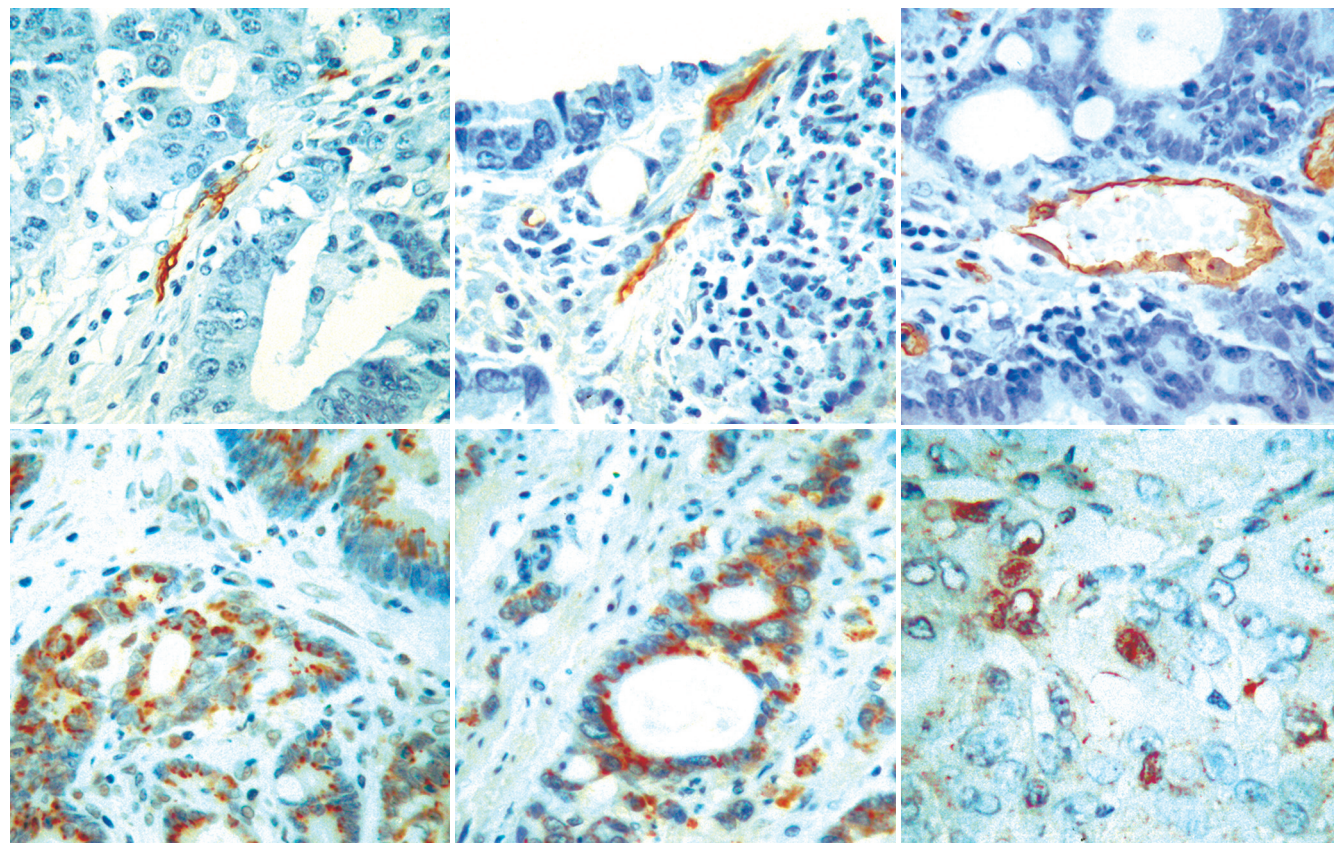


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 8 月 18 日 第 14 卷 第 23 期 (Volume 14 Number 23)



23 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

副总编辑

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

常务编委

程英升副教授	上海
高毅主任医师	广州
江学良主任医师	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
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
程树群副教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
巩鹏副教授	大连
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川
韩天权教授	上海
郝春秋副教授	西安
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州

何振平教授	重庆
洪天配教授	北京
侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李军祥教授	北京
李奇林教授	广州
李胜研究员	济南
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李旭副教授	广州
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李瑗教授	南宁
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林胜璋副教授	温州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘彬彬副研究员	上海
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆
刘铁夫教授	哈尔滨
刘颖斌副教授	杭州
刘占举教授	郑州

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006年8月18日 第14卷 第23期 (总第175期)

述 评

- 2261 世界华人消化杂志现状及未来发展的目标 张海宁
2263 肝纤维化的发生机制与治疗进展 高润平, 齐晓艳

基 础 研 究

- 2270 重组腺病毒Ad-I κ B α M在5-氟尿嘧啶诱导胃癌细胞凋亡中的作用
胡丽红, 刘冰熔, 刘丹, 关景明, 吕志武, 杜雅菊
2275 幽门螺杆菌疫苗接种小鼠产生免疫后胃炎的影响因素
陈洁, 陈旻湖, 王锦辉, 朱森林
2281 L02细胞在2-乙酰氨基苄处理大鼠肝中的增殖
林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 蒋黎, 李俊刚, 刘国栋
2288 原癌基因*pim-3*的克隆及其对肝癌细胞凋亡的影响
邓欢, 刘亮明, 张吉翔, 罗杰, 尹东, 熊瑛, 汤蕾, 谢正元
2294 人骨髓来源多能成体祖细胞ZHJ-MAPCs与人肝细胞系L02体外共培养向肝样细胞的分化
王海澜, 高毅, 蒋泽生, 慕宁
2301 NS-398对HGF诱导的肝癌细胞株MMP-7, MMP-9, TIMP-1表达的影响
殷积彬, 刘铁夫, 孟祥宁, 赵丽莉, 刘晓川

临 床 研 究

- 2306 山东省胃癌高发区人群胃黏膜肠化的预后与标记物表达
张阳, 张联, 潘凯枫, 游伟程, 李吉友
2311 DNA损伤修复基因hOGG1的遗传多态与乙肝相关性HCC的风险
张昊, 郝冰涛, 贺福初
2315 食管鳞癌细胞Survivin蛋白及其体视学参数的测定
韩永, 徐燕杰, 余琦, 杨敏, 赵敏, 周会芹

文 献 综 述

- 2319 调节性T细胞在肝脏免疫及疾病中的作用
杨俊涛, 张令强, 贺福初
2324 肿瘤中胰岛素样生长因子 II 基因印记及其丢失的机制 樊红, 徐卫芳
2329 Ghrelin与胃肠运动 余跃, 王巧民
2332 多层螺旋CT成像技术在急腹症中的应用 宋富珍, 程英升

研 究 快 报

- 2337 GABA对胰腺癌细胞株SW1990生长的影响
王莹, 余胜利, 刘军权, 费素娟, 陈剑群, 许统俭, 王人灏, 刘伟
2340 lactulose和glutamine对梗阻性黄疸大鼠空肠黏膜的影响
吴德全, 吕哲, 张新晨, 宿华威, 崔花子, 赵瑞波, 钟志久, 高彦辉
2344 噪音避水应激中心理因素对大鼠免疫功能的影响
施炳龙, 胡家露, 潘伯荣, 仇军文, 季万胜, 吴开春, 樊大明

临 床 经 验

- 2349 超细胃镜在食管金属支架置放中的作用
王盛根, 王寿九, 涂金兰, 谷丽娟, 曾庆菊, 吴玉纯
2354 应用SELDI-TOF-MS技术建立肝癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型
刘池波, 潘春琴, 孙灵芬
2358 肝转移介入治疗前后CT容积测量的价值
戴洪修, 鲁际, 周建雄, 谷家林, 刘卫红, 肖治明, 李海涛

附 录	2361 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	2366 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2262 更正与说明 2293 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2300 2006年即将召开的国际会议 2328 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 2331 第八届中西医结合实验医学研讨会 2336 专家门诊 2343 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知 2348 第三届亚洲大洋洲光生物学大会 2353 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知
封面故事	Jian-Xian Yu, Lin Cui, Qi-Yi Zhang, Hua Chen, Ping Ji, Hong-Jun Wei, Hai-Yan Ma. Expression of NOS and HIF-1α in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(29): 4660-4664 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4660.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 enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-08-18 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		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: wjcd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893	《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。 2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

August 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 23

EDITORIAL	2261 Status and future objective of World Chinese Journal of Digestology <i>Zhang HN</i> 2263 Advance in pathogenesis and treatment of liver fibrosis <i>Gao RP, Qi XY</i>
BASIC RESEARCH	2270 Role of recombinant adenovirus $\text{IkB}\alpha\text{M}$ in 5-fluorouracil-induced apoptosis of gastric carcinoma SGC-7901 cells <i>Hu LH, Liu BR, Liu D, Guan JM, Lv ZW, Du YJ</i> 2275 Influence factors of post-immunization gastritis after <i>Helicobacter pylori</i> vaccine immunization in mice <i>Chen J, Chen MH, Wang JH, Zhu SL</i> 2281 Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with 2-acetaminofluorene <i>Lin H, Mao Q, Wang YM, Jiang YG, Deng GH, Jiang L, Li JG, Liu GD</i> 2288 Cloning of pro-oncogene <i>pim-3</i> cDNA and its effect on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells <i>Deng H, Liu LM, Zhang JX, Luo J, Yin D, Xiong Y, Tang L, Xie ZY</i> 2294 ZHJ-multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells as co-cultured with human liver cell line L02 <i>Wang HL, Gao Y, Jiang ZS, Mu N</i> 2301 Effect of NS-398 on matrix metalloproteinase expression in hepatocyte growth factor-induced HepG2 cell line <i>Yin JB, Liu TF, Meng XN, Zhao LL, Liu XC</i>
CLINICAL RESEARCH	2306 Prognosis of intestinal metaplasia and expressions of biomarkers in high-risk populations of gastric cancer in Shangdong province <i>Zhang Y, Zhang L, Pan KF, You WC, Li JY</i> 2311 Impact of DNA repair gene hOGG1 Ser326Cys polymorphism on the risk of hepatocellular carcinoma <i>Zhang H, Hao BT, He FC</i> 2315 Expression of Survivin protein and measurements of stereology parameters in esophageal squamous carcinoma <i>Han Y, Xu YJ, Yu Q, Yang M, Zhao M, Zhou HQ</i>
REVIEW	2319 Roles of regulatory T cells in the immunity and disease of liver <i>Yang JT, Zhang LQ, He FC</i> 2324 Gene imprinting and loss of insulin-like growth factor II in tumors <i>Fan H, Xu WF</i> 2329 Relationship between Ghrelin and gastrointestinal motility <i>Yu Y, Wang QM</i> 2332 Application of multislice spiral computed tomography in acute abdomen <i>Song FZ, Cheng YS</i>
RAPID COMMUNICATION	2337 Effect of gamma-aminobutyric acid on the growth of pancreatic cancer cell line SW1990 <i>Wang Y, Yu SL, Liu JQ, Fei SJ, Chen JQ, Xu TJ, Wang RH, Liu W</i>

	2340 Influence of lactulose and glutamine on the jejunum mucosa of rats with obstructive jaundice <i>Wu DQ, Lv Z, Zhang XC, Su HW, Cui HZ, Zhao RB, Zhong ZJ, Gao YH</i> 2344 Effect of psychological factors on immune functions of rats in water avoidance stress <i>Shi BL, Hu JL, Pan BR, Qiu JW, Ji WS, Wu KC, Fan DM</i>
CLINICAL PRACTICE	2349 Values of ultrathin gastroscope in implantation of esophageal metal stents <i>Wang SG, Wang SJ, Tu JL, Gu LJ, Zeng QJ, Wu YC</i> 2354 Establishment of serum protein pattern model for screening hepatocellular carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry <i>Liu CB, Pan CQ, Sun LF</i> 2358 Computed tomography volumetric evaluation of treatment response in patients with liver metastases for interventional therapy <i>Dai HX, Lu J, Zhou JX, Gu JL, Liu WH, Xiao ZM, Li HT</i>
APPENDIX	2361 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	2366 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Ji P, Wei HJ, Ma HY.</i> Expression of NOS and HIF-1 α in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(29): 4660-4664 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4660.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 18, 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

世界华人消化杂志现状及未来发展的目标

张海宁

张海宁, 世界华人消化杂志编辑部 北京市 100023
通讯作者: 张海宁, 100023, 北京市, 世界胃肠病学杂志社.
h.n.zhang@wjgnet.com
电话: 010-85381901-1020 传真: 010-85381893
收稿日期: 2006-08-18 接受日期: 2006-08-18

0 引言

《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》. 《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. 经历了近14 a的发展, 本刊在以下几个方面取得了长足的进步.

1 编辑及编委会组成

目前, 《世界华人消化杂志》编辑部由3名科学编辑、2名电子编辑组成, 编委会成员共计295名, 分布在北京(50)、天津(4)、武汉(15)、上海(54)、福州(6)、西安(20)、广州(27)、重庆(17)、哈尔滨(16)、长春(5)、石家庄(5)、沈阳(6)、本溪(1)、杭州(3)、大连(4)、南京(10)、南通(3)、济南(3)、唐山(1)、厦门(3)、温州(1)、郑州(3)、南宁(3)、成都(4)、兰州(2)、长沙(3)、贵阳(2)、深圳(2)、昆明(3)、苏州(3)、合肥(1)、徐州(2)、新乡(1)、泰安(1)、石河子(1)、镇江(1)、银川(1)、香港(1)、汕头(1)、乌鲁木齐(1)、大同(1)、南昌(1)、宁波(1)、海口(1)、滨州(1).

2 刊登文章范围

《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.

3 《世界华人消化杂志》的同行评议

《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评议, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.

4 国内外检索系统收录情况

《世界华人消化杂志》入选《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》. 2004年度《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; 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.

《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.

5 世界华人消化杂志在线办公系统

自2005-12-15起, 《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程均可在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.

6 电子杂志的开放存取出版

《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15/2006-08-17, 电子版的点击次数为

2006-08-18/20世界胃肠病学杂志社在河北香河第一城召开了2006年第二次工作会议, 编辑部主任作了题为《世界华人消化杂志现状及未来发展的目标》的报告.

11 280 031, 平均每天点击9097次. 总下载次数133 655, 平均每天下载108次.

7 2006年收稿及文章发表情况

自2006-01-01/07-31, 世界华人消化杂志收到文章共计826篇, 1月份66篇, 2月份123篇, 3月份164篇, 4月份121篇, 5月份107篇, 6月份127篇, 7月份118篇, 平均每月104篇. 退稿299篇, 退稿率36%. 作者分布涉及除西藏、宁夏、内蒙以外所有的省、直辖市、及自治区(含香港特别行政区), 由以哈尔滨、沈阳、长沙、南京、北京、西安、郑州、上海、广州、成都、重庆、武汉、杭州、青岛、厦门等省会城市、直辖市为多, 稿件大部分来自高等院校及附属医院.

自2006-01-01/07-31, 《世界华人消化杂志》共发表文章421篇, 其中述评21篇(5%), 研究原著176篇(41%), 文献综述76篇(18%), 研究快报51篇(12%), 临床经验81篇(19%), 病例报告17篇(4%), 英文摘要299篇(70%), 国家基金资助文章89篇(21%), 省部级基金资助文章125(29%).

8 《世界华人消化杂志》开辟配发内容专栏

从2006年起, 《世界华人消化杂志》在栏目与版型上做了重大调整, 增加以下配发内容, (1)背景资料: 简要、精确概括此文的相关背景, 使读者更广泛的了解文章的相关知识, 更深入的理解文章的意义. (2)研发前沿: 简要介绍此文章研究

领域中的研究热点、重点, 以及亟待研究的问题. (3)相关报道: 为了方便读者对文章有更深入的理解, 或得到更系统, 详实的相关知识, 简要引用并点评与文章有关的其他发表的研究报道的亮点部分, 以方便读者进行更广泛的阅读. (4)创新盘点: 总结、提炼此文章与其他相关、或类似文章、报道的不同点以及创新之处, 以方便读者比较, 并有重点的阅读文章. (5)应用要点: 总结此文章在实际应用中的价值, 或对应用的指导、改进作用, 以及在将来应用中的前景. (6)名词解释: 将文章中出现的, 对文章的理解有重要意义, 而大部分读者可能不太熟悉, 或理解的不是很全面、准确, 或者这些词在此文中的意思异于他处的名词给予简单、直白、明了的解释说明. (7)同行评价: 编辑部将同行评议时审稿专家的意见中最能概括文章特点、价值、意义的词语、句子进行概括总结, 使读者可以对文章有个比较客观的认识.

9 《世界华人消化杂志》发展方向

经历了14 a的发展, 《世界华人消化杂志》已经由当初的季刊发展到如今的旬刊, 作者遍布全国各地, 发表的论文质量也一步步提高. 但是, 为了满足当前学术的发展、作者的需求以及市场需要, 在未来的发展中还需要面临以下问题: (1)进一步扩大编委及审稿人力量, 提高审稿及组稿质量; (2)在线办公系统的完善; (3)扩大征订; (4)加大广告宣传力度.

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 更正与说明 •

作者更正 江苏省建湖县第二人民医院消化内科肖海刚2006-08-25来函, 更正其发表在世界华人消化杂志2006-04-08第14卷第10期的文章(细菌性痢疾于肠易激综合征相关性分析)中两个数据, 分别是第1013页中材料和方法部分第6-7行: 数据32.4%应为22.4%, 46例应为76例, 67.6%应为77.6%.

经责任核查, 作者和编辑均有不可推卸的责任, 严重的损害了本刊形象. 在此, 本编辑部向广大读者表示郑重致歉.

肝纤维化的发生机制与治疗进展

高润平, 齐晓艳

高润平, 齐晓艳, 吉林大学第一医院肝病科 吉林省长春市 130021

高润平, 留美博士后, 教授, 主要从事肝病专业, 专于肝纤维化的研究。

吉林省自然科学基金资助课题, No. 200505211

通讯作者: 高润平, 130021, 吉林省长春市新民大街1号, 吉林大学第一医院肝病科. gao_runping@yahoo.com

电话: 0431-5612704 传真: 0431-5612468

收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-05-29

摘要

肝纤维化是各种致病原因引起细胞外基质(ECM)在肝内过多沉积的病理过程。在细胞和分子发病机制方面的研究显示, 细胞因子作用于窦周间隙静止的肝星状细胞(HSC)使其转变为激活状态, 继而增殖, 合成ECM。因此认为激活的HSC是产生ECM的主要细胞, 其他如肝静脉区成纤维细胞和骨髓源性肌成纤维细胞也是某些肝纤维化初期的主要纤维原性细胞。目前认为, 进展性肝纤维化具有可逆性。药物旨在通过抑制HSC的激活、诱导其凋亡和防止ECM沉积的干预性治疗在实验性肝纤维化已取得疗效, 但人类抗肝纤维化的有效性和安全性有待于进一步研究和论证。

关键词: 肝脏疾病; 纤维化发生学; 药物治疗

高润平, 齐晓艳. 肝纤维化的发生机制与治疗进展. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2263-2269

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2263.asp>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是继发于各种原因引起的肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应, 以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内过量沉积为病理特征^[1-2]。我国是病毒性肝炎高发区, 仅乙型肝炎病毒(HBV)携带者就达1.2亿, 其中慢性乙型肝炎患者有3000万以上。全球慢性HBV感染者3.5亿^[3], 约25%慢性乙肝患者最终将发展为肝硬化(hepatic cirrhosis), 甚至肝癌^[4]。丙型肝炎病毒(HCV)感染慢性化达50%-85%, 10%-30%发展为肝硬化, 3%-10%演变为肝癌^[5-6]。其他如乙醇性肝病、非乙醇性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、

自身免疫性肝炎及原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)等疾病亦可发生肝纤维化肝硬化, 而这些疾病在我国亦不少见。

由于各种原因所致慢性肝病在病程中伴随着肝纤维化的发生, 而进展性肝纤维化得不到有效控制最终发展为肝硬化, 甚至肝癌, 由此可见肝纤维化是各种慢性肝病导致严重后果的共同途径。近年来, 随着对肝纤维化发病机制的广泛深入研究, 明确提出肝纤维化是完全可逆转的观点^[7], 同时引发人们针对肝纤维化某些发病环节干预性药物治疗的研究。现概括介绍肝纤维化的发病机制, 着重阐述导致肝纤维化机制国外研究的一些新资料, 探讨抗肝纤维化治疗的方法及今后的发展趋向。

1 肝纤维化的发生机制

1.1 肝纤维化与肝硬化 肝纤维化是许多慢性致病因素作用于肝脏, 以ECM在肝脏内沉积为特征^[8]。在急性肝脏损伤后, 肝组织出现炎症反应和有限的ECM沉积, 肝实质细胞再生来取代坏死或凋亡的细胞。如果肝脏损害持续存在, 最终肝脏重建失败, 肝细胞被大量富含胶原的ECM取代而导致肝纤维化发生(hepatic fibrogenesis)。肝脏纤维性物质的分布特点与肝损伤的原因相关。在乙醇性肝病和NASH, ECM沉积起始于窦周间隙, 引发中央静脉周围肝纤维化的初期表现^[9], PBC和原发性硬化性胆管炎, 纤维组织最初分布在门静脉区, 形成门静脉区-门静脉区的纤维间隔, 即所谓胆管型纤维化^[10]。慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎以门静脉区-中央静脉区的纤维间隔形成为特征^[11], 随着各种慢性肝病的进展, 肝脏病理进程可从早期的肝纤维化, 继而发展为以纤维组织环绕增生肝细胞团的硬化结节为特征的肝硬化。

1.2 细胞外基质与肝纤维化 肝纤维化是由过多的ECM在肝内沉积所致, 伴随肝纤维化的进程, ECM的量和成份发生变化^[12]。在肝纤维化的高级阶段肝脏内的ECM约为正常的6倍, 胶原是ECM的主要成份。间质胶原 I, III型和模型胶原

■背景资料

肝纤维化是许多慢性致病因素作用于肝脏引起ECM过量沉积的共同病理过程。致病因子引起肝脏氧化应激反应和细胞因子产生是肝纤维化发生的始动环节。细胞因子作用于HSC的表面受体通过信号传导分子及转录因子调节HSC的激活过程。激活的HSC表达 α -SMA, 具有高增殖活性及合成肝脏绝大部分的ECM, 因此HSC的激活是肝纤维化发生的中心环节。MMPs可特异降解胶原纤维和其他基质蛋白及去除致病因素后HSC可发生凋亡, 这些从分子和细胞水平提供了肝纤维化可逆性的依据。目前, 啮齿类动物实验研究已经揭示了防止肝纤维化发展的靶点, 然而肝纤维化治疗药物的有效性和安全性需要用于人体实验加以论证。

■ 研发前沿

目前研究证实进展性肝纤维化是可逆转的。药物旨在通过抑制HSC激活、诱导其凋亡及防止ECM沉积的干预性治疗在实验性肝纤维化已取得疗效。本文着重介绍导致肝纤维化发病机制国外的一些新资料,探讨人类抗肝纤维化的方法和今后的发展趋势。

IV型是主要的骨架蛋白^[13-14]。ECM的其他成分有纤维连接素、粗纤维调节素、弹性蛋白、层黏连蛋白、透明质酸和蛋白多糖。肝脏的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可特异地水解胶原和其他基质蛋白。人类肝脏可表达MMP-1, -2, -3, -8, -9, -12, -13和-14^[15]。在肝脏疾病的急性期,过多的ECM受到MMPs的水解而被去除。在严重和反复的损伤因子作用下,纤维产生大于纤维降解(fibrolysis)导致过量的ECM沉积,引起肝纤维化。肝纤维化的发生受到ECM合成的上调, MMPs分泌和活性的下调^[16]。MMPs组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)的过多表达通过抑制MMPs活性而对ECM的合成和沉积起上调作用。

1.3 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC) 在正常肝脏, HSC位于窦周间隙, 是维生素A的储存场所。在慢性损伤的肝脏或培养的塑料器皿表面上, HSC从含有维生素A脂滴的静止状态转化为另一种“激活”的肌成纤维样细胞。完全激活的HSC不再含有维生素A, 能够表达 α -平滑肌动蛋白(α -SMA), 具有收缩性, 原始炎症性, 高增殖性, 并能产生肝脏绝大部分ECM^[2,7,17-18]。因此, HSC是损伤因子作用下肝纤维化发生过程中起主要作用的细胞^[19-20]。激活的HSC受细胞因子、基质蛋白的趋化可从邻近部位迁移并聚集在组织损伤修复的场所, 既可分泌大量的ECM, 又能调节ECM的降解^[21-22]。正常肝脏门静脉区没有固定的HSC, 如门静脉周围的慢性炎症扩展波及肝小叶内部, HSC由于细胞因子和基质蛋白的趋化能够从窦周间隙迁移至门静脉区^[21]。HSC通过这种方式参与门静脉区血吸虫性肉芽肿纤维形成^[23]。静止的HSC可表达脂肪细胞具有的标志, 如过氧化物酶体增殖受体- γ 、瘦素(leptin)等, 激活的HSC能表达肌原性标志, 如 α -SMA, 肌细胞加强因子-2。此外, HSC还可表达大量神经内分泌标志和神经传导介质的受体^[1,24-25], 这些特征使得HSC远比我们已知其在肝纤维化发生学的生物学功能和调节机制复杂。

目前研究表明, 除HSC在肝纤维化发生学中是主要的纤维原性细胞外, 肝细胞也具有潜在的纤维原性。其他肌成纤维细胞尽管在特定结构和机能上表现了与HSC的异质性^[26-27], 如肝脏固有的肌成纤维细胞, 源于骨髓的肌成纤维细胞, 在不同肝损伤过程中也参与了肝纤维化的发生^[28-29]。不同致病因子引起肝损伤引发不同的纤维原细胞发挥作用, 在中央静脉周围受损时,

HSC是主要的纤维原细胞。损伤发生在门静脉周围时, 如胆汁性肝硬化, 源于门静脉区的肌成纤维细胞在胆管周围增生, 率先启动胶原的沉积^[1,26,30]。尽管上皮间充质细胞在肾脏疾病的纤维发生学发挥作用, 然而, 该细胞以及来源于循环血液的纤维细胞在肝脏尚未被证实^[31-33]。

1.4 调节肝纤维化的细胞因子 不同的肝脏细胞在肝纤维化发生过程中产生复杂的相互作用。致病因素如肝炎病毒、乙醇代谢产物和胆汁酸等可引起肝细胞损伤, 受损的肝细胞释放活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)和纤维原性介导物质, 引起炎症细胞浸润^[34]。枯否细胞(Kupffer cell)是肝内的巨噬细胞, 主要通过释放ROS和细胞因子对肝脏炎症发挥作用^[35]。其他如肝内窦周内皮细胞和来自肝外的细胞(血小板、淋巴细胞、中性粒细胞)亦可释放细胞因子引起炎症反应。这些旁分泌的细胞因子作用于静止的HSC, 使其形态转化, 合成和自分泌细胞因子及表达相应的受体, 继而使HSC激活并发挥致纤维化作用^[36-37]。在众多的细胞因子中, 转化生长因子 β 1(transforming growth factor β , TGF- β)和血小板衍化生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是肝纤维化发生过程中最重要的^[38-40]。TGF- β 可刺激HSC转化为肌成纤维样细胞, 促进ECM的合成和抑制其降解^[41]。TGF- β 1在肝脏过度表达可引起严重的肝纤维化^[42]。PDGF可刺激HSC分裂增殖, 上调肝纤维化的发生^[43]。其他细胞因子在肝纤维化发生学的作用也引发人们的关注, RANTES可引起HSC增殖、迁移^[44], HCV感染患者RANTES基因多态性与门管区炎症有关^[45]。在慢性肝损伤时肾素-血管紧张素系统的某些成分局部表达, 激活HSC, 产生血管紧张素II, 诱发肝脏炎症^[46]。外源性血管紧张素II可促进HSC增殖, 迁移, 促进炎症前细胞因子分泌和胶原合成^[47]。其他血管收缩剂内皮素-1, 通过作用于他的受体A可促进纤维化的发生^[48], 相反, 扩血管物质一氧化氮, 弛缓素具有抗肝纤维化的作用^[49]。

瘦素和脂连素是由脂肪组织产生的脂肪细胞素(adipokine), 可调节脂肪及其他组织的代谢^[50]。近年来的研究表明, 激活的HSC可表达瘦素, 其可上调HSC胶原的合成, 引起单核细胞趋化蛋白-1及其受体的表达^[51]。在NASH和慢性HCV患者瘦素是一种调节肝纤维化发生的重要细胞因子^[50,52]。静止的HSC内可合成脂连素, 该细胞因子可维持HSC处于静止状态, 并可诱导激

活的HSC凋亡, 因而其具有抗肝纤维化作用^[53].

1.5 调节肝纤维化的细胞内信号途径 HSC培养和基因敲除小鼠模型是目前体外和体内研究信号通路在肝纤维化发生学作用的主要方式. TGF- β 是调节肝纤维化发生的重要细胞因子, 因而其信号通路的研究备受关注. TGF- β 家族含有3种密切相关的异构体(TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), 他们和HSC膜上相应的受体结合. TGF- β 主要通过细胞内Smad通路介导其生物学活性^[54]. 目前从哺乳类动物分离出8种Smad蛋白, 其中Smad2和Smad3属于受体介导性(R-Smad). TGF- β 可引起静止HSC内Smad2磷酸化, 从胞质转移至胞核内, 而引起激活的HSC内Smad3磷酸化和细胞核内转移^[55]. Smad3在HSC内过度表达引起纤维连接素、I型胶原沉积增加和 α -SMA应力纤维加速组合^[56], 而缺乏Smad3小鼠的HSC对纤维原性刺激反应降低^[57], 因此, Smad3通路在介导慢性肝病肝纤维化发生学起主要作用, 同时为肝纤维化干预性治疗提供了一个靶目标. PDGF可以激活HSC的细胞外信号调节激酶(ERK1/2)和FAK-PI3K-Akt通路而引起HSC增殖及致纤维化作用^[58]. c-Jun氨基端激酶(JNK)和NF- κ B通路调节HSC分泌炎症细胞因子^[59]. 其他一些转录因子(如JunD, KLF6, c-Myb)及过氧化物酶体增殖受体路径也参与了HSC的激活及肝纤维化的发生^[60].

1.6 不同肝脏疾病肝纤维化发生机制的特点 不同原因所致肝脏疾病其肝纤维化发生机制不尽相同. HCV逃逸HLA-II类分子介导免疫应答的监视而感染肝细胞, 引起活性氧自由基和纤维原性细胞因子产生, 导致HSC激活和胶原的沉积^[6]. 此外, HCV的核心蛋白和非结构蛋白还可以直接诱导HSC增殖和炎症细胞因子释放, 引起肝纤维化的发生^[61]. 某些基因多态性(如血管紧张素原、TGF- β 1等)与慢性丙型肝炎不同个体肝纤维化进展速度有关. NASH的肝纤维化发展过程中, 瘦素参与了HSC的激活, 而激活的HSC可自分泌瘦素. 瘦素通过与其受体结合引起HSC内胶原的合成. 此外, 与代谢综合征相关的情况如肥胖、2型糖尿病、高脂血症均与NASH的肝纤维化发生有关. NASH和肝纤维化的发生、发展尚与人类下列遗传基因有关: (1)对胰岛素敏感基因; (2)调节肝内脂肪储存、氧化和释放入血的基因; (3)与肥胖体型及脂肪分布相关的基因; (4)调节肝内铁水平(如遗传性血色素沉着症基因)和氧化应力产生的基因; (5)细胞因

子(TNF- α , IL-10)基因^[62]. 基于NASH二次创击学说, 由于胰岛素抵抗引起外周血清游离脂肪酸升高, 继而沉积于肝细胞引起脂肪肝的发生. 脂肪变性的肝细胞遇到第二次创击, 在氧化压力和细胞因子作用下发生凋亡, HSC可被激活, 导致肝纤维化的发生^[62].

在慢性胆汁淤积性肝病(如PBC), 炎症细胞首先在胆管周围浸润, T淋巴细胞和细胞因子引起胆管持续性损伤, 胆管细胞释放纤维原性介质激活临近门静脉区的成纤维细胞, 分泌ECM^[63]. 因此认为胆汁淤积性肝纤维化的早期, 门静脉区的成纤维细胞是主要的纤维原细胞. 随着门静脉区炎症的扩展, 肝小叶外围肝细胞可以被破坏, 激活窦周HSC, 参与纤维条带形成. 此外, IL-1和HLA基因多态性与PBC病情进展及肝纤维化发生有关^[64].

1.7 肝纤维化可逆转的分子生物学基础与临床证据 HSC、枯否细胞可分泌多种MMPs^[15], 依据底物的特异性MMPs可被分为5类: 即间质胶原酶(MMP-1, -8, -13), 明胶酶(MMP-2, -9), 基质溶解素(MMP-3, -7, -10, -11), 模型基质金属蛋白酶(MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25)和金属弹性酶(MMP-12)^[19]. 这些酶可特异性的降解胶原及其他基质分子, 使肝纤维化逆转成为现实. 分子生物学研究显示, 这些酶的mRNA及胶原降解活性在肝脏甚至硬化的肝脏表达, 受到MMPs组织抑制剂TIMPs的抑制^[65]. 纤维胶原(I, III型)能够被间质MMPs(人的MMP-1, -8, -13, 啮齿类动物的MMP-13)降解, 模型胶原(IV型)可被MMP-2, -9降解^[19,66]. 肝纤维化进展期, 当致病因子去除, 基质重构启动, HSC因失去存活因子的维持而凋亡^[67]. HSC的凋亡, 使其产生的TIMP减少, 枯否细胞及其他细胞产生MMPs增加, 导致纤维基质的降解^[19,68]. 因此, 促进ECM的降解和加速HSC凋亡是减轻肝纤维化, 向正常肝脏结构发展的两个重要环节.

与以往肝硬化是不可逆的观点不同, 近期研究表明, 即使是严重的纤维化(肝脏结构破坏的末期结节性纤维化)仍是可逆的^[69]. 但这种肝纤维化的明显减轻需要数年的时间, 其原因可能在于: (1)由于慢性肝病伴随胶原交叉连接的长期存在, 使其对MMPs的降解作用不敏感; (2)胶原和其他基质分子形成大的疤痕使得MMPs难以接近; (3)降解基质的MMPs减少和抑制这些酶功能的蛋白水平持续升高. 肝纤维化逆转时间长短除与纤维化程度有关外, 还取决于引

■创新盘点

目前人们对肝纤维化发病机制和治疗的研究和认识取得了重大的进展. 但有关肝纤维化确切的发病机制及人类抗肝纤维化的有效性及安全性有待进一步研究和论证. 本文综合国外肝纤维化基础与临床研究的一些新进展, 阐述不同致病因素作用于肝脏后肝纤维化发生学的共同机制与特征, 提出针对肝纤维化不同发病环节人类肝纤维化治疗的可能性和方法.

■应用要点

加深对肝纤维化发病机制的理解, 探讨针对人类各种致病因素所致肝纤维化治疗的方法, 将有助于有效抑制进展性肝纤维化的发展, 并控制其最终演变为肝硬化, 甚至肝癌。

起肝脏疾病的原因。去除进展性肝病致病因素如戒酒和空肠回肠绕道术分别使乙醇性肝病和NASH患者的肝纤维化缓解^[19]。越来越多的迹象表明, 慢性HCV感染接受有效的抗病毒治疗(PEG-IFN+利巴韦林)后, 肝脏炎症得到控制和纤维化明显减轻^[6,19,69]。有效控制铁和铜负荷过重、血色病、继发性胆汁淤积性肝病、自身免疫性肝炎及采用拉米夫定治疗慢性HBV感染的患者均能够观察到上述现象, 而且近半数患者肝硬化出现很大程度的逆转^[1,19]。

2 肝纤维化的治疗途径

去除致病原因是治疗肝纤维化最有效的方式, 而且这种对策对许多原因引起的慢性肝病是有效的。然而, 事实上绝大多数肝病难以从根本上去除病因, 如慢性乙型肝炎, 自身免疫性肝炎, PBC等。尽管肝移植是治疗肝硬化具有并发症患者最有效的手段, 可是对于乙型、丙型肝炎后肝硬化的患者移植后病毒可重新感染, 常常发展为慢性肝病甚至肝硬化。近年来随着对肝纤维化发病机制的深入理解, 肝纤维化有效治疗正在变为现实。目前, 在啮齿动物实验研究已经揭示了某些防止肝纤维化发展的靶点^[70], 因而本文列出几种针对肝纤维化发生学某些环节的治疗方法。

2.1 抑制炎症和免疫反应 由于炎症先于并促进肝纤维化的发生, 因而有效的控制肝脏的炎症反应具有后继的抗肝纤维化作用。皮质类固醇具有抑制肝脏炎症反应的作用, 但目前仅限于自身免疫性肝炎和急性乙醇性肝炎所致肝纤维化的治疗。皮质类固醇长期用药全身不良反应较多, 而且能促进HBV复制, 故不适合治疗慢性乙肝肝纤维化。

2.2 抗氧化损伤 ROS在不同肝脏疾病的发生、发展过程中起着重要的作用, 因而抗氧化损伤是治疗肝纤维化的一个环节。抗氧化剂如维生素E、巯胺基硫、水飞蓟素、磷脂酰胆碱、S腺苷蛋氨酸能减轻氧化应激, 抑制TGF- β 介导的 $\alpha 1(I)$ 胶原合成, 抑制HSC的激活, 保护肝细胞避免凋亡, 减轻实验性肝纤维化^[1,11]。抗氧化剂在治疗乙醇性肝病和NASH是有效的。

2.3 受体与信号通路的阻断 TGF- β 是最有潜能的纤维原性细胞因子, 阻断TGF- β 与HSC膜受体结合或灭活其信号传导分子(Smad3, Smad7)的受体, 在体内外显示具有抗肝纤维化作用^[6,11]。口服内皮素受体拮抗剂可有效控制大鼠实验性肝纤

维化。血管紧张素II受体拮抗剂或血管紧张素转化酶抑制剂可有效延迟大鼠肝纤维化的发生, 然而这种剂量超过人体抗高血压剂量的100倍^[6]。肾素-血管紧张素抑制剂类药物对慢性丙肝和NASH患者的初步治疗以及对肝移植合并高血压患者进行的治疗结果显示, 这些药物在预防纤维化进展有作用^[1]。然而这种方法需要足够的临床实验才能被推荐于临床治疗。

2.4 抑制HSC的激活 HSC从静止向激活状态的转化是肝纤维化发生的一个中心环节, 因此, 抑制HSC的激活是治疗肝纤维化的关键步骤。一些抗氧化剂可抑制因氧化应激而引起的HSC激活, 具有抑制实验性肝纤维化的作用, 这为人类选择抗氧化剂(如维生素E, S腺苷蛋氨酸, 磷脂酰胆碱)和肝细胞保护剂水飞蓟素抑制慢性肝病肝纤维化进程提供理论依据。 γ -干扰素、肝细胞生长因子在动物肝纤维化实验模型可抑制HSC的激活, 发挥抗肝纤维化作用。 α -干扰素可阻断培养HSC的激活、增殖和胶原的合成。对慢性丙型肝炎患者采用 α -干扰素治疗的一项回顾性研究和一项小样本的前瞻性研究显示出 α -干扰素具有防止肝纤维化进展的作用, 即使在那些抗病毒非应答的患者^[6]。过氧化物酶体增殖受体- α (PPAR- α)和/或PPAR- γ 的配体具有下调HSC的激活, 如: 噻唑烷二酮在动物实验性肝纤维化中及人类NASH患者有积极的抗肝纤维化作用^[1]。

2.5 诱导HSC凋亡 诱导HSC的凋亡促使肝纤维化逆转正在引起人们的重视。在细胞和活体实验研究显示, 谷氏菌素可选择性的引起HSC的凋亡, 减轻肝纤维化^[19]。

2.6 抑制胶原的产生和加速纤维疤痕降解 人类肝脏疾病的肝纤维化治疗需要促进已有基质的吸收和防止新疤痕的形成, 因此通过刺激HSC、枯否细胞、肝细胞产生MMPs, 或者下调MMPs的抑制剂TIMPs, 或直接给予MMPs以促进疤痕基质的降解是肝纤维化治疗的重要目标。TGF- β 拮抗剂通过下调TIMPs和增加MMPs的活性具有抑制实验性肝纤维化的疤痕形成^[37]。抑制胶原的合成和促进其降解是抗肝纤维化的另一种方法^[70]。脯氨酸-4羟化酶抑制剂和卤夫酮(halofuginone)通过抑制胶原的合成可防止实验性肝硬化的进展。施予MMP-8和尿激酶型纤溶酶原激活物可刺激活体内胶原降解。

2.7 中药治疗 中医药确有抗肝纤维化的独特优势, 国内研究发现抗肝纤维化比较有效的单味中药有丹参、黄芪、桃仁、冬虫夏草、当归、

葫芦素B、齐墩果酸、苦参素等, 复方制剂有复方861冲剂、扶正化瘀胶囊、鳖甲软肝片等. 相信中药在未来慢性肝病肝纤维化治疗中会发挥重要的作用. 但中药抗肝纤维化需要长疗程、大样本、多中心联合、随机、双盲、安慰剂对照的临床实验来论证其有效性. 中药及其有效成分抗肝纤维化正在受到国际的关注, 目前国外研究较多的有:

水飞蓟素(silymarin): 水飞蓟素是从植物水飞蓟中提出来的混合物, 其主要成分黄酮类化合物水飞蓟宾(silybinin)占60%. 水飞蓟宾在体外可刺激肝细胞RNA合成, 清除自由基, 保护肝细胞, 抑制HSC的增殖和胶原合成. 水飞蓟宾可抑制大鼠胆汁性肝纤维化肝内胶原沉积, 对严重肝纤维化仍然有效^[71].

小柴胡汤是我国传统的中药方剂, 近年日本学者对其抗肝纤维化的作用进行了系统研究. 该方的活性成分之一黄芩苷(baicalein)亦属于黄酮类, 结构上与水飞蓟宾相似, 具有清除自由基, 在体内外具有抗肝纤维化的作用^[6].

甘草甜素(glycyrrhizin)是从中药甘草中提取的有效成分. 具有抑制HSC激活、增殖和胶原的合成. 最近日本的一项随机双盲临床研究表明, 甘草甜素用药4 wk可使慢性丙型肝炎患者血清ALT明显下降, 用药8 wk可改善肝脏组织学的变化, 长期使用可降低肝细胞癌发病率^[72].

卤夫酮(halofuginone)是源于抗疟药物常山的一种半合成生物碱衍生物, 其可抑制HSC胶原的合成, 减轻继发性胆汁淤积性和硫代乙酰胺所致实验性肝纤维化^[73-74].

丹参(salvia miltiorrhiza)可降低CCl₄实验性大鼠肝纤维化肝内TGF- β 1, I型和III型前胶原和TIMP-1的mRNA水平, 提高MMP-13的水平, 因而发挥抗肝纤维化的作用^[75].

总之, 尽管各种致病原因引起肝纤维化发生机制不尽相同, 但致病因子持续作用于肝脏引起氧化应激和细胞因子产生是肝纤维化的始动因素. 在细胞因子如TGF- β , 血管紧张素II, 瘦素等作用下HSC的激活是肝纤维化发生的中心环节. MMPs特异降解胶原纤维和其他基质蛋白及致病因素去除后HSC凋亡是肝纤维化逆转的分子和细胞学基础. 人类不同的肝病致纤维化分子机制的研究将有利于确定新的治疗靶点. 今后需在临床工作中揭示遗传因素对肝纤维化进程的影响, 将已知能够减轻试验性肝纤维化的药物用于人体试验.

3 参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 2 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 3 Chan HL, Leung NW, Hussain M, Wong ML, Lok AS. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. *Hepatology* 2000; 31: 763-768
- 4 Progress towards the comprehensive control of hepatitis B. Proceedings of a roundtable meeting. Windsor, Berkshire, United Kingdom, 25-26 July 1995. *Gut* 1996; 38 Suppl 2: S1-70
- 5 Wands JR. Prevention of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1567-1570
- 6 Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003; 10 Suppl 1: S59-67
- 7 Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G7-G11
- 8 Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-53
- 9 Horn T, Junge J, Christoffersen P. Early alcoholic liver injury. Activation of lipocytes in acinar zone 3 and correlation to degree of collagen formation in the Disse space. *J Hepatol* 1986; 3: 333-340
- 10 Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin. Immunopathology* 1999; 21:475-490
- 11 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
- 12 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443-446
- 13 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965
- 14 Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, Thibault V, Charlotte F, Dumouchel P, Cazier A, Huraux JM, Devergie B, Vidaud M, Opolon P, Poynard T. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998; 27: 868-872
- 15 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 16 Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 43-54
- 17 Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 337-349
- 18 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-826
- 19 Friedman SL, Arthur MJ. Reversing hepatic fibrosis. *Sci Med* 2002; 8: 194-205
- 20 Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-77
- 21 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N,

■同行评价

本文就肝纤维化的发病机制和治疗的进展进行了较为详细的综述, 论述层次清晰, 可读性强, 文献复习较全面, 基本上反映了近年来在肝纤维化发病机制和治疗方面的研究情况.

- Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159
- 22 Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002; 82: 767-774
- 23 Fonseca Yde O, Lima CB, Santos ET, Andrade ZA. On the presence of hepatic stellate cells in portal spaces. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 289-291
- 24 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, Torbenson M, Thomas SA, Diehl AM. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 284-292
- 25 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
- 26 Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004; 40: 1151-1159
- 27 Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; 117: 1205-1221
- 28 Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955-963
- 29 Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Magae J, Ochiai A. *In vivo* characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 2005; 23: 699-706
- 30 Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d496-503
- 31 Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776-1784
- 32 Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
- 33 Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004; 114: 438-446
- 34 Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med* 2003; 3: 483-490
- 35 Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16-28
- 36 Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992; 89: 19-27
- 37 Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d1899-1914
- 38 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-807
- 39 Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 255-273
- 40 Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3389-3394
- 41 Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66
- 42 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2572-2576
- 43 Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989; 84: 1786-1793
- 44 Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G949-958
- 45 Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 1468-1476
- 46 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodes J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117-125
- 47 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156
- 48 Cho JJ, Hoher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 1169-1178
- 49 Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis *in vivo*. *Gut* 2001; 49: 577-583
- 50 Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 303-306
- 51 Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 42: 1339-1348
- 52 Piche T, Vandenbos F, Abakar-Mahamat A, Vanbiervliet G, Barjoan EM, Calle G, Giudicelli J, Ferrua B, Laffont C, Benzaken S, Tran A. The

- severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 91-96
- 53 Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-1669
- 54 Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 659-693
- 55 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003; 278: 11721-11728
- 56 Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 57 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 58 Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by *in vivo* liver injury in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 951-958
- 59 Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001; 166: 6812-6819
- 60 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
- 61 Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126: 529-540
- 62 Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2004; 27: 2057-2066
- 63 Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004; 84: 153-159
- 64 Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, Craig W, James O, Jones D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. *Gut* 2001; 48: 397-402
- 65 Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110: 821-831
- 66 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001; 50: 58-65
- 67 Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003; 327: 143-147
- 68 Friedman SL. Mac the knife? Macrophages- the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 29-32
- 69 Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1525-1528
- 70 Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 437-451
- 71 Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001; 35: 392-398
- 72 Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neominophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002; 62 Suppl 1: 94-100
- 73 Van de Casteele M, Roskams T, Van der Elst I, van Pelt JF, Fevery J, Nevens F. Halofuginone can worsen liver fibrosis in bile duct obstructed rats. *Liver Int* 2004; 24: 502-509
- 74 Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, Pines M. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2001; 33: 379-386
- 75 Wasser S, Ho JM, Ang HK, Tan CE. Salvia miltiorrhiza reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 1998; 29: 760-771

电编 张敏 编辑 潘伯荣

重组腺病毒Ad-I κ B α M在5-氟尿嘧啶诱导胃癌细胞凋亡中的作用

胡丽红, 刘冰熔, 刘丹, 关景明, 吕志武, 杜雅菊

■背景资料

核转录因子NF- κ B是近年来研究的热点。研究表明, 肿瘤细胞对化疗药物的耐药性与NF- κ B的激活密切相关。因此, 通过基因治疗手段抑制NF- κ B的激活来抑制耐药性的产生, 提高肿瘤化疗药物的治疗效果是一个全新的有广泛应用前景的研究课题。

胡丽红, 刘冰熔, 刘丹, 关景明, 吕志武, 杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150086
胡丽红, 哈尔滨医科大学附属第二医院2003年消化内科硕士生。
黑龙江省攻关重点资助项目, No. GC02C148-01
2005年哈尔滨医科大学优秀研究生创新基金资助项目, No. HCXS2005015
通讯作者: 刘冰熔, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科. liubingrong@medmail.com.cn
电话: 0451-86605980 传真: 0451-86605980
收稿日期: 2006-03-25 接受日期: 2006-05-08

Role of recombinant adenovirus I κ B α M in 5-fluorouracil-induced apoptosis of gastric carcinoma SGC-7901 cells

Li-Hong Hu, Bing-Rong Liu, Dan Liu, Jing-Ming Guan, Zhi-Wu Lv, Ya-Ju Du

Li-Hong Hu, Bing-Rong Liu, Dan Liu, Jing-Ming Guan, Zhi-Wu Lv, Ya-Ju Du, Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Key Development Program of Heilongjiang Province, No. GC02C148-01, and Innovation Fund for Excellent Graduates of Harbin Medical University, No. HCXS2005015

Correspondence to: Dr. Bing-Rong Liu, Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn
Received: 2006-03-25 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the role of recombinant adenovirus I κ B α M (Ad-I κ B α M) on the apoptosis of gastric carcinoma SGC-7901 cells induced by 5-fluorouracil (5-FU) as well as the possible mechanism.

METHODS: The cultured SGC-7901 cells were divided into group A, B and C. The cells in group A and B were infected with Ad-I κ B α M and Ad-I κ B α , respectively, and those in group C served as controls. 5-FU was added to each group at the concentration of 5 mg/L, respectively. Electrophoretic mobility shift assays were used to detect the activation of nuclear factor

kappa B (NF- κ B) in all the groups, and the 5-FU-induced apoptosis of SGC-7901 cells was tested by MTT and TUNEL method.

RESULTS: After 5-FU treatment, NF- κ B was activated in gastric carcinoma cells, but in the cells infected with Ad-I κ B α M, the activity of NF- κ B was inhibited. MTT assay indicated that the apoptosis rate of cells infected with Ad-I κ B α M (56.36% $\pm$ 0.60%) was significantly higher than that of cells infected with Ad-I κ B α (47.50% $\pm$ 1.42%), or without infection (42.95% $\pm$ 1.27%) (P < 0.001). TUNEL method showed that the apoptosis rate was 29.7% $\pm$ 2.5% in the cells infected with Ad-I κ B α M, which was also significantly higher than that of cells infected with Ad-I κ B α (20.0% $\pm$ 2.6%) or without infection (12.3% $\pm$ 1.1%) (P < 0.01). Therefore, infection with Ad-I κ B α M markedly promoted the apoptosis induced by 5-FU.

CONCLUSION: Infection with Ad-I κ B α M can effectively inhibit the activation of NF- κ B in human SGC-7901 cells, and increase the apoptosis induced by 5-FU.

Key Words: Nuclear factor kappa B; Gastric carcinoma; 5-Fluorouracil; Gene therapy

Hu LH, Liu BR, Liu D, Guan JM, Lv ZW, Du YJ. Role of recombinant adenovirus I κ B α M in 5-fluorouracil-induced apoptosis of gastric carcinoma SGC-7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2270-2274

摘要

目的: 研究重组腺病毒Ad-I κ B α M对5-氟尿嘧啶(5-FU)诱导胃癌细胞凋亡的作用情况, 进而研究胃癌细胞抵抗5-FU的机制。

方法: 培养胃癌SGC-7901细胞, 感染重组腺病毒Ad-I κ B α M的细胞为实验组, 感染Ad-I κ B α 及非感染的空白对照为对照组, 以5 mg/L 5-FU加入上述各组细胞, 采用EMSA法检测5-FU处理后各组细胞内NF- κ B激活情况; 应用MTT和TUNEL法分别检测5-FU对各组细胞诱

导凋亡的情况.

结果: 5-FU作用于胃癌细胞可使细胞内NF- κ B激活, 感染Ad-I κ B α M使NF- κ B活性受到明显抑制. MTT法证明, 5-FU作用后, 感染Ad-I κ B α M细胞的凋亡(56.36% $\pm$ 0.60%)较感染Ad-I κ B α 组(47.50% $\pm$ 1.42%)及未感染组(42.95% $\pm$ 1.27%)明显, 各组间比较有统计学差异($P<0.001$); TUNEL法结果与MTT相符, 感染Ad-I κ B α M组的凋亡率为29.7% $\pm$ 2.5%, 明显高于感染Ad-I κ B α 组(20.0% $\pm$ 2.6%)及未感染组(12.3% $\pm$ 1.1%)($P<0.01$). 可见, 感染Ad-I κ B α M可明显提高5-FU诱导的细胞凋亡.

结论: 感染Ad-I κ B α M可通过抑制胃癌细胞NF- κ B的活性增强5-FU的诱导凋亡作用.

关键词: 核转录因子 κ B; 胃癌; 5-氟尿嘧啶; 基因治疗

胡丽红, 刘冰熔, 刘丹, 关景明, 吕志武, 杜雅菊. 重组腺病毒Ad-I κ B α M在5-氟尿嘧啶诱导胃癌细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2270-2274

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2270.asp>

0 引言

5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)是最常用的抗肿瘤药物, 也是胃癌化疗的首选药物. 然而许多胃癌细胞对5-FU具有一定的耐药性, 从而大大影响了胃癌的治疗效果. 核转录因子B (nuclear factor κ B, NF- κ B)是近年来发现的一种重要的转录调节因子^[1-3], 他的激活被认为是许多肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性的关键因素^[4-5]. 目前国外的一些研究表明^[6-7], 在5-FU诱导胃癌细胞凋亡的同时, NF- κ B也被激活, 说明NF- κ B与胃癌细胞的抗凋亡作用机制有关. 因此, 是否可以通过抑制NF- κ B的激活来增强5-FU治疗胃癌的效果是一个十分有意义的课题. 他不仅可以找到一条治疗胃癌的有效途径, 同时可以进一步证实NF- κ B的抗凋亡机制.

正常状态下, NF- κ B与其主要的调节蛋白I κ B α 结合以非活性状态存在于细胞质中. 肿瘤细胞在受到化疗药物、放疗等刺激后, I κ B α 迅速磷酸化降解, 被激活的NF- κ B会进行核内转移, 与DNA启动子上特定的认知序列结合, 转录靶基因, 抑制肿瘤的凋亡^[8]. 研究表明, 第32位和36位丝氨酸位点发生突变的I κ B α 不会被降解, 与NF- κ B发生不可逆性结合而抑制其激活^[9-10], 这一突变的I κ B α 被称为NF- κ B超抑制物

(I κ B α M). 我们应用自行构建的重组腺病毒Ad-I κ B α M^[11-12]为基因治疗手段, 以胃癌SGC-7901细胞为研究对象, 研究Ad-I κ B α M在5-FU诱导胃癌细胞凋亡中的作用, 进而研究胃癌细胞抵抗5-FU诱导凋亡与NF- κ B活化的关系, 为探索胃癌治疗的新方法打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌SGC-7901细胞系, 购自中科院上海细胞所细胞库. 重组腺病毒Ad-I κ B α M为含第32和36位丝氨酸定点诱变为丙氨酸的中国人I κ B α 基因编码区的cDNA序列, 并表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组腺病毒; 重组腺病毒Ad-I κ B α 为含未突变的中国人I κ B α 基因, 并表达绿色荧光蛋白的对照用重组腺病毒, 详见参考文献[11-12]. 5-FU注射液(10 mL : 0.25 g), 购自天津金耀氨基酸有限公司; TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒购自Roche公司; 核蛋白抽提试剂盒、非放射性凝胶迁移(EMSA)试剂盒, 购自宁波唯奥基因科技发展有限公司.

1.2 方法 实验组细胞感染重组腺病毒Ad-I κ B α M; 感染对照组细胞感染重组腺病毒Ad-I κ B α ; 空白对照组细胞不感染任何病毒. 3组胃癌细胞用2种方法进行处理, 一种常规培养, 另一种用5 mg/L 5-FU作用一定时间, 诱导细胞的凋亡和NF- κ B的表达. 细胞接种于六孔培养板, 待细胞贴壁且处于对数生长期时, 弃培养液, 加入不同感染复数(MOI)的Ad-I κ B α M及Ad-I κ B α , 培养2 h, 弃病毒液, 加入完全培养基继续培养. 感染Ad-I κ B α M及Ad-I κ B α 的浓度分别为25, 50, 100, 200, 400, 48 h后在荧光显微镜下计数GFP阳性细胞百分率.

1.2.1 凝胶电泳迁移率实验 对SGC-7901细胞用5-FU分别诱导0, 0.5, 2, 12 h后收获, 按核蛋白抽提试剂盒操作说明提取核蛋白; BCA法进行蛋白浓度测定, 将实验抽提的核蛋白调至相同的量(3 mg/孔); 进行EMSA, 其步骤为配制60 g/L聚丙烯酰胺凝胶, 然后将细胞核提取物与NF- κ B寡核苷酸探针进行结合反应, 反应体系按总体积10 μ L上样; 电泳后取出凝胶板, 用电泳转膜装置将凝胶上的蛋白转至结合膜, 交联、洗涤、底物结合反应、Cool Imager成像系统成像, 选择NF- κ B活性较高的时间作为选定时间点. 3组细胞用5-FU诱导上述选定时间后按以上方法进行EMSA.

1.2.2 MTT比色法 在96孔板每孔接种细胞 4×10^3

■ 研发前沿

目前, 此领域的研究重点在于探讨不同的肿瘤细胞对某些化疗药物产生耐药性与NF- κ B激活的关系, 并寻找更有效的抑制NF- κ B激活的方法, 进一步探讨是否可通过抑制NF- κ B活性的方法抑制肿瘤细胞耐药性的产生, 提高肿瘤的治疗效果.

■创新盘点

I κ B α M是由本文课题组自行克隆成功的中国人I κ B α M基因进行定点诱变后构建成的NF- κ B超抑制物,在此基础上应用AdEasy腺病毒构建系统构建重组腺病毒Ad-I κ B α M.以Ad-I κ B α M为基因治疗手段,研究其对NF- κ B活性的抑制作用,进而揭示胃癌细胞对5-FU耐药的机制,在国内相关研究领域尚属首次.

个细胞,设调零组,8 h后按计划实验组感染重组腺病毒Ad-I κ B α ,感染对照组感染Ad-I κ B α ,空白对照组不感染任何病毒,48 h后按计划5-FU处理组加5 mg/L 5-FU,对照不加任何药物;继续培养48 h后,每孔加入5 g/L MTT 20 μ L,CO₂培养箱37℃培养4 h;弃培养液,各孔加200 μ L二甲基亚砜,振荡10-20 min,用自动酶标检测仪在570 nm处检测96孔的吸光度(A值),按公式计算生长抑制率:抑制率(%)=(1-实验组A值/对照组A值) $\times$ 100,每一处理组取3个复孔.

1.2.3 原位末端标记法 将无菌盖玻片置于培养板中,将培养瓶中细胞用胰酶消化制成细胞悬液,等量(约 4×10^6 个/孔)接种于培养板内盖玻片上,待细胞贴壁且处于对数生长期时,上述方式分组处理后,40 g/L多聚甲醛固定30 min,用TdT酶将生物素标记的dUTP连接到DNA断裂端的3'OH上,加入ABC反应试剂作用后,用DAB/H₂O₂液显色,苏木精复染,中性树胶封片.凋亡指数的计算:随机计数高倍视野下细胞每100个细胞中阳性细胞数,即为凋亡指数.

统计学处理 采用mean $\pm$ SD表示数据结果, t 检验, χ^2 检验等统计学方法进行分析.

