淋巴细胞构成. PP顶部由特殊的上皮细胞覆盖, 能摄取特殊类抗原如细菌, 称为M细胞(microfold cell). PP内DC大部分位于M细胞下方, 呈递抗原并刺激B淋巴细胞分泌IgA或诱导T细胞产生免疫或耐受.

已知DC的迁移是在各类细胞因子及其受体的控制下进行, 因此研究肠道组织内不同DC亚群上信号分子和相应受体的表达具有十分重要的意义. 其中, MIP-3α(CCL20)是肠道DC重要的趋化因子, 在肠道上皮细胞和PP顶部的滤泡上皮呈高表达, 能诱导表达CCR6的未成熟DC从血循环迁移至肠道组织内. 体外实验已证实, 位于PP内滤泡上皮下方的$CD11b^+$DC, 其表面存在CCR6分子, 能受到MIP-3α的趋化作用发生迁移. 而在CCR6表达缺陷的大鼠体内, 相应区域的$CD11b^+$DC含量明显减少. 因此, MIP-3α被认为是控制DC在PP和肠道固有层内定位的主要信号分子[2]. 最近的研究报道, 用更敏感的荧光技术发现, 即使是CCR6缺陷的大鼠, 在PP的滤泡上皮下方也存在$CD11b^+$DC. 进一步研究发现, 这些$CD11b^+$DC具有CCL9的趋化活性, CCL9的受体CCR1在$CD11b^+$DC上高度表达; 阻断CCL9的活性能减少PP内$CD11b^+$DC的数

■背景资料
树突状细胞(DC)是目前所知机体内功能最强的专职性抗原递呈细胞. 在肠道内, 树突状细胞不但能对致病菌产生免疫应答, 而且能对肠腔内共生菌及各类食物蛋白产生免疫耐受. 肠道是人体最大的免疫器官, DC在此起到关键的抗原递呈作用, 其种类和成熟过程对于研究肠道免疫功能和相关疾病具有重要意义. 目前体外实验已取得较大进展, 相关机制已初步了解, 下一步即将进行体内研究.

■应用要点
肠道内DC可同时诱导免疫应答和耐受, 在肠道免疫屏障的构成中起到决定性作用. 目前认为: 与DC相关的疾病包括自身免疫性疾病、过敏反应、移植排斥、感染、肿瘤等. 肠道内树突状细胞由于其特殊的部位和功能, 主要参与炎性肠病、肠道肿瘤、感染、移植排斥反应等的病理过程. 因此, DC的功能研究对完善肠道肠屏障功能研究具有重要临床意义.

量; 但是, CCR1缺陷的大鼠并未出现CD11b$^+$DC的显著减少. 说明CCL9在DC表面可能还有另外的受体或者CCR1存在独立的活性[3]. 目前还不清楚是否CD11b$^+$DC迁移至PP需要同时表达CCR6和CCR1. MIP-3β(ELC)能诱导表达CCR7的CD8α$^+$DC发生迁移, 进入PP内的T细胞富集区. 同时, DC通过高表达CCR7与MIP-3β, 6Ckine (SLC)的反应, 可从PP迁移进入淋巴管间内皮小静脉和输出淋巴结的T细胞富集区. 一旦接触到T细胞, 成熟DC能接收到另外的成熟信号(如TNFR 家族分子 CD40L, RANKL, 4-1BBL和OX40L)来进一步提高T细胞触发的免疫反应[4].

通过摄入荧光聚苯乙烯微粒的研究发现, CD11b$^-$CD8α$^-$DC亚群主要存在于PP的圆顶区和滤泡间区, 占此处DC数量的大部分[2]. 值得注意的是, 这些DC并不随着摄入颗粒直接迁移到滤泡间区而是先在PP内滤泡上皮下停留较长的一段时间. 只有当大鼠给予外来刺激(如感染沙门菌或给予霍乱毒素)时, DC才迁移至T淋巴细胞区和B细胞滤泡内发育成熟. 这说明DC的迁移和成熟除了各类信号分子相互作用外, 还需要外来的刺激因素[4].

2 肠道DC的抗原递呈功能

肠腔内的抗原物质主要经由3条途径吸收: (1)DC途径: 肠道DC能直接从上皮细胞之间伸出轴突摄取抗原或细菌; (2) M细胞途径: 特殊抗原(如细菌)经由PP顶部的M细胞吸收, 传递给PP内的DC, 直接激活T淋巴细胞或促使B淋巴细胞分泌IgA; (3) 上皮细胞途径: 可溶性抗原可直接由肠上皮细胞通过囊泡摄取或经细胞旁途径进入黏膜固有层, 进而与T细胞或巨噬细胞反应[5].

2.1 可溶性抗原的递呈 可溶性抗原主要是指各类食物蛋白经消化后进入肠道内吸收的小分子蛋白质. 此类抗原主要经由肠上皮细胞和细胞旁途径吸收. 早期的研究已证实, 肠道内可溶性抗原的摄取可诱发DC的增殖, 从而提高肠道相关淋巴组织参与的免疫耐受[6] , 但其机制未阐明. 最近, Kunkel *et al*[7]通过对PP和MLN内DC参与抗原递呈的可视化研究结合流式细胞计数发现, 虽然 PP内的DC首先递呈肠道来源的可溶性抗原, 但是MLN内的初始型T淋巴细胞却优先激活并分组表达; 在PP缺陷的大鼠体内, 参与可溶性抗原递呈的DC出现的数量和频率与正常大鼠受同等刺激后的表现相似. 因此, PP内DC可能并不是诱导免疫耐受所必须, 有学者研究认为MLN可能才是真正诱导免疫反应的关键部位. 用荧光标记的抗原鉴定递呈可溶性抗原的DC亚群时发现, 标记抗原可出现在外周淋巴结CD8α$^-$DC和CD8α$^+$DC上, 而在MLN内仅有CD8α$^-$DC. 与此相比, 在致免疫应答的条件下, 标记抗原仅在外周淋巴结CD8α$^-$DC上发现[8]. 上述研究表明, 相同DC亚群可同时在免疫应答和免疫耐受的条件下递呈抗原, 但是其应答或耐受功能可能取决于DC的定植部位和组织微环境的影响.

2.2 DC对特殊抗原的递呈 特殊抗原(细菌及不溶性颗粒)进入肠道黏膜免疫系统一般是通过PP肠腔面特殊的M细胞的吞饮作用来完成. 早期研究发现, 在PP内DC与M细胞相邻而居. 用伤寒沙门氏菌感染肠道黏膜数小时后, 即可发现PP内DC与沙门菌共存, 表明DC是肠道内细菌类抗原的主要递呈细胞[9]. 通过DC吞入荧光聚苯乙烯微粒的实验表明, 此类大部分为CD11c$^+$CD11b$^-$CD8α$^-$DC, 定位于滤泡上皮下区域[10]. 除了经由PP内M细胞途径摄取细菌类抗原外, 散布于整个肠道LP的DC也可直接与细菌接触. LP内DC可以从肠腔上皮细胞间伸出突触来与细菌接触, 与此同时通过表达和调节紧密连接蛋白(如JAM, occluding, claudin, ZO-1等)来维持肠道屏障的完整性, 目前认为此机制与DC诱导肠道对共生菌的免疫耐受有关[11].

鉴别肠道内的致病菌与共生菌是维持肠道稳态的基础条件. 目前假设机制是DC利用其表面的Toll样受体(TLR)和C型lectin来辨别两类细菌固有的特征性相关分子, 从而将其区分[12]. TLR是细胞表面的跨膜蛋白, 能与特定的配体(通常是细菌产物)结合, 从而诱导免疫反应. 例如TLR4能识别*E.coli*来源的LPS; TLR2主要识别G$^+$菌细胞壁成份; TLR5能识别G$^-$菌来源的鞭毛素; TLR9可识别细菌DNA内GpG结构[13]. 但是, 目前还不清楚肠道不同组织内DC亚群表面TLR表达情况及其与各类细菌识别的具体机制. C型lectin能结合糖基抗原, 与多种微生物(如病毒、细菌、酵母、寄生虫等)的抗原递呈有关. 同时, C型lectin在DC的迁移过程中也起重要作用. 目前研究较深入的C型lectin分子如DC-SIGN, 他能与血管内皮表面ICAM-2结合促进未成熟DC从血管内渗出; 通过与T细胞表面ICAM-3结合即可激活免疫反应[14].

3 肠道DC诱导的免疫反应和免疫耐受

3.1 免疫反应 外来致病菌主要由肠道上皮M细胞吞噬后传递给PP内DC, 继而刺激肠道内淋巴

细胞产生免疫反应. 通过刺激DC表面TNFR分子来研究DC诱导的免疫发现, 脾脏来源DC经刺激后可诱导 IL-1, IL-6和IL-12表达增多, 从而激发免疫应答, 但在PP却诱导IL-10复制增多[4]. 其中, IL-12是一个重要的免疫应激因子. 在体内, T细胞是主要的刺激因素, DC通过CD40与T细胞表面CD40L接触后刺激分泌大量IL-12, 使辅助性T细胞变成Th1细胞, 并诱导NK细胞分泌IFN-γ. 在体外, IL-12与携带抗原成分的DC一起可增强抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)反应.

DC还能对进入上皮内的异位细菌产生免疫抑制, 最近研究发现, IL-23可能起到关键作用, 但机制未阐明. IL-23由2个亚单位构成: IL-23p19和IL-12p40. 用表达荧光素酶的动物实验发现, IL-12p40与IL-23p19在小肠内共同表达, 肠道黏膜固有层$CD11^+CD8^-CD11b^-$DC也可表达IL-p40[15]. 在正常定植的肠道内, 肠道黏膜对细菌的免疫并不激烈, 而且这种免疫反应有助于局部免疫系统的发育. 最近研究发现, 肠道内不同部位的DC亚群对同一刺激反应完全不同, 因此DC诱导免疫或耐受, 其结果可能更依赖于局部组织内DC亚群种类以及他们与T细胞的接触[1].

3.2 *免疫耐受* 肠道黏膜免疫耐受的诱导途径有很多, 涉及一系列的细胞与体液因子参与. 通过对荧光标记的抗原研究及动态分析发现, DC参与免疫耐受的诱导过程, 并存在T淋巴细胞的激活表达. 尽管研究显示, T细胞被激活的部位不同, 但可以肯定免疫耐受的诱导是一个活化的过程, 伴随着抗原反应性T细胞增殖[16-17]. 目前很难通过实验鉴别诱导免疫耐受的DC亚群. 肠道DC参与的免疫耐受机制包括功能性T细胞不应/缺失、诱导调节性T细胞分泌TGF-β(Th3细胞)或IL-1(Tr1细胞)产生免疫抑制. 其相关途径包括[1]: (1)酶和前列腺素(PGE_2)途径: 胸腺起源的$CD4^+CD25^+$调节性T细胞在CTLA-4-B7和IFN-γ的诱导下能分泌吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2, 3 dioxygenase, IDO). IDO通过分解色氨酸(细胞增殖必需)来抑制T细胞的免疫调节活性. 同时, IDO也受到IFN-γ和DC来源的IFN-α的调节[18]. PGE_2能增加IL-10的产生而抑制DC的免疫刺激功能; 同时, PGE_2也能减少DC表面白三烯B4(LTB4), IL-12和 MHCⅡ类分子的产生来降低免疫反应. (2)信号途径: DC表面Serrate1分子与外周初始型 $CD4^+$T细胞的Notch1结合, 诱导其分化为调节性T细胞, 通过减少IL-2, IFN-γ的分泌来抑制细胞增殖[18]. (3)结合抑制途径: 研究发现, 用异源性不成熟DC反复刺激初始型$CD4^+$T细胞能导致T细胞增殖抑制并大量分泌IL-10, 但这种抑制严格依赖于DC与T细胞间的接触. (4)细胞因子途径: DC可分泌IL-10, TGF-β, IFN-α等分子直接调节T细胞的免疫功能.

在上述机制中, IL-10和TGF-β是重要的免疫抑制分子, 起到关键作用. 与免疫应答一样, 在免疫耐受过程中不同组织来源的DC对于同一种刺激, 也可表现出不同的功能. 例如, 在PP内$CD11c^+CD11b^+$ DC在CD40L刺激下可特异性分泌IL-10, 而$CD11c^+CD8\alpha^+$DC和$CD11c^+CD11b^-CD8\alpha^-$DC则分泌IL-12p70.

4 肠道DC与疾病

DC是目前所知机体内功能最强的抗原递呈细胞, 无论是生理或者病理状态下, DC都参与免疫反应的启动和调节过程, 在多种疾病的发生和发展中具有重要作用. 目前认为, 与DC相关的疾病包括自身免疫性疾病、过敏反应、移植排斥、感染、肿瘤等. 肠道内DC由于其特殊的部位和功能, 主要参与肠道炎性疾病、肠道肿瘤、感染、移植排斥反应等的病理过程. 目前认为, DC的功能紊乱是引起肠道炎性疾病如Crohn's病、溃疡性结肠炎等发生的重要病因. 研究发现, 在炎性肠病发生的早期, 转移的T细胞即可引起$CD11c^+$DC在LP的聚集, 其中涉及一系列信号分子如OX40/OX40L[19], B7-H1/程序性死亡-1受体(PD-1)[20]的结合, 但具体机制还未阐明.

近来, 有关DC与各种肿瘤的临床病理特征及预后的关系和以DC为基础的免疫治疗方面已成为国内外研究的热点, 并且已取得初步成效. 有学者研究发现, DC的数量和肠癌的组织学类型、浸润、转移及分期有关. DC在肠癌组织中与淋巴细胞相伴浸润; 癌周淋巴细胞反应明显者, 癌组织内DC数量明显增多; 肿瘤侵至浆膜或淋巴结转移时, 癌组织内DC数量明显减少; 术后生存时间>5 a者癌组织内DC数量明显多于生存时间< 5 a者, 提示癌组织内DC可作为估计预后的一项指标.

当肠道发生感染后, 肠道相应组织内DC的数量明显增多, 同时存在DC表面共刺激分子的高表达. 肠道内DC可将细菌产物递呈T, B细胞, 从而诱导免疫应答, 此为肠道免疫系统的正常反应. 目前临床上小肠移植很难取得成功, 很重要

■名词解释

树突状细胞: 首先由Steinman于1973年在小鼠脾脏中发现, 后来Vanvoohis在人外周血液中亦发现这种细胞. 由于这种细胞向外伸出许多长的膜性面纱状、梭状或扁平状突起, 类似于神经细胞的树突, 因而得名. DC是体内功能最强的专职抗原呈递细胞.

■同行评价
本文详细综述树突状细胞在免疫、耐受及疾病发生过程中的作用. 文章介绍较为全面, 阐述较为严密, 引文较新, 有一定指导意义.

的原因就是移植排斥反应, 相信与肠道内DC密切相关. 而有关外科病理状态下, 肠道DC改变以及引起肠免疫功能的影响鲜有报道.

总之, 肠道内DC可同时诱导免疫应答和耐受, 在肠道免疫屏障的构成中起到决定性作用. 但是, DC及其亚群在肠道免疫系统中的功能受多种因素影响, 包括抗原浓度; T细胞的相互作用; 局部细胞因子、趋化因子或代谢产物; 致病菌产物; 局部组织微环境等. 实际上, 这些因素均参与肠道屏障的构成, 因此, DC的功能及相互影响因素的研究对完善肠道肠屏障功能概念具有重要临床意义.

