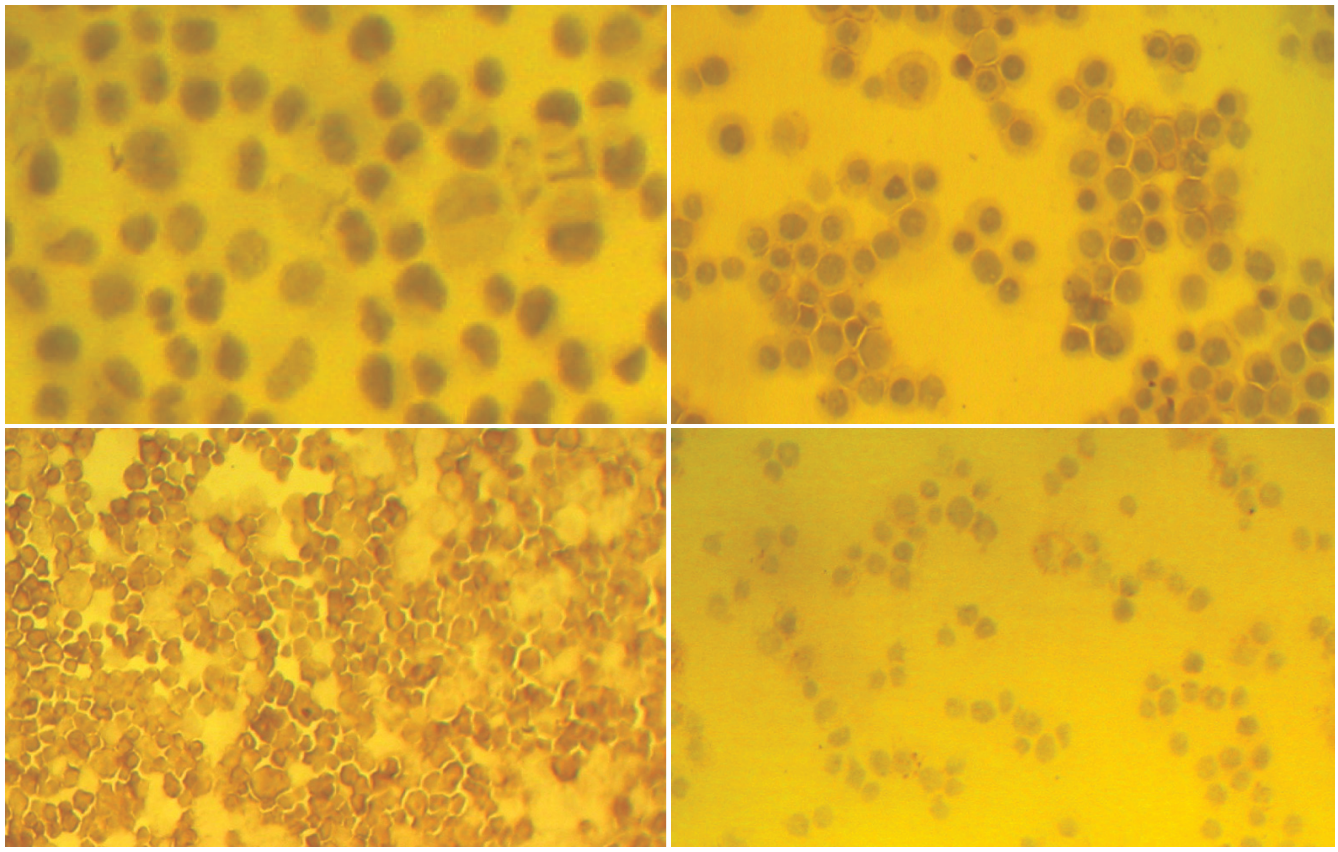
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 10 月 28 日　第 14 卷　第 30 期　(Volume 14 Number 30)



30 / 2006

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

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

世界华人消化杂志
www.wjgnet.com
二零零六年十月二十八日
第十四卷　第三十期
世界胃肠病学杂志社

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31
wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授 西安

社长/总编辑

马连生教授 北京

副总编辑

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

常务编委

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

编委

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

世界华人消化杂志®
编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2006 年 10 月 28 日　第 14 卷　第 30 期　(总第182期)

述　评

2907 三叶因子基因表达调控相关因子　卢雅丕, 任建林

基础研究

2913 EGCG对人胃癌细胞株MKN 45中Bcl-2家族相关基因表达的影响
童锦禄, 冉志华, 陈翔, 萧树东

2918 肝细胞癌变过程中胰岛素样生长因子II的动态表达与改变特征
邱历伟, 姚登福, 宗蕾, 吴玮, 吴信华

2923 Egr-1基因表达及其在射线诱导的肝癌细胞凋亡中的作用
董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 刘伟, 金茜, 张淑云

2928 COX-2抑制剂NS398调控PPARs信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制
余力伟, 马向涛

2933 四株人结肠腺癌细胞CEA表达水平的检测及其意义
王立峰, 刘宝瑞, 钱晓萍, 殷海涛, 禹立霞, 魏嘉

临床研究

2938 Granzyme B在原发及淋巴转移性胃癌细胞中的差异表达及其与肿瘤血管生成的关系
周业江, 熊玉霞, 易国平, 徐亮, 夏冬, 魏仁智

2943 慢性萎缩性胃炎黏膜上皮中P53和C-erbB-2表达的临床意义
赵松, 付英梅, 赵柏, 刘连新

2948 农村居民家庭幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查
范红敏, 袁聚祥, 徐应军, 张天哲

文献综述

2954 肝脏神经内分泌区室的研究进展
陈谦, 李强

2958 肠息肉发生的细胞和分子生物学研究进展
姚蓝, 宋家武

研究快报

2962 高频电针刺激足三里促进大鼠结肠推进运动
陈兰, 刘诗

2965 缺氧诱导因子-1α在胰腺癌中的作用
陈干涛, 白少华, 高志强

临床经验

2971 血管回声跟踪技术对肝硬化患者颈动脉弹性功能的定量检测
罗燕, 张梅, 谢兵

2974 雷帕霉素在合并急性肾功能不全肝移植患者中的初步应用
王轩, 吴幼民, 许正昌, 张斌, 李增才, 陆雷, 郑以山

2977 2型糖尿病合并脂肪肝危险因素临床分析
于晓静, 王晓梅, 冯海娟

病例报告

2980 慢性自身免疫性胰腺炎误诊1例
宋建功, 黄如川, 李红燕, 李雪玲

附　　录	2983 世界华人消化杂志投稿须知
致　　谢	2988 致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	2912 我国科技论文数跃居世界第四论文被引用次数升至世界第十三位 2927 2004年度《世界华人消化杂志》、《World Journal of Gastroenterology》的影响因子在1608种中国科技论文统计源期刊中的排位 2932 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 2942 中国学术期刊综合引证报告(2006) 2947《世界华人消化杂志》简介 2953 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2957 第三届亚洲大洋洲光生物学大会 2982 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知
封面故事	王立峰, 刘宝瑞, 钱晓萍, 殷海涛, 禹立霞, 魏嘉. 四株人结肠腺癌细胞CEA表达水平的检测及其意义. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2933-2937 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2933.asp
国际会议	XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)
创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2006-10-28
原刊名 新消化病学杂志

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

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

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

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

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

World Chinese Journal of Digestology

October 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 30

EDITORIAL

2907 Associated factors with trefoil factor gene expression
Lu YP, Ren JL

BASIC RESEARCH

2913 Expression of the Bcl-2 family is influenced by Epigallocatechin-3 -gallate in human gastric cancer cell MKN 45
Tong JL, Ran ZH, Chen X, Xiao SD

2918 Dynamic expression and alteration characteristic of insulin-like growth factor-Ⅱ in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma
Qiu LW, Yao DF, Zong L, Wu W, Wu XH

2923 Early growth response-1 gene expression and its role in radiation-induced apoptosis of liver cancer cell lines
Dong GL, Xing LN, Liu XB, Liu W, Jin Q, Zhang SY

2928 Molecular mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitor in regulating proliferation of colon cancer cells through modulating PPAR signal transduction pathway
Yu LW, Ma XT

2933 Expression of carcinoembryonic antigen in four different human colon adenocarcinoma cell lines
Wang LF, Liu BR, Qian XP, Yin HT, Yu LX, Wei J

CLINICAL RESEARCH

2938 Differential expression of Granzyme B in tumor cells between primary and metastatic gastric cancer and its potential role in tumor angiogenesis
Zhou YJ, Xiong YX, Yi GP, Xu L, Xia D, Wei RZ

2943 Expression of P53 and C-erbB-2 and their significances in chronic atrophic gastritis
Zhao S, Fu YM, Zhao B, Liu LX

2948 A seroepidemiology survey on *Helicobacter pylori* infection in rural families
Fan HM, Yuan JX, Xu YJ, Zhang TZ

REVIEW

2954 Advance in hepatic neuroendocrine compartment
Chen Q, Li Q

2958 Research progress on cytology and molecular biology of intestinal polyps
Yao L, Song JW

RAPID COMMUNICATION

2962 High-frequency electroacupuncture at *Zusanli* point promotes colonic propulsive motility in rats
Chen L, Liu S

2965 Role of hypoxia-inducible factor-1α in pancreatic cancer
Chen GT, Bai SH, Gao ZQ

CLINICAL PRACTICE

2971 Quantitative evaluation of carotid elasticity in cirrhotic patients by echo-tracking technique
Luo Y, Zhang M, Xie B

2974 Application of rapamycin in liver transplant patients with acute kidney malfunction
Wang X, Wu YM, Xu ZC, Zhang B, Li ZC, Lu L, Zheng YS

2977 Analysis of risk factors on nonalcoholic steatohepatitis in patients with type 2 diabetes
Yu XJ, Wang XM, Feng HJ

CASE REPORT

2980 Missed diagnosis for chronic autoimmune pancreatitis: one case analysis
Song JG, Huang RC, Li HY, Li XL

APPENDIX

2983 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

2988 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Wang LF, Liu BR, Qian XP, Yin HT, Yu LX, Wei J.
Expression of carcinoembryonic antigen in four different human colon adenocarcinoma cell lines.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2933-2937
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2933.asp

INTERNATIONAL MEETINGS

XXX Panamerican Congress of Gastroenterology
11-16 November 2006
Cancun
www.panamericano2006.org.mx

New York Society for Gastrointestinal Endoscopy
13-16 December 2006
New York
www.nysge.org

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

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 October 28, 2006
Honorary-Editor-in-Chief
Bo-Rong Pan
President and Editor-in-Chief
Lian-Sheng Ma

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

Code No.M4481
Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Telephone: +86-10-85381901
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**
Copyright © 2006 by The WJG Press

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2907-2912
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

三叶因子基因表达调控相关因子

卢雅丕, 任建林

卢雅丕, 福建医科大学2005级硕士研究生 福建省福州市 350000
任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 福建省厦门市 361004
任建林, 2004年西安交通大学医学博士, 2003年哈佛大学麻省总院, 纽约大学研修, 教授、主任医师 、硕士研究生导师, 厦门大学附属中山医院消化内科主任, 厦门市消化中心常务副主任主要从事胃黏膜病变与胃癌的相关研究.
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学中山医院消化内科, 厦门市消化中心. jianlinr@msn.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2006-08-11 接受日期: 2006-09-10

摘要

三叶因子在黏膜修复与重建及肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用, 对其结构与功能及基因表达调控的研究一直是近20余年来黏膜保护及肿瘤研究领域的热点. 目前的研究发现, 许多转录因子如C/EBPβ、GATA家族、NF-κB等, 调节蛋白质如雌激素、EGF及TGFα等, 及其他化学物质如NSAIDs、TPA、硫氨素等均参与了三叶因子基因的表达调控过程. 通过调节这些相关因子, 我们可以充分发挥三叶因子生物学作用中的有利方面, 避免其不利方面, 为临床应用创造条件.

关键词: 三叶因子; 基因表达调控

卢雅丕, 任建林. 三叶因子基因表达调控相关因子. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2907-2912
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2907.asp

0 引言

自从1980年代发现三叶因子(trefoil factor family, TFF)以来, 对其结构与功能及基因调控的研究一直是黏膜保护及肿瘤研究领域的热点. 大量的研究发现, 许多转录因子、调节蛋白及其他化学物质参与了三叶因子基因的调控过程, 本文拟就近年来这一方面的研究进展作一综述.

1 三叶因子

TFF是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽. 其共同特征为均含1个特殊的P结构域, 由38-39个氨基酸通过6个半胱氨酸残基经由3个二硫键相互联接, 使整个肽链扭曲、折叠形成三叶状结构. 这种结构的稳定性使三叶因子家族具有明显的抗蛋白酶水解、酸消化及耐热特性, 因而能在消化道复杂的环境中保持生物活性[1]. 目前在哺乳动物体内发现的三叶因子有3种, 即乳癌相关肽(pS2/TFF1)、解痉多肽(SP/TFF2)和肠三叶因子(ITF/TFF3). TFF1于1982年由Masiakowski *et al*[2]在雌激素诱导的人乳腺癌细胞系MCF-7中获得; TFF2于1982年由Jorgensen *et al*[3]在从猪胰腺提纯胰岛素的过程中分离获得; TFF3于1991年由Suemori *et al*[4]从大鼠空肠中分离. 3种三叶因子的基因串联分布于21号染色体长臂(21q22.3), TFF1和TFF3有3个外显子, 只含有1个P功能域; TFF2有4个外显子, 内部有2个P功能域. 他们在胃肠道呈组织细胞特异性表达, 在黏膜修复与重建及肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用[5].

■背景资料
三叶因子发现至今20余年, 是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽, 在黏膜修复与重建及肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用, 深入了解其基因转录与表达调控相关机制能为更好的发挥其生物学作用提供指导.

2 三叶因子基因调控相关因子

2.1 三叶因子间的相互调节作用 3种三叶因子的基因具有相似的5'端核苷酸序列, 这使他们之间可以相互调节. 有研究表明, 低浓度的三叶因子可以刺激自身及其他三叶因子家族成员基因的转录及蛋白质的分泌[6], 这一过程是三叶因子通过Ras/MEK/MAPK依赖性途径实现的, 且需要表皮生长因子受体(EGFR)的间接激活[7].

2.2 雌激素 TFF1被看作是雌激素调节系统蛋白(或称雌激素诱发蛋白)的代表性蛋白. TFF1基因定位于第21号染色体, 在乳腺癌细胞中, TFF1只有在雌激素作用下才能被转录与翻译. 人乳腺癌细胞系MCF-7中的雌激素反应基因(包括TFF1)通常含有一个存在于Sp1结合位点旁的雌激素反应元件(estrogen response elements, ERE). Barkhem *et al*[8-9]对雌激素与TFF1之间的关系做了一系列的研究, 发现雌激素经由激活蛋白1(activator protein 1, AP1)与TFF1启动子中的ERE及类固醇受体共活化物-1(steroid receptor coactivator-1, SRC-1)协同作用, 诱导TFF1基因在激素依赖性乳腺癌细胞中表达. Sun *et al*[10]通过免疫沉降分析观察MCF-7细胞系中雌激素受体、Sp1和Sp3与对雌激素敏感的TFF1启动子

■研发前沿
三叶因子的作用目前较为明确, 但作用机制尚不清楚. 目前研究的热点及重点集中于: (1)三叶因子的作用机制, 明确其作用的细胞信号转导途径; (2)三叶因子基因的表达调控; (3)蛋白质水平的研究, 如寻找三叶因子相关受体或结合蛋白. 特别是后者, 是目前亟待研究的问题.

之间的结合效应, 发现位于ERE上游的Sp1/Sp3结合位点在TFF1启动子对雌激素的反应过程中具有重要的作用, Sp位点突变可抑制Sp1和Sp3与TFF1基因启动子的结合, 减弱TFF1对雌激素的反应性. 这提示雌激素调节TFF1基因的作用是通过Sp1/Sp3实现的. 最近, Espino *et al*[11]的研究也提示, 在雌二醇存在时, MCF-7细胞系中的TFF1 mRNA水平明显升高. TFF3基因的启动子中亦含有ERE, 其在子宫内膜增生期及月经周期的卵泡期表达明显上升, 而在分泌期急剧下降, 提示TFF3亦接受雌激素调节[12].

2.3 转录因子CCAAT/增强子结合蛋白β (CCAAT/enhancer binding proteinβ, C/EBPβ) C/EBPβ是近20 a来在对无数调节基因的研究中发现的一个功能极其广泛的转录因子, 他在众多细胞反应如细胞分化、代谢及肿瘤发生等过程中发挥了关键的调节作用. 在胃癌组织中, C/EBPβ较正常明显升高. 有研究发现, TFF1启动子中含有一个具有C/EBPβ结合位点的抑制区, 在鼠和人细胞系中过表达C/EBPβ可以抑制TFF1基因的转录[13]. 我们在前期的实验中发现胃癌组织中的TFF1表达显著减少或缺如[14], 考虑可能与胃癌组织中升高的C/EBPβ对TFF1转录的抑制作用有关. Chi *et al*[15]研究发现, TFF2在乳腺癌细胞系MCF-7中的表达是在胃癌细胞系AGS中的两倍, 并通过电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)及定向诱变(site-directed mutagenesis)的方法, 证实在TFF2启动子5'端具有一个细胞系特异性转录调节元件, 这一元件中包含有C/EBPs的一致性结合位点. 这一结合位点的突变可使MCF-7乳腺癌细胞系中TFF2启动子的转录活性降低50%, 而对AGS胃癌细胞系中的TFF2转录则没有影响. 这提示C/EBPs可能作为一种细胞特异性顺式作用元件, 调节TFF2的细胞特异性表达.

2.4 非甾体类抗炎药(NSAIDs)及过氧化物酶体增生物激活受体γ(PPARγ) Azarschab *et al*[16]发现, 阿司匹林和吲哚美辛均可以显著提高胃腺癌细胞系MKN45及KATOⅢ、肠腺癌细胞系LS174T中内源性TFF2基因转录水平. 当向前述细胞系中同时加入阿司匹林及吲哚美辛时, 可以进一步提高TFF2基因转录水平, 但并不表现为叠加效应, 提示二者可能通过相同的信号转导途径发挥作用. 向细胞系中进一步加入蛋白激酶C(PKC)抑制剂十字孢碱, 发现TFF2基因表达下降10倍, 再次加入阿司匹林和吲哚美辛刺激无法逆转这种抑制效应, 说明PKC途径与TFF2基因的转录激活有关. 另有多位学者用吲哚美辛及阿司匹林刺激MKN45细胞系, 亦发现TFF2 mRNA水平呈剂量及时间依赖性升高, 荧光素酶报告基因测定发现外用PGE2并不会逆转吲哚美辛对TFF2表达的这种上调作用. 因此考虑吲哚美辛对TFF2的调控是通过一种不依赖于环氧合酶(COX)的机制起作用的[17-18]. 吲哚美辛是PPARγ的配体, 他在产生上调TFF2转录效应的相同浓度范围内, 也可活化PPARγ, 其对TFF2的诱导作用可被PPARγ的特异性抑制剂GW9662所阻断. 提示吲哚美辛及阿司匹林对TFF2的诱导作用是通过激活PPARγ起作用的, 这一机制在减轻NSAIDs所致的胃肠道黏膜损伤方面可能具有重要的意义[18]. 另有研究发现, PPARγ的其他配体如15d-PGJ2及曲格列酮(TGZ)等也能在MKN45细胞系中上调TFF1及TFF2的表达水平[19].

2.5 GATA家族 GATA家族是一类能识别GATA序列并与之结合的转录调节因子, 普遍具有锌指结构, 共有6个家族成员(GATA-1--GATA-6). Alazzeh *et al*[20]研究发现, 在胃腺癌细胞系MKN45及KATOⅢ、肠腺癌细胞系LS174T、胰腺癌细胞系Capan-2、胰腺导管癌细胞系IMIM-PC1及IMIM-PC2等细胞系中, GATA-6转录因子可活化TFF1和TFF2基因转录, 但不影响TFF3基因的转录. 共转染TFF报告基因及GATA-6表达载体到胃癌细胞系中, 也得到相同的结果[21]. GATA-4及GATA-5亦可激活三叶因子表达. GATA-4及GATA-5启动子甲基化及转录静止现象常发生在胃癌及结直肠癌中, 而GATA-6没有类似现象. 在胃肠道肿瘤中, 一些由GATA-4及GATA-5调节的抗肿瘤基因如三叶因子、inhibinα和Dab2等也出现转录静止, 同时伴有启动子的甲基化. 药物或相关基因诱导的去甲基化过程可导致结直肠癌细胞GATA-4、GATA-5及其下游目的基因如三叶因子基因表达. 表达外源性GATA-5基因也可引起下游目的基因激活. 提示GATA-4及GATA-5可通过激活三叶因子等抗肿瘤基因的转录而发挥抗肿瘤作用[22].

2.6 表皮生长因子(EGF)及转化生长因子α (TGFα) 在三叶因子基因的5'端存在一个雌激素/表皮生长因子反应元件(EGF/URO). Wright *et al*[23]的研究表明, 在EGF的调控下, TFF参与了组织的损伤修复, 在胃、十二指肠、胰腺等众多组织中三叶因子表达均与EGF/URO反应元件相

关. TGFα是消化道中最主要的表皮生长因子受体的配体, 能诱导三叶因子表达. 原位杂交表明, 在正常小鼠中, TFF1 mRNA在胃黏膜表面黏液细胞中表达. 而在胃黏膜中过表达TGFα的转基因鼠中, TFF1表达明显升高, 其mRNA遍及整个胃小凹区[24]. 在黏膜修复过程中, TFF2及TFF3也受到TGFα的调节. Cook *et al*[25]制作了野生鼠及TGFα基因敲除鼠的胃黏膜损伤模型, 测定损伤前后胃黏膜中TFF2及TFF3的表达情况, 发现两种因子在野生鼠损伤后胃黏膜中的表达较损伤前明显升高, 而在TGFα基因敲除鼠中, 损伤前后TFF2及TFF3的表达无明显改变. 提示TGFα在三叶因子发挥其胃黏膜保护及修复作用的过程中是不可或缺的. 正常小鼠胰腺中TFF1表达甚微, 而过表达TGFα的小鼠胰腺中的TFF1表达却明显升高且表现出显著的特异性免疫反应性, 亦证明TGFα能上调TFF1的表达[26].

2.7 核因子κB(NF-κB)及肿瘤坏死因子α(TNFα) 尽管NF-κB是公认的转录激活因子, 能与多种基因启动子或增强子的特异序列结合, 并促进其转录, 然而在一些实验研究中发现, NF-κB也可抑制或负调节某些基因的转录表达. Loncar *et al*[27]研究发现, 在人结肠癌细胞系HT-29中, TNF-α可通过NF-κB信号途径下调TFF3表达; Dossinger *et al*[28]也发现在IL-1β, IL-6抑制了NF-κB及C/EBP的转录后, TFF1启动子的活性降低, 基因表达下调. 由此推测在TFF基因上游可能存在NF-κB的结合位点, 活化的NF-κB可结合TFF1的特异序列并抑制其转录活性.

2.8 上游刺激因子(USF) USF具有抗增殖活性, 在癌细胞中往往缺乏, 提示这种因子具有抑制肿瘤的作用[29]. TFF1, TFF2及TFF3基因的启动子区均含有上游刺激因子(USF)的结合位点E box. E Al-azzeh *et al*[21]在胃腺癌细胞系MKN45及结肠腺癌细胞系LS174T, HT-29, COS-7中加入外源性USF, 发现USF对TFF2启动子具有很强的激活作用. 其中, USF2的作用较USF1显著, 两种USF共表达的作用又远高于USF2. 使TFF2基因E box的DNA序列发生突变后, 这种激活作用被显著抑制, 无法结合TFF2 DNA的USF突变体也无法激活TFF2启动子, 提示USF对TFF2启动子的激活作用是通过USF与E box特异性结合而实现的. 他们同时测定了TFF1及TFF3, 发现TFF3启动子被中度激活, 而TFF1启动子则不受USF影响.

2.9 肝细胞核因子3(HNF-3/FKH) 有研究发现, 在人和两栖动物的三叶因子启动子中具有一个接近TATAA盒的一致序列, 该序列与HNF-3的结合位点具有惊人的相似性, 由此推断HNF-3可能对三叶因子基因转录产生影响[30-31]. 共转染HNF-3α和β表达载体, 可以特异性激活野生型TFF1报告基因. 通过凝胶阻留法分析发现, HNF-3α和β主要结合于TFF1, 对TFF2及TFF3的亲和力较弱. 若此一致序列发生变异, 则TFF1报告基因的转录显著下降. 在HNF-3α和β基因产物的作用下, 内源性TFF1 mRNA的表达在胰腺细胞系Capan-2中升高1000倍, 在胃细胞系MKN-45中升高5倍. 另有学者发现, 在乳腺癌细胞系中, HNF-3基序位于ERE附近, 可能与激活雌激素调节基因包括TFF1有关[32].

2.10 杯状细胞沉默基因抑制因子结合蛋白(GCSI-BP) 正常生理条件下, 肠三叶因子TFF3选择性表达于肠道杯状细胞中. 以前的研究已经证实了在TFF3基因启动子附近存在一些顺式调控元件, 但不足以解释为什么TFF3在体内的这种组织及细胞特异性表达的现象. 最近, Iwakiri *et al*[33]发现, 在鼠TFF3基因中含有一个沉默子元件, 这个元件可以有效防止TFF3在非杯状细胞中表达. 杯状细胞中含有一种可以与杯状细胞沉默基因抑制因子(GCSI)调控元件结合的核蛋白, 称为GCSI结合蛋白(GCSI-BP), 这种GCSI调控元件可以废除其临近的各种顺式调控元件的沉默作用, 使TFF3基因在杯状细胞中表达. TFF3在体内细胞特异性表达的实现便有赖于这种GCSI调控元件.

2.11 缺氧诱导因子1(HIF-1) HIF-1是一种介导缺氧信号、在胃肠道完整性和血管发生方面起着关键性作用的中枢转录因子. 胃肠道表面上皮细胞经常受到组织微循环障碍及缺氧相关性损伤, 缺氧条件下, HIF-1升高, 并通过其诱导作用导致TFF3 mRNA和蛋白质的水平升高, 保护肠黏膜. Karhausen *et al*[34]发现, 在小鼠结肠炎模型中, 降低HIF-1表达使小鼠出现更严重的肠黏膜损伤, 体质量明显减轻, 死亡率升高. 而在高表达HIF-1的小鼠中, 黏膜屏障保护性因子TFF3的mRNA及蛋白质水平均明显升高, 其他黏膜保护因子如多药耐药基因、CD73等的表达亦有所升高, 使肠黏膜屏障修复能力较同窝正常小鼠明显升高.

2.12 12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13(TPA) 早在1989年, Nunez *et al*[35]便发现, 在乳腺癌细胞系MCF-7中TFF1基因的转录受到雌激素的调控,

■相关报道

丹麦的Thim L教授是对三叶因子研究最早、最多及最深入的学者之一, 这篇文章详细介绍了三叶因子的结构与功能, 使读者对三叶因子有较为形象的了解. Emami *et al*总结了三叶因子的生物学作用、分布及其基因的多种调节途径, 引用文献近200篇, 对三叶因子的介绍较为系统、详尽.

■**创新盘点**
国内文献中, 对三叶因子的黏膜保护与修复及其在肿瘤发生、发展中的作用的综述较多, 但尚无对其基因表达调控方面的报道, 本文对三叶因子基因表达调控方面作一综述.

但在胃黏膜中则不受雌激素调控. 他们通过瞬时转染分析, 发现TFF1基因的5'端含有一个复合增强子元件, 这个增强子能与TPA、雌激素、EGF、c-Ha-ras癌蛋白和c-jun原癌蛋白等物质结合, 影响TFF1基因的转录. 最近, Espino *et al*[11]的研究也提示, TPA对TFF1基因的转录具有重要的诱导作用, 且这种诱导可被组蛋白3(H3)分裂原和应激活化蛋白激酶(MSK)抑制剂H89及MAPK激酶抑制剂UO126所阻断, 提示TPA对TFF1基因的转录诱导作用是通过Ras/MAPK信号途径实现的.

2.13 短链脂肪酸 短链脂肪酸可以引起肠道黏膜损伤, 早年便有学者发现他们可以抑制TFF3的表达, 其抑制作用按强弱顺序依次为丁酸盐、丙酸盐及乙酸盐[36]. Lin *et al*[37]发现, 在丁酸盐诱导的新生鼠结肠损伤黏膜中TFF3 mRNA水平明显下降, 体外研究也显示, 用TFF3启动子-荧光素酶报告基因质粒转染LS174T细胞, 在丁酸盐存在的条件下, TFF3启动子报告基因活性降低, 提示丁酸盐通过抑制特异性启动子下调TFF3表达, 降低黏膜屏障功能, 引起黏膜损伤. Miki *et al*[38]也发现, 丁酸钠及丙酸钠均可抑制TFF3基因表达.

2.14 白细胞介素家族 炎症因子白细胞介素家族也是三叶因子基因表达的重要调节因子. Dossinger *et al*[28]研究发现, IL-1β及IL-6可以通过抑制NF-κB及C/EBPβ而协同抑制TFF1启动子的活性及基因表达. Blanchard *et al*[39]也发现, 在结肠癌细胞系HT-29中, IL-4和IL-13可以上调TFF3 mRNA及蛋白质水平, 这种调节效应呈时间及剂量依赖性, 杯状细胞分泌产物黏液素2(MUC2)亦随之增加.

2.15 其他 胃泌素也是TFF1的正调节蛋白. Khan *et al*[40]的研究证实, 在人TFF1启动子中具有一个胃泌素效应元件, 在表达胃泌素/胆囊收缩素受体的胃癌细胞系AGS-G_R中加入胃泌素可以快速提高TFF1 mRNA水平. Liu *et al*[41]将硫氨素转运载体THTR2转染到MCF-7乳腺癌细胞系中, 发现TFF1水平明显下降, 在硫氨素消耗殆尽后, TFF1水平复又升高, 提示硫氨素对TFF1的转录起抑制作用. X线放射、花生四烯酸及过氧化氢等物质均与三叶肽基因表达相关. 肠道的神经传递物质、拟胆碱药、血管活性肠肽、生长抑素、TNFα、FGF2/bFGF、FGF7/KGF、葡萄糖等均可以调节三叶因子表达及分泌. 此外, DNA的自身修饰如启动子甲基化也是一个重要的调节因素. TFF基因表达依赖于启动子甲基化, 在不表达TFF的组织中, 3种三叶肽的启动子通常都是甲基化的[42-43].

总之, 三叶因子基因表达受到众多转录因子、蛋白质及其他化学物质的调控, 各种因子的调控机制不尽相同. 鉴于三叶因子在黏膜修复与重建及肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用, 深入了解三叶因子错综复杂的基因表达调控机制是非常必要的. 通过调节其基因表达调控相关因子, 我们可以充分发挥三叶因子的生物学作用中的有利方面, 避免其不利方面, 为临床应用创造条件.