2 结果

用不同MOI的Ad-I κ B α M及Ad-I κ B α 感染SGC-7901细胞,48 h后用荧光显微镜观察,结果发现,随着MOI的增高发出绿色荧光的阳性感染细胞(图1)数量逐渐增多.当MOI等于50时,感染效率达到40%,当MOI等于100时,感染效率超过90%,故选择100 MOI作为实验最佳MOI值.

2.1 凝胶电泳迁移阻滞实验 可见胃癌SGC-7901细胞受到化疗药物5-FU处理前(0 h)细胞内NF- κ B基本无活性;5-FU处理0.5 h NF- κ B具有较强的活性,2 h活性降低,12 h则无活性(图2).在检测感染Ad-I κ B α M及Ad-I κ B α 对NF- κ B抑制作用的实验中,感染Ad-I κ B α M及Ad-I κ B α 48 h后,5-FU诱导0.5 h收获细胞,提取核蛋白.感染Ad-I κ B α M的细胞NF- κ B无明显的活化现象(图3),NF- κ B的活性完全被Ad-I κ B α M抑制;感染Ad-I κ B α 对照组则仍有NF- κ B的活化现象,可见感染Ad-I κ B α 对NF- κ B活性的抑制作用较弱($\rightarrow$ 所示为NF- κ B阳性条带).

2.2 MTT比色法检测抑制率 常规培养的细胞感染Ad-I κ B α M实验组及感染I κ B α 的感染对照组胃癌细胞生长均受到抑制,但两者之间比较差别无统计学意义,说明I κ B α M及I κ B α 本身对肿

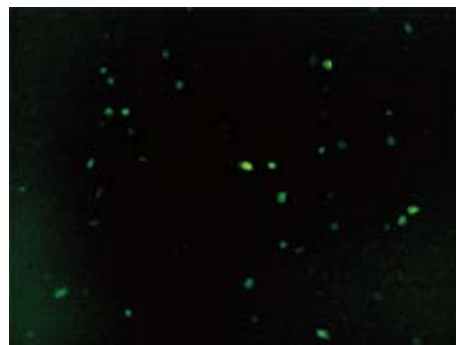
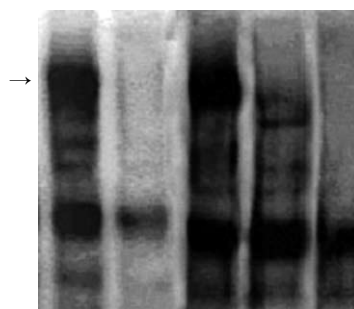
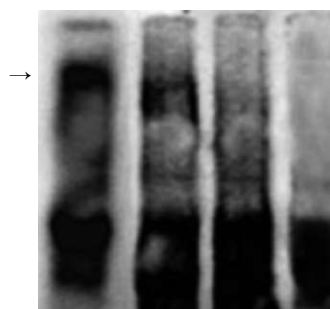


图1 发出绿色荧光的阳性感染细胞($\times 100$).



阳性对照 0 0.5 2 12 (t/h)

图2 5-FU处理不同时间NF- κ B活性变化.



阳性对照 空白对照 感染对照 实验组

图3 经5-FU处理0.5 h NF- κ B的活性.

瘤细胞的生长无影响,两者与空白对照组之间的差别是腺病毒自身的毒性引起的.5-FU处理后各组间生长抑制率比较:感染Ad-I κ B α M实验组>感染Ad-I κ B α 对照组>空白对照组,三者之间采用LSD- t 检验,两两比较 $P<0.001$ (56.36 ± 0.60 vs 47.50 ± 1.42 , $t=11.89$; 47.50 ± 1.42 vs 42.95 ± 1.27 , $t=7.81$; 56.36 ± 0.60 vs 42.95 ± 1.27 , $t=19.70$),其差别均具有统计学意义,可见感染Ad-I κ B α M可明显提高5-FU致胃癌7901细胞的生长抑制(图4).

2.3 原位末端标记法 凋亡细胞核染上棕褐色,而正常细胞核被染成淡蓝色.常规培养的细胞各组间比较凋亡百分率没有显著性差别;5-FU处

理的细胞各组间比较: 感染Ad-IκBαM的实验组>感染Ad-IκBα的对照组>空白对照组, 组间两两比较: 29.7 ± 2.5 vs 20.0 ± 2.6 , $\chi^2 = 7.51$, $P < 0.01$; 29.7 ± 2.5 vs 12.3 ± 1.1 , $\chi^2 = 26.91$, $P < 0.01$, 差别具有统计学意义(表1)。

3 讨论

胃癌的发病率和死亡率均居我国恶性肿瘤的第一位^[13]。5-FU为胃癌化疗首选药物, 诸多化疗方案都以其为基础。但在多年的临床工作中人们却发现, 5-FU等许多化疗药物在诱导胃癌细胞凋亡的过程中会产生耐药性, 关于其机制一直未能明确。1996年Hsu *et al*^[14]发现, 当TNF作用于肿瘤细胞时, 肿瘤细胞通过激活NF-κB而发挥抗凋亡途径。随后, 越来越多的研究表明, 肿瘤细胞对抗癌药物诱导的细胞凋亡的抗凋亡能力与NF-κB激活直接相关^[15-16]。NF-κB抗凋亡机制的研究, 使人们对肿瘤细胞抗凋亡机制的研究有了突破性的进展。如何有效地抑制NF-κB的活性进而将其用于肿瘤的治疗成为近年肿瘤治疗的新焦点。抑制NF-κB活性的方法有很多^[17-23], 近年来国内外学者在应用NF-κB超抑制物IκBαM为基因治疗手段治疗肿瘤, 以提高化疗药的敏感性方面作了大量的工作, 以定点诱变和N端缺失的方式构建而成的NF-κB超抑制物IκBαM, 对肿瘤细胞的抗凋亡能力有明显的抑制作用^[24-29]。重组腺病毒Ad-IκBαM, 自其构建以来, 已将其应用于肝癌细胞、血管内皮细胞等进行研究, 均证明其可明显抑制NF-κB活化。

Uetsuka *et al*^[6]通过体外实验证明, 用5-FU分别对5-FU耐药的胃癌细胞株(NUGC3/5FU/L)和对5-FU敏感的胃癌细胞株(NUGC3)进行处理, 结果NUGC3/5FU/L细胞株可见明显的NF-κB激活, 但在NUGC3中则无NF-κB激活。Camp *et al*^[7]通过体外实验证明, 可以通过抑制NF-κB活化的方法降低胃癌细胞对5-FU的耐药性, 国内尚无此方面的研究报道。本实验证明, 当胃癌SGC-7901细胞受到5-FU作用后, 细胞内的核转录因子NF-κB被激活; 感染Ad-IκBαM的细胞内NF-κB的活性完全被IκBαM抑制; 感染Ad-IκBα的细胞中NF-κB活性不能完全被抑制, 可能是IκBα被部分磷酸化降解的原因。进一步的实验表明, 感染Ad-IκBαM后, 5-FU对胃癌细胞生长抑制及诱导凋亡作用也明显增强, 而感染Ad-IκBα的细胞对5-FU的诱导凋亡作用的增强作用则较差。由此我们可以得出, 5-FU在诱导胃癌细

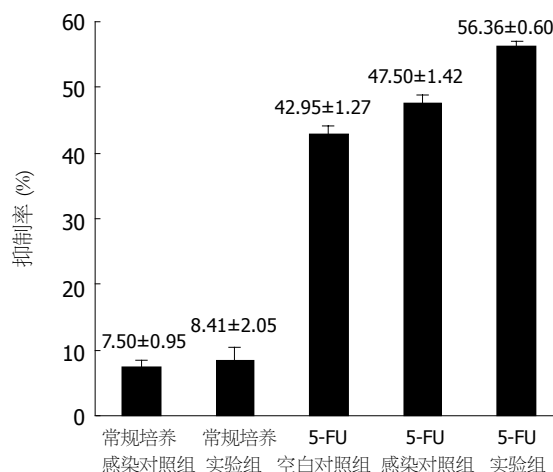


图4 MTT法测定生长抑制率。

表1 胃癌SGC-7901细胞凋亡百分率 (mean ± SD)

	实验组	感染对照组	空白对照组
常规培养	2.3 ± 1.5	2.3 ± 0.6	1.7 ± 0.6
5-FU处理	29.7 ± 2.5	20.0 ± 2.6	12.3 ± 1.1

胞凋亡的同时激活了细胞内的NF-κB, 使胃癌细胞内的抗凋亡机制激活产生耐药性。应用重组腺病毒Ad-IκBαM可以有效的抑制NF-κB激活, 因此可明显降低胃癌细胞对5-FU的耐药性, 增强5-FU的抗胃癌作用。5-FU联合基因治疗的方法将为胃癌的治疗开辟一条新的途径。

4 参考文献

- Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 2003; 9: 575-581
- Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 2003; 115: 565-576
- Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M, Xiao W, Dixit VM. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 2004; 427: 167-171
- Duan L, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, Morimoto T, Wakimoto H, Nagasaka Y, Hirakawa K, Ohno K, Yamamoto K. Impairment of both apoptotic and cytoprotective signalings in glioma cells resistant to the combined use of cisplatin and tumor necrosis factor alpha. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 234-243
- Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*

应用要点

国外学者正在对应用NF-κB超抑制物IκBαM进行广泛深入的研究, 取得了一些有意义的结果, 有些已经申请专利。因此, 无论从拥有我国自主知识产权的药物所具有的潜在的巨大的经济效益和有效治疗恶性肿瘤所具有的巨大的社会效益来看, 该课题均具有重要的意义。

■同行评价

本文研究了重组腺病毒Ad-IκBαM对5-FU诱导胃癌细胞凋亡的作用情况,实验设计合理,方法较为先进,结论明确,证实了NF-κB在胃癌抗5-FU诱导凋亡中的作用。

- 2003; 22: 90-97
- 6 Uetsuka H, Haisa M, Kimura M, Gunduz M, Kaneda Y, Ohkawa T, Takaoka M, Murata T, Nobuhisa T, Yamatsuji T, Matsuoka J, Tanaka N, Naomoto Y. Inhibition of inducible NF-kappaB activity reduces chemoresistance to 5-fluorouracil in human stomach cancer cell line. *Exp Cell Res* 2003; 289: 27-35
- 7 Camp ER, Li J, Minnich DJ, Brank A, Moldawer LL, MacKay SL, Hochwald SN. Inducible nuclear factor-kappaB activation contributes to chemotherapy resistance in gastric cancer. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 249-258
- 8 Davis N, Ghosh S, Simmons DL, Tempst P, Liou HC, Baltimore D, Bose HR Jr. Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* 1991; 253: 1268-1271
- 9 Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 1995; 267: 1485-1488
- 10 Brockman JA, Scherer DC, McKinsey TA, Hall SM, Qi X, Lee WY, Ballard DW. Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2809-2818
- 11 刘冰熔, 黄爱龙, 沈鼎明. 中国人IκBα基因的克隆和序列分析. 免疫学杂志 2002; 18: 81-84
- 12 刘冰熔, 黄爱龙, 肖戡君, 沈鼎明. NF-κB超抑制物IκBαM重组腺病毒的构建. 免疫学杂志 2004; 20: 65-70
- 13 李诚, 周健. 胃癌流行病学与分子生物学病因的研究进展. 肿瘤防治研究 2004; 31: 115-118
- 14 Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308
- 15 Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784
- 16 Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 2002; 1: 493-503
- 17 Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS Jr, Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC Jr. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 183-193
- 18 Dong QG, Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Peng B, Wu T, Tsao MS, Evans DB, Abbruzzese JL, McDonnell TJ, Chiao PJ. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 6510-6519
- 19 Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 2000; 60: 3477-3483
- 20 Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 3727-3738
- 21 Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, Pandol SJ. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int J Cancer* 2002; 98: 761-769
- 22 Nawata H, Maeda Y, Sumimoto Y, Miyatake J, Kanamaru A. A mechanism of apoptosis induced by all-trans retinoic acid on adult T-cell leukemia cells: a possible involvement of the Tax/NF-kappaB signaling pathway. *Leuk Res* 2001; 25: 323-331
- 23 Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 1759-1767
- 24 Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 784-787
- 25 Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 787-789
- 26 Shinoura N, Yamamoto N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in combination with superrepressor of NF-kappaB drastically induced apoptosis in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 544-552
- 27 Chen S, Fribley A, Wang CY. Potentiation of tumor necrosis factor-mediated apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of NF-kappaB inhibitor. *J Dent Res* 2002; 81: 98-102
- 28 Duffey DC, Crowl-Bancroft CV, Chen Z, Ondrey FG, Nejad-Sattari M, Dong G, Van Waes C. Inhibition of transcription factor nuclear factor-kappaB by a mutant inhibitor-kappaBalpha attenuates resistance of human head and neck squamous cell carcinoma to TNF-alpha caspase-mediated cell death. *Br J Cancer* 2000; 83: 1367-1374
- 29 向明确, 黄爱龙, 唐霓, 肖戡君, 闫歌, He TC. 重组腺病毒IκBαM在人肝癌细胞HepG₂中的表达及对NF-κB活性的抑制. 中华医学杂志 2003; 83: 1156-1160

电编 张敏 编辑 潘伯荣

幽门螺杆菌疫苗接种小鼠产生免疫后胃炎的影响因素

陈洁, 陈旻湖, 王锦辉, 朱森林

陈洁, 陈旻湖, 王锦辉, 朱森林, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080

陈洁, 2002年获中山大学医学博士, 讲师, 2002-2004年德国马格德堡Otto-von-Guericke大学医学院胃肠、肝病及感染病系消化肿瘤实验室博士后, 主要从事幽门螺杆菌相关疾病以及消化道肿瘤研究。

广东省自然科学基金资助项目, No. 021889

通讯作者: 陈旻湖, 510080, 广东省广州市中山二路58号, 中山大学附属第一医院消化内科. chenminhu@vip.163.com

电话: 020-87332916 传真: 020-87332916

收稿日期: 2006-06-15 接受日期: 2006-06-27

Influence factors of post-immunization gastritis after *Helicobacter pylori* vaccine immunization in mice

Jie Chen, Min-Hu Chen, Jin-Hu Wang, Sen-Lin Zhu

Jie Chen, Min-Hu Chen, Jin-Hu Wang, Sen-Lin Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 021889

Correspondence to: Dr. Min-Hu Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. chenminhu@vip.163.com

Received: 2006-06-15 Accepted: 2006-06-27

Abstract

AIM: To explore the influence factors of post-immunization gastritis after *H pylori* vaccine immunization in mice.

METHODS: (1) C₅₇BL/6 and BALB/c mice were orally immunized with *H pylori* vaccine (*H pylori* whole cell sonicate antigen plus mucosa adjuvant cholera toxin). Gastric *H pylori* infection and inflammation were evaluated after *H pylori* challenge. (2) C₅₇BL/6 mice were orally immunized with *H pylori* vaccine, and then challenged by different amounts of *H pylori*. Gastric *H pylori* infection and inflammation were evaluated after *H pylori* challenge. (3) C₅₇BL/6 mice were immunized orally or intraperitoneally with *H pylori* vaccine. Gastric *H pylori* infection and inflammation were evaluated after *H pylori* challenge at different time points. (4) Infected C₅₇BL/6 mice were orally immunized with *H pylori* vaccine,

and gastric *H pylori* infection and inflammation were evaluated after immunization at different time points.

RESULTS: (1) Similar decreasing of *H pylori* colonization was found in both C₅₇BL/6 and BALB/c mice. However, C₅₇BL/6 mice showed more severe post-immunization gastritis than BALB/c mice did. (2) Although *H pylori* colonization was similar in all groups with different challenging amounts, larger amount of *H pylori* challenge induced more severe post-immunization gastritis. (3) Similar post-immunization gastritis and decreasing of *H pylori* colonization were found in mice with both oral and intraperitoneal immunization at different time points. (4) Therapeutic immunization led to significant decreasing of *H pylori* colonization in infected mice; meanwhile more severe gastritis was also found in therapeutic group when compared with that in control group.

CONCLUSION: Post-immunization gastritis occurs in different immune hosts, the same hosts with different vaccination routes and hosts received therapeutic immunization. *H pylori* challenge amounts and immune host are influential factors of post-immunization gastritis degree.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Vaccine; Post-immunization gastritis; Mice

Chen J, Chen MH, Wang JH, Zhu SL. Influence factors of post-immunization gastritis after *Helicobacter pylori* vaccine immunization in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(23):2275-2280

摘要

目的: 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)疫苗接种小鼠产生免疫后胃炎的影响因素。

方法: 将*H pylori*疫苗免疫C₅₇BL/6和BALB/c的小鼠, 观察攻击后胃黏膜*H pylori*定植和炎症情况。将*H pylori*疫苗免疫C₅₇BL/6小鼠, 然后予不同菌量的*H pylori*攻击, 观察胃黏膜*H pylori*定植和炎症情况。将*H pylori*疫苗经口和经腹腔免疫C₅₇BL/6小鼠, 观察攻击后胃黏

■背景资料

幽门螺杆菌(*H pylori*)是慢性活动性胃炎和消化性溃疡的重要致病菌, 并与胃腺癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤发病相关。大量动物实验表明, 通过适当的抗原传递系统(Antigen delivery system)如佐剂或细菌、病毒载体将*H pylori*抗原导入机体进行免疫接种可预防甚至治疗*H pylori*感染, 说明有效的疫苗接种可诱导机体产生保护性免疫反应。

■应用要点

近年来在利用 *H pylori* 疫苗所做的免疫实验中, 免疫后胃炎, 即免疫动物受到 *H pylori* 攻击后出现较单纯感染对照更为严重的胃炎这一现象引起越来越多关注, 对免疫后胃炎的实质以及其影响因素的研究将加深我们对 *H pylori* 疫苗保护性免疫机制认识, 同时对 *H pylori* 疫苗应用于人体的安全性提供有价值的资料。

膜 *H pylori* 定植和炎症情况。对感染 *H pylori* 的 C₅₇BL/6 小鼠予 *H pylori* 疫苗治疗, 观察治疗免疫后胃黏膜 *H pylori* 定植和炎症情况。

结果: 不同品系的小鼠免疫保护程度无明显差异, 但 C₅₇BL/6 小鼠免疫后胃炎重于 BALB/c 小鼠。接受不同攻击菌量的小鼠保护程度无明显差异, 但大的攻击菌量可诱导更严重的免疫后炎症。不同免疫途径诱导的免疫保护程度及攻击后不同时间点的炎症程度均无显著性差异。治疗性免疫导致 *H pylori* 定植明显降低, 同时也引发更为严重的胃炎。

结论: 在不同的免疫宿主、免疫途径和治疗性免疫中均存在免疫后胃炎。免疫后胃炎的强弱程度受免疫宿主和攻击菌量的影响。

关键词: 幽门螺杆菌; 疫苗; 免疫后胃炎; 小鼠

陈洁, 陈旻湖, 王锦辉, 朱森林. 幽门螺杆菌疫苗接种小鼠产生免疫后胃炎的影响因素. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2275-2280

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2275.asp>

0 引言

在幽门螺杆菌 (*H pylori*) 疫苗免疫的动物实验中, 免疫后胃炎这一现象引起了越来越多的关注。早在90年代初 Eaton *et al*^[1] 即报道免疫后的悉生小猪受到 *H pylori* 攻击时出现较感染对照更为严重的活动性胃炎。以后一些研究者在他们的实验中均提及了这一现象^[2-4], 而且发现这种胃炎的严重程度与免疫动物受保护的度相关, 为了和单纯 *H pylori* 感染导致的胃炎区别, 将其称为免疫后胃炎 (post-immunization gastritis)。免疫后胃炎的报道引起人们对 *H pylori* 疫苗用于人体的安全性的担忧^[5]。对免疫后胃炎的一种解释是由于免疫反应未能彻底清除攻击细菌, 残存的细菌导致了炎症的发生^[2]。Eaton *et al*^[6] 用联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠所做的被动免疫实验提示免疫后胃炎与细胞免疫有关; Sutton *et al*^[7] 的报道也指出免疫后胃炎是由细胞免疫导致的一过性增强的炎症反应, 而且对免疫动物用猫胃螺杆菌 (*H. files*) 攻击较 *H pylori* 攻击可诱发更为严重的免疫后胃炎, 提示免疫后胃炎严重程度受细菌因素影响。我们前期的研究表明, 不同抗原传递系统组成的 *H pylori* 疫苗即以减毒鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 为载体构建的重组 *H pylori* 疫苗和以黏膜免疫佐剂霍乱毒素 (cholera toxin, CT) 加 *H pylori* 全菌超声粉碎抗原组成的

疫苗免疫小鼠后均出现免疫后胃炎, 免疫后胃炎实质上是免疫动物受到 *H pylori* 攻击后增强的 Th1 反应的一种表现, 他是伴发于抗 *H pylori* 感染免疫应答的组织病理损伤^[8-11]。我们将进一步探讨免疫后胃炎的其他影响因素, 包括宿主、免疫途径、攻击细菌量等; 了解治疗性免疫 (即对已经感染 *H pylori* 的动物进行免疫) 是否也会导致免疫后胃炎以及免疫后胃炎的持续时间, 这些问题的研究将进一步加深我们对 *H pylori* 疫苗保护性免疫机制认识, 同时对 *H pylori* 疫苗应用于人体的安全性提供有价值的资料。

1 材料和方法

1.1 材料 C₅₇BL/6 和 BALB/c 小鼠 (清洁级) 均为 ♀, 8 周龄, 体质量 17-20 g, 由中国医学科学院医学实验动物研究所提供。所用 *H pylori* SS1 菌株 (Sydney Strain 1) 为澳大利亚新南威尔士大学微生物学院 Adrian Lee 教授惠赠。霍乱毒素购自 Sigma 公司。*H pylori* 培养和全菌超声粉碎抗原的制备均按我室建立方法进行^[10]。

1.2 方法

1.2.1 免疫宿主对免疫后胃炎的影响 C₅₇BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠各 30 只, 随机分为免疫组 (20 只) 和对照组 (10 只)。免疫组在第 1 周和第 4 周分别灌胃 CT 5 μg + *H pylori* 超声粉碎抗原 1 mg, 对照组予生理盐水 (normal saline, NS) 100 μL。第 2 次免疫后 4 wk 给予 *H pylori* SS1 菌株攻击 1 次 (5 × 10⁷ cfu), 攻击后 5 wk 处死所有小鼠, 观察胃黏膜 *H pylori* 定植和炎症情况。按照我们既往的报道^[8-11], 胃黏膜 *H pylori* 定植通过快速尿素酶试验和组织学检查评价, 胃黏膜炎症情况通过组织学检测评分。

1.2.2 攻击菌量对免疫后胃炎的影响 C₅₇BL/6 小鼠随机分为 3 个免疫组 (15 只/组) 和 1 个对照组 (10 只)。免疫组在第 1 周和第 4 周分别灌胃 CT 5 μg + *H pylori* 超声粉碎抗原 1 mg, 对照组予 NS 100 μL。第 2 次免疫后 4 wk, 3 个免疫组分别予 *H pylori* SS1 菌株 5 × 10⁷ cfu × 2 次, 5 × 10⁷ cfu × 1 次和 5 × 10⁵ cfu × 1 次攻击, 对照组予 SS1 5 × 10⁷ cfu 攻击 1 次。攻击后 5 wk 处死所有小鼠, 观察胃黏膜 *H pylori* 定植和炎症情况。

1.2.3 免疫途径对免疫后胃炎的影响 C₅₇BL/6 小鼠随机分为经口免疫组 (40 只), 腹腔免疫组 (40 只) 和对照组 (25 只)。免疫组在第 1 周和第 4 周分别予 CT 5 μg + *H pylori* 超声粉碎抗原 1 mg 进行灌胃或 ip 免疫, 对照组予 NS 100 μL。第 2 次免疫

表 1 各组实验小鼠在攻击后5 wk的*H pylori*定植情况和炎症评分

分组	n	<i>H pylori</i> 定植		炎症评分	
		尿素酶 试验	组织学 评分	胃体	胃窦
BALB/c小鼠对照组	10	2	3	1	0.5
BALB/c小鼠免疫组	20	0	0.5	2	1
C ₅₇ BL/6小鼠对照组	10	2	3	1.2	0.5
C ₅₇ BL/6小鼠免疫组	20	0	0	3	1.5

表 2 各组实验小鼠在攻击后5 wk的*H pylori*定植情况和炎症评分

分组	n	攻击菌量 (cfu)	<i>H pylori</i> 定植		炎症评分	
			尿素酶 试验	组织学 评分	胃体	胃窦
对照组	10	$5 \times 10^7 \times 1$ 次	2	3	1	0.5
免疫组	15	$5 \times 10^7 \times 2$ 次	0	0.5	3	2
免疫组	15	$5 \times 10^7 \times 1$ 次	0	0	3	2
免疫组	15	$5 \times 10^5 \times 1$ 次	0	0	2	1.5

表 3 各组实验小鼠在攻击后不同时间点的*H pylori*定植情况

分组	尿素酶实验					<i>H pylori</i> 定植组织学评分				
	3 wk	6 wk	12 wk	26 wk	35 wk	3 wk	6 wk	12 wk	26 wk	35 wk
对照组	1.5	2	2	2	2	2	2.5	3	3	3
经口免疫组	1	0	0	0	0	1.2	0.5	0	0	0
腹腔免疫组	1	0.5	0	0	0	1.5	0.8	0.5	0	0

后第4周予*H pylori* SS1菌株攻击1次(5×10^7 cfu), 攻击后3, 6, 12, 26, 35 wk免疫组各处死8只小鼠, 对照组5只, 观察胃黏膜*H pylori*定植和炎症情况。

1.2.4 治疗性免疫对免疫后胃炎的影响 C₅₇BL/6小鼠随机分为免疫治疗组(40只)和对照组(25只)。全部小鼠先予*H pylori* SS1菌株感染(5×10^7 cfu $\times$ 2次), 感染4 wk后治疗组予CT 5 μ g+*H pylori*超声粉碎抗原1 mg进行灌胃免疫, 1 wk 1次, 连续4次。对照组灌胃同体积NS。免疫后3, 6, 12, 26, 35 wk治疗组各处死8只小鼠, 对照组5只, 观察胃黏膜*H pylori*定植和炎症情况。

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件进行。各组尿素酶试验结果、*H pylori*定植评分和胃黏膜炎症评分均以中位数(median, *Med*)表示, 采用Kruskal-Wallis秩和检验和Mann-whitney秩和检验对变量进行比较, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 免疫宿主对免疫后胃炎的影响 和对照组相比C₅₇BL/6小鼠和BALB/c小鼠免疫组在*H pylori*攻击后5 wk胃黏膜*H pylori*定植量均明显降低(免疫 vs 对照, $P < 0.001$), 但两免疫组保护程度无明显差异; 和对照组相比两免疫组均出现更为严重的胃炎(免疫 vs 对照, $P < 0.01$), 以胃体及窦体交界黏膜中底部和黏膜下层为明显, C₅₇BL/6

小鼠的炎症程度重于BALB/c小鼠($P = 0.043$, 表1)。

2.2 攻击菌量对免疫后胃炎的影响 和对照组相比3个免疫组在*H pylori*攻击后5 wk胃黏膜*H pylori*定植量均明显降低($P < 0.001$), 但3组保护程度无明显差异; 3免疫组均出现较对照组更为严重的胃炎(表2), 5×10^7 cfu攻击菌量诱导的炎症程度重于 5×10^5 cfu攻击菌量($P = 0.037$)。

2.3 免疫途径对免疫后胃炎的影响 和对照组相比经口免疫组和腹腔免疫组在攻击后各时间点胃黏膜*H pylori*定植量均明显降低($P < 0.001$), 且免疫组随时间推移*H pylori*定植逐渐减少, 但两免疫组各时间点保护程度无明显差异。和对照组相比免疫组在攻击后3, 6, 12 wk出现更为严重的胃炎($P < 0.01$), 以胃体及窦体交界黏膜中底部和黏膜下层为明显, 但不同免疫途径免疫组炎症程度无显著性差异; 攻击后26, 35 wk免疫组炎症程度有所减轻而对照组炎症程度逐渐加重, 免疫组和对照组炎症程度相比无显著性差异(表3)。在整个实验期间除炎症反应外, 所有小鼠胃黏膜未见萎缩、肠化生等病理改变(图1)。

2.4 治疗性免疫对免疫后胃炎的影响 和对照组相比治疗组在免疫后各时间点*H pylori*定植均明显降低($P < 0.01$), 且治疗组随时间推移*H pylori*定植逐渐减少(表4); 治疗组在免疫后3, 6, 12 wk出现较对照组更为严重的胃炎($P < 0.05$), 免疫后26, 35 wk治疗组炎症程度较前有所减轻, 但和对照

■同行评价

本文研究了宿主、免疫途径、攻击细菌量等对免疫后胃炎的影响, 证明宿主因素也会影响免疫后胃炎的严重程度; 经口免疫和腹腔免疫两种途径达到的免疫保护程度无明显差异, 两种免疫途径均导致了程度相似的免疫后胃炎, 证明免疫后胃炎的产生与不同的免疫接种途径无关。研究选题准确, 设计合理, 结果数据可信, 结论明确, 具有一定的理论意义。

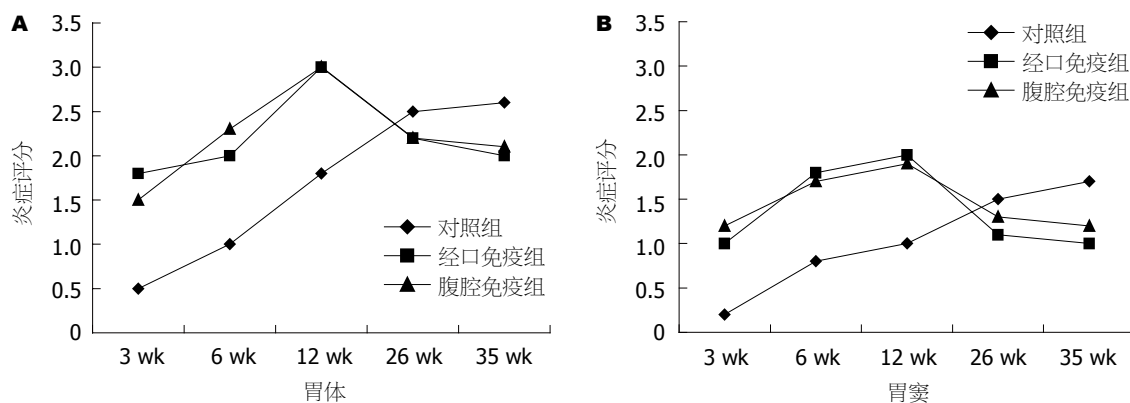


图 1 不同时间点各组小鼠胃体炎症、胃窦炎症评分结果. A: 小鼠胃体炎症; B: 小鼠胃窦炎症.

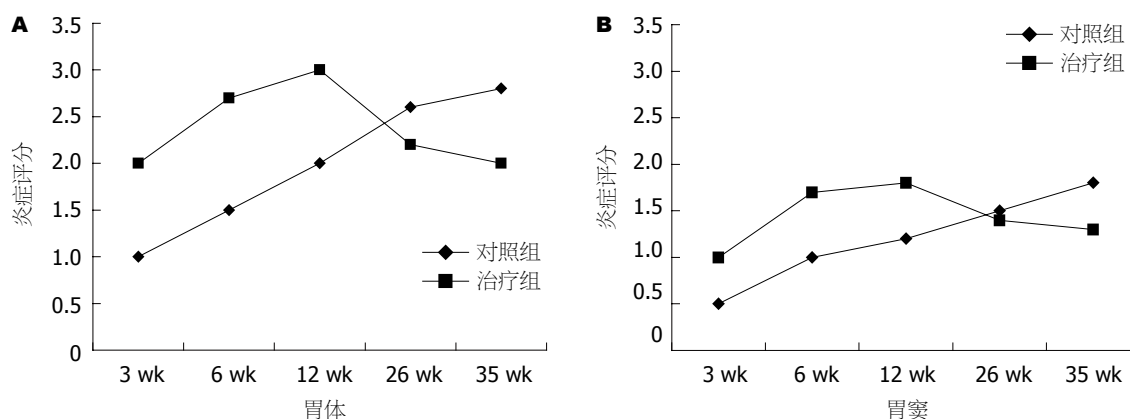


图 2 不同时间点对照组和治疗组小鼠胃体炎症、胃窦炎症评分结果. A: 小鼠胃体炎症; B: 小鼠胃窦炎症.

表 4 治疗组和对照组小鼠在免疫后不同时间点的 *H. pylori* 定植情况

分组	尿素酶实验					<i>H. pylori</i> 定植组织学评分				
	3 wk	6 wk	12 wk	26 wk	35 wk	3 wk	6 wk	12 wk	26 wk	35 wk
对照组	2	2	2	2	2	2.5	3	3	3	3
治疗组	1	1	1	0	0	1.5	1.5	0.5	0	0

组相比无显著性差异(图2).

3 讨论

虽然有不少文献都提及了免疫后胃炎这一现象, 但对其进行系统研究的报道极少. 我们前期的研究已经证明, 免疫后胃炎的实质是免疫动物受到 *H. pylori* 攻击后早期增强的 Th1 反应的一种表现, 他是伴发于抗 *H. pylori* 感染免疫的组织病理损伤. 免疫后胃炎和 *H. pylori* 感染本身导致的胃炎的实质是一样的, 但在时间上 *H. pylori* 感染本身导致的胃炎较免疫后胃炎明显延迟^[8-11]. Sutton *et al*^[7] 报道, 对免疫动物用 *H. files* 攻击较 *H. pylori* 攻击可诱发更为严重的免疫后胃炎, 提示免疫后胃炎严重程度受细菌因素影响. 虽然

免疫后胃炎在不同的动物模型包括悉生小猪、雪貂、小鼠^[1-2,7,12-13]中均有报道, 但是没有研究对不同宿主的免疫后胃炎进行比较. 本研究对 C₅₇BL/6 和 BALB/c 2 种不同品系的小鼠予同样方案免疫, 再用 *H. pylori* 攻击, 结果发现 2 种小鼠免疫保护程度无明显差异, 但 C₅₇BL/6 小鼠的免疫后胃炎程度重于 BALB/c 小鼠, 证明宿主因素也会影响免疫后胃炎的严重程度.

在 *H. pylori* 自然感染的研究中, 许多文献报道认为胃组织病理损害的严重程度与活动度均与感染菌量呈正相关^[14-16]. 那么在 *H. pylori* 疫苗免疫动物模型中, 用于攻击感染的细菌量是否会对免疫后胃炎的严重程度产生一定影响呢? 我们比较了不同攻击菌量对免疫后胃炎的影响,

结果发现和单纯感染对照组相比,3个免疫组在*H pylori*攻击后5 wk胃黏膜*H pylori*定植量均明显降低,3个免疫组均出现较对照组更为严重的胃炎,5×10⁷ cfu攻击菌量诱导的炎症程度重于5×10⁵ cfu攻击菌量。这证明攻击菌量在早期可以影响免疫后胃炎的严重程度。由于*H pylori*是一种黏膜感染,在*H pylori*疫苗的研制中多数实验采用黏膜免疫进行接种,包括经口、经鼻黏膜和直肠黏膜等途径^[2,17-18]。值得注意的是免疫后胃炎多数出现于黏膜免疫途径接种的报道中,而在系统免疫途径中少有报道。我们比较了经口免疫和腹腔注射免疫两种不同免疫途径对免疫后胃炎的影响,结果发现经口免疫和腹腔免疫两种途径达到的免疫保护程度无明显差异,两种免疫途径均导致了程度相似的免疫后胃炎,证明免疫后胃炎的产生与不同的免疫接种途径无关。在现有的报道中,免疫后胃炎高峰期大多数出现于免疫动物受到攻击的早期,时间从攻击后1 wk到3 mo不等^[2-3,7,12],随着*H pylori*被清除,免疫后胃炎逐渐减轻,我们的研究也证明在不同疫苗^[8-11]、不同免疫宿主、不同免疫途径的免疫/感染模型中免疫后胃炎的高峰期多出现于攻击后5 wk,以后炎症程度逐渐减轻。但是文献报道和本研究均发现,虽然免疫后胃炎在高峰期过后逐渐减轻,但在现有的观察期内(Goto *et al*^[3]报道为18 wk, Ermak *et al*^[2]报道为54 wk, Sutton *et al*^[7]报道为18 mo,本研究最长为35 wk),免疫后胃炎并没有如预期的完全消退,而且随时间的推移免疫后胃炎和感染对照组的炎症程度已没有明显差异。对于*H pylori*减少乃至清除后免疫后胃炎在一定时间内仍然持续的原因,有研究推测与自身免疫反应有关^[19]。免疫后胃炎和*H pylori*感染本身导致的胃炎的实质都是Th1反应的一种表现,在Th1反应中产生的一些细胞因子,例如IFN-γ可以显著增加胃黏膜上皮细胞MHC II抗原的表达,而过度表达的MHC II抗原可以将自身抗原提呈给免疫细胞从而激发自身免疫反应。自身免疫反应也可以解释*H pylori*定植和免疫后胃炎产生部位的一些差异,因为*H pylori*多数定植于胃窦和窦体交界部位的胃黏膜^[20],然而免疫后胃炎产生的部位却以胃体和窦体交界部位的胃黏膜为主。

有关免疫后胃炎的报道多数见于预防性免疫实验,在治疗性免疫实验中报道较少,一些报道表明随着*H pylori*的根除,免疫动物的胃炎也随之减轻^[21-23]。但Whary *et al*^[13]对感染了鼯鼠螺

杆菌的雪貂进行免疫治疗,却使雪貂的十二指肠炎和溃疡等病理损害加重; Dieterich *et al*^[24]对感染海尔曼螺杆菌(*H. heilmannii*)的小鼠进行免疫治疗,结果使免疫小鼠胃黏膜细菌显著减少的同时也加重了胃体黏膜萎缩;近期Eaton *et al*^[25]所做的被动免疫治疗实验证明,将免疫C₅₇BL/6小鼠的脾细胞转移给*H pylori*感染的联合免疫缺陷(SCID)小鼠,结果受体鼠在被动免疫后出现了较单纯*H pylori*感染的C₅₇BL/6小鼠更为严重的胃炎,这种炎症反应由细胞免疫介导,在免疫后9 wk达到高峰,在免疫后45 wk随*H pylori*感染的清除而减退。本研究也证实,治疗性免疫使免疫小鼠*H pylori*感染清除的同时也导致了较对照鼠更为严重的胃炎,这种炎症反应在免疫后3-12 wk达到高峰,免疫后26 wk减轻,但和预防性免疫实验类似这种炎症直到实验期结束(免疫后35 wk)也没有完全消退,炎症持续的原因,推测也与自身免疫反应有关。对于治疗性免疫导致免疫后胃炎的现象我们可以做如下解释:在治疗性免疫中,已经存在的细菌感染对实验动物而言相当于“初次免疫”,而后来进行的免疫治疗则相当于再次免疫;再次免疫可以导致机体产生更强的免疫反应,在清除感染细菌的同时也加重了胃黏膜炎症反应。

总之,我们证实了在不同的免疫宿主、免疫途径和治疗性免疫中均存在免疫后胃炎。免疫后胃炎的强弱程度受免疫宿主和攻击菌量的影响。虽然到目前为止免疫后胃炎还没有在人体实验中报道,但仍然需要更多的尤其是临床实验提供*H pylori*疫苗应用于人体的安全性的数据。

4 参考文献

- 1 Eaton KA, Krakowka S. Chronic active gastritis due to *Helicobacter pylori* in immunized gnotobiotic piglets. *Gastroenterology* 1992; 103: 1580-1586
- 2 Ermak TH, Ding R, Ekstein B, Hill J, Myers GA, Lee CK, Pappo J, Kleanthous HK, Monath TP. Gastritis in urease-immunized mice after *Helicobacter felis* challenge may be due to residual bacteria. *Gastroenterology* 1997; 113: 1118-1128
- 3 Goto T, Nishizono A, Fujioka T, Ikewaki J, Mifune K, Nasu M. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immun* 1999; 67: 2531-2539
- 4 Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol* 1996;

- 156: 4729-4738
- 5 Zevering Y. Vaccine against *Helicobacter pylori*? *Ann Med* 2001; 33: 156-166
 - 6 Eaton KA, Ringler SR, Danon SJ. Murine splenocytes induce severe gastritis and delayed-type hypersensitivity and suppress bacterial colonization in *Helicobacter pylori*-infected SCID mice. *Infect Immun* 1999; 67: 4594-4602
 - 7 Sutton P, Danon SJ, Walker M, Thompson LJ, Wilson J, Kosaka T, Lee A. Post-immunisation gastritis and *Helicobacter* infection in the mouse: a long term study. *Gut* 2001; 49: 467-473
 - 8 Chen M, Chen J, Liao W, Zhu S, Yu J, Leung WK, Hu P, Sung JJ. Immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing catalase in protection against gastric *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter* 2003; 8: 613-625
 - 9 陈洁, 陈旻湖, 朱森林, 于君, 梁伟强, 陈为, 胡品津, 沈祖尧. 重组幽门螺杆菌疫苗免疫保护机制的研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 80-83
 - 10 陈洁, 陈旻湖, 李国庆, 焦志勇, 梁伟强, 胡品津, 沈祖尧. 幽门螺杆菌疫苗免疫小鼠的Th免疫应答及作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 739-743
 - 11 陈洁, 陈旻湖, 廖文俊, 于君, 梁伟强, 陈为, 胡品津, 沈祖尧. 重组幽门螺杆菌疫苗免疫保护作用与免疫后胃炎. *中国免疫学杂志* 2005; 21: 411-415
 - 12 Michetti P, Cortesey-Theulaz I, Davin C, Haas R, Vaney AC, Heitz M, Bille J, Kraehenbuhl JP, Saraga E, Blum AL. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology* 1994; 107: 1002-1011
 - 13 Whary MT, Palley LS, Batchelder M, Murphy JC, Yan L, Taylor NS, Fox JG. Promotion of ulcerative duodenitis in young ferrets by oral immunization with *Helicobacter mustelae* and muramyl dipeptide. *Helicobacter* 1997; 2: 65-77
 - 14 Jonkers D, Houben G, de Bruine A, Arends JW, Stobberingh E, Stockbrugger R. Prevalence of gastric metaplasia in the duodenal bulb and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. A clinical and histopathological study in 96 consecutive patients. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 481-483
 - 15 Satoh K, Kimura K, Yoshida Y, Kasano T, Kihira K, Taniguchi Y. A topographical relationship between *Helicobacter pylori* and gastritis: quantitative assessment of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 285-291
 - 16 Yamamura F, Yoshikawa N, Akita Y, Mitamura K, Miyasaka N. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and histologic features of gastritis in biopsy specimens in gastroduodenal diseases, including evaluation of diagnosis by polymerase chain reaction assay. *J Gastroenterol* 1999; 34: 461-466
 - 17 Cortesey-Theulaz IE, Hopkins S, Bachmann D, Saldinger PF, Porta N, Haas R, Zheng-Xin Y, Meyer T, Bouzourene H, Blum AL, Kraehenbuhl JP. Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* phoPc expressing urease A and B subunits. *Infect Immun* 1998; 66: 581-586
 - 18 Kleanthous H, Myers GA, Georgakopoulos KM, Tibbitts TJ, Ingrassia JW, Gray HL, Ding R, Zhang ZZ, Lei W, Nichols R, Lee CK, Ermak TH, Monath TP. Rectal and intranasal immunizations with recombinant urease induce distinct local and serum immune responses in mice and protect against *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 1998; 66: 2879-2886
 - 19 van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, Vandenbroucke-Grauls CM. *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 1999; 67: 3040-3046
 - 20 Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997; 112: 1386-1397
 - 21 Cortesey-Theulaz I, Porta N, Glauser M, Saraga E, Vaney AC, Haas R, Kraehenbuhl JP, Blum AL, Michetti P. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter* infection in mice. *Gastroenterology* 1995; 109: 115-121
 - 22 Cuenca R, Blanchard TG, Czinn SJ, Nedrud JG, Monath TP, Lee CK, Redline RW. Therapeutic immunization against *Helicobacter mustelae* in naturally infected ferrets. *Gastroenterology* 1996; 110: 1770-1775
 - 23 Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Cortesey-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 1999; 116: 804-812
 - 24 Dieterich C, Bouzourene H, Blum AL, Cortesey-Theulaz IE. Urease-based mucosal immunization against *Helicobacter heilmannii* infection induces corpus atrophy in mice. *Infect Immun* 1999; 67: 6206-6209
 - 25 Eaton KA, Mefford ME. Cure of *Helicobacter pylori* infection and resolution of gastritis by adoptive transfer of splenocytes in mice. *Infect Immun* 2001; 69: 1025-1031

电编 张敏 编辑 潘伯荣

L02细胞在2-乙酰氨基苄处理大鼠肝中的增殖

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 蒋黎, 李俊刚, 刘国栋

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 蒋黎, 李俊刚, 刘国栋, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038

林沪, 2003年第三军医大学西南医院感染病研究所硕士, 主治医师, 主要从事肝炎发病机制和病毒性肝炎动物模型的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271173

通讯作者: 毛青, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所。linhu7018@yahoo.com.cn

电话: 023-65399064 传真: 023-68754475

收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-06-05

Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with 2-acetaminofluorene

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Guo-Hong Deng, Li Jiang, Jun-Gang Li, Guo-Dong Liu

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Guo-Hong Deng, Li Jiang, Jun-Gang Li, Guo-Dong Liu, Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271173

Correspondence to: Hu Lin, Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. linhu7018@yahoo.com.cn

Received: 2006-05-09 Accepted: 2006-06-05

Abstract

AIM: To investigate whether human L02 hepatocytes can repopulate after implantation to the normal, immunocompetent rats treated with 2-acetaminofluorene.

METHODS: Human L02 hepatocytes were injected into the peritoneal cavities of fetal Sprague Dawley rats to induce immune tolerance. The 2-week rats were injected with different doses of 2-acetaminofluorene or normal saline, and received partial hepatectomy. After 1, 1'-Diocadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) staining, the hepatocytes were implanted to the 3-week rats via the spleen. Immuno-fluorescent staining, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), S-P immunohistochemistry, and DiI staining were used to detect human albumin, human albumin

mRNA and specific proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the rat liver. The distribution of human L02 hepatocytes was observed under fluorescent microscope. The number and area density of PCNA-positive cells were quantified with the help of computer-assisted image analyzer.

RESULTS: All the examined indicators were not significantly different between the rats treated with 2-acetaminofluorene and normal saline. Dynamic distribution of human L02 hepatocytes in the rat livers was observed from wk 1 to 10 after implantation. Human albumin and human albumin mRNA were detected from wk 2 to 8 after implantation and the peak content appeared at the 4th wk. Specific human PCNA was detected in the rat livers from wk 2 to 6 after implantation. There were the most PCNA-positive cells at the 4th wk. Nonspecific PCNA was detected in the rat livers from wk 1 to 8 after implantation.

CONCLUSION: Human L02 hepatocytes can not significantly repopulate after implantation to the normal, immunocompetent rats treated with 2-acetaminofluorene. Human L02 hepatocytes can survive for 10 wk after implantation, and exhibit unique hepatic biochemical functions for 8 wk.

Key Words: Chimeric liver; L02 hepatocytes; Animal model; Implantation; Rats

Lin H, Mao Q, Wang YM, Jiang YG, Deng GH, Jiang L, Li JG, Liu GD. Repopulation of human L02 hepatocytes in tolerant rats treated with 2-acetaminofluorene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2281-2287

摘要

目的: 应用2-乙酰氨基苄(2-acetaminofluorene, 2-AAF), 研究L02细胞移植到具有正常免疫性的大鼠肝内的存活与增殖情况。

方法: SD大鼠出生前宫内ip正常人L02肝细胞, 诱导胎鼠对L02肝细胞产生免疫耐受, 出生2 wk时分别ip小(1.2 mg/kg)、中(13 mg/kg)、大剂量(30 mg/kg)2-乙酰氨基苄或生理

■背景资料

人鼠嵌合肝是将人肝细胞移植到受体鼠肝脏内建立的动物模型, 但是, 直接给予受体鼠移植人肝细胞, 移植细胞的存活数量与时间很有限, 移植细胞在受体肝内的增殖是其存活及发挥功能的关键, 要建立稳定持久的人鼠嵌合肝动物模型, 必须提高移植细胞的增殖能力。

■研究前沿

目前常用肝脏毒性药物首先阻断受体细胞的细胞周期,抑制其增殖,联合再生刺激作用,二者共同促进移植肝细胞增殖。本研究采用卵圆细胞活化的基本模型,即2-AAF与部分肝切除术联合,观察2-AAF促进人鼠嵌合肝中移植细胞的增殖能力。

盐水,隔日行2/3肝切除术,同时经脾移植DiI染色后的人L02肝细胞,建立2-AAF/PH肝细胞增殖模型。采用免疫荧光、RT-PCR、免疫组化、DiI荧光示踪等方法,在不同时相分别检测人白蛋白、人白蛋白mRNA、增殖细胞核抗原(PCNA)以及在荧光显微镜下观察人L02肝细胞在鼠肝内的分布,并采用计算机图像分析系统分析不同时相PCNA阳性细胞的数密度和面积密度。

结果: 2-乙酰氨基苄实验组(小、中、大剂量)的各项检测,均与对照组无明显区别;于移植后1, 2, 4, 6, 8, 10 wk在荧光显微镜下观察到人L02肝细胞在鼠肝内的动态分布;移植后2, 4, 6, 8 wk大鼠均检测出人白蛋白及人白蛋白mRNA;移植后2, 4, 6 wk检测出特异性人增殖细胞核抗原PCNA,移植后1, 2, 4, 6, 8 wk检测出非特异性PCNA。

结论: 2-AAF/PH模型中, 2-乙酰氨基苄对移植L02细胞无明显增殖作用; L02细胞在2-乙酰氨基苄处理人鼠嵌合肝动物模型中存活10 wk,产生白蛋白功能持续8 wk。

关键词: 嵌合肝; L02肝细胞; 动物模型; 移植; 大鼠

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 蒋黎, 李俊刚, 刘国栋. L02细胞在2-乙酰氨基苄处理大鼠肝中的增殖. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2281-2287

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2281.asp>

0 引言

移植细胞在受体肝内的增殖是其存活及发挥功能的关键,必须提高移植细胞的增殖能力,才能建立稳定持久的人鼠嵌合肝动物模型^[1]。研究认为,移植细胞要大量增殖,必须满足2个条件:移植肝细胞有更强的生长优势;受体细胞的更新必须超过正常肝细胞更新水平,二者相辅相存的^[2]。前者常用肝脏毒性药物:倒千里光碱等生物碱、2-乙酰氨基苄(2-AAF)、dipin、呋喃(furan)、丝裂霉素、DDC(3'5'-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine)、烯丙醇、甲基亚硝基氨(DEN)等^[3-6],可阻断受体肝细胞进入再生周期;后者常采用四氯化碳、2/3肝切除(partial hepatectomy, PH)等^[7-8]再生刺激作用,二者共同促进移植肝细胞增殖。

2-AAF与PH联合,即卵圆细胞活化的基本模型^[9],目前国内外多用2-AAF抑制肝细胞的增殖,在肝细胞再生需求下,促进卵圆细胞的活化,但是否能促进人鼠嵌合肝中移植细胞的增殖却

少有报道。我们将诱导免疫耐受的大鼠首先ip 2-AAF, 2 wk后行PH,同时经脾移植DiI染色后的L02细胞,建立2-AAF/PH肝细胞增殖模型;采用免疫荧光、RT-PCR、免疫组化、DiI荧光示踪以及计算机图像分析系统等方法,检测嵌合于具有正常免疫活性大鼠肝内人L02细胞的存活、增殖情况。

1 材料和方法

1.1 材料 生育期SD大鼠6只,购自第三军医大学实验动物中心。选择大鼠孕龄15-17 d,体质量250-300 g者为实验对象。L02细胞属于人正常肝细胞,购自中国科学院上海细胞生物研究所。加入胰酶酶解后,1100 r/min,离心3 min,重新混悬。血细胞计数板计算肝细胞的数量,台盼蓝拒染法计算存活率,超过80%的用于实验。

1.2 方法 诱导胎鼠免疫耐受:对孕龄15-17 d的6只SD大鼠进行乙醚吸入麻醉。自孕鼠腹白线逐层依次剪开,暴露子宫。用1 mL注射器将50 μ L人L02细胞培养液(含 1×10^8 个细胞)缓慢经孕鼠子宫壁注射到胎鼠腹腔内,缝合腹腔。至孕鼠自然生产。药物配制:2-AAF用M400的聚乙二醇溶解,该溶剂毒性小。实验分组与药物注射:6只SD孕鼠共产胎鼠约60只,均分为实验组和对照组大鼠。实验组免疫耐受胎鼠,出生2 wk腹腔内注射2-AAF,分小(1.2 mg/kg)、中(13 mg/kg)、大剂量组(30 mg/kg),各分配约10只,考虑到2-AAF对肝细胞的抑制有累积剂量依赖性^[10],分别按小剂量组每日连续注射,共7针;中、大剂量组隔日注射,共4针。对照组免疫耐受鼠,出生2 wk ip生理盐水,其余与药物组同。实验组与对照组于注射结束后第2天,乙醚麻醉下行PH并经脾移植DiI染色的L02肝细胞培养液100 μ L (1×10^{12} /L)。PH:大鼠在乙醚吸入麻醉下,自腹白线暴露肝脏,用细丝线分别结扎左前叶、右前叶、右后叶及尾叶后切除,保留肝中叶,腹腔青霉素抗炎。DiI荧光染色:具体方法见文献^[11],标记细胞经4 g/L台盼蓝染色计数后,用PBS液调整细胞浓度为 1.0×10^{12} /L;于荧光显微镜诺丹明滤片下进行荧光观察并照相后送移植。L02细胞移植:出生2 wk的实验组胎鼠,乙醚吸入麻醉,自孕鼠腹白线逐层剪开,暴露脾,自脾系膜缘进针,向脾体和脾尾方向,将100 μ L经DiI染色的L02细胞培养液缓慢注入,轻压注射点,防止出血和渗液。L02细胞移植后1 wk取标本,2 wk开始每2 wk取1次标本,至10 wk结束,每次每组

取4只大鼠收集标本. 大鼠在乙醚吸入麻醉下行肝部分切除术, 新鲜肝组织送冰冻切片, 在荧光显微镜诺丹明滤片下观察; 部分组织用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋切片. 术后大鼠继续喂养. 用DiI染色L02肝细胞后, 移植前于荧光显微镜诺丹明滤片下观察; L02细胞移植后, 大鼠取新鲜肝组织送冰冻切片, 在荧光显微镜下观察.

1.2.1 免疫荧光检测肝组织人白蛋白 采用链霉菌亲生物素蛋白-过氧化酶法(strept avidin-biotin immunostaining, SP)免疫组织化学染色(中山公司PV-6002试剂盒). 新鲜肝组织用冰冻切片4-8 μm , 室温放置30 min后, 入4℃丙酮固定10 min, 37℃下100 mL/L封闭血清孵育20 min, 滴加鼠抗人白蛋白mAb(Sigma公司, 滴度1:400), 37℃孵育60 min或4℃过夜, 加荧光标记二抗, 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗大鼠IgG(滴度1:100), 37℃暗室下孵育45 min. 用900 mL/L缓冲甘油封片, 荧光显微镜下用蓝色滤光片观察. PBS替代一抗作阴性对照.

1.2.2 检测肝组织特异性人PCNA 采用SP免疫组织化学染色. 新鲜肝组织用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋后切片, 60℃烤箱中烤1-2 h, 脱蜡至水, 加入含0.5 g/L的Triton×100的PBS, 室温下孵育5 min, 37℃下30 mL/L过氧化氢孵育20 min, 特异性人PCNA mAb (Chemicon公司, 滴度1:200)或非特异性PCNA mAb(滴度1:200, 检测所有脊椎动物)4℃过夜, 然后加聚合物辅助剂和辣根酶标记羊抗鼠IgG多聚体. 底物用DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 光镜下观察. PBS替代一抗作阴性对照. 采用LeicaQWin计算机图像分析系统, 在100倍PCNA免疫组化切片下, 每个切片随机选取5个测量区域, 计算在不同时相PCNA阳性细胞的数密度(个/ μm^2)和面积密度($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$).

1.2.3 RT-PCR检测鼠肝组织人白蛋白mRNA 按Trizol提取RNA试剂说明进行, 采用BioDev公司RT-PCR试剂盒的两步法逆转录和扩增反应, 引物由大连Takara公司设计合成. 人白蛋白mRNA引物, 正向引物Hs: 5'-TCGACAACGGCTCCGGCAT-3', 反向引物Ha: 5'-AAGGTGTGGTGCCA GATTTTC-3', 扩增目的片段为241 bp; 正常大鼠白蛋白mRNA引物, 正向引物Rs: 5'-CGGTTT AGGGACTTAGGAGAACAGC-3', 反向引物Ra: 5'-ATAGTGTCCAGAAAGCTGGTAGGG-3', 扩增目的片段为388 bp. 扩增条件: 94℃预变性

5 min, 94℃变性50 s; 55℃退火50 s; 72℃延伸1 min; 共32个循环, 最后72℃延伸8 min. 采用未加入AMV反转录酶的扩增作为阴性对照以排除假阳性的可能. 产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上获取图像.

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 采用SPSS 10.0统计分析软件, 两均数的比较采用配对t检验.

2 结果

由于实验鼠太小, 无法活体取肝组织且不易继续喂养, 故在实验鼠出生2 wk时经脾移植L02细胞. 实验组1只大鼠因麻醉过量死亡; 对照组2只大鼠因麻醉过量死亡. 从未纳入实验和对照组的胎鼠中选取, 继续给药实验. 其余大鼠营养及生长状况良好.

2.1 DiI荧光示踪 DiI染色的阳性细胞在绿色滤光片下显示红色荧光. 细胞均匀着色呈圆形或椭圆形, 不能区分胞核与胞质. 3种剂量实验组和对照组未见明显区别. 实验组或对照组的4只实验大鼠1, 2, 4, 6, 8 wk均可检测出, 10 wk每组有2至3只大鼠仍可见较微弱的荧光细胞, 其他1至2只为阴性, 每组4只大鼠12 wk均未再检出. 早期时相L02细胞分布在受体鼠肝内的门静脉区域, 聚集成团分布, 以后逐渐扩散到肝实质区域. 荧光细胞数目逐渐减少, 亮度逐渐减弱, 维持10 wk左右, 最后留下细胞核呈现点状荧光, 逐渐消失. 移植后1 wk的DiI荧光显示: 荧光染色区域较多, 有的区域密集分布, 荧光亮度大, 提示移植的L02肝细胞较多, 说明刚从脾转移到肝的L02细胞尚未弥散; 有的区域散在分布, 提示移植的L02肝细胞相对较少. 移植后2 wk和4 wk的DiI荧光显示: 荧光染色区域较多, 未见密集分布, 可见荧光散在分布, 说明从脾转移到肝的L02细胞已逐渐弥散分布. 移植后8 wk的DiI荧光显示: 荧光细胞较少, 可见少量荧光点状分布, 荧光亮度明显减弱(图1).

2.2 鼠肝组织中人白蛋白 FITC标记荧光二抗, 阳性细胞在蓝色滤光片下显示为绿色荧光, 与周围大鼠肝细胞界限清楚, 胞核未着色. 3种剂量实验组和对照组未见明显区别. 移植L02细胞后2 wk的大鼠肝组织中即能检测到合成人白蛋白的L02细胞; 实验组的4只实验大鼠2, 4, 6 wk均可检测出合成人白蛋白的L02细胞, 以4 wk发现绿色荧光细胞最多; 8 wk有3只大鼠可见绿色荧光细胞, 1只为阴性, 4只大鼠10 wk均未再检出

■创新盘点

在诱导免疫耐受的人鼠嵌合肝动物模型基础上, 应用肝毒性药物2-AAF, 抑制受体肝细胞的增殖, 明确其提高移植细胞增殖功能. 同时, 对人鼠嵌合肝中移植细胞进行多样化检测: DiI示踪法动态显示其生存及分布; 免疫荧光证实移植细胞具有一定的生物学功能; 免疫组化对PCNA的检测, 及计算机细胞图像分析系统定量分析数密度和面积密度反映了移植细胞的增殖情况.