5 参考文献

1 Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 300-309

2 Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191: 1381-1394

3 Zhao X, Sato A, Dela Cruz CS, Linehan M, Luegering A, Kucharzik T, Shirakawa AK, Marquez G, Farber JM, Williams I, Iwasaki A. CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 2797-2803

4 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811

5 Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12; quiz 13

6 Williamson E, O'Malley JM, Viney JL. Visualizing the T-cell response elicited by oral administration of soluble protein antigen. *Immunology* 1999; 97: 565-572

7 Kunkel D, Kirchhoff D, Nishikawa S, Radbruch A, Scheffold A. Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1292-1301

8 Kobets N, Kennedy K, Garside P. An investigation of the distribution of antigen fed in tolerogenic or immunogenic forms. *Immunol Lett* 2003; 88: 147-155

9 Hopkins SA, Niedergang F, Corthesy-Theulaz IE, Kraehenbuhl JP. A recombinant Salmonella typhimurium vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* 2000; 2: 59-68

10 Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect Immun* 2003; 71: 504-509

11 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367

12 Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 72-76

13 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680

14 Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 255-270

15 Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693-706

16 Gutgemann I, Fahrer AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* 1998; 8: 667-673

17 Sun J, Dirden-Kramer B, Ito K, Ernst PB, Van Houten N. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol* 1999; 162: 5868-5875

18 Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, Tan K, Dunne J, Forsyth LM, Dallman MJ, Owen MJ, Ish-Horowicz D, Lamb JR. Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol* 2000; 12: 177-185

19 Malmstrom V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, Powrie F. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 2001; 166: 6972-6981

20 Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 4156-4163

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2233-2236
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成

赖铭裕, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
梁志海, 唐国都, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
孙学成, 温州医学院第一附属医院消化内科 浙江省温州市 325035
广西自然科学基金资助, No. 0447054
通讯作者: 唐国都, 530021, 广西南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科. tguodu02@yahoo.com.cn
电话: 0771-5356501
收稿日期: 2006-04-17 接受日期: 2006-05-11

L-arginine-induced acute nectotizing pancreatitis by intraperitoneal injection in rats

Ming-Yu Lai, Zhi-Hai Liang, Guo-Du Tang, Xue-Cheng Sun

Ming-Yu Lai, Department of Gerontism Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Zhi-Hai Liang, Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Xue-Cheng Sun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, No. No. 0447054
Correspondence to: Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China. tguodu02@yahoo.com.cn
Received: 2006-04-17 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To evaluate the method and mechanism of *l*-arginine induced acute necrotizing pancreatitis in rats.

METHODS: A total of 60 rats were randomly divided into control group (C, n = 24), acute pancreatitis group (A, n = 36). The rat model of acute necrotizing pancreatitis was induced by intraperitoneal injection of *l*-arginine (1.0 mg/g, all 3 times) at the concentration of 60 g/L. All the rats were killed at 4th, 12th, 24th and 36th h after modeling. The histopathological scores for pancreas and the level of serum amylase were investigated.

RESULTS: Histopathological results revealed that the acinar architecture was destroyed with necrosis, interstitial edema and inflammatory infiltration at 24th h after *l*-arginine injection. Pancreatic necrosis mainly centralized in the edge area of glandular lobule. In comparison with those in group C, the histopathological scores for the pancreas (4 h: 4.45 ± 1.33 *vs* 0.50 ± 0.55, P < 0.01; 12 h: 5.33 ± 1.66 *vs* 0.67 ± 0.82, P< 0.01; 24 h: 7.89 ± 1.67 *vs* 0.67 ± 0.82, P < 0.01; 36 h: 8.33 ± 1.12 *vs* 0.67 ± 0.82, P < 0.01) and the serum level of amylase (4 h: 8296.16 ± 1028.21 nkat/L *vs* 6315.10 ± 816.83 nkat/L, P < 0.01; 12 h: 11 255.92 ± 2565.18 nkat/L *vs* 5867.84 ± 632.29 nkat/L, P < 0.01; 24 h: 54 424.22 ± 27 125.09 nkat/L *vs* 6078.05 ± 1070.88 nkat/L, P < 0.01; 36 h: 28 494.53 ± 12 278.62 nkat/L *vs* 6286.26 ± 1074.38 nkat/L, P < 0.01) were significantly increased in group A at different time points.

CONCLUSION: The rat model of acute necrotizing pancreatitis can be induced by intraperitoneal injection of *l*-arginine (1.0 mg/g, three times) at the concentration of 60 g/L at an hourly interval.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; L-arginine; Rat model

Lai MY, Liang ZH, Tang GD, Sun XC. L-arginine-induced acute nectotizing pancreatitis by intraperitoneal injection in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2233-2236

摘要

目的: 通过大剂量左旋精氨酸(*l*-arginine) ip诱导大鼠急性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)模型, 探讨此模型制备的方法和机制.

方法: 将60只SD大鼠随机分为正常对照组(C组, n = 24), ANP模型组(A组, n = 36). C组接受生理盐水对照; A组用60 g/L左旋精氨酸分3次ip建立ANP模型. 分别观察两组大体病理变化、光镜下病理评分、血清淀粉酶水平.

■背景资料
急性坏死性胰腺炎(ANP)是病死率较高的疾病, 其发病机制未完全阐明, 多年来国内外学者致力于制备良好的ANP动物模型用于ANP的基础研究, 目前所用的多种ANP动物模型制备方法均有不足之处, 本文试用腹腔注射大剂量左旋精氨酸(*l*-arginine)腹腔注射法制备ANP大鼠模型, 探讨这种新的ANP实验模型形成机制, 希望为ANP的实验研究提供更多选择.

■研发前沿
迄今尚未有一种ANP模型能与人类ANP发病过程完全一致, 可以全面解释ANP的发病机制, 每一种模型均只能在一定程度上反映ANP的某一病理生理学方面的改变情况. 此外, 从动物模型得到的实验数据和结果并不完全适用于人类. 能模拟人类ANP发病机制和病理生理学改变的ANP动物模型必将对ANP的发病机制基础研究及临床治疗起到巨大的推动作用.

■创新盘点
腹腔注射大剂量*l*-arginine制备ANP大鼠模型, 此模型制作方法简单, 价廉, 不需特殊材料及设备, 重复性好, 损伤小, 病变程度在不同的胰腺部位比较均匀一致, 克服了其他模型需行剖腹术等缺点, 大大减少了外源性细菌污染机会, 且与人类ANP的病程及组织学改变相似.

结果: *l*-arginine ip后24 h可观察到集中于小叶边缘区的大片胰腺组织坏死、腺小叶结构消失, A组的病理评分(4 h: 4.45±1.33 *vs* 0.50±0.55, $P<0.01$; 12 h: 5.33±1.66 *vs* 0.67±0.82, $P<0.01$; 24 h: 7.89±1.67 *vs* 0.67±0.82, $P<0.01$; 36 h: 8.33±1.12 *vs* 0.67±0.82, $P<0.01$)、血清淀粉酶(4 h: 8296.16±1028.21 nkat/L *vs* 6315.10±816.83 nkat/L, $P<0.01$; 12 h: 11 255.92±2565.18 nkat/L *vs* 5867.84±632.29 nkat/L, $P<0.01$; 24 h: 54 424.22±27 125.09 nkat/L *vs* 6078.05±1070.88 nkat/L, $P<0.01$; 36 h: 28 494.53±12 278.62 nkat/L *vs* 6286.26±1074.38 nkat/L, $P<0.01$)各时点都比C组明显升高.

结论: 采用分3次ip 60 g/L左旋精氨酸方法可成功诱导ANP模型.

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 左旋精氨酸; 大鼠模型

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2233-2236
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2233.asp

0 引言

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)是病死率较高的疾病, 其发病机制未完全清楚, 传统的胰酶活化学说不能满意解释ANP的病程发展和转归, 近年来先后提出ANP后继发系统性炎症反应综合征(SIRS)、胰腺微循环障碍、肠道细菌移位等理论对ANP的病理生理机制有重要意义. 为阐明ANP的发病机制, 大量的研究采用动物实验进行, 诱导满意的ANP动物模型是关键的一步, 传统的胰胆管逆行注射、十二指肠结扎等实验方法存在一定的缺点. 我们以大剂量左旋(*l*-arginine)ip法制备ANP大鼠模型, 探讨这种新的ANP实验模型形成机制.

1 材料和方法

1.1 *材料* 健康♂SD大鼠(清洁级)60只, 2-3月龄, 体质量250-350 g(由广西医科大学实验动物中心提供), 随机分成正常对照组(C组, n = 24)、急性胰腺炎组(A组, n = 36). 左旋精氨酸, 美国Sigma公司分析纯, 通过深圳晶美生物工程技术有限公司购进; 血清淀粉酶试剂, 英国Randox公司.

1.2 *方法* ANP动物模型的制备: 参照尚宏清 *et al*[1]方法经改良[2]大剂量左旋精氨酸ip法制备大鼠AP模型. 所有大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水; A组大鼠分3次给予ip左旋精氨酸(3×1.0 g/kg体质量), 间隔1 h, 诱导ANP模型; C组大鼠生理盐水ip对照, 用量计算同左旋精氨酸. 在注射左旋精氨酸诱导ANP模型后4, 12, 24, 36 h共4个时点分批处死, 从腹主动脉取血, 离心后留血清-80℃下保存待测; 同时提取胰腺组织. 提取胰头部位组织用40 g/L福尔马林液固定, 石蜡包埋、切片及HE染色. 由病理科医生按盲法对大鼠胰腺组织切片在光镜下观察并参考Kusske *et al*[3]标准进行组织病理学评分. 对大鼠胰腺组织在光镜下的表现按水肿、炎细胞浸润、坏死3方面的轻重程度评分(表1). 血清淀粉酶测定: 用底物酶学法在大型生化仪(Hitachi 7100)上检测血清淀粉酶水平.

表 1 病理分级标准评分

指标	分级标准	评分
水肿	无	0
	小叶间灶性水肿	1
	小叶间弥散性水肿	2
	腺体紊乱分离	3
炎症细胞浸润	无	0
	局限导管内	1
	实质内 (<50%小叶)	2
	实质内 (>50%小叶)	3
腺泡坏死	无	0
	导管周围坏死 (<5%)	1
	灶性坏死 (5%-20%)	2
	弥散性实质坏死 (>20%)	3

表 2 两组大鼠病理评分 (mean ± SD)

分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
C	6	0.50 ± 0.55	0.67 ± 0.82	0.67 ± 0.82	0.67 ± 0.82
A	9	4.45 ± 1.33[b]	5.33 ± 1.66[b]	7.89 ± 1.67[b]	8.33 ± 1.12[b]

[b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

统计学处理 应用SPSS 10.0分析, 对两组间病理评分应用秩和检验, 血清淀粉酶数据差别比较采用t检验. 实验数据均以mean±SD表示, $P<0.05$为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 *胰腺组织病理改变* 各时点处死的A组大鼠解剖后在腹腔内可见数量不等的淡黄色或红色血性腹水, 而且同时可观察到不同程度的鼓肠、腹腔脏器黏连、脂肪皂化现象, 胰腺外观变成灰白色, 部分有暗红色出血样改变. 观察时间越长, 以上表现越重. C组大鼠大体观无变化. A组胰腺标本在镜下可见胰腺腺泡水肿、组织坏死, 在胰腺实质、间质内有中性粒细胞、淋巴细胞浸润以

表 3 大鼠血清淀粉酶活性对比 (mean ± SD, nkat/L)

分组	*n*	4 h	12 h	24 h	36 h
C	6	6315.10 ± 816.83	5867.84 ± 632.29	6078.05 ± 1070.88	6286.26 ± 1074.38
A	9	8296.16 ± 1028.21[b]	11 255.92 ± 2565.18[b]	54 424.22 ± 27 125.09[b]	28 494.53 ± 12278.62[b]

[b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

及出血病灶形成. 随时间延长病变加重, 24 h以后可见大片胰腺组织凝固性坏死、腺小叶结构消失、大量炎症细胞浸润. C组标本腺泡结构完整、腺小叶清晰, 多数无病理改变, 个别只见轻度水肿及少量炎症细胞浸润, 无细胞坏死, 多数评分为0分, 个别在1-2分间. A组大鼠胰腺各时点病理评分较C组明显增高($P<0.01$), 时间越长、评分越高 (表2).

2.2 *血清淀粉酶水平* C组血清淀粉酶水平在各时点变化不明显, A组大鼠血清淀粉酶水平在各时点都比C组明显增高($P<0.01$), 在第24 h达到高峰, 随后有所下降(表3).

3 讨论

实验性动物ANP模型可分为侵入性和非侵入性两类. 侵入性模型主要有: 逆行性胰管注射牛磺胆酸钠, 手术结扎胰、胆管或胰胆管共同通道, 十二指肠闭袢法而致ANP模型等. 这些方法都需要对动物实施麻醉、剖腹手术等复杂的创伤性操作, 术中易损伤腹腔脏器, 且需要实验人员掌握一定的手术技巧和设备. 所以, 侵入性模型操作较复杂, 费用高. 近年来, 人们越来越重视非侵入性ANP模型的制备, 目前常用的有: ip蛙皮素和食物诱导(CDE) 两种. 这两种模型操作简单, 但前者胰腺损害较轻, 多用于研究急性水肿型胰腺炎(AEP); 后者病情所产生的损害程度取决于实验鼠的性别、年龄和质量, 使用受到限制[4]. 由于左旋精氨酸诱导大鼠ANP所使用方法、剂量和和浓度在国内外各家报道不一[1-2,5-6], 本实验组须通过预实验摸索合适的具体诱导方法, 我们在使用80 g/L及以上的左旋精氨酸浓度注射时大鼠死亡率高, 不利于观察12 h以后的变化; 当降低注射浓度到6%时胰腺损伤以水肿为主, 坏死少见, 必须在降低左旋精氨酸浓度(60 g/L)同时增加ip次数(3次)才能诱导出满意的ANP模型, 其方法简便、成本低、可重复性好、动物损伤小, 病变程度在不同的胰腺部位比较一致, 克服了侵入性模型需行剖腹术的缺点, 减少了外源性细菌污染机会, 与人类ANP的病程及组织学改变相似, 他是目前研究ANP发病机制及防治措施较为理想、值得推广的动物模型[7]. 在本实验中, A组的血清淀粉酶增高, 高峰出现在24 h, 随观察时间的延长, A组大鼠的大体病理和组织病理学改变加重, 胰腺组织坏死明显、病理评分加重, 胰腺损伤随时间延长而加重, 本实验方法形成稳定的ANP模型是肯定的. 值得注意的是, 本模型胰腺大片的凝固性坏死多集中于腺小叶周边, 与赵秋玲 *et al*[8]观察到的坏死明显集中于小叶边缘区一致, 与传统的逆行性胰管注射牛磺胆酸钠有所区别.

大剂量左旋精氨酸ip制备大鼠ANP模型的作用机制未完全清楚, 最早应用的Tani *et al*[5]认为, 实验原理在于他能减少多胺的合成, 抑制蛋白及蛋白质合成, 损伤蛋白质合成最为活跃的胰腺细胞, 从而导致胰腺炎发生. 随着研究的深入, 左旋精氨酸诱导ANP模型的形成机制有以下观点: (1)左旋精氨酸作为一氧化氮(NO)的前体, 当大剂量给药时产生过量的NO, 导致了难治性的血管扩张和胰腺低灌注[9], 导致血流淤滞、血压下降、局部炎症扩散, 组织利用氧减少, 而引起胰腺组织病理损伤; (2)大剂量左旋精氨酸改变胰腺腺泡细胞的肌动蛋白细胞骨架, 增加了热休克蛋白的表达[10]; (3)左旋精氨酸能诱发腺泡细胞胰腺炎相关蛋白的细胞凋亡和基因表达[11], 促进了ANP的发生; (4)NF-κB是多种ANP动物模型的共同机制, 左旋精氨酸(3 g/kg) ip可诱导ANP, 注射后12-36 h观察到NF-κB活性和IL-1β和TNF-α浓度的增高, 在注射左旋精氨酸前应用干预药物可抑制NF-κB活性、减轻ANP病理损害, 通过抑制NF-κB活性、减少前炎症细胞因子合成对减轻ANP有利[12]; (5)*l*-arginine左旋精氨酸诱导的ANP模型中发现胰腺组织的丙二酰二醛(MDA)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化物歧化酶(Mn, Cu, Zn-SOD)以及血清TNF-α, IL-6的水平明显上升, 应用黄嘌呤氧化酶抑制剂前干预可减轻实验动物胰腺的水肿、炎症及坏死程度, 同时检测的以上指标均有所降低, 所以氧自由基、前炎症因子[6,13]等物

■**名词解释**
精氨酸是一种半必需氨基酸, 其左旋体*l*-arginine经一氧化氮合酶催化生成一氧化氮(NO), 是NO的唯一来源. 小剂量*l*-arginine可改善组织微循环, 大剂量对组织有损伤作用.