3 参考文献

1 卢雅丕, 任建林. 三叶因子家族研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2019-2021
2 Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 7895-7903
3 Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept* 1982; 3: 207-219
4 Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11017-11021
5 Thim L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 888-903
6 Bulitta CJ, Fleming JV, Raychowdhury R, Taupin D, Rosenberg I, Wang TC. Autoinduction of the trefoil factor 2 (TFF2) promoter requires an upstream cis-acting element. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 366-374
7 Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 1999; 103: R31-38
8 Barkhem T, Haldosen LA, Gustafsson JA, Nilsson S. pS2 Gene expression in HepG2 cells: complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor alpha, an estrogen-responsive element, and the activator protein 1 response element. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 1273-1283
9 Barkhem T, Haldosen LA, Gustafsson JA, Nilsson S. Transcriptional synergism on the pS2 gene promoter between a p160 coactivator and estrogen receptor-alpha depends on the coactivator subtype, the type of estrogen response element, and the promoter context. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2571-2581
10 Sun JM, Spencer VA, Li L, Yu Chen H, Yu J, Davie JR. Estrogen regulation of trefoil factor 1 expression by estrogen receptor alpha and Sp proteins. *Exp Cell Res* 2005; 302: 96-107
11 Espino PS, Li L, He S, Yu J, Davie JR. Chromatin modification of the trefoil factor 1 gene in human

breast cancer cells by the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 2006; 66: 4610-4616
12 Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 19-33
13 Sankpal NV, Mayo MW, Powell SM. Transcriptional repression of TFF1 in gastric epithelial cells by CCAAT/enhancer binding protein-beta. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1728: 1-10
14 任建林, 罗金燕, 卢雅丕, 陈建民, 王琳. 三叶因子1在胃癌及癌前病变胃黏膜中的表达改变. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2188-2190
15 Chi AL, Lim S, Wang TC. Characterization of a CCAAT-enhancer element of trefoil factor family 2 (TFF2) promoter in MCF-7 cells. *Peptides* 2004; 25: 839-847
16 Azarschab P, Al-Azzeh E, Kornberger W, Gott P. Aspirin promotes TFF2 gene activation in human gastric cancer cell lines. *FEBS Lett* 2001; 488: 206-210
17 Koitabashi A, Shimada T, Fujii Y, Hashimoto T, Hosaka K, Tabei K, Namatame T, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Indometacin up-regulates TFF2 expression in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 171-176
18 Shimada T, Koitabashi A, Fujii Y, Hashimoto T, Hosaka K, Tabei K, Namatame T, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. PPARgamma mediates NSAIDs-induced upregulation of TFF2 expression in gastric epithelial cells. *FEBS Lett* 2004; 558: 33-38
19 Shimada T, Koitabashi A, Kuniyoshi T, Hashimoto T, Yoshiura K, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Up-regulation of TFF expression by PPARgamma ligands in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 1: 119-125
20 Al-azzeh ED, Fegert P, Blin N, Gott P. Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 324-332
21 Al-azzeh E, Dittrich O, Vervoorts J, Blin N, Gott P, Luscher B. Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells. *Gut* 2002; 51: 685-690
22 Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M, Sakai H, Ren CY, Yuasa Y, Herman JG, Baylin SB. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8429-8439
23 Wright NA, Poulsom R, Stamp GW, Hall PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rio MC, Tomasetto C, Chambon P. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J Pathol* 1990; 162: 279-284
24 Goldenring JR, Poulsom R, Ray GS, Wright N, Meise KS, Coffey RJ Jr. Expression of trefoil peptides in the gastric mucosa of transgenic mice overexpressing transforming growth factor-alpha. *Growth Factors* 1996; 13: 111-119
25 Cook GA, Yeomans ND, Giraud AS. Temporal expression of trefoil peptides in the TGF-alpha knockout mouse after gastric ulceration. *Am J Physiol* 1997; 272: G1540-1549
26 Ebert MP, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P. Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 1999; 45: 105-111
27 Loncar MB, Al-azzeh ED, Sommer PS, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, Blin N, Stohwasser R, Gott P, Kayademir T. Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* 2003; 52: 1297-1303
28 Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gott P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem* 2002; 12: 197-206
29 Jaiswal AS, Narayan S. Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene. *J Cell Biochem* 2001; 81: 262-277
30 Botzler C, Oertel M, Hinz M, Hoffmann W. Structure of the Xenopus laevis TFF-gene xP4.1, differentially expressed to its duplicated homolog xP4.2. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 345-353
31 Beck S, Sommer P, dos Santos Silva E, Blin N, Gott P. Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATAA box. *DNA Cell Biol* 1999; 18: 157-164
32 Lacroix M, Leclercq G. About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor-alpha gene (ESR1) in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219: 1-7
33 Iwakiri D, Podolsky DK. A silencer inhibitor confers specific expression of intestinal trefoil factor in gobletlike cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1114-1123
34 Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* 2004; 114: 1098-1106
35 Nunez AM, Berry M, Imler JL, Chambon P. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J* 1989; 8: 823-829
36 Tran CP, Familari M, Parker LM, Whitehead RH, Giraud AS. Short-chain fatty acids inhibit intestinal trefoil factor gene expression in colon cancer cells. *Am J Physiol* 1998; 275: G85-94
37 Lin J, Peng L, Itzkowitz S, Holzman IR, Babyatsky MW. Short-chain fatty acid induces intestinal mucosal injury in newborn rats and down-regulates intestinal trefoil factor gene expression *in vivo* and *in vitro*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 607-611
38 Miki K, Unno N, Nagata T, Uchijima M, Konno H, Koide Y, Nakamura S. Butyrate suppresses hypoxia-inducible factor-1 activity in intestinal epithelial cells under hypoxic conditions. *Shock* 2004; 22: 446-452
39 Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression:

■应用要点

在明确三叶因子生物学作用的基础上, 进一步深入了解三叶因子基因转录与表达调控相关机制, 能对良好发挥其作用提供指导. 另外, 在日后的科研中, 能增加对三叶因子表达水平的调控手段, 更有利于对其作用机制及相互作用蛋白的研究.

■同行评价
本文综述了三叶因子基因表达调控相关因子, 可读性强, 对该方面的研究具有参考意义.

requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004; 172: 3775-3783
40 Khan ZE, Wang TC, Cui G, Chi AL, Dimaline R. Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin. *Gastroenterology* 2003; 125: 510-521
41 Liu S, Stromberg A, Tai HH, Moscow JA. Thiamine transporter gene expression and exogenous thiamine modulate the expression of genes involved in drug and prostaglandin metabolism in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 477-487
42 Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 2004; 25: 885-898
43 Baus-Loncar M, Giraud AS. Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2921-2931

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 •

我国科技论文数跃居世界第四
论文被引用次数升至世界第十三位

北京10月27日讯(科学时报记者潘锋)中国科学技术信息研究所10月27日在京发布“2005年度中国科技论文统计结果”, 在2005年度的科技论文与引文统计工作中, 国际论文数据取自三种在国际上颇具影响的检索工具:《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(Ei)和《科学技术会议录索引》(ISTP). 自2005年起还新增加了对美国《医学索引》(MEDIINE)和对《社会科学引文索引》(SSCI)收录的社会科学论文的统计与分析. 国内论文数据取自中国科学技术信息研究所研制的《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD), 该数据库2005年度收录的中国科技论文统计源期刊, 即中国科技核心期刊共1652种.

2005年SCI、Ei和ISTP收录的、在作者机构中含有“中华人民共和国”的论文共153374篇, 比2004年的111356篇增加了42018篇, 增长率为27.4%. 我国科技论文占世界论文总数2231002篇的6.9%, 所占份额较2004年增加了0.6个百分点. 按照国际论文数量排序, 我国科技论文数首次超过德国, 跃居世界第4位. 位于我国之前的三个国家分别是美国、英国和日本.

2005年反映基础研究状况的SCI所收录的中国论文数为68226篇, 比2004年增加了10849篇, 增长18.9%. 按论文数排序我国位列世界第5位, 与2004年相同. 论文数排在前四位的国家为: 美国、英国、德国和日本.

被SCI 2000-2004收录的我国科技人员作为第一作者发表的国际论文在2005年被引用情况, 与2004年相比被引用论文数量由32536篇增加到51223篇; 被引用次数由75234次增加到133417次, 增长率分别为57.4%和77.5%. 我国科技论文被引用次数已由2004年的第14位升至第13位.

Ei是全世界最早的工程文献来源和工程领域最权威的数据库, Ei数据也是各国高技术竞争力比较研究的重要参考. 2005年在反映工程科学研究情况的Ei收录期刊论文中, 中国论文有显著增长, 为54362篇, 比2004年增长了62.3%, 占世界的比例为12.6%, 继续保持世界第2位, 仅落后于美国.

ISTP收录的是科技会议论文, 在发展迅速的学科领域, 许多创新的想法、概念经常会首先在国际会议上进行交流, 会议论文是科研成果产出除期刊以外的一个重要补充, ISTP汇集了自然科学、医学、农学科学和工程技术领域每年全世界出版的会议文献的80%-90%, ISTP 2005年共收录我国科学家发表的论文数显著增长, 达到30786篇, 比2004年的20479篇增加了10307篇, 增长了50.3%, 占全世界总数的6.2%. 我国科技会议论文的世界排位继续保持世界第5位, 国际会议论文数超过我国的是美国、日本、德国和英国.

创刊于1879年的美国《医学索引》收录了世界70多个国家和地区、40余种文字的4800种生物医学及相关学科的期刊, 目前我国大陆有83种期刊被该系统收录. 2005年该系统共收录中国论文27460篇, 与2004年的18962篇相比增长了44.8%.

2005年我国科技人员在1652种中国核心期刊上共发表论文355070篇, 比2004年增加了80466篇, 增长了29.3%; 海外科技人员作为第一作者在我国刊物上发表论文2495篇, 比2004年增加708篇.

截至2005年9月, SCI收录我国大陆科技期刊76种, Ei收录我国大陆期刊141种.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2913-2917
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

EGCG对人胃癌细胞株MKN 45中Bcl-2家族相关基因表达的影响

童锦禄, 冉志华, 陈 翔, 萧树东

童锦禄, 冉志华, 陈翔, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院、上海市消化疾病研究所 上海市 200001
童锦禄, 上海交通大学医学院(原上海第二医科大学)硕士, 现攻读博士学位, 主要从事消化道肿瘤的基础研究.
上海市重点学科建设资助项目, No. Y0205
通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院、上海市消化疾病研究所. z-ran@online.sh.cn
电话: 021-63287817 传真: 021-63266027
收稿日期: 2006-08-23 接受日期: 2006-09-21

Expression of the Bcl-2 family is influenced by Epigallocatechin-3 -gallate in human gastric cancer cell MKN 45

Jin-Lu Tong, Zhi-Hua Ran, Xiang Chen, Shu-Dong Xiao

Jin-Lu Tong, Zhi-Hua Ran, Xiang Chen, Shu-Dong Xiao, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China
Supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. Y0205
Correspondence to: Zhi-Hua RAN, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. z-ran@online.sh.cn
Received: 2006-08-23 Accepted: 2006-09-21

Abstract

AIM: To investigate the changes of the Bcl-2 family in human gastric cancer cell line MKN 45 after epigallocatechin-3-gallate (EGCG) treatment.

METHODS: The mRNA expression of apoptosis-related genes Bcl-xl, Bcl-2, Bax, Bid and Bad were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blot analysis was performed to detect the changes of the corresponding protein expression, and then the ratio of Bcl-2 to Bax (Bcl-2/Bax) was calculated.

RESULTS: The mRNA and protein expression levels of pro-apoptotic members, such as Bax, Bid and Bad, were increased gradually as the treating time extended (Bax protein: 0.6292 ± 0.08, 0.6454 ± 0.04, 0.8069 ± 0.09, 0.8992 ± 0.07, $P < 0.05$; Bid protein: 1.1214 ± 0.08, 1.3697 ± 0.07, 1.610 ± 0.09, 2.0623 ± 0.12, $P < 0.05$; Bad protein: 0.4327 ± 0.02, 0.7531 ± 0.01, 1.2827 ± 0.02, 1.6388 ± 0.09, $P < 0.05$; for 0, 12, 24, and 36 h, respectively). However, the mRNA and protein expression levels of anti-apoptotic members, such as Bcl-xl and Bcl-2, were decreased as the time prolonged (Bcl-xl protein: 0.6444 ± 0.01, 0.6060 ± 0.02, 0.5647 ± 0.04, 0.5487 ± 0.11, $P < 0.05$; Bcl-2 protein: 0.8112 ± 0.04, 0.6716 ± 0.08, 0.4664 ± 0.03, 0.3146 ± 0.01, $P < 0.05$). Meanwhile, the ratio of Bcl-2/Bax was decreased as well ($P < 0.05$).

CONCLUSION: EGCG induces apoptosis of gastric cancer cells through influencing the mRNA and protein expression of the Bcl-2 family, especially the ratio of Bcl-2/Bax.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate; Apoptosis; Gastric cancer; Bcl-2 family

Tong JL, Ran ZH, Chen X, Xiao SD. Expression of the Bcl-2 family is influenced by Epigallocatechin-3 -gallate in human gastric cancer cell MKN 45. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2913-2917

摘要

目的: 探讨EGCG干预人胃癌细胞株MKN45后Bcl-2 家族相关基因表达的变化情况.

方法: 运用半定量RT-PCR法和蛋白免疫印迹法分别检测EGCG干预人胃癌细胞株MKN 45后不同时间点上(0, 12, 24, 36 h)抗凋亡相关基因Bcl-xl和Bcl-2及促凋亡相关基因Bax、Bid和Bad的mRNA和蛋白表达水平, 并比较不同时间点的Bcl-2与Bax的比值.

结果: 促凋亡相关基因Bax、Bid和Bad的mRNA与蛋白表达水平随着EGCG作用于人胃癌细胞株MKN45的时间延长(0,12, 24, 36 h)逐渐升高(Bax蛋白: 0.6292±0.08, 0.6454±0.04, 0.8069±0.09, 0.8992±0.07,

■背景资料
表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是从茶叶中分离得到的儿茶素类单体, 是茶多酚生物活性的主要成份, 具有抑制肿瘤生长, 诱导癌细胞凋亡等作用. EGCG的临床前实验及其有效释放剂型的研究将为EGCG进入临床应用做好铺垫, 分子作用机制的研究有利于筛选作用的靶点.

■同行评价
本文分析了EGCG对胃癌细胞株MKN 45的Bcl-2家族相关基因表达的影响，发现EGCG可影响Bcl-2家族不同成员的mRNA与蛋白表达水平，尤其是Bcl-2/Bax比值. 课题有一定的创新性，方法比较实用，结果也较可信. 建议今后以real-time RT-PCR检测Bcl-2/Bax转录水平，更具说服力.

$P<0.05$; Bid蛋白: 1.1214±0.08, 1.3697±0.07, 1.610±0.09, 2.0623±0.12, $P<0.05$; Bad蛋白: 0.4327±0.02, 0.7531±0.01, 1.2827±0.02, 1.6388±0.09, $P<0.05$), 而抗凋亡相关基因Bcl-xl及Bcl-2的mRNA和蛋白表达水平却逐渐降低(Bcl-xl蛋白: 0.6444±0.01, 0.6060±0.02, 0.5647±0.04, 0.5487±0.11, $P<0.05$; Bcl-2蛋白: 0.8112±0.04, 0.6716±0.08, 0.4664±0.03, 0.3146±0.01, $P<0.05$). Bcl-2/Bax比值也随着EGCG作用时间的延长逐渐变小($P<0.05$).

结论: EGCG可改变Bcl-2家族不同成员的mRNA与蛋白表达水平，尤其是Bcl-2/Bax比值，这可能与EGCG来调控胃癌细胞凋亡有关.

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 细胞凋亡; 胃癌; Bcl-2

童锦禄，冉志华，陈翔，萧树东. EGCG对人胃癌细胞株MKN 45中Bcl-2家族相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2913-2917
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2913.asp

0 引言

饮食中的多酚成分能抑制癌细胞的生长，而又不影响正常细胞的功能，因此越来越受到研究者们的关注，以期寻求新的安全的癌症预防和治疗方法[1]. 全世界茶饮用量仅次于水，茶叶根据制作工序和发酵时间可以分为红茶、绿茶和乌龙茶. 绿茶中的茶多酚主要包括表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3 gallate, EGCG)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)及表儿茶素(epicatechin, EC)，其中EGCG的含量最为丰富，而且活性也最强. EGCG不仅具有化学预防和抗炎作用，还能抑制许多不同器官肿瘤细胞的生长和诱导其凋亡，譬如胃、食管、肺和前列腺等. 虽然EGCG诱导凋亡的分子机制尚不太明了，但目前研究表明主要同其抗氧化作用，调节致癌物的代谢和抑制细胞增殖等有关. Bcl-2家族蛋白如Bcl-2, Bax和Bcl-xl等定位于线粒体膜上，实验证实Bcl-2家族蛋白可以影响PT通道开放、Cyto-c及AIF的释放，改变线粒体外膜的通透性. 我们前期的实验表明，EGCG可以通过线粒体途径激活Caspase-3，从而诱导人胃癌细胞株MKN45的凋亡[2]. 因此我们推测EGCG诱导人胃癌细胞株的凋亡涉及Bcl-2家族相关基因的蛋白表达改变，并通过影响线粒体途径上一系列事件，进而诱导凋亡.

1 材料和方法

1.1 材料 EGCG单体购自中国农科院茶叶研究所，纯度为99%，溶解于RPMI-1640中，即配即用; RPMI-1640为美国Gibcol公司产品; 小鼠抗人Bcl-2 mAb(sc-7382)、兔抗人Bcl-xl mAb(sc-7195)、小鼠抗人Bad mAb(sc-8044)、兔抗人Bax多克隆抗体(sc-526)和兔抗人Bid多克隆抗体(sc-11423)等一抗购自Santa Cruz公司，二抗驴抗兔IgG-HRP(sc-2317)及驴抗小鼠IgG-HRP(sc-2318)也均购自Santa Cruz公司.

1.2 方法 人胃癌细胞株MKN 45为本所细胞室保存; 细胞培养基为RPMI-1640，内含100 mL/L灭活胎牛血清和100 kU/L青霉素及100 mg/L链霉素的完全培养液. 细胞置于含50 mL/L CO_2的CO_2孵箱中，在37℃、95%湿度条件下培养. 取对数生长期的MKN 45细胞，以1×10^8-2×10^8/L的浓度接种于25 cm^2培养瓶中，24 h后加入新鲜配置的EGCG，终浓度为80 μmol/L. 分别于干预后12, 24和36 h收集细胞.

1.2.1 总RNA抽提及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 总RNA抽提按TRIzol试剂(Invitrogen公司)说明书建议的步骤操作，在约含5×10^6个细胞的25 cm^2培养瓶中加入TRIzol试剂1 mL，吸管吹打2 min，裂解细胞. 将细胞裂解液移入1.5 mL Eppendoff管中，室温静置2-3 min; 4℃ 12 000 *g*离心15 min; 取最上层无色水相层(RNA相)移入另一Eppendoff管中，加入0.5 mL异丙醇，轻轻摇匀，室温静置10 min; 去上清夜，空气干燥30 min，重新溶于50 μL DEPC水中，经紫外分光光度法测定RNA纯度和浓度后，置于-70℃保存.

引物设计和合成: 根据GenBank中的基因序列，采用Primer Premier 5.0引物设计软件设计各凋亡相关基因的PCR扩增引物(表1)，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. RT-PCR: 按两步法分别进行RT-PCR. 先将mRNA逆转录为cDNA，再以cDNA为模板进行PCR扩增，RT-PCR结果重复3次. PCR反应条件: β-actin: 94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸10 min. Bax: 94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 62 ℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环35次; 72℃延伸10 min. Bid: 94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 56.3℃ 1 min,72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸10 min. Bcl-2: 94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 58.8℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环33次; 72℃延伸10 min. Bcl-xl: 94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 56 ℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环32次; 72℃延伸10 min. Bad: 94℃变

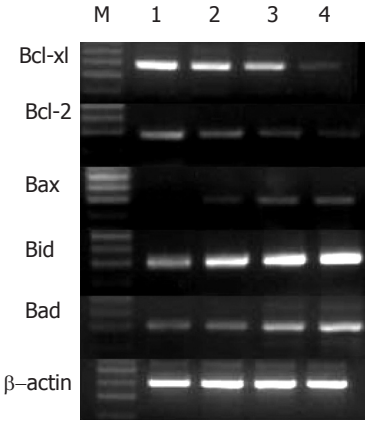


图 1 EGCG干预后Bcl-2家族相关基因mRNA改变情况. 1: 为对照未处理组; 2: 为处理后12 h; 3: 为处理后24 h; 4: 为处理后36 h.

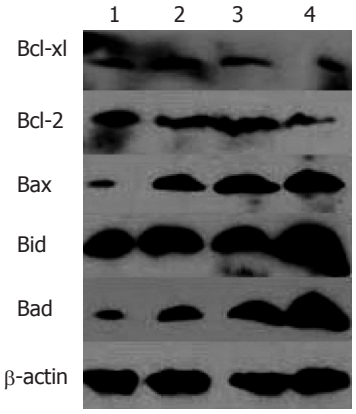


图 2 EGCG干预后Bcl-2家族相关蛋白改变情况. 1: 为对照未处理组; 2: 为处理后12 h; 3: 为处理后24 h; 4: 为处理后36 h.

表 1 Bcl-2家族相关基因的RT-PCR引物序列及相关信息

基因	引物序列	产物大小 (bp)	GenBank号
Bax	同义 5'- tct gac ggc aac ttc aac tg-3'	299	gi:34335114
	反义 5'- cac tgt gac ctg ctc cag aa-3'		
Bid	同义 5'- aca gca tgg acc gta gca tc-3'	302	gi:33150623
	反义 5'- gtc cat ccc att tct ggc ta-3'		
Bad	同义 5'- ccc aga gtt tga gcc gag tg-3'	314	gi:49456824
	反义 5'- gct gtg ctg ccc aga ggt t-3'		
Bcl-2	同义 5'- gga gga ttg tgg cct tct tt-3'	287	gi:179366
	反义 5'- tca ctt gtg gct cag ata ggc-3'		
Bcl-xl	同义 5'- gag gca ggc gac gag ttt-3'	491	gi:510900
	反义 5'- gac gga gga tgt ggt gga-3'		
β-actin	同义 5'- gga ctt cga gca aga gat gg-3'	404	gi:33878222
	反义 5'- aca tct gct gga agg tgg ac-3'		

性5 min; 94℃ 30 s, 57 ℃1 min, 72℃ 1 min, 循环32次; 72℃延伸10 min. 取PCR产物10 μL加6×上样缓冲液2 μL于含5 μL/dL goldviewTM核酸染料(北京赛百盛基因技术有限公司)的20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 紫外线下生物电泳图像分析系统(FR-200型, 上海复日科技有限公司)观察结果并拍照.

1.2.2 *总蛋白抽提和Western印渍* 总蛋白抽提: 小心倾去培养液后, 用预冷的PBS清洗贴壁的细胞两次, 倾去PBS. 向培养瓶中加入1 mL预冷的含有抑制剂的蛋白抽提试剂(1 mL抽提试剂中加入5 μL蛋白酶抑制剂混合液、5 μL PMSF和5 μL磷酸酶混合液)(购自康成公司), 轻轻摇动5 min, 再用预冷的细胞刮刮下贴壁细胞, 转移细胞悬浮液到离心管中, 冰浴下摇动30 min进行裂解. 将裂解液置于预冷的离心机中18 800 *g*离心15 min, 立刻转移上清液至新的离心管中, 并取一部分上清液进行BAC蛋白质定量. Western印渍: 蛋白质等量样品加入6×加样缓冲液, 煮沸变性5 min, 100 g/L SDS-PAGE 80 V电泳45 min及150 V电泳80 min, 然后100 V 1 h电转移至硝酸纤维素膜上. 丽春红S染色10 min以观察各电泳带蛋白量是否一致. 5%(50 g/L)脱脂牛奶TBST(Tween 20/TBS)缓冲液室温封闭2 h, 分别加入一抗β-actin(1∶1000)、Bax (1∶1000)、Bcl-2 (1∶500)、Bad (1∶1000)、Bcl-xl(1∶5000)和Bid(1∶1000), 4℃过夜. PBS洗涤20 min, 再用TBS洗涤20 min. 然后与结合有辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶3000)室温孵育1 h, TBS洗涤40 min, Supersignal West Femto Kit(PIERCE公司, 美国)法检测, 硝酸纤维素膜与检测液反应5 min, X胶片曝光1 min, 显影.

表 2 EGCG干预后Bcl-2家族蛋白相对改变情况 (mean ± SD)

蛋白	Bax/Actin	Bad/Actin	Bid/Actin	Bcl-2/Actin	Bcl-xl/Actin
0 h	0.6292 ± 0.08	0.4327 ± 0.02	1.1214 ± 0.08	0.8112 ± 0.04	0.6444 ± 0.01
12 h	0.6454 ± 0.04	0.7531 ± 0.01	1.3697 ± 0.07	0.6716 ± 0.08	0.6060 ± 0.02
24 h	0.8069 ± 0.09	1.2827 ± 0.02	1.610 ± 0.09	0.4664 ± 0.03	0.5647 ± 0.04
36 h	0.8992 ± 0.07	1.6388 ± 0.09	2.0623 ± 0.12	0.3146 ± 0.01	0.5487 ± 0.11

统计学处理 所有实验均重复3次, 结果以均数±标准差表示. 各组间数据的差异应用SAS 6.12统计软件包, $P<0.05$时认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 EGCG对Bcl-2家族相关基因mRNA表达的影响 EGCG处理人胃癌细胞株MKN 45细胞, 终浓度为80 μmol/L, 运用半定量RT-PCR检测处理后12, 24和36 h Bcl-2家族相关基因mRNA表达情况. 随EGCG作用时间的延长, Bcl-xl和Bcl-2的mRNA表达逐渐减弱 ($P<0.05$), 而Bax, Bid和Bad的mRNA表达逐渐增强 ($P<0.05$)(图1).

2.2 EGCG对Bcl-2家族相关基因蛋白表达的影响 以终浓度为80 μmol/L EGCG干预人胃癌细胞株MKN 45细胞, 运用Western Blot法分别检测干预后12, 24和36 h等时间点的蛋白表达情况, Bcl-xl和Bcl-2的蛋白表达水平同样随EGCG作用时间延长逐渐减弱($P<0.05$), 而Bax, Bid和Bad的蛋白表达则逐渐增强 ($P<0.01$)(表2, 图2).

2.3 Bcl-2/Bax比值 通过软件分析获得Bcl-2和Bax蛋白的光密度值, 并计算Bcl-2/Bax比值. 随EGCG作用时间的延长, Bcl-2/Bax比值逐渐降低 ($P<0.05$).

3 讨论

胃癌是我国常见的肿瘤之一, 为全部恶性肿瘤的第3位, 占消化道肿瘤的首位. 胃癌的死亡率相当高, 其年死亡率为25.21/10万, 是各种恶性肿瘤中的第1位. 虽然近些年来胃癌在我国发病率有降低趋势, 但作为重大疾病, 胃癌的防治在我国的形势依旧十分严峻, 亟待发掘新的有效的治疗策略. 绿茶是三大茶系之一, 绿茶多酚占绿茶干重的30%, 大多数是黄酮醇类儿茶素. 许多流行病学研究都表明饮用绿茶同众多部位发生肿瘤的危险度偏低相关, 尤其是胃、食管和肺等. 体内实验也显示, 服用茶提取物或茶多酚能抑制裸鼠的乳腺癌和前列腺癌的生长[3]. 饮茶在亚洲较为盛行, 因此利用茶叶或茶叶成分预防和治疗肿瘤极具前景. EGCG是儿茶素中主要的成分, EGCG具有强的抗氧化作用, 能广泛地诱导肿瘤细胞凋亡. 许多研究表明, EGCG在体内和体外都均能抑制肿瘤的生长, 包括肺癌、胃癌、前列腺癌, 皮肤癌、结肠癌、肝癌和乳腺癌等. 虽然EGCG的癌症预防作用机制尚未完全阐明, 但一般与诱导凋亡及抑制端粒酶活性相关. 我们先前的研究业已表明EGCG可以通过线粒体途径激活Caspase-3, 从而诱导人胃癌细胞株的凋亡. 因此在本研究中我们进一步检测了针对于线粒体途径上其他相关作用蛋白, 如Bcl-2家族相关蛋白.

Bcl-2家族蛋白包括抗凋亡因子(Bcl-2、Bcl-xl和Mcl-1等)、促凋亡因子(Bax和Bak等)及只含BH3结构域蛋白(Bim和Bid等). 该家族为细胞凋亡的线粒体通路中最重要的调控因子, 决定细胞色素C从线粒体释放至胞质. Bcl-x通过剪切可形成Bcl-xl和Bcl-xs两个产物, Bcl-xl与Bcl-2同源, 两者通过抑制细胞色素C从线粒体的释放和阻止Bak与Bax蛋白的移位来发挥他们的抗凋亡作用. Bcl-xl同时抑制由凋亡刺激或氧化磷酸化抑制剂导致的线粒体肿胀, 并与Bax形成异二聚体[4]. Caspase 8分解Bid成截短的Bid移位到线粒体, 使Bak和Bax寡聚体化形成孔隙, 以利于细胞色素C从线粒体的释放, 并放大Caspase激活后的下游信号. 促凋亡家族的Bax正常是以非活性状态存在于胞质中, 但一旦受到凋亡刺激, 就会被激活并插入到线粒体外膜和内质网中. 在线粒体中, Bax形成释放细胞色素C和其他促凋亡因子的孔隙; 相比之下, 在内质网Bax诱导钙离子释放, 从而促进线粒体上释放细胞色素C的孔隙的打开[5]. 另外一个促凋亡家族的Bak以非活性状态存在于线粒体中, 一旦激活, 就发生寡聚体化, 促进线粒体外膜通透性增高和细胞色素C的释放. Bcl-2家族中大多数都可以形成同源或异源二聚体, Bax在体内除了结合Bcl-2形成异二聚体, 同样还可以形成同二聚体. 过度表达的

Bax可以抵消Bcl-2的抗凋亡活性[6-7]. 因此Oltvai *et al*[8]提出Bcl-2与Bax的比例决定凋亡刺激后是否生存或凋亡的模型. 1995年Yang *et al*[9]通过酵母双杂交实验筛选到新的Bcl-2相互作用蛋白Bad, 他具有Bcl-2蛋白的BH1和BH2同源结构域. Bad选择性与Bcl-2和Bcl-xl形成二聚体, 但不与Bax, Bcl-xs, Mcl-1和A1结合, 也不会形成同二聚体.

生理性细胞死亡过程-凋亡机器的损害是肿瘤发生及促进肿瘤对细胞化疗药物的反弹的关键因素. 当前治疗肿瘤的主要策略之一是激活细胞内凋亡程序, 离子辐射和化疗药物就是通过诱导凋亡杀死一些肿瘤细胞. 一旦细胞受到凋亡刺激, 线粒体内就会发生一系列事件, 包括释放细胞色素C. 抗凋亡Bcl-2家族蛋白(如Bcl-2和Bcl-xl)的表达可以抑制细胞色素C的释放, 而促凋亡的Bcl-2家族蛋白(如Bax和Bid)的表达则可以诱导细胞色素C的释放[10]. 肿瘤细胞常伴有Bcl-2及相关生存蛋白的过度表达, 这也正是其对化疗药物耐药原因之一[11]. 目前抗凋亡蛋白Bcl-2已成为成熟的抗肿瘤靶点, Oltersdorf *et al*[12]通过基于核磁共振技术的筛选方法找出了抗凋亡因子Bcl-2, Bcl-xl和Bcl-w的小分子抑制剂ABT-737, 应用于动物实验,并得到了初步肯定作用.

虽然在一些体外研究(如前列腺癌细胞等)中EGCG诱导的凋亡不改变细胞中Bcl-2, Bcl-xl和Bad的表达, 即与Bcl-2家族部分成员无关[13], 但在本实验中, EGCG处理人胃癌细胞株MKN 45后, Bcl-2表达下调, 而Bax的表达则上调, 从而提示Bcl-2和Bax是EGCG诱导人胃癌细胞株MKN 45凋亡的关键因素. 通过影响Bcl-2家族蛋白的表达, 调节细胞色素C的释放, 进而调控Caspase 3的激活, 因此更进一步说明了EGCG是通过线粒体途径诱导人胃癌细胞株MKN 45的凋亡.