■应用要点

本研究证实, L02细胞宫内诱导胎鼠产生免疫耐受, 出生后移植到实验鼠肝内, 移植细胞可以在嵌合鼠体内整合、增殖, 并具有一定的生物学功能; 但是, 2-AAF不能促进移植肝细胞的增殖, 有待进一步应用其他方法, 建立长期稳定的动物模型, 从理论和实践中都能够证明人鼠嵌合肝动物模型的应用前景, 构建在正常免疫系统基础上的动物模型, 可为进一步研究病毒感染免疫应答、致病机制、抗病毒治疗等提供新的方法。

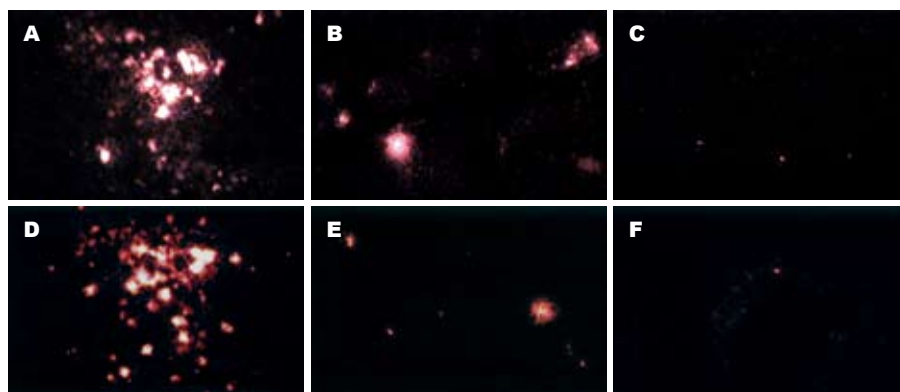


图 1 DiI染色L02细胞荧光图像($\times 200$). A, B, C: 实验组移植1, 4, 8 wk; D, E, F: 移植1, 4, 8 wk.

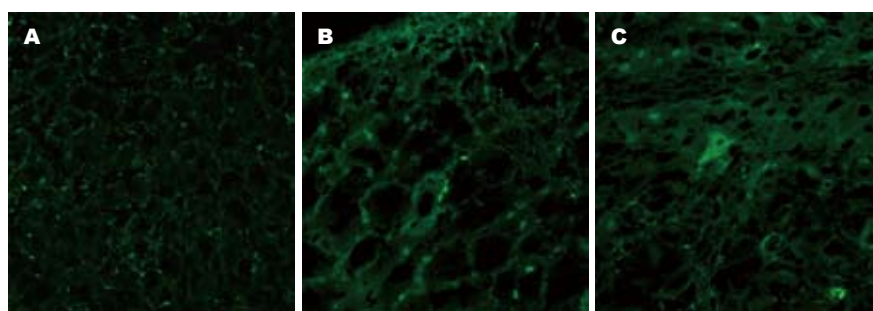


图 2 鼠肝组织中胞质呈绿色的L02细胞的免疫荧光($\times 400$). A: 正常鼠肝组织; B: 实验组移植4 wk鼠肝组织; C: 对照组移植4 wk鼠肝组织.

表 1 大鼠不同时相PCNA的数密度和面积密度(mean $\pm$ SD, $n = 4$)

	分组	1 wk	2 wk	4 wk	6 wk	8 wk
数密度(10^{-4} 个/ μm^2)	实验组1		0.14 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.08	
	对照组1		0.12 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.03	
	实验组2	6.26 $\pm$ 1.07	5.79 $\pm$ 0.75	6.32 $\pm$ 0.84	7.58 $\pm$ 1.17	5.18 $\pm$ 1.03
	对照组2	5.17 $\pm$ 1.05	7.42 $\pm$ 1.22	5.86 $\pm$ 1.12	4.46 $\pm$ 1.03	6.33 $\pm$ 0.75
面积密度(10^{-4} μm^2 / μm^2)	实验组1		1.58 $\pm$ 0.27	2.36 $\pm$ 0.26	1.17 $\pm$ 0.22	
	对照组1		1.38 $\pm$ 0.47	2.25 $\pm$ 0.33	1.74 $\pm$ 0.46	
	实验组2	54.6 $\pm$ 2.56	49.9 $\pm$ 3.37	52.7 $\pm$ 4.46	47.5 $\pm$ 3.58	51.4 $\pm$ 3.27
	对照组2	52.6 $\pm$ 1.73	67.2 $\pm$ 2.34	62.8 $\pm$ 1.83	55.2 $\pm$ 1.47	68.3 $\pm$ 1.73

(图2).

2.3 PCNA 实验组和对照组各取两份切片, 分组为: 实验组1: 一抗为特异性人PCNA mAb. 特异性人PCNA阳性的细胞核, DAB显色后均为棕色, 其实验组和对照组无区别. 移植L02细胞后1 wk的大鼠肝组织中未能检测到特异性人PCNA; 2 wk才能检测到特异性人PCNA; 每组4只实验大鼠2, 4, 6 wk均可连续检测出特异性人PCNA, 以4 wk发现PCNA阳性细胞最多, 4只大鼠8 wk均未再检出. 实验组2: 一抗为非特异性PCNA mAb. 非特异性PCNA阳性的细胞核, DAB显色后亦为棕色, 其实验组和对照组亦无区别. 移植L02细胞后1 wk的大鼠肝组织中即能检测到特异性人PCNA; 每组4只实验大鼠1, 2, 4, 6, 8 wk均可连续检测出大量非特异性人PCNA(图3).

PCNA的细胞图像分析, 实验组1与对照组1比较无统计学差异($P > 0.05$), 实验组2与对照组2比较无统计学差异($P > 0.05$, 表1).

2.4 RT-PCR检测人白蛋白mRNA 实验组和对照组均于移植后2, 4, 6, 8 wk检测出人白蛋白mRNA. 分别采用人和大鼠白蛋白mRNA引物作RT-PCR时, 可在实验大鼠肝组织中检测到相应的人白蛋白mRNA条带(241 bp)及大鼠白蛋白mRNA条带(388 bp)(图4).

3 讨论

肝细胞脾内植入后, 50%-65%随门脉血流迁移到受体肝窦, 但其中大约70%被门静脉血内的巨噬细胞清除, 残留的移植肝细胞在穿过肝窦内皮层时失去其细胞膜缝隙连接, 这些细胞合成

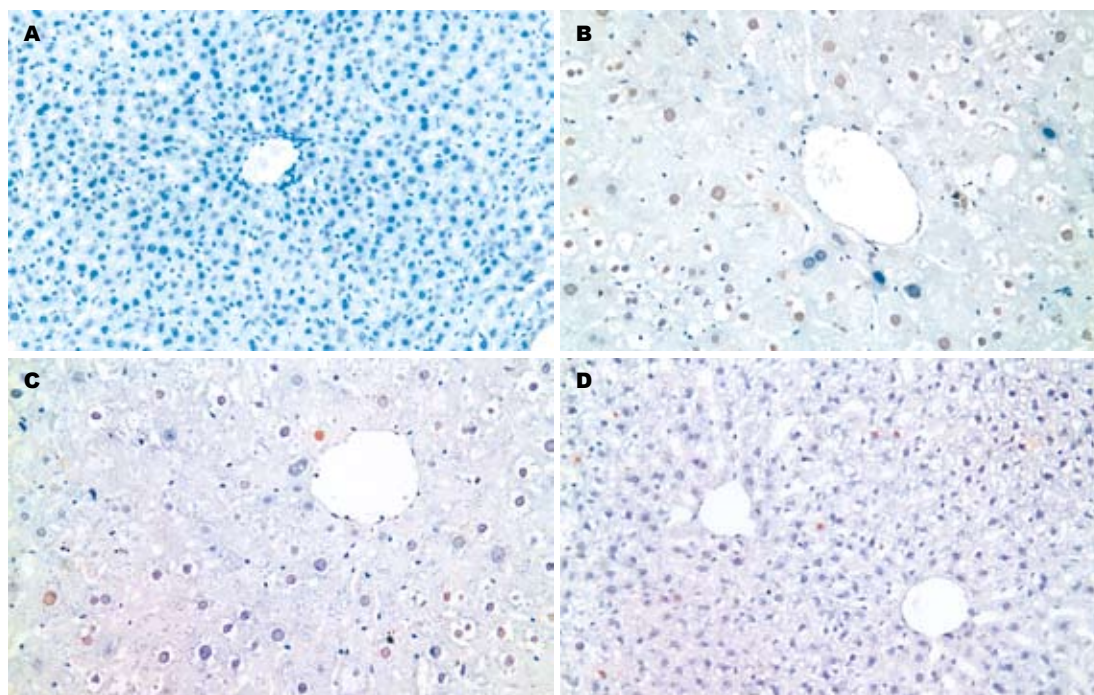


图 3 肝组织中胞核PCNA呈棕色的L02细胞(SP × 200). A: 正常鼠肝; B: 非特异性PCNA作一抗; C: 实验组; D: 对照组.

血管内皮生长因子及获得细胞膜再生^[12], 在移植5 d后可观察到移植的肝细胞与宿主肝细胞间的缝隙连接及胆管样结构的重构, 意味着移植细胞成功整合需要5 d以上^[13-14]. 移植肝细胞与宿主肝整合后, 才可表达出白蛋白、胆汁的代谢和酶等功能. 我们在1 wk未能测出人白蛋白及特异性人PCNA, 而荧光示踪可见阳性, 提示移植L02细胞虽已转移并整合至鼠肝内, 但尚未具备合成白蛋白和增殖的功能. 肝细胞的主要功能之一是合成白蛋白, 所以白蛋白的合成是判断肝细胞功能非常敏感的指标, 其含量与有功能的肝细胞数量成正比. 许多研究将其作为衡量成熟肝细胞数量的指标^[15]. 我们采用免疫荧光技术和RT-PCR, 从移植后2, 4, 6, 8 wk嵌合肝大鼠肝组织中检测出人白蛋白和人白蛋白mRNA, 证明L02细胞不仅在大鼠肝组织中存活, 而且具有正常人肝细胞一定的生物学功能. 既往研究表明, 肝细胞移植后的免疫排斥反应一般发生在移植后3 wk^[16], 我们的实验发现L02细胞移植后8 wk仍具有合成白蛋白的功能. 因此, 本实验在诱导免疫耐受基础上进行的人肝细胞异种移植, 移植细胞的消亡不是因为与宿主的免疫排斥反应, 而是移植细胞有限的增殖能力^[17]. 但实验同时发现, 2-AAF实验组(小、中、大剂量)均与对照组无显著区别, 证明2-AAF对移植L02细胞无明显增殖作用.

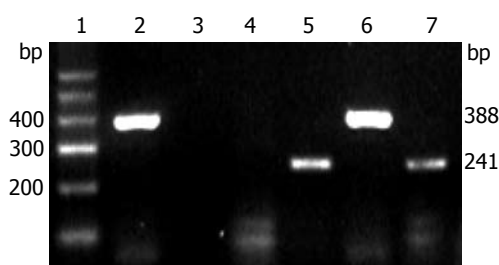


图 4 RT-PCR检测肝组织人白蛋白和鼠白蛋白mRNA. 1: 标准分子质量DNA Marker; 2, 3: 正常大鼠肝; 4, 5: 人肝; 6, 7: 嵌合鼠肝; 2, 4, 6: 大鼠白蛋白mRNA引物, 2对照组大鼠及6实验大鼠肝组织中均出现鼠白蛋白mRNA, 扩增目的片段388 bp; 而4为人肝组织未出现相应扩增产物; 3, 5, 7: 人白蛋白mRNA引物, 3对照组大鼠肝组织未出现扩增产物, 5为人肝组织和7为实验大鼠肝组织均出现人白蛋白mRNA, 扩增目的片段241 bp.

亲脂性碳花青荧光染料DiI标记整个细胞^[18], 对活体细胞无毒性, 不会影响细胞活性和基本生理特性, 不从已标记的细胞转移到未标记的细胞, 且荧光衰减慢^[19]. 有报道标记的神经元在体外保持4 wk以上, 而体内保持活性9 mo以上, 仍没有明显衰减和向周围的神经元细胞转移^[20]. 运用DiI对SD大鼠进行脾内肝细胞移植示踪观察, 发现经DiI标记的肝细胞容易从宿主组织中辨认出来, 荧光L02细胞移植到鼠肝后, 数目逐渐减少, 亮度逐渐减弱, 不同时相的DiI及免疫组化均显示了L02细胞的分布: 移植的L02细胞

■名词解释

人鼠嵌合肝是利用人肝细胞异种移植方法建立的新型动物模型, 是人肝细胞移植后在受体鼠体内存活、增殖, 并具有其正常的生物学功能. 诱导免疫耐受建立的人鼠嵌合肝动物模型, 可进行已知和未知肝炎致病因子的研究.

■同行评价

林沪,毛青,王宇明所领导的感染病研究所在国内小有名气,他们研究的人鼠嵌合动物模型对研究病毒性、代谢性肝病的发病机制及治疗药物、疫苗研发等提供了新的技术手段,具有良好的前景和发展意义.文章具有较高的学术价值和理论意义,属于国内领先水平.

首先到达受体鼠肝内的远端门静脉区域和肝窦,聚集成团分布,以后逐渐扩散到肝实质区域,并呈散在分布^[21]. 3种剂量实验组和对照组结果未见明显区别. 移植10 wk的荧光点基本消失,可能是残余移植细胞活性下降,也可能意味着细胞死亡或其碎片为吞噬细胞吞噬. 该荧光剂显示时间较长,较好显示了L02细胞整合后的存活情况. 同时,通过免疫组化和免疫荧光发现,植入肝细胞还表达了合成白蛋白及增殖功能.

我们应用的肝毒性药物2-AAF是一种致癌药物,他在肝细胞内可被I相代谢酶分解为具有肝细胞毒性的N-羟基衍生物,该物质为细胞有丝分裂的抑制剂,可有效抑制肝实质细胞的增殖. 胆管上皮细胞及幼稚的肝卵圆细胞内富含II相酶,可将肝细胞致癌剂解毒,I相酶的含量则极低,故2-AAF不能抑制此类细胞的增殖. 此时给予PH,在肝细胞再生需求下,由于2-AAF抑制了肝细胞的增殖,促进胆管上皮细胞向卵圆细胞大量增殖^[22]. 70% PH是最常见的大鼠肝再生模型,肝严重损伤后的再生主要是肝前体细胞即卵圆细胞或小肝细胞的增殖与分化的过程,可能少量的成熟肝细胞通过大量增殖来参与肝脏的再生与修复^[23]. 2-AAF是常用于卵圆细胞活化的肝毒性药物,阻断受体肝细胞的DNA合成,从而抑制肝细胞的增殖^[24-25],在肝细胞再生需求下,可促进卵圆细胞的活化,但是否能促进移植细胞在嵌合肝中的增殖却少有报道. 计算机图像分析和统计学分析,检测不同时相PCNA细胞的数密度和面积密度. PCNA在静止期细胞中量很少,G1晚期开始增加,S期达到高峰^[26]. 可作为评价移植肝细胞增殖状态的指标^[27]. 我们从移植后2, 4, 6 wk大鼠肝组织中检出细胞核为棕色的特异性人PCNA阳性细胞,表明此期间嵌合鼠体内有处于增殖期的人肝细胞存在. 特异性人PCNA作一抗时,实验组与对照组在时间和数量上均无明显差异,说明2-AAF虽能抑制受体肝细胞增殖,促进卵圆细胞的增殖分化,但未能促进移植肝细胞的增殖;4 wk PCNA细胞数量最多,提示移植肝细胞在4 wk时增殖能力最高;8 wk PCNA细胞基本消失,即L02细胞增殖能力消失,但荧光与组化显示,仍存在活的移植细胞并具备一定的功能. 非特异性PCNA作一抗时,实验组与对照组也无明显差异,自1 wk出现阳性胞核后,不同时相检测一直持续存在且数量很多,说明鼠肝细胞在行PH后迅速表现出强烈的增殖趋势,对照组受体肝细胞及移植肝

细胞均开始增殖,由于此类模型可能以卵圆细胞增殖为主,且移植肝细胞数量远远少于受体肝细胞,所以,PH促进L02细胞的增殖能力非常有限^[28];实验组由于2-AAF广泛破坏受体肝细胞的DNA合成,使受体肝细胞增殖受阻,而此类模型可能以卵圆细胞增殖为主,即使阻断了受体成年肝细胞增殖,L02细胞的增殖比例仍然很小. 由于移植肝细胞数量在嵌合肝中比例很小,PH促进L02细胞增殖的数量很少,所以,非特异性PCNA在1 wk出现,而特异性人PCNA在1 wk未能发现,且在相应时相,特异性人PCNA与非特异性PCNA比较数量明显稀少.

本研究证实,L02细胞宫内诱导胎鼠产生免疫耐受,出生后移植到实验鼠肝内,可成功建立针对移植耐受的动物模型,移植的L02细胞可以在嵌合鼠体内整合、增殖,并具有一定的生物学功能;但是,2-AAF不能促进移植肝细胞的增殖,L02细胞在正常免疫活性的大鼠肝内存活未超过10 wk. 为提高移植肝细胞在宿主肝内的生存时间和比例,有待进一步应用其他方法促进移植肝细胞的增殖,从而建立长期有效的动物模型.

4 参考文献

- 1 Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 378-385
- 2 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 433-438
- 3 Fandrich F, Ruhnke M. Stem cells and liver replacement. *Med Klin (Munich)* 2003; 98 Suppl 2: 18-22
- 4 Witek RP, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant* 2005; 14: 41-47
- 5 Menthen A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 2004; 22: 1049-1061
- 6 Shafritz DA, Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002; 36: 552-564
- 7 Guha C, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif Organs* 2001; 25: 522-528
- 8 Okumoto K, Saito T, Haga H, Hattori E, Ishii R, Karasawa T, Suzuki A, Misawa K, Sanjo M, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol* 2006; 41:

- 62-69
- 9 Alison M, Golding M, Lalani EN, Nagy P, Thorgeirsson S, Sarraf C. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *J Hepatol* 1997; 26: 343-352
- 10 Chen Y, Wang Y, Li J, Lang S. Establishment and optimization of rat models for hepatic oval cells proliferation. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002; 10: 185-187
- 11 韩明子, 邹亚男, 赵宪琪, 李福德, 韩桂萍, 赵瑞波, 温洁. DiI荧光示踪剂在小鼠骨髓细胞肝内移植中的研究. *中华器官移植杂志* 2003; 24: 251
- 12 Gupta S, Lee CD, Vemuru RP, Bhargava KK. ¹¹¹Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology* 1994; 19: 750-757
- 13 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005; 14: 31-40
- 14 Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153: 319-329
- 15 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 978-983
- 16 Song E, Chen J, Antus B, Su F, Wang M, Exton MS. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes. *Surgery* 2001; 130: 502-511
- 17 Oertel M, Rosencrantz R, Chen YQ, Thota PN, Sandhu JS, Dabeva MD, Pacchia AL, Adelson ME, Dougherty JP, Shafritz DA. Repopulation of rat liver by fetal hepatoblasts and adult hepatocytes transduced *ex vivo* with lentiviral vectors. *Hepatology* 2003; 37: 994-1005
- 18 Gerashchenko BI, Howell RW. Flow cytometry as a strategy to study radiation-induced bystander effects in co-culture systems. *Cytometry A* 2003; 54: 1-7
- 19 Zhou BJ, Zhong CP, Gu YD, Zhang XH, Liang CM, Wu CQ. Effects of hepatectomized rat serum on the transdifferentiation of adult rat bone marrow cells into hepatocyte-like cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 730-733
- 20 Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp Neurol* 1988; 102: 92-101
- 21 Okumoto K, Saito T, Haga H, Hattori E, Ishii R, Karasawa T, Suzuki A, Misawa K, Sanjo M, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol* 2006; 41: 62-69
- 22 Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* 1998; 27: 1030-1038
- 23 Mitaka T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1-5
- 24 Paku S, Dezso K, Kopper L, Nagy P. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver. *Hepatology* 2005; 42: 863-870
- 25 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 26 Majka J, Burgers PM. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; 78: 227-260
- 27 Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and *in situ* hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1681-1688
- 28 Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H. Quantitative evaluation of long-term liver repopulation and the reconstitution of bile ductules after hepatocellular transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6176-6181

电编 张敏 编辑 潘伯荣

原癌基因 *pim-3* 的克隆及其对肝癌细胞凋亡的影响

邓欢, 刘黎明, 张吉翔, 罗杰, 尹东, 熊瑛, 汤蕾, 谢正元

■背景资料

Pim蛋白广泛表达于人类各种组织细胞中, 并且能够磷酸化多种在细胞凋亡、细胞周期调控中起着重要作用的细胞因子, 从而在肿瘤发生及发展过程中发挥着重要的作用。目前对于Pim-1激酶的研究较为深入, 但对于 *pim* 家族的最新成员: *pim-3* 仍知之甚少, 本实验在国内首次成功的克隆出 *pim-3* 基因, 并重点研究了Pim-3激酶对人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的影响。

邓欢, 刘黎明, 张吉翔, 罗杰, 熊瑛, 汤蕾, 谢正元, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006

尹东, 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
邓欢, 2004年南昌大学医学院本科毕业, 现为南昌大学第二附属医院2004级在读硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤基因治疗的基础和临床研究。

国家自然科学基金项目, No. 30160032, No. 30360037

江西省科委重点项目, No.200110300101, No.20041B0300300

通讯作者: 张吉翔, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科、江西省分子医学重点实验室。
jixiangz@tom.com

电话: 0791-6292706 传真: 0791-6262262

收稿日期: 2006-05-30 接受日期: 2006-06-24

Cloning of pro-oncogene *pim-3* cDNA and its effect on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

Huan Deng, Liang-Ming Liu, Ji-Xiang Zhang, Jie Luo, Dong Yin, Ying Xiong, Lei Tang, Zheng-Yuan Xie

Huan Deng, Liang-Ming Liu, Ji-Xiang Zhang, Jie Luo, Ying Xiong, Lei Tang, Zheng-Yuan Xie, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Dong Yin, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30160032 and No. 30360037; and the Key Project of Science and Technology Committee of Jiangxi Province, China, No. 200110300101 and No. 20041B0300300

Correspondence to: Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jixiangz@tom.com

Received: 2006-05-30 Accepted: 2006-06-24

Abstract

AIM: To clone rat *pim-3* cDNA and construct its eukaryotic expressing plasmid, and to investigate the expression of *pim-3* and its effect on the apoptosis in SMMC-7721 cells.

METHODS: Total RNA was isolated from rat skeletal muscle tissues with TRIzol method. *pim-3* cDNA was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and constructed into eukaryotic expression vector pEGFP-N₂, which expressed green fluorescent

protein. The recombinant pEGFP-N₂/*pim-3* was then transformed into *E.coli* JM109 host bacteria. After identified by restriction endonuclease digestion and sequencing, plasmid pEGFP-N₂/*pim-3* was transfected into SMMC-7721 cells by liposome mediation. Fluorescent microscopy was used to examine the expression of *pim-3* gene, and the biological behaviors of the transfected cells were tested by flow cytometry and MTT colorimetric assay.

RESULTS: Restriction enzyme digestion analysis and sequencing showed that the recombinant plasmid of rat *pim-3* was correctly constructed; Flow cytometry showed the apoptosis rate was 3.48% in the cells transfected with the recombinant plasmid pEGFP-N₂/*pim-3*, 10.74% in those transfected with the plasmid pEGFP-N₂, and 11.01% in those without transfection. There were significant differences between the recombinant plasmid transfected group and the other two control groups (both $P < 0.05$). Fluorescent microscopy and MTT showed that *pim-3* was expressed in SMMC-7721 cells and the apoptosis of the transfected cells was significantly inhibited.

CONCLUSION: *pim-3* gene is successfully cloned, and it can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

Key Words: Liver cancer; Pro-oncogene *pim-3*; Clone; Apoptosis; Fluorescent microscopy; Flow cytometry; MTT colorimetric assay

Deng H, Liu LM, Zhang JX, Luo J, Yin D, Xiong Y, Tang L, Xie ZY. Cloning of pro-oncogene *pim-3* cDNA and its effect on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2288-2293

摘要

目的: 克隆大鼠原癌基因 *pim-3* 并构建真核表达重组质粒 pEGFP-N₂/*pim-3*, 观察他在真核细胞 SMMC-7721 中的表达情况以及对细胞凋亡的影响。

方法: 利用 TRIzol 从液氮保存的大鼠骨骼肌组织中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 方法获

取 cDNA, 并构建重组质粒pEGFP-N₂/, 转化用CaCl₂法制备的大肠杆菌JM-109菌株, 酶切以及测序鉴定. 将重组质粒通过脂质体介导转染肝癌SMMC-7721细胞后利用倒置荧光显微镜观察基因表达情况, 并利用流式细胞术及MTT比色实验对转染细胞的生物学行为进行检测.

结果: 将RT-PCR产物全部用于低熔点琼脂糖凝胶电泳、回收, 在DL 2000 Marker 1000 bp附近可见清晰条带, 与实验设计符合; 阳性克隆质粒的酶切电泳和测序结果表明, 大鼠 cDNA的克隆和重组质粒pEGFP-N₂/的构建成功; 重组质粒pEGFP-N₂/转染组凋亡细胞占3.5%, 质粒pEGFP-N₂转染组凋亡细胞占10.7%, 而仅加入转染液的空白组凋亡细胞占11.0%, 重组质粒转染组与两对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$); 倒置荧光显微镜可以观察到在SMMC-7721细胞中的正常表达; MTT比色实验显示原癌基因能够明显抑制细胞凋亡.

结论: 真核表达重组质粒pEGFP-N₂/构建成功; 原癌基因能明显抑制肝癌细胞凋亡.

关键词: 肝癌; 原癌基因; 克隆; 凋亡; 荧光显微镜; MTT比色试验; 流式细胞术

邓欢, 刘亮明, 张吉翔, 罗杰, 尹东, 熊瑛, 汤蕾, 谢正元. 原癌基因的克隆及其对肝癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2288-2293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2288.asp>

0 引言

原癌基因家族已发现3个成员: , 和, 目前对于的研究较为深入, 他编码的丝/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase): Pim-1包含一个被称为ATP锚的活化位点, 属于钙/钙调蛋白调节激酶(calcium/calmodulin-regulated kinase, CAMP), 在多细胞组织的进化过程中高度保守^[1]. 他广泛的分布于各种正常的组织细胞中, 是多种关键性信号传导通路的重要组成部分, 如: C-myc, STATs, Bcl-2等^[2-4], Pim-1激酶能通过一个保守的甘氨酸环状模序(motif)磷酸化众多的特异性底物, 从而抑制细胞凋亡, 最终导致肿瘤细胞的出现^[5].

而对于原癌基因的研究成果, 仅限于Fujii *et al*^[6]成功克隆出的基因全长cDNA核苷酸序列. Pim-3激酶是否与Pim-1激酶一样能通过

抑制细胞凋亡来促进肿瘤的发生, 以及二者之间的作用机制有何异同等问题, 目前尚不得而知. 为了研究Pim-3激酶对细胞凋亡的影响, 并进一步探讨其具体作用机制以及应用于临床疾病治疗的可能途径, 我们从Wistar大鼠的骨骼肌组织中克隆出基因, 并将其重组入真核表达载体pEGFP-N₂内, 通过转染肝癌SMMC-7721细胞、倒置荧光显微镜观察细胞内绿色荧光蛋白(green fluorescent proein, GFP), 来研究Pim-3激酶在真核细胞内的表达、定位及其具体的生物学功能, 并为进一步研究如何利用构建成功的重组质粒pEGFP-N₂/能够抑制细胞凋亡的特性, 为治疗目前临床缺乏有效治疗手段的急性肝损伤、肝衰竭等疾病提供分子生物学基础.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年♂ Wistar大鼠, 体质量200 ± 10 g, 南昌大学医学院动物科学部提供. 实验前1 wk领取动物, 分笼饲养, 给予自由进食和饮水. 室温维持25℃, 并每隔12 h开灯照明. TRIzol试剂, ThermoScriptTM reverse transcriptase, Lipofectamine 2000, RPMI 1640培养基购自美国Invitrogen公司; olig(dT)₁₅, 1 kb DNA step ladder marker, 限制性核酸内切酶EcoR I 和Kpn I, Wizard SV gel and PCR Clean-Up System Kit, Wizard PureFectin Plasmid DNA Purification System, T4 DNA连接酶均购自美国Promega公司; LA TaqTM DNA聚合酶, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L), DL 2000 marker为日本TaKaRa公司; 质粒pEGFP-N₂和*E.coli* JM109菌株为本实验室保存; 肝癌SMMC-7721细胞株购自上海细胞研究所; 胎牛血清为美国Gibco公司产品; 引物由上海Sangon公司合成; 无内毒素质粒小提取试剂盒(离心柱型)购自北京Tiangen生化科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR获得目的基因 cDNA片段 根据NCBI GenBank (NM_022602)收录的大鼠 mRNA序列, 借助Primer Premier 5.0软件(PremierBiosoft, USA)设计引物如下: 正义引物: 5'-TAT GAA TTC GAT GCT GCT GTC C-3'; 反义引物: 5'-TAT GGT ACC TCA AGC TCT CAC TGC-3'.

分别在正义引物和反义引物的5'末端引入了限制性核酸内切酶EcoR I 和Kpn I 识别

■创新盘点

1 首次在国内成功克隆基因, 并构建真核表达重组质粒pEGFP-N₂/.
2 重点研究基因对于人肝癌细胞SMMC-7721凋亡的影响.

■应用要点

真核表达重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*的成功构建为在动物模型上进行*pim-3*基因的研究提供了有利条件, *Pim-3*激酶抑制凋亡的特性也为以凋亡为主要病理改变的临床疾病的治疗提供了全新的视角。

序列(下划线所示), 扩增产物长度为998 bp. 总RNA提取自成年Wistar大鼠骨骼肌组织, 按照TRIzol试剂说明书的操作步骤进行. 逆转录为cDNA后使用TaKaRa公司的LA Taq扩增*Pim-3*蛋白编码区域, 建立50 μ L反应体系如下: LA Taq (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 2 $\times$ GC Buffer I 25 μ L, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L) 8 μ L, 逆转录产物2 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L)各1 μ L, 补去离子水至50 μ L. 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性1 min; 55 $^{\circ}$ C退火1 min 10 s; 72 $^{\circ}$ C延伸1 min; 35个循环后72 $^{\circ}$ C延伸2 min. PCR产物全部加入10 g/L低熔点琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并用Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System试剂盒纯化回收目的片段, 操作步骤同说明书。

1.2.2 重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*的构建与鉴定
扩增产物纯化回收后用*Eco*R I 和*Kpn* I 酶过量酶切, 酶切产物经10 g/L低熔点琼脂糖凝胶电泳、纯化回收, 与同样经*Eco*R I 和*Kpn* I 双酶切后的线性pEGFP-N₂质粒利用T4 DNA连接酶, 按照1:1, 1:3和3:1的比例, 室温3 h重新连接, 目的基因连接在EGFP编码区之前的多克隆位点区(图1). 将连接产物转化CaCl₂法制备的*E. coli* JM109感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C培养48 h后, 于Kanamycin (+)的LB固体培养基上随机挑取单克隆进行小剂量质粒抽提用于*Eco*R I 和*Kpn* I 双酶切鉴定, 双酶切证实的阳性克隆送北京三博远志生物工程有限公司进行测序分析。

1.2.3 重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*转染真核细胞
将重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*通过Lipofectamine 2000转染进入肝癌SMMC-7721细胞中, 瞬时转染方法按照说明书进行. 将转染细胞放入CO₂恒温孵育箱内, 分别于转染后24, 48和72 h在荧光倒置显微镜下, 利用488 nm激发波观察, 表达GFP的细胞发出绿色荧光. 为了探讨*Pim-3*激酶对细胞凋亡的影响, 收集在相同条件下分别用重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*转染、空载体转染和仅加入转染液后72 h, 并且生长状态良好的SMMC-7721细胞, 制备细胞悬液, 测量时用碘化丙啶(PI)染色, 于流式细胞仪检测细胞凋亡率. 进一步观察*Pim-3*激酶对细胞生长状态的影响. 将制备好的SMMC-7721细胞悬液以10³-10⁴/孔的密度接种于96孔板内, 生长72 h后分别用重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*和空载体转染, 分别于转染后24, 48和72 h时, 利用倒置荧光显微镜观察到正常的GFP表达后进行MTT比色实验, 检测细胞存活状态. 分组包括: 重组质粒pEGFP-N₂/

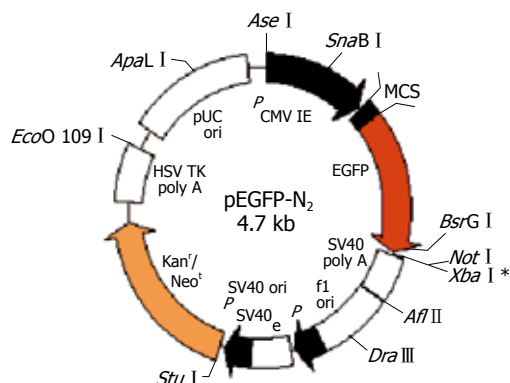


图1 pEGFP-N₂质粒结构图。

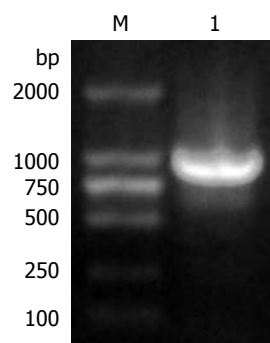


图2 大鼠*pim-3*基因RT-PCR扩增产物电泳图。M: DL 2000; 1: RT-PCR产物。

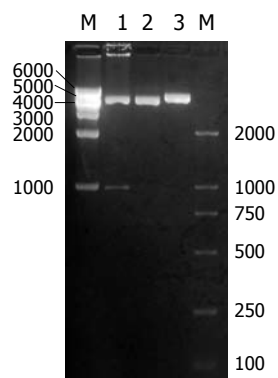


图3 重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*和质粒pEGFP-N₂酶切电泳图。1: 重组质粒pEGFP-N₂/*pim-3*经*Eco*R I 单切; 2: 质粒pEGFP-N₂经*Eco*R I 单切; 3: 重组质粒经*Eco*R I 和*Kpn* I 双酶切。

*pim-3*转染组、空载体转染组、正常细胞组和空白调零组, 每组细胞取4孔, 在酶联免疫检测仪上测吸光度值($A_{490\text{ nm}}$), 以空白孔调零, 求其平均值。

统计学处理 组间比较用One-Way ANOVA一元方差分析检验, 所有数据由SPSS 11.0统计学软件处理。

2 结果

2.1 大鼠原癌基因*pim-3* cDNA片段的获得与扩增
*pim-3*基因预计大小为998 bp(含酶切位点), 扩增产物在10 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 于DL 2000 Marker 1000 bp条带附近形成1条明显条带, 与预计的cDNA片段大小一致(图2)。重组质

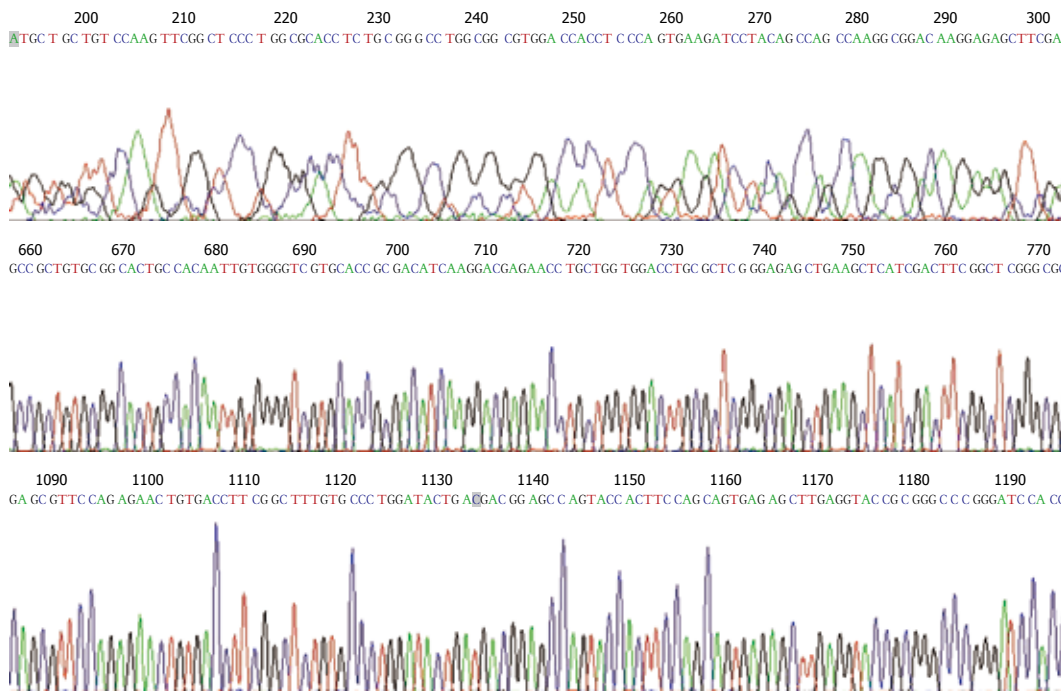


图4 目的片段的部分测序结果。

粒的酶切鉴定结果: 利用从Kanamycin (+)的LB固体培养基上得到的阳性克隆, 分离、纯化重组质粒pEGFP-N₂/pim-3, 经EcoR I和Kpn I双酶切后, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳出现1条约1000 bp的pim-3基因片段和1条约4.7 kb的pEGFP-N₂质粒片段, 仅使用EcoR I单酶切后只出现一条约5.7 kb的条带, 符合预期结果(图3)。

2.2 目的基因片段的测序结果 将双酶切鉴定的阳性克隆测序, 获得的目的基因片段与NCBI GenBank (NM_022602)收录的大鼠pim-3 mRNA序列比较: 该基因第285位氨基酸编码碱基由T突变为G, 但编码的氨基酸都为丙氨酸; 第657位氨基酸编码碱基由T突变为C, 但编码的氨基酸都为亮氨酸, 属于沉默突变型, 表明已经成功的克隆并插入pim-3基因片段, 将重组质粒命名为pEGFP-N₂/pim-3(图4)。

2.3 pim-3在真核细胞内的表达情况 瞬时转染24 h后即可在倒置荧光显微镜下观察到明显的绿色荧光, 表明重组质粒pEGFP-N₂/pim-3中的原癌基因pim-3在真核细胞内可以正常表达, 流式细胞术结果将验证pim-3基因对细胞凋亡的抑制作用。转染72 h后, 仅加入细胞转染液的细胞组, 凋亡细胞占11.0%; 质粒pEGFP-N₂转染细胞组, 凋亡细胞占10.7%; 重组质粒pEGFP-N₂/pim-3转染细胞组, 凋亡细胞占3.5%, 重组质粒转染组与两对照组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。转

■ 名词解释

1 DNA克隆(DNA cloning): 在体外利用酶学方法将感兴趣的物种来源的DNA片段转移到能自主复制的遗传单元中, 形成重组的DNA分子, 并在宿主细胞中增殖。

2 细胞凋亡(apoptosis): 是一种细胞生长的负性调控机制, 又称程序性细胞死亡, 是一种早期以染色体浓缩, 晚期以细胞质、细胞核裂解, 或出现凋亡小体为特征性表现的细胞死亡。

表1 各组转染细胞MTT检测结果 (A_{490nm})

分组	24 h	48 h	72 h
重组质粒pEGFP-N ₂ /pim-3转染	0.707	1.016 ^a	1.541 ^a
质粒pEGFP-N ₂ 转染	0.702	0.763	0.832
正常细胞对照	0.693	0.725	0.827

^a $P<0.05$ vs 对照组。

染后24, 48和72 h, 重组质粒pEGFP-N₂/pim-3转染组细胞状态与正常细胞对照组出现明显差异($P<0.05$), 质粒pEGFP-N₂转染组细胞与正常细胞对照组之间无明显差异(表1, 图5)。

3 讨论

原癌基因pim家族第一个成员:pim-1基因最早是作为莫洛尼小鼠白血病病毒(MoMuLV)的前病毒插入点而被发现的^[7], 他编码产生的丝/苏氨酸激酶Pim-1能够通过自身催化结构域与具有特定序列的底物结合, 这一共同序列为: (赖/精)₃-X-丝/苏-X[(Lys/Arg)₃-X-Ser/Thr-X]或者精/赖-精/赖-精-精/赖-X-丝/苏-X(Arg/Lys-Arg/Lys-Arg-Arg/Lys-X-Ser/Thr-X), X是一个具有一段侧链的氨基酸残基^[8]。随着研究的深入以及pim-2基因的发现, pim家族在细胞凋亡调控中的作用日益受到人们的关注。Pim激酶不仅能直接磷酸化BH₃-only蛋白Bad上的第112位丝氨酸, 并使之失

同行评价

本文研究了原癌基因 *pim-3* 转染 SMMC-7721 细胞对凋亡抑制的影响, 实验方法可靠, 结果可信, 有一定的学术价值。

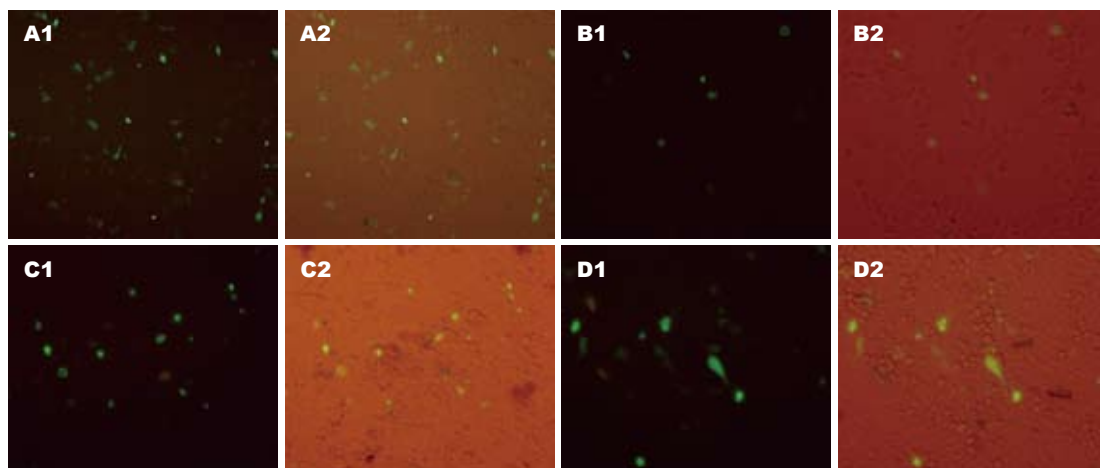


图 5 细胞转染情况 (IF $\times 400$). A1, A2: 质粒 pEGFP-N₂ 转染 24 h; B1, B2: 重组质粒 pEGFP-N₂/*pim-3* 转染 24 h; C1, C2: 重组质粒 pEGFP-N₂/*pim-3* 转染 48 h; D1, D2: 重组质粒 pEGFP-N₂/*pim-3* 转染 72 h.

活从而失去与 Bcl-2 的结合能力, 导致线粒体外膜上通透性转换(permeability transition, PT)通道关闭, 线粒体内促凋亡因子无法释放进入细胞质, 从而促进了细胞在受到外界凋亡刺激因素作用下的存活^[9-11]. 最近的研究表明, Pim 激酶还可能通过 p53/Puma 这条重要途径来抑制细胞凋亡, 但具体作用机制尚不清楚. 虽然对于 *pim-1* 和 *pim-2* 的研究已经取得不少进展, 但对 *pim-3* 的了解仍处于一片空白: *pim-3* 是否也能显著的抑制细胞凋亡; 如果能, 那么他的具体作用机制如何, 是与 *pim-1* 和 *pim-2* 类似或者还可以通过其他特定的途径来起作用; 临床上众多疾病都是由于细胞过度凋亡引起, 并且缺乏有效的治疗手段, 是否能够将 *pim-3* 基因抑制细胞凋亡这一重要特性用于这类疾病的治疗? 这同样也是一个令人感兴趣的疑问.

为了深入研究原癌基因 *pim-3*, 并考虑到使用大鼠建立临床疾病模型的可行性和普遍性, 所以选择克隆大鼠 *pim-3* 基因, 利用基因重组技术将其连接到真核表达载体上. 在质粒的选择上, 采用具有 GFP 报告基因的 pEGFP-N₂ 质粒, 这样可以非常直观的利用荧光显微镜观察他在真核细胞内的表达情况, 以及在将其用于动物疾病模型后追踪 *pim-3* 基因在体内的作用部位以及分布浓度, 同时利用 pEGFP-N₂ 质粒的卡那霉素抗性基因进行转化细菌的阳性克隆筛选. 进行引物设计时, 去除 *pim-3* 基因的终止密码, 并将其插入在 GFP 报告基因之前的多克隆位点区域, 这样可以通过观察 GFP 的正常表达来部分监测重组质粒是否成功构建. 重组质粒经酶切鉴定表

明成功插入长度为 998 bp 的目的基因, 经测序证实为大鼠原癌基因 *pim-3*. 为了模拟并观察将重组质粒用于动物疾病模型后的表达效率, 我们选用通过脂质体介导的瞬时转染方法. 在利用重组质粒转染的肝癌 SMMC-7721 细胞内成功的观察到高效率的 GFP 表达, 也反映出重组质粒的正常功能, 将重组质粒命名为 pEGFP-N₂/*pim-3*. 这一步的完成, 为之后 *pim-3* 基因作用机制的深入研究提供了分子生物学基础. 为了初步研究 *pim-3* 基因对真核细胞凋亡的影响, 将成功构建的重组质粒 pEGFP-N₂/*pim-3* 转染肝癌 SMMC-7721 细胞, 并进行流式细胞术以及 MTT 比色试验检测, 结果表明, *pim-3* 能够显著抑制真核细胞的凋亡.

在临床上对于急性肝损伤、肝衰竭尚缺乏有效的治疗手段, 原因之一就是对于其发生机制缺乏足够的了解. 目前的研究发现, 急性肝损伤、肝衰竭的主要病理表现为肝细胞大面积的凋亡和坏死, 细胞凋亡在此过程中起着重要的作用, 他往往是肝细胞对损伤因子做出的第一反应, 之后才会有坏死发生^[12-14]. 因此, 如何有效的抑制肝细胞对损伤因子做出的过度细胞凋亡的反应将成为急性肝损伤、肝衰竭防治过程中的重点. 我们已经成功的利用亚致死剂量的内毒素造成 D-半乳糖苷 (D-galactosamine, D-GalN) 致敏大鼠的急性肝损伤实验动物模型^[15], 他为研究急性肝损伤、肝衰竭的机制以及治疗手段提供了理想的平台. 下一步将致力于利用成功构建的重组质粒 pEGFP-N₂/*pim-3* 通过内毒素性急性肝损伤实验动物模型, 探求急性肝损伤、肝

衰竭的基因治疗途径.

4 参考文献

- 1 Eichmann A, Yuan L, Breant C, Alitalo K, Koskinen PJ. Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene* 2000; 19: 1215-1224
- 2 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20
- 3 Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M, Small D. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 2005; 105: 1759-1767
- 4 Peltola KJ, Paukku K, Aho TL, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen PJ. Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood* 2004; 103: 3744-3750
- 5 Bachmann M, Moroy T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 726-730
- 6 Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 114: 209-218
- 7 Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Sugiyama A, Kagaya S, Chi S, Asai A, Kuchino Y. Pim-1 kinase stimulates c-Myc-mediated death signaling upstream of caspase-3 (CPP32)-like protease activation. *Oncogene* 1997; 15: 1471-1480
- 8 Palaty CK, Clark-Lewis I, Leung D, Pelech SL. Phosphorylation site substrate specificity determinants for the Pim-1 protooncogene-encoded protein kinase. *Biochem Cell Biol* 1997; 75: 153-162
- 9 Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-656
- 10 Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 2002; 3: 631-643
- 11 Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* 2004; 571: 43-49
- 12 Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 2000; 47: 167-175
- 13 Riordan SM, Williams R. Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 203-215
- 14 Togo S, Kubota T, Matsuo K, Shimizu T, Momiyama N, Takeda K, Tanaka K, Endo I, Sekido H, Shimada H. Mechanism of liver failure after hepatectomy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004; 105: 658-663
- 15 刘亮明, 邓欢, 张吉翔, 罗杰. 内毒素性急性肝损伤实验动物模型的建立. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 12-18

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

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

人骨髓来源多能成体祖细胞ZHJ-MAPCs与人肝细胞系L02体外共培养向肝样细胞的分化

王海澜, 高毅, 蒋泽生, 慕宁

■背景资料

杂交型生物人工肝治疗可使终末期肝病患者桥接肝移植, 促进肝细胞再生, 但其核心生物材料的肝细胞来源问题未得到根本解决。研究证明, 人骨髓来源多能成体祖细胞具有向肝细胞分化潜能, 由于其取材方便, 可以来自患者自身, 无排斥反应, 具有重要的临床应用价值, 因而有望成为肝组织工程新的种子细胞来源。

王海澜, 高毅, 蒋泽生, 慕宁, 南方医科大学珠江医院普外科 广东省广州市 510282

王海澜, 1994年哈尔滨医科大学学士, 2004年南方医科大学博士, 副主任医师, 从事干细胞诱导分化研究。

广东省十五重点科技攻关专项基金资助项目, No. 2002A3020206

通讯作者: 高毅, 510282, 广东省广州, 市南方医科大学珠江医院普外科. gaoyi6146@163.com

电话: 020-61643212

收稿日期: 2006-03-29 接受日期: 2006-04-20

ZHJ-multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells as co-cultured with human liver cell line L02

Hai-Lan Wang, Yi Gao, Ze-Sheng Jiang, Ning Mu

Hai-Lan Wang, Yi Gao, Ze-Sheng Jiang, Ning Mu, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Supported by the Key Science and Technology Research Program of the 10th Five-Year Plan of Guangdong Province, No. 2002A3020206

Correspondence to: Dr. Yi Gao, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Received: 2006-03-29 Accepted: 2006-04-20

Abstract

AIM: To investigate the feasibility that ZHJ-multipotent adult progenitor cells from bone marrow (ZHJ-MAPCs) differentiate into hepatocytes as co-cultured with human liver cell line L02 *in vitro*.

METHODS: Co-culture without cell-to-cell contact: ZHJ-MAPCs and L02 hepatocytes were speared on coverslip separately, and then were put in a culture dish. The levels of albumin (ALB), alpha-fetoprotein (AFP), cytokeratin-18 (CK-18), and cytokeratin-19 (CK-19) expression in ZHJ-MAPCs were detected by immunocytochemistry at different time points. Separated culture of L02 hepatocytes served as positive controls and separated culture of ZHJ-MAPCs served as negative controls. Co-culture with cell-to-cell contact:

ZHJ-MAPCs labelled with carboxyfluorescein diacetate succidimidyl ester (CFSE) were mixed with L02 hepatocytes (both with cell density of $1 \times 10^7/L$), and then the mixed cells were seeded on special dish for detection by laser scanning confocal microscopy (LSCM). Five days later, the cells were doubly stained with SABC-Cy3 fluorescent reagent. The levels of ALB, AFP, and CK-18 in ZHJ-MAPCs were observed under LSCM. Similarly, the positive and negative controls were designed.

RESULTS: Co-culture without cell-to-cell contact: High level of AFP expression appeared in ZHJ-MAPCs at the 1st day, and then AFP expression tapered daily. The expression of ALB was very weak at the 1st day, but increased a lot at the 3rd day, and reached the peak at the 5th day. The initial expression of CK18 appeared at the 5th day, and reached a higher level at the 7th day. The expression of CK19 was always negative. Co-culture with cell-to-cell contact: Yellow cells were ZHJ-MAPCs differentiated into hepatocytes; Green cells were undifferentiated ZHJ-MAPCs; Red cells were L02 hepatocytes. At the 5th day, many ZHJ-MAPCs with positive expression of ALB and CK18 appeared, while just few ZHJ-MAPCs with positive expression of AFP were observed.

CONCLUSION: ZHJ-MAPCs can be induced to differentiate into mature hepatocyte-like cells by co-culture with L02 hepatocytes, either with or without cell-to-cell contact, but the former may be more effective.

Key Words: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow; Hepatocyte; Co-culture; Cell to cell contact

Wang HL, Gao Y, Jiang ZS, Mu N. ZHJ-multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells as co-cultured with human liver cell line L02. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2294-2300

摘要

目的: 探索人骨髓来源多能成体祖细胞

(ZHJ-MAPCs)在与人肝细胞系L02在体外共培养条件下诱导分化为肝细胞的可行性.

方法: (1)间接共培养: 将第4代ZHJ-MAPCs和人肝细胞系L02仅培养液相通行间接共培养. 分别于培养第1、3、5、7天应用免疫细胞化学法鉴定ZHJ-MAPCs的ALB、AFP、CK-18、CK-19等肝细胞特征性表型表达情况, 并设阳性对照和阴性对照, 计数阳性细胞比率; (2)直接共培养: 将CFSE荧光(绿色)标记的第4代ZHJ-MAPCs与L02(密度均为 $1 \times 10^7/L$)按照各50%比例混合行直接共培养. 5 d后用SABC-Cy3免疫荧光(红色)双标后在激光共聚焦显微镜下分别观察ZHJ-MAPCs表达ALB、AFP、CK-18的情况. 同样设阳性对照和阴性对照.

结果: (1)间接共培养: AFP在ZHJ-MAPCs间接共培养第1天即表现为强阳性, 随后表达逐渐减弱. ALB在共培养第1天有可疑阳性, 第3天出现较强的阳性, 第5天达到高峰. CK-18在培养第1、3天检测均为阴性, 至第5天开始出现阳性, 第7天表达较前增强. CK-19在各时间点均为阴性着色. (2)直接共培养: 胞质内呈黄色荧光ALB和CK18的阳性细胞即向肝细胞分化的ZHJ-MAPCs在共培养5 d时出现较多, 而AFP阳性表达则仅出现在极个别细胞, 该结果与阳性对照细胞荧光表达类似.

结论: 人骨髓来源的ZHJ-MAPCs与人肝细胞系L02行间接或直接共培养均能够诱导其向成熟肝样细胞定向分化, 且直接共培养有提前趋势.

关键词: 人骨髓来源多能成体祖细胞; 肝细胞; 直接共培养; 间接共培养

王海澜, 高毅, 蒋泽生, 慕宁, 人骨髓来源多能成体祖细胞ZHJ-MAPCs与人肝细胞系L02体外共培养向肝样细胞的分化. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2294-2300
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2294.asp>

0 引言

人骨髓来源多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)具有向肝细胞分化潜能^[1-3], 由于其取材方便, 可以来自患者自身, 无排斥反应, 具有重要的临床应用价值, 因而有望成为肝组织工程新的种子细胞来源. 我们已经通过密度梯度离心-贴壁培养筛选-免疫磁性双阴性分选(magnetic activated cell sorting, MACS)3个步骤高效率地纯化分选出骨髓间

充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)亚群MAPCs(CD45⁻, GlyA⁻), 并将之命名为ZHJ-MAPCs(Zhujiang-MAPCs)^[4-5]; 本实验采用ZHJ-MAPCs与肝细胞系L02共培养的方法继续探讨ZHJ-MAPCs向肝细胞定向分化的能力. 为其在组织工程研究和临床医学中的广泛应用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 L02人肝细胞株, 购自上海细胞生物研究所; 羊抗人 ALB, 购自Sigma公司; 鼠抗人 AFP, 购自Neomarkers公司; 鼠抗人 CK18, 鼠抗人 CK19, 购自Chemicon公司; 抗小鼠 IgG SABC-Cy3试剂盒, 抗山羊IgG SABC-Cy3试剂盒, 武汉博士德; CFSE, 购自Molecular Probes公司; 抗羊SP免疫组化试剂盒、AEC显色试剂盒、DAB显色试剂盒、抗鼠免疫组化广谱试剂盒, 购自福州迈新生物技术开发公司. ZHJ-MAPCs培养基配方(1000 mL): 低糖DMEM 600 mL, MCDB-201 400 mL, 胰岛素5 mg, 转铁蛋白100 mg, 牛血清白蛋白1 g, 地塞米松 0.03 925 mg, 硒仕钠抗坏血酸2-磷酸盐25.62 mg, 亚油酸4.7 mg, 谷氨酰胺3.9 mg, 用NaHCO₃调节pH值至7.4, 过滤除菌, 4℃保存(LIF按10 μg/L、FCS按50 mL/L浓度在使用中加入). CFSE荧光染料: CFSE 500 μg; DMSO 90 μL(使用时取上述原液1 μL加入PBS 2 mL中).

1.2 方法

1.2.1 人肝细胞系L02与ZHJ-MAPCs间接共培养 诱导其向肝样细胞分化 (1)将分别接种于盖玻片上的传代ZHJ-MAPCs和人肝细胞系L02(密度均为 $1 \times 10^7/L$)按照各50%比例共置于直径10 cm培养皿中, 培养液共通(自制ZHJ-MAPCs培养基, 5% FCS, 不加LIF), 实现间接共培养. (2)分别于间接共培养第1、3、5、7天免疫细胞化学鉴定ZHJ-MAPCs的ALB、AFP、CK18、CK19等肝细胞特征性表型表达变化情况, 并设阳性对照(单独培养的L02细胞)和阴性对照(单独培养未经诱导的ZHJ-MAPCs), 计数阳性细胞比率, 起始共培养时间计为第0天. 间接共培养的细胞达到各诱导时间点后, 行免疫细胞化学染色. 一抗为羊抗人ALB(1:400)、鼠抗人AFP(1:320)、CK18(1:400)和CK19(1:400), 设阳性、阴性、替代对照. 其中AFP、CK18和CK19用ABC法, DAB显色, 胞质内出现棕黄色颗粒反应为阳性; ALB用SP法, AEC显色, 胞质内出现棕红色颗粒反应为阳

■研发前沿

目前诱导干细胞向肝细胞定向分化的方法以细胞因子诱导多见^[10-11,17-18], 其可能的机制在于这些生长因子和细胞因子对肝细胞的分化和再生的控制作用; 利用共培养诱导骨髓间充质干细胞的实验研究较少, 且局限于啮齿类动物细胞^[19-21].