■同行评价
该文采用腹腔注射大剂量左旋精氨酸制备急性坏死性胰腺炎大鼠模型, 以病理所见和血清淀粉酶为观察指标, 探讨左旋精氨酸的使用方法、剂量和浓度. 本模型的建立为急性胰腺炎的研究提供了一个较理想的平台, 为模型制备提供简单、有供较准确剂量可依的方法. 该模型成功率高, 较侵入性模型有不受技术、设备、条件和手术损伤程度影响的不利因素限制. 因此是一个较理想的模型.

质增加参与了ANP的病理生理机制. 大剂量左旋精氨酸ip法能成功建立ANP大鼠模型, 其方法简便、成本低、可重复性好, 是目前研究ANP发病机制及防治措施较为理想、值得推广的动物模型.

4 参考文献

1 尚宏清, 李非, 张再兴, 孙家邦. 分次大剂量L-精氨酸腹腔内注射致大鼠急性坏死性胰腺炎模型的研究. 首都医科大学学报 2000; 21: 322-324.

2 谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海锋. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子-κB和一氧化氮合酶的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 711-713

3 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289

4 林振和, 陈垦. 实验性胰腺炎动物模型研究进展. 胰腺病学 2003; 3: 176-178

5 Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 367-374

6 Czako L, Takacs T, Varga IS, Hai DQ, Tiszlavicz L, Hegyi P, Mandi Y, Matkovics B, Lonovics J. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin. *J Physiol Paris* 2000; 94: 43-50

7 Toma H, Winston J, Micci MA, Shenoy M, Pasricha PJ. Nerve growth factor expression is up-regulated in the rat model of L-arginine-induced acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 119: 1373-1381

8 赵秋玲, 黄承钰, 徐家玉, 张银柱, 刘静. L-精氨酸诱导小鼠急性坏死性胰腺炎模型的建立. 疾病控制杂志 2004; 8: 141-144

9 周总光, 陈友岱. 胰腺微循环障碍的影响因子与急性胰腺炎. 中国科学基金 2001: 13-16

10 Tashiro M, Schafer C, Yao H, Ernst SA, Williams JA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut* 2001; 49: 241-250

11 Motoo Y, Taga K, Su SB, Xie MJ, Sawabu N. Arginine induces apoptosis and gene expression of pancreatitis-associated protein (PAP) in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Pancreas* 2000; 20: 61-66

12 Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709

13 Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1770-1777

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 •

专家门诊

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

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

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

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2237-2240
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

医用微生态制剂分离菌株对白假丝酵母菌芽管形成的抑制作用

唐 欢, 但国蓉, 魏 泓

唐欢, 但国蓉, 魏泓, 第三军医大学基础部动物学教研室 重庆市 400038
通讯作者: 魏泓, 400038, 重庆市, 第三军医大学基础部动物学教研室. weihong63528@163.com
电话: 023-68752051
收稿日期: 2006-04-12 接受日期: 2006-06-14

Inhibition of *Candida albicans* germination by strains separated from probiotic products for medicinal purposes

Huan Tang, Guo-Rong Dan, Hong Wei

Huan Tang, Guo-Rong Dan, Hong Wei, Department of Animal Science, College of Basic Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Hong Wei, Department of Animal Science, College of Basic Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. weihong63528@163.com
Received: 2006-04-12 Accepted: 2006-06-14

Abstract

AIM: To study the effect of the strains separated from probiotic products for medicinal purposes on the germ tube formation of *Candida albicans*.

METHODS: Ten single strains were isolated from the probiotic products bought from the market, respectively. Crystal violet-based germ tube assay was used and the inhibition efficiency of the culture supernatant, live bacteria and heat-killed bacteria from each probiotic products were evaluated by germination rate.

RESULTS: Neutralized spend culture suspension of all the single strains separated from probiotic products suppressed the germination of *Candida albicans* significantly (all $P < 0.01$). Live bacteria of *Bifidobacterium longum* 1, *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus* inhibited the germination while all the heat-killed bacteria didn't.

CONCLUSION: Probiotic products for medicinal purposes can inhibit the growth of germ tube of *Candida albicans*.

Key Words: Probiotic products; *Candida albicans*; Germ tube

Tang H, Dan GR, Wei H. Inhibition of *Candida albicans* germination by strains separated from probiotic products for medicinal purposes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2237-2240

摘要

目的: 研究市售医用微生态制剂分离的单菌株对白假丝酵母菌芽管形成的影响.

方法: 分离市售益生菌产品单菌株10株, 采用结晶紫芽管染色法, 通过计算出芽率检测各益生菌分离菌株培养上清, 活菌体和热灭活菌体对白假丝酵母菌的出芽抑制.

结果: 五种微生态制剂单菌的中性培养上清对白假丝酵母菌的芽管生成均具有显著的抑制作用($P<0.01$); 长双歧杆菌1, 嗜酸乳杆菌及两株芽孢杆菌的活菌可以抑制出芽; 热灭活菌体无法抑制白假丝酵母菌的出芽.

结论: 市售医用微生态制剂具备抑制白假丝酵母菌出芽的抑菌效果.

关键词: 微生态制剂; 白假丝酵母菌; 芽管

唐欢, 但国蓉, 魏泓. 医用微生态制剂分离菌株对白假丝酵母菌芽管形成的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2237-2240
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2237.asp

0 引言

白假丝酵母菌(*Candida albicans*, *C.albicans*)性肠炎婴幼儿发病率较高, 多继发于长期腹泻, 营养不良及重症所致体质虚弱者, 尤其是在长期大量使用抗生素或激素等导致肠道菌群失调后更易诱发[1]. 临床上使用培菲康、金双歧、丽珠肠乐等微生态药物治疗此类感染, 效果与抗真菌

■背景资料
近年来, 白假丝酵母菌成为医源获得性感染的主要病原菌之一, 胃肠道真菌感染患者增多, 除传统抗真菌药物外, 微生态疗法也已广泛应用于霉菌性腹泻的治疗. 益生菌药物疗效显著, 安全性高, 具备开发为抗真菌药物的潜力, 但其拮抗此类条件性致病真菌的基础研究相对较少, 作用机制的研究亟待深入.

■研发前沿
芽管结构作为白假丝酵母菌明确的致病因子成为筛选抗双相真菌药物的标靶. 芽管可以促进白假丝酵母菌对宿主细胞的黏附, 穿透及破坏, 芽管的形成与白色念珠菌毒力的增强密切相关. 当前大量报道聚焦于芽管的萌发过程、诱导条件、阻断途径等.

■**创新盘点**
我国主要微生态药物对白假丝酵母菌抑菌活性的实验研究尚无报道, 而对益生菌抑制白假丝酵母菌的研究重点大部分仍定位于数量抑制, 本文首次将药品分离的10株益生菌单菌株用于白假丝酵母菌的芽管抑制实验, 进一步明确了微生态制剂抑制白假丝酵母菌生长并削弱其毒力的作用方式.

表 1 实验使用菌株及培养基

菌株名称	培养基	来源	备注
ATCC90028(白假丝酵母菌)	YPD	第三军医大学西南医院皮肤科惠赠	NCCLS推荐使用菌株
嗜酸乳杆菌	MRS(Oxoid)	分离自培菲康	上海医药(集团)有限公司
长双歧杆菌1	PTYG		信谊制药总厂
粪肠球菌	M17(Difco)		
保加利亚乳杆菌	MRS(Oxoid)	分离自金双歧	内蒙古双歧股份有限公司
长双歧杆菌2	PTYG		
嗜热链球菌	M17(Difco)		
青春双歧杆菌	PTYG	分离自丽珠肠乐	丽珠集团丽珠制药厂
地衣芽孢杆菌	营养琼脂(北京奥博星)	分离自整肠生	沈阳第一制药厂
枯草芽孢杆菌	营养琼脂(北京奥博星)		
屎肠球菌	M17(Difco)	分离自妈咪爱	北京韩美药品有限公司

药物无显著性差异, 且无副作用[2-4], 但除病例分析外, 对其拮抗白假丝酵母菌感染的机制并未做进一步研究. 白假丝酵母菌此类双相真菌可通过酵母相向菌丝相的转变增强其毒力[5], 而芽管结构是其菌相转化的起点, Hawser *et al*[6]研究表明, 药物对于芽管形成的干涉作用比抑制白假丝酵母菌本身的生长更适合作为评价抗真菌药物有效性的指标, 因此, 我们以抑制芽管形成为指标, 研究市售医用微生态制剂对白假丝酵母菌芽管形成的影响, 以探讨医用微生态制剂拮抗白假丝酵母菌感染的机制.

1 材料和方法

1.1 *材料* 菌株及培养基(表1). 白假丝酵母菌在含有300 mL/L甘油的YPD培养基中于-70℃保存. 取冻存菌液按照1∶100的比例接种于新鲜的YPD液体培养基中, 30℃静置培养48-72 h; 乳杆菌和肠球菌分别于MRS及M17液体培养基中, 37℃静置培养24 h; 芽孢杆菌于营养培养基中, 37℃振荡培养24 h; 双歧杆菌于PTYG液体培养基中, 37℃厌氧培养24 h.

1.2 *方法* 益生菌菌株的分离及鉴定详见文献[7], 简述如下: 从选择性培养基平皿挑取典型单菌落进行表型鉴定和常规生化鉴定[8], 同时提取各单菌落培养物的基因组DNA[9], 以提取的细菌基因组DNA为模板, 使用细菌通用引物27f及1492r[10]对其进行16S rDNA序列扩增, 将测定序列上传至GenBank数据库获Accession Number, 用BLAST工具将测定的序列与GenBank中的序列进行同源性比对分析. 白假丝酵母菌CFU测定使用10倍系列稀释法, 于最后3个稀释度各取100 μL滴入YPD培养基平皿上, 并用L形棒涂布均匀, 各做2个重复, 置37℃有氧条件下培养48 h后进行CFU计数. 收获新鲜白假丝酵母菌ATCC90028菌液, 使用1×PBS (pH 7.4)漂洗2次, 洗涤后的样品使用FBS (fetal bovine serum, 天津TBD公司)重悬, 将菌浓度调至5×10^9 CFU/L; 调节好浓度的白假丝酵母菌按照100 μL/孔的量加入96孔板中, 再加入等量的添加物使体系血清终浓度为50%, 37℃孵育2 h诱导出芽. 与白假丝酵母菌共孵育的添加物分为益生菌培养上清、益生菌活菌及热灭活菌体, 对照孔添加物为等体积PBS (pH 7.4). 由产品中分离的益生菌菌株, 经过24 h培养后12 000 *g*离心获取上清液, 所有上清液均调节至中性, 0.22 μm微孔滤膜过滤后即获中性培养上清; 活菌经1×PBS (pH 7.4)漂洗2次后调节至不同菌密度; 80℃

表 2 益生菌10株中性培养上清对白假丝酵母菌芽管形成的抑制作用 (mean ± SD)

培养上清, pH 7.4	A_{590}	出芽率(%)
长双歧杆菌1	0.226 ± 0.04	43.27 ± 8.87[d]
长双歧杆菌2	0.278 ± 0.03	54.77 ± 5.49[da]
青春双歧杆菌	0.333 ± 0.02	67.09 ± 6.39[da]
嗜酸乳杆菌	0.181 ± 0.04	33.32 ± 11.05[d]
保加利亚乳杆菌	0.408 ± 0.05	83.65 ± 2.66[db]
粪肠球菌	0.154 ± 0.03	27.33 ± 4.40[d]
屎肠球菌	0.191 ± 0.02	35.39 ± 6.36[dc]
嗜热链球菌	0.342 ± 0.03	68.90 ± 3.55[d]
枯草芽孢杆菌	0.248 ± 0.03	48.08 ± 6.60[d]
地衣芽孢杆菌	0.259 ± 0.02	50.63 ± 8.08[d]
对照(PBS, pH 7.4)	0.482 ± 0.01	100 ± 8.87

[a]$P<0.05$ *vs* 长双歧杆菌1; [b]$P<0.01$ *vs* 嗜酸乳杆菌; [c]$P<0.05$ *vs* 粪肠球菌; [d]$P<0.01$ *vs* 对照.

表 3 益生菌10株活菌体对白假丝酵母菌芽管形成的抑制作用 (mean ± SD)

活菌体	出芽率(%)	
	Probiotic: *C.albicans* = 10 : 1	Probiotic: *C.albicans* = 1 : 1
长双歧杆菌1	69.44 ± 9.91[d]	95.43 ± 18.25
长双歧杆菌2	94.99 ± 12.10[a]	96.14 ± 6.99
青春双歧杆菌	99.88 ± 8.40[a]	101.30 ± 3.96
嗜酸乳杆菌	84.94 ± 5.27[c]	104.97 ± 2.82
保加利亚乳杆菌	96.77 ± 3.44[b]	101.58 ± 2.74
粪肠球菌	103.08 ± 10.52	100.71 ± 23.08
屎肠球菌	92.59 ± 10.28	101.18 ± 5.84
嗜热链球菌	107.65 ± 20.14	111.20 ± 20.96
枯草芽孢杆菌	91.64 ± 20.27[c]	84.07 ± 10.73[c]
地衣芽孢杆菌	92.43 ± 2.12[c]	91.25 ± 4.02[c]
对照(PBS, pH 7.4)	100 ± 3.48	100 ± 6.24

[a]$P<0.05$ *vs* 长双歧杆菌; [b]$P<0.01$ *vs* 嗜酸乳杆菌; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$ *vs* 对照.

处理30 min获得热灭活菌体. 芽管形成定量检测以Abe *et al*[11]的结晶紫染色法为基础加以改进, 方法如下: 孵育后的样品使用700 mL/L的乙醇洗涤1次; 吸去乙醇后, 每孔中加入2.5 g/L SDS 200 μL, 弃去SDS, 去离子水洗涤3次以清除SDS; 显微镜观察, 确定没有出芽黏附的白假丝酵母菌已经被洗掉后, 每孔中添加1 g/L的结晶紫100 μL, 染色10 min; 倒掉染液后, 96孔板使用去离子水洗涤3次, 使用2.5 g/L的SDS洗涤1次, 去离子水再洗涤2次; 96孔板自然干燥后, 每孔加入异丙醇-0.04 mol/L HCl 200 μL和2.5 g/L SDS 50 μL, 在摇床上进行短暂固定; 酶标仪读取A_{590nm}的值; 计算出芽率, 公式为: 出芽率(%) = (实验孔A_{590}-空白孔A_{590})/(对照孔A_{590}-空白孔A_{590}).

统计学处理 采用SPSS 12.0软件, *t*检验组间比较, $P<0.05$为统计学上有显著差异.

2 结果

2.1 中性培养上清对白假丝酵母菌的出芽抑制 益生菌10株的培养上清(pH 7.4)对于白假丝酵母菌的芽管形成均具有显著的抑制作用, 且双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌同种不同株的抑菌效果存在显著差异(表2).

2.2 益生菌活菌对白假丝酵母菌的出芽抑制 益生菌与白假丝酵母菌浓度之比对益生菌的抑菌能力有一定影响, 该比例降低则对芽管的抑制能力也有所降低, 仅枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的抑菌效果未受浓度变化的影响(表3).