4 参考文献

1 Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1881-1886

2 许琦, 冉志华, 萧树东. 表没食子儿茶素没食子酸酯对人胃癌细胞株MKN 45诱导凋亡作用的研究. 中华消化杂志 2005; 25: 594-597

3 Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells *in vitro* and *in vivo* systems. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1918-1927

4 Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7834-7838

5 Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391: 496-499

6 汤睿, 朱正纲. 凋亡途径与肿瘤治疗. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2469-2472

7 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression of bcl-2 protein in gastric carcinoma and its significance. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 228-230

8 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619

9 Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80: 285-291

10 Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999; 274: 1156-1163

11 Wang SS, Zhang T, Wang XL, Hong L, Qi QH. Effect of arsenic trioxide on rat hepatocellular carcinoma and its renal cytotoxity. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 930-935

12 Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435: 677-681

13 Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, Kwok TT. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci* 2001; 68: 1207-1214

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2918-2922
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

肝细胞癌变过程中胰岛素样生长因子Ⅱ的动态表达与改变特征

邱历伟, 姚登福, 宗 蕾, 吴 玮, 吴信华

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

邱历伟, 姚登福, 宗蕾, 吴玮, 吴信华, 南通大学附属医院临床分子生物学中心 江苏省南通市 226001
邱历伟, 南通大学肿瘤学硕士生, 主要从事肿瘤早期诊断及分子机制研究.
江苏省卫生厅项目, No. H200523
南通市社会发展科技计划, No. S5053
通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床分子生物学中心. yaodf@ahnmc.com
电话: 0513-85052523
收稿日期: 2006-08-16 接受日期: 2006-09-16

Dynamic expression and alteration characteristic of insulin-like growth factor-Ⅱ in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma

Li-Wei Qiu, Deng-Fu Yao, Lei Zong, Wei Wu, Xin-Hua Wu

Li-wei Qiu, Deng-Fu Yao, Lei Zong, Wei Wu, Xin-Hua Wu, Research Center of Clinical Molecular Biology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by Fund from Health Department of Jiangsu Province, No. H200523, and Nantong Social Development Project of Science and Technology, No. S5053
Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Molecular Biology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Province, China. yaodf@ahnmc.com
Received: 2006-08-16 Accepted: 2006-09-16

Abstract

AIM: To investigate the dynamic expression and alteration of insulin-like growth factor-Ⅱ(IGF-Ⅱ) during in the pathogenesis and development of hepatocellular carcinoma.

METHODS: Hepatoma models were induced with 2-fluorenylacetamide (2-FAA) in male Sprague-Dawley (SD) rats. The morphological changes of rat livers were observed by HE staining. The dynamic changes of IGF-Ⅱ in rat livers and sera were quantitatively analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Simultaneously, the expression and cellular distribution of IGF-Ⅱ were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Histological examination confirmed that the expression of IGF-Ⅱ was increased in gradient after granule-like degeneration, atypical hyperplasia and carcinoma appeared in hepatocytes, and it was significantly higher in carcinoma group than that in degeneration and control group (carcinoma vs degeneration, χ^2 = 9.55, P < 0.01; carcinoma vs control, χ^2 = 14.00, P < 0.01). IGF-Ⅱ was positively expressed inside the liver cancer cells, and there was positive correlation between tissue and serum IGF-Ⅱ expression (r = 0.97, P < 0.01).

CONCLUSION: IGF-Ⅱ is involved in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma, and its expression is up-regulated at the early stage of carcinoma, which can help to achieve early diagnosis and prognosis judgment.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Insulin-like growth factor Ⅱ; Immunohistochemistry; Enzyme linked immunosorbent assay

Qiu LW, Yao DF, Zong L, Wu W, Wu XH. Dynamic expression and alteration characteristic of insulin-like growth factor-Ⅱ in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2918-2922

摘要

目的: 观察肝细胞癌变过程中胰岛素样生长因子Ⅱ(IGF-Ⅱ)的动态改变及与病理学特征的关系.

方法: 以2-乙酰氨基芴(2-FAA)喂饲♂SD鼠诱发肝细胞发生癌变, 以病理学方法(HE染色)和酶联免疫吸附法(ELISA), 分别观察肝细胞形态学、肝及血IGF-Ⅱ的动态变化. 以免疫组织化学法分析肝组织IGF-Ⅱ表达与胞内定位.

结果: 组织学证实SD鼠在喂饲2-FAA后, 在肝细胞出现颗粒样变性、不典型增生到HCC的形成过程中IGF-Ⅱ呈梯度表达, 表现为癌组明显高于对照组和变性组(癌组 *vs* 变性组, χ^2 = 9.55, P<0.01; 癌组 *vs* 正常组, χ^2 = 14.00,

$P<0.01$), 大鼠肝癌中IGF-Ⅱ在肝细胞内呈阳性表达; 肝组织和外周血中IGF-Ⅱ呈显著正相关($r = 0.97$, $P<0.01$).

结论: IGF-Ⅱ参与肝细胞的癌变过程, 在癌变早期表达增加有助于肝癌早期诊断及预后判断.

关键词: 肝癌; 胰岛素样生长因子Ⅱ; 免疫组化; 酶联免疫吸附试验

邱历伟, 姚登福, 宗蕾, 吴玮, 吴信华. 肝细胞癌变过程中胰岛素样生长因子-Ⅱ的动态表达与改变特征. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2918-2922
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2918.asp

0 引言

肝癌(HCC)是由病毒、化学致癌物等多病因作用[1-3], 因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些酶基因重新复活等诸多因素引起肝细胞生长失控而致癌变, 经启动、促进、演变多阶段的发病过程, 其中基因的调控和表达、多种生长因子的活性等均与肝癌的发生、发展密切相关[4-6]. 胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)-Ⅱ是与胰岛素同源的多肽, 并具有胰岛素样活性, 引起不同类型细胞的有丝分裂[7]. 本文以免疫组织化学法分析了诱癌过程中IGF-Ⅱ在大鼠肝脏的胞内定位及表达, 并以酶联免疫吸附法测定了大鼠肝脏诱癌过程中IGF-Ⅱ水平在肝脏和血清中的变化趋势, 探讨了IGF-Ⅱ在肝癌发生、发展过程中的作用机制及其作为肝癌早期诊断标志物的可能性.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂Sprague-Dawley(SD)大鼠48只, 4-6 wk龄, 体质量120-160 g, 由南通大学实验动物中心提供, 清洁级. 分笼喂养于8个等大的笼中, 普通大鼠颗粒饲料由南通大学实验动物中心提供. 随机分为6只/笼, 随机挑选1个笼子的大鼠作为正常对照组, 其余为实验组(其中1组为备用组). 对照鼠给予一般颗粒饲料, 其余实验鼠以0.5 g/L的2-乙酰氨基芴(2-Fluorenylacetamide, 2-FAA, Sigma)颗粒饲料作恒环境饲养. 实验期间剔除死亡鼠, 以备用鼠补足. 每2 wk取1只正常鼠及1组实验鼠, 以乙醚轻度麻醉. 从心尖取血5 mL分离血清, 置-20℃冰箱保存; 肝组织洗去血迹, 部分用40 g/L中性甲醛液固定作病理学检查(HE染色)和免疫组织化学染色, 其余组织置-80℃保存(Sanyo超低温冰箱).

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝组织的HE染色观察 肝组织经40 g/L中性甲醛液固定, 脱水、透明、石蜡包埋后, 经切片(厚度4 μm)、展片、贴片、烤片后制成空白片. 经脱蜡、水化, 苏木素染色, 分化、反蓝, 伊红浸染, 脱水、透明、封片后制成苏木素-伊红(HE)染色切片. OLYMPUS BX 50光学显微镜(日本OLYMPUS公司)下观察.

1.2.2 免疫组织化学染色(链霉亲和素-生物素法, S-P法) 新鲜鼠肝组织经取材、固定、浸蜡, 作成厚度4 μm的组织切片; 常规脱蜡、水化; 双氧水阻断内源性过氧化物酶; 高压加热法修复抗原; 正常动物血清封闭非特异性结合; 滴加IGF-Ⅱ抗体, 4℃过夜, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗; 滴加生物素标记的第二抗体, 室温孵育10 min, PBS漂洗; 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶, 室温孵育10 min, PBS冲洗; 滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺(DAB)溶液, 室温显色, 蒸馏水洗涤; 苏木素复染. 无水乙醇脱水透明、封片. OLYMPUS BX 50光学显微镜观察、摄像. 以0.01 mol/L PBS液(pH7.5)分别替代一抗、二抗和SP试剂作阴性对照, 已知表达IGF-Ⅱ的乳腺癌组织作阳性对照. 组织中显示棕黄色颗粒为IGF-Ⅱ表达阳性. 肝组织中IGF-Ⅱ表达强度: +, 阳性细胞数为10%-25%; ++, 阳性细胞数为26%-50%; +++, 阳性细胞数为>50%.

1.2.3 鼠肝细胞质蛋白浓度测定 取肝组织60 mg左右, 剪碎. 按20∶1混合适当量的细胞质蛋白抽提试剂(碧云天)A和B, 加入PMSF至终浓度为1 mmol/L配制成组织匀浆液. 取匀浆液200 μL与组织混合, 充分匀浆. 冰浴15 min, 4℃ 15 000 *g*离心5 min. 分离上清至一预冷的塑料管中, 为部分质蛋白. 每20 μL沉淀加入添加了PMSF的试剂A 200 μL. 高速剧烈振摇5 s, 使沉淀完全悬浮分散开. 冰浴15 min. 加试剂B 10 μL. 高速剧烈振摇5 s, 冰浴1 min. 高速剧烈振摇5 s, 4℃ 12 000-16 000 *g*离心5 min. 立即吸取上清至上述塑料管中, 即为抽提得到的质蛋白. 肝细胞质蛋白浓度以BCA法测定, 按50∶1混合BCA试剂A、B配制适量BCA工作液. 蛋白标准品稀释10倍. 稀释后的标准品按0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL加至标准品孔中, 加水补足到20 μL. 加适当体积样品至样品孔中, 加水稀释到20 μL. 各孔加入BCA工作液200 μL, 37℃放置30 min. 测定A_{578}. 根据标准曲线计算出蛋白浓度.

■研发前沿

目前, 通过监测肝癌患者血清中IGF-Ⅱ水平以阐明其在肝癌发生、发展过程中的意义及其作为早期诊断肝癌标志物的可行性的研究较为深入, 但通过动物实验直接观察大鼠肝脏诱癌过程中IGF-Ⅱ表达与改变的研究尚较少见.

■创新盘点
关于IGF-Ⅱ水平与肝癌关系的研究目前大都集中在临床血清学检测方面. 本文则在大鼠肝脏诱癌的动物实验中, 以病理学方法(HE染色)和酶联免疫吸附法(ELISA), 分别观察肝细胞形态学、肝及血IGF-Ⅱ的动态变化. 以免疫组织化学法分析肝组织IGF-Ⅱ的表达、胞内定位及变化规律.

表 1 诱癌过程鼠肝细胞的病理组织学变化(n)

分组	n	肝组织病理组织学形态变化			
		正常	变性	癌前	癌变
对照组	6	6	0	0	0
实验组第2周	6	0	6	0	0
第4周	6	0	6	0	0
第6周	6	0	5	1	0
第8周	6	0	3	2	1
第10周	6	0	2	1	3
第12周	6	0	0	2	4
总计	42	6	22	6	8

1.2.4 大鼠IGF-Ⅱ测定 大鼠IGF-Ⅱ以大鼠IGF-Ⅱ ELISA Kit/96T(ADL公司)分析. 浓缩洗涤液稀释50倍. 辣根过氧化物酶(HRP)稀释60倍. 标本稀释50000倍. 加入标准品100 μL、已稀释标本100 μL于相应反应板孔中. 轻轻混匀30 s, 25℃温育20 min. 反复洗板3次. 加生物素化的抗大鼠IGF-Ⅱ100 μL. 轻轻混匀30 s, 25℃温育20 min. 反复洗板3次. 加100 μL×HRP. 轻轻混匀30 s, 25℃温育10 min. 反复洗板3次. 每孔加入100 μL TMB显色液, 轻轻混匀10 s, 25℃温育20 min. 每孔加入终止液100 μL. 轻轻混匀30 s; 测定A_{450}. 根据标准曲线计算其浓度.

统计学处理 所有数据以均数±标准差表示, 多个样本均数间的比较先进行方差齐性检验, 再进行方差分析, 两样本均数的比较采用t检验, 样本率之间的比较采用Fisher确切概率法; 相关性用直线相关分析. 以$P<0.05$表示差异有显著性.

2 结果

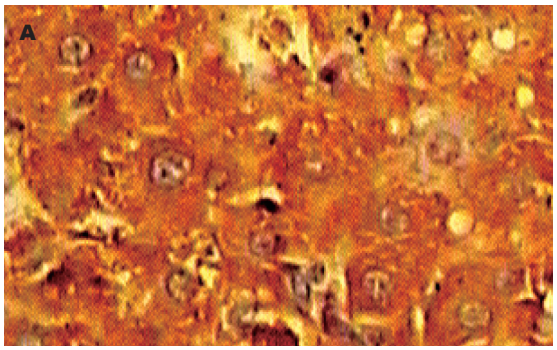
2.1 诱癌过程中大鼠肝细胞的病理组织学变化 在2-FAA的诱癌过程中, 大鼠肝细胞在形态学上发生了明显变化, 诱癌不同时期大鼠肝脏病理学变化的实际发生情况见表1. 在鼠肝细胞癌变阶段, 经组织学检查发现: 在诱癌早期, 肝细胞胞质出现颗粒样变性, 偶见大的异型胞核(肝细胞变性组); 中期阶段肝板细胞层次增多, 局灶细胞层次超过3层, 细胞核染色质增粗, 核质比例增大(癌前病变组); 在诱癌的后期, 可见肝组织结构消失, 肝细胞排列成巢状、粗条索状, 细胞核中等大, 核染色质增粗, 核质比例增大, 均为高分化HCC(肝细胞癌变组).

2.2 大鼠肝细胞癌变过程中IGF-Ⅱ的表达及动态改变 IGF-Ⅱ表达阳性物质呈棕黄色颗粒, 主要定位于胞质, 少数细胞出现胞核着色, 胞膜未见着色(图1). 随着大鼠肝组织癌变的发生, IGF-Ⅱ阳性率逐渐增高, 正常鼠无阳性表达, 变性组阳性率仅为36.36%, 癌前组与癌变组明显上升, 阳性率已达100%, 差别均有显著性意义($P<0.01$). 而且IGF-Ⅱ表达强度呈增强趋势, 在变性鼠阳性中多呈"+"表达水平, 癌前鼠已有3例达"++"或"+++"水平, 而癌变组的8例中有5例为"+++"水平(表2).

表 2 肝细胞癌变过程中IGF-Ⅱ表达强度与动态改变的定性分析(%)

分组	n	IGF-Ⅱ阳性(%)	表达强度			
			−	+	++	+++
正常组	6	0 (0)	6	0	0	0
变性组	22	8 (36.36)	14	6	1	1
癌前组	6	6 (100)[a]	0	3	2	1
癌变组	8	8 (100)[b]	0	1	2	5

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 正常组及变性组.



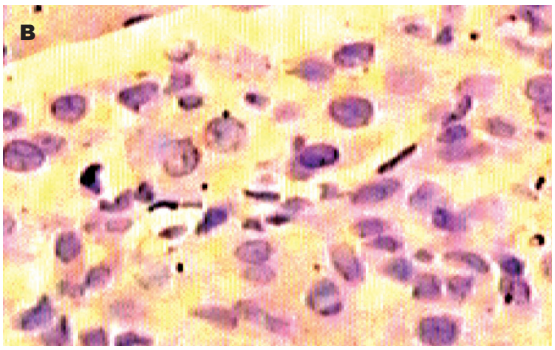


图 1 IGF-Ⅱ表达免疫组化分析(SP×400). A: 模型鼠肝癌; B: 对照鼠肝.

2.3 诱癌过程中大鼠肝脏和血清中IGF-Ⅱ的动态改变 在大鼠肝细胞诱癌过程中, 肝细胞质IGF-Ⅱ的表达水平随肝组织学形态的改变呈增高趋势, 表现为癌变组>癌前病变组>肝细胞变性组>正常对照组, 其变化趋势有显著性意义($F=13.2$, $P<0.01$). 肝细胞质中IGF-Ⅱ平均浓度在癌

表 3 诱癌过程中鼠血和肝组织中IGF-II水平的动态改变的定量分析

分组	*n*	血IGF-II (mean ± SD, ng/L)	*t*	*P*	肝IGF-II (mean ± SD, μg/g蛋白)	*t*	*P*
正常组	6	86.4 ± 14.7	9.03	<0.01	21.7 ± 4.5	16.39	<0.01
变性组	22	174.2 ± 43.4	6.75	<0.01	54.9 ± 12.8	6.79	<0.01
癌前组	6	274.1 ± 24.1	4.30	<0.01	70.3 ± 8.4	2.42	<0.05
癌变组	8	450.3 ± 112.6			80.7 ± 7.4		

t, *P*均为癌变组与其他三组比较结果.

■应用要点
本文为进一步探讨IGF-Ⅱ在肝癌发生、发展过程中的作用机制及其表达规律提供了新的研究思路和方法, 今后可从基因水平对IGF-Ⅱ的表达做进一步的研究.

前病变组明显高于正常组(t = 12.46, P<0.01)及变性组(t = 3.50, P<0.01); 癌变组明显高于正常组(t =16.39, P<0.01)、变性组(t = 6.79, P<0.01)和癌前病变组(t = 2.42, P<0.05). 肝脏IGF-Ⅱ释放入血后, 引起血清中IGF-Ⅱ增加. 血IGF-Ⅱ浓度, 正常肝对照组>肝细胞变性组>癌前病变组>肝细胞癌变组, 呈明显梯度升高, 差别有显著性意义(F = 48.1, P<0.01), 其中癌前病变组显著高于正常组(t =16.18, P<0.01)及变性组(t = 7.40, P<0.01); 癌变组显著高于正常组(t = 9.03, P<0.01)、变性组(t = 6.75, P<0.01)及癌前病变组(t = 4.30, P<0.01). 血清与肝细胞质中IGF-Ⅱ浓度的变化呈显著正相关(r = 0.97, t = 5.97, P<0.01)(表3).

3 讨论

IGF-Ⅱ为小分子肽, 由67个氨基酸残基组成(MW 7.5 kDa), 分子中含有3个链内二硫键, 其分子结构与胰岛素前体具有较高同源性, 他对体内多种组织中的代谢、细胞生长和分化具有调节作用. 成人肝脏是IGF主要的生物合成及内分泌场所, 但在人体, 除肝外的大部分组织也具有外分泌或旁分泌产生IGF的能力, IGF-Ⅱ型受体则可能参与IGF-Ⅱ的降解[8]. 以蛋白质复合形式存在的IGF易于与其受体结合以调节其活性, 体内的生长激素参与调控IGF的表达[9]. 血清中IGFs与特异结合蛋白具有高度亲和力, 现已鉴定出的结合蛋白(BP)有6种,分别命名为IGFBP1-6. 外周血中IGFs是由IGF、IGFBP和对酸敏感的亚单位组成, 大约为150 kd的高分子复合物, 结合形式的IGFs可延长其半寿期, 防止如低血糖血症的急性胰岛素样作用出现. 此外血中也存在31-40 kd二聚体IGFs形式, 他易于通过毛细血管壁到达靶组织而发挥生物学效应[8,10].

体内IGF-Ⅱ是肝细胞癌变过程中发挥重要作用的生长因子, 他通过IGF-Ⅰ受体上的酪氨酸激酶途径合成与活化[11-13]. IGF-Ⅱ的活化与表达过程, 已在化学诱癌鼠、转基因鼠和肝炎病毒慢性感染的实验动物及肝组织中得到证实[14-15]. 转基因鼠中若持续表达IGF-Ⅱ, 则肝细胞癌和淋巴瘤的发病频率增加. 在肝细胞癌变过程中, 胚胎型IGF-Ⅱ基因活化, 使IGF-Ⅱ呈高水平状态[16]. 肝细胞癌变过程中IGF-Ⅱ呈高度表达的机制尚不十分清楚, 可能与IGF-Ⅱ通过自分泌或旁分泌作用促进细胞转化有关. 本研究以免疫组织化学法分析了大鼠诱癌过程中IGF-Ⅱ的表达与变化, 并以酶联免疫吸附法对大鼠肝组织和血清中IGF-Ⅱ水平在诱癌过程中的变化趋势和相互关系进行了分析. 研究发现大鼠肝脏IGF-Ⅱ表达阳性率在癌前病变组及癌变组均明显高于正常组和变性组, 且其表达水平也呈升高趋势. 大鼠肝脏和血清中IGF-Ⅱ浓度的变化趋势也显示, 诱癌过程中癌前病变鼠肝组织及血清IGF-Ⅱ水平均明显高于正常组及变性组, 而癌变鼠肝组织及血清IGF-Ⅱ水平又显著高于正常组、变性组及癌前病变组, 且肝组织和血清中IGF-Ⅱ的变化趋势有明显的相关性. 证实IGF-Ⅱ在肝细胞癌变的发生、发展过程中均具有重要作用. 其主要机制可能为诱癌因素导致IGF-Ⅱ基因的异常激活和过量表达, 促使具有高增殖活性状态的癌前肝细胞转化, 最终导致肝癌发生, 同时IGF-Ⅱ的表达水平亦同步反映肝脏病变的程度[17-18].

肝癌细胞置于缺氧状态中培养6 h, 发现IGF-Ⅱ mRNA增加,提示缺氧可能是肝细胞癌变过程中诱导IGF-Ⅱ表达的重要因素[19-20]. 肝癌为典型的血管丰富的肿瘤, IGF-Ⅱ在肝癌的新血管形成过程中起重要作用. 在肝癌细胞培养的一定时间内, IGF-Ⅱ增加同时引起血管内皮生长因子(VEGF)-mRNA和蛋白质浓度的增加. 他们均为缺氧引起的表达, 可以认为IGF-Ⅱ为肝癌的一种缺氧诱导血管生成因子[21]. 由于肝硬变再生结节和肝癌细胞的快速分裂可导致肝脏供血不足, 造

■同行评价
作者通过制作化学性致肝癌模型，监测癌变过程中IGF-Ⅱ及肝细胞病理变化对于进一步揭示肝细胞恶变机制有一定意义，同时为临床上应用IGF-Ⅱ检测来早期诊断肝癌提供一定理论依据．选题先进，实验设计合理可靠．

成局部缺氧状态，促使IGF-Ⅱ合成增加，并作为血管活性因子间接促进血管内皮生长因子的合成，刺激HCC新生血管的形成[22]．此外，在HCV感染的慢性肝病发展过程中，IGF-Ⅱ的启动子P_1、P_3和P_4水平呈进行性增加，其中胚胎型P_3呈显著表达，提示在癌前期肝细胞分化中IGF-Ⅱ呈过度表达，并参与肝细胞的癌变过程[23]．

4 参考文献

1 Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390-395

2 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 3717-3726

3 Ji GZ, Wang XH, Miao L, Liu Z, Zhang P, Zhang FM, Yang JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 644-648

4 Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 761-769

5 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346

6 Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 220-226

7 Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54: 138-144

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

9 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660

10 Yao DF, Dong ZZ, Liu YH, Zhao L, Huang JF, Meng XY. Amplification of peripheral blood insulin-like growth factor II-mRNA and its clinical significance in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 695-696

11 Aihara T, Noguchi S, Miyoshi Y, Nakano H, Sasaki Y, Nakamura Y, Monden M, Imaoka S. Allelic imbalance of insulin-like growth factor II gene expression in cancerous and precancerous lesions of the liver. *Hepatology* 1998; 28: 86-89

12 Huynh H, Chow PK, Ooi LL, Soo KC. A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ* 2002; 13: 115-122

13 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 303-307

14 Zhang N, Siegel K, Odenthal M, Becker R, Oesch F, Dienes HP, Schirmacher P, Steinberg P. The role of insulin-like growth factor II in the malignant transformation of rat liver oval cells. *Hepatology* 1997; 25: 900-905

15 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001; 283: 167-177

16 Fiorentino M, Grigioni WF, Baccarini P, D'Errico A, De Mitri MS, Pisi E, Mancini AM. Different in situ expression of insulin-like growth factor type II in hepatocellular carcinoma. An in situ hybridization and immunohistochemical study. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 59-65

17 Zhang J, Chan EK. Autoantibodies to IGF-II mRNA binding protein p62 and overexpression of p62 in human hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 146-153

18 Seo JH, Kim KW, Murakami S, Park BC. Lack of colocalization of HBxAg and insulin like growth factor II in the livers of patients with chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 1997; 12: 523-531

19 Sedlaczek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. *Br J Cancer* 2003; 88: 733-739

20 Kang-Park S, Lee YI, Lee YI. PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Lett* 2003; 545: 203-208

21 Lee YM, Bae MH, Lee OH, Moon EJ, Moon CK, Kim WH, Kim KW. Synergistic induction of *in vivo* angiogenesis by the combination of insulin-like growth factor-II and epidermal growth factor. *Oncol Rep* 2004; 12: 843-848

22 He Z, Opland DM, Way KJ, Ueki K, Bodyak N, Kang PM, Izumo S, Kulkarni RN, Wang B, Liao R, Kahn CR, King GL. Regulation of vascular endothelial growth factor expression and vascularization in the myocardium by insulin receptor and PI3K/Akt pathways in insulin resistance and ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 787-793

23 Elsammak MY, Amin GM, Khalil GM, Ragab WS, Abaza MM. Possible contribution of serum activin A and IGF-1 in the development of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients suffering from combined hepatitis C virus infection and hepatic schistosomiasis. *Clin Biochem* 2006; 39: 623-629

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2923-2927
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

Egr-1基因表达及其在射线诱导的肝癌细胞凋亡中的作用

董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 刘 伟, 金 茜, 张淑云

董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤放射治疗科 黑龙江省哈尔滨市 150086
刘伟, 金茜, 张淑云, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
董广璐, 1993年哈尔滨医科大学硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事肿瘤放射治疗.
黑龙江省科技计划攻关项目, No. GC03C606-4
通讯作者: 张淑云, 150086, 哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心.
Zhshuyun136@yahoo.com.cn
电话: 0451-86605487 传真: 0451-86688011
收稿日期: 2006-09-04 接受日期: 2006-10-12

Early growth response-1 gene expression and its role in radiation-induced apoptosis of liver cancer cell lines

Guang-Lu Dong, Li-Na Xing, Xiao-Bin Liu, Wei Liu, Qian Jin, Shu-Yun Zhang

Guang-Lu Dong, Li-Na Xing, Xiao-Bin Liu, Department of Tumor Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Wei Liu, Qian Jin, Shu-Yun Zhang, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Key Science and Technology Project of Heilongjiang Province, No. GC03C606-4
Correspondence to: Shu-Yun Zhang, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. Zhshuyun136@yahoo.com.cn
Received: 2006-09-04 Accepted: 2006-10-12

Abstract

AIM: To study the relationship between radiation-induced apoptosis and the expression of early growth response-1 (Egr-1) gene in liver cancer cell lines.

METHODS: The cultured cells (HepG2, SMMC-7721 and HL-7702) were irradiated at 4Gy X-radiation. The expression of Egr-1 gene was detected by fluorescent quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR) before and 1, 2, 4, 6, 12, 24 h after irradiation. Cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM).

RESULTS: The expression of Egr-1 was increased from 1 to 4 h after irradiation in the three kinds of cell lines HepG2, SMMC-7721 and HL-7702, and the highest expression was in HepG2 cells (ΔEgr_{HepG2} = 12.9629 ± 1.0649), which was significantly higher than that in SMMC-7721 or HL-7702 cells (ΔEgr_{7721} = 0.0017 ± 0.0003, ΔEgr_{7702} = 0.0096 ± 0.0008, $P < 0.01$). Radiation-induced apoptosis was not significant 6 h after irradiation in all the three cell lines, but it reached the peak value at 12 in HepG2 (41.16%) and HL-7702 cells (27.45%). Radiation-induced apoptosis was still relatively low in SMMC-7721 cells at 24 h (24.94%). Radiation-induced changes of S phase and apoptosis was opposite in the tendency from 6 to 12 h in HepG2 and SMMC-7721 cells.

CONCLUSION: X-radiation may induce cell-cycle changes and cell apoptosis by up-regulation of Egr-1 gene expression, and radiation-induced apoptosis may be associated positively with Egr-1 expression level. HepG2 and SMMC-7721 cells of S phase might be susceptible to apoptosis after irradiation.

Key Words: X-radiation; Early growth response-1; Cell cycle; Apoptosis; Liver cancer cell line

Dong GL, Xing LN, Liu XB, Liu W, Jin Q, Zhang SY. Egr-1 gene expression and its role in radiation-induced apoptosis of liver cancer cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2923-2927

摘要

目的: 研究Egr-1基因的表达在放射诱导的细胞凋亡中的作用.

方法: 选择肝癌细胞系HepG2, SMMC-7721和正常肝细胞系HL-7702培养; 培养细胞接受4Gy X射线照射; 收获受照前和受照后1, 2, 4, 6, 12和24 h的细胞, 采用荧光定量PCR(FQ-PCR)检测0, 1, 2和4 h Egr-1基因的表达, 采用流式细胞术(FCM)检测0, 6, 12和24 h细胞周期和细胞凋亡.

结果: 随HepG2, SMMC-7721和HL-7702

■背景资料

目前的研究表明, 射线照射与某些起转录因子作用的早期基因激活有关, 如jun, fos和Egr-1等. Egr-1是早期生长反应因子基因(Egr)家族成员之一, 该家族包括Egr-1, Egr-2, Egr-3, Egr-4, Egr-α和Wilms肿瘤抑制因子1基因 (WT1). Egr-1基因启动子区含有6个高度保守的$CC(A+T)_6GG$模体(motif), 可感受电离辐射产生的氧自由基, 而在其表达产物的羧基端有1个含3个锌指结构的区域, 可与DNA序列5'-GCG(T/G)GGGCG-3'或5'-TCC(T/A)CCTCCTCC-3'结合, 诱导下游基因的表达, 如TGF-β1, PTEN, p53, p73和TNF-α, 他们都是诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡的效应基因. 所以Egr-1基因在射线诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡中可能起关键作用.

■研发前沿
Egr-1基因在放射生物学反应中的作用及其启动子序列在放射诱导的基因治疗中的应用是目前关注的热点.

在4Gy X射线照射后1 h即诱导了Egr-1基因表达增高, 4 h均未达峰值, 分别为ΔEgr_{HepG2}(12.9629±1.0649)、ΔEgr_{7702} (0.0096±0.0008)和ΔEgr_{7721}(0.0017±0.0003), HepG2显著高于HL-7702和SMMC-7721(P<0.01). 照射后6 h射线诱导的3株细胞凋亡均不明显, 但在12 h均诱导了明显的细胞凋亡, 而且HepG2(41.16%)和HL-7702(27.45%)已达峰值; SMMC-7721诱导的细胞凋亡水平较低, 24 h仅为24.94%, 且未达峰值. 在射线诱导的细胞周期变化中, HepG2和SMMC-7721 S期的变化与细胞凋亡变化在6-12 h走势相反.

结论: 在HepG2, SMMC-7721和HL-7702细胞中, 射线通过诱导Egr-1基因表达而诱导了细胞周期和细胞凋亡的变化; 射线诱导的Egr-1基因表达水平可能与射线诱导的细胞凋亡成正相关; S期肿瘤细胞可能易发生射线诱导的细胞凋亡.