■相关报道

根据Takeda *et al*^[28]的研究,将骨髓来源基质细胞和大鼠肝细胞共培养,发现肝细胞和基质细胞数均较单独培养明显增加,且肝细胞功能较单独培养增强,而将二处细胞用可透过可溶因子的半透膜隔开共培养,肝细胞增殖不明显,间接证明了骨髓基质细胞对肝细胞的作用是通过直接接触发生作用的。

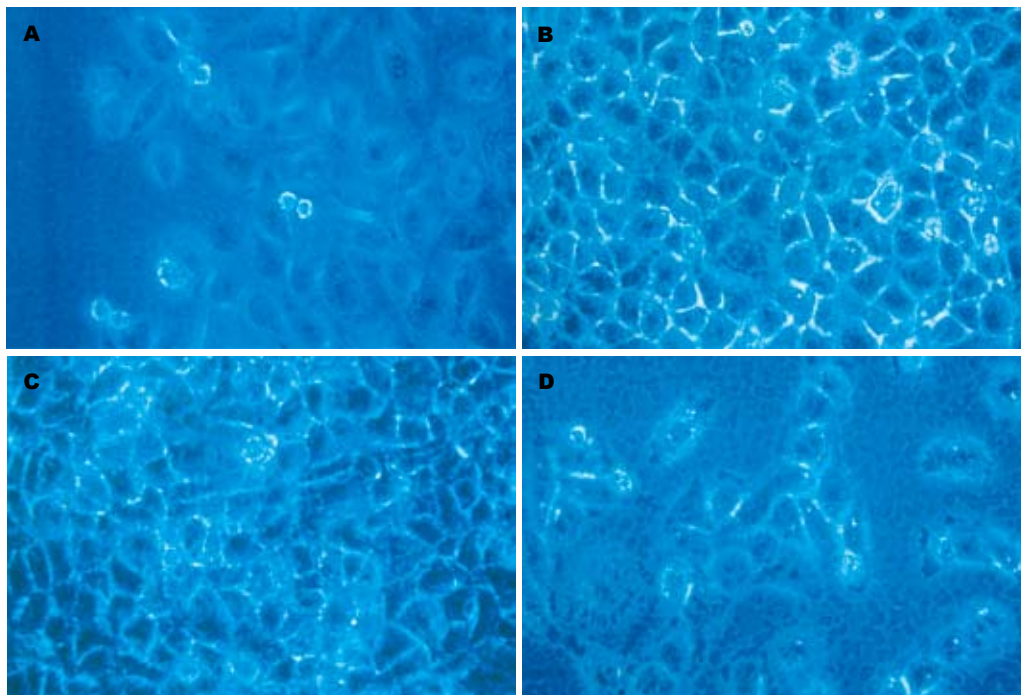


图1 ZHJ-MAPC细胞共培养后的生长形态以及L02肝细胞的形态学特征($\times 200$)。A: 第6代ZHJ-MAPC生长形态; B: 间接共培养7 d ZHJ-MAPC生长形态; C: 直接共培养5 d ZHJ-MAPC细胞生长形态; D: L02肝细胞形态。

性。我们采用半量化免疫细胞化学结果: 每个结果我们取5个有代表性的高倍镜视野($\times 200$), 计数阳性染色细胞所占百分比, 取其平均值。

1.2.2 CFSE标记第4代ZHJ-MAPCs后与人肝细胞系L02直接共培养诱导其向肝样细胞分化 待50 mL培养瓶内长满第4代ZHJ-MAPCs后(2×10^6)吸去培养液, 加入配制好的CFSE荧光染料2 mL, 终浓度为0.3 nmol/细胞, 37℃孵箱内孵育20 min; 吸去CFSE荧光染料, PBS清洗2遍; 加入自制MAPCs全培后37℃孵箱内继续孵育30 min。更换全培后37℃孵箱内过夜。用0.25 g/L胰酶将CFSE标记的ZHJ-MAPCs消化下来后与L02细胞(密度均为 1×10^7 /L)按照各50%比例混合后接种于激光共聚焦显微镜扫描专用培养皿内, 实现直接共培养。直接共培养5 d用SABC-Cy3(红色荧光)间接免疫荧光进行双标免疫荧光染色。一抗为羊抗人ALB(1:400), 鼠抗人AFP(1:320)和CK18(1:400)、设阳性、阴性、空白对照。阳性对照为单独培养的CFSE标记L02细胞, 阴性对照为单独培养未诱导分化的CFSE标记ZHJ-MAPCs。在激光共聚焦显微镜下观察ZHJ-MAPCs表达ALB, AFP, CK18的情况。阳性结果为胞质出现黄色荧光。

2 结果

2.1 ZHJ-MAPC的形态学(图1A-C) ZHJ-MAPCs

表1 各组在诱导各时间点免疫细胞化学染色结果

天数(d)	ALB	AFP	CK-18	CK-19
1	±	+++++	-	-
3	+++++	+++	-	-
5	+++++	+	++	-
7	+++++	±	+++	-
阳性对照	+++++	±	++++	-
阴性对照	-	-	-	-

免疫细胞化学染色计数方法: 每个结果取5个具代表意义的高倍镜视野($\times 200$), 计数阳性染色细胞所占百分比, 取其平均值。-, 0%; ±, <10%; +, 20%; ++, 30%; +++, 40%; +++++, 50%; ++++++, 60%; ++++++, >70%。

单独培养时大多呈现内皮细胞样的梭型或成纤维细胞样长条形。在两种共培养体系中, 梭形或成纤维细胞样ZHJ-MAPCs均随着诱导时间的延长, 变成纺锤、不规则圆形或多角形, 与L02肝细胞形态相似(图1D)。

2.2 间接共培养免疫细胞化学染色结果 我们分别在诱导第1, 3, 5, 7天对ZHJ-MAPCs行免疫细胞化学染色, L02细胞为阳性对照, 未诱导ZHJ-MAPCs细胞为阴性对照, 结果见表1。结果显示: AFP作为不成熟肝细胞的表型标志, 在间接共培养第1天表现为强阳性表达, ALB可疑阳性表达, CK18为阴性; 而间接共培养第3天, ALB即出现较强的阳性表达, 相反AFP的阳性表达减少; 第5天, ALB的阳性表达即达到高峰, AFP阳性

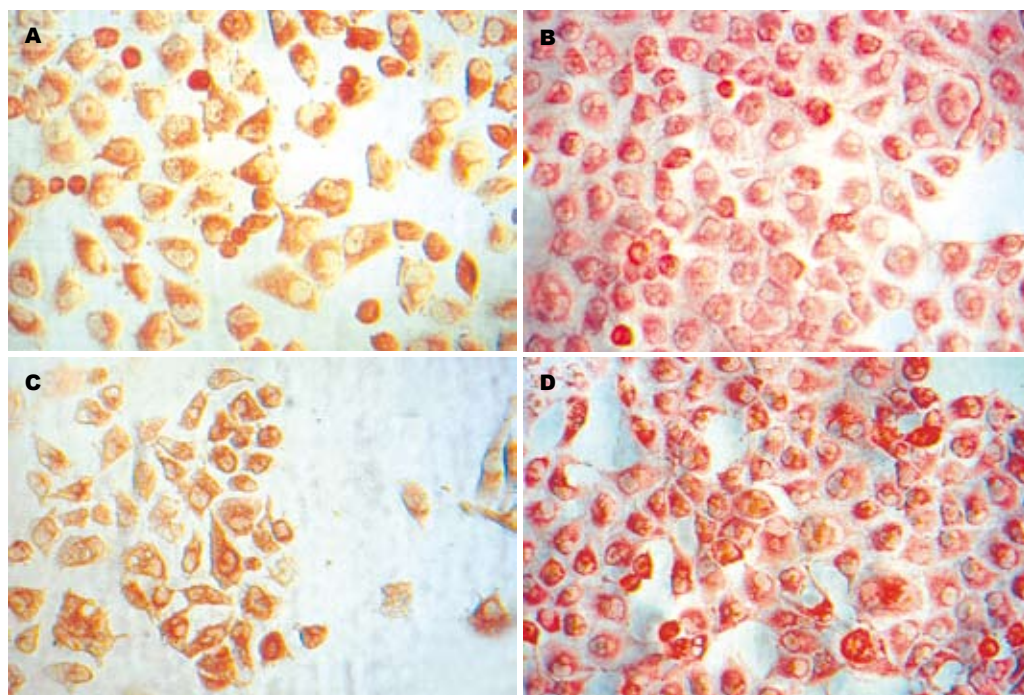


图2 间接共培养第1, 5, 7天 ZHJ-MAPC细胞免疫组化特征($\times 200$)。A: 间接共培养第1天AFP胞质内棕色染色为阳性(ABC法, DAB显色); B: 间接共培养第5天 ALB胞质内棕色染色为阳性(ABC法, DAB显色); C: 间接培养第7天 CK-18胞质内红色染色为阳性(SP法, AEC显色); D: L02肝细胞株ALB胞质内棕色染色为阳性(ABC法, DAB显色)。

表达继续减少, 而此时CK-18出现阳性表达; 间接共培养第7天, 密集生长的细胞广泛的阳性表达ALB, AFP的阳性表达已经很少, CK-18阳性表达增多; CK-19在各时间点均为阴性着色(图2A-D)。

2.3 直接共培养免疫荧光染色激光共聚焦扫描结果 我们将CFSE(绿色)荧光标记的ZHJ-MAPCs和L02直接共培养, 在第5天行SABC-Cy3免疫细胞荧光(红色)染色后行激光共聚焦显微镜扫描分析, 观察ALB, AFP, CK18的表达情况, 镜下呈黄色荧光的细胞即是向肝细胞分化的ZHJ-MAPCs, 为阳性细胞; 单纯表达绿色荧光的细胞为未分化的ZHJ-MAPCs; 单纯表达红色荧光的细胞为L02细胞。图像分析显示, 胞质内呈黄色荧光的ALB和CK18表达阳性细胞较多, 而AFP则仅在极个别细胞内呈阳性表达(图3A-E)。

3 讨论

自1999年以来, 在骨髓中已经发现多种细胞亚群具有向肝细胞分化的潜能^[6-9], 其中MAPCs在一定诱导、培养条件下, 不仅能分化为间充质组织细胞, 而且能分化为内皮组织^[10-12]细胞如血管内皮细胞和内胚层组织细胞如具有肝功能样肝细胞^[13-15]。我们参照Reyes *et al*^[10,16]的研究从正常成年人骨髓中通过梯度离心及免疫磁珠筛选分

离纯化出MSCs一个亚群的ZHJ-MAPCs (CD45⁻, glycophorin-A⁻), 该类细胞具有易于调控、供源丰富、易于获得、有自体供源避免免疫排斥等优点。但是ZHJ-MAPCs是否能在一定条件下向肝细胞定向分化, 是其能否成为肝组织工程种子细胞的关键。目前诱导干细胞向肝细胞定向分化的方法以细胞因子诱导多见^[10-11,17-18]。Yamazaki *et al*^[19], Yamada *et al*^[20], Lange *et al*^[2,21]分别将鼠骨髓细胞与肝非实质细胞、胎肝细胞、肝细胞共培养, 检测到较强表达的肝细胞特异性基因及成熟肝细胞表型的基因, 并阐明其机制在于模拟了器官特异性的微环境。本实验应用的人肝细胞系L02源于正常成人肝细胞, 是一种高分化的人肝细胞系, 各项生物功能较好^[22]。探讨ZHJ-MAPCs与其在间接和直接两种共培养模式下向肝样细胞分化的能力。

在间接共培养模式下, ZHJ-MAPCs与L02细胞分别培养, 培养液共通, 结果显示, AFP作为不成熟肝细胞的表型标志, 在间接共培养1 d表现为强阳性表达, 随着时间逐渐减少; ALB在第1 d可疑阳性表达, 随着时间渐增强, 间接共培养7 d, 密集生长的细胞广泛的阳性表达ALB, AFP的阳性表达已经很少; 另一种成熟肝细胞特征表型CK18在共培养5 d出现阳性表达, 在间接共培养7 d阳性表达增多; 成熟胆管细胞特征表型

■创新盘点

目前利用共培养诱导骨髓间充质干细胞的实验研究较少, 且局限于啮齿类动物细胞, 本文课题实验利用自行分离纯化、传代培养的人骨髓来源的多能成体祖细胞(ZHJ-MAPCs), 建立了与人肝细胞系L02共培养, 诱导其向肝样细胞定向分化的方法, 在较短的时间(7 d)诱导ZHJ-MAPCs转化为具有较成熟肝细胞表型的肝样细胞, 且获得了较高的转化效率, 比较利用细胞因子、病理血清等诱导的方法, 在诱导时间及效率上, 共培养表现出较为明显的优势。

■应用要点

通过共培养模式诱导其定向分化, 扩大培养规模有望在短时间内满足治疗数量级的需求和维持较高的肝特异性功能, 可以为HBAL和肝细胞移植等肝细胞组织工程提供更为充足的肝细胞源。

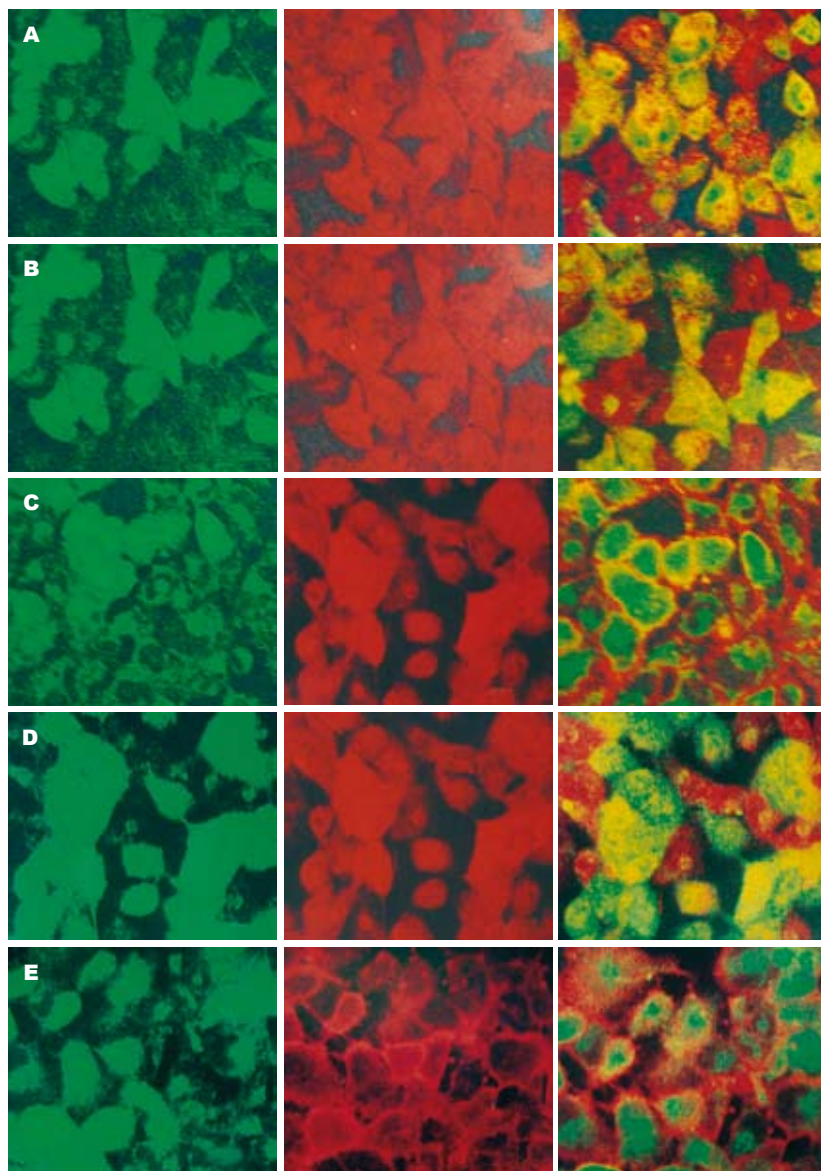


图 3 直接共培养第5天免疫荧光激光共聚焦扫描结果(CFSE, SABC-Cy3间接双标记阳性细胞胞质内呈黄色荧光, $\times 400$)。A: ALB; B: CK 18; C: AFP; D: 阳性对照(ALB, L02肝细胞单独培养); E: 阴性对照(ALB, ZHJ-MAPCs单独培养)。

CK19在各时间点均为阴性着色, 说明在此模式下, 7 d可以诱导ZHJ-MAPCs分化为较为成熟的肝样细胞。本实验结果表明ZHJ-MAPCs和肝细胞或具有肝细胞特异性功能的肝细胞系间接共培养, 可能为ZHJ-MAPCs向肝样细胞定向分化提供适宜的微环境, 从而诱导其分化为肝细胞。

在间接共培养取得阳性结果的基础上, 我们探讨了直接共培养诱导分化的方法, 即将ZHJ-MAPCs与L02细胞混合后共培养, 使之直接接触。我们采用了绿色荧光染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(5, 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)标记ZHJ-MAPCs, 这是一种可穿过细胞膜的荧光染料^[23-24], 细胞分裂时CFSE标记荧光可平均分配到两个子代细胞中, 可定位于细胞膜、细胞质和细胞核内, 细胞核标记最明显^[25], 且对细胞的正常生理活动无影

响^[26]; SABC-Cy3是专为免疫荧光化学设计的检测试剂盒, 用以显示组织或细胞中的抗原分布。其中花菁素-3(Cyanine-3, Cy3)是3H-吡啶染料中的代表化合物, 与标记在二抗上的长臂生物素结合后, 激发呈鲜红色荧光, 较传统荧光更具有亲水性。标记CFSE后的ZHJ-MAPCs与未标记的L02细胞直接共培养, 在第5天行SABC-Cy3免疫细胞荧光(红色)染色后行激光共聚焦显微镜扫描(laser scanning confocal microscope, LSCM), 分别观察ALB, AFP, CK18的表达情况。镜下单纯表达绿色荧光的细胞为未分化的ZHJ-MAPCs; 表达黄色荧光的细胞既是向肝细胞分化的ZHJ-MAPCs, 为阳性细胞; 单纯表达红色荧光的细胞为L02细胞。结果ALB和CK18胞质内出现较多黄色荧光表达, 而AFP则仅在极个别细胞内阳性表达。初步说明直接共培养5 d, ZHJ-MAPCs被诱导

分化为较为成熟的肝样细胞, 较间接共培养诱导分化的时间似乎更为提前, 提示细胞直接接触时, 细胞间直接信号交流和或细胞因子局部的高浓度也可能对诱导特异性分化产生作用. 国内外尚未见有关于人类骨髓来源干细胞的类似研究结果. 根据Mizuguchi *et al*^[27]的研究, 将骨髓来源基质细胞和肝细胞共培养, 发现肝细胞和基质细胞数均较单独培养明显增加, 且肝细胞功能较单独培养增强. Takeda *et al*^[28]的体内实验取得了相似的结果.

目前利用共培养诱导骨髓间充质干细胞的实验研究较少, 且局限于啮齿类动物细胞, 本实验利用我们自行分离纯化、传代培养的人骨髓来源的多能成体祖细胞(ZHJ-MAPCs), 建立了与人肝细胞系L02共培养诱导其向肝样细胞定向分化的方法, 在较短的时间(7 d)诱导ZHJ-MAPCs转化为具有较成熟肝细胞表型的肝样细胞, 且获得了较高的转化效率, 比较利用细胞因子^[10-11,17-18]、病理血清^[29-30]等诱导的方法, 在诱导时间及效率上, 共培养表现出较为明显的优势. 同时, 本实验间接共培养的研究由于干细胞不与肝组织直接接触而排出了融合的可能性, 与Jiang *et al*^[31]的结果一致, 支持了微环境诱导ZHJ-MAPCs横向分化为功能性肝细胞的理论.

尽管向肝细胞分化的ZHJ-MAPCs的功能尚需进一步检测, 干细胞定向分化的机制仍需探索, 与不同细胞共培养诱导转化的效能尚需要更多的证据, 共培养情况下肝细胞功能的改变仍值得进一步研究, 但我们已经证实ZHJ-MAPCs具有较高的纯度, 体外培养获得了活跃而稳定的增殖特性, 并表明骨髓来源的ZHJ-MAPCs与肝细胞体外共培养可以成功诱导其向成熟肝样细胞定向分化. 通过共培养模式诱导其定向分化, 扩大培养规模有望在短时间内满足治疗数量级的需求和维持较高的肝特异性功能, 可以为HBAL和肝细胞移植等肝细胞组织工程提供更为充足的肝细胞源.

4 参考文献

- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by

- liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504
- Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484
- 唐力军, 高毅, 李浩, 单毓强, 姜晓丹, 柳晓秋. 人骨髓来源的多能成体祖细胞分离纯化及体外培养的实验研究. *中国临床康复* 2005; 9: 85-87
- 慕宁, 高毅, 唐力军. 双阴性选择法纯化培养人骨髓多能成体祖细胞. *第一军医大学学报* 2005; 25: 535-537
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118
- Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-2625
- Uzan G. Therapeutic potential of circulating endothelial cells. *J Soc Biol* 2005; 199: 107-111
- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 2001; 115: 186-194
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- Tang LJ, Gao Y, Zhang Z, Li H, Shan YQ. Human bone marrow multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells with hepatocyte growth factor plus fibroblast growth factor-4 *in vitro*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005; 13: 652-655
- 高毅, 唐力军, 慕宁. 两种细胞因子诱导人骨髓多能成体祖细胞向肝样细胞分化的作用. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 862-864
- Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2001; 938: 231-233; discussion 233-235
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JL, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K,

■名词解释

人骨髓来源多能成体祖细胞(MAPCs): 是Verfaillie *et al*从出生后啮齿类动物和人类骨髓中筛选出的一种细胞, 该细胞表达CD45⁺和GlyA⁺, class I HLA⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD117与造血干细胞区分. 这种细胞在体外能扩增80代以上保持未分化状态, 在一定诱导、培养条件下, 不仅能分化为间充质组织细胞, 而且能分化为内皮组织细胞如血管内皮细胞和内胚层组织细胞, 如具有肝功

- Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes *in vitro*: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 19 Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003; 39: 17-23
 - 20 Yamada Y, Nishimoto E, Mitsuya H, Yonemura Y. *In vitro* transdifferentiation of adult bone marrow Sca-1+ cKit- cells cocultured with fetal liver cells into hepatic-like cells without fusion. *Exp Hematol* 2006; 34: 97-106
 - 21 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
 - 22 薛国柱, 刘冰艳, 陈芦斌, 高毅, 杨继震. 人肝细胞系生物功能筛选测定. *外科理论与实践* 2002; 7: 163-165
 - 23 Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *J Microbiol Methods* 2003; 52: 379-388
 - 24 Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan Y. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005; 37: 379-385
 - 25 陈蕾蕾, 陈军浩, 孙雪梅, 施广飞. 荧光染料CFSE作为细胞标记的特性研究. *细胞与分子免疫学杂志* 2004; 20: 140-141
 - 26 Dumitriu IE, Mohr W, Kolowos W, Kern P, Kalden JR, Herrmann M. 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester-labeled apoptotic and necrotic as well as detergent-treated cells can be traced in composite cell samples. *Anal Biochem* 2001; 299: 247-252
 - 27 Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiyama N, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Enhanced proliferation and differentiation of rat hepatocytes cultured with bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 106-119
 - 28 Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 77-81
 - 29 方天翎, 闵军, 邓小耿, 钱世鹏, 褚忠华, 陈亚进, 邵静, 魏菁, 陈积圣. 含淤胆血清的培养体系外诱导胚胎干细胞表达肝细胞功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 726-729
 - 30 邓小耿, 方天翎, 曹铭辉, 杨勇志, 邵静, 魏菁, 陈积圣, 闵军. 淤胆血清“病理微环境”诱导胚胎干细胞向肝细胞分化. *中国病理生理杂志* 2004; 20: 985-989
 - 31 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539

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

NS-398对HGF诱导的肝癌细胞株MMP-7, MMP-9, TIMP-1表达的影响

殷积彬, 刘铁夫, 孟祥宁, 赵丽莉, 刘晓川

殷积彬, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086

刘铁夫, 赵丽莉, 刘晓川, 哈尔滨医科大学附属第四医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150001

孟祥宁, 哈尔滨医科大学遗传教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086

殷积彬, 1998年哈尔滨医科大学学士, 2003年哈尔滨医科大学附属第四医院消化科博士生, 主要从事肝胆疾病的诊断与治疗。

通讯作者: 刘铁夫, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第四医院消化科。TFLiu@mail.csoft.com.cn

电话: 0451-82576696

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-06-30

Effect of NS-398 on matrix metalloproteinase expression in hepatocyte growth factor-induced HepG2 cell line

Ji-Bin Yin, Tie-Fu Liu, Xiang-Ning Meng, Li-Li Zhao, Xiao-Chuan Liu

Ji-Bin Yin, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Tie-Fu Liu, Li-Li Zhao, Xiao-Chuan Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Xiang-Ning Meng, Department of Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. TFLiu@mail.csoft.com.cn

Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-06-30

Abstract

AIM: To investigate the effect of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS-398 on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in liver cancer cell line induced by hepatocyte growth factor (HGF), and to explore the possible mechanism of NS-398 in depressing tumor cell invasiveness.

METHODS: HGF-induced liver cancer cells HepG2 were treated with different concentrations of NS-398 (0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$). The

expression of MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 inside the cells, the contents outside of the cells and the levels of mRNA were observed by immunohistochemistry staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

RESULTS: After HepG2 cells were treated with NS-398 for 48 h, the expression of MMP-7, MMP-9 and TIMP-1 protein in the cells were decreased; the content of MMP-7 in the culture fluid was 8.2 ± 0.6 , 5.8 ± 0.8 , 4.3 ± 0.8 , 2.7 ± 0.4 , and 1.7 ± 0.4 $\mu\text{g/L}$, respectively, as 0, 20, 40, 60, and 80 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 was used; the relative level of MMP-7 mRNA in the cells was 0.58 ± 0.06 , 0.42 ± 0.03 , 0.37 ± 0.01 , 0.36 ± 0.01 , and 0.33 ± 0.01 , respectively; MMP-9 can not be detected in the culture fluid, but its relative mRNA level was 0.32 ± 0.02 , 0.23 ± 0.02 , 0.21 ± 0.01 , 0.17 ± 0.01 , and 0.13 ± 0.01 , respectively, in the cells; the content of TIMP-1 in the culture fluid was 39.0 ± 0.9 , 29.5 ± 2.8 , 25.0 ± 0.9 , 16.8 ± 0.4 , 11.8 ± 0.3 $\mu\text{g/L}$ and its relative mRNA level in the cells was 0.19 ± 0.02 , 0.17 ± 0.02 , 0.16 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 , and 0, respectively.

CONCLUSION: The selective COX-2 inhibitor can inhibit the gene transcription of MMP and TIMP, and lead to the imbalance of TIMP and MMP percentage, which is one of the possible mechanisms in reducing tumor cell invasive ability.

Key Words: Specific cyclooxygenase-2 inhibitor; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of metalloproteinase; Invasiveness; Liver cancer cell line

Yin JB, Liu TF, Meng XN, Zhao LL, Liu XC. Effect of NS-398 on matrix metalloproteinase expression in hepatocyte growth factor-induced HepG2 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2301-2305

摘要

目的: 研究选择性COX-2抑制剂NS-398对肝癌细胞株MMP和TIMP表达的影响, 探讨选择

■背景资料

选择性COX-2抑制剂较多用于风湿性关节炎的镇痛和抗炎治疗, 效果很好。近些年研究发现, 其具有抑制肿瘤细胞的增殖、诱导其发生凋亡、改变细胞周期分布等作用, 并且这些作用不依赖于PGE₂/COX-2的表达与否。

■相关报道

Abiru *et al*研究发现, 选择性COX-2抑制剂NS-398具有抑制肿瘤细胞增殖信号转导通路中的ERK1/2等酶的活化, 可能与选择性COX-2抑制剂的抗肿瘤作用直接相关。

性COX-2抑制剂降低肿瘤细胞侵袭力的机制。

方法: 以不同浓度的NS-398 (0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)作用于HGF诱导的HepG2细胞, 免疫组化法观察细胞中MMP-7, MMP-9, TIMP-1的蛋白质表达, ELISA法检测细胞外培养液中MMP-7, MMP-9, TIMP-1的含量, RT-PCR法分析3种蛋白酶的mRNA转录水平。

结果: NS-398作用细胞48 h后, 发现MMP-7, MMP-9, TIMP-1的蛋白质表达程度均下降, NS-398作用于HepG2细胞后, MMP-7在培养液中的含量和其在细胞内的mRNA相对水平分别为 8.2 ± 0.6 , 5.8 ± 0.8 , 4.3 ± 0.8 , 2.7 ± 0.4 , 1.7 ± 0.4 $\mu\text{g/L}$ 和 0.58 ± 0.06 , 0.42 ± 0.03 , 0.37 ± 0.01 , 0.36 ± 0.01 , 0.33 ± 0.01 ; MMP-9在培养液中未检出, 其细胞内mRNA相对水平分别为 0.32 ± 0.02 , 0.23 ± 0.02 , 0.21 ± 0.01 , 0.17 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 ; TIMP-1在培养液中的含量和其在细胞内的mRNA相对水平分别为 39.0 ± 0.9 , 29.5 ± 2.8 , 25.0 ± 0.9 , 16.8 ± 0.4 , 11.8 ± 0.3 $\mu\text{g/L}$ 和 0.19 ± 0.02 , 0.17 ± 0.02 , 0.16 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 , 0。

结论: 选择性COX-2抑制剂能够抑制MMP和TIMP基因转录, 使TIMP/MMP比例失衡, 这可能是其降低肿瘤细胞侵袭力的机制之一。

关键词: COX-2抑制剂; 肝细胞生长因子; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制剂; 侵袭力; 肝癌细胞株

殷积彬, 刘铁夫, 孟祥宁, 赵丽莉, 刘晓川. NS-398对HGF诱导的肝癌细胞株MMP-7, MMP-9, TIMP-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2301-2305
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2301.asp>

0 引言

选择性环氧化酶(COX)-2抑制剂不仅抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡^[1-2], 还具有抑制肿瘤细胞运动的作用。但选择性COX-2抑制剂通过何种机制降低肿瘤细胞的运动能力尚不十分清楚。我们以选择性COX-2抑制剂NS-398作用于肝细胞生长因子(HGF)诱导的肝癌细胞株, 观察其对基质金属蛋白酶(MMP)-7, -9及其抑制剂TIMP-1表达的影响, 探讨选择性COX-2抑制剂降低肿瘤细胞侵袭力的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2, 哈医大二院消化科刘冰熔教授惠赠。rhHGF购自美国CytoLab公

司; NS-398购自美国Cayman Chemical公司; 鼠抗人MMP-7, MMP-9和TIMP-1 mAb, 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物公司; TRIzol, RT-PCR试剂盒购于美国Invitrogen公司; ELISA试剂盒购于上海森雄生物公司; 胎牛血清购于天津灏源生物公司; DMEM培养基购自美国HyClone公司; 引物由上海博亚生物技术公司合成。HepG2细胞以100 mL/L FBS的DMEM培养基培养于25 cm^2 培养瓶中, 置37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 的孵箱中, 2-3 d换培养液1次。最终逐渐过渡到含20 mL/L FBS和30 $\mu\text{g/L}$ rhHGF的低血清培养基中培养。

1.2 方法 按每孔 2×10^5 个细胞接种于24孔板, 分别以不同浓度的NS-398培养基200 μL 培养48 h。加入5 g/L的MTT溶液20 μL , 继续培养2 h。弃上清, 加入DMSO 200 μL , 摇晃5 min, 取150 μL 加入96孔板中。在酶标仪波长492 nm处测A值。设4个复孔。根据MTT结果、光镜和电镜下细胞形态选择NS-398药物浓度范围, 进行分组实验。

1.2.1 免疫组化 细胞爬片后, 以不含有和含有60 $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398的低血清培养基处理48 h。40 g/L多聚甲醛室温固定15 min。PBS漂洗5 min 3次。滴加1:25, 1:25, 1:15稀释的抗MMP-7, MMP-9, TIMP-1抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS漂洗后, 滴加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, DAB显色。苏木素复染后, 封片。结果判定: 深棕色(+++), 棕黄色(++), 浅棕色(+), 无色(-)。

1.2.2 培养液中MMP-7, MMP-9, TIMP-1含量的检测 按每孔 2×10^5 个细胞接种于24孔板, 培养48 h。以不含和含有NS-398(分别为20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$)的培养基500 μL 培养48 h, 收获上清。分别取100 μL 加入不同的酶标板中, 按试剂盒要求操作, 最后在酶标仪波长492 nm处测A值, 重复4次。根据标准曲线, 计算培养液中MMPs的含量, 取平均值。

1.2.3 RT-PCR 10^7 个细胞加入TRIzol 1 mL, 提取总RNA。取RNA 2 μL , 按照试剂盒说明在20 μL 体系下完成逆转录, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。MMP-7引物为5'-ATGGGACATTCCTCTGA-3'和5'-CATTTATTGACATCTACGC-3', 产物长度372 bp; MMP-9引物为5'-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3'和5'-CGGCAAGTCTTCCGAGTAGTTT-3', 产物长度307 bp; TIMP-1引物为5'-CCGCAGCGAGGAGTTT-3'和5'-GGTCCGTCCACAAGCAA-3', 产物长度

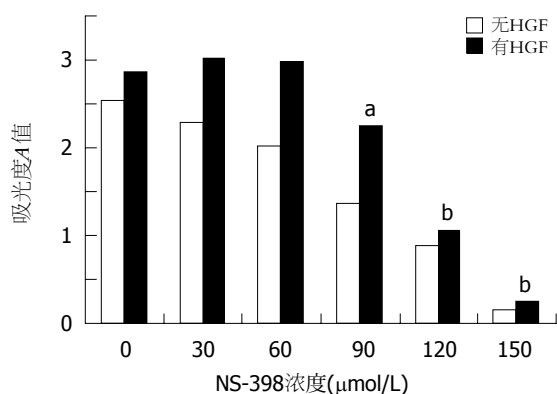


图 1 NS-398对HepG2细胞增殖的影响。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 无处理组。

表 1 NS-398处理48 h后上清中MMP-7, MMP-9, TIMP-1的含量变化

NS-398 ($\mu\text{mol/L}$)	MMP-7 ($\mu\text{g/L}$)	MMP-9 ($\mu\text{g/L}$)	TIMP-1 ($\mu\text{g/L}$)	TIMP-1 MMP-7
0	8.2 ± 0.6		39.0 ± 0.9	4.8
20	5.8 ± 0.8^a		29.5 ± 2.8^a	5.1
40	4.3 ± 0.8^b		25.0 ± 0.9^b	5.8
60	2.7 ± 0.4^b		16.8 ± 0.4^b	6.2
80	1.7 ± 0.4^b		11.8 ± 0.3^b	6.9

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 无处理组。

■创新盘点

本研究证实, 选择性COX-2抑制剂NS-398在0-80 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, 可能通过调节TIMP/MMP的比例, 达到降低肝癌细胞侵袭力的作用。

表 2 NS-398对MMP-7, MMP-9, TIMP-1的mRNA的影响

NS-398 ($\mu\text{mol/L}$)	MMP-7	MMP-9	TIMP-1	TIMP-1 mRNA MMP-7 mRNA	TIMP-1 mRNA MMP-9 mRNA
0	0.58 ± 0.06	0.32 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.33	0.59
20	0.42 ± 0.03	0.23 ± 0.02^a	0.17 ± 0.02	0.40	0.74
40	0.37 ± 0.01^a	0.21 ± 0.01^a	0.16 ± 0.01	0.43	0.76
60	0.36 ± 0.01^a	0.17 ± 0.01^a	0.13 ± 0.01^a	0.36	0.76
80	0.33 ± 0.01^a	0.13 ± 0.01^b	0		

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 无处理组。

215 bp; β -actin引物为5'-TTGTAACCAACTGG GACGATATGG-3'和5'-GATCTTGATCTTCATG GTGCTAGG-3', 产物长度745 bp。反应条件为94℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 30个循环。取产物2 μL 在110 V下经20 g/L琼脂糖凝胶电泳30 min, 利用凝胶成像系统(上海天能科技有限公司GIS-2010)扫描分析、拍照, 获取条带平均密度和面积数据, 计算MMP-7, MMP-9, TIMP-1的mRNA相对含量。

统计学处理 应用SPSS 11.5统计学软件进行数据分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 NS-398对HepG2细胞形态和增殖的影响 肿瘤细胞在无HGF的培养基中表现出对NS-398的浓度依赖性抑制($P < 0.05$)。当给予30 $\mu\text{g/L}$ 的HGF作用后, 30 $\mu\text{mol/L}$ 和60 $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398组与未给药组之间的细胞增殖无显著性差异, 而90 $\mu\text{mol/L}$, 120 $\mu\text{mol/L}$, 150 $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398组与未给药组之间的细胞增殖具有显著性统计学差异($P < 0.05$, 图1)。

2.2 NS-398对细胞中MMP/TIMP表达的影响 30 $\mu\text{g/L}$ 的HGF诱导HepG2细胞48 h后, MMP-7,

MMP-9, TIMP-1均匀表达于细胞质中, 呈细颗粒状, 三者的表达强度分别为(++), (++)和(弱+)/(+)。以60 $\mu\text{mol/L}$ 的NS-398作用细胞48 h后, 发现三者的蛋白质表达程度均下降, 分别为(弱+)/(+)、(弱+)和(-)(图2)。

2.3 NS-398对细胞培养液中MMP/TIMP含量的影响 用不同浓度的NS-398作用肿瘤细胞48 h, 培养液上清中MMP-7和TIMP-1的含量随NS-398浓度增加逐渐减少, 且TIMP-1/MMP-7的比值出现递增变化; 在培养液上清中没有检测到酶或酶原形式的MMP-9(表1)。

2.4 NS-398对MMP和TIMP的mRNA水平的影响 以不同浓度的NS-398处理HGF诱导的HepG2细胞24 h, 细胞内MMP-7, MMP-9, TIMP-1的mRNA相对含量逐渐降低, 并且出现TIMP mRNA/MMP mRNA的比例失衡(图3, 表2), 提示NS-398能够影响细胞内MMP-7, MMP-9, TIMP-1基因的mRNA转录。

3 讨论

MMP是一组锌离子依赖性内肽酶, 翻译后分泌过程中前酶原逐渐被加工修饰形成酶原或酶, 在转录、激活和抑制剂3个水平接受调控, HGF

■应用要点

选择性COX-2抑制剂具有降低肿瘤细胞侵袭力的作用, 因此有望成为一种新型的临床抗肿瘤药物.

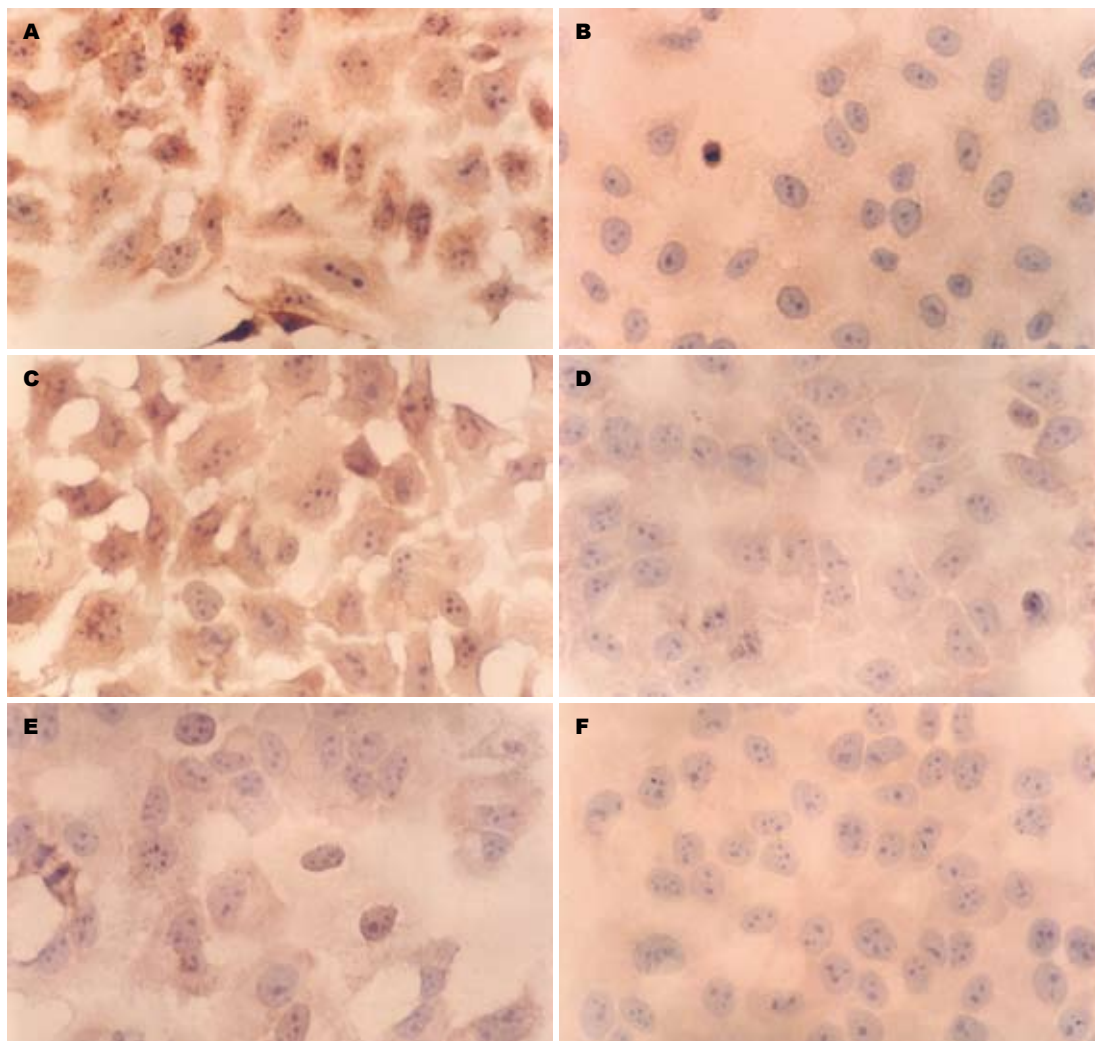


图 2 NS-398对HepG2细胞MMP和TIMP表达的影响($\times 40$). A: MMP-7; B: NS-398处理后MMP-7; C: MMP-9; D: NS-398处理后MMP-9; E: TIMP-1; F: NS-398处理后TIMP-1.

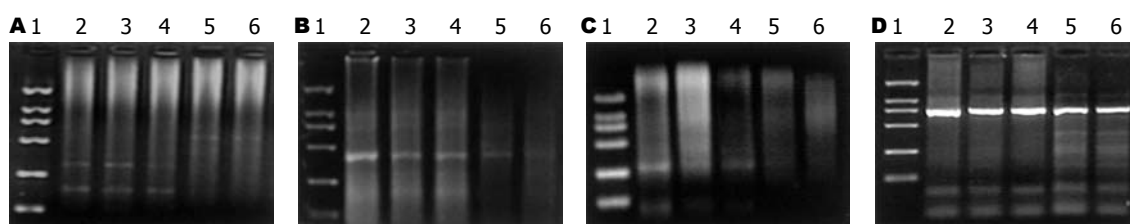


图 3 NS-398对MMPs mRNA表达的影响. A: MMP-7, 372 bp; B: MMP-9, 307 bp; C: TIMP-1, 215 bp; D: β -actin, 745 bp; 1: Maker为DL2000; 2: 无NS-398处理; 3: 20 μ mol/L NS-398处理; 4: 40 μ mol/L NS-398处理; 5: 60 μ mol/L NS-398处理; 6: 80 μ mol/L NS-398处理.

可以促进MMP的表达^[3]. MMP-7属于基质溶素类, 主要降解基质中的层黏蛋白、纤维蛋白和蛋白多糖等, 是MMP家族中唯一由上皮性肿瘤细胞特异性表达的酶, 由于其能够抑制肿瘤细胞凋亡, 激活其他MMP成员(MMP-2, MMP-9等)和灭活serpins(丝氨酸蛋白酶抑制剂), 而被认为与肿瘤细胞转移直接相关; MMP-9属于明胶酶类, 主要降解IV/V型胶原, 与c-met、肿瘤大

小、肿瘤肝内转移或血管癌栓、生存时间等临床指标呈正相关, 对评估肝癌的进展和转移十分重要. TIMP-1特异的抑制MMP-7和MMP-9的活性, 降低肿瘤细胞的迁移能力. Abiru *et al*^[4]利用Matrigel检测细胞侵袭力, 发现选择性COX-2抑制剂明显降低HepG2肝癌细胞株在人工基质中的迁移性. 我们的研究结果显示, NS-398作用于HGF诱导的HepG2肝癌细胞株后, MMP-7,

MMP-9和TIMP-1的mRNA和胞内胞外蛋白质表达均不同程度地减少, TIMP/MMP比值增加, 出现TIMP/MMP比例失衡, 这可能是选择性COX-2抑制剂抑制肿瘤细胞侵袭力的作用机制之一. 培养液中没有检测出分泌型MMP-9, 但细胞内却有前MMP-9的mRNA和蛋白质表达, 说明MMP-9在细胞内向细胞外分泌过程中可能受到抑制而难以激活. 实验中我们发现, 当NS-398浓度大于90 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞受到明显的增殖抑制, 细胞形态变化较大, 随着培养时间的延长, 死亡细胞数量也增加, 提示选择性COX-2抑制剂的作用与药物浓度有关.

研究证实, 选择性COX-2抑制剂可以影响TIMP/MMP比例, 降低肿瘤细胞株的侵袭力, 但是否通过抑制HGF/c-met/ERK(细胞外信号调节的激酶)信号途径^[5-6], 抑制肿瘤细胞迁移力以及分子作用机制还需进一步研究. 另外, 选择性COX-2抑制剂虽然具有一定的预防和治疗消化道肿瘤的效果, 但也要重视其带来的不良反应, 合理掌握药物的使用方法及开发新型药物, 比如新近研发的NO释放Aspirin和COX抑制NO供体^[7-8]都有助于提高其临床安全性. 因此, 深入研究COX-2抑制剂的抗肿瘤的分子生物学机制具有深远的临床意义.

4 参考文献

- 1 Cheng J, Imanishi H, Liu W, Nakamura H, Morisaki T, Higashino K, Hada T. Involvement of cell cycle regulatory proteins and MAP kinase signaling pathway in growth inhibition and cell cycle arrest by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, etodolac, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2004; 95: 666-673
- 2 Huang DS, Shen KZ, Wei JF, Liang TB, Zheng SS, Xie HY. Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 204-207
- 3 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 289-301
- 4 Abiru S, Nakao K, Ichikawa T, Migita K, Shigeno M, Sakamoto M, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Eguchi K. Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells. *Hepatology* 2002; 35: 1117-1124
- 5 Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 2004; 39: 1028-1037
- 6 Wong BC, Jiang XH, Lin MC, Tu SP, Cui JT, Jiang SH, Wong WM, Yuen MF, Lam SK, Kung HF. Cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) suppresses activator protein-1 through c-Jun NH2-terminal kinase. *Gastroenterology* 2004; 126: 136-147
- 7 Brzozowska I, Targosz A, Sliwowski Z, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Konturek PC, Brzozowski T, Pawlik M, Konturek SJ, Pawlik WW, Hahn EG. Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 773-790
- 8 Hawkey CJ, Jones JI, Atherton CT, Skelly MM, Bebb JR, Fagerholm U, Jonzon B, Karlsson P, Bjarnason IT. Gastrointestinal safety of AZD3582, a cyclooxygenase inhibiting nitric oxide donator: proof of concept study in humans. *Gut* 2003; 52: 1537-1542

■同行评价

本文选题先进, 选择性环氧化酶(COX-2)抑制剂不仅与肿瘤细胞运动有关, 而且与肿瘤增殖和凋亡有关, 探讨NS-398对MMP-7, -9, 及其抑制剂TIMP-1的影响, 从而探讨COX-2抑制剂降低肿瘤细胞侵袭力的机制十分有意义. 设计科学、技术合理、结果可信.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

山东省胃癌高发区人群胃黏膜肠化的预后与标记物表达

张阳, 张联, 潘凯枫, 游伟程, 李吉友

■背景资料

Padova和Vienna国际分类在形态学上将胃黏膜肠化病变分为增生型和普通型两类, 并提出增生型肠化在病变发展过程中属于不确定的异型增生, 可能与胃癌的发生有关。Padova和Vienna国际分类对胃癌及癌前病变详细的病理学划分, 帮助各国的病理医生对复杂的胃黏膜病变统一归类, 指导胃癌的预防和治疗。同时与胃癌发生相关的分子标记物研究也在国内外有大量报道, 但对胃癌各阶段癌前病变的生物学特性及其预后转归, 尚缺乏系统的人群研究。

张阳, 张联, 潘凯枫, 游伟程, 北京大学临床肿瘤学院流行病学研究室 北京市 100036

李吉友, 北京大学临床肿瘤学院病理科 北京市 100036
张阳, 2000年中国医科大学学士, 2003年北京大学临床肿瘤学院硕士, 研究实习员, 主要从事胃癌及癌前病变的流行病学研究。

国家重点基础研究发展规划项目, No. G1998051203

通讯作者: 李吉友, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤学院病理科. lijy@263.net

电话: 010-88122450 传真: 010-88122437

收稿日期: 2006-06-05 接受日期: 2006-07-10

Prognosis of intestinal metaplasia and expressions of biomarkers in high-risk populations of gastric cancer in Shandong province

Yang Zhang, Lian Zhang, Kai-Feng Pan, Wei-Cheng You, Ji-You Li

Yang Zhang, Lian Zhang, Kai-Feng Pan, Wei-Cheng You, Department of Cancer Epidemiology, Peking University School of Oncology and Beijing Cancer Hospital and Institute, Beijing 100036, China

Ji-You Li, Department of Pathology, Peking University School of Oncology and Beijing Cancer Hospital and Institute, Beijing 100036, China

Supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. G1998051203

Correspondence to: Dr. Ji-You Li, Department of Pathology, Peking University School of Oncology and Beijing Cancer Hospital and Institute, Haidian District, Beijing 100036, China. lijy@263.net

Received: 2006-06-05 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the expression of biomarkers and the prognosis of hyperproliferative intestinal metaplasia (HIM) and usual intestinal metaplasia (UIM) in Padova and Vienna international classification.

METHODS: The risk of progression to dysplasia or gastric cancer in patients with UIM or HIM was estimated in a prospective study in Chinese populations at high risk area of gastric cancer from 1992 to 2001 in Shandong province. The cases included 2 groups: progressive group ($n = 27$) and non-progressive group ($n = 60$). Immunohistochemistry was used to detect the expres-

sions of pS2, MUC5AC, MUC6 and Ki-67 in both groups.

RESULTS: HIM had a higher risk of dysplasia or gastric cancer than UIM ($OR = 7.23$, 95%CI 2.59-20.20). The risk of dysplasia or gastric cancer was reduced in IM with the expression of MUC5 ($OR = 0.27$, 95%CI 0.10-0.73) or pS2 ($OR = 0.33$, 95%CI 0.12-0.90). Ki-67 labeling index was elevated in progressive IM in comparison with that in non-progressive one ($28.5\% \pm 14.3\%$ vs $16.4\% \pm 9.8\%$, $P < 0.01$). An elevated risk of dysplasia or gastric cancer was observed in patients with HIM and negative expression of MUC5AC ($OR = 10.40$, 95%CI 2.99-36.21). The expression of was also higher in progressive IM than that in non-progressive one ($OR = 1.56$, 95%CI 0.53-4.60), but the difference was not significant.

CONCLUSION: HIM has a higher risk of progression to dysplasia or gastric cancer than UIM. It may be helpful to evaluate the prognosis of IM by combining the histological classification and the detection of some biomarkers, such as Ki-67, MUC5AC and pS2.

Key Words: Hyperproliferative intestinal metaplasia; Usual intestinal metaplasia; pS2; MUC5AC; MUC6; Ki-67

Zhang Y, Zhang L, Pan KF, You WC, Li JY. Prognosis of intestinal metaplasia and expressions of biomarkers in high-risk populations of gastric cancer in Shandong province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2306-2310

摘要

目的: 在山东胃癌高发区人群中观察增生型和普通型肠化的预后转归, 结合分子标记物的检测比较其进展为异型增生或胃癌的危险性。

方法: 采用前瞻性研究方法, 分析增生型和普通型肠化进展为异型增生或胃癌的危险性。进展组($n = 27$)的肠化病变选自1992-2001年对山东胃癌高发区的随访研究, 对照病例($n = 60$)随机选自无进展的肠化病变。根据Padova国际分型, 将所选肠化病变重新分为增生型

和普通型. 用免疫组化法检测pS2, MUC5AC, MUC6, Ki-67在不同肠化病变中的表达.

结果: 增生型肠化进展为异型增生或癌的危险性为普通型肠化的7.23倍(95%CI 2.59-20.20). MUC5AC, pS2与肠化进展为异型增生或胃癌的危险性呈负相关, *OR*值分别为0.27 (95%CI 0.10-0.73), 0.33 (95%CI 0.12-0.90). Ki-67标记指数在进展组中明显高于未进展组(28.5%±14.3% *vs* 16.4%±9.8%, *P*<0.01). MUC5AC表达阴性的增生型肠化进展为异型增生或胃癌的危险性上升为10.40倍(95%CI 2.99-36.21). MUC6的表达在进展组中略高于未进展组(*OR* = 1.56, 95%CI 0.53-4.60), 但差异无统计学意义.

结论: 增生型肠化进展为异型增生或胃癌的风险明显高于普通型肠化. 肠化病变的病理分型如同时结合Ki-67, MUC5AC, pS2等分子标记物的检测, 将有助于评估其预后转归.

关键词: 增生型肠化; 普通型肠化; Ki-67; MUC6; MUC5AC

张阳, 张联, 潘凯枫, 游伟程, 李吉友. 山东省胃癌高发区人群胃黏膜肠化的预后与标记物表达. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2306-2310
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2306.asp>

0 引言

Padova^[1]和Vienna^[2]国际分类将胃黏膜病变划分为5组: (1)无异型增生(Negative for dysplasia); (2)不确定的异型增生(indefinite for dysplasia); (3)非浸润性肿瘤(non-invasive neoplasia), 又称异型增生(dysplasia); (4)可疑浸润性癌; (5)浸润性癌. 在这2个分类标准中, 肠化病变被分为2类: 普通的肠化(本研究称为普通型肠化)属于第1组病变, 且包括完全型和不完全型2种类型; 而增生型肠化(hyperproliferative intestinal metaplasia)归类于第2组病变. Padova和Vienna国际分类从组织形态学上描述了增生型肠化的组织和细胞异型性都明显高于普通型肠化, 但2类肠化预后转归的前瞻性研究以及病变相关分子标记物研究, 国内外尚未报道. 自1989年, 北京大学临床肿瘤学院和美国国家肿瘤研究所合作在山东省临朐县胃癌高发区开展对胃癌前病变的一系列前瞻性研究. 我们报道Padova国际分类中普通型和增生型肠化的预后转归, 以及病变相关标记物(包括增殖相关标志物Ki-67和胃黏膜分化相关标志物

pS2, MUC5AC, MUC6)与病理形态学和预后的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 标本选自在山东省临朐县胃癌高发区进行的队列研究^[3-4]. 即1989-1990年在临朐县随机挑选了14个村庄的3399名35-64岁居民进行胃镜检查, 在胃体、胃角、胃窦7个标准部位取活检组织经病理诊断, 确定胃黏膜病变. 以7个部位病理检查诊断后的任意最严重病理病变为该病例的最高诊断. 1992年对其中689例胃癌前病变(包括深度肠化和异型增生)进行胃镜复查^[5], 并分别于1994和1999年对所有受试者进行胃镜随访, 监测胃黏膜病变的进展情况. 在随访过程中, 对发现有凝血功能障碍、高血压、肝脏疾病和慢性阻塞性肺病等情况的受试者退出随访, 失访者的基础病变与整体人群的病变构成相似. 至2001年, 从随访人群中按照肠化病变是否进展至异型增生或胃癌挑选进展和非进展2组. 活检组织标本用40 g/L甲醛固定、石蜡包埋、HE染色. 多次复查中病理诊断标准、方法相同. 3位对全部病理进行诊断的病理医师, 用盲法对1992年确定为肠化的病理切片进行复阅, 按照Padova国际分类将肠化分为增生型和普通型. 分子标记物的免疫组化检测组织标本选自进展和非进展组病例在1992年的随访胃镜检查病理标本.

1.2 方法 免疫组化采用卵白素-生物素-过氧化物酶染色系统^[6]. 组织切片常规脱蜡、复水, 30 g/L H₂O₂阻断内源性过氧化物酶10 min, 用枸橼酸钠抗原修复液微波抗原修复, 滴加非免疫小牛血清封闭, 37℃孵育30 min, 弃去封闭液后滴加相应的mAb稀释液, 4℃冰箱过夜. 选用的mAb为抗pS2 [BC04(7). GenTech], MUC5AC (45M1. NeoMarker 1:100), MUC6 (MCN6.01. NeoMarker 1:100), Ki-67 (MIB-1 MaximBiotec 1:100). 滴加通用型IgG抗体(Fab段)-HRP多聚体(PV-6000 PicTure™ Kits)水浴37℃. 1 g/L DAB-H₂O₂显色后苏木素染色, 常规脱水封片. pS2, MUC5AC, MUC6染色以>5%的细胞胞质或胞膜染为棕黄色至深棕黄色为阳性. Ki-67以细胞核呈棕黄色至深棕黄色为阳性细胞, Ki-67标记指数(labeling index)是以3-5个高倍视野(40倍)内计数500个上皮细胞, 计算阳性细胞的百分比^[7].

统计学处理 运用SPSS 10.0统计分析软件包分析数据. χ^2 检验用于分析肠化病理类型和

■ 相关报道

在2000年分别发表的Padova和Vienna国际分类中, 详细描述了增生型肠化的病理学特征, 指出其细胞和组织分化水平均明显低于普通型肠化. 另外, You *et al*在1989-2003年进行的随访研究, 介绍了本文选取的高发区人群的基础病变构成, 癌前病变进展状况以及可能的相关因素.