2.3 益生菌热灭活菌体对白假丝酵母菌的出芽抑制 热灭活后的所有益生菌菌体对于白假丝酵母菌芽管的形成无显著抑制作用(图1).

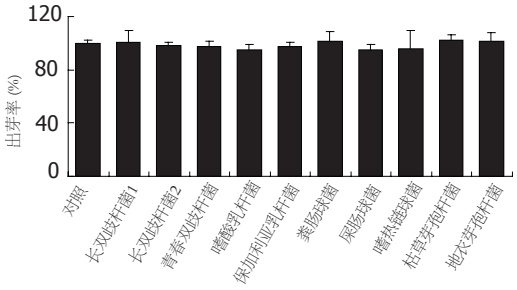


图 1 益生菌10株热灭活菌体对白假丝酵母菌芽管形成的抑制作用.

3 讨论

近年来, 医源性菌群失调频发, 继发真菌感染明显增多, 白假丝酵母菌成为深部真菌感染的主要致病菌之一. 由于白假丝酵母菌性肠炎患者多为婴幼儿及危重患者, 而临床一线抗真菌药物普遍具有较强的胃肠道反应, 因此使用微生态疗法治疗真菌性肠炎日益受到关注. 目前国内医用微生态制剂主要选用的益生菌包括双歧杆菌、乳杆菌、芽孢杆菌及肠球菌等, 这些益生菌具备提供肠道营养、提高机体免疫能力、维持肠道低pH环境及帮助恢复肠道菌群等复合作用, 而针对单一标靶性致病菌的抑制和拮抗, 其确切的功效成分及特异的抑菌机制仍缺乏深入研究. 我们分离鉴定了5种微生态药物的10株益生菌单菌株, 其中性培养上清和部分活菌可显著的抑制白假丝酵母菌的芽管形成. 与热灭

■**应用要点**
临床病例分析已经表明医用微生态制剂具有治疗真菌性肠炎的良好疗效, 但目前我国尚无微生态药物标注有相关适应症, 本文为拓宽微生态药物的适应症积累了药效学资料. 此外, 对于白假丝酵母菌芽管的定量检测, 结晶紫芽管染色法较传统的光镜观察计数法更为快速和客观.

■**名词解释**
1 益生菌制剂: 可以改善宿主肠道微生态平衡且含生理性活菌的微生物制剂.
2 芽管: 白假丝酵母行无性繁殖, 芽体从母细胞表面膨出并最终以菌丝态从母体缢断的过程称为出芽, 萌发过程中形成的早期结构成为芽管, 芽管进一步发展成为新的菌丝.

■同行评价
本研究初步探讨了10株微生态制剂对白色念珠菌芽管形成的抑制作用, 观察微生态单菌及其培养上清的抗真菌活性, 得到了有意义的结果, 但研究方法较为简单.

活菌体共孵育并没有降低出芽率, 说明无代谢能力的益生菌不具备拮抗白假丝酵母菌的能力, 加之将培养上清调节至中性完全避免了pH值本身对于白假丝酵母菌的抑制, 因此抑制芽管形成、拮抗白假丝酵母菌感染的主要作用因子极可能为益生菌的代谢产物本身, 该结果与Noverr *et al*[12]对三株乳杆菌拮抗白假丝酵母菌的结果相似. 双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌及链球菌等乳酸细菌均可代谢产生大量短链脂肪酸(如乙酸、丙酸、丁酸等), 但是有研究显示, 乙酸, 丙酸及乳酸随着其pH值的中和逐渐失去抗真菌活性[13-14]; 丁酸则具有较强的免疫调节活性, 并且可通过抑制几丁质合成酶、破坏真菌细胞壁而阻止真菌发生形态改变[15], 即便在中性pH值下对于白假丝酵母菌的芽管形成也具有明显的阻断作用[12], 因此丁酸的抗真菌作用机制值得进一步深入研究. 结合我们后续的抑菌实验结果, 10株菌中仅2株芽孢杆菌的中性SCS可形成阳性抑菌圈, 其余均为阴性, Kim *et al*[16]的研究显示, 地衣芽孢杆菌可产生抗菌能力极强的苯乙酸, 直接杀死包括白假丝酵母菌在内的多种真菌, 由此可见, 芽孢杆菌对白假丝酵母菌的抑菌机制可能有别于乳酸菌.

当前, 针对传统抗真菌药物的毒副作用和真菌耐药性的增强, 开展医用微生态制剂抗真菌感染的机制研究, 对于拓展微生态药物的适应症、促进其在抗真菌感染中的运用具有积极意义. 我们首次将国内主要微生态药品的所有单菌株用于体外芽管抑制实验, 并发现微生态药物可以通过其代谢产物抑制试验芽管形成, 结果提示, 这可能是微生态药物拮抗肠道试验感染的机制之一.

4 参考文献

1 Dong Y, Wang BC, Zhang YX. Clinical and experimental study on treatment of infantile mycotic enteritis by jiechang mixture. *Zhongguo Zhongxiyijiehe Zazhi* 2001; 21: 419-421

2 邱美蕉. 婴儿霉菌性肠炎60例临床分析. 中国微生态学杂志 2001; 13: 345

3 李菊兰, 朱戎. 霉菌性肠炎治疗的探讨. 中国微生态学杂志 2005; 17: 147

4 黄斗芳. 大剂量丽珠肠乐胶囊治疗霉菌性肠炎36例疗效观察与分析. 江西医药 2002; 37: 192-193

5 van Burik JA, Magee PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 743-772

6 Hawser S, Islam K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 411-413

7 但国蓉, 袁静, 唐欢, 魏泓. 5种医用益生菌产品的微生物数量和种属分析. 中国药房 2006; 17: 530-532

8 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第1版. 北京: 科学出版社, 2001

9 Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 55-59

10 Suzuki K, Sasaki J, Uramoto M, Nakase T, Komagata K. Agromyces mediolanus sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for "Corynebacterium mediolanum" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2, 4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 88-93

11 Abe S, Satoh T, Tokuda Y, Tansho S, Yamaguchi H. A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 1994; 38: 385-388

12 Noverr MC, Huffnagle GB. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect Immun* 2004; 72: 6206-6210

13 Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarrondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertle T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by Lactobacillus paracasei subsp. paracasei strain M3. *Int J Food Microbiol* 2003; 87: 63-73

14 Lind H, Jonsson H, Schnurer J. Antifungal effect of dairy propionibacteria-contribution of organic acids. *Int J Food Microbiol* 2005; 98: 157-165

15 Hoberg KA, Cihlar RL, Calderone RA. Inhibitory effect of cerulenin and sodium butyrate on germination of Candida albicans. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 401-408

16 Kim Y, Cho JY, Kuk JH, Moon JH, Cho JI, Kim YC, Park KH. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by Bacillus licheniformis isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang. *Curr Microbiol* 2004; 48: 312-317

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2241-2246
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胃肠道间质瘤的临床病理分析和免疫组化特点

顾国利, 王石林, 任 力, 魏学明, 李德昌, 周晓武, 黄蓉蓉

顾国利, 王石林, 魏学明, 周晓武, 黄蓉蓉, 空军总医院普通外科 北京市 100036
任力, 李德昌, 空军总医院病理科 北京市 100036
通讯作者: 顾国利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院普通外科. kzggl@163.com
电话: 010-68410099-6302
收稿日期: 2006-06-15 接受日期: 2006-07-18

Histopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors

Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Li Ren, Xue-Ming Wei, De-Chang Li, Xiao-Wu Zhou, Rong-Rong Huang

Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Xue-Ming Wei, Xiao-Wu Zhou, Rong-Rong Huang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China
Li Ren, De-Chang Li, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China
Correspondence to: Guo-Li Gu, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China. kzggl@163.com
Received: 2006-06-15 Accepted: 2006-07-18

Abstract

AIM: To explore the histopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors (GIST).

METHODS: Immunohistochemistry was performed in GIST, for a panel of antibodies such as CD117, CD34, Vim, SMA, S-100 by SP staining methods. Clinical data and follow-up documents of 24 patients with GIST admitted from January 2000 to May 2006 were studied retrospectively.

RESULTS: There were 24 patients (males and 8 females) aged from 29 to 75 (mean 54.5 ± 13.5). The tumors were mainly located at the stomach, small bowel and rectum. The initial presentations were bellyache (33.3%), abdomen mass (25.0%) and gastrointestinal bleeding (20.8%) in the most cases. All patients received successful surgical resection of tumor and the total resection rate was 100%. The rate of recurrence and metastasis was 14.3% (3/21) after operation. The most cases were diagnosed after surgical resection. Tumor size varied from 2 to 16 cm (mean 6.6 cm). The cells were spindle-like, and the epithelioid cells were rare. The mitotic count was higher than 5/50HPF in 5 cases, in which the tumor sizes were over or equal to 5 cm in diameter, and cystification, hemorrhage or necrosis was observed in 4 cases. The mitotic count was 2-5/50HPF in 4 cases, in which the tumor sizes were 3-5 cm in diameter. Immunohistochemically, CD117, CD34 and Vim showed diffuse and strong expression, and the positive rates were 91.7%, 62.5% and 66.7%, respectively. S-100 was hardly present, and SMA was focally present or absent.

CONCLUSION: GIST predominantly occurs in the middle aged or old patients without specific manifestations, so early diagnosis is fairly difficult. Surgery remains the standard treatment for non-metastasis patients with GIST. The tumor cells have various kinds of types and different arrangements. Immunohistochemical staining is positive for CD117, CD34 and Vim, negative for S-100, and focal positive for SMA.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumors; Histopathology; Immunohistochemistry

Gu GL, Wang SL, Ren L, Wei XM, Li DC, Zhou XW, Huang RR. Histopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2241-2246

摘要

目的: 探讨胃肠道间质瘤(GIST)的临床病理和免疫组化特点.

方法: 回顾性分析我院收治的24例GIST患者的临床病理及随访资料, 并对其石蜡标本采用免疫组化SP染色法检测, 分析其免疫组化特点.

结果: 本组GIST发病年龄29-75(平均54.5±13.5), 男16例, 女8例, 主要发生在胃、小肠、直肠. 并多以腹部隐痛不适、腹部肿物、上消化道出血为首发症状, 全部患者进行积极外科治疗, 肿瘤切除率100%, 术后复发转移率为

■背景资料
GIST是最常见的消化道间叶性肿瘤, 其临床病理和免疫组化特点突出, 是目前消化道肿瘤研究的一个热点. GIST可见于各年龄段, 高峰为50-70岁, 其发生部位: 胃部60%-70%, 小肠20%-25%, 结直肠约5%. 以腹部隐痛、腹部肿物和消化道出血为主要表现, 无特征性临床表现. 因其发生于肌层并多向腔外生长, 故内镜活检的确诊率较低, 影像学检查虽能作出定位诊断; 但因其缺乏特异性影像表现, 很难作出定性诊断.

■**创新盘点**
本文在总结所诊治的GIST临床病理、随访资料的同时, 结合了免疫组化的基础研究, 就GIST的诊断治疗经验进行了总结, 对提高广大读者对该病诊断与治疗的认识有一定参考价值.

14.3%. 大多数病例为手术切除后确诊. 肿瘤大小从2-16 cm(平均6.6±3.9 cm). 基本病理组织形态为梭形细胞型, 上皮细胞型较少. 5例核分裂像>5/50HPF者其肿瘤直径均>5 cm, 其中4例伴有囊性变、出血或坏死. 4例核分裂像为2-5/50HPF者肿瘤直径在3-5 cm之间. 免疫组化染色CD117, CD34, Vim为弥漫强阳性, 阳性率分别为91.7%, 62.5%和66.7%. S-100阴性, SMA呈灶状阳性.

结论: GIST好发于中老年, 缺乏特异的临床表现, 早期诊断困难, 外科手术仍是未转移的GIST的首要治疗方式, 并且其肿瘤细胞形态多变, 排列方式多样, 免疫组化染色为CD117, CD34和Vim阳性, S-100阴性, SMA呈灶状阳性.

关键词: 胃肠道间质瘤; 临床病理; 免疫组化

顾国利, 王石林, 任力, 魏学明, 李德昌, 周晓武, 黄蓉蓉. 胃肠道间质瘤的临床病理分析和免疫组化特点. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2241-2246
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2241.asp

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是一组独立起源于胃肠壁间质干细胞的肿瘤, 由未分化或多能的梭形或上皮样细胞组成, 免疫组化多数表达CD117和(或)CD34[1]. 因其临床病理和免疫组化特点突出, 近年来GIST受到了人们的广泛关注并成为消化道肿瘤研究的一个热点. 我院2000-01/2006-05共收治GIST 24例, 我们采用免疫组化SP染色法对其石蜡标本进行检测并结合临床病理及随访资料的回顾性分析, 探讨GIST的临床病理和免疫组化表达特点及其生物学行为.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2000-01/2006-05收治GIST患者的肿瘤组织石蜡标本24例. Leica RM2135病理切片机、LAB vision Autostainer360自动染色仪系统、Olympus Bx51光学显微镜、Olympus Dp70图像采集分析仪. 试剂一抗均为鼠(或兔)抗人mAb, EDTA抗原修复缓冲液, DAB和AEC显色剂. 以上抗体、试剂盒及显色液均购于北京中杉金桥生物科技有限公司.

1.2 *方法* 对24例GIST患者的临床病理及随访资料进行回顾性分析. 将其肿瘤组织标本经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋切片(厚度4 μm), HE染色, 光镜观察. SP染色法检测CD117, CD34, SMA, S-100, Vim的表达情况, 用已购阳性切片作阳性对照, PBS代替一抗作为阴性对照, DAB显色, 苏木精复染, 显微镜下观察结果, 染色步骤和抗体稀释度均按产品说明书进行. 结果判定: 结构清晰, 着色明显高于背景, 在相应部位出现棕黄色颗粒者为阳性细胞; 不着色或显色强度与背景无差别者为阴性细胞. 每例切片随机选择5-10个高倍视野(×400), 统计阳性细胞数, 取其平均值; 无着色或<10%为阴性, 10%-25%为+, 26%-50%为++, >50%为+++.