关键词: X射线; Egr-1基因; 细胞凋亡; 细胞周期; 肝癌细胞系

董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 刘伟, 金茜, 张淑云. Egr-1基因表达及其在射线诱导的肝癌细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2923-2927
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2923.asp

0 引言

早期生长反应因子1(early growth response-1, Egr-1)基因启动子区含有6个高度保守的CC(A+T)$_6$GG模体(motif), 可感受电离辐射产生的氧自由基的刺激而诱导基因表达[1-4]. 在Egr-1基因表达产物(EGR-1)的羧基端有1个含3个锌指结构的区域, 可与DNA同意序列5'-GCG(T/G)GGGCG-3'或5'-TCC(T/A)CCTCCTCC-3'结合. 已在许多基因的启动子区域发现该类DNA序列, 如转录因子、生长因子、受体、细胞周期调控子和促凋亡等基因[5-6]. 所以, 由射线诱导的Egr-1基因表达, 可能是射线诱导的细胞周期阻滞和(或)细胞凋亡的关键因素. 为此, 我们对肝癌细胞系HepG2, SMMC-7721和正常肝细胞系HL-7702射线诱导的Egr-1基因表达水平, 以及射线诱导的细胞周期和细胞凋亡的变化进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系HepG2, SMMC-7721和正常肝细胞系HL-7702均购于中国医学科学院肿瘤研究所; 流式细胞术(FCM)检测所用试剂为Becton Dickinson公司的试剂盒(CycleTEST™ PLUSDNA Reagent Kit); 由上海生物工程有限公司合成; SYBR GreenⅠ和荧光定量PCR(FQ-PCR)反应试剂(RealMasterMix)由Tiangen Biotech(Beijing)公司提供; 其他试剂均购于Promega公司. 直线加速器为XHA600C(山东新华医疗器械厂); 流式细胞仪为Becton Dickinson FACsort(美国BD公司). FQ-PCR仪为LightCycler(美国Roche公司). 普通PCR仪Bioer XP Cycler(中国博日公司).

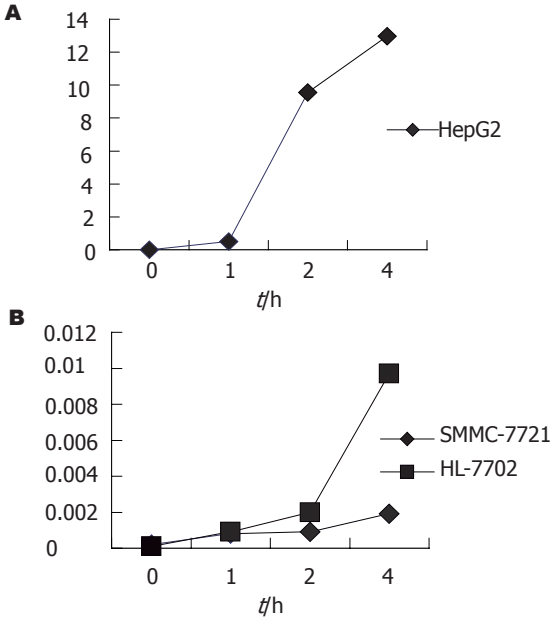


图 1 4Gy射线照射前后Egr-1(Egr-1 mRNA/actin mRNA)的表达水平. A: HepG2; B: SMMC-7721和HL-7702.

1.2 方法 HepG2, SMMC-7721和HL-7702用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养, 5×10^{5}个/孔接种6孔板, 培养48 h. 用4Gy X线照射(剂量率: 250 cGy/min). 继续培养受照细胞. 按试剂盒要求收获照射前和照射后1, 2, 4 h的细胞用于基因表达水平检测. 采用荧光染料(SYBR GreenⅠ)标记的荧光定量PCR(FQ-PCR)技术. 引物设计参照文献[6-7], β-actin: 上游引物5'-CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT-3', 下游引物5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'; Egr-1: 上游引物5'-AAAGTTTGCCAGGAGCGATG-3', 下游引物5'-CAGGGGATGGGTATGAGGTG -3'. FQ-PCR反应体系20 μL, 含2.5xRealMasterMix 8 μL, 20xSYBR GreenⅠ 1 μL, 上下游引物各1 μL, cDNA 2 μL(50-100 ng总RNA逆转录产物). 反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 58℃退火40 s和72℃延伸20 s, 40个循环, 于每个循环延伸结束后, 以SINGLE方式检测F1通道的荧光强度.

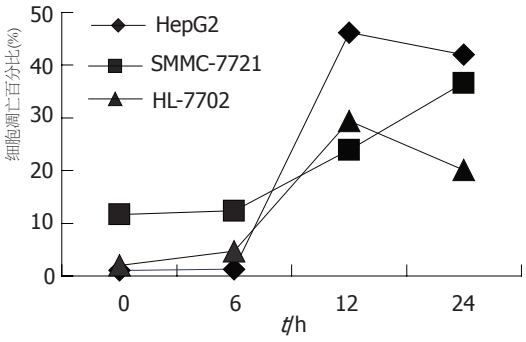


图 2 3株细胞4Gy射线照射前后细胞凋亡的变化.

按试剂盒要求将β-actin和Egr-1的普通PCR产物纯化, 连接到pEM-T载体上, 构建标准质粒pEM-actin和pEM-Egr. 常规提取标准质粒, 建立荧光定量标准曲线. 按试剂盒要求收获照射前和照射后6, 12和24 h的细胞, 并用流式细胞术进行细胞周期和细胞凋亡检测.

统计学处理 数据处理采用SPSS 10.0软件系统, 照射前后和细胞系之间基因表达和细胞凋亡变化的比较采用*t*检验, $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 X射线诱导的Egr-1基因表达 3株细胞均在射线照射后1 h诱导了Egr-1基因表达水平的增高, HepG2照射后2 h明显增高, HL-7702则在照射后4 h明显增高, 而SMMC-7721的Egr-1基因表达水平始终较低. 在照射后4 h射线诱导的Egr-1基因表达分别为: ΔEgr_{HepG2}, 12.9629±1.0649; ΔEgr_{7702}, 0.0096±0.0008和ΔEgr_{7721}, 0.0017±0.0003, HepG2显著高于HL-7702和SMMC-7721($P<0.01$, 图1).

2.2 X射线诱导的细胞凋亡 3株细胞在射线照射后6 h均未诱导明显的细胞凋亡, 而在照射后12 h均诱导了明显的细胞凋亡, 且HepG2和HL-7702细胞凋亡达高峰, 而SMMC-7721细胞凋亡比率继续增高. 在照射后12 h诱导的细胞凋亡率分别为: Δapo_{HepG2}, 45.16%; Δapo_{7702}, 27.45%和Δapo_{7721}, 12.25%. SMMC-7721在照射后24 h诱导的细胞凋亡达24.94%, 仍未达到HL-7702诱导的细胞凋亡水平(图2).

2.3 X射线照射后细胞周期的变化 HepG2, SMMC-7721和HL-7702在照射前后不同时间点呈现了不同的变化模式. 在G0-G1期, SMMC-7721与其他两株细胞呈现不同的走势, 前者在照射后12 h内随时间延长该期的百分比呈增高走势, 而后者则相反呈降低走势, 但变化均不明显. 在S期, 3株细胞呈现不同的走势, HL-7702在观察时间内其百分比略呈增高走势; HepG2在6-12 h则呈明显降低走势, 而随后在12-24 h又呈增高走势; SMMC-7721在6-12 h与HepG2相似也呈明显降低走势, 但在随后的12-24 h则没有明显变化. 在G2-M期, 在照射前和照射后6 h内3株细胞均为极低比例, 此后, SMMC-7721和HL-7702呈相同走势, 且保持较低水平, 而HepG2则完全与其S期走势相反(图3).

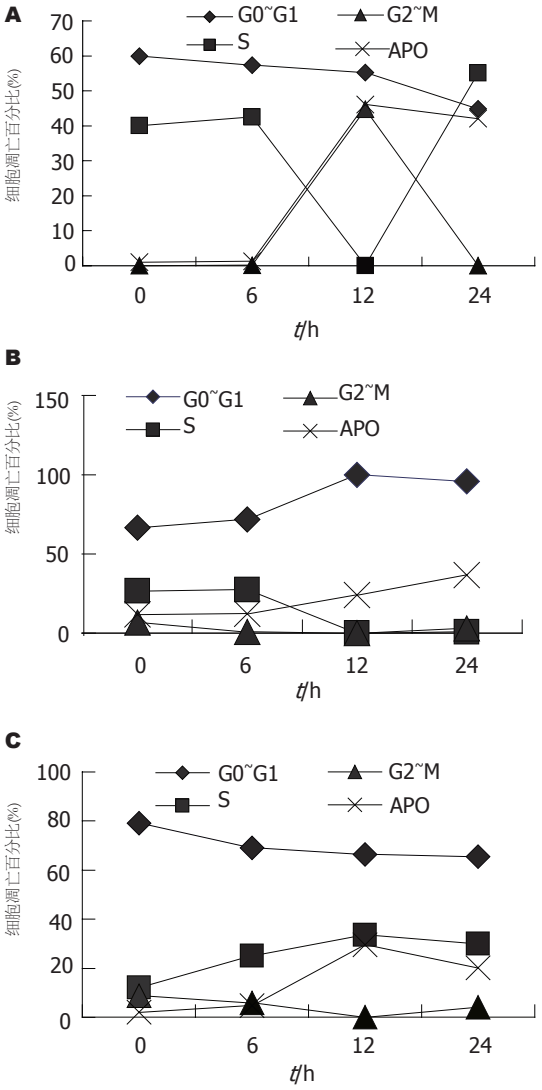


图 3 4Gy射线照射前后细胞周期和细胞凋亡的变化. A: HepG2; B: SMMC−7721; C: HL−7702.

2.4 射线诱导的细胞凋亡与细胞周期变化关系 HepG2和SMMC-7721在照射后6-12 h射线诱导的细胞凋亡和S期成相反走势, 射线诱导的细胞凋亡可能发生在S期. 而正常细胞株未有相同趋势(图3).

3 讨论

放射治疗产生DNA损伤, 诱导细胞周期阻滞[8-11]

■创新盘点
用荧光定量PCR法研究射线诱导的Egr-1基因表达的变化, 同时用流式细胞术研究射线诱导的细胞周期和细胞凋亡的变化, 为放射生物学机制研究提供了实验依据.

■同行评价
研究题目新颖, 具有很好的应用前景, 文章条理清晰, 用词准确. 研究方案设计合理, 研究结果科学可信, 对于肝癌的放射治疗有很好的指导作用.

和细胞凋亡[12-15], 并有许多基因参与[16-17]. 如近年来, 采用微阵列技术已检测了射线诱导的基因表达谱, 如低剂量照射(2cGy)可诱导细胞信号传导和DNA损伤反应等基因谱的表达; 大剂量(4-6Gy)则诱导细胞增殖、细胞修复和细胞凋亡等基因谱的表达, 其中包括Egr-1基因[18-19]. 已有研究表明Egr-1基因可介导组织细胞凋亡[20-22]. 又因Egr-1基因启动子区含有6个高度保守的CC(A+T)$_6$GG模体(motif), 可感受电离辐射产生的氧自由基, 而在其表达产物的羧基端有1个含3个锌指结构的区域, 可与DNA同意序列5'-GCG(T/G)GGGCG-3'或5'-TCC(T/A)CCTCCTCC-3'结合, 诱导下游基因的表达, 如TGF-β1, PTEN, p53, p73和TNF-α, 他们都是诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡的效应基因. 所以Egr-1基因在射线诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡中可能起关键作用[23-27]. 我们研究的HepG2, SMMC-7721和HL-7702 3株细胞在4Gy射线照射后均诱导了Egr-1基因表达水平的增高、细胞凋亡的增加和细胞周期的变化.

在照射前, 3株细胞Egr-1基因表达水平均较低, 与文献报道较一致[28]. 在4Gy照射后2 h和4 h, HepG2和HL-7702均诱导了较高水平的基因表达, 在12 h诱导了最大程度的细胞凋亡. 而SMMC-7721在4 Gy照射后2 h和4 h, 诱导的基因表达水平相对较低, 在12 h不仅诱导的细胞凋亡比例相对较低, 而且未达到峰值. 这些结果提示同种组织不同细胞株射线诱导的Egr-1基因表达水平可能不同; 射线诱导的Egr-1基因表达水平可能与射线诱导的细胞凋亡成正相关. 另外, 在照射前后细胞周期与细胞凋亡变化的比较中, 我们发现, 在4Gy照射后6-24 h, HepG2 S期细胞比例变化与细胞凋亡比例变化成相反走势, 提示HepG2 S期细胞可能易发生细胞凋亡. SMMC-7721 S期细胞比例变化与细胞凋亡比例变化也成相反走势, 可能与HepG2有类似的结果. 而HL-7702则未发现细胞周期与细胞凋亡之间有相关的变化.

我们的研究结果表明, 在HepG2, SMMC-7721和HL-7702 3株细胞中, 射线通过诱导Egr-1基因表达而诱导了细胞周期和细胞凋亡的变化; 射线诱导的Egr-1基因表达水平可能与射线诱导的细胞凋亡成正相关. 在不同细胞株射线通过Egr-1基因诱导细胞凋亡的确切分子机制有待进一步明确.

4 参考文献

1 Suggs SV, Katzowitz JL, Tsai-Morris C, Sukhatme VP. cDNA sequence of the human cellular early growth response gene Egr-1. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4283

2 Meyer RG, Kupper JH, Kandolf R, Rodemann HP. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells *in vitro*. *Eur J Biochem* 2002; 269: 337-346

3 Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2419-2422

4 魏道严, 戴冰冰, 陈诗书. 放射诱导调控腺病毒介导*gfp*报告基因在肿瘤细胞内的表达. 生物化学与生物物理学报 2001; 33: 123-127

5 Krones-Herzig A, Mittal S, Yule K, Liang H, English C, Urcis R, Soni T, Adamson ED, Mercola D. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor *in vivo* and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res* 2005; 65: 5133-5143

6 Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Ishikawa H, Shinohara K, Okada M, Inoue M. Decreased expression of early growth response-1 and its role in uterine leiomyoma growth. *Cancer Res* 2004; 64: 4677-4684

7 Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, Kim EH, Hosen N, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Taniguchi Y, Nishida S, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003; 101: 1698-1704

8 Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 928-942

9 Nome RV, Bratland A, Harman G, Fodstad O, Andersson Y, Ree AH. Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1231-1238

10 Lee YJ, Soh JW, Dean NM, Cho CK, Kim TH, Lee SJ, Lee YS. Protein kinase Cdelta overexpression enhances radiation sensitivity via extracellular regulated protein kinase 1/2 activation, abolishing the radiation-induced G(2)-M arrest. *Cell Growth Differ* 2002; 13: 237-246

11 Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK. BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem* 2004; 279: 31251-31258

12 Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 41-44

13 Blakely EA. Radiation-induced changes in a cell's program for life. *Acta Oncol* 1998; 37: 127-128

14 Nakajima T. Signaling cascades in radiation-induced apoptosis: Roles of protein kinase C in the apoptosis regulation. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA220-224

15 Liu ZZ, Huang WY, Li XS, Lin JS, Cai XK, Lian KH, Zhou HJ. Prediction value of radiosensitivity of hepatocarcinoma cells for apoptosis and micronucleus assay. *World J Gastroenterol* 2005; 11:

7036-7039
16 Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 240-253
17 董广璐, 张淑云, 邢丽娜, 郑淑香. 宫颈癌放疗前后肿瘤细胞凋亡及其相关基因的变化. 中国肿瘤临床 2004; 31: 1098-1100(1105)
18 Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng JF, Chen DJ. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res* 2005; 164: 17-26
19 Otomo T, Hishii M, Arai H, Sato K, Sasai K. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J Radiat Res (Tokyo)* 2004; 45: 53-60
20 Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J, Homer RJ, Elias JA. Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2004; 200: 377-389
21 Pignatelli M, Luna-Medina R, Perez-Rendon A, Santos A, Perez-Castillo A. The transcription factor early growth response factor-1 (EGR-1) promotes apoptosis of neuroblastoma cells. *Biochem J* 2003; 373: 739-746
22 Wu MY, Liang YR, Wu XY, Zhuang CX. Relationship between Egr-1 gene expression and apoptosis in esophageal carcinoma and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 971-975
23 Ahmed MM. Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 43-52
24 Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38: 223-243
25 Darzynkiewicz Z, Huang X, Okafuji M. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Methods Mol Biol* 2006; 314: 81-93
26 Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* 2004; 64: 7065-7072
27 Raffoul JJ, Wang Y, Kucuk O, Forman JD, Sarkar FH, Hillman GG. Genistein inhibits radiation-induced activation of NF-kappaB in prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *BMC Cancer* 2006; 6: 107
28 Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 203-207

■同行评价
本文内容较新, 对于结直肠癌发生机制从PPAR信号转导通路角度进行了探讨, 为进一步研究提供了理论与实验基础.

电编 李琪 编辑 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 •

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

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

《世界华人消化杂志》的总被引频次为3353, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01.

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2928-2932
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

COX-2抑制剂NS398调控PPARs信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制

余力伟, 马向涛

■背景资料
非甾体抗炎药(NSAIDs)可以抑制COX-2表达, 阻断结直肠肿瘤细胞增殖, 但是NSAIDs拮抗肿瘤的作用机制并不只局限于COX-2. 选择性COX-2抑制剂抗结直肠癌非COX-2依赖性途径的作用机制是近期研究的重点.

余力伟, 马向涛, 北京市海淀医院外科 北京市 100080
余力伟, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤研究.
通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京市海淀医院外科. xiangtao_ma@pku.org.cn
电话: 010-62583013 传真: 010-62653601
收稿日期: 2006-07-30 接受日期: 2006-08-22

Molecular mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitor in regulating proliferation of colon cancer cells through modulating PPAR signal transduction pathway

Li-Wei Yu, Xiang-Tao Ma

Li-Wei Yu, Xiang-Tao Ma, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, Beijing 10080, China
Correspondence to: Dr. Xiang-Tao Ma, Department of Surgery, Beijing Haidian Hospital, 29 Zhongguancun Avenue, Beijing 100080, China. xiangtao_ma@pku.org.cn
Received: 2006-07-30 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To investigate the role of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS398 on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells, and reveal the COX-2-independent mechanism.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on human colon cancer cell line SW480 to examine COX-2 mRNA expression. Then, NS-398 (a selective COX-2 inhibitor) was added into culture media, and MTT assay was used to examine the proliferation of the cells; Western blot analysis was performed to detect the expression of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR); Flow cytometry was applied to analyze the cell cycle and apoptosis.

RESULTS: The expression of COX-2 mRNA was not detected in colon cancer SW480 cells. NS-398 inhibited the cell proliferation and induced apoptosis in colon cancer cell lines. Seventy-two hours after the treatment of NS398 (75 μmol/L), the proliferative level of SW480 cells was decreased; the rate of the cells at G_1 stage was increased from 31.2% to 40.6%, while the rate of those at S stage was decreased from 52.8% to 41.2%. The expression of PPARα, PPARδ, PPARγ, cyclin D1 and Bcl-xl were decreased along with the prolonging of NS398 treated time.

CONCLUSION: The selective COX-2 inhibitor NS-398 can inhibit the proliferation while induce the apoptosis of colon cancer cell lines through COX-2-independent pathway.

Key Words: Colorectal neoplasm; Signal transduction; Peroxisome proliferators-activated receptor; COX-2

Yu LW, Ma XT. Molecular mechanism of COX-2 inhibitor in regulating proliferation of colon cancer cells through modulating PPAR signal transduction pathway. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2928-2932

摘要

目的: 观察选择性COX-2抑制剂NS-398对结肠癌细胞系SW480中PPARs信号转导通路的影响, 以期初步阐明选择性COX-2抑制剂抗结直肠癌非COX-2依赖性途径的作用机制.

方法: 应用RT-PCR检测结肠癌细胞系SW480中COX-2 mRNA表达水平, 用选择性COX-2抑制剂NS-398处理结肠癌细胞系SW480, Western blot检测PPARs信号转导通路成员表达, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖状态, 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡情况.

结果: 结肠癌细胞系SW480中未检测到COX-2 mRNA表达, NS-398(75 μmol/L)作用于SW480细胞72 h后, G_1期细胞比率由31.2%上升至40.6%, S期细胞比率由52.8%下降至41.2%, 细胞增殖受抑制. PPARα, PPARδ, PPARγ, cyclin D1与Bcl-xl表达水平随NS-398作用时间延长而下降.

结论: 选择性COX-2抑制剂NS-398可能通过非COX-2依赖途径影响结肠癌细胞的增殖.

关键词: 结直肠肿瘤; 信号转导; 过氧化物酶体增殖因子激活受体; COX-2

余力伟, 马向涛. COX-2抑制剂NS398调控PPARs信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2928-2932
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2928.asp

0 引言

研究表明, 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在结直肠癌中呈过表达, 而非甾体抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可以抑制COX-2表达, 阻断结直肠肿瘤细胞增殖, 但是NSAIDs拮抗肿瘤的作用机制并不只局限于COX-2, 研究显示, NSAIDs参与调控某些细胞内信号转导通路, 其机制尚不清楚[1-4]. 本研究观察选择性COX-2抑制剂NS-398对COX-2低表达结肠癌细胞增殖与凋亡的影响, 以期初步阐明选择性COX-2抑制剂抗结直肠癌非COX-2依赖性途径的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌细胞系SW480与HT29由北京大学人民医院外科肿瘤研究室保存. RPMI 1640培养基、胰蛋白酶(美国GIBCOL/BRL公司)、胎牛血清(美国HyClone公司)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、NS-398(美国Sigma公司). 兔抗人PPARα, PPARδ, cyclin D1, Bcl-xl多克隆抗体(美国Santa Cruz公司), 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(美国Promega公司).

1.2 细胞培养 结肠癌细胞系SW480与HT29在含有100 mL/L胎牛血清(美国HyClone公司)的RPMI 1640培养基(美国GIBCO/BRL公司)中传代培养.

1.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测COX-2 mRNA表达 (1)β-微球蛋白引物序列: 上游引物(GH20)5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'; 下游引物(PCO4)5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'; PCR产物长度268 bp; (2)COX-2引物序列: 上游引物5'TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT 3'; 下游引物5' AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT 3'; PCR产物长度305 bp; (3)RT-PCR: 应用TRIzol试剂盒(美国GIBCOL/BRL公司), 按说明书提取细胞株SW480、HT29(作为阳性对照)总RNA. 各取5 μg RNA加随机引物Oligo(Dt)12-18及逆转录酶合成cDNA链, 取2 μL cDNA作为模板, 总体积为25 μL的反应体系中包括$MgCl_2$ 1.5 mmol/L, 拓扑异构酶2.5 U, COX-2与β-微球蛋白引物终浓度为0.5 μmol/L, 94℃变性35 s, 55℃退火35 s, 72℃延伸30 s, 共40个循环. PCR反应产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳进行鉴定.

1.4 细胞增殖状态检测 取第3-6代生长状态良好的对数生长期细胞, 常规消化、分离、收集细胞、细胞计数及测定细胞活力, 活细胞率达95%, 按每孔3.2×10^5个细胞接种于96孔板中, 贴壁后, 无血清培养细胞16-24 h, 使细胞同步化. 实验分两组进行, 即空白对照组与COX-2抑制剂组. 每个研究点设置3组平行对照, 重复3次实验取平均值. 空白对照组加无血清培养基; COX-2抑制剂组加无血清培养基及NS-398; 加入NS-398至浓度达到0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 μmol/L, 第0, 24 h, 48 h, 72 h分别加入四甲基偶氮唑盐5 mg/mL(美国Sigma公司), 继续培养4 h, 每孔加入DMSO 200 μL, 酶标仪测定540 nm的光密度值*A*, 绘制生长曲线.

1.5 流式细胞仪检测细胞周期 SW480细胞在RPMI1640培养基中培养至80%融合后加入无血清培养基继续培养16-24 h, 使细胞同步化; COX-2抑制剂组培养基中加入NS-398处理细胞; 在不同时间点(0, 24 h, 48 h, 72 h)消化细胞, 0.5 mL PBS重悬细胞, 70%(体积分数)冰乙醇固定细胞过夜, 加入RNAase A至终浓度50 mg/L, 37℃恒温水浴1 h, 加入碘化丙啶至终浓度50 mg/L, 4℃避光染色1 h, 上流式细胞仪FACScan(美国Becton-Dickinson公司)检测, 资料用Cell Quest细胞周期分析软件处理.

1.6 细胞总蛋白、胞质蛋白与核蛋白提取 (1)细胞总蛋白提取: 细胞于裂解缓冲液中裂解, 离心30 min后收集上清液得到细胞总蛋白; (2)胞质蛋白提取: 收集细胞悬液, 离心2 min后用胞质缓冲液重悬裂解产物, 收集上清液得到胞质蛋白; (3)细胞核蛋白提取: 收集细胞悬液, 用低渗缓冲液于冰上裂解细胞10 min, 离心后取上清为核提取物; (4)蛋白浓度测定方法(Bradford法): 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品, 根据蛋白定量试剂盒(美国Bio-Rad公司)说明绘制蛋白定量标准曲线, 于分光光度计595nm下测吸光度, 计算提取液蛋白浓度.

1.7 Western blot法检测蛋白表达 在进行Western blot之前将蛋白提取物与2×十二烷基磺酸钠

■**创新盘点**
本文研究的PPAR通路在结直肠癌发生中的作用机制是目前研究发展的趋势.

■应用要点
本文为研究COX-2抑制剂抗结直肠癌非COX-2依赖性途径提供了新的研究靶点，进一步可通过阻断PPAR通路了解肿瘤细胞转移相关特征的改变.

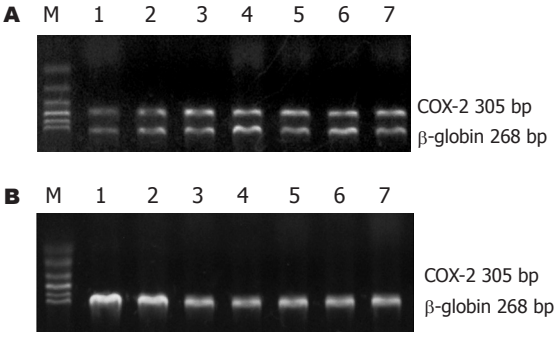


图 1 结肠癌细胞中COX-2 mRNA表达. A: HT29细胞中 COX-2 mRNA表达呈阳性; B: SW480细胞中COX-2 mRNA表达呈阴性. (β-globin为内参照; 1-7代表泳道编号).

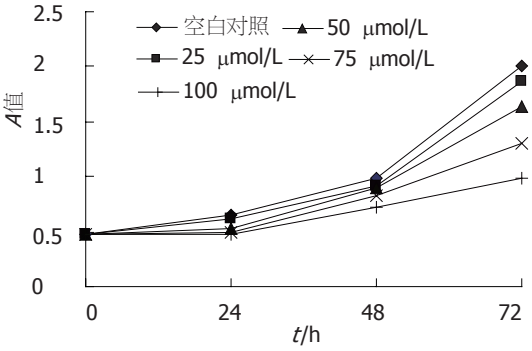


图 2 NS-398作用于SW480后细胞增殖曲线. SW480细胞增殖水平随NS-398浓度增加及作用时间延长而下降.

(SDS)上样缓冲液按1∶1混合后100℃水浴下加热5 min. 取蛋白样品50 μg, 75-100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到PVDF膜上. 转膜后用TBST 缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 150 mmol/L 氯化钠, 0.5% Tween-20)与50 mL/L牛血清白蛋白封闭30 min. 封闭后, 分别加入一抗(PPARα, PPARδ, PPARγ, Bcl-xl, cyclin D1), 工作浓度1∶1000, GAPDH 作为内参照, 于4℃条件下孵育过夜, 与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育30 min, 工作浓度1∶1000. 用ECL(英国Amersham公司)化学发光试剂盒检测杂交信号. 用PhosphoImager图像分析仪(美国Molecular Dynamics公司)测定条带的光密度(*A*值), 以*A*值代表蛋白的相对表达量.

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

2 结果

结肠癌细胞中COX-2 mRNA表达见图1. NS-398可以抑制SW480细胞增殖: 不同浓度NS-398加入培养基后的第0, 24 h, 48 h, 72 h, 用MTT法测定细胞增殖, 与相应空白对照组相比加入

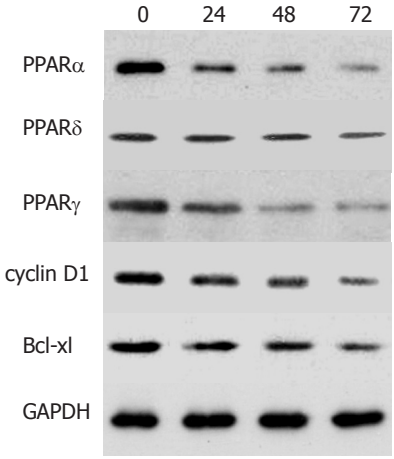


图 3 Western blot法检测SW480细胞中PPARs通路成员蛋白表达. COX-2抑制剂NS-398(75 μmol/L)可以抑制SW480细胞中PPARs通路成员的表达, Western blot显示PPARα、PPARδ、PPARγ、cyclinD1与Bcl-xl表达下降, GAPDH为内参照.

COX-2抑制剂NS-398后, SW480细胞增殖水平下降(图2). NS-398对SW480细胞周期的影响: NS-398(75 μmol/L)作用于SW480细胞72 h后, G_1期细胞比率由31.2%上升至40.6%, S期细胞比率由52.8%下降至41.2%, 细胞增殖受抑制. NS-398处理组与空白组相比差异有显著性(t = 2.847, $P<0.01$). NS-398抑制SW480细胞PPAR通路成员表达: PPAR通路成员表达水平随NS-398作用时间延长表达下降(0、24、48、72 h)(图3).

3 讨论

结直肠癌是消化道常见恶性肿瘤之一, 在欧美国家有较高的发病率. 近20 a来, 我国结直肠癌发病率也迅速上升. 研究发现, COX-2作为体内前列腺素生物合成的限速酶, 不仅在炎症中起重要作用, 而且参与结直肠癌发生、 发展过程[5-7]. 尽管在结直肠癌发生的分子生物学机制方面已取得了许多进展, 已经发现某些信号转导通路与结直肠癌恶性潜能密切相关, 但是其详细作用机制还有待深入[8-12].

过氧化物酶体增殖因子激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR)在脂肪代谢、细胞分化与细胞周期调控中起重要作用[13-15]. PPARs属于类固醇核激素受体超家族, 存在3种亚型: PPARα, PPARδ(也称PPARβ)和PPARγ. 他们由不同的基因编码, 分别由441-479个氨基酸残基组成[16-18].

PPARs是过氧化物酶体增殖物(peroxisome proliferator, PP)的激活受体. 研究表明, PP是一

类致癌物, 可以诱导增殖凋亡基因c-myc, c-fos, c-jun, Egr-1的表达, 从而在调控细胞周期中起关键作用[19-22]. PPARs在肿瘤细胞系及组织中高表达有利于PP类物质发挥其致癌作用. 研究报道PPARδ信号转导通路在结直肠癌发生、发展过程起重要作用, 其详细调控机制尚不清楚[23-25].

NSAIDs作为环氧合酶(COX)抑制剂, 具有解热、镇痛及抗炎作用. 研究显示, NSAIDs可以抑制结肠癌细胞生长并促进其凋亡, 但是其作用机制不能完全用COX-2活性受抑制解释[26-28].

本研究结果显示, SW480细胞不表达COX-2 mRNA, 提示SW480中无COX-2基因的转录. 进一步研究发现, PPARδ信号转导通路成员表达水平随NS-398作用时间延长而下降, NS-398可以使SW480细胞G0/G1期比率增高, 降低S、G2/M期比率, 其可能机制为NS-398阻断PPARδ通路后, 抑制肿瘤细胞进入DNA合成期从而影响SW480结肠癌细胞增殖并诱导凋亡[29-31].