■创新盘点

本文首次将近年来国际认可的胃黏膜病变分类标准应用于长期、大样本的自然人队列研究中,对病变的预后转归及可能相关的分子标记物进行了系统的研究。结果提示,增生型肠化进展为异型增生或胃癌的危险性明显高于普通型肠化,并且结合Ki-67等标记物的检测有助于评估肠化病变的预后转归,预警胃癌的发生。

MUC5AC, MUC6, pS2的免疫组化结果, *t*检验用于分析Ki-67标记指数, $P < 0.05$ 被认为具有显著性。

2 结果

1992年进行胃镜复查的胃癌前病变中,病理诊断确定434例胃黏膜肠化。经10 a (1992-2001)随访,共27例病变进展(进展组),其中22例为胃癌,5例为异型增生;在407例未进展的肠化病变中,随机挑选60例对照作为“非进展组”。在27例进展组中有22例为男性,平均年龄 67.6 ± 10.1 岁;在60例非进展组中有40例为男性,平均年龄 65.8 ± 10.6 岁,2组在年龄和性别分布中未见统计学明显差异, $P > 0.05$ 。

2.1 肠化转归与组织学分类 病变进展组中20例(74.1%)基线病变为增生型肠化,7例(25.9%)为普通型肠化(其中完全型7.4%,不完全型18.5%)。非进展组的60例肠化病例中,有17例(28.3%)为增生型肠化,43例(71.7%)为普通型肠化(完全型46.7%,不完全型25.0%)。两组相比,增生型肠化进展为异型增生或胃癌的OR值为7.23 (95% CI 2.59-20.20, 表1)。将普通型肠化进一步分为完全型和不完全型肠化进行比较,不完全型肠化病变进展的OR值为4.67 (95% CI 0.81-27.01, $P > 0.05$)。将增生型肠化与完全型肠化比较,增生型肠化进展为异型增生或胃癌的OR值上升为16.47 (95% CI 3.42-79.45)。

2.2 肠化转归与标记物表达 MUC5AC, pS2在进展组的肠化病例中表达(24.1%, 55.2%)明显低于非进展肠化(56.7%, 81.7%), OR值分别为0.27 (95% CI 0.10-0.73), 0.33 (95% CI 0.12-0.90)。Ki-67标记指数在进展的肠化中($28.5\% \pm 14.3\%$)显著高于非进展的肠化组织($16.4\% \pm 9.8\%$, $P < 0.01$)。MUC6的表达在进展组中(24.1%)略高于未进展组(18.3%), OR = 1.56 (95% CI 0.53-4.60), 但差异无统计学意义(表2, 图1)。

2.3 MUC5AC, pS2表达与肠化转归 单独MUC5AC表达缺失或病理类型为增生型的肠化进展为异型增生或胃癌的OR值分别为0.61 (95% CI 0.11-3.52)和1.30 (95% CI 0.21-8.03)。而当上述两种因素同时存在时肠化病变进展的OR值明显升高为10.4 (95% CI 2.99-36.21)。单独pS2表达缺失或病理类型为增生型肠化的OR值分别为3.42 (95% CI 0.27-43.7)和8.54 (2.41-30.24), 而两种因素同时存在时的OR值为7.59 (95% CI 2.19-26.31), 未见显著上升(表3)。

表1 增生型和普通型(完全型和不完全型)肠化的预后比较 n (%)

肠化	非进展	进展	OR	95% CI
普通型	43(71.7)	7(25.9)	1	
完全型	28(46.7)	2(7.4)	1	
不完全型	15(25.0)	5(18.5)	4.67	(0.81-27.01)
增生型	17(28.3)	20(74.1)	7.23 ^b	(2.59-20.20)

^b $P < 0.01$ 。

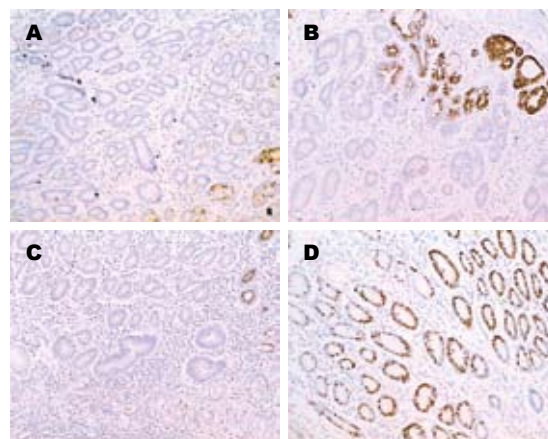


图1 在增生型肠化中pS2, MUC6, MUC5AC, Ki-67表达 (standard Envision法, $\times 100$)。A: pS2降低; B: MUC6胞质阳性; C: MUC5AC降低; D: Ki-67胞核阳性。

3 讨论

在山东省临朐县胃癌高发区人群进行的前瞻性研究结果显示,根据Padova国际分类将胃黏膜肠化病变划分为增生型和普通型,并结合病变相关分子标记物的检测,对于了解肠化病理分类的分子机制、提示预后判断具有科学和应用的价值。以往对胃黏膜肠化病变的研究显示,人群中近40%有胃黏膜肠化^[8],根据累及范围将其分为浅表和深度肠化。以浅表性或萎缩性胃炎为参照组,浅表肠化进展为异型增生或癌的危险性为2.2倍;而深度肠化的危险性增至4.7倍^[4]。不完全型肠化(13.3%)进展为胃癌的比例高于完全型肠化(1.9%)^[4],与许多文献报道一致^[9-11]。2000年,Padova和Vienna国际分类对胃黏膜病变重新划分后,提出增生型肠化是一些在黏膜深部排列紧密、分化不太成熟的腺体,细胞大且不规则,细胞异型性明显。增生型肠化的细胞和结构特点是从黏膜基底部到表层呈一种逐级演变的趋势,即底层腺体幼稚,异型性明显,到表层呈“渐进性成熟”。其形态学特征提示增生型肠化可能与胃癌,尤其是肠型胃癌的关系密切。我

表 2 进展组与非进展组中pS2, MUC5AC, MUC6, Ki-67的表达 *n* (%)

标记物	非进展组 (<i>n</i> = 60)	进展组 (<i>n</i> = 27)	OR	95% CI	<i>P</i>
pS2	49 (81.7%)	16 (55.2%)	0.33	(0.12–0.90)	<0.01
MUC5AC	34 (56.7%)	7 (24.1%)	0.27	(0.10–0.73)	<0.01
MUC6	11 (18.3%)	7 (24.1%)	1.56	(0.53–4.60)	0.52
Ki-67 LI ¹	16.4% ± 9.8%	8.5% ± 14.3%			<0.01

¹标记指数(labeling index).

表 3 MUC5AC, pS2表达与不同病理类型肠化转归关系的分层分析

肠化	MUC5AC				pS2			
	⁺	OR (95% CI)	[−]	OR (95% CI)	⁺	OR (95% CI)	[−]	OR (95% CI)
普通型	5/26	1.00	2/17	0.61 (0.11–3.52)	6/41	1.00	1/2	3.42 (0.27–43.70)
增生型	2/8	1.30 (0.21–8.03)	18/9	10.40 (2.99–36.21)	10/8	8.54 (2.41–30.24)	10/9	7.59 (2.19–26.31)

¹进展组例数/非进展组例数.

们进一步证实, 增生型肠化发展为更严重病变的风险显著高于普通型肠化. 与普通型肠化中的完全型肠化相比, 不完全型肠化向异型增生或胃癌发展的危险性上升3.67倍(统计学差异不显著, 可能是由于2组肠化病例数偏少); 增生型肠化进展的危险性增加15.47倍. 因此我们从预后转归的差异水平证实, 增生型肠化是比普通型肠化更容易发生进展的高危癌前病变. Padova国际分型对胃黏膜肠化病变进行重新划分后, 增强了其与胃癌发生的关联强度, 能够帮助更好地预警胃癌的发生.

为了解肠化病变发展过程中的生物学基础, 我们检测了Ki-67, MUC5AC, pS2, MUC6的表达状况. Ki-67标记指数作为反映细胞增殖状态的敏感指标, 在进展组肠化中明显升高, 提示旺盛的细胞增殖是肠化病变向异型增生或胃癌发展的危险因素. MUC5AC, pS2是胃黏膜分化成熟的标志^[6,12], 且pS2可能是胃特异的肿瘤抑制因子, 其表达从正常胃黏膜到肠化、腺瘤逐渐下降^[13]. 这些观点与本研究的结果相符, 即MUC5AC和pS2的高表达是肠化病变进展为异型增生或胃癌的保护性因素, 可使其危险性降低为约30%. MUC6可能与胃型黏膜的分化有关^[14], 正常表达于胃窦基底部腺体^[15], 在胃癌组织中降低^[16–18], 在不完全型肠化中高于完全型肠化^[19]. MUC6的表达在进展组略高于未进展组, 但其在肠化进展过程中的作用尚需进一步大样本研究探讨. 结果显示, MUC5AC, pS2和Ki-67

在肠化病变的进展过程中可能发挥重要作用, 其检测结果可以帮助我们客观评价肠化病变的预后转归. 将MUC5AC和pS2表达与肠化病变的病理类型综合分析显示, 增生型肠化中同时伴随MUC5AC的表达缺失, 该病变进展为异型增生或胃癌的危险性显著升高; 而伴随有pS2表达缺失的增生型肠化进展的危险性则没有明显的上升. 这一现象提示, MUC5AC的表达缺失与增生型肠化的组织类型在肠化病变进展过程中可能存在协同关系. 两种因素综合考虑, 可能提高对肠化病变预后转归评估的准确性.

本研究的优点在于, 在胃癌高发区代表性人群中进行胃镜和病理学诊断, 按照最新的Padova国际分类前瞻性观察不同病理类型肠化的转归, 并综合讨论了多种病变相关标记物的表达, 结果可靠. 但由于所选标本均来自自然人群的随访研究, 因此观察到的进展肠化病例数偏少, 从而限制了多因素的综合分析能力, 今后还有待于扩大随访病例数和延长随访时间. 总之, 本研究结果显示, 增生型肠化比普通型肠化进展为异型增生或胃癌的风险更高. 将肠化划分为增生型和普通型两种类型, 同时结合Ki-67, MUC5AC, pS2等分子标记物的检测, 将有助于评估肠化病变的预后转归.

4 参考文献

1 Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia: the Padova international

■名词解释
增生型肠化: 在Padova国际分类中增生型肠化属于不确定的异型增生, 表现为腺体分化不太成熟、排列紧密、核呈假复层排列、细胞大且不规则、核大深染、可见核分裂象. 从黏膜基底部到顶层呈“渐进性成熟”, 即底层腺体幼稚, 异型性明显, 到表层逐渐变得成熟, 分化程度高.

同行评价

1 本文选题新颖,具有重要的理论和实际意义。
2 本研究工作基础较好,研究结果可靠、可信。
3 研究对象来自自然人群队列研究,样本量大,随访时间相对较长,在恶性肿瘤病因和预后研究中实属不易。

- 2 classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 167-176
- 2 Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Flejou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000; 47: 251-255
- 3 Gail MH, You WC, Chang YS, Zhang L, Blot WJ, Brown LM, Groves FD, Heinrich JP, Hu J, Jin ML, Li JY, Liu WD, Ma JL, Mark SD, Rabkin CS, Fraumeni JF Jr, Xu GW. Factorial trial of three interventions to reduce the progression of precancerous gastric lesions in Shandong, China: design issues and initial data. *Control Clin Trials* 1998; 19: 352-369
- 4 You WC, Li JY, Blot WJ, Chang YS, Jin ML, Gail MH, Zhang L, Liu WD, Ma JL, Hu YR, Mark SD, Correa P, Fraumeni JF Jr, Xu GW. Evolution of precancerous lesions in a rural Chinese population at high risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 615-619
- 5 Riecken B, Pfeiffer R, Ma JL, Jin ML, Li JY, Liu WD, Zhang L, Chang YS, Gail MH, You WC. No impact of repeated endoscopic screens on gastric cancer mortality in a prospectively followed Chinese population at high risk. *Prev Med* 2002; 34: 22-28
- 6 Reis CA, David L, Nielsen PA, Clausen H, Mirgorodskaya K, Roepstorff P, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1997; 74: 112-121
- 7 Krecicki T, Jelen M, Zaleska-Krecicka M, Rak J, Szkudlarek T, Jelen-Krzeszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol* 1999; 35: 180-186
- 8 You WC, Blot WJ, Li JY, Chang YS, Jin ML, Kneller R, Zhang L, Han ZX, Zeng XR, Liu WD. Precancerous gastric lesions in a population at high risk of stomach cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1317-1321
- 9 Huang CB, Xu J, Huang JF, Meng XY. Sulphomucin colonic type intestinal metaplasia and carcinoma in the stomach. A histochemical study of 115 cases obtained by biopsy. *Cancer* 1986; 57: 1370-1375
- 10 Jass JR, Filipe MI. A variant of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma: a histochemical study. *Histopathology* 1979; 3: 191-199
- 11 Jass JR. Role of intestinal metaplasia in the histogenesis of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1980; 33: 801-810
- 12 Hanby AM, Poulsom R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology* 1993; 105: 1110-1116
- 13 Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, Tahara E. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett* 2000; 149: 125-134
- 14 De Bolos C, Garrido M, Real FX. MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 1995; 109: 723-734
- 15 Buisine MP, Devisme L, Maunoury V, Deschodt E, Gosselin B, Copin MC, Aubert JP, Porchet N. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. I. Stomach. A relationship to gastric carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1657-1666
- 16 Reis CA, David L, Carvalho F, Mandel U, de Bolos C, Mirgorodskaya E, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 377-388
- 17 Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehans GA. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 1995; 55: 2681-2690
- 18 Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim YI, Kim WH. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators. *Cancer* 2001; 92: 1427-1434
- 19 Reis CA, David L, Correa P, Carneiro F, de Bolos C, Garcia E, Mandel U, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression. *Cancer Res* 1999; 59: 1003-1007

电编 张敏 编辑 潘伯荣

DNA损伤修复基因hOGG1的遗传多态与乙肝相关性HCC的风险

张昊, 郝冰涛, 贺福初

张昊, 河南省人民医院老年病研究中心 河南省郑州市 450003
郝冰涛, 贺福初, 军事医学科学院放射医学研究所 北京市 100850
张昊, 2003年郑州大学肿瘤学硕士, 主要从事消化系统肿瘤的诊治工作。
国家863高技术发展项目, No. 2001AA224011
通讯作者: 张昊, 450003, 河南省郑州市, 河南省人民医院老年病研究中心. 0371-zhanghao@vip.163.com
电话: 0371-65580603
收稿日期: 2006-04-26 接受日期: 2006-06-24

Impact of DNA repair gene hOGG1 Ser326Cys polymorphism on the risk of hepatocellular carcinoma

Hao Zhang, Bing-Tao Hao, Fu-Chu He

Hao Zhang, Center of Geriatrics Institute, Henan People's Provincial Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Bing-Tao Hao, Fu-Chu He, Institute of Medical Radiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2001AA224011

Correspondence to: Hao Zhang, Center of Geriatrics Institute, Henan People's Provincial Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. 0371-zhanghao@vip.163.com

Received: 2006-04-26 Accepted: 2006-06-24

Abstract

AIM: To investigate the associations of susceptibility to hepatocellular carcinoma (HCC) with DNA repair gene hOGG1 Ser326Cys polymorphism.

METHODS: The polymorphism of Ser326Cys in DNA damage repair gene hOGG1 was analyzed by sequencing and genotyping in 96 HCC patients and healthy controls.

RESULTS: The frequencies of Cys/Cys, Cys/Ser and Ser/Ser genotypes were 20.9%, 44.2% and 34.9%, respectively. The odd ratio (OR) of heterozygote Ser/Cys was 1.5, and that of homozy-

gosity Cys/Cys was 1.9, which was significantly higher than that of Ser/Ser, respectively. The relative risk of HCC in patients with hepatitis B virus (HBV) infection was over 9 times in patients without HBV infection ($OR = 9.2$; 95%CI 0.99-5.9). Furthermore, the OR for the variant genotype and HBV infection was 5.5 (95%CI 0.7-240.1) and 10.9 (95%CI 1.6-453.3), respectively, while that was 27.8 (95%CI 4.7-970.2) in patients with both variant genotype and HBV infection.

CONCLUSION: The allele Cys for hOGG1 gene may increase the genetic susceptibility of HCC, in which HBV infection plays a synergic role.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; DNA damage repair gene; Polymorphism; Hepatitis B virus infection

Zhang H, Hao BT, He FC. Impact of DNA repair gene hOGG1 Ser326Cys polymorphism on the risk of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2311-2314

摘要

目的: 探讨DNA损伤修复基因hOGG1的遗传多态Ser326Cys与肝细胞癌(HCC)易感性的关系。

方法: 应用基因测序分型方法, 分析96例HCC患者和96例健康对照hOGG1的遗传多态及与HBV感染的交互作用。

结果: HCC病例组的Cys/Cys, Cys/Ser和Ser/Ser基因型分别为20.9%, 44.2%和34.9%。Ser/Cys杂合子个体的OR值为1.5, Cys/Cys纯合子个体的OR值为1.9, 明显高于Ser/Ser个体, 表现出剂量效应。HBV感染者发生HCC的相对风险度是非HBV感染者的9倍($OR = 9.2$; 95%CI 0.99-5.9)。对于HCC, hOGG1-Ser326Cys变异或HBV感染单一因素的OR值分别为5.5 (95%CI 0.7-240.1)和10.9 (95%CI 1.6-453.3), 但携带变异基因者如果感染HBV, OR值则高达27.8 (95%CI 4.7-970.2)。

■背景资料

肝癌的发生与个体的易感性相关, 中国人肝癌的个体易感因素目前尚不清楚, 乙肝病毒感染是导致肝癌的重要原因, 二者的关系是本文想要探讨的问题。

■研发前沿

多基因疾病已成为该领域研究的热点, 估计参与多基因疾病发病原理的基因可达3-20个, 这些基因的单核苷酸多态及其特定组合可能是造成疾病易感性最重要的原因。对特定候选基因的单核苷酸多态与相关疾病的关联研究是该领域研究的重点。

■相关报道

Radicella *et al* 克隆了人hOGG1基因并发现其具有遗传多态性, 日本的研究发现, hOGG1基因多态增高肺癌易感性, 邢德印的研究表明, hOGG1基因多态与中国人食管癌易感性相关, 为本研究提供借鉴。

结论: DNA修复基因hOGG1的Cys等位基因可能增加HCC的遗传易感性, 他与HBV协同在乙肝相关性HCC的发生中起着重要作用。

关键词: 肝细胞肝癌; DNA修复基因; 遗传多态; HBV感染

张昊, 郝冰涛, 贺福初. DNA损伤修复基因hOGG1的遗传多态与乙肝相关性HCC的风险. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2311-2314

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2311.asp>

0 引言

近年来, 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发病率居高不下, 已成为严重危害人民健康的恶性肿瘤之一. 乙型肝炎病毒(HBV)感染是公认的HCC的主要病因, 但HBV感染者中只有一小部分发展成HCC; 提示在相同的暴露条件下, 个人的易感性因素可能是促使发病的关键. 通过对HBV导致HCC的发病机制的研究发现, HBV基因组中的蛋白HBx是引起HCC的重要蛋白^[1-2]. 最近发现, HBx可以与DNA损伤结合蛋白DDB1 (damaged DNA binding protein 1)作用, 从而降低细胞的核苷酸切除修复能力^[3]. 在DNA损伤中8-羟基鸟嘌呤(8-hydroxyguanine)是一种高突变损伤, hOGG1是修复8-羟基鸟嘌呤的主要的DNA糖苷酶^[4]. 有研究表明, 在hOGG1基因中存在着一个改变氨基酸编码序列的多态, 可以导致这个糖苷酶326位的Ser改变为Cys, 携带Ser的hOGG1修复能力是Cys变异体的7倍^[5]. 既往研究表明, hOGG1的遗传多态在多个群体中与肺癌的遗传易感性关联^[6]. 其与乙肝相关性HCC是否相关尚未见报道. 为此, 我们采用基因测序方法进行了病例-对照研究, 分析hOGG1的遗传多态与HBV感染交互作用对HCC风险的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 采用病例-对照研究, 包括96例HCC患者和96例正常对照, 病例和对照均为北方汉族群体, 来自河南省人民医院, 所有病例经临床资料和组织病理学检查确诊为HCC, 所有研究对象之间没有直系血缘关系(表1)。

1.2 方法 采用改良Miller法抽提研究对象外周血白细胞DNA, 应用Primer 3.0软件设计引物序列, 正向引物: 5'-CACACAGACTCCACCCTCCTA; 反向引物: 5'-CTGAACCGGGAGTTTCTCTG. 反应体系为25 μ L, 含0.1 μ g模板DNA,

表1 研究对象的年龄、性别构成和HBV感染状况

项目	病例组	对照组
男性(n)	81	79
女性(n)	15	17
年龄(y)	49.9 $\pm$ 18	49.9 $\pm$ 17.0
非HBV感染n (%)	22 (23.3)	84 (87.9)
HBV感染n (%)	74 (76.7)	12 (12.1)

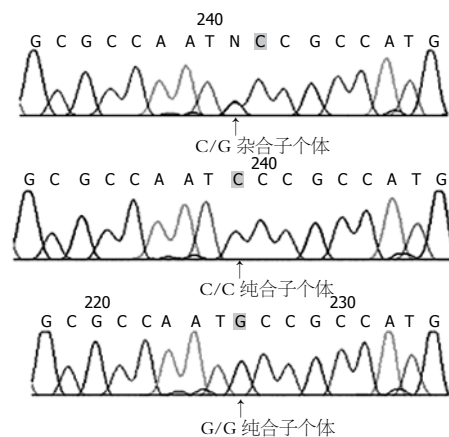


图1 3种基因型个体在hOGG1基因第5外显子基因组区域测序结果。

0.4 μ mol/L各引物, 0.1 μ mol/L dNTP, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 1.0 U Taq聚合酶以及1 $\times$ 反应缓冲液, 反应条件为: 95 $^{\circ}C$ 预变性2 min, 而后94 $^{\circ}C$ 30 s, 58 $^{\circ}C$ 30 s和72 $^{\circ}C$ 30 s, 进行28个循环, 最后72 $^{\circ}C$ 延伸9 min. 然后将PCR产物采用MultiScreen[®]-PCR plate (Millipore)进行纯化. 取纯化产物2 μ L为模板, 用ABI PRIMERTM Big-Dye测序试剂盒, 进行PCR测序反应. 再在ABI 3700自动测序仪进行毛细管电泳序列测定. 在Unix服务器上运行PolyPhred软件, 获得每个个体的基因型, 并通过人工确定。

统计学处理 以比值比(odds ratio, OR)及其95%置信区间(confidence interval, CI)表示相对风险度. 所有的统计检验均为双侧概率检验. 所用统计软件为Statistic Analysis System第6版(SAS Institute, Cary, NC, USA)。

2 结果

2.1 测序结果 通过测序可以明确地获得病例和对照的hOGG1基因Ser326Cys的基因型(图1). C/C基因型对应蛋白编码序列Ser/Ser个体, G/G基因型对应蛋白编码序列Cys/Cys个体, C/G基因型对应蛋白编码序列Ser/Cys个体. 由于部分样本DNA降解, 导致测序不成功. 96个对照和96

■创新盘点

本文采用基因测序的方法, 对hOGG1基因多态与肝癌发生进行关联研究, 从基因水平研究肝癌的致病机制。

个病例测序结果, 可以明确得到的分型有89例对照、86例病例, 两组平均测序成功率为91%。

2.2 hOGG1基因型分布及其与HCC的关系 HCC病例组的Cys/Cys, Cys/Ser和Ser/Ser基因型分别为20.9%, 44.2%和34.9%。基因型Cys/Cys和Cys/Ser与Ser/Ser相比在患者中的频率高于正常对照, 表现出剂量效应。其中携带Cys/Cys基因型的个体患病风险增加约为2倍($OR = 1.9$)。正常人群Cys等位基因频率为33.1%, HCC病例组为43%, HCC患者要明显高于正常对照(表2)。

2.3 hOGG1-Ser326Cys多态和HBV感染交互作用与HCC风险 HCC组的HBV感染率显著高于对照组(76.7% vs 10.1%), HBV感染者发生HCC的相对风险度是非HBV感染者的9倍($OR = 9.2$; 95% CI 0.99-5.9)。我们以携带野生型而又未感染HBV者为参照, 分析变异基因型与HBV感染之间的交互作用对HCC风险的影响。结果(表3)显示, 对于HCC, hOGG1-Ser326Cys变异或HBV感染单一因素的 OR 值分别为5.5 (95% CI 0.7-240.1)和9.9 (95% CI 1.6-453.3), 但携带变异基因者如果感染HBV, OR 值则高达27.8 (95% CI 4.7-970.2)。

3 讨论

HBV基因组中的蛋白HBx是引起HCC的重要蛋白, 该蛋白可与细胞中的多种癌症相关的蛋白包括P53, CREB, ATF2, RBP5等相互作用^[1-2]。最近人们发现, HBx可以与DDB1作用, 从而抑制该蛋白与DNA的结合^[3]。DDB1是DNA修复系统中核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)途径的重要蛋白, 他可以结合到受损伤的DNA上, 引发核苷酸切除修复^[7]。HBx蛋白与DDB1的结合可以降低细胞的核苷酸切除修复能力^[3]。HBx还可以降低2个重要的NER蛋白XPB和XPD的表达。XPB和XPD是NER中的转录修复因子TF IIH复合物的的重要组成部分, 具有解旋酶的作用^[7]。这2个蛋白的突变可以导致一种严重的肿瘤易感性疾病-着色性干皮病^[8-9]。对HCC的EST分析也发现DNA修复相关基因DDB2, RAD51C, RAD23A, ERCC1和LIG1表达的下调^[3,10,15]。在过量表达DNA修复基因MGMT的转基因小鼠中也发现自发性HCC发病率降低^[11], 而在患有活动性肝炎的HBV转基因小鼠体内可以检测到广泛的DNA氧化损伤^[12], 这些均提示HBV在肝细胞癌变过程中, 可能通过影响DNA损伤修复来起作用, DNA修复基因在HCC的发生过程中起着

表 2 hOGG1-Ser326Cys多态性与HCC风险的关系

项目	HCC 病例 <i>n</i> (%)	对照组 <i>n</i> (%)	OR (95% CI)
等位基因	Ser 98(57.0)	119(66.9)	1.0(ref)
	Cys 74(43.0)	59(33.1)	1.5(0.99-2.35)
基因型	Ser/Ser 30(34.9)	42(47.2)	1.0(ref)
	Cys/Ser 38(44.2)	35(39.3)	1.5(0.79-2.93)
	Cys/Cys 18(20.9)	13(14.6)	1.9(0.83-4.55)

表 3 hOGG1-Ser326Cys变异与HBV感染交互作用对HCC的风险

基因	HBV	HCC病例	对照组	OR (95% CI)
否	无	1	16	1.0
是	无	5	22	5.5(95% CI 0.7-240.1)
否	有	2	8	9.9(95% CI 1.6-453.3)
是	有	38	4	27.8(95% CI 4.7-970.2)

重要作用。

在生理或病理状态下, DNA氧化损伤广泛存在; 如果损伤得不到及时有效的修复, 细胞将发生基因突变和癌变^[12], 因此, 由各种因素导致的DNA氧化损伤, 可能参与了HCC的发生和发展。本文结果表明, hOGG1的Ser326Cys多态及与HBV感染交互作用与中国人HCC的风险显著相关。

hOGG1基因编码的蛋白产物具有DNA糖苷酶和AP裂解酶活性, 可以特异切除oh8Gua, 从而避免在DNA复制过程中导致的G:C→T:A颠换突变^[13]。oh8Gua是氧化自由基攻击DNA形成的主要产物, 是一种重要的致癌性致突变性损伤^[14]。我们应用病例-对照分子流行病学方法, 通过基因测序分析发现, 等位基因Cys的基因频率在HCC患者高于正常对照, 基因型Cys/Cys和Cys/Ser与Ser/Ser相比较, 在患者中的频率都要高于对照, 表现出量效关系, 携带Cys/Cys基因型的个体患病风险较其他基因型(Cys/Ser和Ser/Ser)增加约2倍。我们的结果从分子遗传学角度为DNA氧化损伤可能导致HCC提供了证据。hOGG1基因涉及oh8Gua切除修复, 该基因多态可引起个体对DNA氧化损伤修复能力的差异, 因此, 可能与HCC的遗传易感性有关。hOGG1基因Cys/Cys基因型增高HCC风险具有生物学上的关联性。体外实验发现, Cys等位基因的修复能力比Ser等位基因低约7倍^[15], 从机制上支持我

■应用要点

肝癌为我国高发的恶性肿瘤, 如果检测和确定肝癌易感性单核苷酸多态, 则为阐明我国人群肝癌的病因及基于遗传学背景的个体化治疗和临床试验奠定基础, 为肝癌的预防、诊断、治疗和新药筛选创造条件。

■名词解释

单核苷酸多态: 指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的一种DNA序列多态性, 是人类基因组DNA序列中最常见的变异形式, 并有很高的信息含量。

■同行评价

DNA损伤修复基因的遗传多态性与肿瘤的发生,是目前肿瘤流行病学研究的热点,本文选择hOGG1的遗传多态Ser326Cys与肝细胞肝癌易感性的关系为研究对象,比较新颖,但是样本量少(国际上一般样本量达200-300),有一定学术价值。

们的结论。目前认为,肿瘤遗传易感性最根本的原因是各种损伤因素破坏了基因组的稳定性。hOGG1作为DNA修复基因,可能在维持基因组稳定性方面发挥重要作用。实验表明,hOGG1灭活后酵母菌基因组中G:C→T:A突变频率显著增加^[5],由于Cys等位基因编码的蛋白活性降低,所以携带Cys/Cys基因型的个体修复oh8Gua的能力可能降低,这样造成oh8Gua在基因组中存留而加快肿瘤相关G:C→T:A突变的积累,使发生肿瘤的易感性增加。在人类肺癌、食管癌以及其他一些肿瘤p53基因的G:C→T:A突变率较高^[15],而实验表明,oh8Gua是引起此类突变的重要原因^[16]。如果两者之间确实存在因果关系,那么oh8Gua功能低下也可能易患其他肿瘤。事实上,已有研究报道Cys/Cys基因型个体罹患肺鳞癌的风险显著高于其他两种基因型^[17],hOGG1基因错义突变也与小细胞肺癌和食管癌的发生有关^[18-19]。

4 参考文献

- Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
- Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999; 80: 875-879
- Wakasugi M, Kawashima A, Morioka H, Linn S, Sancar A, Mori T, Nikaido O, Matsunaga T. DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2002; 277: 1637-1640
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27: 247-254
- Sugimura H, Kohno T, Wakai K, Nagura K, Genka K, Igarashi H, Morris BJ, Baba S, Ohno Y, Gao C, Li Z, Wang J, Takezaki T, Tajima K, Varga T, Sawaguchi T, Lum JK, Martinson JJ, Tsugane S, Iwamasa T, Shinmura K, Yokota J. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 669-674
- Inoue M, Osaki T, Noguchi M, Hirohashi S, Yasumoto K, Kasai H. Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 691-695
- de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 453-460
- Butkiewicz D, Rusin M, Harris CC, Chorazy M. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum Mutat* 2000; 15: 577-578
- Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM, Egly JM. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet* 1998; 20: 184-188
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 2001; 7: 273-282
- Sakumi K, Shiraishi A, Shimizu S, Tsuzuki T, Ishikawa T, Sekiguchi M. Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Res* 1997; 57: 2415-2418
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370
- Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H, Yokota J. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998; 16: 3219-3225
- Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-1450
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878
- Hussain SP, Aguilar F, Cerutti P. Mutagenesis of codon 248 of the human p53 tumor suppressor gene by N-ethyl-N-nitrosourea. *Oncogene* 1994; 9: 13-18
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-608
- Ishida T, Takashima R, Fukayama M, Hamada C, Hippo Y, Fujii T, Moriyama S, Matsuba C, Nakahori Y, Morita H, Yazaki Y, Kodama T, Nishimura S, Aburatani H. New DNA polymorphisms of human MMH/OGG1 gene: prevalence of one polymorphism among lung-adenocarcinoma patients in Japanese. *Int J Cancer* 1999; 80: 18-21
- Xing DY, Tan W, Song N, Lin DX. Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2001; 95: 140-143

电编 张敏 编辑 潘伯荣

食管鳞癌细胞Survivin蛋白及其体视学参数的测定

韩永, 徐燕杰, 余琦, 杨敏, 赵敏, 周会芹

韩永, 余琦, 杨敏, 赵敏, 周会芹, 解放军总医院第二附属医院病理科 北京市 100091

徐燕杰, 解放军总医院第二附属医院医务部 北京市 100091
韩永, 2005年解放军总医院病理学硕士, 主管技师, 从事病理实验工作十余年.

通讯作者: 韩永, 100091, 北京市, 解放军总医院第二附属医院病理科. frankbj72@163.com

电话: 010-66775260

收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-07-10

Expression of Survivin protein and measurements of stereology parameters in esophageal squamous carcinoma

Yong Han, Yan-Jie Xu, Qi Yu, Min Yang, Min Zhao, Hui-Qin Zhou

Yong Han, Qi Yu, Min Yang, Min Zhao, Hui-Qin Zhou, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China
Yan-Jie Xu, Department of Medical Administration, the Second Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China

Correspondence to: Dr. Yong Han, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China. frankbj72@163.com
Received: 2006-06-21 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To investigate the expression of Survivin in esophageal squamous carcinomas (ESC) and measure the stereology parameters of ESC cells.

METHODS: SP immunohistochemistry was used to detect the expression of Survivin protein in 52 ESC patients. Thirty Survivin-positive ESC cells were measured with image analyze system under microscope. The data for the stereological analysis include the body density of nucleus (V_{vn}), the surface area density of nucleus (S_{vn}), the mean volume of nucleus (V), the surface area of nucleus (S), the mean free path of nucleus (λ), the number density of nucleus (N_v), and the mean curvature density of nucleus (K_v). The differences of the parameters were compared among the tumors with different degrees.

RESULTS: The positive rate of Survivin protein

was 57.7% in ESC, and up-regulated expression of Survivin was strongly associated with poor differentiation ($\chi^2 = 6.1099$, $P = 0.0471$). The values of V_{vn} , S_{vn} , V and S were increased, but those of K_v , N_v , and λ were decreased ordinarily in well, moderately and poorly differentiated tumor cells, of which the values of V_{vn} ($F = 3.8368$, $P = 0.0342$) and S_{vn} ($F = 3.7143$, $P = 0.0376$) had significant differences ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Survivin protein is correlated with the differentiation in ESC. V_{vn} and S_{vn} were important indexes of cellular abnormality, which provides evidences for clinical morphological diagnosis.

Key Words: Esophageal neoplasm; Survivin; Immunohistochemistry; Stereology

Han Y, Xu YJ, Yu Q, Yang M, Zhao M, Zhou HQ. Expression of Survivin protein and measurements of stereology parameters in esophageal squamous carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23): 2315-2318

摘要

目的: 探讨凋亡抑制因子Survivin在食管鳞癌(ESC)组织中的表达及其肿瘤细胞进行体视学分析.

方法: 应用免疫组织化学SP法检测52例不同分化食管鳞癌Survivin蛋白的表达, 运用图像分析系统在显微镜下测量Survivin阳性肿瘤细胞的体视学参数, 依据有关体视学公式计算出参数核的体密度(V_{vn})、核的表面密度(S_{vn})、核的平均体积(V)、核的平均表面积(S)、核的平均自由程(λ)、核的数密度(N_v)、核的平均曲度密度(K_v), 比较这些参数在不同分化肿瘤的差异.

结果: Survivin蛋白在ESC组织中阳性表达率为57.7%, 其表达越强, 组织分化程度越低($\chi^2 = 6.1099$, $P = 0.0471$). 参数 V_{vn} , S_{vn} , V , S 的大小是依高、中、低分化的顺序增加, 而 K_v , N_v , λ 依高、中、低分化的顺序减小, 其中 V_{vn} ($F = 3.8368$, $P = 0.0342$), S_{vn} ($F = 3.7143$, $P =$

■背景资料

我国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家, 对人们健康构成极大威胁. 近年来Survivin在恶性肿瘤组织中的表达已有较多报道, 且与ESC的分化程度有密切关系; 但体视学参数用于ESC的报道国内未见.

■创新盘点

体视学参数用于ESC的研究比较新颖,该文提示是肿瘤细胞分化的重要指标,可为临床形态学诊断提供依据。

0.0376)参数有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: ESC组织Survivin蛋白的表达与其分化程度有密切关系,肿瘤细胞 V_{vn} , S_{vn} 参数是肿瘤细胞分化重要指标,且为临床形态学诊断提供了依据。

关键词: 食管肿瘤; Survivin; 免疫组化; 体视学

韩永, 徐燕杰, 余琦, 杨敏, 赵敏, 周会芹. 食管鳞癌细胞Survivin蛋白及其体视学参数的测定. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2315-2318

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2315.asp>

0 引言

传统的形态研究方法容易使人们对组织结构的认识局限在二维空间,并且缺乏组织结构的数量概念。随着电子计算机的普及、图象分析仪器的产生和体视学原理、方法的发展等,生物形态研究正由定性向定量、由二维向三维方向发展,充分展现了体视学发展和应用的广阔前景^[1-2]。应用体视学方法能使人们从三维水平定量地阐明组织、细胞结构。体视学的基本原理就是通过定量分析切片图像与组织结构的关系,用几何学、概率论、数理统计、微积分、曲线、曲面理论和拓扑学等数学方法准确地揭示这种关系以实现三维结构的定量分析^[3-4]。Survivin是凋亡抑制因子家族的新成员,选择性表达于常见的恶性肿瘤,而在癌旁正常组织和成人分化组织中不表达或低表达^[5-6]。Survivin对某些肿瘤凋亡抑制的程度是影响其预后的关键^[7-9]。目前,国内外文献中对其在食管鳞癌(ESC)中的表达报道甚少^[10]。我们采用免疫组化SP法检测ESC组织中Survivin的表达,应用体视学技术,对食管鳞癌不同分化的癌细胞的Survivin的表达体视学参数进行定量研究,从量化角度进一步探讨ESC不同分化机制。

1 材料和方法

1.1 材料 1997-2005手术切除的ESC 52例,均经病理学确诊,高分化15例,中分化17例,低分化20例。同时取非癌食管组织作为对照。男38例,女14例,平均年龄50岁,Survivin阳性30例,非癌食管组织均为阴性。

1.2 方法 标本经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,切片厚4 μ m, HE染色进行组织学分类。免疫组化采用SP法。Survivin购自Santa Cruz公司,试剂盒为北京中山公司产品。苏木素复染。空白对照

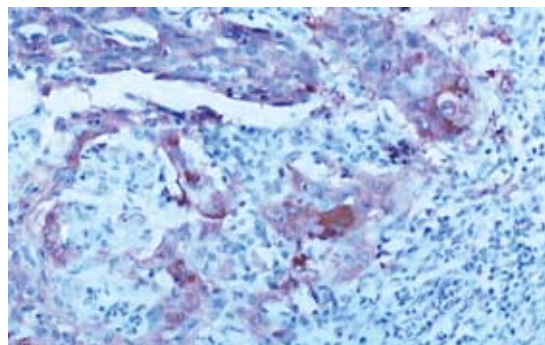


图1 ESC细胞质Survivin蛋白表达(SP × 100)。

表1 ESC病理分级Survivin表达及R/C表资料的卡方检验

分化	Survivin		小计
	Positive	Negative	
高	5	10	15
中	10	7	17
低	15	5	20
合计	30	22	52

$$\chi^2 = 6.1099, v = 2, P = 0.0471.$$

以PBS取代一抗,阳性对照为已知阳性片。阳性判断标准:阳性染色主要位于细胞质,呈棕黄色颗粒状,背景清晰。阴性对照无着色。应用北京天地百年科技有限公司TD-2000真彩色病理细胞显微分析系统,显微镜下选取阳性细胞集中的视野,调整图像效果,经彩色CCD摄像机将图像输入计算机病理图像分析系统,转化为数字图像。注意输入图像的背底灰度(即每张载玻片上没有细胞或组织区域的灰度)一致,以消除载玻片透光度及背底灰度等的影响。每个图像选取30个阳性细胞,选择测量指标,由系统自动测量相应数据。选用的参数有: V_{vn} , 核的体密度; S_{vn} , 核的表面积密度; V , 核的平均体积; S , 核的平均表面积; λ , 核的平均自由程; N_v , 核的数密度; K_v , 核的平均曲度密度。

统计学处理 Survivin蛋白采用定性资料的R×C表资料的Pearson 检验,体视学参数采用单因素多水平完全随机设计的方差分析。以上统计分析均在计算机上由统计软件包SPSS 10.0 进行。

2 结果

2.1 ESC组织Survivin蛋白的表达 ESC组织中Survivin蛋白阳性表达率为57.7%(30/52, 图1)。ESC的组织分化程度越低, Survivin蛋白的表达越强,低、中、高分化ESC阳性表达率明显降低(表1), R

表 2 ESC病理分级Survivin标记各体视学参数统计分析 (mean ± SD)

分化	参数						
	V _{vn}	S _{vn}	λ (× 10 ³)	K _v	N _v	V (× 10 ⁶)	S (× 10 ⁶)
高	0.471 ± 0.030	0.187 ± 0.013	90 ± 28	0.067 ± 0.014	0.0012 ± 0.0003	4.9 ± 0.6	2.1 ± 0.2
中	0.509 ± 0.037	0.212 ± 0.031	90 ± 29	0.066 ± 0.006	0.0011 ± 0.0001	5.0 ± 0.7	2.1 ± 0.3
低	0.530 ± 0.047	0.230 ± 0.035	88 ± 29	0.065 ± 0.003	0.0010 ± 0.0003	5.1 ± 0.7	2.1 ± 0.3

表 3 V_{vn}完全随机设计方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	P
总	0.0602	29			
组间	0.0133	2	0.0067	3.8368	0.0342
组内	0.0468	27	0.0017		

×C表资料的Pearson χ^2 检验, $\chi^2 = 6.1099$, 自由度 = 2, $P = 0.0471(P < 0.05)$.

2.2 不同分化ESC Survivin蛋白表达体视学参数
参数V_{vn}, S_{vn}, V, S是依高、中、低分化的顺序增加K_v, N_v, λ是依高、中、低分化的顺序减小(表2), 完全随机设计的方差分析, V_{vn}, S_{vn}参数的比较有显著差异($P < 0.05$, 表3, 表4).

3 讨论

Survivin是Duperray *et al*^[11]利用效应细胞蛋白酶受体cDNA在人体基因组库中筛选克隆出的新基因, 该基因定位于人染色体17q25, 是凋亡抑制基因家族的一个新成员, 通过级联式激活并溶解蛋白质, 主要抑制Caspase-3, Caspase-7的活性, 阻断细胞的凋亡, Survivin蛋白是迄今发现的最强的凋亡抑制因子^[12]. 在胚胎发育期组织和人类大多数肿瘤组织可见阳性表达, 但在正常成熟组织中不表达(胸腺、生殖腺除外)^[13-14]. 而在大多数肿瘤组织内却有Survivin蛋白的表达, 其参与肿瘤的发生发展, 并与肿瘤的分级密切相关. Survivin表达与肿瘤的组织学类型、分化程度、TNM分期及淋巴结转移的关系各家报道不一. 多数研究表明, Survivin的表达与多种肿瘤的生物学特性, 分期密切相关^[15]. Kawasaki *et al*^[16]的资料显示, Survivin表达与胃癌的组织学类型及淋巴管浸润有关. Lo *et al*^[17-18]的研究显示, Survivin在口腔及皮肤鳞癌组织中的表达与肿瘤的分化程度和淋巴结转移有密切关系. 少数研究认为Survivin的表达与上述临床病理因素无关^[19]. 我们发现Survivin蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率为57.7%, 且低、中、高分化组

表 4 S_{vn}完全随机设计方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	P
总	0.0338	29			
组间	0.0073	2	0.0036	3.7143	0.0376
组内	0.0265	27	0.0010		

阳性表达有显著性差异. 提示在肿瘤组织中的Survivin蛋白能够抑制正常的细胞凋亡过程, 使癌细胞获得永生性(immortality). Survivin蛋白在肿瘤细胞中的表达越高, 其对癌细胞凋亡抑制的能力越强, 癌细胞的生存能力和肿瘤的恶性程度也随之增高. 提示Survivin是一个有研究价值的肿瘤标志物及判断ESC预后的参考指标, 他可能会成为评估食管鳞癌侵袭进展情况的参考指标和肿瘤治疗的新靶点. 体视学是从二维平面上测得的图像数据, 获取三维空间内结构的定量信息的科学. 他是根据结构的随机截面(切片), 定量研究结构的几何特征的方法学. 已应用于肝癌, 大肠癌^[20]等疾病的研究中. 癌巢的表面积密度(S_v)为肿瘤单位体积内癌巢的表面积, 癌实质的体积密度(V_v)为肿瘤单位体积内癌实质的体积. S_v值越大, 表明癌与间质接触面积越大, 侵袭血管的机会越大; V_v值大, 说明癌实质的量多, 间质的量少, 癌与间质接触面积少^[21]. 细胞分子水平的变化必然引致细胞形态的改变, 从我们的实验结果可以看出, 参数V_{vn}, S_{vn}, V, S的大小是依高、中、低分化的survivin蛋白阳性细胞的顺序增加, λ, N_v, K得参数大小则依高、中、低分化的Survivin蛋白阳性细胞得顺续减少, 说明细胞分化越低部分体视学参数也呈现出规律性的量化改变, 其中V_{vn}, S_{vn}参数得比较差异显著. 可以说明V_{vn}, S_{vn}两项参数是细胞分化的重要指标, 他们为临床形态学诊断及预后提供了依据.

4 参考文献

- 1 Pickett J, London E. The neuropathology of autism: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 925-935
- 2 Stark AK, Pelvig DP, Jorgensen AM, Andersen

■名词解释
体视学是从二维平面上测得的图像数据, 获取三维空间内结构的定量信息的科学. 他是根据结构的随机截面(切片), 定量研究结构的几何特征的方法学.

同行评价

本文研究了食管鳞癌细胞Survivin蛋白表达及其与体视学参数的关系。课题新颖,有创新性,设计合理,推理正确,有参考价值。

- BB, Pakkenberg B. Measuring morphological and cellular changes in Alzheimer's dementia: a review emphasizing stereology. *Curr Alzheimer Res* 2005; 2: 449-481
- 3 De Paepe ME, Mao Q, Powell J, Rubin SE, DeKoninck P, Appel N, Dixon M, Gundogan F. Growth of pulmonary microvasculature in ventilated preterm infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 204-211
- 4 Okur A, Kantarci M, Akgun M, Alper F, Cayir K, Koc M, Onbas O. Unbiased estimation of tumor regression rates during chemoradiotherapy for esophageal carcinoma using CT and stereology. *Dis Esophagus* 2005; 18: 114-119
- 5 Wang W, Luo H, Wang A. Expression of survivin and correlation with PCNA in osteosarcoma. *J Surg Oncol* 2006; 93: 578-584
- 6 Chang Q, Qin R, Huang T, Gao J, Feng Y. Effect of antisense hypoxia-inducible factor 1alpha on progression, metastasis, and chemosensitivity of pancreatic cancer. *Pancreas* 2006; 32: 297-305
- 7 Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 478-482
- 8 Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, Peng J, Zhang M, Pan X, Hou M, Wu XY, Lin Q, Chen F. Ponidicin, an ent-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPES, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells in vitro. *Cancer Invest* 2006; 24: 136-148
- 9 Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1013-1017
- 10 Warnecke-Eberz U, Hokita S, Xi H, Higashi H, Baldus SE, Metzger R, Brabender J, Bollschweiler E, Mueller RP, Dienes HP, Hoelscher AH, Schneider PM. Overexpression of survivin mRNA is associated with a favorable prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 1241-1246
- 11 Duperray A, Languino LR, Plescia J, McDowall A, Hogg N, Craig AG, Berendt AR, Altieri DC. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* 1997; 272: 435-441
- 12 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812
- 13 Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43-49
- 14 Adida C, Ambrosini G, Plescia J, Crotty PL, Costa J, Altieri DC. Protease receptors in Hodgkin's disease: expression of the factor Xa receptor, effector cell protease receptor-1, in Reed-Sternberg cells. *Blood* 1996; 88: 1457-1464
- 15 Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1327-1333
- 16 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 17 Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De Rosa G, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 249-254
- 18 Lo Muzio L, Pannone G, Mignogna MD, Staibano S, Mariggio MA, Rubini C, Procaccini M, Dolci M, Bufo P, De Rosa G, Piattelli A. P-cadherin expression predicts clinical outcome in oral squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1089-1099
- 19 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134
- 20 Wu LP, Chen LH, Zhang JS, Sun L, Zhang YQ. Protective effect of rhIL-1beta on pancreatic islets of alloxan-induced diabetic rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3353-3355
- 21 Zhang DS, Liu L, Jin LQ, Wan ML, Li QH. Effect of phosphorus-32 glass microspheres on human hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1551-1554

电编 李琪 编辑 潘伯荣

调节性T细胞在肝脏免疫及疾病中的作用

杨俊涛, 张令强, 贺福初

杨俊涛, 张令强, 贺福初, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京市 100850
国家863课题, No. 2002AA223051
国家自然科学基金资助项目, No. 30270659, 30321003, 30400398
通讯作者: 张令强, 100850, 北京市, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所. zhanglq@hupo.org.cn
电话: 010-66931216
收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-05-08

摘要

免疫抑制是控制免疫系统稳定的一种重要机制. 调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)控制着免疫系统对自身抗原的免疫耐受, 具有强大的抑制免疫反应能力, 广泛参与了各种免疫抑制现象. 随着对Tregs研究的不断深入, 人们发现Tregs参与调节了肝脏免疫耐受、肝移植、慢性肝炎和肝癌等各种肝脏病理生理现象. Tregs的功能异常也会影响肝脏多种疾病的进程. 我们总结了调节性T细胞的相关进展及其在肝脏免疫及疾病中的作用.

关键词: 调节性T细胞; 肝脏疾病; 免疫抑制

杨俊涛, 张令强, 贺福初. 调节性T细胞在肝脏免疫及疾病中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2319-2323
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2319.asp>

0 引言

免疫系统的稳态控制对机体至关重要. 免疫系统既要有能够识别外来抗原或病原体并将其清除的能力, 也要具有识别自身抗原并诱导自我免疫耐受的机制. 免疫系统即为识别“自我”与“异我”并产生相应反应的系统^[1]. 早在1970年代, 人们就发现了一种具有免疫抑制性质的T细胞^[2], 伴随着曲折的研究, 调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)这种控制着自身免疫耐受的重要细胞逐渐为人们所认识并得到了深入研究. Tregs能够抑制免疫反应, 防止自身免疫的发生, 诱导免疫耐受. 而肝脏作为人体重要的器官, 在生理和某些病理情况下经常处于免疫豁免或免疫低下状态. 因此, Tregs在肝脏正常生理状态下的作用机制, 以及Tregs在病毒性肝炎、肝癌、肝移植等肝脏病理过程中的功能作用就

引起了人们极大的兴趣. 我们就Tregs的研究进展及Tregs在肝脏免疫及疾病中的作用进行综述.

1 调节性T细胞的来源

调节性T细胞是指既可天然产生又可以经诱导而产生的具有免疫抑制功能的细胞亚群. 天然产生的调节性T细胞是指经由胸腺分化, 并且在机体正常情况下持续表达IL-2受体 α 链(CD25⁺)的CD4⁺T细胞^[3], 又称为CD4⁺CD25⁺Tregs. 目前, 胸腺来源天然CD4⁺CD25⁺Tregs的功能研究较为清楚. CD4⁺CD25⁺Tregs在胸腺发育的晚期产生, 如果对这时的幼鼠进行胸腺切除后, 由于CD4⁺CD25⁺Tregs的生成障碍, 就可以导致小鼠产生多种自身免疫疾病^[4]. 如果清除成年小鼠体内的CD25⁺的细胞, 也会导致小鼠自身免疫病的发生. CD4⁺CD25⁺Tregs能够与自身抗原结合, 通过转基因小鼠的实验证明, CD4⁺CD25⁺Tregs的TCR受体与胸腺细胞表面MHC II-自身抗原复合体的高亲和力结合是其发育和功能获得的关键因素^[5-6]. 这种与自身抗原结合的能力使其在逃脱了胸腺的克隆清除后形成了强大而广泛的免疫抑制能力. 还有一小部分调节性T细胞是在皮肤或黏膜等外周器官经过抗原刺激而产生, 这部分细胞称之为抗原诱导型及抗原特异性的调节性T细胞, 根据分泌细胞因子的种类分为高水平生成IL-10的Tr1细胞^[7], 特异性分泌IL-4的Th2细胞和大量分泌TGF- β 的Th3细胞^[8]等, 其免疫抑制能力具有抗原特异性, 其成熟需要CD4⁺CD25⁺Tregs的参与^[9].

2 调节性T细胞的特征

CD4⁺CD25⁺Tregs表面表达一些活化标志, 如糖皮质激素诱导的TNFR超家族(glucocorticoid-induced TNFR superfamily, GITR)相关蛋白^[10], OX40 (CD134)^[11], L-selectin (CD62L)^[12], and CTLA-4 (CD152)^[13]等特殊分子, 但最重要的标志是其高表达转录因子Foxp3 (forkhead family transcription factor, forkhead Box p3). 通过

■背景资料

调节性T细胞参与了免疫系统的稳态控制, 影响机体对“自我”和“异我”的识别. 肝脏在免疫系统中的地位十分特殊, 在面对大量外来食物抗原及病原体的情况下能够产生免疫抑制表型, 在病理情况下肝脏疾病又易于慢性化. 深入理解调节性T细胞在肝脏中的功能有助于对肝脏疾病的治疗.

■研发前沿

在对调节性T细胞的研究中,影响其功能的因素无疑是一大热点.如果能够人为的对其功能进行控制,那么自身免疫病、慢性炎症乃至癌症的免疫治疗就大有可能.

分析“knock in”表达Foxp3-EGFP融合蛋白基因的小鼠表明,只有CD4⁺CD25⁺Tregs才能高表达Foxp3,而CD4⁺CD25⁻T细胞以及CD8⁺T细胞的Foxp3的表达量均极低. Foxp3不仅能作为CD4⁺CD25⁺Tregs的标志分子,还是决定CD4⁺CD25⁺Tregs功能的关键基因. 未经刺激的原始T细胞在转染了Foxp3基因后,会产生类似于CD4⁺CD25⁺Tregs的免疫抑制表型^[14]. Foxp3在人、小鼠、大鼠中的同源性极高,显示了其功能的保守性. Foxp3缺陷的小鼠易发自身免疫病,回输正常小鼠的CD4⁺CD25⁺Tregs则可以阻止疾病发生^[15]. 相应的,人类的Foxp3基因突变会导致X染色体连锁的先天免疫缺陷综合征(IPEX)^[6]. 这表明了Foxp3的表达及其下游靶基因的转录是CD4⁺CD25⁺Tregs实现免疫抑制功能的决定因素. 对于抗原诱导型的Tr1, Th2, Th3细胞,细胞表面的特征分子没有明显差别,其各自不同的细胞因子分泌情况决定了其不同特征和功能^[17].

3 调节性T细胞的功能

Tregs控制着机体对“自我”与“异我”之间耐受与反应的平衡. 在外周血中大约有5%-10%的CD4⁺细胞为CD4⁺CD25⁺Tregs,他们调节自身耐受和自主免疫. CD4⁺CD25⁺Tregs在体内发挥抑制免疫反应能力时虽然可以通过分泌IL-10和TGF- β 等免疫抑制因子来抑制效应T细胞的活性,但其主要还是通过表面的CTLA-4分子与抗原提呈细胞(APC)及效应T细胞表面上的CD80或CD86分子相互作用来发挥其免疫抑制功能^[18],通过其表面不同的趋化因子受体分布到全身^[19-20],进而调节机体自身免疫耐受. 回输CD4⁺CD25⁺Tregs能有效的治疗胸腺切除小鼠所患的自身免疫性疾病. 但人们在多种感染性疾病的治疗实验过程中发现,如果向感染小鼠体内回输病原体抗原特异性的CD8⁺T细胞,CD8⁺T细胞却不能有效的分泌细胞因子并发挥杀伤活性,只有通过CD25抗体清除掉被感染小鼠体内的CD4⁺CD25⁺Tregs之后,病原体抗原特异性的CD8⁺T细胞才能有效清除病原微生物^[21]. 抗原诱导型的Tregs是在包括CD4⁺CD25⁺Tregs等多种细胞的参与下,通过外来抗原提呈-细胞活化-再识别这3步成熟^[17],进而拥有了抑制针对特定抗原免疫反应的能力,这很可能与感染的慢性化相关. 正是由于调节性T细胞具有强大的抑制免疫

反应能力,其在体内的功能呈现出一种正负两面效应. 调节性T细胞既可以防止免疫系统对自身抗原的反应,防止自身免疫性疾病的发生,又可以诱导机体对移植物、病原体乃至肿瘤产生免疫耐受^[22],这是导致病毒慢性感染及肿瘤逃避免疫系统监视的重要原因^[23],也为相应的治疗提供了细胞生物学基础^[24].

4 调节性T细胞在肝脏疾病中的作用

4.1 调节性T细胞在肝脏中的作用机制 近年来随着研究的不断深入,肝脏在各种病理生理状态下其特殊的免疫表型与Tregs的关系正逐渐被揭开. 肝脏能够通过由肝窦内皮细胞(LSECs)作为抗原提呈细胞诱导CD4⁺T细胞转变为免疫抑制状态的细胞表型^[25],从而使肝脏在正常生理条件下往往处于免疫豁免状态,在面对大量外来食物抗原时维持一种低的免疫应答. 在病理状态下, Tregs强大的免疫抑制能力可以控制肝脏的炎症反应,例如爆发性或自身免疫性肝炎,减少肝脏损伤,也可以调节肝脏移植时产生免疫耐受. 但是, Tregs抑制免疫反应的能力同时也会导致病毒性肝炎的慢性化,同时还可能保护肿瘤抵抗免疫系统的杀伤作用而迅速生长.

4.2 自身免疫性肝炎与肝移植 自身免疫性肝炎体现为免疫紊乱,循环中出现大量抗自身抗体,造成肝脏损伤. 人们早已关注Tregs在自身免疫性肝炎中的作用^[26-27]. 有研究发现,患者的自身免疫性肝炎的严重程度越高,其体内Tregs的数量就越少,同时与健康人相比,从自身免疫性肝炎患者体内分离得到的Tregs活性明显降低,而且易于发生凋亡,人为的升高患者体内Tregs的量可能是治疗自身免疫性肝炎的新方法^[28-29]. 肝脏移植是治疗晚期肝癌有效手段, Tapirdamaz *et al*^[30]在研究调节Tregs功能的重要分子CTLA-4的单核苷酸多态性时发现,当肝脏移植受体者的CTLA-4基因存在着+49A/+6230G这种风险等位时,肝脏移植后患者发生急性排斥的机率远高于正常患者,表明Tregs正常功能的发挥关系到宿主对移植肝脏的耐受能力^[31]. Demirkiran *et al*^[32]及Jiang *et al*^[33]研究都表明,在肝移植后发生急性排斥反应的患者,其体内循环中Tregs的量较未发生排斥的患者要低很多,这意味着提高受供者循环中Tregs的量有利于移植肝脏的存活^[34]. 动物体内试验已经证明,通过免疫抑制剂二羟维生素D3 (1 α , 25-dihydroxyvitamin D3)及

■相关报道

调节性T细胞在肝脏中的功能研究这几年才刚刚开始,目前普遍认为其功能具有两面效应,即在抑制了危及肝脏的急性免疫反应之后,却保护了病原体或癌细胞,对肝脏形成了长期的慢性危害.