统计学处理 应用SPSS 12.0统计软件进行统计分析. 数据用mean±SD表示, 采用计数资料的χ^2检验及Spearman等级相关分析, $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 *临床资料(表1)* 本组患者24例, 男16例, 女8例. 男女比例2∶1. 年龄29-75(中位54.5±13.5)岁; 其中≥50岁者15例(占62.5%). 病灶位于胃14例(58.3%)、小肠5例(20.8%)、直肠4例(16.7%)、结肠1例(4.2%). 肿瘤直径2-16(平均6.6±3.9)cm, 其中<3 cm 3例, 3-5 cm 10例, >5 cm 11例. 发病至就诊时间为1 wk-1.5 a, 平均5.4 mo. 临床首发表现: 腹部隐痛不适8例, 腹部肿物6例, 消化道出血5例, 上腹部饱胀3例, 体检或术中探查发现2例(无症状). 伴随症状有贫血、乏力、体质量减轻等. 除1例患者在术中探查被发现外, 其他均行内镜检查, 发现黏膜下肿物12例, 黏膜溃疡性肿物6例, 黏膜肿物出血5例. 内镜下组织活检确诊5例(20.8%), 其余为黏膜慢性炎. 20例行腹部CT检查均发现占位性病变, 考虑间质瘤9例、胃肠道癌6例、淋巴瘤5例. 14例行X线造影发现胃肠道腔内充盈缺损12例. 均行手术切除治疗, 其中胃大部切除术10例, 胃部分切除术3例, 全胃切除术1例, 小肠部分切除5例, Miles术2例, 直肠前切除2例, 左半结肠切除1例. 无手术死亡, 1例发生骶前静脉丛大出血, 经髂内动脉结扎、宫纱填塞后缓解, 其余无术后并发症. 本组有3例术后失访(12.5%), 其余患者采用门诊复查、电话及信访等方式随访, 时间1 mo-6 a. 21例患者中术后没有伊马替尼(Imatinib mesylate, 商品名Gleevec或Glivec格列卫)治疗, 有10例行艾迪注射液、复方斑蝥胶囊等中药治疗. 1例术后1 a复发再次手术切除, 1例死于

表 1 GIST患者的临床病理及免疫组化资料

编号	性别	年龄(岁)	首发症状	病史	部位	细胞形态	肿瘤大小(cm)	免疫组化					治疗	随访结果
								CD117	CD34	Vim	SMA	S-100		
1	女	72	上腹隐痛	1.5 a	胃	上皮细胞	4×4	++	–	+	–	–	胃部分切除	72 mo健在
2	男	45	上腹隐痛	1 mo	胃	梭形细胞	4×3	+++	–	–	–	–	胃大部切除	术后失访
3	女	65	上腹隐痛	1.5 a	胃	上皮细胞	3×3	+	–	+++	–	–	胃大部切除	64 mo健在
4	男	35	上腹饱胀	1 a	胃	梭形细胞	15×15 出血囊性变	++	++	+	–	–	全胃切除	39 mo后死于腹腔复发
5	男	72	上腹隐痛	1 a	胃	混合细胞	5×5	++	–	–	–	–	胃大部切除	术后失访
6	男	46	腹部肿物	3 mo	小肠	梭形细胞	11×10 出血囊性变	+++	+	+++	–	–	小肠部分切除	66 mo健在
7	男	61	上腹饱胀	6 mo	胃	混合细胞	2×2	++	++	+	++	–	胃大部切除	14 mo健在
8	女	75	腹部肿物	3 mo	胃	梭形细胞	5×5	++	++	–	–	–	胃部分切除	1 mo健在
9	女	74	便血	10 d	小肠	混合细胞	4×4	+	++	+++	–	–	小肠部分切除	13 mo健在
10	女	60	便血	7 d	胃	梭形细胞	2×2	+++	++	+++	–	–	胃部分切除	38 mo健在
11	男	32	便血	7 d	小肠	梭形细胞	8×8	+++	+	+++	–	–	小肠部分切除	36 mo健在
12	男	54	腹部肿物	4 mo	小肠	梭形细胞	8×7	+++	+	++	+++	–	小肠部分切除	19 mo健在
13	女	70	上腹隐痛	4 mo	胃	梭形细胞	16×16 出血囊性变	–	++	++	–	–	胃大部切除	4 mo健在
14	男	45	上腹隐痛	1 a	胃	梭形细胞	2.5×2.5	+	++	–	–	–	胃大部切除	10 mo健在
15	男	46	腹部肿物	2 mo	直肠	梭形细胞	10×6	+++	+++	–	–	–	Miles	9 mo健在
16	男	41	便血	8 d	小肠	梭形细胞	6×6	+++	+	+++	–	–	小肠部分切除	9 mo健在
17	女	60	腹部肿物	1 mo	结肠	梭形细胞	6.5×6	+	++	+++	–	–	左半结肠切除	25 mo健在
18	男	56	便血	1 mo	胃	梭形细胞	4.5×4	++	++	+++	–	–	胃大部切除	24 mo健在
19	男	52	上腹饱胀	1 mo	胃	梭形细胞	5×3.5	+	–	++	–	–	胃大部切除	40 mo健在
20	男	29	腹部隐痛	6 mo	直肠	梭形细胞	10×10 出血囊性变	+	++	+++	–	–	直肠前切除	39 mo健在
21	男	47	腹部肿物	1 a	胃	梭形	5×5	+	–	+++	–	–	胃大部切除	62 mo健在
22	男	69	无症状, 术中探查发现		胃	混合细胞	3×3	–	–	–	–	–	胃大部切除	2 mo后死于其他疾病
23	男	50	腹部隐痛	1 mo	直肠	梭形细胞	10×8	+++	–	–	–	–	直肠前切除	术后失访
24	女	51	无症状, 体检发现		直肠	梭形细胞	0×6	+++	–	–	–	–	Miles	术后1 a复发, 再次手术 48 mo后死于肝转移

■应用要点

GIST是最常见的消化道间叶性肿瘤, 其临床病理和免疫组化特点突出, 本文通过对所经治GIST病例的临床病理资料的总结和其免疫组化的染色, 以及结合国内外同行文献的学习, 归纳出GIST的临床病理和免疫组化特点, 以期临床医生在一线工作中提高对该病的认识和诊治技能, 加强随访和复查工作, 避免误诊误治.

■名词解释
胃肠道间质瘤(GIST): 是一组独立起源于胃肠壁间质干细胞的肿瘤, 由未分化或多能的梭形或上皮样细胞组成, 免疫组化多数表达CD117和(或)CD34. 多数是由于人类染色体4q[12-13]区的c-Kit基因第11外显子发生突变所致, 极少数是由第9, 13, 14, 17外显子上发生突变所致.

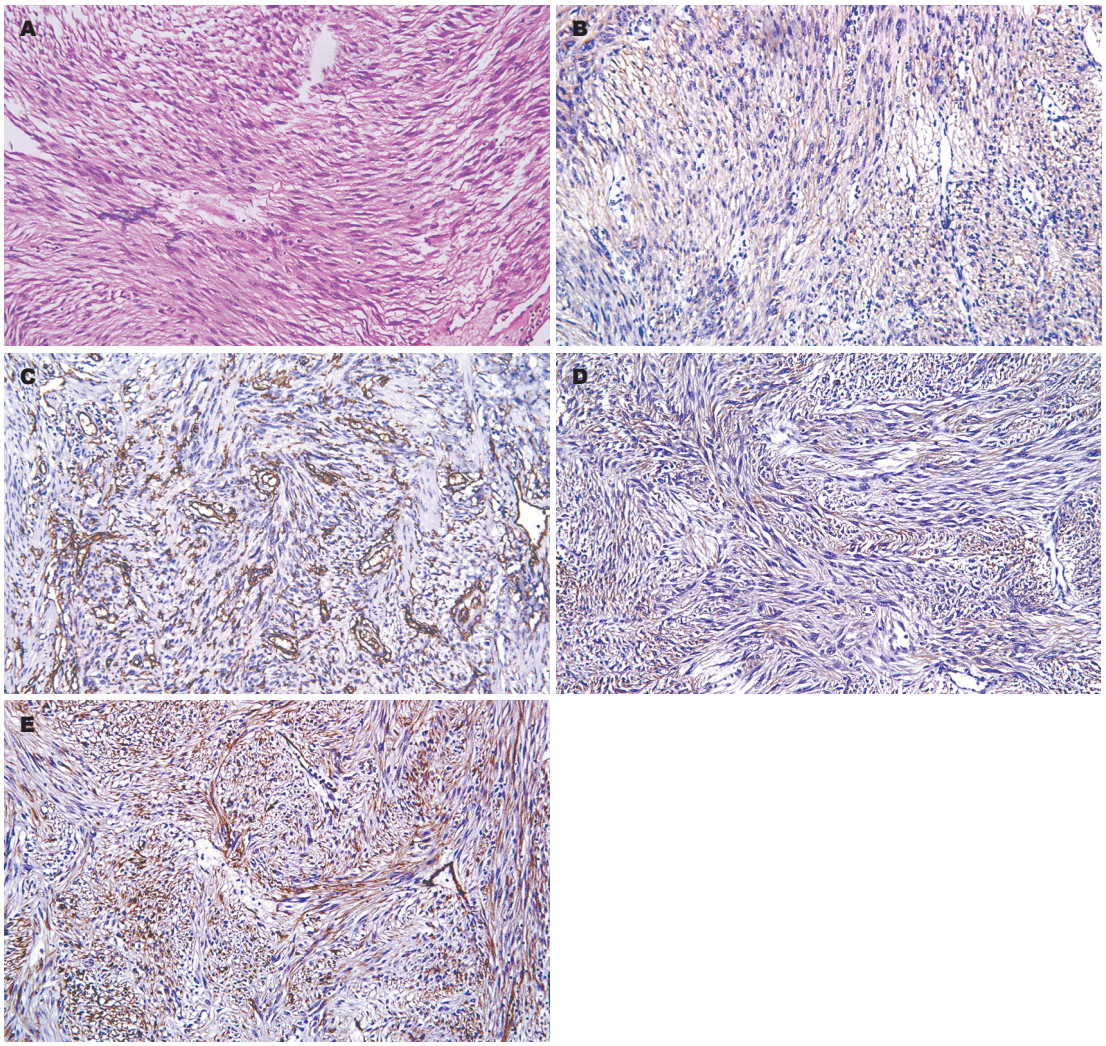


图 1 GIST形态学特点和免疫组化结果. A: GIST梭形细胞呈交叉束状排列(HE, ×200); B: CD117染色, 阳性局限于胞膜/胞质, 呈棕褐色, 形成条状或环状, 呈弥漫性分布(SP, ×200); C: CD34染色, 阳性局限于胞膜, 呈棕褐色, 形成条状, 呈弥漫性分布(SP, ×200); D: Vim染色, 阳性局限于胞质, 呈棕褐色, 形成条状或环状, 呈弥漫性分布(SP, ×200); E: SMA染色, 阳性局限于胞质, 呈棕褐色, 形成条状或环状, 呈局灶性分布(SP, ×200).

其他疾病, 2例死于腹腔复发、肝脏转移, 其余健在. 21例患者中完成3 a随访10例(47.6%), 完成5 a随访5例(23.8%).

2.2 病理结果(表1) GIST肿瘤细胞基本形态为梭形细胞和上皮样细胞. 多数梭形细胞界限不清, 胞质丰富, 淡染, 轻度嗜酸或略嗜碱, 多交叉束状、旋涡状、席纹状排列(图1A). 上皮样细胞多呈弥漫片状、束状或巢状排列, 胞质可嗜酸或嗜碱或二者都有, 细胞界限清楚. 依据梭形细胞和上皮样细胞的比例可分为上皮样细胞型(上皮样细胞>50%)、梭形细胞型(上皮样细胞<10%)和混合型(上皮样细细胞10%-50%). 本组有梭形细胞型18例(75.0%)、混合细胞型4例(16.7%)、上皮样细胞型2例(8.3%). 核分裂像>5/50 HPF者5例, 其肿瘤直径均>5 cm, 其中4例伴有囊性变或出血. 核分裂像在2-5/50 HPF者4例, 肿瘤直径3-5 cm, 其中上皮样细胞型和梭形细胞型各2例. CD117阳性22例(91.7%)(图1B)、CD34阳性15例(62.5%)(图1C), CD117和CD34共同阳性表达14例(58.3%), 多数病例的CD117阳性强度和范围高于CD34. Vim阳性16例(66.7%)(图1D), CD117, CD34, Vim多呈弥漫强阳性. SMA局灶阳性表达2例(8.3%)(图1E), S-100均无阳性表达.

3 讨论

GIST是最常见的消化道间叶性肿瘤[1-2], 约占消化道恶性肿瘤的2.2%. 本组占同期收治的胃肠道恶性肿瘤的2.8% (24/868). 在1983年Mazur *et al*[3]提出GIST的概念以前, 其常被诊断为胃肠道平滑肌瘤、平滑肌肉瘤或神经鞘瘤. 目前认为GIST起

源于消化道间叶组织的、具有多向分化潜能的间质干细胞, 是由于人类染色体4q[12-13]区的c-Kit基因第11外显子发生突变所致[4-5], 极少数是由第9, 13, 14, 17外显子上发生突变所致[6-7]. GIST可见于各年龄段, 高峰为50-70岁, 无性别显著差异[1-2,8-14]. 本组男女比例2∶1, 可能是因例数较少所致. 本组中位发病年龄54.5岁, ≥50岁者占62.5%, 差异显著(P<0.05). 按GIST发生率的高低排序依次为胃部60%-70%、小肠20%-25%、结直肠约5%[1-2,8-14]. 本组发生部位也以胃、小肠、直肠居多, 结肠较少. 本组患者以腹部隐痛不适、腹部肿物和消化道出血为主要表现, 无特征性临床表现. 有23例行内镜检查虽均发现病变, 但镜下病理确诊率只有20.8%. 原因: GIST发生在消化道肌层, 主要在肌壁内或向浆膜面生长, 内镜多无法在消化腔内取到肿瘤组织. 即使其向腔内生长引起黏膜溃疡、出血、坏死, 钳取肿瘤组织的阳性率也较低. CT、超声、X线造影等影像学检查虽能发现肿瘤并作出定位诊断, 但因GIST缺乏特异性影像表现, 很难作出定性诊断. 因此手术切除活检和免疫组化检查仍是确诊的主要方法. 目前伊马替尼价格昂贵, 尚未在临床普及, 其用于GIST的治疗国内报道较少. 本组术后均未行伊马替尼治疗, 仅有部分患者行中药等治疗, 在并非全部患者完成5 a随访的情况下, 其3 a, 5 a生存率仍较高. 因此, 对于GIST应积极手术治疗, 特别是首次手术时注意完整切除. 对于有恶性倾向者应行根治性切除. 国内外文献[1-2,8-15]报道: 恶性GIST完全切除肿瘤病灶者, 5 a生存率35%-54%, 不完全切除者为8%. 本组显示, 原发肿瘤较小、恶性程度较低并行完整切除的病例预后较好, 而原发肿瘤较大者其恶性程度增加、完整切除的机会减少, 故复发的机会增加, 使预后变差. 因对GIST的生物学行为并未完全掌握, 所以对于直肠GIST的手术方式目前仍有争议, 根治性手术可能造成患者永久性结肠造口、性功能障碍、生活质量降低, 而姑息性切除可能使肿瘤复发风险增大、生存期缩短. 因此术前需与患者仔细沟通探讨、共同制订手术方式, 以免引发纠纷. 本组2例肿瘤较小且位置较高者行直肠前切除术, 另2例行Miles的原因是肿瘤较大、核分裂像多、有恶性倾向且位置较低并产生不全梗阻症状, 其中1例肿瘤侵犯骶前筋膜, 术中剥离时发生骶前静脉丛大出血, 经双侧髂内动脉结扎、填塞宫纱压迫止血才得以控制出血. 术后1 wk后分次拔出宫纱, 患者未再出血, 恢复正常出院. 目前, 绝大多数学者[16-28]认为CD117, CD34联合应用是诊断GIST的最有效方法. CD117是诊断GIST的一项主要指标但不是唯一标准, 必须结合CD34或其他免疫组化标记, 才能更有效与其他肿瘤鉴别[22-30]. 本组CD117阳性率为91.7% (P<0.05), CD34阳性率70.8%, 与文献[16-28]报道一致. Vim阳性表明肿瘤起源于间叶组织, 本组Vim阳性率66.7%, 高于CD34, 因此Vim也是诊断GIST的一个重要辅助指标. 本组结果显示CD117, CD34, Vim, SMA和S-100 5项指标的表达与患者年龄、性别、肿瘤部位及大小和预后均无相关性, 并且这5项指标内部之间的阳性表达也无相关性, 因此他们在GIST中的表达意义仅限于诊断, 对GIST的预后判断及治疗方式无指导意义.

■**同行评价**

因其临床病理和免疫组化特点突出, 近年来GIST受到了人们的广泛关注并成为消化道肿瘤研究的一个热点, 本文研究临床内容为国内外研究的热点内容, 研究设计合理, 有科学研究价值和临床指导价值.