本研究表明, NS-398存在COX-2非依赖性途径, 而其作用机制可能与肿瘤细胞内多种信号转导通路密切相关, PPAR通路可能是结直肠癌的重要靶点[32-34]. 深入研究选择性COX-2抑制剂对于细胞内信号转导通路的作用可能对于治疗结肠癌提供理论基础[35-36].

4 参考文献

1 Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 736-747

2 Huls G, Koornstra JJ, Kleibeuker JH. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet* 2003; 362: 230-232

3 Sinicrope FA. Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2006; 45: 447-454

4 Asano TK, McLeod RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin for the prevention of colorectal adenomas and cancer: a systematic review. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 665-673

5 Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 Suppl 5: 57-73

6 Chell S, Patsos HA, Qualtrough D, H-Zadeh AM, Hicks DJ, Kaidi A, Witherden IR, Williams AC, Paraskeva C. Prospects in NSAID-derived chemoprevention of colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 667-671

7 Fujimura T, Ohta T, Oyama K, Miyashita T, Miwa K. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1336-1345

8 马向涛, 王杉, 叶颖江, 杜如昱, 崔志荣. Stat3及其靶基因产物与结直肠癌恶性程度关系的研究. 癌症 2003; 22: 1135-1139

9 Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ. Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer-more than skin deep. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5374-5385

10 Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6: 322-327

11 马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. STATs信号传导通路成员选择性活化与结直肠癌发生机制的研究. 北京医学 2005; 27:646-649

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

13 Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 2006; 86: 465-514

14 Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 545-554

15 Nehlin JO, Mogensen JP, Petterson I, Jeppesen L, Fleckner J, Wulff EM, Sauerberg P. Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 448-453

16 Kostadinova R, Wahli W, Michalik L. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2995-3009

17 马向涛, 余力伟, 王杉, 张辉, 杜如昱, 崔志荣. Stat3与过氧化物酶体增殖因子激活受体δ信号转导通路间交互作用对结肠癌细胞增殖的调控影响. 中华实验外科杂志 2005; 22:1493-1495

18 Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-435

19 Zandbergen F, Mandard S, Escher P, Tan NS, Patsouris D, Jatkoe T, Rojas-Caro S, Madore S, Wahli W, Tafuri S, Muller M, Kersten S. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem J* 2005; 392: 313-324

20 Fu M, Wang C, Rao M, Wu X, Bouras T, Zhang X, Li Z, Jiao X, Yang J, Li A, Perkins ND, Thimmapaya B, Kung AL, Munoz A, Giordano A, Lisanti MP, Pestell RG. Cyclin D1 represses p300 transactivation through a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 2005; 280: 29728-29742

21 James SY, Lin F, Kolluri SK, Dawson MI, Zhang XK. Regulation of retinoic acid receptor beta expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 3531-3538

22 Jia Y, Qi C, Kashireddi P, Surapureddi S, Zhu YJ, Rao MS, Le Roith D, Chambon P, Gonzalez FJ, Reddy JK. Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPARalpha-regulated gene expression in liver. *J Biol Chem* 2004; 279: 24427-24434

23 Koh WP, Yuan JM, Van Den Berg D, Ingles SA, Yu MC. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma gene polymorphisms and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1797-1802

24 Grau R, Punzon C, Fresno M, Iniguez MA. Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation

■同行评价

本文内容较新, 对于结直肠癌发生机制从PPAR信号转导通路角度进行了探讨, 为进一步研究提供了理论与实验基础.

in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. *Biochem J* 2006; 395: 81-88
25 Yang L, Zhou ZG, Luo HZ, Zhou B, Xia QJ, Tian C. Quantitative analysis of PPARdelta mRNA by real-time RT-PCR in 86 rectal cancer tissues. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 181-185
26 Church RD, Fleshman JW, McLeod HL. Cyclo-oxygenase 2 inhibition in colorectal cancer therapy. *Br J Surg* 2003; 90: 1055-1067
27 Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tarnawski AS. Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. *FASEB J* 2003; 17: 1640-1647
28 Lou J, Fatima N, Xiao Z, Stauffer S, Smythers G, Greenwald P, Ali IU.Proteomic profiling identifies cyclooxygenase-2-independent global proteomic changes by celecoxib in colorectal cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1598-1606
29 马向涛, 余力伟, 王杉, 张辉, 杜如昱, 崔志荣. COX-2抑制剂调控Stat5信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制. 中华医学杂志 2005; 85: 2566-2569
30 Kim SJ, Seo JH, Lee YJ, Yoon JH, Choi CW, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS. Autocrine vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2 growth pathway represents a cyclooxygenase-2-independent target for the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in colon cancer cells. *Oncology* 2005; 68: 204-211
31 Ulrich S, Loitsch SM, Rau O, von Knethen A, Brune B, Schubert-Zsilavecz M, Stein JM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Res* 2006; 66: 7348-7354
32 Linsalata M, Giannini R, Notarnicola M, Cavallini A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expressions are significantly correlated in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 191
33 Kim E, Chen F, Wang CC, Harrison LE. CDK5 is a novel regulatory protein in PPARgamma ligand-induced antiproliferation. *Int J Oncol* 2006; 28: 191-194
34 Siezen CL, Tijhuis MJ, Kram NR, van Soest EM, de Jong DJ, Fodde R, van Kranen HJ, Kampman E. Protective effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas is modified by a polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 43-50
35 Marin HE, Peraza MA, Billin AN, Willson TM, Ward JM, Kennett MJ, Gonzalez FJ, Peters JM. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 4394-4401
36 Knutsen HK, Olstorn HB, Paulsen JE, Husoy T, Goverud IL, Loberg EM, Kristiansen K, Alexander J. Increased levels of PPARbeta/delta and cyclin D1 in flat dysplastic ACF and adenomas in Apc(Min/+) mice. *Anticancer Res* 2005; 25: 3781-3789

电编 李琪 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 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 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. (世界胃肠病学杂志社2006-10-28)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2933-2937
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

四株人结肠腺癌细胞CEA表达水平的检测及其意义

王立峰, 刘宝瑞, 钱晓萍, 殷海涛, 禹立霞, 魏 嘉

王立峰, 刘宝瑞, 钱晓萍, 殷海涛, 禹立霞, 魏嘉, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心 南京大学临床肿瘤研究所 江苏省南京市 210008
王立峰, 南京大学医学博士, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心主治医师, 主要从事恶性肿瘤的分子生物学研究.
通讯作者: 刘宝瑞, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心南京大学临床肿瘤研究所.
baoruiliu@nju.edu.cn
电话: 025-83304616-21002
收稿日期: 2006-08-16 接受日期: 2006-09-16

Expression of carcinoembryonic antigen in four different human colon adenocarcinoma cell lines

Li-Feng Wang, Bao-Rui Liu, Xiao-Ping Qian, Hai-Tao Yin, Li-Xia Yu, Jia Wei

Li-Feng Wang, Bao-Rui Liu, Xiao-Ping Qian, Hai-Tao Yin, Li-Xia Yu, Jia Wei, Oncology Center, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School; Clinical Oncology Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Bao-Rui Liu, Oncology Center, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School; Clinical Oncology Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. baoruiliu@nju.edu.cn
Received: 2006-08-16 Accepted: 2006-09-16

Abstract

AIM: To investigate the expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and its significance in the four different colon adenocarcinoma cell lines.

METHODS: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the expression of CEA in the cell culture medium and the immunohistochemistry was used to detect the protein expression of CEA in LS174T, SW480, LoVo and HCT-8 cell lines, separately. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the expression of CEA mRNA in the four kinds of cell lines was also carried out.

RESULTS: A great variation in CEA content was found among the four kinds of colon cancer cell lines. The expression of CEA was detectable at the protein and mRNA level in LS174T and SW480 cell lines, and moreover, it was higher in the former (culture supernatant fluid: 1050 ± 25.0 ng/10^7 cells *vs* 66 ± 5.6 ng/10^7 cells, $P < 0.0001$; mRNA: 1.137 ± 0.155 *vs* 0.399 ± 0.135, $P = 0.003$). Meanwhile, CEA was negatively expressed in LoVo cells no matter at the protein or mRNA level, and HCT-8 cells were only found with weakly-positive immunohistochemical staining.

CONCLUSION: There is a great variation in CEA expression among the four kinds of human colon cancer cell lines as compared with the reported results previously. The expression change of CEA in the different cell lines may affect its *in vitro* biological behavior and further lead to the uncertainty of the experiment.

Key Words: Carcinoembryonic antigen; Human colon cancer cell line; Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Wang LF, Liu BR, Qian XP, Yin HT, Yu LX, Wei J. Expression of carcinoembryonic antigen in the four different human colon adenocarcinoma cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2933-2937

摘要

目的: 检测四株结肠癌细胞株中癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的表达, 并探讨其意义.

方法: 四株人结肠腺癌细胞(LS174T, LoVo, SW480及HCT-8)分别应用ELISA法测定细胞培养上清中CEA含量; 免疫组化检测细胞CEA蛋白表达; 半定量RT-PCR检测细胞CEA mRNA表达丰度.

结果: LS174T和SW480细胞在蛋白和mRNA水平均可检测到CEA的表达且前者表达量高于后者(细胞培养上清中CEA含量: 1050±25.0 ng/10^7 cells *vs* 66±5.6 ng/10^7 cells, $P<0.0001$; 半定量检测CEA mRNA表达丰度: 1.137±0.155 *vs* 0.399±0.135, $P = 0.003$); 而LoVo细胞

■背景资料
目前, 已建系的肠癌细胞株已有近百种, 因在抗原表达、遗传特性及生物学行为等方面的不同而在不同的研究中被广泛使用. 然而这些细胞系在长期传代培养中由于多种因素可能导致细胞时常表现出遗传学的不稳定性从而可能影响实验结果.

■研发前沿
由于CEA所具有的重要生物学功能以及其在肠癌中的应用价值, 我们推测, 目前被广泛采用的肠癌细胞系有可能部分细胞株的CEA表达水平与既往文献不尽相同; 这种CEA表达的改变有可能影响肿瘤细胞在体内/体外的生物学行为从而产生不确信的结果.

在蛋白和和mRNA水平均未检测到CEA的表达; HCT-8细胞免疫组化有弱阳性染色.

结论: 四株结肠癌细胞株的实际CEA表达情况与既往文献报道不尽相同. 这种细胞株CEA表达特性的改变有可能影响其体外生物学行为从而导致实验结果的不确定性.

关键词: 癌胚抗原; 人结肠癌细胞; 半定量RT-PCR; 免疫组化

王立峰, 刘宝瑞, 钱晓萍, 殷海涛, 禹立霞, 魏嘉. 四株人结肠腺癌细胞CEA表达水平的检测及其意义. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2933-2937
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2933.asp

0 引言

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一相对分子质量约为200 kDa的糖蛋白. 作为一广谱肿瘤相关抗原, CEA在临床中有着广泛的应用, 尤其在监测肠癌的复发、转移方面更有着独特的价值[1-6]. 血浆CEA升高可见于多种恶性肿瘤如肺癌、肠癌、胰腺癌、乳癌以及妇科肿瘤等[7]. 随着对该蛋白特性的不断深入了解, CEA目前的应用主要集中于肿瘤的监测与预后复发、免疫治疗、靶向影像及治疗领域[8-12].

由于原代培养肿瘤细胞尤其是上皮来源性肿瘤细胞耗时长、繁琐且容易因污染导致培养失败, 在体外进行的大多数研究都是采用已建系的肿瘤细胞株. 目前已建系的肠癌细胞株已有近百种, 因在抗原表达、遗传特性及生物学行为等方面的不同而在不同的研究中被广泛使用. 然而这些细胞系大多来源于不同的实验室, 对其生物学特性的检测手段不尽相同; 加上长时间体外培养时肿瘤细胞时常表现出遗传学的不稳定性, 从而可能影响实验结果. 由于CEA所具有的重要生物学功能: 促进细胞黏附、抑制细胞死亡、介导信号转导及激发肿瘤免疫[13-17]以及其在肠癌中的应用价值, 我们推测目前被广泛采用的肠癌细胞系有可能部分细胞株的CEA表达水平与既往文献不尽相同; 这种CEA表达的改变有可能影响肿瘤细胞在体内/体外的生物学行为, 如果研究者在一些相关生物学功能研究中未加验证的选用某种CEA表达已发生变化的细胞系则有可能产生不确信的结果. 在本实验中我们选取了LS174T、LoVo、SW480及HCT-8四株肠癌细胞, 分别从蛋白水平、分子生物学水平检测CEA的表达, 发现与既往的文献报道不尽相同, 提示在选择细胞系前对其重要的生物学指标加以验证是完全必要的.

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol试剂及细胞培养液为Invitrogen公司产品, 逆转录PCR 试剂盒及Taq 酶购于日本TaKaRa公司; ELISA检测CEA试剂盒购于美国Lifekey公司; 免疫组化用CEA mAb、 EnVision试剂盒均购自DAKO公司.

1.2 方法 LoVo细胞株购于中科院上海细胞库; LS175T, HCT-8和SW480购于南京凯基生物有限公司. 所用细胞于含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液中37℃、50 mL/L CO_2条件下常规培养.

1.2.1 夹心ELISA法检测培养上清CEA的表达 四株细胞以相同密度接种至T75培养瓶中, 3-5 d后收集上清. 按CEA ELISA 试剂盒说明检测培养上清液中的CEA, 每样品均设3个复孔, 以试剂盒中的CEA做标准曲线, 定量.

1.2.2 免疫组化检测细胞的CEA表达 四株细胞分别以胰酶消化后PBS洗涤3遍, 调整密度后甩片, 40 g/L多聚甲醛固定30 min后免疫组化检测. 免疫组化标记采用EnVision二步法, 具体操作按试剂盒说明书进行. CEA一抗为鼠抗人mAb.

1.2.3 半定量RT-PCR TRIzol 一步法分别抽提LS175T, HCT-8, SW480和LoVo细胞的总RNA, 反转录为cDNA, 体系如下: 5×M-MLV Buffer 4 μL, dNTP 1 μL, Oligo dT 1 μL, M-MLV逆转录酶0.5 μL, RNase抑制剂0.5 μL, 总RNA 2-3 μg, 加水至20 μL. 42℃ 15 min, 95 ℃ 2 min. 产物保存于-20℃.

CEA及内参β-actin基因片段的引物由上海博亚生物技术有限公司合成. CEA mRNA的特异性引物序列按文献所述[18-20]: 上游序列5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAG GAAGAAGC-3'; 下游序列5'-GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG-3'. β-actin引物序列, 上游序列5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'; 下游序列5'-CAGGTCCAGACG CAGGATGGC-3'. 反应体系如下: 5 μL cDNA , 5 μL 10×PCR缓冲液, 0. 2 μL Ex Taq 酶, 4 μL dNTPs, 25 mmol/ L的$MgCl_2$ 4 μL, 引物各1 μL , 加水至50 μL. CEA cDNA PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72 ℃延伸1 min, 30个循环, 最后72 ℃终延伸9 min. β-actin cDNA PCR反应条件: 95 ℃预变性5 min, 94 ℃变性30 s, 55℃

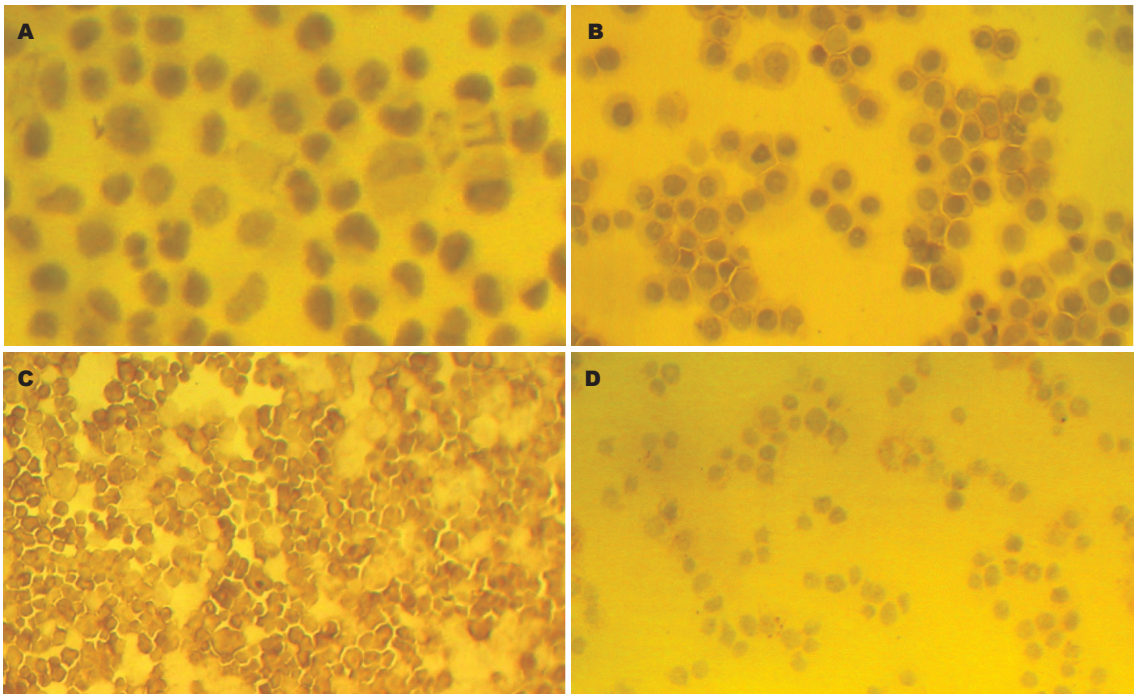


图 1 免疫组化检测CEA表达. A: LoVo细胞(×150); B: SW480细胞(×150); C: LS174T细胞 (×60); D: HCT−8细胞(×60).

■创新盘点
本文分析了四株人结肠腺癌细胞CEA表达情况并与既往文献报道进行比较, 发现其表达在部分细胞系发生变化.

退火30 s, 72 ℃延伸45 s, 30 个循环, 最后72 ℃终延伸5 min. 扩增产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳Image-Pro plus图像分析软件进行光密度积分值分析, 计算出CEA与β-actin光密度积分值之比, 重复3次.

统计学处理 所有数据采用SPSS 10.0统计软件分析, 以均数±标准差(mean±SD)表示, 各组之间比较采用*t*检验.

2 结果

2.1 细胞培养上清中CEA的表达 ELISA结果表明LS174T高表达CEA(1050±25.0 ng/10^7 cells); SW480细胞也有CEA的表达(66±5.6 ng/10^7 cells)但其表达量远低于前者(P<0.0001); 而LoVo和HCT-8细胞培养上清中的CEA含量在检测下限(<1 ng).

2.2 免疫组化检测结果 CEA的阳性表达主要定位于肿瘤细胞的细胞膜和细胞质, 呈棕黄色颗粒状. 免疫组化结果表明, LS174T和SW480细胞均为阳性染色其中以LS174T细胞染色最强; HCT-8仅有个别细胞弱染色, 而LOVO细胞则未见阳性染色(图1).

2.3 CEA mRNA表达 四株人结肠癌细胞中, LS174T和SW480细胞RT-PCR可以检测到CEA mRNA的表达且半定量分析表明两者之间的表达有显著性差异: (1.137±1.55 *vs* 0.399±0.135, P = 0.003); 而在LoVo和HCT-8细胞中则未能检测到相应表达(图2).

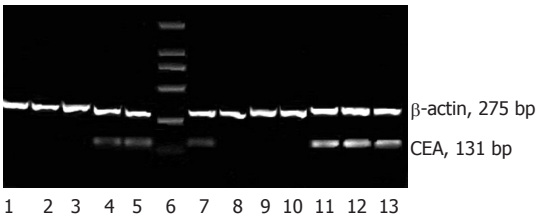


图 2 RT−PCR检测四株人结肠腺癌细胞株CEA mRNA的表达(以β−actin为内参). 1−3: LoVo细胞; 4, 5, 7: SW480细胞; 8−10: HCT−8细胞; 11−13: LS174T细胞; 6: Marker.

3 讨论

作为研究最为透彻的肿瘤相关抗原之一, CEA家族成员结构已逐渐为人们所知. 已有30多个相关基因/假基因被认为与CEA家族有关. 这些基因均定位于人染色体19q13.2[21]. 有研究者将这一大家族分为两类: 一类为CEA相关的细胞黏附分子(CEA-related cell adhesion molecules, CEACAM), 这些具有黏附因子作用的分子在肿瘤细胞的信号转导中发挥重要作用, 包括CEA(CEACAM5, CD66e)在内的CEA家族成员在肿瘤细胞膜表面的表达被认为具有利于肿瘤细胞播散的作用; 另一类为pregnancy-specific glycoproteins (PSG). 不同家族成员间由于具有部分相同的抗原决定簇常有交叉反应的发生[22].临床上CEA主要用于结

■应用要点
本研究提示, 在当今广泛使用肿瘤细胞系为研究载体的同时, 更加不能忽视对选用的细胞系某些重要生物学功能重新加以确认以保证结果的准确性; 同时, 由于广义的CEA抗体常与多个成员间有交叉反应的发生, 在肿瘤研究中应加以注意选择相应的抗体.

直肠癌的诊断、判断肿瘤分期和病变程度、监测治疗和预报复发等[23-26]. 然而研究者们往往只单纯关注于CEA作为肿瘤相关抗原的身份而忽略了其本身所具有的生物学功能[27]. 血浆CEA水平的升高与肿瘤的分化程度、侵袭及转移密切相关, 有研究者认为, CEA在肿瘤的进展中扮演发挥着关键作用[28]. 因此, 肿瘤细胞株CEA蛋白的表达与否与其在体外、体内的生物学行为有直接的关系.

由于缺少高效、方便的方法原代培养肿瘤细胞, 已建系的细胞株仍然在现今的肿瘤研究中广受青睐. 已有多篇文献报道肿瘤细胞系存在一定缺陷如显著的遗传表型漂移的可能性; 因此, 早在1988年Trainer *et al*[29]就提出对于已建系的肿瘤细胞株周期性地对其生物学性状重新评估是极其必要的. 我们检测了四株肠癌细胞的CEA表达, 结果显示, 不论在蛋白质水平还是在mRNA水平, LS174T细胞均高表达CEA; 而在LoVo细胞中则完全检测不到CEA 的表达, 这与文献中LoVo细胞高表达CEA 的报道完全相反[29-32]. SW480细胞的CEA表达情况既往有不同的报道: Dai *et al*和Liebig *et al*认为SW480细胞高表达CEA[33-34], 而另一研究组则有相反的结论[29], 这种相反的结论可能与不同实验室采用不同来源的细胞有关. 我们的结果表明, SW480细胞表达CEA但其表达丰度远低于LS174T细胞. HCT-8是文献报道不表达CEA的细胞株, 我们在细胞上清及mRNA水平均未检测到CEA的表达, 而在免疫组化中个别细胞有弱染色, 分析这是由于免疫组化实验中所使用的CEA抗体与NCA、BGP等CEA家族成员有交叉反应有关.

通过对四株肠癌细胞株的研究我们发现实际CEA表达情况与既往文献报道不尽相同. 由于CEA所具有的多种生物功能, 我们推测这种细胞株CEA表达特性的改变有可能影响其体外生物学行为从而导致实验结果的不确定性. 提示在当今广泛使用肿瘤细胞系为研究载体的同时, 更加不能忽视对选用的细胞系某些重要生物学功能重新加以确认以保证结果的准确性; 同时, 由于CEA家族拥有众多成员, 广义的CEA抗体常与多个成员间有交叉反应的发生, 在肿瘤研究中应加以注意选择相应的抗体.

4 参考文献

1 Sarobe P, Huarte E, Lasarte JJ, Borras-Cuesta F. Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 443-454

2 Aquino A, Formica V, Prete SP, Correale PP, Massara MC, Turriziani M, De Vecchis L, Bonmassar E. Drug-induced increase of carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Pharmacol Res* 2004; 49: 383-396

3 张青云, 孙丽, 张书耕, 王琼. 时间分辩荧光免疫法与电化学发光法检测结直肠肿瘤标志CEA的比较. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2799-2802

4 Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23: 338-351

5 陈艳宁, 姜季, 李焕春, 钟志. CA199和CEA联合检测对肠道恶性肿瘤术后复发的诊断价值. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1472-1473

6 刘阳, 田素礼. 直肠癌行TME术癌组织及周围组织CEA检测的意义. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2826-2828

7 Naghibalhossaini F, Pakdel A, Ghaderi AA, Saberi Firoozi M. Effective production of carcinoembryonic antigen by conversion of the membrane-bound into a recombinant secretory protein by site-specific mutagenesis. *Pathol Oncol Res* 2005; 11: 211-217

8 Michaeli D. Vaccines and monoclonal antibodies. *Semin Oncol* 2005; 32: S82-S86

9 Sorbye H, Dahl O. Transient CEA increase at start of oxaliplatin combination therapy for metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol* 2004; 43: 495-498

10 Chen CC, Yang SH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Chang SC. Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res* 2005; 124: 169-174

11 Goldenberg DM, Sharkey RM, Paganelli G, Barbet J, Chatal JF. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 823-834

12 Zbar AP. The immunology of colorectal cancer. *Surg Oncol* 2004; 13: 45-53

13 Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 67-81

14 Screaton RA, Penn LZ, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. *J Cell Biol* 1997; 137: 939-952

15 Screaton RA, DeMarte L, Draber P, Stanners CP. The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycophosphatidyl-inositol anchor. *J Cell Biol* 2000; 150: 613-626

16 Taheri M, Saragovi U, Fuks A, Makkerh J, Mort J, Stanners CP. Self recognition in the Ig superfamily. Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion. *J Biol Chem* 2000; 275: 26935-26943

17 Ordonez C, Screaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 2000; 60: 3419-3424

18 Guo J, Xiao B, Zhang X, Jin Z, Chen J, Qin L, Mao X, Shen G, Chen H, Liu Z. Combined use of positive and negative immunomagnetic isolation followed by real-time RT-PCR for detection of the circulating

tumor cells in patients with colorectal cancers. *J Mol Med* 2004; 82: 768-774
19 Park S, Lee B, Kim I, Choi I, Hong K, Ryu Y, Rhim J, Shin J, Park SC, Chung H, Chung J. Immunobead RT-PCR versus regular RT-PCR amplification of CEA mRNA in peripheral blood. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 489-494
20 Ohtsukasa S, Okabe S, Yamashita H, Iwai T, Sugihara K. Increased expression of CEA and MHC class I in colorectal cancer cell lines exposed to chemotherapy drugs. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 719-726
21 Olsen A, Teglund S, Nelson D, Gordon L, Copeland A, Georgescu A, Carrano A, Hammarstrom S. Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics* 1994; 23: 659-668
22 Hance KW, Zeytin HE, Greiner JW. Mouse models expressing human carcinoembryonic antigen (CEA) as a transgene: evaluation of CEA-based cancer vaccines. *Mutat Res* 2005; 576: 132-154
23 Schiemann U, Gunther S, Gross M, Henke G, Muller-Koch Y, Konig A, Muders M, Folwaczny C, Mussack T, Holinski-Feder E. Preoperative serum levels of the carcinoembryonic antigen in hereditary non-polyposis colorectal cancer compared to levels in sporadic colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 356-360
24 Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C. CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumour Biol* 2004; 25: 228-234
25 Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, Ezumi K, Kato H, Kawasaki T, Furukawa H, Kawakami H. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004; 207: 109-115
26 Wu WX, Sun YM, Hua YB, Shen LZ. Laparoscopic versus conventional open resection of rectal carcinoma: A clinical comparative study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1167-1170
27 Berinstein NL. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2197-2207
28 Ilantzis C, DeMarte L, Screaton RA, Stanners CP. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* 2002; 4: 151-163
29 Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, Anzano M, Rieman D, Hoffstein S, Li DJ. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1988; 41: 287-296
30 Zhang M, Li S, Nyati MK, DeRemer S, Parsels J, Rehemtulla A, Ensminger WD, Lawrence TS. Regional delivery and selective expression of a high-activity yeast cytosine deaminase in an intrahepatic colon cancer model. *Cancer Res* 2003; 63: 658-663
31 Graham-Cole CL, Thomas HD, Taylor GA, Newell DR, Melton RG, Hesp R, Boddy AV. An evaluation of thymidine phosphorylase as a means of preventing thymidine rescue from the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006
32 Li Y, Chen Y, Dilley J, Arroyo T, Ko D, Working P, Yu DC. Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1003-1009
33 Dai S, Wan T, Wang B, Zhou X, Xiu F, Chen T, Wu Y, Cao X. More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7554-7563
34 Liebig B, Brabletz T, Staege MS, Wulfanger J, Riemann D, Burdach S, Ballhausen WG. Forced expression of deltaN-TCF-1B in colon cancer derived cell lines is accompanied by the induction of CEACAM5/6 and mesothelin. *Cancer Lett* 2005; 223: 159-167

■同行评价

本文研究四株人结肠癌细胞CEA水平的表达情况, 有一定的参考价值, 对于肿瘤研究细胞的选择以及评价有一定的指导意义. 论文撰写规范, 结果可信.

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2938-2942
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

Granzyme B在原发及淋巴转移性胃癌细胞中的差异表达及其与肿瘤血管生成的关系

周业江, 熊玉霞, 易国平, 徐 亮, 夏 冬, 魏仁智

■背景资料
GrB是CTL及NK细胞所特有的细胞毒蛋白, 发现其在肺癌、乳腺癌及胃癌等上皮源性肿瘤细胞表达是近年来肿瘤研究领域的重要进展, 但GrB在上皮肿瘤细胞表达的生物学意义至今仍不清楚.

周业江, 易国平, 夏冬, 魏仁智, 徐亮, 泸州医学院附属医院普外科 四川省泸州市 646000
熊玉霞, 泸州医学院药理教研室 四川省泸州市 646000
周业江, 泸州医学院附属医院普外科副教授, 医学博士, 硕士研究生导师, 主要从事胃肠肿瘤的基础与临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30672058
通讯作者: 周业江, 646000, 四川省泸州市江阳区太平街25号, 泸州医学院第一附属医院普外科. zyj7525@163.com
电话: 0830-3165421 传真: 0830-3165421
收稿日期: 2006-08-16 接受日期: 2006-09-16

Differential expression of Granzyme B in tumor cells between primary and metastatic gastric cancer and its potential role in tumor angiogenesis

Ye-Jiang Zhou, Yu-Xia Xiong, Guo-Ping Yi, Liang Xu, Dong Xia, Ren-Zhi Wei

Ye-Jiang Zhou, Guo-Ping Yi, Liang Xu, Dong Xia, Ren-Zhi Wei, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Yu-Xia Xiong, Department of Pharmacology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30672058
Correspondence to: Dr. Ye-Jiang Zhou, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Jiangyang District, Luzhou 646000, China. zyj7525@163.com
Received: 2006-08-16 Accepted: 2006-09-16

Abstract

AIM: To investigate the potential role of Granzyme B (GrB) in the biological behavior of gastric cancer, such as angiogenesis and lymphatic metastasis.

METHODS: The identification of GrB expression in gastric cancer cells was performed immunohistologically in patients with primary gastric cancers (PGC, n = 35) and lymphoid metastatic gastric cancer (LMGC, n = 23), and GrB^+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) served as positive internal control.The antibodies recognizing vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD34 were employed to detect the VEGF expression and microvascular density (MVD), respectively.