霉酚酸酯(mycophenolate mofetil)作用于小鼠, 诱导其体内的Tregs数量增高, 使小鼠对移植物的耐受明显增强, 而且将这种Tregs转移至未经治疗小鼠体内, 受体小鼠也产生了移植耐受现象^[35]。这为通过应用免疫抑制剂人为增加Tregs的数量, 进而治疗自身免疫性肝炎和降低肝脏移植排斥开辟了新的领域和方向^[36]。

4.3 病毒性肝炎 病毒性肝炎一直是威胁人类健康的主要疾病, 其感染易于慢性化, 极大地增加了病毒性肝炎的危害。Roh *et al*^[37]通过基因疫苗对HBV的转基因小鼠进行治疗时发现在二月龄转基因小鼠中, 其体内的Tregs细胞起到了免疫抑制的作用, 使基因疫苗不能有效的引发免疫反应。Furuichi *et al*^[38]发现在活体内, 如果预先清除小鼠体内的CD25⁺细胞, 通过基因治疗后的小鼠体内针对HBV特异性的效应CD8⁺T细胞和记忆性CD8⁺T细胞的数量均显著升高。Franzese *et al*^[39]发现在急性及慢性感染HBV个体中, 从其体内分离得到的CD4⁺CD25⁺Tregs均可以有效抑制细胞毒CD8⁺T细胞的活性。Xu *et al*^[40]最近优秀的研究证实了在严重慢性HBV肝炎患者中, 外周循环的CD4⁺CD25⁺Tregs数量明显升高, 而普通的HBV慢性肝炎患者其循环中CD4⁺CD25⁺Tregs量与其病毒载量正相关, 急性HBV肝炎患者循环中CD4⁺CD25⁺Tregs的量在急性期降低, 随着患者的恢复而逐渐升高。而且分离得到的CD4⁺CD25⁺Tregs具有诱导形成HBV抗原特异性Tregs的能力, HBV抗原特异性Tregs则加强了HBV感染的慢性化。以上的研究表明, 不论在体内还是在体外, Tregs都能下调抗病毒免疫反应而导致HBV感染的慢性化, 这为通过免疫手段抑制Tregs从而治疗HBV的慢性感染提供了理论基础。

Bolacchi *et al*^[41]和Cabrera *et al*^[42]的研究表明, 持续性HCV感染升高了循环中CD4⁺CD25⁺Tregs的数量, 并直接抑制了HCV特异性细胞CD8⁺T的活性^[43]。Tajimi *et al*^[44]则进一步证实了在HCV慢性患者中, 出现了针对HCV核心抗原及NS3抗原的抗原特异性Tregs, 这种抗原特异性Tregs的诱导生成无疑加重了HCV的感染。令人感兴趣的是Boyer *et al*^[45]的研究。在慢性感染HCV的患者中, 30%-50%的患者会并发冷球蛋白血管炎(mixed cryoglobulinemia vasculitis, MC)这种自身免疫性疾病, 而且10%-15%的患者会发展成系统性重度自身免疫

病变, 所以人们又称之为病毒相关的自身免疫病。Boyer发现, 与未发病的HCV患者相比, 严重并发MC的HCV患者, 其CD4⁺CD25⁺Tregs在外周循环数量会明显下降, 甚至会低于正常健康人群。这可能是由于CD4⁺CD25⁺Tregs过分聚集于炎症区域, 在努力抑制炎症反应的同时却导致了外周循环的Tregs数量下降, 从而减弱了其抑制自身免疫的能力, 进而导致了HCV患者并发MC。这从一个方面解释了为什么病毒感染会导致自身免疫病的原因, 也揭示了CD4⁺CD25⁺Tregs在免疫上微妙的调节作用。

4.4 肝癌 肿瘤之所以能够快速生长并转移的一个重要原因就是机体的免疫系统对肿瘤组织呈现出一种耐受性, 肿瘤细胞不能被淋巴细胞有效杀伤^[46]。Tregs在HCC患者中发挥了重要的作用。Ormandy *et al*^[47]的研究首次表明, HCC患者外周循环中的CD4⁺CD25⁺Tregs数量增加, Foxp3表达上调而且肿瘤组织中有CD4⁺CD25⁺Tregs浸润。而Unitt *et al*^[48]进一步研究了HCC患者肿瘤组织浸润的淋巴细胞, 发现只有少量的CD8⁺T细胞具有杀伤能力, 同时肝癌组织中浸润有CD4⁺CD25⁺Tregs细胞, 与健康人相比, HCC患者外周的CD4⁺CD25⁺Tregs细胞表达TGF- β 的量远远高于健康人, 抑制免疫反应的能力明显升高。Yang *et al*^[49]细致分析了25位HCC患者的肝组织, 发现癌旁组织的CD4⁺CD25⁺Tregs细胞比例高于癌远端组织, 而CD8⁺T细胞的比例恰好相反。而且在癌旁组织分离得到的CD4⁺CD25⁺Tregs能够抑制CD8⁺T细胞的增殖。Tregs可能错误的认为肿瘤为“自体”组织而抑制了免疫系统的效应, 防止“自身”免疫反应的发生, 却错误的保护了肿瘤。所以目前有观点认为^[50]: 以肿瘤组织内的Tregs为治疗靶点, 通过药物消除其抑制免疫的能力, 就能够“唤醒”机体的免疫系统对肿瘤的识别, 进而消除肿瘤, 这为肿瘤的免疫治疗提供了新的思路^[51]。

目前, 关于Tregs如何逃脱胸腺的克隆清除; Foxp3具体调控的基因以及Tregs抑制免疫反应的具体分子机制还不清楚。但随着研究的深入, 人们不仅会详细了解其控制免疫反应的分子机制, 同时Tregs在肝脏生理病理各个阶段中的作用也会被逐步揭开。彻底阐明Tregs的功能和作用机制, 不仅有利于我们进一步了解肝脏在生理条件下的免疫机制, 而且还为人们有针对性的治疗自身免疫性肝炎、病毒性肝炎、爆发性

■创新盘点

本文详细介绍了调节性T细胞特点及其功能, 全面的总结了肝脏在生理及病理条件下调节性T细胞所发挥的作用。

应用要点

应用分子和细胞的手段影响调节性T细胞的功能,能够通过免疫手段,大大加强和改善对肝移植、自身免疫性、病毒性肝炎甚至是肝癌患者的临床治疗效果,更好的服务人类健康事业。

肝炎、肝移植乃至肝癌等肝脏疾病开辟一个新的方向,为治疗性药物的研发提供新的思路。

参考文献

- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216
- Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21: 903-914
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-562
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hokenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2: 301-306
- Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vivo*. *J Exp Med* 2003; 198: 249-258
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
- Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196: 255-260
- Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004; 114: 1398-1403
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3: 135-142
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-323
- Lepault F, Gagnerault MC. Characterization of peripheral regulatory CD4⁺ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2000; 164: 240-247
- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68-73
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20-21
- Vigouroux S, Yvon E, Biagi E, Brenner MK. Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 2004; 104: 26-33
- Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10398-10403
- Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 2006; 108: 426-431
- Eksteen B, Miles A, Curbishley SM, Tselepis C, Grant AJ, Walker LS, Adams DH. Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. *J Immunol* 2006; 177: 593-603
- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353-360
- Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005; 6: 327-330
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352
- Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 2006; 118: 1-9
- Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW. Induction of cytokine production in naive CD4⁺ T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1999; 116: 1428-1440
- Nouri-Aria KT, Hegarty JE, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Effect of corticosteroids on suppressor-cell activity in "autoimmune" and viral chronic active hepatitis. *N Engl J Med* 1982; 307: 1301-1304
- Recher M, Lang KS. Innate (over)immunity and adaptive autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 305: 89-104
- Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 31-37
- Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, Bogdanos DP, Heneghan M, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; 25: 63-71
- Tapirdamaz O, Pravica V, Metselaar HJ, Hansen B, Moons L, van Meurs JB, Hutchinson IV, Shaw J, Agarwal K, Adams DH, Day CP, Kwekkeboom J. Polymorphisms in the T cell regulatory gene cytotoxic T lymphocyte antigen 4 influence the rate of acute rejection after liver transplantation. *Gut* 2006; 55: 863-868

- 31 Yoshizawa A, Ito A, Li Y, Koshiba T, Sakaguchi S, Wood KJ, Tanaka K. The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 37-39
- 32 Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kusters JG, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 277-284
- 33 Jiang X, Morita M, Sugioka A, Harada M, Kojo S, Wakao H, Watarai H, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino K. The importance of CD25+ CD4+ regulatory T cells in mouse hepatic allograft tolerance. *Liver Transpl* 2006; 12: 1112-1118
- 34 Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ. Decrease of CD4+CD25+ T cells in peripheral blood after liver transplantation: association with immunosuppression. *Transplant Proc* 2005; 37: 1194-1196
- 35 Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiriglio S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-1953
- 36 Adeegbe D, Bayer AL, Levy RB, Malek TR. Cutting edge: allogeneic CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol* 2006; 176: 7149-7153
- 37 Roh S, Kim K. Overcoming tolerance in hepatitis B virus transgenic mice: a possible involvement of regulatory T cells. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 453-460
- 38 Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M, Moriyasu F, Kakimi K. Depletion of CD25+CD4+T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8+ T cell response primed by DNA immunization. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3772-3777
- 39 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-3328
- 40 Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-747
- 41 Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, Rocchi G, Bergamini A. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 188-196
- 42 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1062-1071
- 43 Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsacker F, Thimme R. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress *in vitro* proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860-7867
- 44 Tajimi M, Ugajin T, Ota M, Hiroishi K, Nakamura I, Imawari M. Immune responses of liver-infiltrating lymphocytes and peripheral blood mononuclear cells to hepatitis C virus core and NS3 antigens. *Hepatol Res* 2006
- 45 Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, Klatzmann D. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; 103: 3428-3430
- 46 Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells. *Immunology* 2002; 107: 5-9
- 47 Ormandy LA, Hilleman T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2457-2464
- 48 Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41: 722-730
- 49 Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, Sato Y, Abo T, Horwitz DA, Aoyagi Y. Increase of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 254-262
- 50 Dranoff G. The therapeutic implications of intratumoral regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8226-8229
- 51 Wang RF. Regulatory T cells and toll-like receptors in cancer therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 4987-4990

■同行评价

本文内容新颖, 问题阐述清楚, 语句通畅, 具有可读性。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

肿瘤中胰岛素样生长因子 II 基因印记及其丢失的机制

樊红, 徐卫芳

■背景资料

基因组印记(genomic imprinting)是指控制某一表型的一对等位基因由于亲源的不同而呈差异性表达,即机体仅转录来自亲本一方的等位基因而与自身性别无关。所谓印记丢失(loss of imprinting, LOI)是指被印记的无活性的等位基因被重新激活。胰岛素样生长因子 II 基因(insulin-like growth factor 2, IGF2)是父源表达的印记基因,编码一个强有力的有丝分裂原,促使细胞增殖,其表达量增加可促使细胞恶性转化与增殖,参与肿瘤的发生、发展。维持IGF2正常印记及丢失的分子机制尚未明确,但近年差异性甲基化区域(differentially methylated region, DMR)在印记调节中的作用备受关注。

樊红, 徐卫芳, 东南大学“发育与疾病相关基因”教育部重点实验室, 东南大学医学院遗传与发育生物学系 江苏省南京市 210009

江苏省自然科学基金, No. BK2002054

国家自然科学基金, No. 30470950

通讯作者: 樊红, 210009, 江苏省南京市丁家桥87号, 东南大学“发育与疾病相关基因”教育部重点实验室, 东南大学医学院遗传与发育生物学系。fanhong66@yahoo.com.cn

电话: 025-83272314 传真: 025-83272340

收稿日期: 2006-06-22 接受日期: 2006-07-10

摘要

基因组印记(genomic imprinting)是目前肿瘤医学领域研究的新热点,印记基因胰岛素样生长因子 II 基因(insulin-like growth factor 2, IGF2)与肿瘤相关性的研究也逐渐显现其参与肿瘤的发生、发展过程。IGF2是最早发现的印记基因之一,对个体的生长发育起着重要的作用。近年发现大多数恶性肿瘤中都存在该基因的印记丢失所致的IGF2高表达现象,且IGF2印记丢失可以作为大肠癌等肿瘤发生危险性的分子标记,但肿瘤中IGF2印记形成和丢失的机制尚不清楚,本文将从等位基因差异性甲基化区域(differentially methylated region, DMR)甲基化状态、绝缘蛋白CTCF (CCCTC-binding factor)结合能力及BORIS (brother of the regulator of imprinted sites)共同参与印记形成几个方面,阐述肿瘤中IGF2印记形成及其印记丢失的可能机制。

关键词: 印记基因; DMR; LOI; CTCF

樊红, 徐卫芳. 肿瘤中胰岛素样生长因子 II 基因印记及其丢失的机制. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2324-2328
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2324.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子 II 基因(insulin-like growth factor 2, IGF2)和H19是最早发现的内源性印记基因之一,二者紧密连锁于11p15.5,且共用位于H19下游的增强子。IGF2是重要的促胚胎生长因子,可通过自分泌或旁分泌的方式作用于细胞表面的IGF II 受体,调节胚胎及滋养叶的生长发育,其母源等位基因印记而其父源等位基因表达。H19无蛋白质产物,但其转录的RNA

可以调节IGF2的印记和表达,其父源等位基因印记而母源等位基因表达。Ping *et al*^[1]发现IGF2基因印记丢失(loss of imprinting, LOI)是BWS (beckwith-wiedemann syndrome)疾病肿瘤高发风险的重要原因,另外在肝癌^[2]、肺癌^[3]、胃癌^[4]、肠癌^[5-6]、卵巢癌^[7]、肉瘤^[8]等多种成人多发的肿瘤中也都发现了IGF2表达量异常增加及其LOI的现象,提示IGF2的表达异常是肿瘤发生的相关因素。但肿瘤中IGF2印记形成和丢失的机制尚不清楚,本文将从等位基因差异性甲基化区域(differentially methylated region, DMR)甲基化状态、绝缘蛋白CTCF (CCCTC-binding factor)结合能力及BORIS (brother of the regulator of imprinted sites)共同参与印记形成几个方面,阐述肿瘤中IGF2印记形成及其印记丢失的可能机制。

1 IGF2/H19 DMR与IGF2印记形成

尽管维持机体IGF2正常印记及印记丢失的分子机制尚未完全明确,但近年研究发现,IGF2/H19 DMR,即印记控制区(imprinting control region, ICR)在其中起重要作用。参与IGF2印记状态的DMR有多个,包括H19上游DMR (H19 DMR)和IGF2 DMR。鼠的H19 DMR区域有4个锌指蛋白CTCF (CCCTC-binding factor)结合位点^[9],而人类H19 DMR含有7个CTCF结合位点,其中只有第6个结合位点在父母源等位基因上甲基化状态不同^[10],这一区域的甲基化状态改变与IGF2/H19印记状态密切相关。根据Bell *et al*^[9]的增强子及CTCF绝缘子模型,H19 DMR在甲基化和未甲基化状态时依其结合蛋白情况不同对等位基因表达进行调控,体细胞中母源等位基因因此DMR区呈未甲基化状态,结合CTCF蛋白作为绝缘子,阻止IGF2启动子与H19下游增强子结合导致IGF2不表达;而父源等位基因上H19 DMR呈高甲基化状态,不能结合CTCF蛋白形成绝缘子,下游增强子作用于IGF2启动子,此时IGF2表达。

Nakagawa *et al*^[11]发现大肠癌中IGF2 LOI伴有H19 DMR的双等位基因甲基化,这一结果符

合上述绝缘子模型. 父母源等位基因H19 DMR上都发生甲基化, CTCF无法结合发挥绝缘作用, H19下游增强子作用于两个同源等位基因上的IGF2启动子而使IGF2双等位基因表达. Cui *et al*^[12]在Wilms肿瘤中也发现同样的甲基化改变; Ulaner *et al*^[13]在骨肉瘤研究中发现, IGF2和H19 LOI伴随CTCF结合位点的互为相反的甲基化改变, 亚硫酸盐测序表明, IGF2 LOI时CTCF结合位点是双等位基因甲基化, H19 LOI时CTCF结合位点是双等位基因去甲基化, Cui *et al*^[14]同样在大肠癌中检测到IGF2 LOI伴有H19 DMR的双等位基因低甲基化, 这与Nakagawa的结果是相反的. Takai *et al*^[10]在6例膀胱肿瘤中发现有2例肿瘤发生IGF2 LOI, 伴有H19 DMR低甲基化. Ishizaki *et al*^[15]指出IGF2 LOI与H19 DMR区异常甲基化无关, IGF2 LOI而H19 DMR甲基化状态正常, 除此之外依照IGF2/H19染色质绝缘模型, IGF2 LOI除存在H19 DMR的双等位基因甲基化以外, 还应伴有H19的双等位基因失去表达^[16-17]. Ulaner *et al*^[13]在绝缘子模型基础上提出一个设想, 在H19 DMR CTCF结合位点, 甲基化模式的变化可能是不同的. 如果甲基化的丢失或获得是不完全的, 这可能导致有缺陷的CTCF绝缘功能, 这可解释为同一亲源等位基因上IGF2和H19皆表达, 故IGF2 LOI可与H19单表达共存(反之亦然); 若甲基化丢失与获得是完全的, 则一个双表达伴有另一个沉默^[17], 以此说法同样可以解释IGF2和H19同时发生LOI^[18], 若母源染色体上CTCF结合位点是高甲基化的, 父源染色体上是低甲基化的, 当这种克隆在肿瘤细胞群体中占有一定比例, 则可见到IGF2和H19同时LOI.

研究表明, 鼠IGF2基因内有3个DMR^[15], DMR0和DMR1位于IGF2编码区上游, DMR2位于基因内部, DMR0在失活的母源染色体上是甲基化的^[19], 而DMR1和DMR2在有活性的父源染色体上是甲基化的. IGF2 DMR1缺失或DMR0, DMR1同时缺失^[20-21], 不论发生在父源染色体还是母源染色体上都导致IGF2和H19两个基因同时LOI, 实验结果表明, 有抑制因子与母源未甲基化的等位基因结合而沉默母源IGF2表达. Cui *et al*^[14]认为, 鼠DMR0相当于人类IGF2外显子2-3区域的DMR, 母源上是甲基化的. Ulaner *et al*^[13]对骨肉瘤的研究结果却显示出这一区域的甲基化模式与IGF2印记无关. 因此可以推断IGF2 DMR与其LOI的关系不是稳定不变的, 可能与肿瘤来源有关.

另外母源H19基因缺失导致母源IGF2 DMR0去甲基化^[20]和父源IGF2 DMR1, DMR2去甲基化^[22], H19 DMR的缺失导致IGF2 DMR的不同水平的甲基化变化^[23]. H19 DMR完全缺失, 能够保护体细胞中母源IGF2基因避免发生甲基化, 而对卵细胞中甲基化情况无影响. 说明H19 DMR和IGF2的DMR有某种功能上的联系, IGF2/H19区域的印记是由H19 DMR和IGF2中的DMR区的相互作用来维持.

2 CTCF在IGF2印记中的作用

真核生物的核染色质由活性区域和非活性区域组成, 这些区域中基因的表达被调控元件所调节: 如增强子、启动子等是在一定距离内有效激活基因所需的, 而沉默子则在阻碍基因转录时起作用. 细胞中的相邻基因常与功能上相拮抗的元件之间存在相互作用, 例如增强子与沉默子, 尽管这些元件相距很近, 但他们并不影响附近基因的表达. 绝缘子或分隔元件是这样一些DNA序列, 其能够作为中立的隔离工具, 使DNA序列避免受到邻近序列活性状态的影响, 并把基因组分隔成互相独立的功能域, 主要功能是防止远处的增强子作用于某一位点, 并阻止失活染色质蔓延. H19 DMR即是其中一种绝缘子, 已知有数个CTCF结合位点, H19 DMR在未甲基化时能够结合CTCF, 共同发挥绝缘功能. 位于在内源性H19 DMR的核苷酸序列突变^[24], 可导致CTCF不能与其结合, 而发生IGF2印记丢失. 说明CTCF-H19 DMR复合体在形成和保持配子印记中是关键的.

CTCF是高度保守的多功能的、多价的核因子^[25], 具有肿瘤抑制属性, 在几乎所有体细胞中表达, 功能涉及基因启动子激活与抑制, 激素诱导基因沉默, 甲基化敏感的染色质绝缘以及‘阅读’印记区域等, 与甲基化依赖的X染色体随机失活亦密切相关. 从果蝇到哺乳动物包括人有90%同源性, 在鼠和人中的实验证实唯一不表达CTCF的细胞是睾丸中的某些生殖细胞, 到目前为止确定的所有脊椎动物染色质沉默子或边界元件都能与CTCF结合. CTCF蛋白含有11个锌指结构, 不同的锌指形成不同的组合可与序列截然不同的DNA结合, 但发挥类似相近的调节功能. 在正常培养细胞中抑制CTCF表达可导致急速的不可逆的细胞死亡, 而在肿瘤细胞中则发现有CTCF表达的下调. 除表达下调外CTCF与靶位点结合改变也常见于肿瘤中, 利用

■研发前沿

IGF2 LOI为肿瘤的表观遗传学改变之一, 探讨IGF2印记及其丢失的机制, 将更好的理解个体发育及肿瘤形成的机制, 从而指导肿瘤的诊断和治疗. 但IGF2印记的机制是一个复杂的调控系统, 除了与DMR甲基化和CTCF等蛋白关系密切外, 不可忽视的是, 他还与染色质重塑、组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化、DNA甲基转移酶表达等有关.

■创新盘点

肿瘤中IGF2印记形成和丢失的机制尚不清楚, 本文DMR甲基化状态、绝缘蛋白CTCF (CCCTC-binding factor)结合能力及BORIS共同参与印记形成几个方面阐述肿瘤中IGF2印记形成及其印记丢失的可能机制.

■应用要点

在多种肿瘤中都发现有IGF2 LOI, 使得无活性的IGF2等位基因被重新激活, 造成IGF2等位基因的双表达, 促使了细胞恶性转化与增殖, 从而促进了肿瘤的发生和发展. 探讨IGF2印记及其丢失的机制, 将更好的理解个体发育及肿瘤形成, 从而指导肿瘤的诊治和治疗.

EMSA可检测到CTCF基因肿瘤特异性的突变使其蛋白失去了与IGF2-H19 DMR结合的能力, 失去或减弱了与生长调节基因P19/ARF和MYC启动子结合的能力. 但对于在细胞增殖中属于中性基因的 β -球蛋白绝缘子或溶菌酶基因沉默子, 其与CTCF的结合能力没有改变, 可能与这些位点结合的锌指没有发生突变, 说明CTCF基因肿瘤特异性的突变是与促进肿瘤生长的基因密切相关的.

Fedoriw *et al*^[26]在转基因鼠中应用有效的RNAi技术, 选择性地使卵细胞中沉默CTCF表达, 发现卵子H19 DMR甲基化水平增加. 从而阐明卵细胞中H19 DMR的甲基化免除直接依赖于CTCF蛋白, 同时发现, CTCF缺如的卵细胞受精后产生的后代发育障碍, 表明CTCF对于正常的植入前发育是重要的. 故是否可这样认为, 卵子中H19 DMR的未甲基化状态作为缺如状态而存在, 在卵细胞发生过程中与CTCF结合, 后者可能具有驱逐DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用而在使母源H19 DMR避免植入时全基因组的普遍甲基化, 并在受精卵发育及其后的生命过程保持这一缺如状态, 同时维持正常印记.

Schoenherr *et al*^[23]发现母源传递的H19 DMR CTCF结合位点突变, 与CTCF的结合丢失, 在新生鼠中H19 DMR获得程度不同的甲基化, 卵母细胞和早期囊胚中H19 DMR却是未甲基化状态, 表明CTCF的结合在卵子发生过程中对于建立未甲基化DMR不是必须的. 提示CTCF调节H19 DMR区甲基化在配子发生过程中和受精卵发育及正常体细胞中机制可能并非如想象那么简单, 但可以肯定的是CTCF在其中扮演了一个非常重要的角色.

3 BORIS参与印记形成与维持

Loukinov *et al*^[25]利用在脊椎动物中保守的一段CTCF基因序列作为探针, 再辅以5'RACE (rapid amplification of cDNA ends)和3'RACE, 从人类睾丸cDNA文库中筛查出一个与CTCF同源性很高的基因, 得到他的核酸序列和氨基酸序列, 将他命名为BORIS. 其蛋白含有与CTCF相同的11个锌指结构域, 此结构域可与CTCF相似的靶DNA序列结合, 而锌指两侧的氨基酸序列同源性不高, 表明行使的功能与CTCF不同. 利用Northern blot, Western blot和RT-PCR分析以及组织染色鉴定BORIS在鼠、人、人各种肿瘤细胞中的表

达谱, 结果发现BORIS正常情况下只表达于个体的睾丸组织, 其他组织中没有, 而在几种肿瘤中却见表达. 对于睾丸组织做的微结构染色及甲基化分析发现, 精母细胞中BORIS表达阳性而CTCF表达阴性, 这也是唯一已知CTCF不表达的细胞类型, 而这类细胞中是没有甲基化胞嘧啶的; 在精细胞和精子中恰好与此相反, BORIS表达阴性而CTCF表达阳性, 此类细胞中胞嘧啶是发生了甲基化的. 根据这一结果作者提出一个假说, 认为BORIS在精子发生过程中参与全基因组的去甲基化过程^[27], CTCF和BORIS在精子细胞发育和体细胞正常印记产生和维持过程中相互协调, 通过精确有序的基因开关来控制. 这种平衡被打破则可能发生印记异常甚或肿瘤.

BORIS位于20q13, 这一区域在许多肿瘤中都经常观察到拷贝数增加, 这可能导致BORIS被异常激活; 在同样的肿瘤中也观察到16q22 CTCF基因位点的突变, BORIS可能作为CTCF蛋白的竞争者来破坏CTCF在细胞中的正常功能, 干扰CTCF的生长抑制功能. 另外可能通过影响CTCF在印记基因如IGF2表达中的绝缘功能而参与印记异常的发生, 如此类印记基因是与细胞增殖有关的, 则又间接地促进了肿瘤发生. 对20q13和16q22的染色体结构分析表明在哺乳动物进化到某一时间点, CTCF及其附近其他基因在内的一段区域复制并插入到20q13.2, 逐渐演化并产生了睾丸特异的启动子, 从而产生了BORIS这一与CTCF极其相似的基因^[28-29].

总之, 基因组印记不仅参与个体生长发育、性别决定等正常生命活动, 同时基因印记的异常与人类遗传病、肿瘤发生有关. 揭示IGF2基因印记调控机制, 将有助于深入了解正常发育过程与肿瘤的发生、发展. 当然, IGF2印记调控是一个复杂、多样性的系统, 可能在不同的肿瘤, 甚至同一种肿瘤的不同起源的组织中, 其印记形成与丢失的模式都有所不同, 因此研究肿瘤中印记丢失现象将依据基因组印记形成的时空特异性而考虑多元化成分的协同作用, 即除了关心DMR甲基化、CTCF蛋白及其相关蛋白外, 还不能忽视其可能与染色质结构变化、组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化、DNA甲基化转移酶表达等有关.

4 参考文献

- 1 Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP. Genetic linkage of Beckwith-

- Wiedemann syndrome to 11p15. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 720-723
- 2 Li H, Zhang N. Study on the expression and genomic imprinting status of insulin-like growth factor 2 gene in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 347-349
- 3 Kohda M, Hoshiya H, Katoh M, Tanaka I, Masuda R, Takemura T, Fujiwara M, Oshimura M. Frequent loss of imprinting of IGF2 and MEST in lung adenocarcinoma. *Mol Carcinog* 2001; 31: 184-191
- 4 Wu MS, Wang HP, Lin CC, Sheu JC, Shun CT, Lee WJ, Lin JT. Loss of imprinting and overexpression of IGF2 gene in gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett* 1997; 120: 9-14
- 5 Sasaki J, Konishi F, Kawamura YJ, Kai T, Takata O, Tsukamoto T. Clinicopathological characteristics of colorectal cancers with loss of imprinting of insulin-like growth factor 2. *Int J Cancer* 2006; 119: 80-83
- 6 Kaneda A, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* 2005; 65: 11236-11240
- 7 Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, Nichols TD, Marks JR, Berchuck A. Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 283-292
- 8 Sun Y, Gao D, Liu Y, Huang J, Lessnick S, Tanaka S. IGF2 is critical for tumorigenesis by synovial sarcoma oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene* 2006; 25: 1042-1052
- 9 Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 2000; 405: 482-485
- 10 Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, Thayer MJ, Jones PA. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2619-2626
- 11 Nakagawa H, Chadwick RB, Peltomaki P, Plass C, Nakamura Y, de La Chapelle A. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 591-596
- 12 Cui H, Niemitz EL, Ravenel JD, Onyango P, Brandenburg SA, Lobanenko VV, Feinberg AP. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms' tumor commonly involves altered methylation but not mutations of CTCF or its binding site. *Cancer Res* 2001; 61: 4947-4950
- 13 Ulaner GA, Vu TH, Li T, Hu JF, Yao XM, Yang Y, Gorlick R, Meyers P, Healey J, Ladanyi M, Hoffman AR. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 535-549
- 14 Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res* 2002; 62: 6442-6446
- 15 Ishizaki T, Yoshie M, Yaginuma Y, Tanaka T, Ogawa K. Loss of Igf2 imprinting in monoclonal mouse hepatic tumor cells is not associated with abnormal methylation patterns for the H19, Igf2, and Kv1q1 differentially methylated regions. *J Biol Chem* 2003; 278: 6222-6228
- 16 Ohlsson R, Hedborg F, Holmgren L, Walsh C, Ekstrom TJ. Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. *Development* 1994; 120: 361-368
- 17 Taniguchi T, Sullivan MJ, Ogawa O, Reeve AE. Epigenetic changes encompassing the IGF2/H19 locus associated with relaxation of IGF2 imprinting and silencing of H19 in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2159-2163
- 18 van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1070-1075
- 19 Moore T, Constancia M, Zubair M, Bailleul B, Feil R, Sasaki H, Reik W. Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse Igf2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12509-12514
- 20 Constancia M, Dean W, Lopes S, Moore T, Kelsey G, Reik W. Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19. *Nat Genet* 2000; 26: 203-206
- 21 Hu JF, Vu TH, Hoffman AR. Genomic deletion of an imprint maintenance element abolishes imprinting of both insulin-like growth factor II and H19. *J Biol Chem* 1997; 272: 20715-20720
- 22 Forne T, Oswald J, Dean W, Saam JR, Bailleul B, Dandolo L, Tilghman SM, Walter J, Reik W. Loss of the maternal H19 gene induces changes in Igf2 methylation in both cis and trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10243-10248
- 23 Schoenherr CJ, Levors JM, Tilghman SM. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet* 2003; 33: 66-69
- 24 Pant V, Mariano P, Kanduri C, Mattsson A, Lobanenko V, Heuchel R, Ohlsson R. The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes Dev* 2003; 17: 586-590
- 25 Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC 3rd, Lobanenko VV. BORIS, a novel male germline-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6806-6811
- 26 Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS. Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science* 2004; 303: 238-240
- 27 Klenova EM, Morse HC 3rd, Ohlsson R, Lobanenko VV. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 399-414
- 28 Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR, Adnani MT, Loukinov DI,

■名词解释

差异性甲基化区域(differentially methylated region, DMR): 即卵子和精子中对同一基因区域不同程度的甲基化, 此区域有时亦称为印记控制区(imprinting control region, ICR).

■同行评价

有关IGF2 LOI的研究报道,近年来明显增多,尤其在肿瘤研究领域。该论文较好的综述了IGF2在肿瘤发生、发展中印记与丢失机制的国内外研究进展,尽管有部分论述国际上尚无定论,但总体上来说,反应了国际上的最新研究进展,具有较高的学术价值。

- 29 Votolin S, Risinger JL, Custer M, Chen GA, Zhao M, Nguyen DM, Barrett JC, Lobanenko VV, Schrupp DS. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 7763-7774
- 29 Votolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT,

Custer M, Loukinov DI, Pugacheva E, Hong JA, Morse H 3rd, Schrupp DS, Risinger JL, Barrett JC, Lobanenko VV. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res* 2005; 65: 7751-7762

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 •

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

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

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

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

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

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

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

Ghrelin与胃肠运动

余跃, 王巧民

余跃, 王巧民, 安徽医科大学附属医院, 安徽省立医院
消化内科 安徽省合肥市 230001

通讯作者: 余跃, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属医院, 安徽省立医院消化内科. yuyuedm@yahoo.com.cn
电话: 0551-2283380

收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-07-19

摘要

胃肠运动障碍性疾病(功能性消化不良、肠易激综合征等)是一类临床常见病,临床上以腹胀、早饱、恶心、呕吐、腹泻、便秘等症状为主要表现,严重影响了患者的生活质量。Ghrelin为一种生长激素促分泌剂(GHSs)受体的内源性配体。目前最新的研究表明, Ghrelin除在摄食与能量代谢、心血管功能等方面具有调节作用外,还具有调控胃肠分泌、运动等功能。本文就Ghrelin对胃肠运动的调节作用作一综述。

关键词: Ghrelin; 胃肠运动

余跃, 王巧民. Ghrelin与胃肠运动. 世界华人消化杂志
2006;14(23):2329-2331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2329.asp>

0 引言

Ghrelin是1999年Kojima *et al*^[1]发现的第一个生长激素促分泌剂(GHSs)受体(growth-hormone secretagogue receptor, GHS-R)的内源性配体,是由28个氨基酸组成的小分子多肽。研究表明, Ghrelin除在摄食与能量代谢、心血管功能等方面具有调节作用外,还具有控制胃酸分泌、调节胃肠动力和胃黏膜保护作用。本文就Ghrelin对胃肠运动的调节进行综述。

1 Ghrelin及其受体

Ghrelin分布于人体多种组织器官,包括心脏、胃肠道、胰腺、肾脏、胎盘、睾丸、下丘脑和脑垂体等,其中以胃组织中含量最高,约占全身的20%左右,说明Ghrelin在胃肠功能的调节上具有重要意义^[2]。Ghrelin主要位于胃泌酸腺体的中部,在人类这些泌酸腺体以P/D1颗粒为特征,而在啮齿动物则以X/A样颗粒为特征。胃泌酸黏

膜层中, Northern blot分析显示有大量Ghrelin的mRNA,免疫细胞化学研究证明,有大量Ghrelin免疫阳性的内分泌样细胞存在^[3]。Ghrelin受体(GHS-R)不仅分布于中枢,而且在大部分外周组织都有分布。人和大鼠胃结肠组织神经元胞体和纤维、胃腺相关细胞、公认的肠内分泌细胞和/或肥大细胞中均表达GHS-R免疫反应性,平滑肌细胞和上皮细胞不表达GHS-R免疫反应性,且只有大鼠与肌肉相关神经纤维上表达GHS-R免疫反应性^[4]。原位杂交研究显示, GHS-R与NPY共存于下丘脑弓状核^[5], GHS-R mRNA存在于迷走传入神经元上^[6]。Xu *et al*^[7]还观察到GHS-R mRNA存在于肠壁和肠肌丛神经元上,且GHS-R与ChAT阳性神经元共存于豚鼠肠肌间神经丛。

GHS-R有1 α , 1 β 2种亚型。GHS的促分泌效应主要是通过1 α 型GHS-R结合而发挥的。研究表明, Ghrelin的功能性受体GHS-R1 α mRNA主要在垂体表达,在下丘脑弓状核、腹内侧核、漏斗核也有表达,而在甲状腺、胰腺、脾脏、脂肪组织及肾上腺表达水平很低,而非功能性GHS-R1 β mRNA在组织器官中广泛表达^[8]。

2 Ghrelin的作用

2.1 对胃肠平滑肌的作用 胃肠运动是由消化管壁的平滑肌有规律的收缩和舒张完成的。Dass *et al*^[4]探讨了Ghrelin对人和大鼠离体胃和结肠环行肌条电刺激(electrical field stimulation, EFS)引起的神经介导反应的影响。在大鼠胃环行肌, Ghrelin (0.1-10 μ mol/L)对平滑肌张力无影响,但呈浓度依赖性增强兴奋性神经刺激引起的肌肉收缩幅度,相似条件下, Ghrelin对大鼠远端结肠和人升结肠和乙状结肠无作用。Kitazawa *et al*^[9]也发现Ghrelin及其合成肽(growth hormone releasing peptide, GHRP-6)和非肽GHS-R拟似剂capromorelin能有效地增强EFS诱导小鼠胃底肌条的胆碱能反应。研究表明, Ghrelin具有明显促进胃动力活性。

2.2 胃排空与肠转运的作用 动物研究表明,除

■背景资料

胃肠运动障碍性疾病是一类临床常见的疾病,临床上以腹胀、早饱、恶心、呕吐、腹泻、便秘等症状为主要表现,每年耗费了国家大量的医疗资源,严重影响了患者的生活质量,但其发病机制尚未完全清楚。Ghrelin为一种新近发现的调节肽,除能调控摄食与能量代谢、心血管功能外,还对胃肠运动具有非常重要的调节作用。

■研发前沿

在功能性胃肠病研究中,其发病机制与胃肠运动障碍、内脏高敏感性、胃肠分泌异常有关。Ghrelin,一种新近发现的调节肽,在胃肠运动研究中调控作用,已成为当前研究的热点,深入系统的从细胞和分子机制来研究其对胃肠平滑肌、胃排空和肠转运、胃肠蠕动反射、消化间期的胃肠运动等方面的调节作用,具有十分重要的临床意义。

■应用要点

本文较系统的介绍了Ghrelin对胃肠平滑肌、胃排空和肠转运、消化间期的胃肠运动的调节作用及可能的调控机制,覆盖面广,为胃肠运动的临床和实验研究提供了思路。

了增加摄食外, Ghrelin能促进胃排空、刺激大鼠小肠动力^[10], 但似乎对结肠动力无影响^[4]. Masuda *et al*^[11]发现乌拉坦麻醉大鼠iv Ghrelin (0.8-20 $\mu\text{g/kg}$)呈剂量依赖性促进胃排空. Levin *et al*^[12]给大鼠灌注含⁵¹Cr的聚乙二醇4000或含⁵¹Cr的液体营养餐. 结果发现在iv Ghrelin 20 min后, Ghrelin对营养性液体的胃排空无影响, 但显著促进了非营养性液体的胃排空. 给大鼠iv Ghrelin, 胃排空和小肠对流体饮食的转运加快, 并可逆转手术后肠梗阻^[13]. Dornonville *et al*^[14]观察了Ghrelin, des-Gln14-ghrelin, des-octanoyl ghrelin, Ghrelin -18, -10, -5对小鼠胃排空影响. 结果表明, Ghrelin, des-Gln14-ghrelin剂量依赖性促进胃排空, 而des-octanoyl ghrelin无作用. C-末端剪切的Ghrelin片段也有作用, 但明显弱于Ghrelin本身. 给小鼠icv或ip Ghrelin, 胃排空速率显著增加^[5]. Ghrelin和des-Gln14-ghrelin还可促进小鼠小肠排空, 并有效缓解手术后引起的肠梗阻, 而此过程中大剂量胃动素无效. Murray *et al*^[15]观察了外源性Ghrelin对糖尿病胃轻瘫患者胃排空的影响. 在Ghrelin注入90 min时, 血浆Ghrelin水平达到峰值, 且与生长激素血浆峰值相对应. Ghrelin使10个患者中的7人胃排空增快 (30% $\pm$ 6% vs 43% $\pm$ 5%, $P<0.05$), 受损的迷走神经张力与餐后胰多肽峰值负相关, 但与胃排空率无明显关联. 因而认为Ghrelin促进DM胃轻瘫患者的胃排空, 这不依赖于迷走神经张力. 不过也有相反的研究结果, De Smet *et al*^[16]应用Ghrelin基因敲除小鼠Ghrelin (-/-)模型, 观察到Ghrelin存在对胃排空无影响, 外源性Ghrelin引起胃排空加速的铃形剂量效应曲线在Ghrelin (+/+)和Ghrelin (-/-)小鼠并无变化. 因而认为Ghrelin并不是一种必须的胃排空调节因素.

2.3 MMC的调控作用 胃肠空腹状态下并不是静止不动的, 胃肠腔内压力呈周期性变化, 称为消化间期的运动周期, 又称为消化间期移行性复合运动(interdigestive migrating motor complex, IMMC). 如同motilin一样, Ghrelin也能诱导MMC. Edholm *et al*^[10]观察到Ghrelin剂量依赖性缩短大鼠小肠MMC周期, iv Ghrelin期间, 十二指肠MMC间期从17.2 $\pm$ 2.0 min下降至9.9 $\pm$ 0.8 min, 而空肠MMC间期从17.5 $\pm$ 2.2 min下降至10 $\pm$ 0.8 min. 阿托品能阻断此效应. 提示Ghrelin通过胆碱能神经元刺激消化间期小肠动力. Tack *et al*^[17]进一步观察了Ghrelin对人MMC的影响. 在MMCIII相出现后20 min, 分别iv生理

盐水或Ghrelin 40 μg . 结果发现, 所有受试者均记录到自发出现的MMCIII相. 给予Ghrelin后胃MMCIII相明显缩短(12 $\pm$ 3 vs 95 $\pm$ 13, $P<0.001$). 注入Ghrelin能升高血浆胰多肽和Ghrelin水平, 但对motilin、生长抑素和胰高糖素水平无影响. 因而认为, Ghrelin能诱导人胃不成熟的MMCIII相, 且不是通过释放胃动素来介导的.

3 作用机制

已有文献报道Ghrelin通过迷走和非迷走神经介导机制影响胃肠动力. 在迷走传入神经元上分布有Ghrelin受体, 可能是Ghrelin信号和迷走传入神经活动相互作用的基础. icv Ghrelin可以诱导孤束核和迷走神经背核神经元的原癌基因*c-fos*表达增加, 这些核团也是中枢神经系统对胃运动调节的主要位点. iv Ghrelin可增加胃酸分泌和增强胃动力, 此效应被阿托品或双侧迷走神经切除所阻断, 但不能被组胺H₂受体拮抗剂所阻断^[11]. 离体研究也发现, 除迷走神经依赖机制外, Ghrelin作用也可由ENS所介导. Ghrelin能增加大鼠胃肌条电刺激所引起的胆碱能神经效应^[4,9-10]. 形态学也证实豚鼠回肠肠神经元上存在Ghrelin及其受体^[7]. 还有研究表明, Ghrelin通过GHS-R1 α 受体活化肠肌从神经元. 除了作用于迷走神经和肠神经元外, Ghrelin也影响了参与调节消化间期胃肠动力的血浆胃肠激素水平^[18]. Chen *et al*^[19]认为, 外周des-acyl Ghrelin(减慢胃排空)可透过血脑屏障直接激活脑受体, 而没有激活迷走传入途径. 大脑中的CRF₂而非CRF₁受体参与了此效应. 可见, Ghrelin及其拟似剂有可能成为治疗胃肠动力低下疾病的有效治疗手段.

4 参考文献

- 1 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 2 Locatelli V, Bresciani E, Bulgarelli I, Rapetti D, Torsello A, Rindi G, Sibilio V, Netti C. Ghrelin in gastroenteric pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 843-848
- 3 Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; 99: 141-150
- 4 Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 2003; 120: 443-453

- 5 Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337-345
- 6 Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-1128
- 7 Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, Zandecki M, Tang M, Timmermans JP, Peeters TL. Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. *Regul Pept* 2005; 124: 119-125
- 8 Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3803-3807
- 9 Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice *in vivo* and *in vitro*. *Gut* 2005; 54: 1078-1084
- 10 Edholm T, Levin F, Hellstrom PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept* 2004; 121: 25-30
- 11 Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908
- 12 Levin F, Edholm T, Ehrstrom M, Wallin B, Schmidt PT, Kirchgessner AM, Hilsted LM, Hellstrom PM, Naslund E. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept* 2005; 131: 59-65
- 13 Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G948-952
- 14 Dornonville de la Cour C, Lindstrom E, Norlen P, Hakanson R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004; 120: 23-32
- 15 Murray CD, Martin NM, Patterson M, Taylor SA, Ghatei MA, Kamm MA, Johnston C, Bloom SR, Emmanuel AV. Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut* 2005; 54: 1693-1698
- 16 De Smet B, Depoortere I, Moechars D, Swennen Q, Moreaux B, Cryns K, Tack J, Buyse J, Coulie B, Peeters TL. Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 431-439
- 17 Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delparte C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 2006; 55: 327-333
- 18 Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, Peracchi M. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 701-704
- 19 Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* 2005; 129: 8-25

■名词解释

1 MMC: 胃肠空腹状态下并不是静止不动的, 胃肠腔内压力呈周期性变化, 称为消化间期的运动周期, 又称为消化间期移行性复合运动(interdigestive migrating motor complex, IMMC), 在健康人这种MMC运动一直存在。

2 胃肠运动: 是消化生理功能的重要组成部分。整个过程是由消化道管壁的纵行肌和环行肌有规律的收缩和舒张以及括约肌的协调性开闭完成的。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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.

www.wjgnet.com

多层螺旋CT成像技术在急腹症中的应用

宋富珍, 程英升

■背景资料

MDCT不但克服了普通CT扫描时肠蠕动和呼吸运动的影响,而且可以以病变为中心进行任意间隔重建,明显提高急腹症病变诊断准确率,为进一步紧急处理提供客观的影像依据。

宋富珍, 程英升, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海交通大学影像医学研究所 上海市 200233

通讯作者: 程英升, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科, 上海交通大学影像医学研究所.

cjr.chengysh@vip.163.com

电话: 021-64823392 传真: 021-64368920

收稿日期: 2006-03-02 接受日期: 2006-03-20

摘要

影像学检查是诊断急腹症的重要手段. 电子计算机断层(computed tomography, CT)对腹部解剖和病变的准确显示, 越来越体现出其优越性, 而多层螺旋CT具有快速螺旋扫描和三维后处理能力, 显著提高了图象质量和显示细微结构的能力, 尤其是其新的成像技术: 多平面重建、最大密度投影、曲面重组法等的应用, 在急腹症的诊断上体现了巨大的优势。

关键词: 急腹症; 螺旋CT; 成像技术

宋富珍, 程英升. 多层螺旋CT成像技术在急腹症中的应用. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2332-2336

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2332.asp>

0 引言

急腹症是以急性发作的剧烈腹痛为特征的一组临床综合症, 常需急诊内科或外科处理. 其病因复杂, 临床表现多样, 有些患者在很短时间内, 病情可能发生很大的变化, 造成严重后果, 甚至危及患者生命. 因此, 能否及时准确地诊断对患者预后乃至生命有重大影响^[1]. 有文献分析了10 000多个急性腹痛的患者, 其中急性阑尾炎约占28%, 急性胆囊炎约占9.7%, 肠梗阻约占4.1%, 4%为急性妇科疾病, 2.9%为急性胰腺炎, 2.5%为溃疡穿孔, 1.5%为憩室炎, 还有1/3的患者病因不明. 由于临床表现、体格检查和实验室检查不具特异性, 急腹症的临床诊断仍是一个难点^[2-3]. 而CT是有效的、准确的影像检查技术, 尤其是多层螺旋CT(multi-detector computed tomography, MDCT)有更多的优势. 当前MDCT发展的总趋势是向探测器多层、多排发展, 这种CT的优越性已得到一致的公认^[4].

1 急腹症CT诊断现状

在过去的20 a, 对于有急性剧烈腹部疼痛的患者, CT是评估其病情的主要影像技术. 研究表明, CT对包括胰腺炎、阑尾炎、肠梗阻及实质脏器破裂等多种原因所致的急腹症诊断是一种敏感、准确的手段^[3-5]. 随着科学技术的日新月异的发展, 尽管CT的应用已经明显提高了临床诊断能力, 但其扫描速度仍然无法满足临床检查的需要, 特别是难以解决运动脏器的扫描问题. MDCT的出现, 解决了这一难题. MDCT由于是容积扫描, 没有跳层现象和数据遗漏, 扫描速度快, 克服了普通CT肠蠕动和呼吸运动的影响, 图象可以任意间隔重建, 可保证以病变中心重建, 对病变特征显示率高, 同时可以提供大量信息了解病变及腹腔周围情况^[6]. 对急腹症患者不采用任何对比剂的常规平扫的方法, 虽然快捷, 无风险, 也不会给患者带来任何不适, 但给影像分析带来一定困难^[2]. 而MDCT的应用口服或静脉注入对比剂的动态增强技术, 可以提高诊断的准确性, 增加诊断医生的信心^[7].

2 MDCT成像技术

2.1 MDCT的优势 1998年MDCT的开发成功, 标志着CT历史上的又一次重大革新. MDCT采用多排探测器技术, 既有横向排列, 又有纵向排列的探测器阵列, 具有快速螺旋扫描和三维后处理能力, 显著提高了图象质量和显示细微结构的能力, 尤其是其新的成像技术的应用, 在急腹症的诊断上体现了巨大的优势. MDCT与常规CT相比, 具有扫描速度快、照射量较低、X线管损耗小、空间分辨率高、采集信息量大等优点. 其优势为: (1)通过患者的一次屏气而完成整个扫描过程, 缩短了检查时间, 增加了信息量, 减少了运动伪影, 这对于病情紧急的患者来说是非常重要的^[8]; (2)利用薄层原始扫描的数据采集, 进行任意方位和各种间隔的高质量影像重建和三维成像; (3)利用注入对比剂的方法实现一些脏器的多时相动态增强检查, 尤其对于血管疾病的评价很有意义^[9]. 另外, MDCT扫描技术不仅突破

了常规CT的技术限制, 而且还具有能直接进行血管造影, 进行三维重建, 减少患者的X线辐射, 降低对比剂用量等诸多优点。

2.2 MDCT成像技术 随着MDCT技术的不断发展, 快速的断层扫描, 较宽的纵向轴向覆盖长度和极薄层厚的数据采集方式, 使图象的纵向分辨率越来越高. MDCT时间分辨率提高, 兴趣区强化程度更高, Z轴分辨率提高, 重组影像基本达到各向同性. MDCT具有强大的图象后处理功能, 其新的成像技术主要有: 多平面重建(multi-planar reconstruction, MPR)、曲面重组法(curved planar reformation, CPR)、最大密度投影(maximum intensity projection, MIP)、表面覆盖法(shaded surface display, SSD)、容积积分技术(volume rendered technique, VRT)、CT仿真内窥镜(computed tomography virtual endoscopy, CTVE)、CT结肠造影(computed tomography colonoscopy, CTC)、CT血管造影(computed tomography angiography, CTA)等. MDCT后处理技术及三维重建能从不同的角度和方位直观、立体地显示病变及与周围毗邻的关系, 在急腹症的病因诊断上体现了巨大的优势^[10-11]。

3 MDCT成像技术在急腹症中的应用研究

3.1 急性阑尾炎 急性阑尾炎是最常见的需急诊手术的急腹症, 虽然依据临床表现可以先作出诊断, 但是如果其症状不典型或与其他疾病的表现相似, 就难以作出正确判断. 而MDCT的应用可以使诊断错误率减少到5%以下, 从而减少了不必要的辅助检查和外科手术, 同时在需要的情况下, 也能进行及时有效的手术^[12]. 急性阑尾炎的最常见和最可靠的MDCT征象为阑尾区域的炎症或蜂窝织炎, 有时可直接显示阑尾壁增厚. 增强扫描可见增厚的肠壁强化, 以及充满液体的扩张的管状结构. MDCT亦能准确反映出阑尾炎炎症程度及范围^[13]. Weltman *et al*^[14]在同一组患者中比较两种检查方法, 指出对急性阑尾炎的诊断价值, 后者的敏感度、准确度和正常阑尾显示率均高于前者. MDCT的多平面成像技术更利于观察阑尾并确定是否为急性阑尾炎^[15], 冠状面重建对观察异位阑尾尤为有利^[9]. 近年来, Huwart *et al*^[16]提出正常阑尾的新的MDCT诊断标准: 阑尾的直径多在5 mm至11 mm之间, 而且70%其直径大于6 mm. 尽管MDCT有其优越性, 但仍有18%的正常阑尾难以明确诊断^[17]。

3.2 急性胰腺炎 急性胰腺炎是常见的急腹症

之一, 临床多表现为不同程度的剧烈腹痛、恶心、呕吐、黄疸及体温升高等. CT薄层扫描可直接显示胰腺形态、大小及实质密度的改变, 并可发现胰周水肿及急性胰腺炎向腹膜后间隙扩展的情况^[13]. MDCT扫描速度快, 明显缩短了扫描时间, 一次屏气可获得整个胰腺薄层扫描, 避免了呼吸运动伪影和胃肠道气体的影响, 而且有利于判断胰周血管受累情况, 是判断急性胰腺炎及其并发症的十分有价值的工具, 尤其对坏死型和出血型胰腺炎的诊断有重要价值. 自1980年代以来, 动态增强CT已成为确定胰腺坏死和胰周炎性改变的基本方法^[18]. 动态增强CT是快速向血管内注入造影剂后, 对检查层面进行一系列短时间连续扫描, 测定兴趣区CT值变化, 绘出时间密度曲线, 观察其生理、病理变化, 协助确定病变的性质. 近年来, 随着MDCT扫描技术的飞速发展和图象质量的提高, 腹部快速多期动态增强扫描得以广泛的临床应用^[18]. 当胰腺有坏死时, MDCT能清楚显示胰腺内的低密度坏死区, 增强扫描显示更准确, 腹部动态MDCT增强扫描时, 胰腺微循环被破坏的组织不强化而呈低密度. 当胰腺坏死超过30%时, MDCT诊断准确率高于90%. 目前多数学者认为, 腹部增强MDCT扫描是非侵入性诊断胰腺坏死的金标准^[19]. 由于MDCT快速的数据采集时间, 可以清楚分辨出血管增强期^[20]. 增强扫描对坏死区的大小、形态和范围的显示是其他诊断方法无可比拟的, 而且MDCT薄层准直扫描能够显示脾静脉和门静脉的假性动脉瘤和血栓等并发症^[9]. 曲面重组技术对于整个扭曲胰腺的显示, 胰胆管和胰周血管的追踪, 突显周围解剖结构及其损害的关系有很高的价值^[21]。

3.3 憩室炎 憩室炎的CT表现包括憩室的显示、憩室壁的增厚及肠壁周围炎症, 肠腔外的气体、瘘管和脓肿, 肠系膜门静脉的血栓性静脉炎在CT上也能明确显示^[3]. 虽然临床对急性憩室炎的诊断一般都很准确, 但CT在确认诊断、显示瘘管和脓肿等并发症方面有着十分重要的作用^[22]. Werner *et al*^[23]指出CT是描述憩室壁穿孔、腹腔内穿孔、瘘管和肠梗阻等并发症的主要影像技术. MDCT对憩室炎诊断的敏感性、特异度都很高^[23]. Kircher *et al*^[22]指出其准确度、敏感性、特异度大于95%. Leschka *et al*^[9]提出冠状面重建更利于正常和非正常肠壁的鉴别. 另外还可以在CT引导下对较复杂的憩室疾病进行介入治疗, 而且对大多数患者来说也能安全成功的

■研究前沿

MDCT MPR是最有价值的后处理技术, 应作为肠梗阻首选的应用技术。

■应用要点

急腹症进行MDCT检查时尽可能使用新技术增加诊断信息或给予增强CT扫描便于鉴别诊断。

进行结肠周围和盆部脓肿的引流手术^[24]。

3.4 肠梗阻 肠梗阻也是常见的急腹症之一。小肠梗阻最常见的病因是手术后的黏连、Crohn's病和肿瘤^[25]。对于儿童来说,肠套叠是另一个相对常见的病因,而相对成年人却是非常少见的^[26]。大肠梗阻常见的3个主要病因是肿瘤、憩室炎以及肠扭转^[27]。以往诊断肠梗阻主要依据临床表现、病史和平片表现^[9]。虽然目前在国内平片检查仍被大多数医院作为首选影像诊断方法,但其空间分辨率和密度分辨率较差,对于判断是否存在梗阻的正确率只有46%-80%。而CT检查可同时显示肠腔内、外和肠壁的情况,特别是MDCT的应用更有利于对梗阻病因的判断。MDCT能直接显示梗阻部位肠管的形态、肠壁的增厚、积气积液的肠袢、肠系膜及肠系膜血管的改变、肠管周围及腹腔间隙是否出现积液等情况^[28]。MDCT诊断肠梗阻有较高的准确率,但是根据疾病的病程和病变的严重程度而不同^[3]。多数情况下肠梗阻患者肠道的积液、积气是良好的对比剂,因此MDCT检查时并不需要口服造影剂,而增强扫描对肠管的缺血程度、范围及血运情况的评价十分重要。MDCT可以直接显示梗阻近段肠管、移行段肠管以及梗阻远侧不扩张的肠管。小肠内径 ≥ 25 mm是诊断肠梗阻小肠扩张的可靠征象^[29]。对于急性肠梗阻,刘文瑾 *et al*^[30-31]指出,临床疑似肠梗阻患者应首选CT检查,MDCT薄层扫描和强大的后处理技术结合横断面图像在诊断肠梗阻中发挥着越来越重要的作用;MDCT薄层扫描MPR技术对明确梗阻点、梗阻原因和范围有很大的帮助,提高了诊断准确率;并且直观地显示了病变的空间形态与周围组织的毗邻关系,有利于临床医师及时把握病情,制订出有效的治疗方案,而MDCT MPR是最有价值的后处理技术,应作为肠梗阻首选的应用技术。马万辉 *et al*^[6]提出MDCT检查可提高成人肠套叠诊断水平,对尽早明确诊断,选择治疗方案和手术方式有重要意义。

3.5 急性肠缺血 CT检查是诊断急性肠缺血可靠而且比较方便的方法。MDCT中CTA技术还可将腹腔动脉和静脉显示为与介入法血管造影所见极为近似的冠状面或矢状面图像。与诊断肠缺血的传统方法-介入性血管造影的“标准”方法比较,由于CT检查无创伤性、方法简便和医师无须在射线作插入导管等操作,已逐渐有代

替前者的趋向,目前已成为诊断本病首选的、主要的检查方法。应用MDCT检查不仅使许多以前被误诊或漏诊的多数急性肠缺血患者能够得到及时正确的诊断,还使多数患者得到极为宝贵的及时手术治疗的机会,大幅度地降低了本病的死亡率。急性肠缺血的CT表现有时很明显,有时仅有微小的改变,需要仔细观察,加以辨识。应注意观察以下表现:肠壁有否增厚,肠腔有否扩张,肠壁有无增强,肠壁的增强为均一性或杂异性,肠壁呈低衰减或高衰减,有无系膜的条束状影(stranding)、血管淤血、腹水,有无肠气囊肿(pneumatosis)或门脉积气。在急性肠缺血时,这些表现可能发生在小肠,也可能发生在大肠;可以是弥漫性的,也可以是局限性的、节段性的、局灶性的;可以是表浅性的,也可以是穿壁性(transmural)的,这些表现多数无特异性,也可出现于许多其他肠病。所以,急性肠缺血的CT诊断必须密切结合患者的临床情况,了解肠缺血的病因、病理、疾病的严重程度、部位、范围、分布几率、有无黏膜下或肠壁内出血、有无伴发的感染、有无穿孔等。MDCT检查在急性肠系膜缺血诊断方面虽有极重要价值,但在有些情况下还是会发生漏诊、误诊。应特别注意以下几点:(1)如果结肠缺血仅为节段性的,而且仅损伤了黏膜表面,此时可仅出现反射性结肠挛缩,如无肠周围脂肪条束状影和异常衰减或增强等肠缺血的其他异常表现,可被误诊为单纯挛缩。解决的方法是结肠内灌入造影剂使之扩张,或注射解痉剂后再作扫描。肠腔扩张和痉挛消除后的肠壁增厚才是真实病变的增厚;(2)如果灌入的造影剂或气体使结肠过度扩张,致原来因缺血而增厚的结肠壁的厚度人为的变薄至3-5 mm之内,可被放射科医师认为属于正常范围而误诊;(3)诊断医师将急性肠缺血时出现的肠曲充气、充液、扩张及液平误认为是麻痹性肠梗阻或假性肠梗阻,此种情况特别在急性肠缺血无肠壁增厚表现时容易发生。一般放射科医师大都以为急性肠缺血时的肠壁应有增厚,放射医师如将有这种情况的急性肠缺血患者误诊,就将造成极为严重的后果。因为立即手术是挽救这种急性肠缺血患者的惟一手段,而麻痹性肠梗阻则一般不考虑手术探索或手术治疗。而且,在绝大多数医疗单位内,MDCT检查可能是目前对此病惟一可能应用的方法,如果MDCT诊断时未想到急性肠缺血的可能,则几乎没有

其他方法可以另行作出此病的正确诊断. 这样, 在很多情况下, MDCT检查很可能就是诊断本病惟一有决定价值的检查, 会成为肯定和排除本病的最后裁决手段^[32].

3.6 其他 CT是腹膜后出血和腹主动脉瘤破裂的首选检查方法. Zalcman *et al*^[33]认为MDCT的应用更有利于诊断和排除肠梗阻引起的肠缺血(敏感性为96%, 特异度为93%). 轴位成像和多平面显示技术能够有效地检测出肠壁和主要肠系膜血管的改变, 而VR技术通过一次扫描即可判断出从起源到远端分支的肠系膜血管的改变^[34]. MDCT对胆管结石诊断的敏感性为80%, 但诊断准确率为100%. 由于结石的不透光性, 不用增强、低剂量的MDCT技术即可快速、准确地诊断胆管、尿路结石^[35-37]. CTA是评价血管系统的一种重要技术, 他无创、价廉, 还可描述重要的非血管异常, 是常规血管造影不可比的. CT在腹部钝挫伤诊断中的应用价值已得到广泛认同, 然而其不足之处是CT平扫无法明确活动性出血, 仍需要增强CT或者血管造影进一步检查^[38]. 由于MDCT的高分辨率、高速度和广覆盖的性质, 对比增强CT在急性腹部钝挫伤中的应用越来越广泛.

4 MDCT成像技术在急腹症中的应用问题和展望

MDCT自2000年初研究成功到应用于临床, 在影像医学中的高质量成像、快速扫描、减少辐射量方面发挥了巨大作用. MDCT的应用是CT技术的一次革命性飞跃, 他扫描速度快, 大大减少了胃肠道的运动伪影和呼吸运动的干扰, 同时具有先进的后处理功能以及高质量的三维重建图像, 病变的显示更加清晰, 使急腹症的诊断技术提高到一个新的水平. 然而, MDCT技术对微小病灶的检出能力还比较缺乏, 并且对某些疾病的显示还不够精确, 如果某些疾病的诊断标准能够详细一些, 将会使急腹症的诊断更为准确、迅速和安全, 而且MDCT的应用会更加普及. MDCT有多种三维后处理技术, 如何选择合适的影像学检查方法达到准确诊断的目的, 也是临床医生所面临的挑战. 尽管MDCT诊断急腹症仍有一定的困难, 但随着科学技术的进步, 各种影像学技术的飞速发展, CT扫描速度和分辨率的不断提高以及后处理功能和三维重建, MDCT对急腹症的诊断将会不断完善, 应用会更广泛、效果更佳.