4 参考文献

1 顾国利, 王石林, 魏学明. 胃肠道间质瘤基础研究与临床进展. 空军总医院学报 2004; 20: 99-105

2 杜春燕, 师英强. 胃肠道间质瘤诊治进展. 中国实用外科杂志 2006; 26: 158-160

3 Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519

4 Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 53-60

5 Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 791-795

6 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710

7 Andersson J, Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Aman P, Kindblom LG. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 15-22

8 魏春首, 沈茂荣, 王文强. 32例胃间质瘤的临床资料分析. 现代中西医结合杂志 2005; 14: 41-42

9 杜春燕, 师英强, 蔡国响, 蔡三军. 46例胃间质瘤的临床诊治. 中国癌症杂志 2005; 15: 193-194

10 邓志刚, 李波, 李敬东, 严茂林, 栗靖, 霍永忠. 胃肠道间质瘤136例诊治及预后分析. 腹部外科 2006; 19: 34-36

11 席吕刚, 蔡端. 胃肠道间质瘤35例诊治分析. 中国实用外科杂志 2005; 25: 151-153

12 梁毕科, 韩少良. 胃肠道间质瘤的临床特点与外科治疗. 医学综述 2006; 12: 98-100

13 叶金明, 瞿丽, 施政. 胃肠间质瘤37例诊治分析. 浙江

临床医学 2005; 7: 51-52
14 石素胜, 孙耘田, 白月奎, 邵永孚. 胃肠道间质瘤多因素预后分析. 诊断病理学杂志 2006; 13: 21-25
15 Crosby JA, Catton CN, Davis A, Couture J, O'Sullivan B, Kandel R, Swallow CJ. Malignant gastrointestinal stromal tumors of the small intestine: a review of 50 cases from a prospective database. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 50-59
16 温建成, 黄小萍, 苏少雪, 王延红, 刘俊斌, 蔡岳华. 18例胃肠道间质瘤临床病理研究及免疫组化分析. 基层医学论坛 2006; 10: 291-293
17 张兴义, 孙梅, 王荣有. 22例胃肠道间质瘤临床病理及免疫组织化学分析. 中国实验诊断学 2005; 9: 94-97
18 赵峰, 王振华, 李依群, 柴敏秀. 43例胃肠道间质瘤临床及病理特点. 肿瘤研究与临床 2005; 17: 117-119
19 曾运红, 罗殿中, 黄应桂. 45例胃肠道间质瘤的临床病理和免疫组化分析. 广东医学 2006; 27: 199-201
20 罗文军, 冷志, 易永芬, 唐博, 李圆圆. 51例胃肠道间质瘤的临床和病理研究. 重庆医科大学学报 2005; 30: 98-101
21 李潮, 宋丁. 67例胃肠道间质瘤临床病理及免疫组化研究. 中国实验诊断学 2006; 10: 250-252
22 严树柏, 王玉玲, 宋曙, 张铁流. c-kit在胃肠道间质瘤中的表达及临床意义. 陕西医学杂志 2005; 34: 311-313
23 赵洁. 胃肠道间质瘤56例病理免疫组化与临床. 实用医技杂志 2005; 12: 2039-2040
24 胡静姿, 刘惠敏, 李玉莉, 何金, 徐毅. 胃肠道间质瘤CD117、CD34、Ki-67的表达及其与临床病理因素和危险度的相关性. 第二军医大学学报 2005; 26: 798-801
25 穆林菁, 楼善贤, 朱寿田, 刘庆伟. 胃肠道间质瘤87例临床病理分析. 肿瘤研究与临床 2006; 18: 106-107
26 胡静姿, 刘惠敏, 李玉莉, 何金, 徐毅. 胃肠道间质瘤中CD117, CD34和Ki-67的表达及其与危险度的关系. 中国肿瘤临床 2005; 32: 834-836
27 商少宏, 张海萍, 王淑真. 消化道间质瘤的临床病理分析及免疫组织化学观察. 福建医科大学学报 2005; 39: 188-191
28 孙梅, 王玉新, 孙亚欣, 李东复. 胃肠道间质瘤的组织病理学和免疫组织化学特点. 吉林大学学报(医学版) 2005; 31: 918-920
29 项一宁, 高冬霞, 王玉萍, 张伟, 郑杰, 吴秉铨. 胃肠道间质瘤诊断中CD117表达检测的标准化及其免疫组织化学技术. 中华病理学杂志 2005; 34: 50-52
30 项一宁, 高冬霞, 贺慧颖, 王玉萍, 张伟, 郑杰. CD117阴性的胃肠道间质瘤的超微结构特点及基因突变检测. 中华病理学杂志 2006; 35: 73-76

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

•消息•

2006年即将召开的国际会议

Internal Medicine: Gastroenterology
22 July 2006-1 August 2006
Amsterdam
Continuing Education Inc
jbarnhart@continuingeducation.net

7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association
3-7 September 2006
Edinburgh
Edinburgh Convention Bureau
convention@edinburgh.org
www.edinburgh.org/conference

World Congress on Controversies in Obesity Diabetes and Hypertension
25-28 October 2006
Berlin
comtec international
codhy@codhy.com
www.codhy.com

XXX Panamerican Congress of Gastroenterology
11-16 November 2006
Cancun
www.panamericano2006.org.mx

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2247-2250
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

新辅助化放疗在局部进展期低位直肠癌保留肛门括约肌的作用

罗 琪, 张颂恩, 魏黎煜

罗琪, 张颂恩, 魏黎煜, 厦门大学附属中山医院 福建医科大学厦门中山医院普外科 福建省厦门市 361004
罗琪, 厦门大学附属中山医院博士, 教授, 主要从事胃肠道肿瘤、乳腺肿瘤的诊治.
通讯作者: 罗琪, 361004, 福建省厦门市湖滨南路209号, 厦门大学附属中山医院普外科. luoqi@medmail.com.cn
电话: 0592-2292042
收稿日期: 2006-05-29 接受日期: 2006-06-19

Role of sphincter preserving surgery with neoadjuant chemoradiotherapy for locally advanced low rectal cancer

Qi Luo, Son-En Zhang, Li-Yu Wei

Qi Luo, Son-En Zhang, Li-Yu Wei, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Correspondence to: Dr. Qi Luo, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital of Xiamen University, 209 Hubin South Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. luoqi@medmail.com.cn
Received: 2006-05-29 Accepted: 2006-06-19

Abstract

AIM: To evaluate the role of the sphincter preserving surgery with neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced low rectal cancer.

METHODS: Forty-two patients with T3 and T4 low rectal cancer were treated by pre-operative radiotherapy to pelvis, 2 Gy daily up to 40-46 Gy in 4 weeks concomitantly with oral administration of capecitabine (CAP) at 1250 mg/m^2 bid for 10 weeks (group A). Twenty-one patients were treated by the same chemoradiotherapy after operation (group B).

RESULTS: Neoadjuvant chemoradiotherapy (NCR) was successfully completed in group A. Among the 42 patients, tumor lesions disappeared in 5 cases, so they didn't receive operation. Curative resection was carried out in the remaining 37 patients, of which 33 received the sphincter-saving resection (SSR) and 4 received abdomino-perineal resection (APR). The rate of sphincter preservation was 89.2% in group A. Of the 21 patients in group B, 11 received SSR and 10 received APR. The rate of sphincter preservation was 52.4% in group B.

CONCLUSION: NCR shows high efficacy in tumor down-staging and shrinkage of tumor mass, and improves the resection rate and sphincter preservation.

Key Words: Rectal cancer; Neoadjuant chemoradiotherapy; Sphincter preserving resection

Luo Q, Zhang SE, Wei LY. Role of sphincter preserving surgery with neoadjuant chemoradiotherapy for locally advanced low rectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2247-2250

摘要

目的: 探讨新辅助化放疗在局部进展期低位直肠癌保留肛门括约肌中的价值.

方法: 2002-10/2006-02 T3, T4期低位直肠癌患者63例分为A组42例, 给予放疗40-46 Gy/20-23次, 5次/wk, 2 Gy/次, 同时给予卡培他滨1250 mg/(m^2·d), 分2次口服, 从放疗开始连续服至手术, 放疗结束后休息6 wk进行手术; B组21例, 明确诊断后手术, 术后给予放化疗.

结果: A组按计划完成新辅助化放疗, 其中5例肿瘤完全消失, 未手术. 37例施行根治性手术, 其中33例行保留肛门括约肌手术, 4例行腹会阴切除术, A组保留肛门括约肌率为89.2%. B组21例施行根治性手术, 其中11例行保留肛门括约肌手术, 10例行腹会阴切除术, 保留肛门括约肌率为52.4%.

结论: 新辅助治疗能有效地使肿瘤降期缩小, 使肿瘤切除率和保留肛门括约肌率明显增加.

关键词: 直肠癌; 新辅助化放疗; 保留肛门括约肌术

罗琪, 张颂恩, 魏黎煜. 新辅助化放疗在局部进展期低

■背景资料
在低位直肠癌患者的治疗中, 如何既能保证根除性切除术的效果, 又能保留肛门括约肌功能, 提高术后生活质量, 一直是外科医生们的追求目标.

■研发前沿
新辅助治疗能有效地使肿瘤降期缩小, 使肿瘤切除率和保留肛门括约肌率明显增加.

■相关报道
2004年新英格兰医学杂志报道了德国多中心随机对照研究成果, 发现相比于术后化放疗, 术前化放疗更有助于控制局部病灶以及毒性较低.

■创新盘点
术前化放疗可降低直肠癌的TN分期, 本文创新点在于其提高了肿瘤的切除率和保留肛门括约肌的可行性.

位直肠癌保留肛门括约肌的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2247-2250
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2247.asp

0 引言

低位直肠癌是大肠癌中最好发、最难治、疗效最差的一类. 随着手术技术和手术器械的发展, 直肠癌保留肛门括约肌的比例不断提高[1-3]. 但低位局部进展期直肠癌保留肛门括约肌的手术仍是目前外科治疗的难点. 为了使更多的低位局部进展期直肠癌患者生活质量的提高, 保住肛门[4], 我科2002-10/2006-02对局部进展期低位直肠癌患者42例先施行新辅助化放疗后再行经腹直肠癌切除, 经肛门结肠肛管吻合的保留肛门括约肌的手术, 叙述如下.

1 材料和方法

1.1 材料 局部进展期低位直肠癌63例, 男39例, 女24例; 年龄16-72(平均52±0.5)岁. 患者均经直肠指诊、结肠镜、腹部B超和盆腔CT扫描, 部分患者经直肠腔内B超等检查, 临床判断为T_3, T_4期的经病理学检查确诊. 按2∶1比例分组. 一组行术前新辅助化放疗后手术, 术后常规化疗6周期(A组). 二组确诊后即行手术, 术后常规化疗6周期(B组). 肿瘤下缘距肛缘5-6.5(平均5.9)cm. 肿瘤T_3期51例, T_4期12例(按照国际TNM分期法[5]), 溃疡型36例, 隆起型22例, 绒毛状腺瘤癌变5例(按中国抗癌协会制定的大肠癌大体分型), 肿瘤细胞中高分化(Ⅰ-Ⅱ级)53例, 低分化(Ⅲ级)10例.

1.2 方法 每日给予卡培他滨1250 mg/m^2. 化疗(瑞士罗氏公司提供)分2次口服, 自放疗开始不间断口服至手术. 术前放射治疗剂量为40-46 Gy, 分次剂量为1.8-2 Gy/d, 每周5 d, 休息2 d, 共4-5 wk完成. 放疗结束后休息6 wk再决定是否手术. 放疗后5 wk复查直肠指诊、结肠镜、腹部B超、盆腔CT、大肠癌肿瘤标志物(CEA, CA19-9等)、部分患者直肠腔内B超. 根据结果按WHO标准对治疗结果进行评定, 确定手术方案. 本组病例不论是术前辅助化放疗组, 还是先手术再化疗组, 手术操作无论是保留肛门括约肌或腹会阴切除术均按TME操作规范进行, 其中A组21例行双吻合器(美国强生公司提供)吻合保留肛门括约肌, 12例按Parks法行肛门结肠吻合保留肛门括约肌.

统计学处理 用SPSS 11.5统计分析软件包进行分析处理, 统计分析方法为χ^2检验和t检验.

2 结果

新辅助化放疗组(A组)术前经10 wk的辅助化放疗, 当术前再次检查时(包括直肠指诊、纤维结肠镜、盆腔CT、部分患者直肠腔内B超等检查)发现5例肿瘤完全消失, 未行手术继续给予随访观察. 余37例施行根治性肿瘤切除, 其中33例行保留肛门括约肌手术, 4例行腹会阴切除术, 新辅助化放疗组保肛率89.2%. 未行新辅助化放疗组(B组), 21例行根治性肿瘤切除, 其中11例行保留肛门括约肌手术, 10例行腹会阴切除术, B组保肛率52.4%. A组病理结果与新辅助化放疗前比较, 达CR(肿瘤完全消失)6例, 加上经新辅助化放疗肿瘤完全消失未手术的5例, 故达CR的为11例(26.2%), PR(肿瘤部分缓解)22例(占52.4%), SD(病情稳定)9例, ORR(总有效率)为78.6%. 病理分期为$T_1N_0$15例, $T_2N_0$15例, $T_3N_0$4例, $T_{2-3}N_1$3例. B组病理分期$T_3N_0$13例, $T_{2-3}N_1$8例. 两组其他资料基本相同有可比性.

A组在化疗期间2例出现轻度的手足综合征, 1例腹泻经处理均完成新辅助治疗, 全组无围手术期死亡, 均获随访, 随访时间2-40(中位18)mo. A组在随访期间发现局部复发2例, 肝转移1例, 肺转移1例, 复发转移率为10.8%. 随访期间暂无死亡, 故无复发生存或无瘤生存率为89.2%. B组随访期间发现局部复发3例, 肝转移1例, 腹腔内广泛转移2例, 复发转移率为28.6%, 无复发生存或无瘤生存率为71.4%, 随访期间死亡2例, 死亡率为9.5%. A, B组无复发生存率比较t = 0.813, P<0.01有非常显著差异.

3 讨论

我国直肠癌的好发部位以直肠下段居多,约占74.1%[6-7]. 近年来, 肠癌的手术效果仍不满意. 术后5 a生存率仍徘徊在50%左右[8]. 新辅助化疗可以不同程度的减轻肿瘤负荷, 减轻组织反应性水肿, 使肿瘤缩小临床分期降低, 因此已受到越来越多的重视[9]. 外科手术仍是当今结直肠癌的主要治疗手段, 术后局部复发与远处转移是导致治疗失败的两大主要原因. 术后局部复发在低位直肠癌尤为突出, 即使遵循TME原则进行手术后, 也还有<10%的局部复发率[10]. 引起局部复发的主要因素之一是肿瘤局部浸润深度与病期. 如何进一步提高治疗效果, 减少局部复发和转移? 新辅助化放疗, 能使原来属于中晚期的病变转变为早中期病变. 肿瘤缩小, 切除率和保肛率均提高, 复发率随之降低, 生存率亦

有所提高[11-12]. 本组病例经新辅助治疗, 收到了较好的疗效. 在化疗期间2例出现轻度的手足综合征, 1例腹泻经处理均完成新辅助治疗, 全组无围手术期死亡. 89.2%(33例)保留肛门括约肌, 随访2-40 mo局部复发2例. 出现肝转移1例, 肺转移1例. 病理判断达CR占26.2%(11例), PR占52.4%(22例), ORR78.6%; 病理分期从治疗前的T_3-T_4期变为T_1-T_3期. 而未行新辅助治疗组保留肛门手术仅52.4%, 随访局部复发转移率为28.6%(6/21), 死亡2例. 两组无复发转移生存率比较t = 0.813, P<0.01有非常显著差异, 证实新辅助治疗对进展期直肠癌能达到降期和降低局部复发的目的.