RESULTS: The positive rate of GrB expression was relatively lower in PGC with lymphoid metastasis than that without metastasis, but no significant difference was observed (P = 0.709). The positive rate of GrB expression in LMGC was significantly higher than that in the corresponding PGC (P = 0.038). The synchronous expression rate of GrB and VEGF came up to 57.1%, while there was no significant correlation between them. A significant negative correlation was found between the level of GrB expression and MVD (r = -0.421, P = 0.012) in PGC. VEGF expression was showed to have no significant effect on MVD in GrB positive PGC (P = 0.494). However, the decreased MVD in $VEGF^+$ PGC was remarkably associated with GrB expression (P = 0.023), and similar feature was exhibited in VEGF negative PGC (P = 0.134). The lowest and the highest MVD were demonstrated in PGC with positive GrB and negative VEGF, and PGC with positive VEGF and negative GrB, respectively (P = 0.013).

CONCLUSION: The over-expression of GrB in gastric cancer cells might contribute to the inhibition of tumor angiogenesis, but also might contribute to the survival potential of diffused tumor cells in lymph gland.

Key Words: Gastric cancer; Granzyme B; Angiogenesis; Lymphoid metastasis

Zhou YJ, Xiong YX, Yi GP, Xu L, Xia D, Wei RZ. Differential expression of Granzyme B in tumor cells between primary and metastatic gastric cancer and its potential role in tumor angiogenesis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2938-2942

摘要

目的: 探讨胃癌细胞Granzyme B(GrB)表达在肿瘤血管生成和淋巴转移中的作用.

方法: 以细胞毒T淋巴细胞为内对照, 采用免

疫组织化学染色S-P法检测35例胃癌及其中23例淋巴转移癌细胞GrB蛋白的表达; 同法检测35例胃癌血管内皮生长因子(VEGF)的表达及CD34标记的微血管密度(MVD).

结果: GrB的表达在无淋巴转移的胃癌高于有淋巴转移者, 但无显著性差异, 但淋巴转移灶的胃癌细胞GrB阳性率较相应的原发肿瘤显著增高(P = 0.038); 胃癌GrB与VEGF表达的同步率达57.1%, 两者表达水平无明显相关性, 而GrB表达水平与胃癌MVD呈显著负相关(r = -0.421, P = 0.012); GrB阳性胃癌无论其VEGF表达水平如何, 其MVD无显著差异; VEGF阳性胃癌MVD与GrB的表达状态明显相关, GrB阳性者MVD显著下降(P = 0.023), 在VEGF阴性胃癌中也有类似结果; GrB^+&$VEGF^-$表型胃癌MVD最低, $VEGF^+$&GrB^-表型胃癌MVD最高, 两者有显著性的差异(P = 0.013).

结论: 胃癌细胞GrB表达可能有助于抑制肿瘤血管生成, 但也可能有助于淋巴转移胃癌细胞的存活.

关键词: 胃癌; 颗粒酶B; 血管生成; 淋巴转移

周业江, 熊玉霞, 易国平, 徐亮, 夏冬, 魏仁智. Granzyme B在原发及淋巴转移性胃癌细胞中的差异表达及其与肿瘤血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2938-2942
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2938.asp

0 引言

Granzyme B(GrB)是细胞毒T淋巴细胞和NK细胞发挥免疫应答作用的主要效应分子, 近年来有研究发现, GrB可表达于人体肺癌、乳腺癌[1-2]和胃癌[3]等上皮肿瘤细胞, 成为肿瘤研究的重要进展. 但其在肿瘤细胞中表达的生物学意义仍不清楚. 本研究观察GrB在原发胃癌及淋巴转移癌细胞中的表达状况, 以及GrB与VEGF表达和微血管密度(MVD)的关系, 探讨GrB在胃癌血管生成和淋巴转移等生物学行为中的作用, 为进一步揭示GrB在胃癌细胞表达的生物学意义奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 35例胃癌来自1996-2000在我院普外科手术治疗的患者, 其中男28例, 女7例; 年龄31-66(平均45)岁; 早期胃癌4例(均为原位癌)、进展期胃癌31例; 肿瘤浸及浆膜者16例; 伴有淋巴转移者23例, 参照国际抗癌联盟(UICC)的TNM分期标准, Ⅰ期10例、Ⅱ期18例、Ⅲ期15例、Ⅳ期2例. 所有胃癌患者均接受了根治性或姑息手术切除, 但术前均未接受化疗、放疗及生物治疗. 鼠抗GrB, CD34 mAb、兔抗VEGF多克隆抗体、Ultrasensitive S-P Kit及DAB Kit均购自福州迈新生物技术开发公司的即用型产品.

1.2 方法 石蜡包埋的组织标本5 μm连续切片, 应用S-P免疫组化染色法, 操作按试剂说明进行, 高温高压修复抗原, 用PBS替代一抗作阴性对照. 胃癌细胞GrB表达以间质中GrB^+CTL为内对照, 定位于细胞质. GrB和VEGF的表达水平以染色强度评分+阳性细胞面积评分的积分表示, 采用先前的方法评定[4], 以积分≥3为表达阳性, 淋巴转移的胃癌细胞GrB表达采用相同的方法评估. MVD计数标准与方法参照Weidner *et al*[5]的方法, 对任何相互独立的、直径8个红细胞直径的微血管、单个内皮细胞或细胞簇均视为一个微血管计数. 计数方法为: 先在低倍镜(×100)下扫视整个切片, 寻找出4个高血管密度区(热区), 再在高倍镜(×200)下计数, 其平均值作为MVD.

统计学处理 计量资料以means±SD表示, 根据适用条件, 组间差异比较采用One-way ANOVA或非参数检验及Pearson相关性分析; 计数资料以阳性率表示, 采用Fisher精确概率法分析, 应用统计软件SSPS 13.0处理, 以P<0.05为有显著性意义.

2 结果

2.1 GrB在胃癌原发灶和淋巴转移灶肿瘤细胞的差异表达 以胃癌组织中浸润的GrB+T淋巴细胞作为阳性内对照, 在各种分化程度及组织类型的胃癌中均可观察到GrB的表达, 其表达定位于细胞质(图1), 胃癌原发灶GrB表达阳性率为34.3%(12/35), GrB表达与肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移状态和TNM分期均无明显关系. 淋巴转移灶的胃癌细胞也可见GrB表达(图2), 23例淋巴转移胃癌GrB阳性表达率为65.2%(15/23), 而相应的原发癌GrB阳性表达率为30.4%(7/23), 两者具有显著性差异(P = 0.038).

2.2 GrB表达与胃癌VEGF表达和血管生成活性的关系 VEGF 表达定位于细胞质, CD34位于肿瘤血管内皮细胞, 显示肿瘤新生血管(图3). GrB阳性胃癌VEGF的表达水平高于GrB阴性胃癌, 但差异无统计学意义, 相关分析显示两者无显著相关性(P = 0.31); GrB阳性胃癌MVD显著低于GrB阴性胃癌, 具有统计学意义(39.12±14.56 *vs* 53.05±20.97, P = 0.048), 相关性分析显

■研究前沿
淋巴转移和血管生成是影响胃癌预后的重要因素, GrB表达在胃癌淋巴转移和血管生成中的作用目前尚不清楚, 我们就此进行初步探讨.

■**创新盘点**
本研究提示GrB可能具有双向作用: (1)具有VEGF非依赖性的抑制胃癌血管生成的作用; (2)GrB表达本身并无促进胃癌淋巴转移的作用, 但可能使转移的胃癌细胞具有免疫耐受的功能而有助于在淋巴结的存活和发展. 国内外无类似报道.

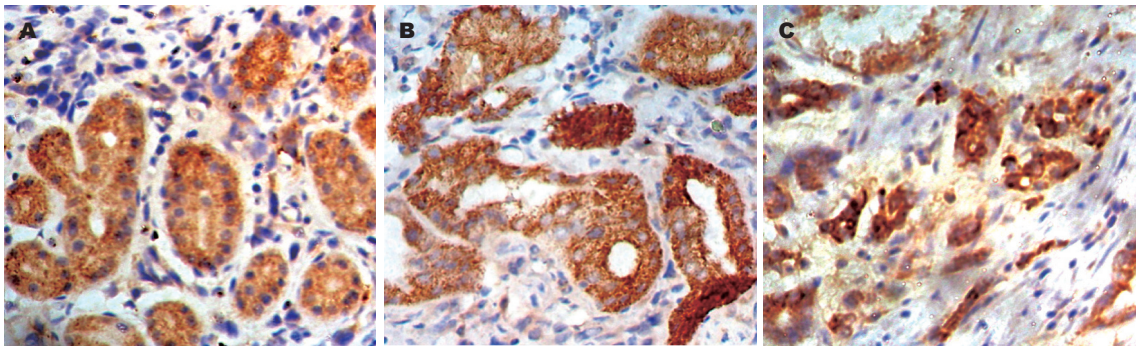


图 1 胃癌细胞GrB阳性表达(SP × 400). A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌.

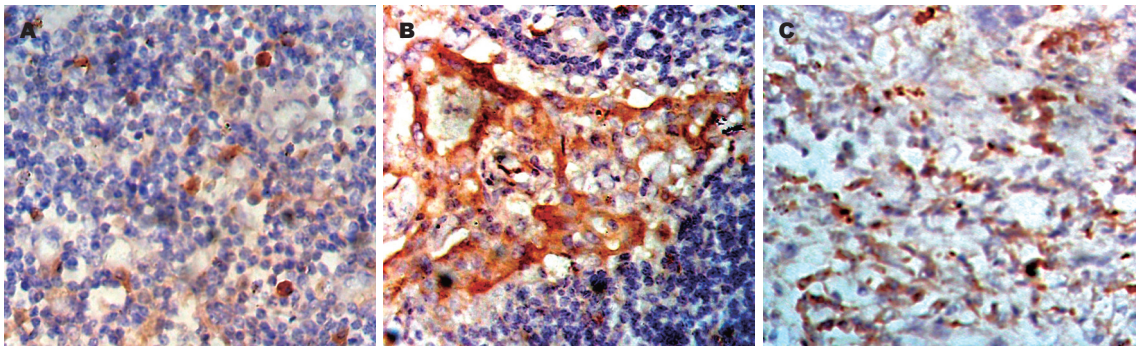


图 2 GrB在淋巴转移胃癌细胞阳性表达(SP × 400). A: 淋巴细胞GrB表达(阳性对照); B: 淋巴转移胃癌细胞GrB强阳性表达, 周围淋巴组织可见GrB阳性淋巴细胞; C: 淋巴转移的胃低分化腺癌GrB阳性表达.

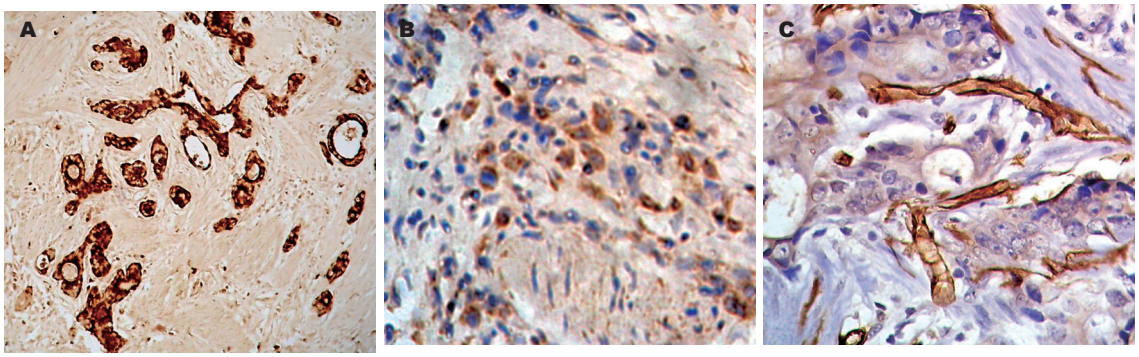


图 3 胃癌组织VEGF表达和肿瘤微血管检测(SP). A–B: 浸润性胃中、低分化腺癌(×200); C: CD34$^+$肿瘤微血管内皮细胞(×400).

示, GrB表达程度与胃癌MVD呈显著负相关(r = -0.421, P = 0.012, 图4).

2.3 GrB和VEGF表达之间的关系及其不同组合与胃癌血管生成活性的关系 GrB和VEGF组成的的4种不同表型的胃癌中, 两者同时阳性表达者占22.8%(8/35), 同时阴性表达者占34.3%(12/35), 同步率为57.1%; GrB$^+$&VEGF$^-$胃癌占11.43%(4/35), GrB$^-$&VEGF$^+$胃癌占31.4%(11/35), 非同步率42.9%, 两者无显著差异(P>0.05). GrB和VEGF组成的各表型组间胃癌MVD有显著性差异(F = 3.142, P = 0.039), 其中

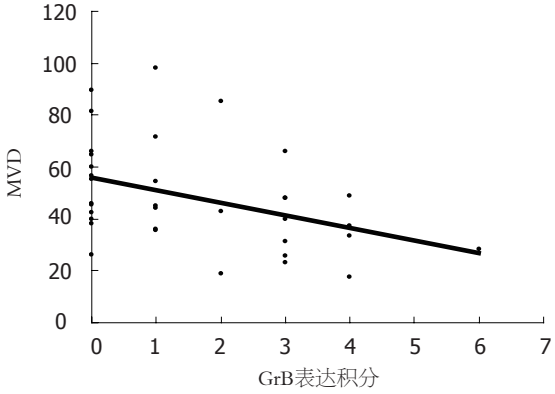


图 4 胃癌细胞GrB表达水平与肿瘤血管生成的关系.

以GrB$^+$&VEGF$^-$胃癌MVD最低, GrB$^-$&VEGF$^+$胃癌MVD最高. 分层分析显示: 在GrB$^+$胃癌中, VEGF阳性较VEGF阴性者MVD增高, 但无统计学意义; 在GrB$^-$胃癌中VEGF阳性较阴性者MVD增高更为明显, 但亦无统计学意义(60.14±19.8 *vs* 48.4±20.34, P = 0.134), 与之相反, 在VEGF阳性胃癌中, GrB阳性者MVD显著下降(60.14±19.8 *vs* 39.88±13.97, P = 0.023); 在VEGF阴性胃癌中, GrB阳性者MVD亦明显低于GrB阴性者, 但无统计学意义(48.4±20.34 *vs* 32.13±13.4, P = 0.134); GrB$^-$&VEGF$^+$胃癌组织MVD高于GrB$^+$&VEGF$^-$胃癌, 两者差异有统计学意义(60.14±19.8 *vs* 32.13±13.4, P = 0.013).

3 讨论

GrB在非淋巴肿瘤中表达的报道极少. Kontani *et al*[1]首先发现GrB和穿孔素在人体乳腺癌和肺癌细胞的表达, 且两者的表达水平与区域淋巴结的转移呈显著负相关; Hu *et al*[2]最近在人体乳癌细胞和RB缺失的乳癌细胞株证实确有内源性GrB的表达, 但其表达调节机制仍不明确. 本研究显示, GrB在人体胃癌细胞也有表达, 值得注意的是, GrB在分化程度较高, 浸润程度较低、无淋巴转移的胃癌中表达较高, 呈现出与胃癌分化、浸润, 淋巴转移等生物学行为负性关联的趋势, 尽管无统计学意义, 这是否可提示GrB阳性的胃癌具有较好的预后? 由于本研究观察的样本量较小, GrB表达与胃癌生物学行为的关系尚难以确定, 需要进一步研究. GrB在胃癌淋巴转移中的作用是本研究关注的重要内容, 为此, 我们进一步检测了淋巴转移性胃癌细胞GrB表达的情况. 结果发现, 在淋巴转移肿瘤细胞GrB呈阳性或强阳性表达, 而其相应的原发灶肿瘤细胞GrB则呈弱阳性表达, 转移至淋巴结的胃癌细胞GrB表达水平较相应的原发肿瘤细胞显著上调, 这是否暗示GrB阳性胃癌细胞可能具有较高的淋巴转移潜能? 有研究显示, 表达GrB的淋巴细胞及树突状细胞本身可表达丝氨酸蛋白酶抑制剂PI9, PI9可防止GrB介导的细胞毒攻击而具有免疫豁免功能[6], 我们推测表达GrB的胃癌细胞也可能存在类似的机制. 由此, 我们提出下列假说: GrB阳性的胃癌细胞本身可能并不具有更高的淋巴转移潜能, 但其可使肿瘤细胞获得免疫耐受的功能: 一旦发生转移后能更好地耐受CTL攻击而在淋巴组织获得较高的生存能力, 而GrB阴性胃癌细胞转移到淋巴细胞组织则易被清除而难以存活和发展, GrB在淋巴转移性的胃癌细胞高表达现象可能是经过细胞免疫选择后的结果. 无论如何, 本研究结果提示, GrB表达与胃癌淋巴转移可能有着密切的关系.

VEGF是最强的促肿瘤血管生成的主要因子, 其表达与胃癌血管生成显著相关. 本研究显示, GrB阳性胃癌MVD显著低于GrB阴性者, 其表达程度与MVD呈显著负相关; 但GrB阳性胃癌其VEGF的表达水平并不下降, 反而有所上调; 在GrB和VEGF的各种组合表型中, GrB阳性胃癌无论VEGF的表达水平如何, 其MVD均较GrB阴性表达者显著降低; 分层分析发现: 在GrB阳性胃癌中VEGF阳性表达者MVD仅有轻度增加(无统计学意义), 但在GrB阴性胃癌中VEGF表达者MVD则显著增加; 无论胃癌VEGF的表达状态如何, GrB阳性表达者MVD均显著下降, 尤以在VEGF阳性者更为显著. 而仅有GrB阳性表达胃癌MVD极显著地低于仅有VEGF阳性表达者. 这些结果强烈提示胃癌细胞GrB表达对肿瘤血管生成活性可能具有抑制作用, 其作用并非是通过调节VEGF表达的途径, 也不受VEGF表达水平的影响, 并对VEGF诱导血管生成还可能具有显著的拮抗作用.

GrB是细胞毒蛋白, 可以穿孔素依赖和非依赖的方式进入靶细胞并水解其DNA, 诱导其凋亡, 清除病变细胞, 在细胞免疫中是主要的效应分子. 体外实验证实, 血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合肽-GrB融合蛋白可靶向进入表达VEGFR的猪动脉内皮细胞, 诱导其凋亡[7]和靶向破坏LoVo细胞诱导的鸡胚绒毛尿囊新生血管[8], 提示GrB对肿瘤新生血管内皮细胞具有显著细胞毒作用. 据此并结合本研究结果, 我们推测GrB抑制血管生成机制可能有: (1)新生血管内皮细胞有较高的VEGF或其他促血管生成因子的受体表达, GrB也可能在肿瘤细胞内与VEGF或其他促血管生成因子形成融合蛋白的形式分泌, 对新生血管内皮细胞产生靶向细胞毒作用, 诱导其凋亡, 从而抑制血管生成, 其作用对VEGF或其他促血管生成因子的表达有一定依赖性; (2)肿瘤新生血管内皮细胞结构尚不完整, 渗透性高, 为GrB的进入提供了条件, 胃癌细胞通过旁分泌GrB, 发挥细胞毒作用, 直接诱导新生血管内皮细胞凋亡, 其作用不依赖于VEGF的表达.

■应用要点

GrB阳性胃癌可能是胃癌的新亚型, 其生物学行为一定有其特殊性, 对其进一步认识有助于探索胃癌的起源和肿瘤免疫耐受新机制, 对其他肿瘤的研究也有借鉴作用.

■同行评价
本文探讨了胃癌细胞GrB表达与血管生成和淋巴转移中的作用, 发现GrB对胃癌血管生成和淋巴转移有抑制作用, 为了解胃癌生物学行为提供了重要指标.

4 参考文献

1 Kontani K, Sawai S, Hanaoka J, Tezuka N, Inoue S, Fujino S. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 180-186

2 Hu SX, Wang S, Wang JP, Mills GB, Zhou Y, Xu HJ. Expression of endogenous granzyme B in a subset of human primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 2003; 89: 135-139

3 Zhou YJ, Xiong YX, Li CP, Shi D. Suppression of local immune response by GrB expression in gastric cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1573-1575

4 Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3225-3229

5 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887

6 Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL, Hack CE, Muris JJ, Dukers DF, Chott A, Kazama Y, Oudejans JJ, van Berkum O, Kummer JA. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 2002; 99: 232-237

7 Liu Y, Cheung LH, Thorpe P, Rosenblum MG. Mechanistic studies of a novel human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)121 and the serine protease granzyme B: directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 949-59

8 李先茂, 曾位森, 张亚历, 刘晓晴. 血管内皮生长因子受体结合肽介导颗粒酶B靶向性抗肿瘤血管生成. 第四军医大学学报 2002; 23: 1929-1932

电编 李琪 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 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心] .

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2943-2947
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

慢性萎缩性胃炎黏膜上皮中P53和C-erbB-2表达的临床意义

赵 松, 付英梅, 赵 柏, 刘连新

赵松, 刘连新, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150001
付英梅, 哈尔滨医科大学微生物教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
赵柏, 哈尔滨医科大学第二临床医学院泌尿外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
赵松, 2000年哈尔滨医科大学外科学硕士, 主治医师, 主要从事普通外科肿瘤和细胞移植研究.
通讯作者: 刘连新, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科.
liulianxin@medmail.com.cn
电话: 0451-53643849-5885 传真: 0451-53658828
收稿日期: 2006-08-29 接受日期: 2006-09-28

Expression of P53 and C-erbB-2 and their significances in chronic atrophic gastritis

Song Zhao, Ying-Mei Fu, Bai Zhao, Lian-Xin Liu

Song Zhao, Lian-Xin Liu, Department of General Surgery, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Ying-Mei Fu, Department of Medical Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Bai Zhao, Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Lian-Xin Liu, Department of General Surgery, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liulianxin@medmail.com.cn
Received: 2006-08-29 Accepted: 2006-09-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of P53 and C-erbB-2 proteins in chronic atrophic gastritis (CAG) and their correlation with clinicopathological parameters in CAG.

METHODS: SP immunohistochemistry was used to detect the expression of P53 and C-erbB-2 proteins in normal gastric mucosa (n = 56), chronic atrophic gastritis with cystic dysplasia (n = 61), intestinal metaplasia (n = 73), atypical hyperplasia (n = 295) and early gastric carcinoma (n = 57). The relationship between the expression of P53 and C-erbB-2 and the clinicopathological characteristics were analyzed.

RESULTS: The positive rates of P53 and C-erbB-2 protein expression were increased with the malignant degrees of gastric tissues. There were significant differences between normal gastric mucosa, moderate atypical hyperplasia, intestinal metaplasia, severe atypical hyperplasia and gastric carcinoma (P < 0.01). The expression of P53 was notably correlated with the age and gender of patients (χ^2 = 12.393, P < 0.01; χ^2 = 8.799, P < 0.01), while C-erbB-2 expression was just correlated with the age of patients (χ^2 = 7.706, P < 0.01). Besides, the expression of P53 was positively correlated with that of C-erbB-2 (r = 0.867, P < 0.05).

CONCLUSION: P53 and C-erbB-2 expression have significant correlations with the malignancy progression in CAG, and they can help to make early diagnosis for gastric cancer.

Key Words: Chronic atrophic gastritis; P53; C-erbB-2; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Zhao S, Fu YM, Zhao B, Liu LX. Expression of P53 and C-erbB-2 and their significances in chronic atrophic gastritis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2943-2947

摘要

目的: 探讨慢性萎缩性胃炎(CAG)黏膜上皮中P53及C-erbB-2的表达及意义.

方法: 用免疫组化技术(SP法)检测正常胃黏膜56例、慢性萎缩性胃炎429例(腺体囊性扩张61例, 大肠型化生73例, 轻、中、重度不典型增生各120、91和84例)和早期胃癌57例中P53和C-erbB-2的表达, 分析P53和C-erbB-2表达及其与CAG胃黏膜病变类型的关系.

结果: 正常胃黏膜, 囊性扩张腺体, 轻、中度不典型增生, 大肠型化生, 重度不典型增生, 早期胃癌P53和C-erbB-2表达的阳性率呈上升趋势. 前三组间表达率差异无统计学意义(P>0.05); 正常胃黏膜与中度不典型增生、大肠型化生、重度不典型增生及胃癌组P53和C-erbB-2的表达差异有统计学意义(P<0.01). Spearman等级相关分析显示P53和C-erbB-2表

■背景资料
慢性萎缩性胃炎(CAG)是胃癌癌前过程的重要环节之一, 但CAG在病理组织学上包括多种病变, 本文研究P53和C-erbB-2在CAG不同病理类型中的表达情况, 分析其与胃癌发生的关系, 有助于监测CAG癌前病变的进展及胃癌的早期发现.

■研发前沿
胃癌的发生、发展涉及多种基因的改变, P53和C-erbB-2是胃癌中常见的基因变化, 其表达与胃癌临床病例类型和恶性程度相关. CAG病理类型与癌变关系的研究是新近胃癌癌前病变中的重要课题, 而与胃癌发生有关的基因在癌前病变中的表达情况也是研究热点.

■创新盘点
本文通过检测正常胃黏膜、CAG伴腺体囊性扩张, CAG伴肠上皮化生、CAG伴轻、中、重度不典型增生及胃癌组织中P53和C-erbB-2表达, 分析两者在CAG不同阶段至胃癌的表达情况, 分别探讨这两种基因表达的检测结果与胃癌临床病理参数及预后的关系.

达呈正相关(r = 0.867, P<0.05). 年龄<40岁和≥40岁组间、性别组间P53表达阳性率差异有统计学意义(χ^2 = 12.393, P<0.01; χ^2 = 8.799, P<0.01). C-erbB-2的表达在上述年龄组间差异有统计学意义(χ^2 = 7.706, P<0.01), 而在性别组间无统计学意义(P>0.05).

结论: 检测慢性萎缩性胃炎中P53和C-erbB-2的表达, 有助于监测CAG癌前病变的进展及胃癌的早期发现.

关键词: 慢性萎缩性胃炎; P53; C-erbB-2; 胃癌; 免疫组织化学

赵松, 付英梅, 赵柏, 刘连新. 慢性萎缩性胃炎黏膜上皮中P53和C-erbB-2表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2943-2947
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2943.asp

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastrititis, CAG)与胃癌的发生关系密切, 很可能是癌前过程的重要环节之一[1-5]. 由于CAG在病理组织学上包括多种病变, 因此CAG类型与癌变关系的研究是新近胃癌癌前病变中的重要课题[2,6-8]. 胃癌的发生和发展与人体基因组的变化有密切关系, 涉及多个基因突变的过程及多种分子遗传学改变[9-10]. 我们利用免疫组织化学方法, 检测P53及C-erbB-2在CAG中的表达, 进一步探讨其与胃癌发生的关系及临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 1995-01/2003-01尸检、手术及胃镜活检标本存档蜡块CAG共672例, 其中伴轻度不典型增生120例, 中度不典型增生91例, 重度不典型增生84例, 大肠型化生73例(经奥新兰染色证实), 腺体囊性扩张61例, 共计429例(占63.8%). 男302例, 女127例, <40岁108例, ≥40岁321例. 正常胃黏膜56例和早期胃癌(肠型)57例. 所有蜡块均为40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm厚切片, 分别进行HE和免疫组化染色. 试剂购自福州迈新生物技术开发公司, 鼠抗人P53 mAb (Pab1801)由美国Santa Cruz公司生产, 鼠抗人C-erbB-2为德国Maxim Biotech公司产品.

1.2 方法 免疫组化采用SP法, P53, C-erbB-2蛋白测定按照试剂盒说明进行. 采用微波抗原修复, 设阳性和阴性对照. P53阳性表达为细胞核出现棕色颗粒, C-erbB-2阳性表达为细胞膜、胞质中出现棕色颗粒. 结果判定根据Volm *et al*[11]报道的标准进行, 即每张切片在高倍镜(×400)下计数10个视野, 依着色细胞占视野细胞总数的百分比计分: 阳性细胞<10%为1分, 11%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分. 染色强度计分: 0分, 阴性, 无染色; 1分, 弱阳性, 浅黄色; 2分, 中等, 棕黄色; 3分, 强阳性, 棕褐色. 阳性细胞百分比计分及染色强度计分之和>2者为免疫组化阳性.

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件, χ^2检验及求Spearman相关系数.

表 1 P53和C-erbB-2在慢性萎缩性胃炎中的表达(n/%)

临床病理指标	n	P53阳性	C-erbB-2阳性
正常胃黏膜	56	3 (5.3)	1 (1.7)
慢性萎缩性胃炎			
年龄			
<40岁	108	12 (11.1)[d]	9 (8.3)[d]
≥40岁	321	89 (27.7)	64 (19.9)
性别			
男	302	83 (27.4)[d]	56 (18.5)
女	127	18 (14.1)	17 (13.3)
不典型增生			
轻度	120	9 (7.5)	2 (1.6)
中度	91	20 (22.0)[b]	16 (17.5)[a]
重度	84	43 (51.9)[b]	39 (46.4)[b]
大肠型化生	73	21 (28.7)[b]	14 (19.1)[b]
肠管囊性扩张	61	8 (13.1)	2 (3.2)
早期胃癌	57	31 (54.3)[b]	29 (50.8)[b]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 正常; [d]P<0.01 *vs*各组内.

2 结果

2.1 P53和C-erbB-2的表达 P53表达为腺上皮细胞胞核内出现棕黄(褐)色颗粒, 正常胃黏膜组织中仅见极少数细胞呈微弱阳性表达. CAG中, 轻度不典型增生腺上皮细胞、囊性扩张腺体呈弱阳性表达, 大肠型化生及中度不典型增生腺上皮细胞呈阳性表达(图1A-B). 重度不典型增生及胃癌中表达明显增强(图1C-D). 大肠型化生、中度和重度不典型增生组P53表达阳性率均高于正常胃黏膜组, 差异有统计学意义(χ^2 = 11.468, 7.256, 31.994, P<0.01, 表1). 轻度不典型增生和囊性扩张腺体组P53表达阳性率与正常胃黏膜组相比, 差异无统计学意义(χ^2 = 0.042, 2.062, P>0.05). 从正常胃黏膜、囊性扩张腺体、轻、中度不典型增生、大肠型化生、重度不典型增生至胃癌, P53的表达率呈上升趋势, 重度不典型增生组接近胃癌组, 差异无统计学意义(χ^2 = 0.334, P>0.05). C-erbB-2阳性表达为腺上皮细胞膜及胞质中出现棕黄(褐)色颗粒. 重度不

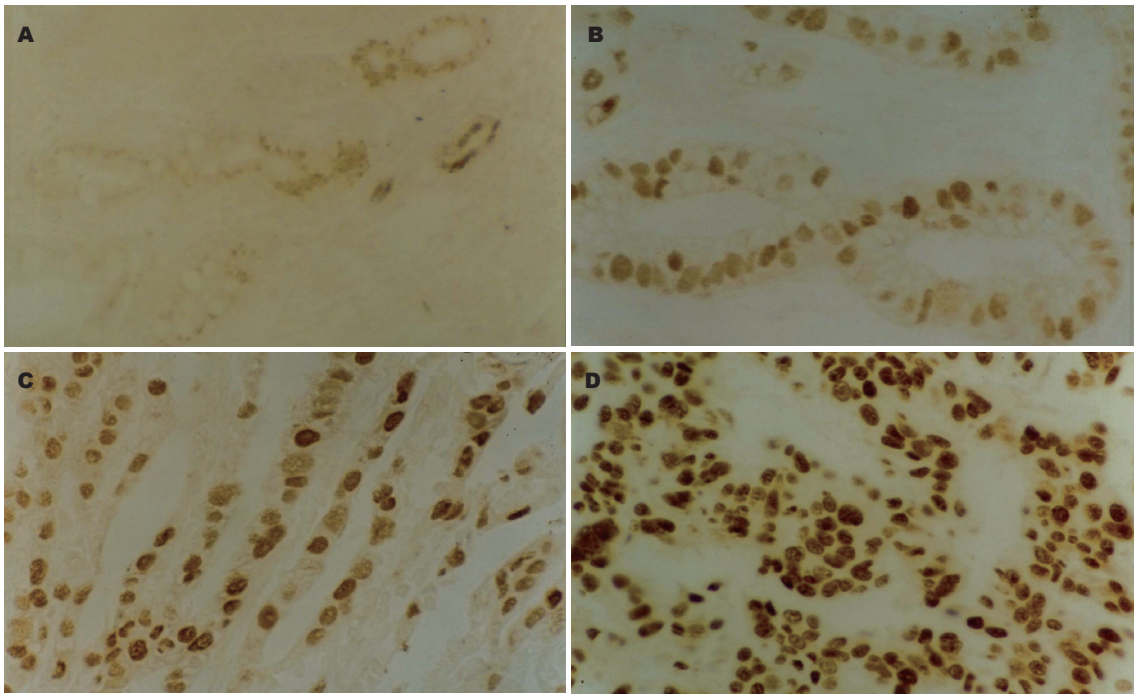


图 1 P53的表达(SP × 200). A: CAG大肠型化生阳性; B: CAG中度不典型增生阳性; C: CAG重度不典型增生腺上皮细胞中强阳性; D: 肠型胃癌强阳性.