5 参考文献

- 1 Flasar MH, Goldberg E. Acute abdominal pain. *Med Clin North Am* 2006; 90: 481-503
- 2 Mindelzun RE, Jeffrey RB. Unenhanced helical CT for evaluating acute abdominal pain: a little more cost, a lot more information. *Radiology* 1997; 205: 43-45
- 3 Federle MP. CT of the acute (emergency) abdomen. *Eur Radiol* 2005; 15 Suppl 4: D100-D104
- 4 Kalender WA, Kachelriess M, Ulzheimer S. Subsecond multislice spiral CT as an alternative to electron beam computerized tomography. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 1: 50-54
- 5 Urban BA, Fishman EK. Targeted helical CT of the acute abdomen: appendicitis, diverticulitis, and small bowel obstruction. *Semin Ultrasound CT MR* 2000; 21: 20-39
- 6 马万辉, 王斌, 张毅, 刘先军, 范承林. 成人肠套叠螺旋CT检查的临床意义. *中国临床医学影像杂志* 2005; 16: 690
- 7 Jacobs JE, Birnbaum BA, Macari M, Megibow AJ, Israel G, Maki DD, Aguiar AM, Langlotz CP. Acute appendicitis: comparison of helical CT diagnosis focused technique with oral contrast material versus nonfocused technique with oral and intravenous contrast material. *Radiology* 2001; 220: 683-690
- 8 Cahir JG, Freeman AH, Courtney HM. Multislice CT of the abdomen. *Br J Radiol* 2004; 77 Spec No 1: S64-S73
- 9 Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S, Marincek B. Multi-detector computed tomography of acute abdomen. *Eur Radiol* 2005; 15: 2435-2447
- 10 Brink JA, Wang G, McFarland EG. Optimal section spacing in single-detector helical CT. *Radiology* 2000; 214: 575-578
- 11 Rydberg J, Buckwalter KA, Caldemeyer KS, Phillips MD, Conces DJ Jr, Aisen AM, Persohn SA, Kopecky KK. Multisection CT: scanning techniques and clinical applications. *Radiographics* 2000; 20: 1787-1806
- 12 Raman SS, Lu DS, Kadell BM, Vodopich DJ, Sayre J, Cryer H. Accuracy of nonfocused helical CT for the diagnosis of acute appendicitis: a 5-year review. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 1319-1325
- 13 梁碧玲, 赵继泉. 急腹症的影像学诊断现状. *中国实用外科杂志* 2003; 23: 438-439
- 14 Weltman DI, Yu J, Krumenacker J Jr, Huang S, Moh P. Diagnosis of acute appendicitis: comparison of 5- and 10-mm CT sections in the same patient. *Radiology* 2000; 216: 172-177
- 15 Paulson EK, Jaffe TA, Thomas J, Harris JP, Nelson RC. MDCT of patients with acute abdominal pain: a new perspective using coronal reformations from submillimeter isotropic voxels. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 899-906
- 16 Huwart L, El Khoury M, Lesavre A, Phan C, Rangheard AS, Bessoud B, Menu Y. Is appendicolith a reliable sign for acute appendicitis at MDCT? *J Radiol* 2006; 87: 383-387
- 17 Rhea JT, Halpern EF, Ptak T, Lawrason JN, Sacknoff R, Novelline RA. The status of appendiceal CT in an urban medical center 5 years after its introduction: experience with 753 patients. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 1802-1808
- 18 傅剑雄, 征锦, 陈明祥, 陈文新. 多期动态增强CT扫描对急性胰腺炎的诊断价值. *中国临床医学影像杂志* 2005; 16: 682-684
- 19 何乾文, 马丽, 罗来华. 急性坏死性胰腺炎及其并发症

■名词解释

MDCT: 多层螺旋CT是采用多排探测器技术, 既有横向排列, 又有纵向排列的探测器阵列, 具有快速螺旋扫描和三维后处理能力, 显著提高了图象质量和显示细微结构能力的成像技术.

■同行评价

急腹症为临床医疗工作中一项常见而且重要的内容,该文提供了较充足的有意义的科学信息,具有新颖性。

- 20 Kundra V, Silverman PM. Impact of multislice CT on imaging of acute abdominal disease. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 1083-1093
- 21 Gong JS, Xu JM. Role of curved planar reformations using multidetector spiral CT in diagnosis of pancreatic and peripancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1943-1947
- 22 Kircher MF, Rhea JT, Kihiczak D, Novelline RA. Frequency, sensitivity, and specificity of individual signs of diverticulitis on thin-section helical CT with colonic contrast material: experience with 312 cases. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 1313-1318
- 23 Werner A, Diehl SJ, Farag-Soliman M, Duber C. Multi-slice spiral CT in routine diagnosis of suspected acute left-sided colonic diverticulitis: a prospective study of 120 patients. *Eur Radiol* 2003; 13: 2596-2603
- 24 Kaiser AM, Jiang JK, Lake JP, Ault G, Artinyan A, Gonzalez-Ruiz C, Essani R, Beart RW Jr. The management of complicated diverticulitis and the role of computed tomography. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 910-917
- 25 Miller G, Boman J, Shrier I, Gordon PH. Etiology of small bowel obstruction. *Am J Surg* 2000; 180: 33-36
- 26 Byrne AT, Geoghegan T, Govender P, Lyburn ID, Colhoun E, Torreggiani WC. The imaging of intussusception. *Clin Radiol* 2005; 60: 39-46
- 27 Taourel P, Kessler N, Lesnik A, Pujol J, Morcos L, Bruel JM. Helical CT of large bowel obstruction. *Abdom Imaging* 2003; 28: 267-275
- 28 Aufort S, Charra L, Lesnik A, Bruel JM, Taourel P. Multidetector CT of bowel obstruction: value of the介入治疗. *实用放射学杂志* 2003; 19: 178-180
- 29 post-processing. *Eur Radiol* 2005; 15: 2323-2329
- 30 明兵, 李振勋, 高源统, 汪永桢, 王晓阳, 蒲青凡, 余瑞立. CT在机械性肠梗阻诊断中的作用. *中华放射学杂志* 2002; 36: 896-900
- 31 刘文瑾, 赵泽华. 多层螺旋CT在肠梗阻诊断中的应用. *中国临床医学影像杂志* 2005; 16: 433-435
- 32 刘文瑾, 张云, 刘锦萍, 季冬, 王康, 赵海庆, 张润, 朱荆皓. 多层螺旋CT多平面重建诊断急性肠梗阻病因的价值. *临床放射学杂志* 2006; 25: 439-442
- 33 尚克中, 程英升. 肠缺血临床与影像学进展. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1405-1412
- 34 Zalcman M, Sy M, Donckier V, Closset J, Gansbeke DV. Helical CT signs in the diagnosis of intestinal ischemia in small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175: 1601-1607
- 35 Wildermuth S, Leschka S, Alkadhi H, Marincek B. Multislice CT in the pre- and postinterventional evaluation of mesenteric perfusion. *Eur Radiol* 2005; 15: 1203-1210
- 36 Pickuth D. Radiologic diagnosis of common bile duct stones. *Abdom Imaging* 2000; 25: 618-621
- 37 Okada M, Fukada J, Toya K, Ito R, Ohashi T, Yoro-zu A. The value of drip infusion cholangiography using multidetector-row helical CT in patients with choledocholithiasis. *Eur Radiol* 2005; 15: 2140-2145
- 38 Tack D, Sourtzis S, Delpierre I, de Maertelaer V, Gevenois PA. Low-dose unenhanced multidetector CT of patients with suspected renal colic. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 305-311
- 39 赵志峰, 刘锦鹏, 曹慧新, 董莘, 邹明宇. 肝脏钝挫伤的CT诊断与分级. *中国临床医学影像杂志* 2005; 16: 205-207

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

GABA对胰腺癌细胞株SW1990生长的影响

王 莹, 余胜利, 刘军权, 费素娟, 陈剑群, 许统俭, 王人灏, 刘 伟

王莹, 余胜利, 费素娟, 陈剑群, 许统俭, 江苏省徐州医学院附属医院消化科 江苏省徐州市 221006
刘军权, 中国人民解放军97医院中心实验室 江苏省徐州市 221000
王人灏, 江苏省徐州医学院附属医院普外科 江苏省徐州市 221006
刘伟, 徐州市民政医院内科 江苏省徐州市 221000
江苏省教育厅自然研究项目, No. 04KJD320203
江苏省徐州市科技局科技计划项目, No. X2004425-3
通讯作者: 王莹, 221006, 江苏省徐州市, 江苏省徐州医学院附属医院消化科. wangyingxu20@21cn.com
收稿日期: 2006-03-23 接受日期: 2006-05-22

Effect of gamma-aminobutyric acid on the growth of pancreatic cancer cell line SW1990

Ying Wang, Sheng-Li Yu, Jun-Quan Liu, Su-Juan Fei, Jian-Qun Chen, Tong-Jian Xu, Ren-Hao Wang, Wei Liu

Ying Wang, Sheng-Li Yu, Su-Juan Fei, Jian-Qun Chen, Tong-Jian Xu, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

Jun-Quan Liu, Department of Central Laboratory, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Ren-Hao Wang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

Wei Liu, Department of Internal Medicine, Hospital of Xuzhou Civil Administration, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Supported by Natural Research Programs from Education Office of Jiangsu Province, No. 04KJD320203, and the Programs from Science and Technology Bureau of Xuzhou, Jiangsu Province, No. X2004425-3

Correspondence to: Ying Wang, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China. wangyingxu20@21cn.com

Received: 2006-03-23 Accepted: 2006-05-22

Abstract

AIM: To investigate the effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on the growth of pancreatic cancer cell line SW1990.

METHODS: Pancreatic cancer cell line SW1990 was cultured by routine method, and then treated with different concentrations of GABA (20-320 $\mu\text{mol/L}$). The proliferation, apoptosis, and cell cycle of SW1990 cells was investigated

by MTT assay and flow cytometry, respectively. Radioimmunoassay was used to measure the intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content.

RESULTS: The different concentrations of GABA promoted the growth of SW1990 cells and affected the distribution of cell cycle. The percentage of cells in G_0/G_1 phase was decreased while that in S and G_2/M phase was increased. The content of intracellular cAMP was increased with the increase of GABA concentration in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). The apoptosis rate of SW1990 cells was decreased from 27.5% to 5.4%, which had significant difference ($\chi^2 = 10.19, P < 0.01$).

CONCLUSION: GABA can promote the proliferation of SW1990 cells by inhibiting apoptosis and influencing the distribution of cell cycle, which may be mediated by the information transduction of post-receptor.

Key Words: Pancreatic cancer; Gamma-aminobutyric acid; Cell proliferation; Apoptosis

Wang Y, Yu SL, Liu JQ, Fei SJ, Chen JQ, Xu TJ, Wang RH, Liu W. Effect of gamma-aminobutyric acid on the growth of pancreatic cancer cell line SW1990. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2337-2339

摘要

目的: 观察 γ -氨基丁酸(GABA)对胰腺癌SW1990细胞生长的影响。

方法: 采用MTT法和流式细胞术检测GABA对胰腺癌SW1990细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期的影响, 放射免疫分析法检测cAMP含量。

结果: 不同浓度的GABA (20-320 $\mu\text{mol/L}$)促进胰腺癌SW1990细胞的生长, 促进细胞周期比例的分布, 使 G_0/G_1 细胞减少, S期和 G_2/M 细胞增多, 同时促进胰腺癌SW1990细胞内cAMP含量的增加, 且呈剂量依赖性($P < 0.01$)。显著抑制细胞凋亡, 凋亡率由27.4%降低到5.4% ($\chi^2 = 10.19, P < 0.01$)。

■背景资料

随着神经生物学研究的深入, 作为神经系统中细胞间的信号传递物质——神经递质, 其神经系统以外的作用逐渐被认识。神经递质与某些肿瘤生长、侵袭和转移有关。 γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)为氨基酸类神经递质之一, 有关GABA在肿瘤方面的研究国内仅有少数, 国外相对较多。近年研究显示, GABA含量和GAD活性在多种进展期肿瘤组织中表达水平明显增加。

■应用要点

本文研究了体外GABA对胰腺癌细胞株SW1990具有促进生长的作用,其作用机制有待进一步研究,如其受体的表达,与癌基因、抑癌基因的关系等等,有助于揭示神经递质在肿瘤发生、发展过程中的作用,将为肿瘤的诊断及治疗提供新的途径。

结论: GABA促进胰腺癌SW1990细胞生长,可能通过受体后信息介导。

关键词: 胰腺癌; γ -氨基丁酸; 细胞增殖; 凋亡

王莹, 余胜利, 刘军权, 费素娟, 陈剑群, 许统俭, 王人灏, 刘伟. GABA对胰腺癌细胞株SW1990生长的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2337-2339

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2337.asp>

0 引言

随着神经生物学研究的深入,发现神经递质不仅参与支配局部组织的运动及感觉生理活动,还可通过与细胞膜表面的特异性受体结合进行信号传导,进而对靶细胞分化、生长、代谢、细胞骨架结构、基因表达产生影响。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是体内重要的抑制性神经递质,不仅存在于中枢神经系统,也广泛存在于外周组织,胰腺细胞含有GABA受体,并能释放高活性的谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)^[1-3],而GAD是GABA合成的关键酶。近年研究显示, GABA含量和GAD活性在多种肿瘤组织中表达水平明显增加^[4-8]。我们观察体外GABA对胰腺癌细胞株SW1990增殖及凋亡的作用,探讨神经递质在肿瘤发生、发展过程中的神经信号传导作用。

1 材料和方法

1.1 材料 GABA和异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)为Sigma公司产品,¹²⁵I-cAMP放免试剂盒为上海中医药大学产品,噻唑氮蓝(MTT)为瑞士Fluka公司产品,流式细胞检测仪(美国Becton Dickinson, BDFACSCalibur)。胰腺癌细胞株SW1990由上海交通大学附属第一人民医院王兴鹏教授惠赠。胰腺癌细胞SW1990置含100 mL/L的小牛血清RMPI 1640培养液中, 37℃, 50 mL/L CO₂条件培养。将传代72 h的细胞消化脱壁,再用含100 mL/L的小牛血清RPMI 1640培养液配成细胞悬液(10⁹/L),接种于96孔培养板(每孔0.1 mL),待细胞贴壁生长后,培养24 h。

1.2 方法 实验组加入不同浓度的GABA,对照组加入等量的培养液,培养48 h后待测,3孔重复。应用甲基偶氮唑盐MTT比色法。实验组与对照组加入MTT 20 μ L,培养4 h,弃去上清,加入二甲基亚砷100 μ L,待其沉淀产物完全溶解,在酶标仪570 nm波长测定各孔吸光度(A)。另收集细胞,1500 r/min离心5 min,700 mL/L冷乙

表 1 GABA对胰腺癌细胞生长和细胞内cAMP生成的影响 (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

c (GABA)/ μ mol/L	光密度值 (A)	cAMP (nmol/L)
0	0.563 $\pm$ 0.013	0.52 $\pm$ 0.042
20 ^b	0.872 $\pm$ 0.022	0.78 $\pm$ 0.035
40 ^b	0.957 $\pm$ 0.061	0.82 $\pm$ 0.010
80 ^b	1.012 $\pm$ 0.027	0.89 $\pm$ 0.014
160 ^b	1.103 $\pm$ 0.016	0.94 $\pm$ 0.020
320 ^b	1.114 $\pm$ 0.034	0.98 $\pm$ 0.052

^b $P < 0.01$ vs 0 μ mol/L.

表 2 GABA对胰腺癌细胞周期的影响 (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

GABA (μ mol/L)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	87.29 $\pm$ 1.34	8.91 $\pm$ 0.78	3.80 $\pm$ 0.55
20 ^b	74.29 $\pm$ 1.25	14.78 $\pm$ 0.76	10.93 $\pm$ 0.49
40 ^b	65.25 $\pm$ 1.39	19.99 $\pm$ 0.32	14.76 $\pm$ 0.32
80 ^b	58.15 $\pm$ 1.94	22.77 $\pm$ 2.01	19.08 $\pm$ 0.06
160 ^b	52.06 $\pm$ 1.04	24.09 $\pm$ 1.62	23.85 $\pm$ 2.65
320 ^b	46.18 $\pm$ 1.12	25.32 $\pm$ 0.74	28.50 $\pm$ 1.35

^b $P < 0.01$ vs 0 μ mol/L.

醇固定,离心后每样品管中加碘化丙啶(PI)染液1 mL,4℃避光染色30 min,流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡,每个样本分析10 000个细胞。再取对数生长期细胞消化后,在细胞悬液中(含细胞10⁹/L),加入10 mmol/L IBMx,将细胞悬液分为实验组和对照组,37℃培养。取出悬液0.15 mL,加入70.6 g/L三氯醋酸,混匀,4℃离心。取上清洗液后,将水移入玻璃瓶内,75℃水浴蒸干,冰箱贮存待测。放射免疫分析法检测cAMP。

统计学处理 实验数据以mean $\pm$ SD表示,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 GABA对胰腺癌细胞增殖的影响 胰腺癌细胞SW1990在给予20-320 μ mol/L GABA培养48 h后,不同浓度的GABA均能明显促进胰腺癌细胞SW1990的生长(表1)。

2.2 GABA对胰腺癌细胞周期和细胞凋亡的影响 与对照组相比,不同浓度的GABA对胰腺癌细胞SW1990细胞周期均有作用,使G₀/G₁细胞减少,S期和G₂/M细胞增多(表2)。GABA抑制胰腺癌细胞SW1990细胞凋亡,随剂量的增加凋亡率下

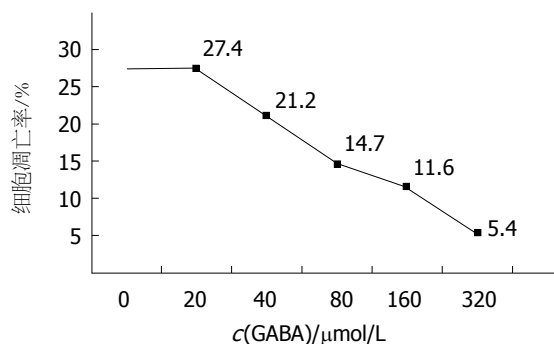


图 1 GABA抑制SW1990细胞凋亡的比例.

降, 凋亡率分别为27.4%, 21.2%, 14.7%, 11.6%, 5.4%, 组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 10.19$, $P < 0.01$, 图1).

2.3 GABA对胰腺癌细胞cAMP的影响 GABA促进胰腺癌SW1990细胞内cAMP生成呈剂量依赖性(表1).

3 讨论

神经递质传统意义上被认为仅作为神经系统中细胞间的信号传递. 最新的肿瘤生物学研究结果显示, 神经递质和其受体结合与肿瘤生长、侵袭和转移有关^[1,9]. 近年研究显示, GABA含量和GAD活性在结肠癌、乳腺癌、胃癌、甲状腺癌及前列腺癌中表达水平明显高于正常组织和良性病变, GABA含量和GAD活性与恶性肿瘤的发生及其生物学行为密切相关^[4-8]. 国内有人发现, 胰腺癌GAD65表达明显增高, 且低分化腺癌表达高于高分化腺癌^[10].

我们发现, 不同浓度的GABA均能促进SW1990增殖, 抑制细胞凋亡, 促进cAMP生成, 且呈剂量依赖性. GABA对SW1990细胞周期也有一定影响, 不同浓度GABA处理SW1990细胞48 h后, G₁期细胞比例明显下降, S, G₂期和M期细胞比例增加. 结果提示, GABA加快细胞周期进程. 最新研究发现, GABA_A受体 α 亚单位在胰腺癌组织中过度表达^[11]. GABA促进SW1990生

长, 抑制细胞凋亡, 可能通过受体后信息传导途径, 使细胞内cAMP增加. GABA作为神经递质可能在肿瘤的生长过程中具有重要的作用.

4 参考文献

- 1 Sha L, Miller SM, Szurszewski JH. Electrophysiological effects of GABA on cat pancreatic neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G324-331
- 2 Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002; 213: 1-47
- 3 Ong J, Kerr DI. GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci* 1990; 46: 1489-1501
- 4 Kleinrok Z, Matuszek M, Jesipowicz J, Matuszek B, Opolski A, Radzikowski C. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as s.c. tumors in athymic nu/nu mice. *J Physiol Pharmacol* 1998; 49: 303-310
- 5 Mazurkiewicz M, Opolski A, Wietrzyk J, Radzikowski C, Kleinrok Z. GABA level and GAD activity in human and mouse normal and neoplastic mammary gland. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 247-253
- 6 Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit* 2001; 7: 377-381
- 7 Myshunina TM, Bogdanova TI, Tron'ko ND. On the possible role of gamma-aminobutyric acid in thyroid carcinogenesis. *Experimental Oncology* 2003; 25: 25-27
- 8 Azuma H, Inamoto T, Sakamoto T, Kiyama S, Ubai T, Shinohara Y, Maemura K, Tsuji M, Segawa N, Masuda H, Takahara K, Katsuoka Y, Watanabe M. Gamma-aminobutyric acid as a promoting factor of cancer metastasis; induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer Res* 2003; 63: 8090-8096
- 9 Entschladen F, Lang K, Drell TL, Joseph J, Zaenker KS. Neurotransmitters are regulators for the migration of tumor cells and leukocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 467-482
- 10 Yang ZL, Wang QW, Deng XH, Li DQ, Lv F, Li YG. Enzymatic activities of ChAT, GAD65 and PKC in pancreatic carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11: 1554-1557
- 11 Johnson SK, Haun RS. The gamma-aminobutyric acid A receptor α subunit is overexpressed in pancreatic adenocarcinomas. *JOP* 2005; 6: 136-142

电编 张敏 编辑 潘伯荣

lactulose和glutamine对梗阻性黄疸大鼠空肠黏膜的影响

吴德全, 吕哲, 张新晨, 宿华威, 崔花子, 赵瑞波, 钟志久, 高彦辉

■背景资料

临床上梗阻性黄疸患者, 无论其原发病是恶性还是良性, 都常常很快出现营养不良及消耗状态。如何正确认识和改善这种营养不良, 对梗阻性黄疸的治疗起到至关重要的作用, 包括能够通过手术方法解除梗阻的患者的术前准备, 尤其是无法解除胆道梗阻的患者的长期营养支持。

吴德全, 张新晨, 宿华威, 哈尔滨医科大学附属第二医院普通外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

吕哲, 黑龙江省肇东市人民医院普通外科, 黑龙江省肇东市 152000

崔花子, 赵瑞波, 钟志久, 哈尔滨医科大学病理教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150086

高彦辉, 哈尔滨医科大学地方病研究中心, 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 吴德全, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普通外科. dqwu56@163.com

电话: 0451-86605535 传真: 0451-86684043

收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-06-05

Influence of lactulose and glutamine on the jejunum mucosa of rats with obstructive jaundice

De-Quan Wu, Zhe Lv, Xin-Chen Zhang, Hua-Wei Su, Hua-Zi Cui, Rui-Bo Zhao, Zhi-Jiu Zhong, Yan-Hui Gao

De-Quan Wu, Xin-Chen Zhang, Hua-Wei Su, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Zhe Lv, Department of General Surgery, People's Hospital of Zhaodong City, Zhaodong 152000, Heilongjiang Province, China

Hua-Zi Cui, Rui-Bo Zhao, Zhi-Jiu Zhong, Department of Pathology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Yan-Hui Gao, Research Center for Endemic Disease, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr De-Quan Wu, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. dqwu56@163.com

Received: 2006-04-20 Accepted: 2006-06-05

Abstract

AIM: To investigate the influence of lactulose and glutamine on the changes of jejunal mucosal morphology of rats with obstructive jaundice.

METHODS: Eighty-four Wistar rats were randomly divided into 4 groups. The rats in group A served as sham operation controls, and those in group B as common bile duct ligation controls. The rats in group C and D were intragastrically treated with lactulose and glutamine, respectively, besides common bile duct ligation.

The rats were sacrificed at the 0, 5th and 10th post-treatment day. The morphology of jejunum mucosa was observed and the height of jejunal villi was measured under microscope.

RESULTS: The tela submucosa of jejunum had a few lymphocytes in group A, while that had more lymphocytes in group B, C and D under microscope. The height of jejunal villi in group A was not changed, and it was significantly higher than that in group B (5 d: $q = 4.32, P < 0.01$; 10 d: $q = 11.03, P < 0.01$). The height of jejunal villi in group B was obviously lower than that in group C or D, but it was not significantly different between group A and D (5 d: $q = 3.62, P > 0.05$; 10 d: $q = 3.83, P > 0.05$). There was also no marked difference between group C and D ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Common bile duct ligation leads to obstructive jaundice, which results in atrophy of the jejunum mucosa. Both lactulose and glutamine may prevent the atrophy of intestinal mucosa, but their effects are not significantly different.

Key Words: Obstructive jaundice; Rats; Jejunal mucosa; Lactulose; Glutamine

Wu DQ, Lv Z, Zhang XC, Su HW, Cui HZ, Zhao RB, Zhong ZJ, Gao YH. Influence of lactulose and glutamine on the jejunum mucosa of rats with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2340-2343

摘要

目的: 研究梗阻性黄疸时空肠黏膜的变化及 lactulose 和 glutamine 对梗阻性黄疸大鼠空肠黏膜的影响。

方法: Wistar大鼠84只, 随机分为4组。通过手术结扎切断大鼠胆总管得到梗阻性黄疸模型。对梗阻性黄疸大鼠分别经胃灌注 lactulose 和 glutamine 药物, 比较给药前及给药后5, 10 d各组大鼠空肠黏膜绒毛高度变化, 同时与未行胆管结扎的假手术对照组进行比较。

结果: 无论胆总管结扎与否, 给药前各组空肠

黏膜的绒毛高度无明显差异. 胆总管结扎后大鼠空肠黏膜高度减低(5 d: $q = 4.32, P < 0.01$; 10 d: $q = 11.03, P < 0.01$); 应用生理盐水组大鼠的空肠黏膜绒毛高度明显低于应用lactulose和glutamine组大鼠的空肠黏膜绒毛高度, 且应用glutamine组与胆总管未结扎组相近(5 d: $q = 3.62, P > 0.05$; 10 d: $q = 3.83, P > 0.05$); 而应用lactulose和glutamine的2组大鼠空肠黏膜绒毛高度无明显差异($P > 0.05$).

结论: 结扎大鼠胆总管可导致其空肠黏膜萎缩. 经胃肠道应用lactulose或glutamine对胆道梗阻所致的大鼠空肠黏膜萎缩均具有保护作用, 且二者对肠黏膜的保护作用无明显差异.

关键词: 梗阻性黄疸; 大鼠; 空肠黏膜; 乳糖; 谷氨酰胺

吴德全, 吕哲, 张新晨, 宿华威, 崔花子, 赵瑞波, 钟志久, 高彦辉. lactulose和glutamine对梗阻性黄疸大鼠空肠黏膜的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2340-2343
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2340.asp>

0 引言

梗阻性黄疸导致患者营养状况下降的诸多因素中, 空肠黏膜改变是其重要原因之一. 因此, 如何保护空肠黏膜对改善梗阻性黄疸患者的营养状况非常重要. 以往研究中发现, 乳糖(lactulose, Lact)和谷氨酰胺(glutamine, Gln)对感染和创伤过程中的空肠黏膜损害都有一定的保护作用. 那么, 这种保护作用对梗阻性黄疸时的空肠黏膜是否也同样存在呢? 我们对此进行了实验研究.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♀Wistar大鼠84只, 体重190-210 g (黑龙江中医药大学动物实验中心提供), 实验前适应性饲养1 wk. 随机分为4组, 即假手术对照组、胆总管结扎对照组、胆总管结扎Lact实验组、胆总管结扎Gln实验组. 每组21只, 分笼饲养. 大鼠术前12 h禁食, 正常饮水. 氯胺酮麻醉, 22 mg/kg, im. 取仰卧位, 四肢及头部固定. 鼠尾静脉穿刺建立输液通道. 术区碘伏消毒. 取上腹正中切口, 将结肠、胃、网膜、十二指肠及小肠拉开, 显露胆总管并加以游离, 将游离的胆总管两端结扎后于中间剪断, 断端以碘伏消毒. 关腹. 假手术对照组的手术过程前半部分与之相同, 但仅做胆总管的显露而不做游离、结扎与切断.

1.2 方法 梗阻性黄疸大鼠模型建立后, 经口腔插管灌胃给药, 每日2次, 容量均为每次5 mL/kg. 根据给药时间各组再分为给药前、给药5 d、给药10 d, 每组大鼠7只. 胆总管结扎Lact实验组用Lact灌胃(5 mL/kg), 胆总管结扎Gln实验组用Gln灌胃(0.5 g/kg稀释成5 mL/kg), 胆总管结扎对照组和假手术对照组均以生理盐水5 mL/kg灌胃. 对各组大鼠分别于预定时间即给药前、给药5 d、给药10 d断头处死. 立即开腹, 距屈氏韧带远端1 cm处开始切取空肠约2 cm, 制成1.5 cm×1.5 cm的组织块, 置于40 g/L甲醛中固定. 对甲醛固定的空肠组织经乙醇脱水、石蜡包埋后切片, 厚度约3-4 μm, 干燥后HE染色进行光学显微镜观察和空肠绒毛高度的图像分析. 空肠绒毛高度图像分析利用北航真彩图像分析系统完成. 每张切片标本按相同方位测定5个视野, 取其平均值为该切片的绒毛高度.

2 结果

2.1 大体观察 假手术对照组肝脏无淤胆及肿胀, 胆总管与周围无黏连, 表面光滑, 管径无扩张. 胆总管结扎对照组、胆总管结扎Lact实验组、胆总管结扎Gln实验组之肝脏均呈明显淤胆肿胀, 胆总管结扎离断部位与周围组织黏连, 结扎近端胆总管明显扩张, 呈囊状, 远端胆总管空虚回缩. 各组空肠表面外观均无明显异常.

2.2 光镜观察 假手术对照组大鼠的空肠黏膜上皮完整, 黏膜腺体及绒毛排列整齐, 黏膜、黏膜下层及肌层等各层次清晰, 黏膜下层有少许淋巴细胞浸润. 胆总管结扎对照组大鼠空肠黏膜水肿, 腺体排列紊乱, 黏膜内杯状细胞增多, 黏膜下层有较多的淋巴细胞浸润. 胆总管结扎Lact实验组及Gln实验组大鼠空肠黏膜的改变与胆总管结扎对照组相近, 但程度较轻.

2.3 空肠绒毛高度(表1) 经单因素方差分析显示, 给药前4组大鼠空肠黏膜的绒毛高度无显著性差异 [$F = 0.19 < F_{0.05}(3.24) = 3.01, P > 0.05$]. 随着胆管结扎导致其梗阻时间的延长, 大鼠空肠黏膜的绒毛高度逐渐发生了显著性的差异, 即给药5 d时, $F = 4.35 > F_{0.05}(3.24) = 3.01, P < 0.05$; 给药10 d时, $F = 21.9 > F_{0.01}(3.24) = 4.72, P < 0.01$. 假手术对照组与胆总管结扎对照组相比, 均以生理盐水灌胃, 5 d时 $q = 4.32 > q_{0.01}(2.20) = 4.02, P < 0.01$; 10 d时, $q = 11.03 > q_{0.01}(2.20) = 4.02, P < 0.01$. 假手术对照组与胆总管结扎Lact实验组相比, 即用Lact灌胃, 5 d时, $q = 3.61 > q_{0.05}(3.20) = 3.58$,

■创新盘点

通过结扎大鼠胆总管制作胆道梗阻模型, 从而观察梗阻性黄疸时空肠黏膜的变化及lactulose和glutamine对梗阻性黄疸时空肠黏膜的保护作用.

■应用要点

lactulose 和 glutamine 对梗阻性黄疸大鼠空肠黏膜的这种保护作用如果能在临床患者中得到证实和应用,必将对改善梗阻性黄疸患者的营养状态发挥积极的作用,具有重要的实际应用价值。

表 1 各组大鼠空肠黏膜绒毛高度对比 (mean ± SD, μm)

分组	给药前	给药5 d	给药10 d
假手术对照	525.1 ± 31.6	530.3 ± 29.3	523.1 ± 17.5
胆总管结扎对照	511.8 ± 17.2	435.5 ± 15.1	397.2 ± 15.5
胆总管结扎Lact实验	516.7 ± 21.1	483.9 ± 22.6	465.9 ± 20.1
胆总管结扎Gln实验	514.3 ± 18.7	498.1 ± 28.3	491.6 ± 29.4

$P < 0.05$, 灌胃10 d时, $q = 4.59 > q_{0.05}(3.20) = 3.58$, $P < 0.05$. 说明胆总管梗阻后应用Lact灌胃, 大鼠空肠黏膜的绒毛高度与非手术对照组的胆总管未结扎相比, 在5 d及10 d时均有所降低, 且有显著性, 但好于胆总管结扎生理盐水灌注组(后者 $P < 0.01$). 假手术对照组与胆总管结扎Gln实验组相比, 即用Gln灌胃5 d时, $q = 3.62 < q_{0.05}(4.30) = 3.85$, $P > 0.05$; 灌胃10 d时, $q = 3.83 < q_{0.05}(4.30) = 3.85$, $P > 0.05$. 说明胆总管梗阻后应用Gln灌胃, 5 d及10 d时大鼠空肠黏膜的绒毛高度与非手术对照组相比均无明显降低. 胆总管结扎对照组与Lact实验组相比, 在用Lact灌胃5 d时, $q = 2.96 > q_{0.05}(2.20) = 2.95$, $P < 0.05$; 灌胃10 d时, $q = 4.01 > q_{0.05}(2.20) = 2.95$, $P < 0.05$. 说明胆总管梗阻后应用Lact灌胃5 d及10 d时均比应用生理盐水灌胃的大鼠空肠黏膜绒毛明显增高. 胆总管结扎对照组与Gln实验组相比, 在用Gln灌胃5 d时, $q = 3.90 > q_{0.05}(3.20) = 3.58$, $P < 0.05$; 灌胃10 d时, $q = 5.75 > q_{0.01}(3.20) = 4.64$, $P < 0.01$. 说明胆总管梗阻后应用Gln灌胃5 d时比应用生理盐水灌胃的大鼠空肠黏膜绒毛明显增高, 灌胃10 d时增高更加明显. 胆总管结扎LACT实验组与Gln实验组相比, 即分别用Lact和Gln灌胃5 d时, $q = 1.54 < q_{0.05}(2.30) = 2.89$, $P > 0.05$; 灌胃10 d时, $q = 2.83 < q_{0.05}(2.30) = 2.89$, $P > 0.05$. 说明胆总管梗阻后应用Lact和Gln灌胃5 d及10 d时, 二者对大鼠空肠黏膜的绒毛高度的影响无明显差异.

3 讨论

胆道梗阻后患者营养状态下降的主要原因之一是空肠黏膜萎缩^[1]. 这种空肠黏膜的改变可能是由于梗阻性黄疸时, 肠道内胆酸、胆盐、S-IgA等减少或缺乏, 以及包括肝脏网状内皮系统在内的全身免疫系统受抑制, 导致肠道内细菌过渡繁殖, 产生的内毒素增多, 吸收入血, 形成内毒素血症, 致使胃肠黏膜淤血和消化吸收功能障碍, 蛋白质和能量代谢障碍, 从而造成肠黏膜结构和功能异常^[2]. 本实验中也清楚的看到, 结

扎大鼠胆总管后, 其空肠黏膜的绒毛高度明显低于假手术的胆总管未结扎组, 进一步证明胆道梗阻后确实能引起空肠黏膜萎缩. 有鉴于此, 如果能够采取适当对策有效阻止或减轻胆道梗阻后的空肠黏膜改变, 势必会有益于改善梗阻性黄疸患者的营养状态. Lact和Gln已被证实在疾病、感染和创伤等应激过程中对空肠黏膜具有保护作用^[3-4]. Lact是一种人工合成的双糖, 口服后很少吸收, 起到肠道微生态调节剂作用. 能够促进肠道内嗜酸性乳酸杆菌的大量生长和抑制嗜碱性革兰阴性杆菌的繁殖, 从而减少肠道内毒素的生成, 降低肠道内的酸度, 并通过其非吸收性的渗透负荷作用减少内毒素在肠腔蓄积及吸收入血, 达到保护肠黏膜结构和功能的作用^[4-5]. Gln是一种条件必需氨基酸, 是肠道黏膜等快速增殖细胞较好的呼吸燃料, 有效地为肠黏膜细胞提供氧化底物, 为其蛋白质更新提供氮源, 增加肠黏膜表面糖蛋白的合成^[6]; 其生糖作用有助于黏膜固有层淋巴细胞分泌SIgA, 以防止肠腔内细菌或毒素的易位, 提高肠黏膜的屏障功能^[7-8]; Gln还能增加胃肠道黏膜细胞的谷胱甘肽合成, 增强肠黏膜细胞抗氧化能力而延长其寿命^[9-10]; 作为蛋白质代谢的重要调节因子, 在应激状态下调节细胞代谢和免疫细胞的功能, 包括调节肠道局部和全身的免疫功能而保护肠黏膜屏障^[11-12]. 从实验结果中我们看到, Lact和Gln对胆管梗阻时的小肠黏膜同样具有保护作用. 因为对大鼠胆总管结扎后, 给予生理盐水的大鼠小肠黏膜绒毛高度明显低于胆总管未结扎的假手术对照组, 而胆总管结扎后给予Lact和Gln, 其空肠黏膜的绒毛高度明显高于给予生理盐水的大鼠, 尤其是给予Gln组空肠绒毛高度与未行胆管结扎的假手术对照组相当. 虽然给予Lact组的空肠黏膜绒毛高度与假手术对照组相比有所降低, 但仍好于应用生理盐水组, 并且给予Lact和Gln两组之间相比大鼠空肠黏膜的绒毛高度无明显差异, 说明二者具有相近的肠黏膜保护作用. 由于Lact用于治疗肝昏迷和做为缓泄

剂、Gln用于重症营养支持在临床已应用多年。所以,为改善梗阻性黄疸患者由于肠黏膜改变对营养状态的影响,根据这两种药物的肠黏膜保护作用,有理由考虑对梗阻性黄疸患者围手术期或不适于手术的梗阻性黄疸患者适当应用Lact和Gln,可能对其营养状态的改善有一定作用。

另外,根据光学显微镜观察到假手术对照组大鼠空肠黏膜下层仅有少量淋巴细胞存在,而胆总管结扎Lact实验组、Gln实验组与胆总管结扎对照组一样,其黏膜下层都有较多的淋巴细胞浸润,提示Lact与Gln均未能完全阻止胆道梗阻时空肠黏膜的损害,只是具有一定程度的保护作用。

4 参考文献

- 1 王跃生,李永山,胡闻,陈柯. 梗阻性黄疸患者空肠黏膜超微结构改变对吸收功能的影响. 临床消化病杂志 1999; 11: 55-56
- 2 Iliffe GD, Owen DA. An association between primary biliary cirrhosis and jejunal villous atrophy resembling celiac disease. *Dig Dis Sci* 1979; 24: 802-806
- 3 于健春. 谷氨酰胺制剂的研究进展. 腹部外科 2000; 13: 203-205
- 4 刘仁宽,温朗聪,王崇霞. 乳糖研究进展. 中国微生物学杂志 1997; 9: 62-64
- 5 Pain JA, Cahill CJ, Gibert JM, Johnson CD, Trapnell JE, Bailey ME. Experimental and clinical study of Lactulose in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1986; 73: 775-778
- 6 Chen K, Okuma T, Okamura K, Torigoe Y, Miyauchi Y. Glutamine-supplemented parenteral nutrition improves gut mucosa integrity and function in endotoxemic rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994; 18: 167-171
- 7 Noguchi Y, James JH, Fischer JE, Hasselgren PO. Increased glutamine consumption in small intestine epithelial cells during sepsis in rats. *Am J Surg* 1997; 173: 199-205
- 8 刘冬妍,刘沛. 肠道分泌型IgA的成分及功能. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2845-2848
- 9 Khan J, Iiboshi Y, Cui L, Wasa M, Sando K, Takagi Y, Okada A. Alanyl-glutamine-supplemented parenteral nutrition increases luminal mucus gel and decreases permeability in the rat small intestine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: 24-31
- 10 邹健,王康宁. 谷氨酰胺对动物肠道结构和免疫功能的影响. 饲料工业 2006; 3: 125-127
- 11 柳汉荣,花天放. 谷氨酰胺和肠道免疫. 肠外与肠内营养 1999; 6: 168-172
- 12 Bai MX, Jiang ZM, Liu YW, Wang WT, Li DM, Wilmore DW. Effects of alanyl-glutamine on gut barrier function. *Nutrition* 1996; 12: 793-796

■名词解释

梗阻性黄疸:胆管由于各种原因导致其管腔狭窄或闭塞,胆汁排出受阻而回流入血,表现为血清胆红素升高,组织黄染,尿色深黄,粪便白色。病变可来自胆管的管壁、管腔内和管腔外。原因可以是肿瘤、炎症、结石、外伤、寄生虫等等。治疗需根据病因、病程、局部及全身状态采用手术、介入及保守疗法。

电编 张焕兰 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2006-10-14/18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, xinxinge75@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。

噪音避水应激中心理因素对大鼠免疫功能的影响

施炳龙, 胡家露, 潘伯荣, 仇军文, 季万胜, 吴开春, 樊代明

■背景资料

应激是人类生活中不可避免的问题, 他可对免疫功能产生广泛的影响, 并与疾病的发生、发展密切相关。对应激与免疫相互关系的深入研究, 不仅能增加本文对机体生理调节机制的了解, 并由此对疾病的诊断、治疗和预防产生积极的影响。

施炳龙, 胡家露, 仇军文, 季万胜, 吴开春, 樊代明, 第四军医大学西京医院消化病研究所 陕西省西安市 710032

潘伯荣, 第四军医大学西京医院肿瘤中心 陕西省西安市 710032

通讯作者: 施炳龙, 510010, 广东省广州市, 广州军区广州总医院消化内科. shibinglong@126.com

电话: 020-36653552

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-06-21

Effect of psychological factors on immune functions of rats in water avoidance stress

Bing-Long Shi, Jia-Lu Hu, Bo-Rong Pan, Jun-Wen Qiu, Wan-Sheng Ji, Kai-Chun Wu, Dai-Ming Fan

Bing-Long Shi, Jia-Lu Hu, Jun-Wen Qiu, Wan-Sheng Ji, Kai-Chun Wu, Dai-Ming Fan, Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Bo-Rong Pan, Center of Cancer, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Bing-Long Shi, Department of Digestive Diseases, Guangzhou General Hospital, Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China. shibinglong@126.com

Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-06-21

Abstract

AIM: To observe the effect of psychophysical factors on the immune function of rats in water avoidance stress.

METHODS: Thirty-two adult male SD rats were randomly divided into four groups (A, B, C and D). The rats in group A, B and C received the stress induced by water avoidance, noise, noise plus water avoidance, respectively. The rats in group D served as controls. After stress, the proliferative ability of the mesentery lymphocytes and the cytotoxicity of natural killer (NK) cells were analyzed.

RESULTS: The proliferative abilities of B and T dominant lymphocytes were not significantly different between group A and D ($P > 0.05$), while they were markedly decreased in group B (LPS: 0.71 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$; PHA: 0.68 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$) and C (LPS: 0.4

± 0.05 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$; PHA: 0.46 ± 0.06 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$). The minimal proliferative ability was found in group C, and significant difference was found between group B and C (LPS: 0.4 ± 0.05 vs 0.71 ± 0.11 , $P < 0.05$; PHA: 0.4 ± 0.05 vs 0.68 ± 0.08 , $P < 0.05$). The cytotoxicity of NK cells in group A and D showed no significant difference ($P > 0.05$), but it decreased significantly in group B (1/10: 24.6 ± 11.6 vs 39.5 ± 13.1 , $P < 0.05$; 1/20: 21.8 ± 9.6 vs 34.6 ± 10.4 , $P < 0.05$; 1/40: 17.8 ± 7.9 vs 30.2 ± 10.6 , $P < 0.05$). Again, the minimal cytotoxicity of NK cells was found in group C (1/10: 17.6 ± 8.3 vs 39.5 ± 13.1 , $P < 0.01$; 1/20: 14.9 ± 5.8 vs 34.6 ± 10.4 , $P < 0.01$; 1/40: 10.2 ± 4.3 vs 30.2 ± 10.6 , $P < 0.01$), and significant difference was found between group B and C (1/10: 17.6 ± 8.3 vs 24.6 ± 11.6 , $P < 0.05$; 1/20: 14.9 ± 5.8 vs 21.8 ± 9.6 , $P < 0.05$; 1/40: 10.2 ± 4.3 vs 17.8 ± 7.9 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Under stress, the immune functions of rats are undermined, and the psychophysical factors have potential inhibitory effects in noise plus water avoidance stress.

Key Words: Water avoidance; Noise; Stress; Psychological factors; Immune function

Shi BL, Hu JL, Pan BR, Qiu JW, Ji WS, Wu KC, Fan DM. Effect of psychological factors on immune functions of rats in water avoidance stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2344-2348

摘要

目的: 探讨噪音联合避水应激中的心理因素对大鼠免疫功能的影响。

方法: 成年♂SD大鼠32只, 随机分为实验A, B, C组和对照组。A组大鼠接受避水应激, B组接受噪音应激, C组接受噪音避水复合应激。应激结束后, 检测所有大鼠肠系膜淋巴细胞增殖反应和外周血NK细胞杀伤功能。

结果: 以B淋巴细胞为主的淋巴细胞增殖实验及以T淋巴细胞为主的淋巴细胞增殖实验结果均显示, 避水组与对照组淋巴细胞刺激指数无明显差异($P > 0.05$); 噪声组的增殖指数低于

对照组(LPS: 0.71 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$; PHA: 0.68 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$); 复合应激组刺激指数明显低于对照组(LPS: 0.4 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$; PHA: 0.46 ± 0.06 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), 且与噪声组也存在差异(LPS: 0.4 ± 0.05 vs 0.71 ± 0.11 , $P < 0.05$; PHA: 0.4 ± 0.05 vs 0.68 ± 0.08 , $P < 0.05$). 避水组与对照组的NK细胞杀伤活性无明显差异($P > 0.05$); 而噪声组NK细胞杀伤活性低于对照组(1/10: 24.6 ± 11.6 vs 39.5 ± 13.1 , $P < 0.05$; 1/20: 21.8 ± 9.6 vs 34.6 ± 10.4 , $P < 0.05$; 1/40: 17.8 ± 7.9 vs 30.2 ± 10.6 , $P < 0.05$); 复合刺激组NK细胞杀伤活性明显低于对照组(1/10: 17.6 ± 8.3 vs 39.5 ± 13.1 , $P < 0.01$; 1/20: 14.9 ± 5.8 vs 34.6 ± 10.4 , $P < 0.01$; 1/40: 10.2 ± 4.3 vs 30.2 ± 10.6 , $P < 0.01$), 且与噪声组也存在差异(1/10: 17.6 ± 8.3 vs 24.6 ± 11.6 , $P < 0.05$; 1/20: 14.9 ± 5.8 vs 21.8 ± 9.6 , $P < 0.05$; 1/40: 10.2 ± 4.3 vs 17.8 ± 7.9 , $P < 0.05$).

结论: 应激导致大鼠免疫功能下降, 噪音联合避水应激中的心理因素对大鼠免疫系统抑制起一种潜在的作用。

关键词: 避水; 噪声; 应激; 心理因素; 免疫功能

施炳龙, 胡家露, 潘伯荣, 仇军文, 季万胜, 吴开春, 樊代明. 噪音避水应激中心理因素对大鼠免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2344-2348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2344.asp>

0 引言

突发性公共卫生事件给社会公众带来了巨大心理压力, 并对人体造成应激性伤害, 给社会特别是政府和医疗卫生、卫生信息系统带来了严峻的挑战, 应激性疾病的相关研究也因此得到广泛重视^[1-3]. 自Bartrop *et al*^[4]于1970年代中期开创性的对应激导致健康人群免疫功能变化进行前瞻性研究以来, 有关精神状态与免疫功能关系的研究便持续深入的开展起来^[16-18]. 应用复合应激模型来研究其中的心理因素在应激中所起的作用未见报道, 我们在改良的大鼠应激模型的基础上研究应激大鼠肠系膜淋巴细胞增殖反应及其外周血NK细胞的杀伤活性变化, 旨在探讨应激中的心理因素对大鼠免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年♂SD大鼠32只由第四军医大学动物中心提供, 体质量180-220 g, 自由饮食,

在光/暗周期为12/12 h(光照时间06:00-18:00)、背景声音 40 ± 5 dB、温度 25 ± 3 °C条件限制下饲养. 实验室温度、湿度、照明及环境噪声相同. RPMI 1640 (Gibco, 美国); LPS, PHA (Sigma, 美国); 3H-TdR, ⁵¹Cr(上海原子能研究所). 录有战场武器声的录音带(第四军医大学军事卫勤教研室提供)、后级放大器(Sony公司)、精密声级计和倍频程滤波器(上海市红声器材厂)、MRP-2100酶联免疫检测仪(SYNTON, 美国)、β-液闪仪(Beckman, 美国)、γ-晶闪仪(Wallac Oy Turku, 芬兰)、CO₂细胞培养箱(TABAIESPEC, 日本).

1.2 方法 大鼠随机分为避水组、噪声组(100 dB)、复合刺激组(避水+噪声100 dB)与对照组, 每组8只. 避水试验参照Enck *et al*^[5]的方法进行改良, 将大鼠置入装有玻璃块的实验箱中, 然后倒入水(25 ± 2)°C, 不行噪声刺激; 噪声组行噪声刺激而无避水刺激, 按噪声强度为100 dB. 复合刺激组在避水中待大鼠爬上玻璃块后启动声源, 噪声强度为100 dB. 每天1次, 每次1 h, 共14次, 实验结束后大鼠返回饲养区. 空白对照组大鼠同时进实验箱但不行任何刺激. 全部实验均个别实施, 实验由主试及3名助手进行, 分别负责控制声源、记时、观察大鼠的行为、采集标本. 为避免形成时间定势干扰实验结果, 大鼠每次进箱、刺激的时间应随机轮换。

1.2.1 肠系膜淋巴结淋巴细胞增殖实验 应激后断头放血处死大鼠, 无菌下取出肠系膜淋巴结, 在细胞培养液中挤压, 经200目尼龙网过滤, 制成单细胞悬液, 细胞计数后制成密度为 1×10^9 /L的悬液. 在悬液中加入有丝分离原PHA/LPS (10 mg/L), 然后取此悬液100 μL加入96孔细胞培养板中, 置入CO₂细胞培养箱内培养. 50 mL/L CO₂, 饱和湿度及37°C孵育72 h. 培养终止前6 h, 每孔加入1 μCi ³H-TdR, 继续培养6 h, 培养结束后用多头细胞收集仪将细胞收集在玻璃纤维滤纸上, 冲洗、烘干, 然后将滤纸放入盛有5 mL闪烁液的闪烁瓶中, 在液体闪烁仪上测定每孔的放射强度cpm值. 刺激指数(SI) = [PHA/LPS(或实验组)cpm - 机器=本底cpm]/(空白对照组cpm - 机器本底cpm).

1.2.2 外周血NK细胞杀伤功能的检测 应激后大鼠抽取尾静脉血, 用淋巴细胞分离液分得淋巴细胞, 按 1×10^9 /L接种在含IL-2 (500 kU/L)的100 mL/L FCS RPMI 1640诱导培养72 h. 小鼠YAC-1细胞标记⁵¹Cr后作为靶细胞, 收获处于对

■ 研发前沿

应激与免疫关系的研究已相当广泛, 但是应激中的心理因素在其中的作用的研究因相关影响因素较多, 因此成为研究难点。

■相关报道

有研究认为,严重的应激反应主要导致机体的细胞免疫功能降低,体液免疫功能增强,形成Th1向Th2漂移。

表 1 大鼠肠系膜淋巴细胞刺激指数和NK细胞杀伤活性的影响 ($n = 8$, mean $\pm$ SD, %)

分组	SI		NK细胞杀伤活性(效应细胞:靶细胞)		
	LPS (B细胞)	PHA (T细胞)	1:10	1:20	1:40
空白对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	39.5 $\pm$ 13.1	34.6 $\pm$ 10.4	30.2 $\pm$ 10.6
避水组 (A)	0.91 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.12	37.8 $\pm$ 13.4	35.4 $\pm$ 11.5	27.7 $\pm$ 9.7
噪声组 (B)	0.71 $\pm$ 0.11 ^a	0.68 $\pm$ 0.08 ^a	24.6 $\pm$ 11.6 ^a	21.8 $\pm$ 9.6 ^a	17.8 $\pm$ 7.9 ^a
复合刺激组 (C)	0.4 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.46 $\pm$ 0.06 ^{bc}	17.6 $\pm$ 8.3 ^{bc}	14.9 $\pm$ 5.8 ^{bc}	10.2 $\pm$ 4.3 ^{bc}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 噪声组。

数生长期靶细胞,洗涤后调整细胞密度为 2×10^9 细胞/L,取 1×10^9 细胞/L靶细胞(0.5 mL),加 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 37°C 孵育3 h,期间振摇3次,用含100 mL/L FCS的RPMI 1640洗涤3次,每次800 r/min离心5 min,重悬细胞为 1×10^8 /L,加入96孔培养板中,每孔加100 μL (1×10^4 细胞,每份3个复孔),每孔加入100 μL 不同细胞密度的效应细胞(效靶比为1:10, 1:20, 1:40),最大释放组加入1% TritonX-100 100 μL ;自然释放组加入100 μL 完全培养基,950 mL/L O_2 , CO_2 37°C 孵育4 h,每孔取出100 μL 上清, γ 计数器上测定cpm值。NK细胞活性 = (实验组 ^{51}Cr 放射性-自发的 ^{51}Cr 放射性)/(总的 ^{51}Cr 放射性-自发的 ^{51}Cr 放射性) $\times 100\%$ 。

统计学处理 数据均采用SPSS 11.0软件包进行统计学分析,结果以mean $\pm$ SD表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B淋巴细胞增殖 避水组与对照组以B淋巴细胞为主的淋巴细胞刺激指数无明显差异($P > 0.05$);噪声组的增殖指数低于对照组($P < 0.05$);复合刺激组刺激指数明显低于对照组($P < 0.01$),且与噪声组也存在差异($P < 0.05$,表1)。

2.2 T淋巴细胞增殖 避水组与对照组以T淋巴细胞为主的淋巴细胞刺激指数无明显差异($P > 0.05$);噪声组的增殖指数低于对照组($P < 0.05$);复合刺激组刺激指数明显低于对照组($P < 0.01$),且与噪声组也存在差异($P < 0.05$,表1)。

2.3 外周血NK细胞杀伤活性 避水组与对照组的NK细胞杀伤活性无明显差异($P > 0.05$);而噪声组NK细胞杀伤活性低于对照组($P < 0.05$);复合刺激组NK细胞杀伤活性明显低于对照组($P < 0.01$),且与噪声组也存在差异($P < 0.05$,表1)。

3 讨论

临床研究表明,当人们在日常生活中遇到突发应激事件或长期处于一种应激状态,其患感染性疾病或肿瘤的机率会大大增加,表明遭受应激后,人体的免疫功能会受到一定程度的损害^[6,16-17]。对大学生和抑郁症患者的进一步临床研究发现,其外周血中的淋巴细胞对促细胞分化剂的增殖反应会降低,自然杀伤细胞的活性呈低调状态,外周血 γ 干扰素的含量减少。此外,在一些处于紧张性生活状态(如婚姻关系紧张、丧偶)中的人群也有类似的发现^[6-8]。因此,研究人体在应激条件下免疫系统出现的功能减退及其机制是当今医学研究中的重要课题。由于人较其他动物有其特殊性——思维的存在,所以人们往往更容易遭受来自心理方面的应激。因此,研究心理应激对人体的免疫功能的影响显得尤为重要。而单纯的心理应激很难建立较好的动物模型,与人相比很可能动物对来自心理应激远不如生理应激明显。一些精神应激模型如水迷宫、电刺激、束缚应激等并未排除人为施加的躯体因素,无法较好地模拟动物所处的自然状态,因此造成免疫指标受到一定程度的干扰。所以,我们采用了一种减弱避水试验^[5,9],并复合噪声应激(一种经典的躯体性刺激),通过比较单纯避水因素、单纯噪声因素以及避水复合噪声因素之间的差异,间接观察心理应激对免疫系统功能的影响。我们在细胞水平上选取了T/B淋巴细胞增殖试验和NK细胞杀伤活性的改变,来观察应激后免疫系统的变化。

既往对受躯体应激的动物进行研究发现,应激主要是通过HPA轴引起血中肾上腺皮质激素浓度的增高,从而引起动物生理的改变^[10-11]。此外还有儿茶酚胺、内源性阿片和一些神经肽的参与。应激对动物免疫功能的影响也是通过上

述途径, 包括T/B淋巴细胞. 已有报道表明, 通过放免配体结合研究发现, 在T/B淋巴细胞表面存在着多种神经肽及神经递质的受体, 这说明应激对T/B淋巴细胞功能的影响有着其物质基础^[12-15]. 因此本研究可以通过观察应激后大鼠T/B淋巴细胞对有丝分裂原的增殖反应来洞悉应激对免疫功能的影响. 研究表明, 大鼠受避水应激后, 其肠系膜淋巴结中的淋巴细胞对LPS刺激增殖反应与正常对照组无明显差异, 而单纯噪声组其淋巴细胞对LPS刺激增殖反应有明显减弱, 与以往文献报道相符. 对于避水+噪声复合组来说, 其淋巴细胞对LPS刺激增殖反应减弱最为明显, 与单纯噪声组相比, 其差异具有明显的统计学意义. 在应激后肠系膜淋巴结中的淋巴细胞对PHA的刺激增殖反应中, 也有类似的发现. 以上说明, 单纯避水因素不足以影响T/B细胞对致有丝分裂原的增殖反应, 但通过比较, 单纯噪声组与避水+噪声复合组之间淋巴细胞增殖反应的差异说明, 单纯避水因素在应激导致机体免疫功能降低中起着一种潜在的作用.

NK细胞是机体免疫系统的重要组成部分, 他主要执行天然免疫, 在抗感染性疾病及抗肿瘤中有其独特的生理功能, 因此检测应激对机体NK细胞杀伤活性的影响具有重要的意义. 既往的研究发现, NK细胞表面也存在着多种神经肽及神经递质的受体^[13-14]. 同时还发现, 他也能够合成多种神经肽及神经递质. 因此可以认为, 应激对NK细胞的功能也可能会有有一定的影响. 本部分研究以YAC细胞作为靶细胞检测了避水应激、单纯噪声以及避水+噪声复合刺激对大鼠外周血NK细胞杀伤活性的影响. 研究发现, 单纯避水应激组其NK细胞杀伤活性与正常对照组无明显差异, 而在单纯噪声组中, NK细胞的杀伤活性明显降低; 在避水+噪声复合组中, NK细胞的杀伤活性降低最为明显, 与其他各组均有显著差异. 通过比较, 单纯避水组、单纯噪声组及避水噪声复合组, NK细胞杀伤活性的差异再次印证了避水因素作为一种心理因素在应激对机体免疫功能的抑制中起着一种潜在的作用.