新辅助放疗是直肠癌主要辅助治疗手段之一[13], **他能很好地预防直肠癌局部复发, 提**高手术切除率, 增加保肛率, 提高生存质量和生存率[14-15]. 新辅助放疗是达到肿瘤降期很有效的方法. 放射线对癌细胞的作用包括直接作用和间接作用[16]. 直接作用的靶点是DNA分子链, 导致细胞核内DNA的单链断裂, 双链断裂. 间接作用是射线和组织细胞内的原子或分子相互作用产生的自由基, 造成DNA的间接损伤. 照射所致细胞死亡的敏感部位在核内, 术前放疗使肿瘤退缩. 降低分期的另一主要原因是诱导直肠癌细胞增加凋亡, 明显抑制癌细胞的增殖[17]. 癌细胞增殖速度越快、增殖比率越大放射治疗效果越好. 新辅助放疗相对术后放疗最主要区别在于术前放疗可使肿瘤缩小、降期, 更有利于手术操作, 可使非常低位的肿瘤施行保留肛门括约肌手术[18]. 因而术前放疗的生存率明显高于术后放疗; 同时术前放疗可使保留肛门括约肌手术的成功率明显提高, 改善生活质量[19]. 术前放疗要注意两点: (1)剂量要适度, 剂量太大影响手术, 剂量太小达不到肿瘤降期的目的. 我们使用的剂量是40-46 Gy, 分次剂量为1.8-2 Gy/d, 每周5 d, 休息2 d, 共4-5 wk完成. 此剂量属中等剂量, 患者耐受好, 无明显不良反应, 全组患者均完成放疗; (2)结束放疗后需休息4-6 wk再手术[20], 目的是待放射的组织反应消退, 同时充分发挥放射治疗对肿瘤的杀伤作用, 达到肿瘤缩小、**降期的目的. 过早地进**行手术可能增加手术困难和手术并发症. 我们的经验是放疗后6 wk手术比4 wk好, 降低了手术操作的难度, 提高了保肛手术的成功率.

近年来的研究, 从理论上和实践上证实了下段直肠癌保留肛门括约肌手术的合理性和可行性[21]. 手术技术和器械的改进和发展, 使直肠癌保留肛门括约肌手术从40%左右增至目前的70%左右. 辅助治疗最大限度提供了直肠癌根治的机会. 直肠癌根治切除必须遵循公认的TME操作规范[22-25], 在保证切净局部病灶和区域淋巴结的前提下, 切除肿瘤远侧2-3 cm的正常肠管. 有些病人切除肿瘤后盆底肌上残留的直肠不足2 cm或虽长于2 cm但无法使用双吻合器行保留肛门括约肌手术. 我们应用1972年Parks[26]提出的经腹直肠癌切除经肛门结肠肛管吻合的术式, 使12例超低位直肠癌患者成功地保留肛门括约肌. 实践证明此术式可以弥补双吻合器技术在低位直肠癌保留肛门括约肌手术中的不足, 术后经肛门功能锻炼, 术后”新直肠”逐渐代偿性扩张, 肛门功能在6-12 mo后可基本恢复正常. 本研究表明, 局部进展期低位直肠癌采用新辅助化疗与放疗联合应用可使疗效发挥至最大. 虽然术后肠道功能会受到一定的影响, 并发症可能会有一定的增加, 但肿瘤根治性切除率明显提高, 术后局部复发率明显降低, 对局部进展期低位直肠癌治疗是一种较好的治疗方法.

■应用要点
临床中对中晚期低位直肠癌更倾向于推行术前化放疗, 而不是术后化放疗.

4 参考文献

1 Khalil el-SA, El-Zohairy M, El-Shahawy M. Sphincter sparing procedures: is it a standard for management of low rectal cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 2004; 16: 210-215

2 Chin CC, Yeh CY, Huang WS, Wang JY. Clinical outcome of intersphincteric resection for ultra-low rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 640-643

3 Law WL, Chu KW. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: a prospective evaluation of 622 patients. *Ann Surg* 2004; 240: 260-268

4 Rullier E, Laurent C, Bretagnol F, Rullier A, Vendrely V, Zerbib F. Sphincter-saving resection for all rectal carcinomas: the end of the 2-cm distal rule. Ann Surg 2005; 241: 465-469

5 Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-1804

6 Li M, Gu J. Changing patterns of colorectal cancer in China over a period of 20 years. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4685-4688

7 郁宝铭, 沈耀祥, 李铭, 蒋家, 周锡庚. 低位直肠癌的外科治疗. 中华外科杂志 1995; 33: 164-166

8 顾晋, 詹元成, 姚云峰. 结直肠癌新辅助化疗. 中国实用外科杂志 2005; 25: 264-265

9 Kendal WS, Stern HS. Preoperative chemoradiation for rectal cancer: kudos and a caution. *Can J Surg* 2004; 47: 87-89

10 郁宝铭, 吴唯勤. 新辅助化放疗与TME联合治疗局部进展期低位直肠癌. 中国实用外科杂志 2005; 25:

■名词解释
新辅助治疗的含义是在明确的局部治疗前的细胞减量治疗, 包括化疗或化疗加放疗, 新辅助化放疗主要指术前化放疗.

■同行评价
术前放化疗可降低直肠癌的TN分期, 并提高保留肛门括约肌的可行性. 国内这方面临床应用研究不多, 本文在国内仍有一定新意, 而且临床方案为对照研究, 对临床指导意义相对可靠.

270-272
11 Ferrigno R, Novaes PE, Silva ML, Nishimoto IN, Nakagawa WT, Rossi BM, Ferreira Fde O, Lopes A. Neoadjuvant radiochemotherapy in the treatment of fixed and semi-fixed rectal tumors. Analysis of results and prognostic factors. *Radiat Oncol* 2006; 1: 5
12 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740
13 刘福坤, 祁晓平, 陈彻, 许哲, 李国立, 黎介寿. 直肠癌根治术联合放化疗的临床疗效比较. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1000-1002
14 Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 638-646
15 McNamara DA, Parc R. Methods and results of sphincter-preserving surgery for rectal cancer. *Cancer Control* 2003; 10: 212-218
16 Rodel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, Sauer R, Rodel C. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4881-4887
17 Suzuki T, Sadahiro S, Fukasawa M, Ishikawa K, Kamijo A, Yasuda S, Makuuchi H, Ohizumi Y, Murayama C. Predictive factors of tumor shrinkage and histological regression in patients who received preoperative radiotherapy for rectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 740-646
18 Pasetto LM. Preoperative versus postoperative treatment for locally advanced rectal carcinoma. *Future Oncol* 2005; 1: 209-220
19 Wong SJ, Sadasiwan C, Erickson B, Ota D, Mulkerin D, Thomas J, Holen K, Meadows S. A phase II trial of preoperative capecitabine and concurrent radiation for locally advanced rectal cancer. *Proc ASCO* 2004; 23: 312
20 苏琪, 吴硕东, 袁正伟, 王伟, 殷红专, 韩霞, 刘恩卿. 直肠癌保肛手术后肛门功能障碍的生物反馈治疗. 世界华人消化杂志 2005; 13: 419-422
21 Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishikawa K, Fujimoto H, Shinto E, Hase K. Preoperative parameters expanding the indication of sphincter preserving surgery in patients with advanced low rectal cancer. *Ann Surg* 2004; 239: 34-42
22 Alves A, Panis Y, Mathieu P, Kwiatkowski F, Slim K, Mantion G. Mortality and morbidity after surgery of mid and low rectal cancer. Results of a French prospective multicentric study. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29: 509-514
23 Kerr J, Engel J, Eckel R, Holzel D. Survival for rectal cancer patients and international comparisons. *Ann Oncol* 2005; 16: 664-672
24 Rudinskaite G, Tamelis A, Saladzinskas Z, Pavalkis D. Risk factors for clinical anastomotic leakage following the resection of sigmoid and rectal cancer. *Medicina (Kaunas)* 2005; 41: 741-746
25 Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubo A, Kitajima M. Current status and future prospects of sentinel node navigational surgery for gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 242S-244S
26 Parks AG. Per-anal anastomosis. *World J Surg* 1982; 6: 531-538

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2251-2254
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胰胆疾病的胆树形态分析

赵保民, 黄峻松, 李春明, 黄永德, 孙振兴

赵保民, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化科 陕西省西安市 710038
黄峻松, 中国人民解放军第123医院普外科 安徽省蚌埠市 233015
李春明, 哈尔滨市第一人民医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150010
黄永德, 中国人民解放军第180医院消化内科 福建省泉州市 362000
孙振兴, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内镜培训中心 上海市 200433
通讯作者: 赵保民, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科.
zhaobm@163.com
电话: 029-84777831 传真: 029-84777597
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-05-17

Morphology of biliary tree displayed by endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients with pancreaticobiliary disease

Bao-Min Zhao, Jun-Song Huang, Chun-Ming Li, Yong-De Huang, Zhen-Xing Sun

Bao-Min Zhao, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Jun-Song Huang, Department of General Surgery, the 123rd Hospital of Chinese PLA, Bengbu 233015, Anhui Province, China
Chun-Ming Li, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China
Yong-De Huang, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China
Zhen-Xing Sun, Training Center, Department of Digestive Endoscopy, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Dr. Bao-Min Zhao, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. zhaobm@163.com
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-05-17

Abstract

AIM: To explore the rule of pancreaticobiliary disease displayed by endoscopic retrograde cholangiapancreatography (ERCP).

METHODS: Retrospective analysis of 190 patients underwent ERCP from May 1 to August 30, 2004 was performed at Changhai hospital. Three contents including amorphology of the biliary tree, influential factors for dilated biliary tree and the correlations with pancreaticobiliary disease were studied.

RESULTS: Of the 190 patients, examination was not completed in 4 cases, and 38 were found without intact bile tree and 148 with intact one. All the 148 patients were classified into 7 groups: Normal bile tree was observed in 18 patients with chronic pancreatitis or without biliopancreatic disease; Hibernated bile tree was found in 15 patients with choledocholithiasis, in whom the mean values of common bile duct (CBD) and stones were 1.41 ± 0.25 and 0.69 ± 0.22 cm in diameter, respectively; Willow-like bile tree was found in 56 patients with choloedocholithiasis, in whom the mean values of CBD and stones were 1.69 ± 0.39 and 1.32 ± 0.44 cm in diameter, respectively; Sapless bile tree was found in 36 patients with choledocholithiasis, in whom the mean values of CBD and stones diameter were 1.80 ± 0.47 and 1.33 ± 0.46 cm in diameter, respectively; Vine-like bile tree was detected in 17 patients with endobiliary cholangiocarcinoma of CBD and carcinoma of pancreatic head, in whom the mean values of CBD diameter was 2.35 ± 0.62 cm; Irregular bile tree was in 6 patients without dominant disease.

CONCLUSION: The morphology of bile tree is associated with biliopancreatic disease and its features. The degrees of dilated CBD were resulted from the location and nature of the disease.

Key Words: Endoscopic retrograde cholangiapancreatography; Biliary tree; Common bile duct; Morphology

Zhao BM, Huang JS, Li CM, Huang YD, Sun ZX. Morphology of biliary tree displayed by endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients with pancreaticobiliary disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(22):2251-2254

■背景资料
逆行胰胆管造影是在十二指肠镜下通过乳头插管注入造影剂, 显示胰胆管有无扩张及其病变, 显示胆树形态, 判断疾病性质. 已广泛应用于胰胆病的诊断与治疗中, 是一种微创伤、痛苦小、费用低、效果好的现代诊疗技术. 胆树形态与胰胆病变的部位、性质、大小、形态及发生时间有关. 其具体的成因及疾病对胆汁流体力学和胆道动力学的影响有待进一步研究.

■创新盘点
关于胆树形态的研究, 过去关注的焦点是胆树的解剖变异如胆总管囊肿、迷走右肝管、胰胆管汇流异常等. 本文研究胆树形态变化和胆总管扩张度, 探讨肿瘤、结石、炎症、狭窄、肝移植术后胆道并发症及其影响, 以期总结胰胆疾病的ERCP表现规律, 从新的角度认识胆胰疾病.

摘要

目的: 探索胆胰疾病的ERCP胆树形态表现规律.

方法: 回顾性分析胆胰疾病患者190例ERCP术后胆树形态、肝内外胆管扩张的影响因素及与胆胰疾病的关系.

结果: 经ERCP检查的190例患者中, 4例未成功, 38例不具备完整的胆树形态, 148例具有完整胆树的形态, 其中正常胆树18例, 见于无胆胰病患者及慢性胰腺炎患者. 表现为冬眠树形态的15例, 胆总管平均直径1.41±0.25 cm, 多见于胆总管结石平均直径为0.69±0.22 cm的患者; 表现为青柳树形态的56例, 胆总管平均直径1.69±0.39 cm, 结石平均直径为1.32±0.44 cm; 枯树枝状胆树36例, 胆总管平均直径1.80±0.47 cm, 多见于结石平均直径为1.33±0.46 cm的患者, 少见于下段胆管癌和下段炎性狭窄者. 软藤状胆树17例, 常见于下段胆管癌和胰头癌患者, 胆总管平均直径为2.35±0.62 cm. 不规则型6例, 胆总管平均直径1.70±0.27 cm, 无优势病种.

结论: 胆树形态与胆胰疾病及严重程度有关, 胆胰疾病的性质及部位决定了胆总管直径及扩张程度, 通过胆树形态可初步判断疾病性质.

关键词: 逆行胰胆管造影; 胆树; 胆总管结石; 形态

赵保民, 黄峻松, 李春明, 黄永德, 孙振兴. 胰胆疾病的胆树形态分析. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2251–2254
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2251.asp

0 引言

近年来, ERCP的诊治技术广泛开展, 成为胰胆疾病内镜下微创治疗的重要手段. 熟悉并掌握ERCP的胆树形态, 对于胰胆疾病的诊断和鉴别诊断具有重要的指导作用和参考价值. 我们总结了190例胰胆病的ERCP下的胆树形态特点及其相互关系, 探索了胰胆病ERCP的表现规律, 以期提高对胰胆病的认识.

1 材料和方法

1.1 材料 住院胆胰疾病患者190例, 均经ERCP诊治, 男115例, 女75例, 年龄10-88(平均58±14)岁. 临床表现为腹痛130例, 发热30例, 黄疸90例, 呕吐7例, 腹胀52例. ERCP前经B超、CT、磁共振及胆道水成像显示确诊为胰头癌7例, 胆管癌29例, 胆囊癌2例, 肝癌4例, 胆囊切除术后腹痛患者40例, 慢性胰腺炎14例, 术后黄疸7例, 胆总管结石86例. 电子十二指肠镜Olympus JF200, JF230, X线机(日本产高岛津1250型), Olympus取石网蓝FG-22Q, 取石气囊BT-2Q, 及BML-4Q碎石器, 造影导管及乳头括约肌切开刀SD-211Q, Olympus高频电源UES-20型及德国爱尔博ICC200高频电源. EUS采用Olympus GF-UM3型超声内镜, 探头频率为7.5 MHZ与12 MHZ. 圣诞树塑料支架(美国Wilson-Cook公司), 金属支架(波士顿产品). 胆道逐级扩张探条, 胆道细胞刷及鼻胆引流管均为Wilson-Cook产品.

1.2 方法 患者均按ERCP术前常规准备, 术前30 min善宁0.1 mg, sc, 术前15 min地西泮10 mg, im, 溴东莨菪碱20 mg, 哌替啶50 mg, 进行心电监护及鼻吸氧. 操作方法: 所有患者按常规行ERCP, 首次接受本项目诊治的患者, 若ERCP示有胆管结石者, 即放置斑马导丝, 在导丝引导下插入取石网篮取石, 大结石先行碎石后再取石. 无碎石或胆泥即结束操作. 如有碎石或胆泥, 可行气囊清扫胆管, 取出结石残渣, 然后留置鼻胆引流管. ERCP示胆管癌者, 在导丝引导下, 插入切开刀, 行乳头括约肌切开, 然后行胆管扩张, 胆管刷检或活检, 最后在导丝引导下行塑料支架置入或金属支架置入, 以达到减黄目的, 为手术创造条件. ERCP示胰管结石, 处理方法同上. 胰管狭窄时, 在导丝引导下, 切开胰管括约肌, 然后置入塑料支架. 术后处理: 常规禁食24 h, 术后2, 4, 24 h复查血尿淀粉酶, 并给予输液及常规应用抗生素3 d. 观察有无腹痛, 胰腺炎, 出血等并发症.