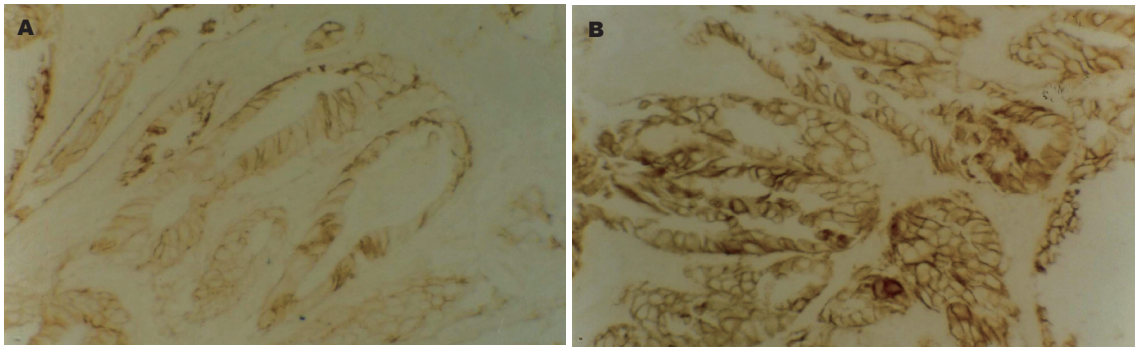


图 2 C-erbB-2的表达(SP × 200). A: CAG重度不典型增生强阳性表达; B: 肠型胃癌强阳性.

典型增生及胃癌组强阳性表达(图2A-B). 正常胃黏膜上皮细胞见极少数散在的微弱表达(1.7%), 囊性增生腺体及轻度不典型增生腺体为弱阳性表达, 与正常胃黏膜相比差异无统计学意义(χ^2 = 0.023, 0.002, P>0.05). C-erbB-2在中度不典型增生、大肠型化生、重度不典型增生及胃癌组中的表达率依次上升, 各组与正常胃黏膜组间差异有统计学意义(χ^2 = 8.458, 9.329, 21.813, 34.910, 均P<0.05, 表1).

2.2 P53及C-erbB-2表达的相关性 Spearman等级相关分析显示, 二者表达呈正相关(r = 0.867, P = 0.0 006). P53在年龄<40岁和≥40岁组中的表达率分别为11.1%和27.7%, C-erbB-2在年龄<40岁和≥40岁组中的表达率分别为8.3%和19.9%, 二者在年龄组间的表达差异有统计学意义(χ^2 = 12.393, 7.706, P<0.01). P53在性别组间的表达差异也具有统计学意义(χ^2 = 8.799, P<0.01), C-erbB-2在性别组间的表达差异无统计学意义(χ^2 = 1.684, P>0.05).

3 讨论

胃癌的发生、发展中, 既有抑癌基因的突变, 又有原癌基因的激活[9,12]. 研究表明P53基因是胃癌中最常突变的抑癌基因[10-14], 而c-erbB-2是胃癌中常见的原癌基因变化[15-16]. 本研究利用免疫组化方法检测CAG中P53及C-erbB-2的表达情况, 探讨CAG与胃癌发生的关系. 野生型p53作为一种抑癌基因, 通过调控细胞生长和促进凋亡发

■应用要点
通过CAG胃镜活检的免疫病理学观察, 检测P53和C-erbB-2的表达情况, 有助于对胃黏膜病变倾向作出判断.

■同行评价
通过检测P53和C-erbB-2的表达情况, 将有助于对胃黏膜病变倾向作出判断, 对胃癌的早期预防和治疗具有一定临床意义. 本文选题为临床所需, 实用性较强.

挥作用[14,17]. 突变后的P53基因不仅失去了上述作用, 反具有促进细胞恶性转化的功能[18-20]. 野生型P53基因产物半衰期短(<30 min), 用免疫组化方法难以检测, 而突变型P53基因产物的稳定性高, 用免疫组化方法检测出的P53蛋白, 皆为突变型基因产物[14], 因此, 可作为一种辅助诊断胃癌的标志物[21-22]. 我们发现, 从正常胃黏膜、囊性扩张腺体、轻、中度不典型增生、大肠型化生、重度不典型增生至胃癌, P53表达率呈依次上升趋势, 其中重度不典型增生组与胃癌组该基因表达率差异无统计学意义(P>0.05), 而与正常胃黏膜组间差异显著(P<0.001), 说明p53基因的突变在CAG胃黏膜上述病变中广泛存在, 重度不典型增生中其表达已接近于胃癌, 提示P53基因的突变在胃癌癌前病变的后期明显上升. 因此, 检测P53的表达有助于对胃黏膜癌前病变进展的监测.

原癌基因c-erbB-2是细胞基因组的正常成分, 其表达产物在细胞增殖及分化调控中起重要作用. 该基因被激活后, 表现为基因的扩增和产物的高表达, 具有致癌变活性[23-24]. Werner *et al*[16]发现, 在胃癌及其组织周围的肠化、异型增生胃黏膜中有C-erbB-2表达的明显增加. 本研究发现, 除在正常胃黏膜中该基因的表达率极低(1.7%)外, 囊性扩张和轻度不典型增生腺上皮细胞中也有弱阳性, 大肠型化生和中度不典型增生组阳性表达率增加, 重度不典型增生组和胃癌组均为强阳性表达, 这一发现证明c-*erb*B-2也参与CAG癌前病变的发生. 本组观察结果表明, 在CAG上述病变中, 既有P53基因的广泛突变, 又有c-*erb*B-2的广泛激活, 二者表达呈正相关, 提示二者在CAG癌前病变中具有重要作用.

此外, P53和C-erbB-2在<40和≥40中的人群间表达差异显著, 提示年长者更易发生P53和C-erbB-2的改变. 本文中P53在男性的表达率高于女性, 差异具有统计学意义(P<0.01), 分析其原因可能为男性嗜烟酒比例高于女性, 这一发现与吸烟是胃癌发生的危险因素的研究结果一致[25]. 吸烟对P53作用的具体机制尚需进一步研究. 近年来纤维胃镜的广泛应用为CAG病变跟踪观察提供了有利条件[26-27], 根据本文的发现, 对慢性萎缩性胃炎, 应用纤维胃镜活检的免疫病理学观察, 检测P53和C-erbB-2的表达情况, 有助于对胃黏膜病变倾向作出判断, 在胃癌尚未达到病因学一级防治的今天, 对胃癌的早期预防和治疗具有重要临床意义.

4 参考文献

1 Tan YK, Fielding JW. Early diagnosis of early gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 821-829

2 Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: S29-S36; discussion S61-S62

3 Ali M, Khan AA, Tiwari SK, Ahmed N, Rao LV, Habibullah CM. Association between cag-pathogenicity island in Helicobacter pylori isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6815-6822

4 Malfertheiner P, Sipponen P, Naumann M, Moayyedi P, Megraud F, Xiao SD, Sugano K, Nyren O. Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2100-2115

5 Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187-194

6 Leung WK, Ng EK, Chan WY, Auyeung AC, Chan KF, Lam CC, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Risk factors associated with the development of intestinal metaplasia in first-degree relatives of gastric cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2982-2986

7 Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Helicobacter pylori infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 791-796

8 Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2004; 53: 1244-1249

9 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198

10 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003; 11: 526-530

11 Volm M, Koomagi R, Mattern J, Efferth T. Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1843-1848

12 Hofler H, Becker KF. Molecular mechanisms of carcinogenesis in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162: 65-72

13 Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H, Becker KF, Luber B. Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 104: 60-65

14 Xi YG, Ding KY, Su XL, Chen DF, You WC, Shen Y, Ke Y. p53 polymorphism and p21WAF1/CIP1 haplotype in the intestinal gastric cancer and the

precancerous lesions. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2201-2206
15 Agnantis NJ, Goussia AC, Stefanou D. Tumor markers. An update approach for their prognostic significance. Part I. *In Vivo* 2003; 17: 609-618
16 Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 207-216
17 Semenza GL. VHL and p53: tumor suppressors team up to prevent cancer. *Mol Cell* 2006; 22: 437-439
18 Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 2006; 25: 3778-3786
19 Gobbo Cesar AC, de Freitas Calmon M, Cury PM, Caetano A, Borim AA, Silva AE. Genetic alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 625-629
20 Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T. Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4884-4890
21 Cho-Chung YS. Autoantibody biomarkers in the detection of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 587-591
22 Nesterova M, Johnson N, Cheadle C, Cho-Chung YS. Autoantibody biomarker opens a new gateway for cancer diagnosis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 398-403
23 Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, Delmotte P, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89: 959-965
24 Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 47-69
25 Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *Am Fam Physician* 2004; 69: 1133-1140
26 Yang JM, Chen L, Fan YL, Li XH, Yu X, Fang DC. Endoscopic patterns of gastric mucosa and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2552-2556
27 陈剑鸣, 龚飞跃. 慢性萎缩性胃炎的相关因素及内镜与病理诊断比较的临床意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2045-2047

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号.《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录.《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线http://www.wjgnet.com免费阅读全文.《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.《世界华人消化杂志》开通了http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2948-2953
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

农村居民家庭幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查

范红敏, 袁聚祥, 徐应军, 张天哲

■背景资料
*H pylori*感染的途径至今未阐明, 但许多资料表明人与人密切接触可以增加感染的传播机会. 在关系密切的家庭成员中, 其*H pylori*感染率要高于普通人群. 但关于*H pylori*感染在家庭内的传播, 大多数已开展的研究是针对有症状儿童的父母和兄弟姐妹, 而不是普通人群的. 为了避免这种可能出现的选择偏性, 我们对河北省遵化市某村263人进行了*H pylori*感染的血清流行病调查, 收集其一般情况、吸烟、饮酒、饮食嗜好、社会经济状况、生活习惯、健康状况、疾病家族史等信息, 了解其*H pylori*的感染情况, 可能的相关因素, 有否家庭聚集性及其相关的传播途径, 为制定合理的预防措施提供依据.

范红敏, 袁聚祥, 徐应军, 张天哲, 华北煤炭医学院预防医学系 河北省唐山市 063000
范红敏, 2000年华北煤炭医学院硕士研究生毕业, 现今中国协和医科大学在读博士研究生, 讲师, 主要从事传染病流行病学研究.
通讯作者: 范红敏, 063000, 河北省唐山市建设南路57号, 华北煤炭医学院预防医学系. fhm01@sohu.com
电话: 0315-3725719 传真: 0315-3725312
收稿日期: 2006-08-01 接受日期: 2006-08-15

A seroepidemiology survey on *Helicobacter pylori* infection in rural families

Hong-Min Fan, Ju-Xiang Yuan, Ying-Jun Xu, Tian-Zhe Zhang

Hong-Min Fan, Ju-Xiang Yuan, Ying-Jun Xu, Tian-Zhe Zhang, Department of Preventive Medicine, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Correspondence to: Hong-Min Fan, Department of Preventive Medicine, North China Coal Medical College, 57 Jianshe North Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. fhm01@sohu.com
Received: 2006-08-01 Accepted: 2006-08-15

Abstract

AIM: To estimate the prevalence of *H pylori* infection in rural families, and to investigate the transmission route of *H pylori* infection.

METHODS: A cross-sectional study was carried out among 263 villagers from 71 families in September 2004 in Zunhua city, Hebei province. Each subject was interviewed using a unified questionnaire. Blood sample of 5 mL was collected for the antibody examination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot analysis was performed to distinguish the infected strains, and compared with two standard strains NCTC 11637 and CAPM N111, respectively. Similarity analysis was then carried out with Quantity one 4.1.1 software, which is special for photographs of electrophoresis.

RESULTS: The seroprevalence of *H pylori* infection in residents of this area was of medium level in our country, and it was not associated with gender. In this area, the risk factors of infection were bad living conditions, overcrowding and possession of pigs during childhood, as well as several generations eating together, less vinegar and fruit intake. The overall prevalence and serum level of anti-*H pylori* antibodies in 263 subjects was 57.41% and 0.911 ± 0.810 μg/L, respectively. In males, they were 60.50% and 0.948 ± 0.843 μg/L, while 54.86% and 0.880 ± 0.748 μg/L in females, respectively ($P > 0.05$). Infection clustered within families, and 60% and 51.35% of the children with two or at least one infected parent were *H pylori*-positive, while the prevalence rate in the children with both parents uninfected was only 11.11% ($P < 0.05$). Western blot showed that the antibodies of the residents living in the area were similar in bands ($F = 1.22$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The prevalence of *H pylori* in residents of this area was of medium level in our country. Infection clusters within families, and the status of parents' infection can affect that of the children.

Key Words: Rural residents; *Helicobacter pylori*; Family clustering; Seroepidemiology; Western blot

Fan HM, Yuan JX, Xu YJ, Zhang TZ. A seroepidemiology survey on *Helicobacter pylori* infection in rural families. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2948-2953

摘要

目的: 了解幽门螺杆菌(*H pylori*)感染在农村居民的感染率和探索*H pylori*感染的传播途径.

方法: 2004-09对河北省遵化市某村71户家庭263人进行横断面研究, 采用面对面问卷调查形式由专人填写调查表, 采集静脉血液标本5 mL, 用酶联免疫吸附实验(ELISA)方法检测HpUIgG抗体. 用免疫印迹方法(Western blot)检测血清中的*H pylori*抗体.

结果: 该地区居民的*H pylori*感染率属于中等水平, 男女感染率没有差别. 当地居民*H pylori*感染的危险因素有未成年时住房拥挤、条件差、养猪、现在家庭中几代共同进餐及醋和

水果进食过少等. 263位受检者中, *H pylori*总血清感染率为57.41%, 抗体平均水平为0.911±0.810 μg/L; 其中男性感染率为60.50%, 抗体平均水平为0.948±0.843 μg/L; 女性感染率为54.86%, 抗体平均水平为0.880±0.784 μg/L. *H pylori*感染有家庭聚集性. 父母双方或者一方*H pylori*感染阳性的其子女*H pylori*感染率(60%, 51.35%)明显高于父母*H pylori*感染均阴性者(11.11%, $P<0.05$). 以家庭为单位进行的血清Western blot分析发现各种血缘关系家庭成员, 其血清抗体平均相似度较之家庭间成员的平均相似度并没有差别($F = 1.22$, $P>0.05$), 两两比较结果亦无差别.

结论: 该地区居民的*H pylori*感染率属于中等水平, 男女感染率没有差别. *H pylori*感染存在家庭聚集性.

关键词: 农村居民; 螺杆菌; 幽门; 家庭聚集性; 血清流行病学; Western blot

范红敏, 袁聚祥, 徐应军, 张天哲. 农村居民家庭幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2948-2953
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2948.asp

0 引言

自从1982年Warren和Marshall从慢性活动性胃炎患者的胃黏膜中首次分离出幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)以来, 大量研究表明, *H pylori*作为世界上人类感染率最高的细菌之一, 是B型胃炎的主要致病因子, 并且与消化性溃疡的发病密切相关. 人类胃黏膜上*H pylori*的持续定植, 也增加了胃腺癌和胃黏膜相关性淋巴样组织(MALT)恶性淋巴瘤发生的风险. 早在1994年, 国际癌症研究机构(IARC)就已将*H pylori*列为人类的Ⅰ类致癌物. 我国属于*H pylori*的高感染地区. 流行病学资料显示, 我国各地自然人群中成人*H pylori*感染率在50%左右, 感染后的自愈率几乎为零, 即一旦受到感染, 如果不采取正规方案治疗, 将终生受累. 在目前无理想的*H pylori*疫苗预防其传播的情况下, 弄清*H pylori*的传播机制和影响因素是当前流行病研究的热点之一. *H pylori*感染的途径至今未阐明, 但许多资料表明, 人与人之间密切接触可以增加感染的传播机会. 在关系密切的家庭成员中, 其*H pylori*感染率要高于普通人群. 但关于*H pylori*感染在家庭内的传播, 大多数已开展的研究是针对有症状儿童的父母和兄弟姐妹, 而不是普通人群的. 为了避免这种可能出现的选择偏性, 我们对河北省遵化市某村263人进行了*H pylori*感染的血清流行病调查, 了解其*H pylori*的感染情况、有否家庭聚集性及其相关的传播途径, 为制定合理的预防措施提供依据.

■创新盘点
本文对农村居民家庭*H pylori*感染的血清流行病学进行了调查, 以期了解*H pylori*感染在农村居民的感染率和探索*H pylori*感染的传播途径.

1 材料和方法

1.1 材料 远离城市、交通不便、相对独立的河北省遵化市某村71户家庭进行了普查, 共263人, 其中男性119人, 女性144人, 年龄在6-86岁之间. 中国预防医学科学院研制山东潍坊医药集团股份有限公司生产的纯化尿素酶试剂盒, 该试剂盒灵敏度为98%, 特异度为96%. 国际标准菌株NCTC11637和国内标准菌株CAPM N111由中国疾病预防控制中心传染病控制中心惠赠.

1.2 方法 采用面对面问卷调查形式, 由专人填写调查表, 内容包括一般情况, 现社会经济状况及生活饮食习惯, 未成年时社会经济状况及生活饮食习惯, 健康状况, 胃病家族史等55个因素. 每位受试者采肘静脉血5 mL, 1000 r/min离心10 min, 分离血清, -20℃冻存, 统一进行检测. 采用纯化尿素酶试剂盒检测抗HpUIgG, 该试剂盒灵敏度为98%, 特异度为96%. 严格按照试剂盒使用说明书进行操作. 其结果判定: (1)肉眼观察, 颜色深于或等于标准血清为阳性, 颜色浅于标准血清为阴性, 同一样本相同稀释度的两孔出现明显不同颜色深度时, 该样本重做. (2)仪器测定: 以酶标仪450 nm波长测定各孔*A*值, 样本平均*A*值大于或等于标准血清平均*A*值者为阳性; 否则为阴性. 同一样本相同稀释度的两孔的*A*值波动超过其均值的1.5倍时, 该样本重做. 以血清抗体阳性受检者的比率作为*H pylori*感染率. 人群样品的Western blots分析: 选择具有地区代表性和抗原代表性的国际标准菌株NCTC11637和国内标准菌株CAPM N111, 收菌于双蒸水中制成约10^{10} cfu/mL菌液, 加等量2×样品缓冲液. 100℃水浴5 min后, 用于聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 标准菌株由中国疾病预防控制中心传染病中心(张建中研究员)惠赠. *H pylori*抗原的SDS-PAGE: 制备双份PAGE胶, 分离胶浓度为110 g/L和50 g/L, 每胶12加样孔, 每孔加入100 μL样品, 在恒压45 V, 16 h的SDS-PAGE后, 采用80 mA, 恒流6 h将抗原转移至醋酸纤维膜(NC膜)上, 转膜后的NC膜进行相应标记后, 放入50 g/L的脱脂奶粉中封闭过夜. NC抗原片的切割及再次预封闭: 将封闭后的各抗原膜纵向切成

■同行评价
本文选题较准确，但有一定参考价值，流行病学调查缺乏循证医学意义.

表 1 *H pylori*感染率的性别、年龄分布

年龄组(岁)	男				女				合计			
	检查数	阳性数	阳性率(%)	抗体含量(μg/L)	检查数	阳性数	阳性率(%)	抗体含量(μg/L)	检查数	阳性数	阳性率(%)	抗体含量(μg/L)
6–	6	1	16.67	0.305±0.295	4	2	50.00	0.859±0.971	10	3	30.00	0.527±0.667
10–	20	11	55.00	0.810±0.785	35	10	28.57	0.558±0.568	55	21	38.18	0.650±0.660
20–	15	10	66.67	1.002±0.866	15	9	60.00	0.847±0.727	30	19	63.33	0.924±0.790
30–	29	20	68.97	0.968±0.856	38	25	65.79	0.990±0.757	67	45	67.16	0.980±0.795
40–	29	16	55.17	0.983±0.972	20	12	60.00	1.076±0.983	49	28	57.14	1.021±0.967
50–	20	14	70.00	1.160±0.738	32	21	65.63	0.998±0.838	52	35	67.31	1.060±0.798
合计	119	72	60.50	0.948±0.843	144	79	54.86	0.880±0.784	263	151	57.41	0.911±0.810

3 mm宽的膜条，按顺序标记，以便在照相记录结果时能够恢复原来的排列位置. 不同菌株相同号码抗原条编入一组并放入50 g/L的脱脂奶粉中过夜进行再次封闭. 血清标本的Western blot分析：将再次封闭后的膜片，用TBS-T洗涤3次，每次10 min，将1∶4稀释的各待测血清2 mL放入相应的NC膜组容器中，室温震荡2 h，用TBS-T洗涤NC膜3次，每次10 min，将NC膜放入1∶50稀释的HRP-羊抗人IgG中，室温震荡1.5 h，再用TBS-T洗涤膜3次，每次10 min后，将NC膜放入新配制的4-氯-1萘酚底物液中，显色满意后，放入蒸馏水中终止反应. 血清样品的Western blot实验结果用BIORAD Gel Doc 2000TM凝胶成像分析系统照相记录结果后，用电泳照片分析处理专用软件quantity one 4.1.1进行条带相似度分析.

统计学处理 全部资料采用EXCEL建库，用SAS 6.12统计软件包进行单因素χ^2分析，*t*检验和方差分析.

2 结果

2.1 研究对象的一般情况及*H pylori*感染的危险因素 263位受检者中，*H pylori*总血清阳性人数为151人，感染率为57.41%，平均抗体含量为0.911±0.810 μg/L；其中男性受检者119人，阳性者72人，感染率为60.50%，平均抗体含量为0.948±0.843 μg/L；女性受检者144人，阳性者79人，感染率为54.86%，平均抗体含量为0.880±0.784 μg/mL；男女*H pylori*感染率和平均抗体含量比较差异没有显著性. 虽然有的年龄段由于受检人数少，感染率值不稳定，仍可看出随着年龄的增大，总的*H pylori*感染率呈上升趋势(表1).

该村居民中初中毕业者占52.09%，比例较大. 将调查对象按照年龄分为两组(<20岁组和≥20岁组)，分别比较不同文化程度者*H pylori*感染情况，未见感染率有差异. 受检者中非本地出生者均为嫁入或入赘本地的成年人，均在20岁以上，故在分析时选择20岁以上年龄组人群，比较其*H pylori*感染状况，结果发现外地迁入者*H pylori*感染率高于本地出生居民(76.47% *vs* 61.64%)，但差异尚无显著性. 在受检者中，有过长期外出史的人占43.73%，比例较大，其*H pylori*感染率虽然高于无长期外出史的人群(61.74% *vs* 54.05%)，但差异无显著性. 按照现在及未成年时人均居住面积将调查对象分别分为两组，分别进行*H pylori*感染状况与人均居住面积的关系比较，发现*H pylori*感染与未成年时人均居住面积有关，未成年时居住拥挤者的感染率较高，与现人均居住面积无关(χ^2 = 7.230, P = 0.007). 未成年时居住草房、简易房者其*H pylori*感染率较住平方及瓦房者高，统计学有显著性(χ^2 = 4.493, P = 0.034). 现家中养猪组及不养猪组的人群*H pylori*感染率分别为63.96%及52.63%，χ^2检验未见有统计学显著性，但未成年时家中养猪组及不养组的人群*H pylori*感染率分别为60.80%及46.88%，差异有显著性. 既往有文献报道，吸烟饮酒可能与*H pylori*感染有关，因此按性别对受检者中20岁及以上者进行*H pylori*感染与吸烟、饮酒关系的分析，差别均无显著性. 本研究发现，几代人共同进餐家庭成员*H pylori*感染率较核心家庭进餐家庭成员*H pylori*感染率高，差异有显著性. 被调查者的饮食习惯中，发现*H pylori*感染状况与经常食醋，食水果有关. 常食醋及常食水果者，其*H pylori*感染率较不食者低(P<0.05). 石家口村地处山区，水质良好，水位在10 m以下，被调查人群，各家均有自备水井，村民饮用生水习惯普遍存在. 调查发现饮用生水者其*H pylori*感染率高于饮用开水者(分别为59.56%和44.74%)，但是χ^2检验未见差异.

表 2 *H pylori*感染与结婚年数的关系

≤30岁组	≤感染状况		合计	感染率(%)	>30岁组	*H pylori*感染状况		合计	感染率(%)
结婚年数	阳性	阴性			结婚年数	阳性	阴性		
0–	9	5	14	62.49	5–	10	4	14	71.43
5–10	7	1	8	87.50	10–	69	43	112	61.61
合计	16	6	22	72.73	合计	79	47	126	62.70

2.2 家庭*H pylori*感染状况分析 调查对象中共有74对夫妻, 年龄为20-69岁, 为探讨夫妻共同生活的可能传播途径, 对受检夫妻*H pylori*感染率与结婚年数之间的关系进行分析. 考虑到*H pylori*感染率是随着年龄的增加而逐渐上升的, 将受检者按照年龄分为>30岁年龄组和≤30岁年龄组, 分别进行比较, 结果差别无显著性(表2). 调查的74对夫妻中, 33对双方均为阳性, 12对双方均为阴性, 29对为夫或妻阳性, 夫妻*H pylori*感染的一致性为60.81%. 以父母抗HpUIgG水平为索引, 对其100名家庭成员的*H pylori*感染状况检测结果进行分析(不包括父母在内), 其总的*H pylori*感染率为48%, 父母均阳性的家庭成员*H pylori*感染率为60%, 父母一方抗体阳性的家庭成员*H pylori*感染率为51.35%, 父母均阴性的家庭成员*H pylori*感染率为11.11%(表3).

表 3 父母*H pylori*感染状况与子女感染状况的关系

父母感染状况	子女*H pylori*感染状况		合计	感染率(%)
	阳性	阴性		
父母均阳性	27	18	45	60.00
父母一方阳性	19	18	37	51.35
父母均阴性	2	16	18	11.11
合计	48	52	100	48.00

$\chi^2 = 10.588$, $P = 0.005$.

2.3 血清*H pylori*抗体Western blot分析 选择具有抗原代表性和地区代表性的国际标准菌株NCTC11637和国内标准菌株CAPM N111作为抗原, 对所有ELISA检测结果阳性的血清, 以家庭为单位进行Western blot分析. 观察家庭内部成员之间, 及家庭间不同人群之间免疫印迹反应条带的相似性. 比较家庭成员之间, 不同家庭成员之间的免疫印迹反应条带相似度, 从而对其感染的*H pylori*抗原情况进行分析(表4). 子女之间的血清相似度均高于其他各种家庭关系的血清相似度, 且其数值变异度较小($F = 1.220$, $P = 0.2915$). 虽然方差分析显示家庭内部成员之间及不同家庭成员之间其血清免疫印迹反应条带相似度并没有显著性差异, 两两比较结果亦如此. 但仍可认为子女间感染的菌株是较为相似的.

表 4 家庭内成员各种关系及家庭间成员血清条带相似度(mean ± SD, %)

相互关系	血清条带相似度
夫妻	54.51 ± 14.59
母女	54.01 ± 11.51
父女	53.50 ± 13.63
父子	57.29 ± 16.31
母子	57.71 ± 14.02
兄妹	64.00 ± 6.59
隔代	56.56 ± 10.75
家庭间成员	54.48 ± 9.28

3 讨论

关于*H pylori*的具体传播途径至今尚未阐明, 有学者提出*H pylori*感染可能是通过人与人之间的密切接触而传播的, 其感染的家庭聚集性就是一个重要的证据. 但大多数已开展的这类研究是以家庭中某种消化道疾病患者为先证者, 对其家庭成员进行调查, 而不是针对普通人群的调查, 在对象的选择上往往存在偏向性. 许多资料表明, 密切生活接触利于*H pylori*的传播, *H pylori*感染的家庭聚集现象就是一个重要的证据[1-2]. 本次研究亦发现, 在父母均为*H pylori*阳性的家庭中, 子女*H pylori*感染率达到60%, 父母一方*H pylori*阳性的家庭中, 子女感染率为51.35%, 而在父母均为*H pylori*阴性的家庭中, 子女的*H pylori*感染率仅为11.11%. 提示, *H pylori*感染在家庭中有聚集现象. 此外, 许多资料均表明, 在生活在人口密度较大的集体人群, 如生活在军队[3]、学校[4-5]或孤儿院[6-10]等的人群, *H pylori*感染率均较高. 但是, *H pylori*是如何在人与人之间传播的目前尚不完全清楚, 随着细菌从唾液、牙菌斑、胃液和粪便中的检出[11-15], 提

出其可能的主要传播途径可能是口口途径和粪口途径. 口口途径是指*H pylori*定植于口腔中的牙菌斑上, 通过唾液传播给他人, 这种途径往往需要人与人的直接接触. 有调查指出, 母亲把咀嚼过的食物喂给婴儿和吃饭时家庭内共用饭碗是发展中国家*H pylori*感染的传播机制[16-21]. 本次研究亦对父母口嚼食物喂养子女情况进行了调查, 未发现口嚼喂养的子女的*H pylori*的感染率升高, 但发现几代共同进餐家庭*H pylori*感染率要高于核心家庭成员的*H pylori*感染率($P<0.05$), 这可能是由于家庭中成员吃饭时共用碗筷而致其*H pylori*感染率的升高. 粪口途径被认为是*H pylori*传播的另一途径. 有报道[21-28], 对日本的70对夫妻志愿者进行内镜检查, 并用限制性长度多态性(RFLP)PCR法检测*H pylori*, 双方都检出者仅有21对, 双方*H pylori*感染的一致率达到50%. 但这21对夫妻均*H pylori*阳性者中又有20对具有不同的RFLP, 仅有1对显示有相同的UreB和UreC RFLP模式. 本次调查的74对夫妻中, *H pylori*感染的一致率为60.81%, 但未发现*H pylori*感染与夫妻的结婚年数之间存在有关联性($P = 0.563$), 关于夫妻之间*H pylori*感染的传播还需要进一步的研究予以阐明.

本次研究中, 对HpUIgG抗体阳性血清进行的免疫印迹分析, 发现其与抗原的反应条带结果具有相似性. 同一家庭的不同关系成员之间血清条带相似度与不同家庭成员的相似度比较虽未见差异, 仍可见子女间血清条带相似度较大, 且变异度较小. 结合本次研究*H pylori*感染家庭聚集性及血清Western blot反应条带的分析结果, 可看出儿童时期是*H pylori*感染的主要时期, 生活中家庭成员之间的密切接触, 可能是*H pylori*传播的主要方式. 与国内一些关于成人*H pylori*感染状况的报道相一致[9,29-30].