我们在建立大鼠避水应激模型的基础上, 探讨了应激对大鼠免疫系统功能的影响, 研究发现, 应激后大鼠肠系膜淋巴结中, 以B淋巴细胞为主的增殖反应和以T细胞为主的增殖反应, 噪声复合避水组明显减弱, 单纯噪声组次之, 避水组与对照组无显著差异, 对于应激后外周血

NK细胞杀伤活性的研究也有类似的发现. 以上结果说明, 单纯心理因素在应激对免疫系统抑制中起一种潜在的作用.

4 参考文献

- 1 Zhu XZ, Peng M, Yao SQ. Protective effect of HSP70 on gastric mucosal cells against apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12: 2605-2609
- 2 Chang XR, Peng N, Yi SX, Peng Y, Yan J. Effects of moxibustion on expression of HSP70 protein and mRNA in stress-induced gastric ulcer of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14: 1252-1256
- 3 Doongaji DR, Apte JS, Dutt MR, Thatte S, Rao M, Pradhan M. Measurement of psycho-social stress in relationship to an illness (a controlled study of 100 cases of malignancy). *J Postgrad Med* 1985; 31: 73-79
- 4 Bartrop RW, Luckhurst E, Lazarus L, Kiloh LG, Penny R. Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet* 1977; 1: 834-836
- 5 Enck P, Merlin V, Erckenbrecht JF, Wienbeck M. Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* 1989; 30: 455-459
- 6 Huot RL, Brennan PA, Stowe ZN, Plotsky PM, Walker EF. Negative affect in offspring of depressed mothers is predicted by infant cortisol levels at 6 months and maternal depression during pregnancy, but not postpartum. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1032: 234-236
- 7 Laumann-Billings L, Emery RE. Distress among young adults from divorced families. *J Fam Psychol* 2000; 14: 671-687
- 8 Sandler IN, Kim-Bae LS, MacKinnon D. Coping and negative appraisal as mediators between control beliefs and psychological symptoms in children of divorce. *J Clin Child Psychol* 2000; 29: 336-347
- 9 Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, Lamy CM, Ohning G, Fanselow M, Pothoulakis C, McRoberts JA, Mayer EA. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G42-53
- 10 Yang PC, Jury J, Soderholm JD, Sherman PM, McKay DM, Perdue MH. Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol* 2006; 168: 104-114
- 11 Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Fleshner M. Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1789-1795
- 12 Matera L, Mori M. Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 505-513
- 13 Schmid-Ott G, Jaeger B, Adamek C, Koch H, Lamprecht F, Kapp A, Werfel T. Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 171-177
- 14 Backstrom E, Chambers BJ, Kristensson K, Ljunggren HG. Direct NK cell-mediated lysis of syngenic dorsal root ganglia neurons *in vitro*. *J Immunol* 2000; 165: 4895-4900
- 15 van Tol EA, Verspaget HW, Hansen BE, Lamers CB.

■创新盘点

本文采用了一种弱化了避水实验, 并复合噪声应激(一种经典的躯体性刺激), 通过比较单纯避水因素、单纯噪声因素以及避水复合噪声因素之间的差异, 间接观察了心理应激对免疫系统功能的影响.

■应用要点

本研究中的避水因素作为一种心理因素在应激对机体免疫功能的抑制中起着一种潜在的作用,其机制的研究对临床心因性疾病的防治具有重要的借鉴价值。

- Neuroenteric peptides affect natural killer activity by intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1993; 42: 139-145
- 16 Miller TR. Psychophysiologic aspects of cancer: the James Ewing lecture. *Cancer* 1977; 39: 413-418
- 17 Goodfellow LM. The effects of therapeutic back massage on psychophysiologic variables and immune function in spouses of patients with cancer. *Nurs Res* 2003; 52: 318-328
- 18 Srikumar R, Parthasarathy NJ, Manikandan S, Narayanan GS, Sheeladevi R. Effect of Triphala on oxidative stress and on cell-mediated immune response against noise stress in rats. *Mol Cell Biochem* 2006; 283: 67-74

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 •

第三届亚洲大洋洲光生物学大会

本刊讯 由亚洲大洋洲光生物学学会发起,中国生物物理学会光生物学专业委员会负责承办的第三届亚洲大洋洲光生物学大会(<http://www.aosp2006.org.cn/>)定于2006-11-17/20在北京举行。会议将讨论和交流包括光化学、光物理、光技术、光感应、时间/节律生物学、光合作用、生物与化学发光、光医学、环境光生物学和紫外辐射效应在内的光生物学领域的所有重要进展,会议还将为与会的光生物学、光医学各个领域的物理学家、化学家、生物学家和临床医生提供相互交流的极好机会。会议可以办理国家 I 类继续教育学分10学分。

1 会议安排

会议时间: 2006-11-17报到, 18-20日会议; 会议地点: 北京西郊宾馆(五星级), 有关大会报告及15个分会邀请报告的内容请见会议网页<http://www.aosp2006.org.cn/>; 会议工作语言: 英语; 截止日期: (1)论文摘要: 2006-09-15; (2)会前注册: 2006-09-15。

2 会议联系人

投稿摘要: 魏舜仪, 100101, 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会(电话: 010-64889894; 传真: 010-64889892; E-mail: wsy@moon.ibp.ac.cn)。注册: 王悦, 100101, 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会(电话: 010-64889894; 传真: 010-64889892; E-mail: wangyue@sun5.ibp.ac.cn)。

超细胃镜在食管金属支架置放中的作用

王盛根, 王寿九, 涂金兰, 谷丽娟, 曾庆菊, 吴玉纯

王盛根, 王寿九, 谷丽娟, 曾庆菊, 南京医科大学友谊医院消化内镜室 江苏省南京市 210029

涂金兰, 南京市中大医院下关分院内镜室 江苏省南京市 210015

吴玉纯, 南京医科大学友谊医院放射科 江苏省南京市 210029

通讯作者: 王盛根, 210029, 江苏省南京市汉中南路146号, 南京医科大学友谊医院消化内镜室. wcm0605@163.com

电话: 025-86677902

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-07-10

Values of ultrathin gastroscopy in implantation of esophageal metal stents

Sheng-Gen Wang, Shou-Jiu Wang, Jin-Lan Tu, Li-Juan Gu, Qing-Ju Zeng, Yu-Chun Wu

Sheng-Gen Wang, Shou-Jiu Wang, Li-Juan Gu, Qing-Ju Zeng, Department of Digestive Endoscopy, Friendship Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Jin-Lan Tu, Department of Digestive Endoscopy, Xiaguan Branch of Nanjing Zhongda Hospital, Nanjing 210015, Jiangsu Province

Yu-Chun Wu, Department of Radiology, Friendship Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province

Correspondence to: Sheng-Gen Wang, Department of Digestive Endoscopy, Nanjing Medical University Friendship Hospital, 146 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wcm0605@163.com

Received: 2006-06-13 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To evaluate the values of ultrathin gastroscopy in the implantation of esophageal metal stents.

METHODS: Thirteen patients suffering dysphagia from late-stage esophageal or cardiac carcinomas (one of which was complicated with esophagotracheal fistula) and 1 patient with cardiac achalasia received the implantation of esophageal metal stents under Fujinon EG-270N5 ultrathin gastroscopy. Following the stricture was pre-dilated to 9 mm, the stent was implanted to an accurate level ensured by both controlling the calculated inserting depth of the stent conveyor and regulating the position of the upper end of the stent in conveyor under ultrathin gastroscopy without X-ray monitoring. The

success rate, accuracy, self-expanding, and complications of the implantation were observed.

RESULTS: The implantation of the stents was successfully performed in the accurate position with satisfactory self-expanding in all the patients, and the shortest diameter of the strictures was expanded from 2.73 ± 3.18 to 13.65 ± 1.66 mm. The esophagotracheal fistula was occluded by the stents. The grades of dysphagia were lowered from 3.15 ± 0.68 to 0.91 ± 0.49 .

CONCLUSION: The implantation of esophageal metal stents under ultrathin gastroscopy without X-ray monitoring is simple, accurate, safe, and effective, with good compliance of patients.

Key Words: Ultrathin electronic gastroscopy; Esophageal strictures; Dysphagia; Metal stent; Compliance

Wang SG, Wang SJ, Tu JL, Gu LJ, Zeng QJ, Wu YC. Values of ultrathin gastroscopy in implantation of esophageal metal stents. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2349-2353

摘要

目的: 观察超细胃镜在食管金属支架放置中的作用。

方法: 对13例晚期食管/贲门癌(其中1例伴食管-气管瘘)及1例贲门失弛缓并吞咽困难患者应用Fujinon EG-270N5超细电子胃镜进行金属支架放置。术中对狭窄预扩张至9 mm, 计算并控制输送器插入深度以及胃镜直视下调节输送器内支架上端位置以保证放置位置准确, 全程无X线监控。观察支架放置成功率、定位准确性、扩张效果以及并发症情况。

结果: 全部患者支架一次性放置成功, 定位准确; 自膨满意, 最狭窄处内径由 2.73 ± 3.18 mm扩至 13.65 ± 1.66 mm, 食管气管瘘被覆盖阻断。吞咽困难评级由 3.15 ± 0.68 降至 0.91 ± 0.49 。

结论: 单纯超细胃镜下食管金属支架放置术患者依从性好; 方法简便、准确、安全、有效。

■背景资料

内镜下置入是食管支架置放的常用方法之一, 超细胃镜对患者耐受性好, 而且容易通过肿瘤狭窄处, 国内已偶见用于置放食管金属支架, 但为数仅数例, 尚罕见专门报道。

■创新盘点

1 超细胃镜下置放食管支架前将狭窄预扩张至9 mm, 便于输送器通过; 扩张次数减少, 支架自膨不受影响。
2 输送器内支架长度减去狭窄长度的差的半数为输送器内支架应超出狭窄上、下端的长度。由此计算预定输送器插入深度和输送器内支架上端的放置位置, 可保证支架定位准确, 简便实用。

关键词: 超细胃镜; 食管狭窄; 吞咽困难; 支架; 依从性

王盛根, 王寿九, 涂金兰, 谷丽娟, 曾庆菊, 吴玉纯. 超细胃镜在食管金属支架置放中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2349-2353

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2349.asp>

0 引言

金属内支架置放对不能切除的晚期食管癌合并有吞咽困难者, 能有效改善其症状, 提高生活质量。目前的置放方法有3种: 内镜直视下置入、X线透视下置入以及两者联合下置入。前者具有操作简便、定位准确、易于调整及不需X线照射等优点。术中所用内镜目前一般均为普通电子胃镜, 操作中患者耐受性差, 且不易通过肿瘤狭窄处。超细胃镜对患者耐受性好, 而且容易通过肿瘤狭窄处^[1-3], 国内已偶见用于置放食管金属支架, 但为数仅数例^[3], 尚罕见专门报道。我们2005-04/2006-04应用Fujinon EG-270N5型超细胃镜放置国产记忆金属食管支架14例, 现将应用体会报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-04/2006-04因以下原因致吞咽困难要求置放支架的患者13例: 晚期食管癌8例, 贲门癌2例, 食管癌和贲门癌术后吻合口癌复发各2和1例。男9例, 女4例, 年龄55-76(平均62.6)岁。狭窄长度为4-9(平均 6.57 ± 2.35) cm。最狭窄处直径均在6 mm以下, 其中5.5 mm 1例, 3-4 mm 3例, 2-2.9 mm 6例, <2 mm 3例, 平均 2.73 ± 3.18 mm。位于食管上段2例(病灶上端距门齿均>20 cm), 中段6例, 下段5例。吞咽困难按以下分级: 0级, 正常吞咽; 1级, 能吞咽大部分固体食物; 2级, 能吞咽半流质食物; 3级, 只能进流质; 4级, 完全不能进食。上述患者中, 2级2例, 3级7例, 4级4例, 平均为 3.15 ± 0.68 级。另有1例患者, 女性, 31岁, 间歇性吞咽(包括饮水)困难伴进食后呕吐半年, 经食管钡餐和胃镜证实为贲门失弛缓, 该例患者拒绝扩张和注射等治疗, 要求直接置放支架。所用器械: Fujinon EG-270N5超细胃镜及相应冷光源; 莎氏(Savary-Gilliard)锥形硅胶食管扩张器一套; 莎氏探条专用导丝; 北京赫之缘镍钛记忆金属网状带膜支架, 直径18-20 mm。一般采用双喇叭型; 当病灶下端距贲门 ≤ 3 cm时或贲门癌狭窄患者用单喇叭型, 远端带防反流瓣, 由3瓣硅胶膜材料的鸭嘴形瓣膜

形成单向阀。上述支架近端开口均有特殊丝线串联, 内镜下用活检钳抽拉时可关闭开口即能移动和回收支架。相配套输送器的规格为25Fr, 由内芯、内鞘和外鞘组成。

1.2 方法 术前1 d行常规食管X线造影。常规查凝血机制、血常规和血型, 签署知情同意书。禁食6 h。术前15 min im 654-2 10 mg, 咽部利多卡因表面麻醉。检查方法同普通电子胃镜。插内镜通过狭窄, 观察其上、下端位置, 其间距为病变长度。继续插镜入胃后插导丝入胃。对狭窄严重内镜无法直接通过者, 在插导丝通过狭窄段后内镜循导丝通过; 仍不能通过者, 以5 mm探条扩张后再进镜完成上述目的。退出胃镜, 保留导丝。沿导丝插入9 mm探条扩张2-3 min, 退出探条, 保留导丝。选择支架长度 = 狭窄长度 + 4 cm(狭窄上、下端各长出2 cm), 将支架安装于输送器内。测量输送器内支架长度。输送器插入深度 = 狭窄下端距门齿距离 + (输送器内支架长度 - 狭窄长度) / 2。在输送器外鞘管上以其内支架下缘为起点测量该深度并作好标记。沿导丝插输送器至预定深度。插入胃镜寻找输送器内支架上缘, 其与内鞘交界处有一明显的颜色分界线可资确定(图1C)。直视下调节其位置, 使其距狭窄上端距离 = (输送器内支架长度 - 狭窄长度) / 2, 或距门齿的距离 = 狭窄上端距门齿距离 - (输送器内支架长度 - 狭窄长度) / 2。符合上述两项中任一条件, 均证实支架位置放置正确。固定内芯及内鞘, 逐渐向外拉外鞘释放支架。释放过程中亦可按上述方法予以及时调整。释放后, 退出输送器和导丝, 保留胃镜。胃镜进镜通过支架腔观察支架放置位置和膨胀情况以及有无并发症。位置不准确者, 可进一步调整。观察指标: (1) 胃镜通过狭窄情况; (2) 支架置放成功率, 支架释放后上下端位置或各自超出狭窄上下端的长度在预期范围内者定为成功; (3) 术后支架膨胀直径, 于术后当天或/和3 d摄X线胸部右斜位片, 观察支架位置, 测量支架直径; (4) 患者吞咽困难缓解情况; (5) 并发症情况。术后2 h可进温流质食物; 常规用抗生素3 d以防止食管黏膜破损致感染; 对症治疗。

2 结果

2.1 胃镜通过狭窄情况 在所有13例癌性狭窄患者中, 狭窄直径为5.5 mm的患者胃镜直接通过狭窄段入胃; 3例3-4 mm者, 1例胃镜可勉强通过, 2例经插导丝引导后缓慢进镜通过狭窄段

入胃; 6例2-3 mm者胃镜均需经插导丝引导后缓慢进镜, 其中4例通过, 剩余2例以及另外3例<2 mm者以5 mm探条扩张后通过. 不经预扩张或预扩张前胃镜通过狭窄率为61.54% (8/13).

2.2 支架置放成功率 所有患者均一次性放置成功.

2.3 术后支架膨胀情况 于支架释放完当时, 内镜下即可见支架上端逐渐膨胀; 之后, 进镜至支架腔内可见支架全程膨胀良好(图1D-F), 管腔最窄处内径除1例仅9 mm外, 其余达12.5-16(平均 13.65 ± 1.66) mm. 术后1-3 d进行了X线摄片, 经测量支架最窄处内径较术中所见更宽, 以术后3 d数据进行统计为13-18(平均 14.5 ± 1.69) mm. 术中唯一1例贲门失弛缓患者, 术后约1 h X线摄片支架最窄处内径为16 mm.

2.4 患者吞咽困难缓解情况 全部患者在置入支架后能进食流质与半流质, 1 wk后均能进软食. 吞咽困难由术前 3.15 ± 0.68 降至 0.91 ± 0.49 级($P < 0.01$).

2.5 术后并发症 (1)胸痛: 11例出现胸骨后疼痛, 多能忍受, 持续2-8 d, 其中2例需用止痛药; (2)出血: 狭窄扩张和支架置放后, 局部有一定出血, 但无大出血; (3)胃食管反流症状: 无或不明显; (4)支架堵塞: 于术后5和6 mo分别有1例患者因吞咽困难再发随诊, 经食管造影和胃镜检查诊断为支架上端再堵塞, 活检均为鳞状上皮慢性炎伴少量异型; (5)穿孔、支架移位和脱落: 未发生. 其中随访时间最长者为8 mo.

3 讨论

导丝顺利通过狭窄段并送入胃部是食管狭窄扩张和支架置放成功的前提. 然而晚期食管癌多存在局部狭窄或堵塞, 普通胃镜常难以通过狭窄段. 有一组21例食管癌患者行支架置放治疗, 扩张前17例胃镜无法通过^[4]; 另一组10例有梗阻症状的食管、贲门癌患者, 胃镜均无法通过^[5]. 因而导丝往往需盲插. 盲插过程中往往需反复试插, 易造成局部损伤出血, 甚至偶可造成假道, 为避免之, 须在X线下监控确认其顺利通过狭窄段入胃, 以确保后续插管扩张和支架置入的安全. 超细胃镜外径较普通胃镜明显缩小, 对不能通过普通胃镜的食管狭窄, 常能较顺利通过^[1-3]. 我们应用的超细胃镜插入部外径仅5.9 mm, 所观察的13例食管/贲门癌患者, 狭窄直径均在6 mm以下, 预扩张前胃镜通过狭窄率高达61.54%. 其中直径在4 mm以上者胃镜较顺

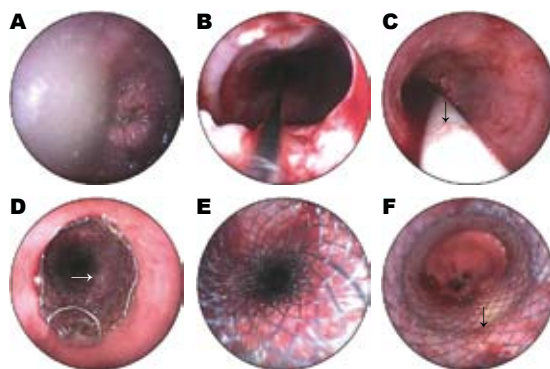


图1 女性, 70岁, 进行性咽下困难1 a, 饮水困难1 mo. A: 胃镜下见食管狭窄上端距门齿25 cm, 其上方食物潴留; B: 经活检钳道插入导丝并循之送镜通过狭窄段, 见狭窄下端距门齿31 cm, 在内镜直视下将导丝送入胃; C: 9 mm探条扩张后插入支架输送器, 内镜直视下测量并调整支架上端(箭头)至狭窄上端/门齿距离; D, E, F: 支架释放后内镜通过支架腔, 进一步目测狭窄上(D中箭头)、下端(F中箭头)至支架上、下端距离.

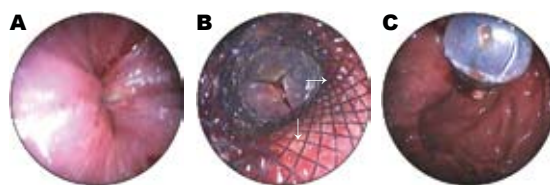


图2 男性, 58岁, 咽下困难, 确诊食管中段癌行放疗术后14 mo, 仅能进全流3 mo. A: 复查胃镜和活检示贲门-食管下段磷癌; B: 支架释放后胃镜进入支架下段腔内, 观察狭窄下端(箭头)至支架下端距离, 视野远处为防反流瓣; C: 进镜至胃腔反转观察支架下端及其周围情况.

利通过, 部分3-4 mm者可勉强通过. 理论上狭窄口径小于胃镜外径时, 胃镜应不能通过, 但操作中, 通过适当注气, 缓慢向前插、挤或旋镜可使胃镜通过, 尤其吻合口狭窄或狭窄段较短者, 这种方法容易成功. 在胃镜入胃后插导丝, 使这些患者完全避免了盲插导丝的不良作用. 3-4 mm者中大多数胃镜不能直接通过, 但经插导丝引导后采取上述进镜法可通过狭窄段. 这些患者在一定程度上也可避免盲插导丝的不良作用. 对内镜无法直接通过者要掌握好导丝的插入深度. 将胃镜端部固定于狭窄上方, 导丝前端插入狭窄上口时, 在活检孔道钮以外的导丝上以该钮口为起点测出等于以下长度的位置并标记: 40-狭窄上端距门齿距离+20-30 cm. 式中40代表贲门至门齿距离, 术后患者以吻合口距门齿距离代替之. 将导丝深插至此标记处. 狭窄下端位置的判定, 是狭窄长度计算的前提. 对普通胃镜常难以通过的晚期食管癌狭窄, 这种判定通常是在预扩张后进镜观察完成. 由于需多次扩张

■应用要点

超细胃镜常能较顺利通过普通胃镜难以通过的食管狭窄, 有助于准确测量狭窄长度, 在无X线监控下可对支架准确定位, 术中患者依从性好、方法简便、安全性高, 在食管狭窄支架置放中有实际应用价值.

■名词解释

超细胃镜: 为减少普通胃镜检查的不适, 近年胃镜的外径在逐渐缩小. 本文中胃镜外径为5.9 mm. 这种胃镜可经口, 也可经鼻插入, 故又称超细胃镜. 一般有2.0 mm的活检钳孔道, 能满足诊断与治疗需要, 尤其适用于上消化道狭窄性病变的诊断和治疗.

胃镜方能通过, 且多次扩张后病变部位多有出血造成视野欠清, 因此不利于快速准确判断. 超细胃镜由于易通过狭窄段, 多数不需经预扩张便可进镜观察, 较之普通胃镜视野更清晰, 判断更快捷准确.

支架长度的选择我们取病变长度+4 cm. 此长度为支架张开状态下的长度. 当装入输送器后因轴向压缩而延长, 释放后又按相应比例而回缩. 在决定输送器插入深度以及释放前镜下调节支架上端位置时要充分考虑这种变化. 延长或回缩的比例因支架材质类型而异, 有些支架的缩短率为23%, 30%, 或接近50%^[6]. 当缩短率或延长率已知时, 可计算具体的支架延长长度. 我们所用支架的产品说明中未见此比率的记载, 因而这种计算方法并不实用. 简单而实用的方法是对输送器内支架长度进行测量, 所得长度减去狭窄长度的差的半数即为输送器内支架应超出狭窄上、下端的长度. 由此可计算确定输送器插入深度和输送器内支架上端的正确放置位置. 将输送器插至预定深度, 即可保证支架下端位置的准确, 也可相应保证支架上端位置的准确. 但为确保之, 还须插入胃镜观察输送器内支架上端的位置是否准确. 由于支架与内鞘接口处存在色差, 同时由于镜身超细, 胃镜在狭窄上端以上的食管腔内有足够的进退和回旋空间, 很容易寻找该色差线进行判断和调节. 确认位置准确后可安全释放支架. 本组所有患者支架释放后均在镜下观察了支架上、下端距门齿的位置, 还观察了各自距狭窄上下端的距离(图1D, F). 由于超细胃镜具有良好的反转观察性能, 我们对贲门癌或术后吻合口狭窄患者所放的支架, 还常规进镜至胃腔反转, 可进一步目测支架下端超出狭窄下口的距离, 并观察支架下端是否顶住胃壁等情况(图2). 这些观察的结果表明, 所有支架放置位置均准确无误. 由此可见, 通过计算和控制输送器插入深度, 结合胃镜下调节输送器内支架上端的位置, 以及释放后对上下端位置的观察验证, 可保证支架位置放置正确. 整个放置过程无需X线的监控, 避免了术者和患者受X线的辐射, 减少了合作科室和人员的数量.

普通胃镜下食管支架置放过程中, 以下步骤需要胃镜介入: (1)插导丝; (2)扩张后观察狭窄下端位置; (3)支架定位和释放. 这3步需胃镜反复插入和退出, 即术中需插3次胃镜(经胃镜活检通道球囊预扩张者可2次), 患者的依从性较

差. 应用超细胃镜时, 由于多数情况下不需经扩张即可通过狭窄段而观察到狭窄下端位置, 因而前2次插镜可1次完成, 较普通胃镜减少了1次胃镜插入次数. 加之插入咽部的耐受性好^[1-3], 因而超细胃镜下食管支架置放术较普通胃镜下患者的依从性明显要好.

普通胃镜下置放支架前, 往往要将狭窄预扩张至10-12 mm以便内镜通过^[6], 要达此程度常需依次从细到粗反复扩张数次(最多时达4-5次). 与此不同, 本组预扩张的最终目的非为内镜通过作准备, 而在便于输送器的通过. 由于所用输送器的外径为25Fr(约8 mm), 因而仅需预扩张至稍大于此外径的程度, 如9 mm便能与之相适应. 在预扩张前有1个胃镜下通过狭窄段插导丝的过程, 此过程其实已将狭窄进行了1次胃镜镜身的扩张, 即已经扩张至镜身般粗细, 约6 mm. 在此基础上, 仅需以9 mm探条扩张1次即可. 对狭窄特别严重不能通过胃镜者, 则加1次上述胃镜通过前的5 mm探条预扩张. 显然, 不论超细胃镜首过能否通过狭窄段, 预扩张的次数均较普通胃镜下减少, 操作时间可相应缩短, 同时也可进一步增加患者的依从性. 预扩张至9 mm是否会影响到支架释放后的充分膨胀? 本组在术中于内镜下以及术后X线下对支架最窄处内径进行了观察. 在术中于支架释放完当时, 内镜下即可见支架全程膨胀良好, 最窄处内径达 13.65 ± 1.66 mm. 其中仅1例膨胀不良, 最窄处内径仅9 mm. 术后3 d内X线摄片测量的支架最窄处内径较术中所见进一步膨胀, 达 14.5 ± 1.69 mm, 上述术中膨胀不良的患者于术后3 d膨胀至15 mm. 另外, 对支架置放后患者吞咽困难的症候变化也进行了观察, 其吞咽困难分级明显下降, 症状明显缓解. 由此可见, 预扩张至9 mm的程度能达到使支架充分膨胀的作用.

食管支架置放后常发生胸痛^[6], 本组有11例出现, 但多能忍受. 胃食管反流为另一常见并发症, 尤其位于食管下段和贲门部位病变者, 采用防反流瓣支架具有良好的抗反流作用^[5]. 本组这些部位的患者均采用了防反流瓣支架, 术后未出现反流症状. 另一常见并发症为出血. 本组患者于狭窄扩张和支架置放后, 局部有一定出血, 但无一例发生大出血. 所有患者均未发生穿孔和支架脱落、移位等严重并发症. 这表明, 单纯超细胃镜下食管金属支架放置术除上述患者依从性好、方法简便、准确有效等优点外, 尚具有很好的安全性.

4 参考文献

- 1 许国铭, 姚银珍, 田青, 王娜, 湛选保, 孙振兴. 鼻胃镜(GIF-N230)临床应用的初步报告. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 86-87
- 2 姜贵君, 刘彩越, 林朝智. 鼻胃镜经口临床应用1020例. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 113
- 3 戈之铮, 胡运彪, 李晓波, 薛寒冰, 高云杰, 宋燕. 新型超细胃镜临床应用的初步评价. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 412-414
- 4 熊小强, 朱兆华, 文卓夫. 内镜下放置食管带膜镍钛记忆金属支架姑息治疗晚期食管癌疗效观察. 癌症 2000; 19: 1027-1029
- 5 许国铭, 李兆申, 王娜, 谢苏庆, 尹宁. 一种新型防反流型食管支架及其临床应用. 第二军医大学学报 1998; 19: 405-407
- 6 钟捷, 吴云林. 食管金属支架演进及临床应用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 797-800

■同行评价

本文探讨了超细胃镜在放置食管支架中的应用, 具有一定的临床价值.

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年第十二届华北区消化学术会议征文通知

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

1 征文内容

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

2 征稿要求

来稿要求是未在国内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.

应用SELDI-TOF-MS技术建立肝癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型

刘池波, 潘春琴, 孙灵芬

■背景资料

表面增强激光解析电离(SELDI-TOF)蛋白质芯片技术是2002年提出出来的一项新兴的蛋白质组学研究技术,已经引起了学术界的高度重视。在生物学和临床医学等方面具有广泛的应用前景。利用蛋白质芯片具有高度并行性、高通量、微型化和自动化等其他方法无法比拟的优越性,在病理学、药理学和毒理学等方面初步取得了卓越的研究成果。

刘池波, 潘春琴, 孙灵芬, 浙江省台州市立医院 浙江省台州市 318000

通讯作者: 刘池波, 318000, 浙江省台州市椒江区中山路381号, 浙江省台州市立医院. liuchibo@56.com

电话: 0576-8858213 传真: 0576-8858284

收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-07-11

Establishment of serum protein pattern model for screening hepatocellular carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Chi-Bo Liu, Chun-Qin Pan, Ling-Fen Sun

Chi-Bo Liu, Chun-Qin Pan, Ling-Fen Sun, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Chi-Bo Liu, Taizhou Municipal Hospital, 381 Zhongshan Road, Jiaojiang District, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China. liuchibo@56.com
Received: 2006-06-20 Accepted: 2006-07-11

Abstract

AIM: To establish a serum protein pattern model for screening hepatic cellular carcinoma.

METHODS: The proteomic spectra of patients with hepatic cellular carcinoma, hepatic cirrhosis, and healthy people were obtained by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) on WCX2 chips. The collected data were compared and analyzed by Biomarker Wizard software.

RESULTS: A group of proteomic peaks were detected. The expression of five protein molecules (4477, 8943, 5181, 8617, 13 761 Da) in patients with hepatic cellular carcinoma was significantly higher than those in the controls, and the expression of 4477- and 13 761-Da proteins were higher while the 4097-Da one was lower in HCC patients than cirrhosis ones. The specificity and sensitivity of SELDI-TOF-MS were 100% (60/60) and 90% (18/20), respectively. Four protein molecules (4477, 8943, 13 761, 4097 Da) were

screened as a proteomic model.

CONCLUSION: The discovered serum protein pattern model can efficiently identify patients with or without hepatocellular carcinoma. SELDI-TOF-MS plays a valuable role in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and the discovery of new tumor-specific protein biomarkers.

Key Words: Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; Protein Chip; Hepatocellular carcinoma

Liu CB, Pan CQ, Sun LF. Establishment of serum protein pattern model for screening hepatocellular carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2354-2357

摘要

目的: 建立肝癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型。

方法: 用表面加强激光解析电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)及WCX2蛋白芯片获得新发肝癌、肝硬化患者和正常人血清的蛋白质指纹图谱,用计算机软件进行比较分析,建立肝癌的筛选模型。

结果: 肝癌患者与健康对照组血清蛋白质指纹图谱之间有5个标志蛋白(4477, 8943, 5181, 8617, 13 761 Da)在肝癌患者血清中高表达,肝癌患者与肝硬化患者血清蛋白质指纹图谱之间2个标志蛋白(4477, 13 761 Da)在肝癌患者血清中高表达,1个标志蛋白(4097 Da)在肝癌患者血清中低表达。SELDI-TOF-MS技术的特异性(60/60, 100%); 敏感度(18/20, 90%)。分析系统筛选出4477, 8943, 13 761, 4097 Da标志蛋白建立的肝癌诊断模型。

结论: 建立的血清蛋白质指纹图谱模型能够区分肝癌与非肝癌患者, SELDI-TOF-MS在肝癌的诊断及肿瘤特异性蛋白质生物标志分子的筛选等方面具有一定价值。

关键词: 表面增强激光解析电离飞行时间质谱; 蛋白芯片; 肝癌

刘池波, 潘春琴, 孙灵芬. 应用SELDI-TOF-MS技术建立肝癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2354-2357

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2354.asp>

0 引言

肝癌为我国常见的恶性肿瘤之一, 肝癌的早期诊断较为困难, 我们利用美国CIPHERGEN公司生产的表面增强激光解吸离子化时间飞行质谱(surface enhanced laser desorption/ionization)技术对肝癌患者和肝硬化、健康志愿者血清中的蛋白质进行对比分析, 采用生物信息学方法建立可作为肝癌诊断标志的蛋白质组合样式, 寻求可用于临床肝癌早期诊断的特异性生物标记物。

1 材料和方法

1.1 材料 所有肝癌血清样品均为2003-08/2004-06台州市立医院的门诊、住院患者, 40例, 其中男30例, 年龄45-60岁; 女10例, 年龄55-64岁, 经病理证实的肝细胞性肝癌患者。对照样品来自健康查体正常的健康志愿者60例, 其中男40例, 年龄50-68岁; 女20例, 年龄50-65岁和经肝穿活检为肝硬化患者20例, 年龄35-45岁。在10 mL血清分离管中全血采集, 4000 r/min条件下离心10 min。取30 μ L血清分装在0.5 mL离心管中, 于-70℃冰箱保存。美国赛弗吉公司(CIPHERGEN Biosystems, Inc.)的表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱仪(Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-time OF Flight-Mass Spectrometry, SELDI-TOF-MS)及该公司配套WCX2 (Weak Cationic Exchanger, 弱阳离子交换)芯片。主要试剂: 尿素、乙腈、三氟乙酸等均购自Sigma公司, SPA (Sinapinic Acid)购自CIPHERGEN Biosystems公司。U9缓冲液(9 mol/L Urea, 20 g/L CHAPS, 10 g/L DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0), U1缓冲液(用50 mmol/L Tris-HCl缓冲液9倍稀释U9缓冲液), WCX2缓冲液(100 mmol/L乙酸钠pH 4.0)。

1.2 方法 血清经冰浴融解后4℃ 20 000 r/min离心10 min。取20 μ L血清, 加30 μ L U9缓冲液, 4℃振荡20 min, 再加100 μ L U1缓冲液, 4℃振荡30 min。每个芯片中加150 μ L WCX2缓冲液, 振荡孵育5 min 2次。从上述蛋白变性后的血清样品中取50 μ L, 加200 μ L WCX2缓冲液稀释,

表 1 肝癌的5个特征峰的表达值

m/z	肝癌 平均值	肝癌 标准差	正常 平均值	正常 标准差	P值
8943	9.29	7.19	1.05	0.39	3.1×10^{-7}
8617	4.61	1.75	1.41	1.23	3.1×10^{-6}
4477	1.20	0.65	0.30	0.10	5.4×10^{-5}
13 761	0.62	0.34	0.22	0.15	4.4×10^{-5}
8151	3.78	3.01	1.06	0.44	3.6×10^{-4}

加至WCX2芯片的Bioprocessor (CIPHERGEN公司)中, 振荡60 min, 甩去血清标本, 每孔加150 μ L WCX2缓冲液, 振荡孵育5 min 2次, 最后芯片用20 mmol/L HEPES (pH 7.4)淋洗, 晾干芯片。芯片每孔分2次加SPA 0.5 μ L, 2次之间自然晾干。质谱仪参数设定为激光强度220, 灵敏度7, 优化范围800-20 000质荷比(m/z)。每条芯片取1点用同一正常人血清作内参照, 芯片间CV $\leq$ 10%。检测前用ALL-IN-ONE多肽标准芯片校正, 系统质量偏差 $\leq$ 0.1%。原始数据先以ProteinChip 3.0软件校正。

统计学处理 采用CIPHERGEN ProteinChip软件和BioMarker Wizard软件对芯片检测得到的蛋白质相对含量及蛋白质质荷比数据按数据挖掘要求进行处理。用Biomarker Wizard Software3.1软件和Biomarker Patterns Software4.0.1软件对数据进行分组及相关性分析。比较2组之间蛋白质峰强度, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组与健康志愿者组比较 对100例样本检测到的质谱图进行分析比较, 共得到蛋白质峰为68个, 其中发现4477, 8943, 5181, 8617, 13 761 Da这5个蛋白质峰具有显著性差异, 且这5个蛋白质均为肝癌患者高于健康志愿者(表1)。通过4477, 8943 Da这2个蛋白质峰建立肝癌蛋白质谱模型可用于区分肝癌与健康志愿者(图1)。此结果表明, 该方法的灵敏度为90% (18/20), 特异性为100% (60/60)。

2.2 肝癌组与肝硬化组比较 分别对实验中的60例样本检测到的质谱图进行分析比较, 共得到蛋白质峰为46个, 其中4477, 13 761, 4097 Da这3个蛋白质峰具有显著性差异。其中在4477, 13 761 Da峰处肝癌的患者均比肝硬化高, 4097 Da峰处肝癌的患者均比肝硬化低, 通过4477 Da这个蛋白质峰即可区分肝癌与肝硬化患者(图2)。

■创新盘点

本文应用SELDI-TOF-MS技术分析肝癌、肝硬化、正常人之间所引起的蛋白质组学的变化, 为临床诊断、治疗提供依据, 同时探索SELDI技术在肿瘤诊断方面的应用, 以便深入分析肿瘤的发生与发展。

■应用要点

本文为肝癌临床诊断提供依据,并可为肝癌预防、术后疗效观察等提供有效措施。

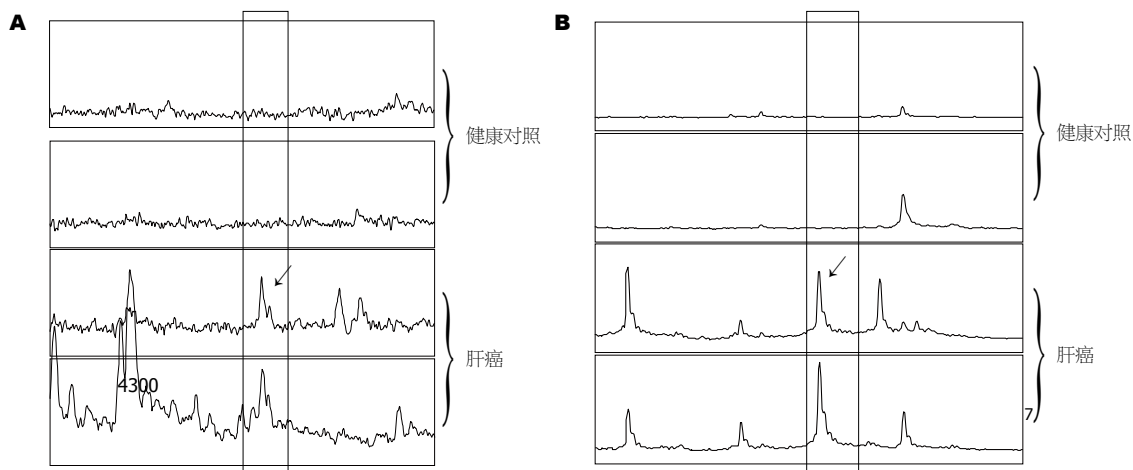


图1 肝癌与健康志愿者的血清蛋白质谱图. A: 质荷比4477 Da; B: 质荷比8943 Da.

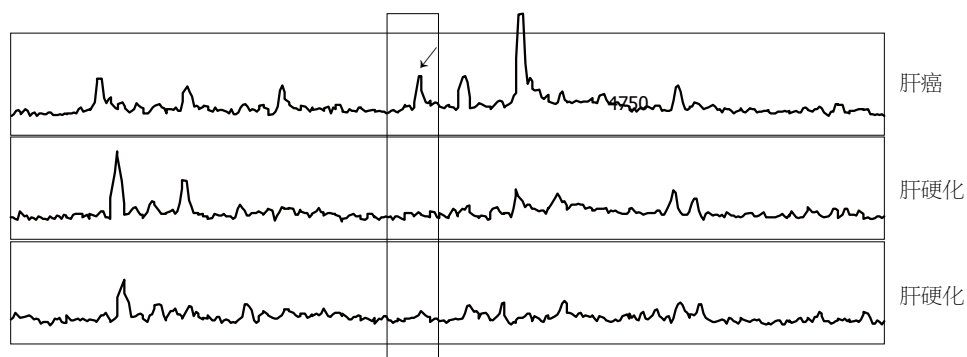


图2 肝癌与肝硬化患者的血清蛋白质谱图. 质荷比为4477 Da.

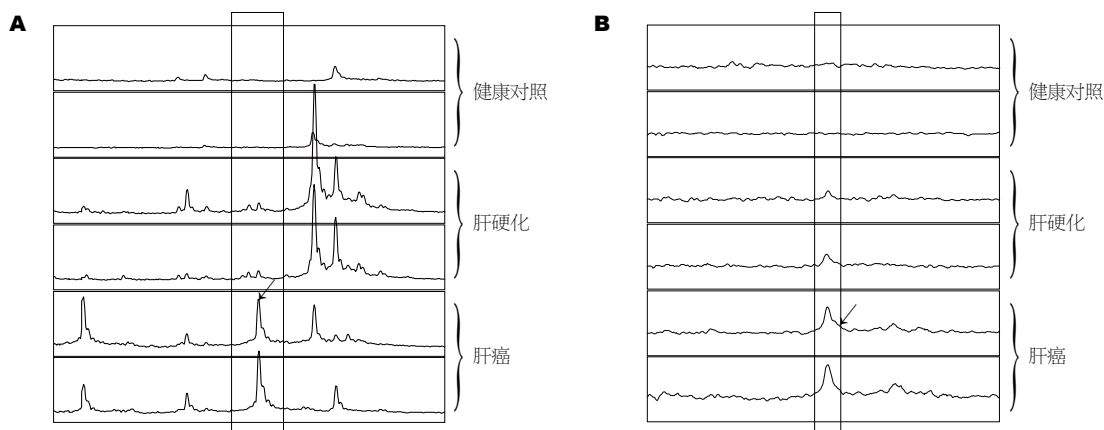


图3 肝癌和肝硬化、健康志愿者的其他表达血清蛋白质谱图. A: 质荷比为8943 Da; B: 质荷比为13 761 Da.

同时发现肝癌、肝硬化、健康志愿者3者之间有8943, 13 761 Da这2个蛋白质随着病情的严重程度逐渐增加(图3)。

3 讨论

目前临床上常用AFP作为肝癌的诊断指标,但AFP对肝癌诊断阳性率一般为60%-70%,且在原发性肝癌诊断中也存在假阳性,因此缺乏可靠

的早期诊断指标是其预后较差的主要原因。

蛋白质组学研究的主要技术是双向电泳和质谱等,虽然双向电泳的技术很成熟,但他复杂的实验过程和大量的样本需求不适应大规模的标本检测,限制了双向电泳直接用于临床检测。SELDI蛋白芯片技术根据层析技术和质谱技术发展而来,其表面可结合特定的蛋白质。该技术不会破坏所测定的蛋白质,检测简便,特异性和

敏感性高,且可将传统方法检测不到的蛋白和多肽检出。对照分析患者和健康志愿者的质谱图,可发现和捕获新的特异性疾病相关蛋白。目前,用SELDI蛋白芯片技术获得有意义成果的数量已经日益升高^[1-4]。尤其在一些癌症的诊断上,如前列腺癌^[1]、卵巢癌^[5]、乳腺癌^[6]的诊断上。从血清中寻求特异性生物标记物用于肝癌等诊断是目前临床急需解决的难题。本研究采用SELDI-TOF-MS技术通过比较蛋白质组学研究发现一些敏感性和特异性均较高,且易于临床检测的诊断方法。我们采用WCX2蛋白质芯片对40例肝癌患者和60例健康志愿者及20例肝硬化患者的血清样本进行了蛋白质谱分析,通过Biomarker Wizard分析显示,在肝癌与健康志愿者两组之间以4477, 8943 Da这2个蛋白质建立模型可用于区分肝癌患者与健康志愿者。所得结果敏感性为90%,特异性为100%。在肝癌组与肝硬化组中4477 Da只在肝癌组中高表达,而在肝硬化组中没有出现。同时发现肝癌、肝硬化、健康志愿者3者之间有8943, 13 761 Da这2个蛋白随着病情的严重程度逐渐增加,通过这几个峰的鉴别,其结果准确性高,有利于患者免于肝穿的痛苦。

本实验将SELDI技术应用于分析肝癌患者血清差异表达蛋白,发现了几种新的肝癌相关蛋白质,对肝癌的早期诊断有一定的价值。对于SELDI技术来说,每个m/z值对应的可能是很多分子量相近的多肽,因此不能对体液中的蛋白质进行鉴定^[7],故该蛋白质的结构、功能及是否

是已知蛋白等均不清楚,需要在下一步的实验中予以解决:通过质谱技术,分析该蛋白质的多肽片段得到其肽指纹图,在蛋白质数据库中搜寻与之匹配的蛋白质。

4 参考文献

- 1 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609-3614
- 2 Weinberger SR, Boschetti E, Santambien P, Brenac V. Surface-enhanced laser desorption-ionization retentate chromatography mass spectrometry (SELDI-RC-MS): a new method for rapid development of process chromatography conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 782: 307-316
- 3 Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmasso EA, Fu S, Pham T, Mei J, Ho JJ, Zhang W, Lopez P, Ho DD. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 2002; 298: 995-1000
- 4 Bane TK, LeBlanc JF, Lee TD, Riggs AD. DNA affinity capture and protein profiling by SELDI-TOF mass spectrometry: effect of DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e69
- 5 Bandera CA, Ye B, Mok SC. New technologies for the identification of markers for early detection of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15: 51-55
- 6 Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, Tsangaris T, Magnant C, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers* 2001; 17: 301-307
- 7 Boguski MS, McIntosh MW. Biomedical informatics for proteomics. *Nature* 2003; 422: 233-237

■同行评价

本文采用较先进的检测技术,病例组、对照组设置合理,有足够的例数,结果有一定的可信度,有新的发现,能提出自己的观点,有一定价值。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

肝转移介入治疗前后CT容积测量的价值

戴洪修, 鲁 际, 周建雄, 谷家林, 刘卫红, 肖治明, 李海涛

■背景资料

肝转移瘤因为肝脏基础较好, 介入治疗结果比原发性肝癌更为肯定。肝转移瘤经动脉化疗栓塞(TACE)已成为常规治疗手段。CT测量是确定实体肿瘤疗效的重要评价方法。一维(直径)和二维(面积)测量简单实用, 但不能全面反映肿瘤在治疗前后的变化。

戴洪修, 三峡大学第一临床医学院医学影像系 湖北省宜昌市 443003

鲁际, 周建雄, 刘卫红, 肖治明, 李海涛, 湖北省宜昌市中心人民医院放射科 湖北省宜昌市 443003

谷家林, 当阳市人民医院放射科 湖北省当阳市 443000

通讯作者: 戴洪修, 443003, 湖北省宜昌市夷陵路127号, 湖北省宜昌市中心人民医院放射科, daihongxiu222@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-04-26 接受日期: 2006-05-24

Computed tomography volumetric evaluation of treatment response in patients with liver metastases for interventional therapy

Hong-Xiu Dai, Ji Lu, Jian-Xiong Zhou, Jia-Lin Gu, Wei-Hong Liu, Zhi-Ming Xiao, Hai-Tao Li

Hong-Xiu Dai, Department of Medical Imaging and Radiological Sciences, the First Clinical College of China Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China
Ji Lu, Jian-Xiong Zhou, Wei-Hong Liu, Zhi-Ming Xiao, Hai-Tao Li, Department of Radiology, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, Hubei Province, China
Jia-Lin Gu, Department of Radiology, Dangyang People's Hospital, Dangyang 443000, Hubei Province, China
Correspondence to: Hong-Xiu Dai, Department of Radiology, the First Clinical College of China Three Gorges University and Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, Hubei Province, China. daihongxiu222@yahoo.com.cn

Received: 2006-04-26 Accepted: 2006-05-24

Abstract

AIM: To compare unidimensional, bidimensional computed tomography (CT), and volumetric techniques for evaluation of therapeutic response in patients with liver metastases from breast and colon carcinoma.

METHODS: Helical CT performed in 22 patients with liver metastases before and 3 mo after interventional treatment. All lesions were measured on transverse CT scans with electronic calipers according to both unidimensional and bidimensional criteria. Volumetric measurements were made by tracing individual lesions, and measurements of individual lesion were summed to obtain patient response, which were categorized as complete response, partial response, disease

progression, and disease stabling (size response other than that of complete response, partial response, or disease progression).

RESULTS: Of the 22 patients, the coincidence rate of unidimensional and bidimensional measurements was 95.5% (21/22). Volumetric measurement gave results different from those obtained by unidimensional and bidimensional techniques in 8 and 6 patients, respectively. In 4 patients with partial responses according to unidimensional and bidimensional criteria, the response based on the volumetric technique was disease stabling. In 2 patients with stable disease in terms of bidimensional and unidimensional criteria, partial response was observed by volumetric measurement. In 2 patients with disease progression based on bidimensional and unidimensional criteria, stabled disease was found by volumetric criteria.

CONCLUSION: Volumetric measurement for tumors produces results different from unidimensional or bidimensional techniques in a considerable proportion of patients.

Key Words: Liver neoplasms; Metastases; Computed tomography; Interventional therapy

Dai HX, Lu J, Zhou JX, Gu JL, Liu WH, Xiao ZM, Li HT. Computed tomography volumetric evaluation of treatment response in patients with liver metastases for interventional therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(23):2358-2360

摘要

目的: 比较一维、二维CT和容积测量三种方法测量肝转移介入治疗的效果。

方法: 22例肝转移的患者, 在介入治疗前和术后3 mo行螺旋CT扫描。在CT工作站分别按一维和二维测量横断层面的全部病灶。用容积测量技术去追踪测量每个病灶, 将每个病灶的总和归类于全效、部分有效、病变进展、病变稳定。

结果: 在22例肝转移介入治疗前后一维与二

维测量符合率达95.5%(21/22), 但容积测量8例与一维测量不符, 6例与二维测量不符. 4例一维和二维测量结果均为部分有效, 而容积测量结果为病变稳定. 2例一维和二维测量病变稳定者, 容积测量则为部分有效. 甚至有2例一维、二维测量为病变进展者, 容积测量仍为病变稳定.

结论: 在肝转移瘤介入治疗前后, 肿瘤容积测量结果在大多数患者与一维、二维测量结果不一致. 若要证实容积测量的优势, 还需要大样本的临床对照研究.

关键词: 肝脏肿瘤; 转移瘤; 计算机断层扫描; 介入治疗

戴洪修, 鲁际, 谷家林, 周建雄, 刘卫红, 肖治明, 李海涛. 肝转移介入治疗前后CT容积测量的价值. 世界华人消化杂志 2006;14(23):2358-2360

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2358.asp>

0 引言

肝转移因为肝脏基础较好, 介入治疗结果比原发性肝癌更为肯定^[1-4]. 在国内外大型综合医院, 肝转移经动脉化疗栓塞(TACE)已成为常规治疗手段. CT测量是确定实体肿瘤疗效的重要评价方法^[5-15]. 一维(直径)和二维(面积)测量简单实用, 但不能全面反映肿瘤在治疗前后的变化. 最近有作者^[5-10]提倡利用螺旋CT容积处理技术, 使肿瘤容积完全量化, 更能客观地反映肿瘤变化. 我院于1997年引进1250MA数字减影血管造影机, 1999年引进4排螺旋CT, 拥有较先进的数字化成像能力. 我们收集22例肝转移介入治疗前后CT资料, 利用CT工作站, 测量肿瘤容积, 并与肿瘤直径和面积测量结果相比较.

1 材料和方法

1.1 材料 肝转移患者22例, 男16例、女6例, 年龄39-78(平均56)岁. 原发肿瘤为直肠癌12例, 乳腺癌6例, 肺癌4例. 经股动脉插管至肝动脉, 行肝动脉造影确定肿瘤染色的数目、大小和部位. 导管固定于肝固有动脉, 注入二联或三联化疗药, 常用的有阿霉素、丝裂霉素、5-Fu等. 然后用3F微导管分别超选肝左、右动脉, 注入超液态碘油加化疗药混悬剂, 栓塞各个肿瘤. 对供血丰富者, 加用明胶海绵颗粒栓塞肿瘤供血动脉TAE术. 每月重复1次.

1.2 介入治疗前后22例患者均在美国GE公司

LightspeedQX/I四层螺旋CT机完成平扫和增强检查. 一次屏气完成全肝扫描. 扫描的解层面、角度等技术参数在治疗前后完全一致. 术前CT在1 wk内, 术后为3 mo CT复查. CT测量利用一维、二维和容积3种方法. 测量结果按世界卫生组织标准^[3]将患者分为4组: 全效(临床治愈), 部分有效, 病变稳定和病变进展. 全效指病灶完全消失; 部分有效指肿瘤容积减少65%以上; 病变稳定则指肿瘤容积减少不到65%, 增加不到73%. 病变进展指肿瘤容积增加73%以上; 3种测量方法在每一例患者中进行比较, 并按各自标准归类.

2 结果

一维与二维测量符合率达95.5%(21/22). 容积测量结果有8例与一维测量不一致(8/22, 36%), 有6例(6/22, 28%)与二维测量不一致. 4例一维和二维测量结果均为部分有效, 而容积测量结果为病变稳定. 2例一维和二维测量病变稳定者, 容积测量则为部分有效. 甚至有2例一维、二维测量为病变进展者, 容积测量仍为病变稳定. 22例CT资料显示, 绝大多数病灶为边界清楚的圆形病灶. 导致测量结果不一致的因素, 包括病灶多发, 不对称生长或缩小.

3 讨论

肝转移介入治疗实际上也是一种化疗^[1-4], 评价其治疗效果的方法包括临床、实验室和影像学检查. 影像学的进步, 如螺旋CT和高场强MR, 可以提供治疗前后的肿瘤容积三维测量^[5-15]. 本组研究结果提示, 肝转移瘤在介入治疗前后, 肿瘤直径和面积测量符合率高达95.5%(21/22); 而肿瘤容积测量与前2种方法不符合者多达1/3. 从理论上讲, 肿瘤的容积测量肯定比直径、面积测量更为准确. 当然, 这需要临床结果来证实. 由于本组患者例数少, 随访时间不长, 尚不能作出全面的评价. 关于肿瘤容积测量目前仍有很多争议^[5-10]. 容积测量对那些融合性、多发性、不规则性肝转移比较准确. 但也有他的缺点, 如追踪每个肿瘤容积相当费时, CT工作站重装容积测量软件, 对非球形病灶须运用不同的记算公式等. 高档螺旋CT和MR都具备这种自动处理图像和容积计算的能力, 放射医生只需要修正一下图像处理后的肿瘤边缘部分. 我们相信肿瘤容积测量是判断肝转移介入治疗效果最准确和最客观的方法, 并在这方面做了一些尝试. 但本研究样本太少, 又是同一器官肿瘤

■应用要点

本组研究结果提示: 肝转移瘤在介入治疗前后, 肿瘤直径和面积测量符合率高达95.5%(21/22); 而肿瘤容积测量与前两种方法不符合者多达1/3. 从理论上讲, 肿瘤的容积测量肯定比直径、面积测量更为准确.

■同行评价

本文利用CT工作站比较一维、二维CT和容积测量三种方法测量转移性肝癌介入治疗的效果。内容有一定新颖性,对转移性肝癌临床介入治疗效果有一定的价值和指导意义。

的比较,未与临床结果对照,绝大多数转移瘤为规则的圆形,因此本研究结果不适合那些不规则性、边界不清楚的转移瘤。总之,肝转移在介入治疗前后CT容积测量比较肿瘤直径和面积测量有很大差异。CT容积测量的价值还需要大样本的临床结果来证实。

4 参考文献

- 1 Patel K, Sullivan K, Berd D, Mastrangelo MJ, Shields CL, Shields JA, Sato T. Chemoembolization of the hepatic artery with BCNU for metastatic uveal melanoma: results of a phase II study. *Melanoma Res* 2005; 15: 297-304
- 2 Lorenz K, Brauckhoff M, Behrmann C, Sekulla C, Ukkat J, Brauckhoff K, Gimm O, Dralle H. Selective arterial chemoembolization for hepatic metastases from medullary thyroid carcinoma. *Surgery* 2005; 138: 986-993; discussion 993
- 3 Morise Z, Sugioka A, Kato R, Fujita J, Hoshimoto S, Kato T. Transarterial chemoembolization with degradable starch microspheres, irinotecan, and mitomycin-C in patients with liver metastases. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 249-258
- 4 Melichar B, Voboril Z, Nozicka J, Cerman J Jr, Melicharova K, Mergancova J, Filip S, Krajina A, Voboril R, Jandik P. Hepatic arterial infusion chemotherapy in sarcoma liver metastases: a report of 6 cases. *Tumori* 2005; 91: 19-23
- 5 Krakora GA, Coakley FV, Williams G, Yeh BM, Breiman RS, Qayyum A. Small hypoattenuating hepatic lesions at contrast-enhanced CT: prognostic importance in patients with breast cancer. *Radiology* 2004; 233: 667-673
- 6 Khalil HI, Patterson SA, Panicek DM. Hepatic lesions deemed too small to characterize at CT: prevalence and importance in women with breast cancer. *Radiology* 2005; 235: 872-878
- 7 Tran LN, Brown MS, Goldin JG, Yan X, Pais RC, McNitt-Gray MF, Gjertson D, Rogers SR, Aberle DR.

Comparison of treatment response classifications between unidimensional, bidimensional, and volumetric measurements of metastatic lung lesions on chest computed tomography. *Acad Radiol* 2004; 11: 1355-1360

- 8 Hauth EA, Statta J, Forsting M. Comparison of unidimensional and bidimensional measurement to assess therapeutic response in the treatment of solid tumors. *Radiology* 2006
- 9 Zacharia TT, Saini S, Halpern EF, Sumner JE. CT of colon cancer metastases to the liver using modified RECIST criteria: determining the ideal number of target lesions to measure. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186: 1067-1070
- 10 Aberle DR, Chiles C, Gatsonis C, Hillman BJ, Johnson CD, McClellan BL, Mitchell DG, Pisano ED, Schnall MD, Sorensen AG. Imaging and cancer: research strategy of the American College of Radiology Imaging Network. *Radiology* 2005; 235: 741-751
- 11 Farraher SW, Jara H, Chang KJ, Hou A, Soto JA. Liver and spleen volumetry with quantitative MR imaging and dual-space clustering segmentation. *Radiology* 2005; 237: 322-328
- 12 Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Woitaschek D, Mack MG. Malignant liver tumors treated with MR imaging-guided laser-induced thermotherapy: experience with complications in 899 patients (2,520 lesions). *Radiology* 2002; 225: 367-377
- 13 Gradishar WJ, Meza LA, Amin B, Samid D, Hill T, Chen YM, Lower EE, Marcom PK. Capecitabine plus paclitaxel as front-line combination therapy for metastatic breast cancer: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2321-2327
- 14 Shankar S, vanSonnenberg E, Desai J, Dipiro PJ, Van Den Abbeele A, Demetri GD. Gastrointestinal stromal tumor: new nodule-within-a-mass pattern of recurrence after partial response to imatinib mesylate. *Radiology* 2005; 235: 892-898
- 15 戴洪修, 谷家林, 鲁际, 周建雄, 刘卫红, 肖治明, 李海涛. 良恶性胃壁增厚的CT鉴别. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2886-2888

电编 李琪 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

Natural Science Foundation of China, No.30224801
通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@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: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号。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

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈仕珠 主任医师
解放军第四五一医院感染科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

龚国忠 教授
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

管冬元 副教授
上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

黄金华 副教授
中山大学肿瘤医院影像介入科

季国忠 副教授
南京医科大学第二附属医院消化科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

林勇 讲师
上海长征医院消化内科

刘彬彬 副研究员
复旦大学附属中山医院

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属四院消化病诊疗中心

禄韶英 主治医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科11病区

牛建昭 教授
北京中医药大学

潘兴华 副主任医师
成都军区昆明总医院病理实验科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院院长办

唐霓 副研究员
重庆医科大学

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

杨冬华 教授
暨南大学附属第一医院

喻荣彬 副教授
南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张军 教授
西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

张绪清 副教授
第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科