统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件作χ^2方检验及t检验, 结果以mean±SD表示, $P<0.05$为相差显著.

2 结果

ERCP不成功4例, 无任何胰胆病表现6例. 不具备完整胆树形态的病例38例, 分别是胆总管上段癌10例, 术后胆管中断4例, 胆肠吻合术后4例, 术后胆管狭窄5例, 肝转移癌4例, 肝内胆管结石8例, 胆总管囊肿3例. 具有完整胆树形态148例, 其中胆总管结石93例, 中下段胆总管癌19例, 胰头癌8例, 胆总管下段炎性狭窄11例, 慢性胰腺炎11例, 无胰胆病者6例. 胆囊切除术后的患者40例, 术后病程2-22(平均10.3±5.9) a. 其中正常5例. 23例出现胆道结石, 占总胆管结石患者的24.5%. 12例并发其他病变如胆总管下段狭窄6例, 壶腹癌2例,

肝门胆管癌1例, 慢性胰腺炎3例. 发现十二指肠憩室39例, 占20.5%(39/190), 其中胆道结石患者37例, 占憩室患者94.8%, 胆管癌2例.

将148例具有完整胆树形态的ERCP结果, 依照胆总管扩张程度, 肝内胆管扩张及有无狭窄, 分为以下类型: A型: 正常胆树, 共18例, 胆总管、肝内外胆管均不扩张, 管径与长度在正常范围, 比例适当, ERCP表现自然柔软, 其中无胰胆患者6例, 慢性胰腺炎11例, 胰头癌1例; B型: 冬眠树型, 共15例, 胆总管轻度扩张, 平均直径1.41±0.25 cm, 左右肝管轻度扩张, 肝内胆管不扩张, ERCP表现呈冬眠树状态, 第3, 4级分支不明显, 其中胆总管结石14例, 其结石最大径均值为0.69±0.22 cm, 胆总管炎性狭窄1例; C型: 外周型(不规则型), 共6例, 胆总管中度扩张, 平均直径1.70±0.27 cm, 肝内胆管不规则扩张, 其中胆总管结石2例, 胆总管下段炎性狭窄2例, 胰头癌1例, 下段胆管癌1例; D型: 青柳树型, 共56例, 胆总管中度狭窄, 平均直径1.69±0.39 cm, 肝内胆管扩张呈垂柳状, 其中胆总管结石52例, 结石最大径均值为1.32±0.44 cm, 下段胆管癌1例, 胰头癌1例, 炎性狭窄2例; E型: 枯树枝状, 共35例, 胆总管重度扩张, 平均直径1.80±0.47 cm, 1-3级肝内胆管均有不规则扩张弯曲、有狭窄僵硬呈枯树状. 主要见于胆总管结石24例, 结石最大径均值为1.33±0.46 cm. 其中下段胆管癌5例, 下段炎性狭窄6例; F型: 软藤症, 共17例, 胆总管高度扩张, 平均直径达2.35±0.63 cm, 肝内胆管不规则扩张扭曲呈软藤状, 其中胆总管结石1例, 下段胆管癌12例, 胰头癌4例(表1).

表 1 胰胆病的ERCP胆树分型及胆总管直径 (mean ± SD)

胰胆病种类	*n*	胆总管直径 (cm)	胆树类型 A	B	C	D	E	F
胆总管结石	93	1.69 ± 0.39[a]		14	2	52	24	1
胆总管下段炎性狭窄	11	1.54 ± 0.25[a]		1	2	2	6	
胆总管下段肿瘤	19	2.22 ± 0.69[b]			1	1	5	12
胰头癌	8	2.13 ± 0.54[b]	1		1	1	1	4
慢性胰腺炎	11	0.74 ± 0.10	11					
无胰胆病患者	6	0.72 ± 0.11	6					

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 无胰胆病患者.

■应用要点
精确测量胆管扩张度, 正确判断胆树形态, 对判断疾病的性质和程度具有重要意义, 对疾病的治疗具有指导意义.

3 讨论

在ERCP检查中, 显示的胆管像包括胆总管、肝总管、左右肝管、肝内外胆管以及胆囊管和胆囊. 正常的胆管结构及压力梯度是胆汁流动的动力, 胰胆疾病常常引起胆道运动不良, ERCP具有明确的诊断价值[1]. 通常把胆总管的远端至肝内胆小管呈愈分愈细的柔和自然的嫩枝状影像称为胆树[2]. 这是除三维成像技术和磁共振胰胆管水成像技术(MRCP)之外其他成像技术均无可比拟的一项显示完整胆树形态的诊断技术. 正常胆树胆总管平均直径7.8 mm, 长71.4 mm; 肝总管平均直径8.3 mm, 长32.9 mm; 左肝管平均直径5.8 mm, 长17.9 mm; 右肝管平均直径4.7 mm, 长15.2 mm, 第二级胆管即右前后肝管与左内外段肝管管径为3-5 mm, 第三级以后的分支管径更细. MRCP和ERCP均可显示胆树形态, 但ERCP显示更清晰, 静注胰高血糖素可提高MRCP观察胆总管可视长度的级别[3]. 胆树分完全型胆树、不完全型胆树、异型胆树和胆树解剖变异. 完全型胆树即正常解剖的ERCP胆树形态, 胆总管远端受胆石、炎症、肿瘤浸润等而发生的胆管扩张, 扭曲变形, 但仍具有完整的胆树形态. 不完全胆树是指由于胆总管中段以上的胆管系统受结石、炎症、肿瘤、外伤及先天性因素的影响, 而发生的胆树残缺如无树干、无胆囊等, 不具备完整的胆树形态. 异型胆树是指先天性肝内外胆管囊肿所致的胆树变异, 除MRCP和ERCP外, 三度空间胆道造影诊断总胆管囊肿可达100%[4]. 胆胰管汇流异常分三型, 胰管型、胆管型和共同管型, 他与胆囊管汇流异常及迷走右肝管, 是区别于正常解剖的完全型胆树的一种另类胆树即胆树解剖变异, MRCP和ERCP对胆树解剖变异的诊断是准确的, ERCP是胰胆疾病诊断的金标准[5], 对术前诊断具有重要的临床意义[6-8].

胆树的形态与胰胆疾病的性质有关. 最常见的疾病有胆总管结石、胆总管炎性狭窄、胆总管下端癌、壶腹周围癌、胰腺癌、慢性胰腺炎、十二指肠乳头周围憩室等. 胆道结石和胆管下段炎性狭窄引起的上段胆管扩张平均直径无显著差异, 而且二者胆树均以D型和E型为主, 胆总管结石的大小与胆树形态D和E无关, 但与胆树B有关, 提示较小结石与大结石导致的胆树形态变化有区别. 胆管下段炎性狭窄病例较少, 无法判断与胆树形态的关系. 胆总管下端肿瘤和胰头癌所致的胆总管扩张度统计学上无差异, 其胆树形态都以F型为常见. 从表1可以看出结石和炎症与肿瘤所致的胆管扩张及胆树形态有明显的不同. 王中秋 *et al*[9]观察到胆管结石及炎症常为单纯性肝外胆管扩张, 肝内外胆管及胆囊一致性扩张或肝内外胆管、胆囊一致性明显

■同行评价
本文分析190例ERCP术后胆树形态,探索胰胆疾病的ERCP胆树形态表现规律,认为胆树形态与胰胆疾病及严重程度有关.通过胆树形态可初步判断疾病的性质,对临床具有一定的指导意义.

扩张,肝内胆管轻度扩张,提示绝大多数是肿瘤性病变,少数是嵌顿性结石.

影响胆树形态变化的因素较多,包括病程、年龄、性别、有无胆囊切除史、十二指肠憩室、白细胞数量、结石大小、肿瘤性质及程度等.各因素作为胆树形态变化的因变量其作用不同,经多因素回归分析发现,胆树形态主要与病变的性质和患者年龄有关,与病程、性别、有无胆囊切除术、白细胞等无关.十二指肠憩室患者并发胆胰疾病的比例较高,谢苏庆*et al*[10]报道达76.2%.本组研究达94.8%.李冰*et al*[11]报道憩室患者92.12%有胆胰病.常玉英*et al*[12]报道51例憩室患者中,41例患有胰胆病,占85%,胰胆病的发生与憩室的存在有关.胆总管下端肿瘤,胰头癌引起的上段胆管及肝内胆管扩张度均在2.1 cm以上,肝内胆管不规则扩张呈软藤症.胆总管结石、下段炎性狭窄引起的胆总管扩张度在1.5 cm以上,肝内胆管扩张有呈枯树枝或者青柳树状,与硬化性胆管炎肝内型的肝内胆管桔树枝状改变无明显区别.二者胆总管结石最大径均值无显著差异,其中可能存在一些其他影响因素,有待进一步研究.自身免疫性胰腺炎也可出现末端胆管狭窄,肝内胆管不规则狭窄[13].

总之,结石、炎症与肿瘤引起的胆树形态具有较明显区别,通过ERCP表现如胆总管扩张度、胆内胆管形态可初步判断病变的性质,胆树形态结合病变部位的局部表现可作出明确诊断.MRCP与ERCP在敏感度、特异度、准确度上无统计学上的差异,但MRCP不能取代ERCP[14].联合应用胆道造影术和核磁共振胆胰管成像,能了解胆管树的全貌,有助于胆道狭窄、胆泥淤积与胆漏的诊断,影响外科手术方法与疗效[15-17],为决策治疗方案提供参考.与术后比较,ERCP对胆总管结石的诊断符合率96.9%,对恶性肿瘤的诊断符合率77.8%,明显优于B超和CT[18],在ERCP不成功的情况下,经PTC螺旋CT胆道成像对肝门胆管癌的诊断具有一定的诊断价值[19-20],但ERCP仍然是诊断胆管癌的金标准[21].胰胆疾病的ERCP胆树形态需要进一步深入研究.

4 参考文献

1 陈仕珠. 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治. 世界华人消化杂志 2003; 11: 613-618

2 李兆申, 许国铭. ERCP基本技术与临床应用. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001; 1-41

3 Dalal PU, Howlett DC, Sallomi DF, Marchbank ND, Watson GM, Marr A, Dunk AA, Smith AD. Does intravenous glucagons improve common bile duct visualization during magnetic resonance cholangiopancreatography? Results in 42 patients. *Eur J Radiol* 2004; 49: 258-261

4 陈肇长, 吴冠群, 江文山, 林哲男, 吴树铿, 万永亮, 黄浩辉. 三度空间胆道造影对总胆管囊肿的临床应用. 中华放射线医学杂志(台湾) 2000; 25: 17-22

5 李兆申. 中国ERCP研究现状. 世界华人消化杂志 2000; 8: 446-448

6 Yu ZL, Zhang LJ, Fu JZ, Li J, Zhang QY, Chen FL. Anomalous pancreaticobiliary junction: image analysis and treatment principles. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2004 ; 3: 136-139

7 梁长生, 张世霞. ERCP对胆树解剖变异的诊断价值探讨: 附34例报告. 镇江医学院学报 1999; 9: 213-214

8 梁长生. 胆树的解剖变异: 用MR胆管胰管成像术(MRCP)进行诊断. 国外医学•临床放射学分册 1997; 20: 362-364

9 王中秋, 黎介寿, 李维勤, 李宁. 肝内外胆管及胆囊扩张程度和低位梗阻性黄胆病变的相关性研究. 胰腺病学 2003; 12 增刊158

10 谢苏庆, 许国铭, 李兆申, 孙振兴. 乳头旁憩室与胰胆疾病ERCP检查的关系.第二军医大学学报 1998; 19: 411-413

11 李冰, 陆志平, 梁斌, 孙振兴, 李兆申, 许国铭. 胆胰疾病与十二指肠乳头部憩室的关系. 胰腺病学 2003; 3 增刊158-159

12 常玉英, 黄永辉, 车筑平, 王于锦, 孙诚宜. 乳头旁憩室与胰胆疾病51例. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1104-1105

13 Sahani DV, Kalva SP, Farrell J, Maher MM, Saini S, Mueller PR, Lauwers GY, Fernandez CD,Warshaw AL, Simeone JF. Autoimmune pancreatitis: imaging features. *Radiology* 2004; 233: 345-52

14 施建平, 胡运彪, 钟亮, 陈克敏. 磁共振胰胆管造影术对胰胆系统疾病的诊断价值. 世界华人消化杂志 2002; 8(特刊8): 46

15 巨邦律, 方弛华, 钟满才, 颜政, 张刚庆, 徐玉亮. 磁共振胰胆管成像在肝内胆管结石外科治疗中的价值. 世界华人消化杂志 2005; 13: 690-691

16 郑树森, 徐骁, 吴健, 梁廷波, 黄东胜, 王伟林, 张珉, 沈岩. 原位肝移植后胆道并发症的诊断与治疗. 中华器官移植杂志 2002; 23: 154-156

17 黄东胜, 徐骁, 郑树森, 梁廷波, 张珉,王伟林, 沈岩, 沈倩云, 吴健, 吴应盛. 人体原位肝脏移植术后胆道与血管并发症的放射介入治疗. 中华肝胆外科杂志 2002; 8: 279-282

18 叶震世, 钟燕, 吴艳环, 郭明玉, 蔡志平, 任建林. ERCP对梗阻性黄疸病因的诊断价值. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1748-1749

19 刘厚宝, 王炳生, 陈培, 焦宛, 曹永胜. 经PTC螺旋CT胆道成像对肝门胆管癌的诊断价值. 肝胆胰外科杂志 1997; 9: 21-23

20 Czako L, Takacs T, Morvay Z, Csernay L, Lonovics J. Diagnostic role of secretin-enhanced MRCP in patients with unsuccessful ERCP. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3034-3038

21 Acalovschi M. Cholangiocarcinama: risk factors, diagnosis and management. *Rom JIntern MED* 2004; 42: 41-58

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志 2006年8月8日; 14(22): 2255-2259
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版. 世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. 2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01. 世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号.

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. 专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD_{50}, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A*r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、−、±及-后列出. 如37.6±1.2℃, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d.3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/ L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2℃. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^9/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B_{12}用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外*uv*, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/ L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/ L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/ L或100 g/ L葡萄糖; 45 ppm=45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用*g*; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*υ*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP <0.05, ^bP <0.01(P >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^cP <0.05, ^dP <0.01; 第三套为^eP <0.05, ^fP <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行!

2.7 *标点符号* 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 *题名* 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 *作者* 论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 *单位* 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 *第一作者简介* 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 *基金资助项目* 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 *通讯作者* 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 *英文摘要*

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值), 中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. 世界华人消化杂志 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *P*值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在"Pang *et al*"的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣 *et al*[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿)，我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力，提高了《世界华人消化杂志》的学术质量，在此表示衷心感谢！

白文元 教授
河北医科大学第二医院消化内科

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院

曹洁 副教授
第二军医大学微生物学教研室

曹志成 教授
香港伊利沙伯医院

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院普外科

陈红松 副研究员
北京大学人民医院北京大学肝病研究所

陈仕珠 主任医师
解放军第541医院

程树群 副教授
上海东方肝胆外科医院肝胆外科

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院科教处

代文杰 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科

党双锁 副教授
西安交通大学第二医院感染科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

樊红 副教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

季加孚 教授
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二医院普通外科

李永哲 副教授
北京市东城区帅府园1号北京协和医院检验科

林胜璋 副教授
温州医学院附属二院肝胆胰外科

刘作金 副教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

陆云飞 教授
广西医科大学第一附属医院外科

牛建昭 教授
北京中医药大学

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院普外

唐霓 副研究员
重庆医科大学

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王志刚 副主任医师
上海交通大学附属上海市第六人民医院普通外科

夏建川 研究员
中山大学肿瘤防治中心生物治疗研究室

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

许文燮 教授
上海交通大学生命科学与技术学院

杨希山 教授
广东省中医药局

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科

朱金水 教授
上海交通大学附属第六人民医院消化科