4 参考文献

1 Bittencourt PF, Rocha GA, Penna FJ, Queiroz DM. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82: 325-334

2 Kivi M, Johansson AL, Reilly M, Tindberg Y. *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 645-652

3 Furesz J, Lakatos S, Nemeth K, Fritz P, Simon L, Kacserka K. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infections among young recruits during service in the Hungarian Army. *Helicobacter* 2004; 9: 77-80

4 Malaty HM, Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003; 8 Suppl 1: 8-12

5 Magalhaes Queiroz DM, Luzza F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006; 11 Suppl 1: 1-5

6 Halitim F, Vincent P, Michaud L, Kalach N, Guimber D, Boman F, Turck D, Gottrand F. High rate of *Helicobacter pylori* reinfection in children and adolescents. *Helicobacter* 2006; 11: 168-172

7 万毅, 徐勇勇, 薛富波, 姜建辉. 幽门螺杆菌感染家庭聚集的Meta分析. 第四军医大学学报 2003; 24: 58-59

8 周曾芬, 南琼, 马岚青, 刘一运, 王健, 金利. 云南玉溪地区幽门螺杆菌感染流行病学调查与健康教育在人群防治中的作用. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 258-262

9 林蒙, 陈碰玉, 陈艳, 刘书议, 郑祖平, 卓星, 郑敏. 生姜产地幽门螺杆菌感染的家庭聚集性调查. 临床内科杂志 2003; 20: 72-73

10 王凯娟, 王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学Meta分析. 中华流行病学杂志 2003; 24: 443-446

11 Ozen A, Ertem D, Pehlivanoglu E. Natural history and symptomatology of *Helicobacter pylori* in childhood and factors determining the epidemiology of infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 398-404

12 Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb MA, Ali SM, Ahi JD, Abid Z, Alvi A, Hussain MA, Ahmed N, Habibullah CM. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. *Singapore Med J* 2006; 47: 291-296

13 Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghighat M, Hayati M, Rashidi M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 259-261

14 Weyermann M, Adler G, Brenner H, Rothenbacher D. The mother as source of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiology* 2006; 17: 332-334

15 Lin HY, Chuang CK, Lee HC, Chiu NC, Lin SP, Yeung CY. A seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* and hepatitis A virus infection in primary school students in Taipei. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38: 176-182

16 Sherman PM. Appropriate strategies for testing and treating *Helicobacter pylori* in children: when and how? *Am J Med* 2004; 117 Suppl 5A: 30S-35S

17 Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9 Suppl 1: 1-6

18 Sinha SK, Martin B, Gold BD, Song Q, Sargent M, Bernstein CN. The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission. *Helicobacter* 2004; 9: 59-68

19 Fujimura S, Kato S, Kawamura T. *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38: 517-521

20 Rodrigues MN, Queiroz DM, Bezerra Filho JG, Pontes LK, Rodrigues RT, Braga LL. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 201-205

21 Rocha GA, Rocha AM, Silva LD, Santos A, Bocewicz AC, Queiroz Rd Rde M, Bethony J, Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, Queiroz DM. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-

aged children from Minas Gerais, Brazil. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 987-991
22 Nishise Y, Fukao A, Takahashi T. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection among a rural population in Japan: relation to living environment and medical history. *J Epidemiol* 2003; 13: 266-273
23 Ueda M, Kikuchi S, Kasugai T, Shunichi T, Miyake C. *Helicobacter pylori* risk associated with childhood home environment. *Cancer Sci* 2003; 94: 914-918
24 Chen LK, Hwang SJ, Wu TC, Chu CH, Shaw CK. *Helicobacter pylori* and hepatitis A virus infection in school-aged children on two isolated neighborhood islands in Taiwan. *Helicobacter* 2003; 8: 168-172
25 Papiez D, Konturek PC, Bielanski W, Plonka M, Dobrzanska M, Kaminska A, Szczyrk U, Bochenek A, Wierzchos E. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish shepherds and their families. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 10-15
26 Niv Y. Family history of gastric cancer: should we test and treat for *Helicobacter pylori*? *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 204-208
27 Nurgalieva ZZ, Malaty HM, Graham DY, Almuchambetova R, Machmudova A, Kapsultanova D, Osato MS, Hollinger FB, Zhangabylov A. *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 201-206
28 Rothenbacher D, Winkler M, Gonser T, Adler G, Brenner H. Role of infected parents in transmission of *helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 674-679
29 陈旻湖, 彭铁立. 幽门螺杆菌的传播途径. 临床消化病杂志 2006; 18: 68-70
30 刘伟, 许春娣, 奚容平, 陈舜年. 上海地区不同家庭环境中儿童幽门螺杆菌感染的流行病学. 中国实用儿科杂志 2006; 21: 19-21

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 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

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

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2954-2957
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肝脏神经内分泌区室的研究进展

陈 谦, 李 强

■背景资料
肝脏祖细胞和肝脏星状细胞都具有神经内分泌的特征, 形成了可能受控于中枢神经系统的肝脏神经内分泌区室, 这对于解释再生和瘢痕形成的神经控制机制是非常重要的.

陈谦, 李强, 天津市环湖医院 天津市 300060
通讯作者: 李强, 300060, 天津市, 天津医科大学附属肿瘤医院,
收稿日期: 2006-06-18 接受日期: 2006-09-01

摘要
肝脏的祖细胞和肝脏星状细胞都具有神经内分泌的特征. 祖细胞表达嗜铬粒蛋白-A、神经细胞黏附分子、甲状旁腺素相关肽、S-100蛋白、神经营养因子和其受体, 肝脏星状细胞表达突触素、胶质纤维酸性蛋白、神经细胞黏附分子、nestin、神经营养因子和其受体. 这种表型提示, 这些细胞类型形成了可能受控于中枢神经系统的肝脏神经内分泌区室. 我们证明了副交感神经系统促进了肝脏损伤后的祖细胞伸展, 而去神经的移植肝脏和肝炎肝脏, 其祖细胞数量都较原本的完全神经支配的肝脏为少, 解释再生和瘢痕形成的神经控制机制是非常重要的. 而且, 对于再生机制的深入认识可能具有治疗学上的意义, 甚至可能避免原位肝脏移植的必要.

关键词: 肝脏祖细胞; 肝脏星状细胞; 副交感神经系统; 肌纤维母细胞; 神经内分泌

陈谦, 李强. 肝脏神经内分泌区室的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2954-2957
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2954.asp

0 引言
肝脏与胆囊、胰腺及肺等都是前肠衍生的器官, 除肝脏外都具有与肠神经系统的神经元和神经胶质衍生自相同胚胎起源的固有神经丛和神经节, 肝脏则通过副交感神经和交感神经与下丘脑相联系而不具有神经嵴衍生的固有神经元[1]. 肝脏具有两种发育成熟的上皮细胞区室, 即肝细胞和胆管上皮细胞, 还含有受控于中枢神经系统、在肝脏损伤修复和肿瘤演进中发挥重要作用的神经内分泌区室, 即祖细胞和星状细胞. 中枢神经系统与肝脏神经内分泌区室的联系具有重要的生理功能, 但肝脏移植术后, 移植的肝脏是去神经支配的, 与受体的神经系统没有联系, 相对于非移植的肝脏, 移植的肝脏具有一种被扰乱的再生潜能.

1 肝脏祖细胞
1.1 *祖细胞和祖细胞的激活* 肝脏祖细胞的概念主要基于细胞培养、肝癌形成的动物模型和化学损伤后的肝细胞再生[2-4]. 在这些模型中, 一种门静脉周围小的原始上皮细胞组成的细胞群, 其增殖与肝细胞增殖相关或者在肝细胞增殖之前, 这些细胞根据其形状被称为椭圆形细胞, 这种称谓被广泛用于动物肝脏的祖细胞. 椭圆形细胞表达的表型标记物包括(不成熟的)肝细胞(如甲胎蛋白)和胆管细胞(如胆管型细胞角蛋白). 动物实验证实了骨髓源性干细胞可以发生肝细胞、椭圆形细胞和胆道细胞[5-8], 相似的情况在人类肝脏也有所描述[9]. 人类肝脏也存在祖细胞(相当于鼠的椭圆形细胞), 并在多种肝脏疾病中可以被激活, 祖细胞的激活是指祖细胞数量的增加和其向肝细胞和/或胆的细胞谱系的分化. 通过动物模型我们已知, 当肝细胞和/或胆道细胞的损伤或丢失合并成熟细胞类型参与的损伤修复时祖细胞被激活. 祖细胞可以分化成为肝细胞和胆管上皮细胞, 对于患病肝脏这些细胞区间的再生发挥作用[10]. 人类的肝脏中, 向胆的细胞谱系分化导致反应性小胆道形成, 向肝细胞谱系分化则形成中间型肝胆管细胞. 这种从最不成熟的细胞到小管道和中间型的肝细胞形成了一种具有独特表型的细胞区室, 即祖细胞区室. 事实上每一种急性或慢性人类肝脏疾病都伴随肝细胞和/或胆道细胞这两种主要的肝脏上皮细胞区间的损伤和缺失. 多种诱发因素会导致损伤, 包括病毒、乙醇、毒性物质、代谢异常和其他未知因素. 终末期慢性肝病唯一可能的治疗方法是肝移植. 供体器官的缺乏要求研究出可以替代的治疗策略. 细胞治疗在将来可能成为一种可替代肝移植的疗法. 由于祖细胞具有双向分化的潜能, 可能成为细胞治疗理想的候选者.

1.2 *祖细胞区室的神经内分泌特征* 肝脏祖细胞区室具有神经内分泌特征, 表达嗜铬粒蛋白-A、神经细胞黏附分子(NCAM)、甲状旁腺素

相关肽、S-100蛋白、神经元特异性磷酸丙酮酸水合酶、神经营养因子(NT)和其受体等.

1.2.1 嗜铬粒蛋白-A 一种在神经内分泌颗粒基质中存在的分子, 其作用一方面是封装和加工激素和神经肽, 另一方面是稳定颗粒内容物. 相对于其他分子, 嗜铬粒蛋白-A已经被证实是一种神经内分泌细胞的高度可靠的标记物.

1.2.2 对NCAM的反应性 NCAM在胚胎中是广泛分布的, 但在成人组织中主要局限于神经系的细胞和内分泌细胞. NCAM通过细胞-细胞和细胞-基质方式在发育中发挥重要的调节作用. NCAM可能在调节祖细胞/反应性小胆道在外周基质中的分布范围发挥重要作用, 也可能通过细胞-细胞相互作用, 与已经证实能够表达NCAM的肝脏星状细胞结合.

1.2.3 神经元特异性烯醇酶(NSE) 一种在神经和内分泌细胞中存在的糖酵解酶. 常被用作多数神经内分泌细胞和肿瘤反应标记物. 反应性胆小管已经被证实表达NSE.

1.2.4 甲状旁腺激素相关肽(PTHrP) 胆道梗阻、亚大片坏死后的再生、原发性胆汁性肝硬变和原发性硬化性胆管炎中, 大部分的反应性胆小管细胞表达PTHrP. 正常人类肝脏的胆小管细胞和肝细胞对于PTHrP或者神经内分泌标记物没有免疫反应性.

2 肝脏星状细胞(HSC)和肌纤维母细胞

2.1 HSC和HSC的激活 HSC位于窦状隙周围, 其长突起一直延伸围绕窦周和肝细胞间, 细胞质内可见脂滴. 基于表达弹性蛋白、结蛋白和α-平滑肌肌动蛋白(αSMA), HSC已经被认为是间充质起源. 自从Kupffer首次描述HSC, 使用氯化金染色找到神经纤维开始, HSC的神经内分泌指征不断积累. HSC被认为是在所有病理条件(肝炎、纤维化、肝硬变、肝细胞癌等)下激活. HSC激活以丢失脂小滴和获得αSMA表达为特征. HSC激活后分化为肌纤维母细胞, 在肝脏修复、瘢痕形成及肿瘤演进中发挥重要作用[11-12]. 上皮细胞和间质细胞的联合作用在胚胎发育、创伤修复和肿瘤演进等现象中发挥着重要作用. 肝细胞癌等许多上皮性肿瘤具有结缔组织细胞和细胞外基质发生局部聚集的特点, 这种现象被称作间质反应. 肌纤维母细胞是间质反应细胞性组分中最重要的一种[13]. 肌纤维母细胞在正常肝脏是不存在的, 其来源于前体细胞的活化, 研究最多的是HSC[14]. 起源于HSC的肌纤维母细胞在肝窦毛细血管化和肿瘤血管形成中发挥作用, 这利于肿瘤的转移[15]. HSC表达突触素(SYN)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、NCAM、nestin、NT和其受体. HSC通过分泌肝细胞生长因子(HGF)、干细胞因子(SCF)和脑源性神经营养细胞诱向因子(BDNF)与祖细胞相互作用, 祖细胞表达这些生长因子的受体. SYN是一种小颗粒(30-80 nm), 电子半透明(SET)小囊泡的跨膜糖蛋白. 这类小囊泡包括神经细胞内的突触前小囊泡和神经内分泌细胞内的一些较大的突触样微泡(SLMV). SYN蛋白与细胞外排作用的控制和神经肌肉突触等神经递质的释放有关. SYN的免疫组织化学检测通常使用结合嗜铬粒蛋白-A、NSE和人自然杀伤细胞-7表面的抗原决定簇的方法以决定身体各处的组织和肿瘤的神经内分泌起源和/或分化. 已经证实仅仅在神经和神经内分泌细胞表达SYN, 兔的血小板除外. SYN染色是一种临床实践中常用的诊断工具, SYN蛋白的存在与神经/神经内分泌的分化明确相关. NT家族包括神经生长因子(NGF)、BDNF、NT-3和NT-4/5. 中枢、周围神经系统以外的器官或组织表达NT被认为是对过度生长物的刺激反应和对周围神经系统的维持[16]. 中枢神经系统损伤后反应性神经胶质细胞增殖的现象与HSC在多种病理条件下的行为表现出了惊人的形态学相似性. HSC和神经胶质细胞都表达nestin, NCAM和GFAP. 神经变性疾病的反应性神经胶质细胞表现出明显的ABCRYS向上调节[17-18]. 在肝脏中, ABCRYS的表达不限于HSC, 肝细胞中也有较低的表达. 在激活/反应性细胞中ABCRYS的表达和诱导作用是HSC和神经胶质细胞的另一个相似性. 祖细胞和HSC/肌纤维母细胞形成了肝脏的神经内分泌区室. HSC和祖细胞被认为是在中枢神经系统控制下工作的修复和再生的效应细胞, 也可能是为病变或再生组织的神经支配恢复创造合适环境所必需的.

3 肝脏的神经支配

肝脏通过副交感神经和交感神经与下丘脑相联系, 这些神经在进入肝实质前沿着门静脉、肝动脉和胆管走行. 交感神经发起自胸7-10脊神经, 通过腹腔神经节支配肝脏; 副交感神经通过前后的迷走神经支配肝脏. 鼠化学损伤后选择性迷走神经切断术减少了祖细胞的数量, 副交感神经系统刺激则促进了祖细胞伸展. 人类去神经的移植肝脏和肝炎发生的肝脏, 祖细胞数

■**创新盘点**
祖细胞和星状细胞形成了一个具有神经内分泌特征的细胞区室, 交感神经系统和副交感神经系统都对这个细胞区室产生影响, 这对于肝脏疾病的治疗策略是很重要的.

■名词解释
肝脏神经内分泌区室: 由具有神经内分泌特征, 可能受控于中枢神经系统的肝脏祖细胞和星状细胞组成的细胞区室.

量都较完全神经支配的肝脏为少.

3.1 副交感神经系统对肝脏神经内分泌区室的影响 迷走神经肝支切断术抑制了肝部分切除术后的肝再生, 下丘脑腹内侧核损伤后迷走神经的刺激则会促进肝部分切除术后的肝脏再生. HSC表现出与肝脏神经末梢密切的联系并且表达GFAP、NCAM、nestin、SYN和NT及其受体[19-20]. 肌纤维母细胞、肥大细胞和胆碱能的神经末梢的功能上的复合已被证实在肝硬化的发生上发挥作用, 在肝硬化的过程中, 肝脏祖细胞也被证实参与其中[21]. 人类肝脏祖细胞表达M3受体. M3受体的表达减少了祖细胞向肝细胞系的分化而保持了向胆系的分化. 进一步的实验揭示了迷走神经的肝脏分支分泌乙酰胆碱, 后者以结合到M3受体的方式在正在增殖的胆管细胞中做为营养因子而发挥作用. 肝脏的神经是已知的唯一的肝脏内乙酰胆碱的来源, 因为他们含有乙酰胆碱和包装乙酰胆碱的运载体囊泡的产生所必需的胆碱乙酰基转移酶[22]. 肝脏非神经细胞不可能存在其他的乙酰胆碱产生部位, 这已经在其他组织得到证实[23]. 肝脏神经分泌的乙酰胆碱一定具有重要和不可被目前发现的任何一种附加的局部来源代偿的作用. 在动物实验中, 迷走神经肝脏分支在再生和典型的小导管反应中的明显的营养性作用已被证实. 乙酰胆碱具有通过旁分泌的方式介导其效应的能力. 肝细胞产生和分泌胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶的部位在细胞表膜. 血清胆碱酯酶的浓度精确反应了肝细胞团块大小, 也可用来估计肝硬化患者的预后. 在正常和部分切除的肝脏, 每个祖细胞被一定数量的肝细胞包围, 通过产生和分泌胆碱酯酶, 这些肝细胞缺乏乙酰胆碱而不能和祖细胞上M3受体结合. 但当肝细胞缺失和损伤性增殖时, 胆碱酯酶活性对应局部和严重的肝细胞缺失而表现出成比例的下降, 而允许乙酰胆碱对肝脏祖细胞发挥其营养效应, 直到肝细胞团块恢复原先大小. 肝移植的过程中, 迷走神经的肝脏分支被切断, 仅仅在移植肝脏的肝门部有恢复的神经支配. 无论正常或患病的移植肝脏, 乙酰胆碱不能再对肝脏祖细胞发挥其有利效应. 通过哌唑嗪这种α_1-肾上腺素能的拮抗剂或通过6-羟基多巴胺这种化学性交感神经阻断剂引起的交感神经系统的抑制, 促进了祖细胞的激活也降低了肝脏的损伤[24]. Oben *et al*[25]已经证明了星状细胞自身产生去甲肾上腺素并且对去甲肾上腺素应答. 祖细胞和孤立的HBC都表达α-肾上腺素能受体[26].

总之, 祖细胞和HBC形成了一个具有神经内分泌特征的细胞区室. 交感神经系统和副交感神经系统都对这个细胞区室产生影响, 这对于肝脏疾病的治疗策略是很重要的, 我们要刺激祖细胞激活同时抑制HBC激活, 这种疗法最终将延缓甚至取代肝移植.

4 参考文献

1 Delalande JM, Milla PJ, Burns AJ. Hepatic nervous system development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 280: 848-853

2 Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201-204

3 Qin AL, Zhou XQ, Zhang W, Yu H, Xie Q. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1480-1486

4 He YF, Liu YK, Gao DM, Chen J, Yang PY. An efficient method of sorting liver stem cells by using immuno-magnetic microbeads. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3050-3054

5 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

6 Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2394-2397

7 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240

8 Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746

9 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16

10 Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 385-396

11 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826

12 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27

13 Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 509-517

14 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826

15 Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 2003; 37: 674-685

16 Shalizi A, Lehtinen M, Gaudilliere B, Donovan N,

Han J, Konishi Y, Bonni A. Characterization of a neurotrophin signaling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J Neurosci* 2003; 23: 7326-7336
17 Oertel MF, May CA, Bloemendal H, Lutjen-Drecoll E. Alpha-B-crystallin expression in tissues derived from different species in different age groups. *Ophthalmologica* 2000; 214: 13-23
18 van Rijk AF, Bloemendal H. Alpha-B-crystallin in neuropathology. *Ophthalmologica* 2000; 214: 7-12
19 Cassiman D, Denef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158
20 Cassiman D, Roskams T, van Pelt J, Libbrecht L, Aertsen P, Crabbe T, Vankelecom H, Denef C. Alpha B-crystallin expression in human and rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001; 35: 200-207
21 Xiao JC, Jin XL, Ruck P, Adam A, Kaiserling E. Hepatic progenitor cells in human liver cirrhosis: immunohistochemical, electron microscopic and immunofluorencence confocal microscopic findings. World J Gastroenterol 2004; 10: 1208-1211
22 Xue C, Aspelund G, Sritharan KC, Wang JP, Slezak LA, Andersen DK. Isolated hepatic cholinergic denervation impairs glucose and glycogen metabolism. *J Surg Res* 2000; 90: 19-25
23 James DE, Nijkamp FP. Neuroendocrine and immune interactions with airway macrophages. *Inflamm Res* 2000; 49: 254-265
24 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, Torbenson M, Huang J, Guarino P, Kafrouni M, Diehl AM. Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury. *Hepatology* 2003; 38: 664-673
25 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
26 Dubuisson L, Desmouliere A, Decourt B, Evade L, Bedin C, Boussarie L, Barrier L, Vidaud M, Rosenbaum J. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002; 35: 325-331

■同行评价
本文对祖细胞和肝脏星状细胞形成的具有神经内分泌特征的细胞区室的研究进展进行了综述，介绍了交感神经系统和副交感神经系统对这个细胞区室产生的影响，该文有一定的新意，对肝脏疾病的治疗研究具有指导意义.

电编 李琪 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(三星级), 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).

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2958-2961
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肠息肉发生的细胞和分子生物学研究进展

姚 蓝, 宋家武

■背景资料
肠息肉是一类从黏膜表面突出到肠腔内的隆起状病变的总称, 是一类发病率高, 危害程度重, 部分具有肯定的恶变趋向的疾病. 由于其发生和发展的原因和机制一直少有突破, 诊疗上亦少有进展.

姚蓝, 宋家武, 中山大学附属第五医院消化内科 广东省珠海市 519000
通讯作者: 宋家武, 519000, 广东省珠海市, 中山大学附属第五医院消化内科. songjw@mail.sysu.edu.cn
电话: 0756－2528843
收稿日期: 2006-09-21 接受日期: 2006-10-05

摘要
肠息肉是一类从黏膜表面突出到肠腔内的隆起状病变的临床诊断. 在最近的研究中陆续证实, 其发生和发展的原因和机制, 是由于*Bmpr1a*, *APC*, *SMAD4*, *PTEN*, *STK11*等基因突变而使各种细胞信号分子通过影响BMP信号通路, PTEN信号通路及Wnt信号通路所组成的生长信号调控网络, 造成β-catenin在肠干细胞中的过度积聚, 使得肠干细胞功能紊乱, 导致其自我更新、克隆增殖、分化和凋亡失去平衡的结果.

关键词: 肠息肉; 肠息肉病; 分子生物学

姚蓝, 宋家武. 肠息肉发生的细胞和分子生物学研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2958-2961
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2958.asp

0 引言
肠息肉是一类从黏膜表面突出到肠腔内的隆起状病变的临床诊断. 他是一种较常见的新生物. 大约有30%的人在一生中会有肠息肉的形成, 且随着年龄的增长, 发生肠息肉的风险越大. 而大部分患肠息肉的患者因无任何症状都不会发现有肠息肉的存在, 常常是在死亡后尸体解剖时才会被发现. 在中国, 约1.4%-20.4%的肠息肉患者其肠息肉会转变为恶性[1], 且因早期症状不明显, 常不能及时发现而耽误病情. 特别是对于肠息肉病(肠息肉综合征)的患者, 不仅因肠息肉数目过多(常>100个), 并具有特殊的临床表现, 常对日常生活造成极大的困扰, 且息肉癌变的风险也大大增加, 威胁生命. 因而, 从细胞和分子生物学水平上研究肠息肉发生的根本机制及原因, 对于肠息肉病的早期诊断与寻找新的治疗方法和新的靶点具有非常重要的意义.

■研发前沿
明确肠息肉的发病机制, 是当前研究的难点和热点. 近年来, 随着分子遗传学进步, 特别是细胞内分子信号传导以及干细胞技术的进步, 其相关研究有重大突破. 有望成为阐明其发病机制的新的突破口.

1 肠息肉分类及其特点
在临床上, 肠息肉常因各自特殊的临床表现和组织结构学上差异, 给予了不同的临床疾病名称和组织学分类. 如根据其组织结构的特点划分, 肠息肉主要分为腺瘤型肠息肉和错构瘤型肠息肉. 前者除了包括大部分散发的肠息肉外, 还包括家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)、加德纳综合征(Gardner's syndrome, GS)、特科特综合征(Turcot's syndrome), 以其息肉在组织学上为腺瘤样, 有较高的恶变倾向为特点. 第二类是错构瘤型肠息肉, 主要包括色素沉着息肉综合征(Peutz-Jegher syndrome, PJS)、幼年性息肉病综合征(juvenile polyposis syndrome, JPS)、Cowden综合征(CS)、BRR综合征(Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome, BRRS)[2-3].

2 肠息肉形成的细胞生物学机制
最近的细胞生物学研究表明, 肠息肉的形成, 是由于肠干细胞细胞生物学功能紊乱, 导致其自我更新和克隆增殖、分化和凋亡失去平衡的结果. 在生理条件下, 小肠表面上存在着一种简单的柱状细胞, 这种细胞是内陷的, 存在于肠隐窝中, 是肠隐窝中主要的增殖细胞. 他们以发芽的方式进行增殖, 分化形成绒毛状的肠功能细胞. 同时, 某些间充质细胞, 例如, 成纤维细胞沿着肠隐窝-绒毛轴梯度堆积细胞外基质物, 小肠上皮组织下隐窝周围的肌纤维母细胞辅助肠隐窝的形成等, 共同促进了小肠表面最重要的小肠上皮组织的主要结构－肠隐窝和绒毛的形成. 通常, 1个绒毛来源于6-10个肠隐窝[4], 而1个肠隐窝就是由1个肠干细胞增殖扩增所形成的. 这种相对未分化肠干细胞, 常位于近肠隐窝底部倒数第3或第4个细胞位置, 位于潘氏细胞之上[5-6]. 而对于结肠来说, 因其不存在绒毛及潘氏细胞, 其肠干细胞常位于隐窝的底部[6]. 肠干细胞在自我更新时, 呈不对称分裂, 即在产生1个自身细胞(保留同源染色体最初的模板链, 并停留在肠隐窝底部附近)的同时产生另1个增殖性祖细胞(proliferative

progenitor). 而该祖细胞相对于干细胞, 只存在着相当有限的自我更新能力, 当他们经过3-4次细胞分裂后, 他们的子代将沿着肠隐窝一绒毛轴逐渐移行到绒毛顶端, 并不断的分化成熟成下面4种类型：肠吸收细胞, 分泌黏液的杯状细胞, 分泌激素的肠激素细胞, 抗微生物的潘氏细胞[4,7]. 其中分化成熟的潘氏细胞不在长轴上, 而逐渐移行到隐窝底部, 在此生存约3 wk[4]. 其他分化的细胞在24-48 h后将移行到绒毛顶端并逐渐凋亡脱落. 而对于缺乏绒毛的结肠来说, 增殖的子细胞位于结肠隐窝的下2/3, 而分化成熟的细胞位于结肠隐窝的上1/3和肠上皮组织[6], 在组织结构上相当于小肠的绒毛结构, 并有着同样的细胞增殖灭活的生理过程. 只有当肠干细胞的不断增殖分化和移行与肠道上皮组织细胞不断的灭活相互平衡时, 才能共同维持肠道正常的生理结构. 当肠干细胞因某种原因突变, 通过肠隐窝的过度分裂, 不断进行自我更新、克隆、增殖分化, 超过了正常肠上皮组织细胞灭活的速度, 打破了生理平衡, 导致肠上皮组织上不断的细胞扩增, 并超过临近的正常肠隐窝时, 就导致了肠息肉的形成[5,8]. 因此, 肠道干细胞的异常克隆增殖在肠息肉形成过程中起着关键作用.

3 肠息肉形成的分子生物学机制

3.1 肠干细胞中b-catenin的积聚与肠息肉的关系 β-catenin在肠干细胞中的过度积聚是导致肠干细胞过度克隆增殖和肠息肉形成的主要因素. 早在1990年代, 已有多个研究发现, 在APC基因敲除小鼠中存在β-catenin在肠息肉中的过度积聚, 证实了β-catenin在肠息肉发生机制中的重要性[9]. 而近年, He *et al*[5]又在*Bmpr1a*基因突变小鼠的实验中进一步证实了肠息肉组织中β-catenin不仅积累显著增多, 并且证实了其积聚主要存在于肠干细胞中, 阐明了肠干细胞中β-catenin过度积聚在肠息肉发病中的重要作用. 当肠干细胞胞质中β-catenin过度堆积后, 将促进其转移到细胞核中, 与细胞核中的TCF(T-cell factor)相结合, 并与染色质构型重塑蛋白(the choromatin-remodeling protein)p300和Brg-1共同激活c-myc, cyclinD1, matrilysin, gastrin, ITF-2等特异靶基因的转录[10-11], 通过β-catenin/TCF转录通路导致肠干细胞的过度增殖与分化[5], 从而打破增殖与凋亡的平衡, 导致肠息肉形成.

3.2 肠干细胞中β-catenin的调节 肠干细胞中β-catenin的调节, 与BMP信号通路, PTEN信号通路或Wnt信号通路息息相关, 而这3条通路又相互作用, 相互影响, 共同平衡细胞的更新和凋亡.

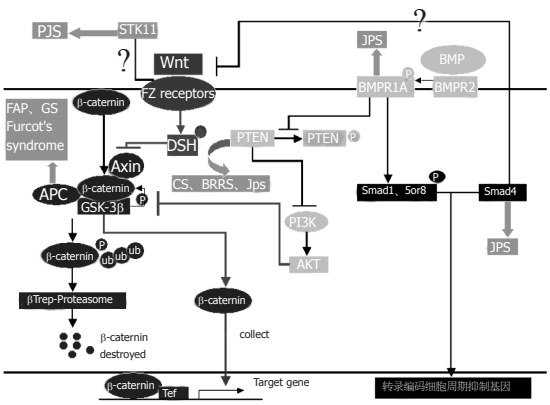


图 1 肠息肉发生过程中肠干细胞分子信号通道及调控网络.

3.2.1 Wnt通路 研究证实, Bmpr1a, APC, SMAD4, PTEN, STK11(丝氨酸/苏氨酸激酶11)等细胞信号分子都可通过各自相应的信号途径影响Wnt通路,调节肠干细胞中β-catenin的代谢, 导致肠息肉的发生. 因而, Wnt通路是众多细胞信号分子调节肠干细胞增生,导致肠息肉形成的共同通路. 当该途径中的Wnt配体与细胞膜上的FZ受体相结合后, 使得DSH磷酸化[12], 而磷酸化DSH则与Axin结合, 阻止β-catenin与GSk3β、Axin、APC形成复合物[10-11], 导致β-catenin不能被GSk3β磷酸化以及被BTrCp泛素化[12], 抑制了β-catenin在细胞质中的水解而逐渐积聚, 最终β-catenin可转位进入细胞核, 激活β-catenin/TCf依赖的转录, 促进肠道干细胞的不断更新及增殖分化. 同时有研究发现, STK11也参与了Wnt-β-catenin途径的调节, 与肠息肉发生相关, 但具体机制尚不清楚[3].

3.2.2 PTEN通路 在PTEN通路中, PTEN可抑制PI3K-AKT途径, 使得AKT不能抑制GSk3β . 从而影响Wnt通路, 间接促进β-catenin, GSk3β, Axin, APC复合物的形成, 加快了β-catenin磷酸化和泛素化, 以及在细胞质中的分解, 与Wnt通路共同平衡细胞的更新和凋亡[5,8,13].

3.2.3 BMP通路 BMP通路则通过BMP2或BMP4与BMPRⅡ结合后磷酸化Bmpr1a, 从而激活Bmpr1a. 激活后的Bmpr1a一方面可磷酸化SMAD1, SMAD5或SMAD8, 而磷酸化的SMAD8或SMAD1, 5又与SMAD4组成化合物, 从细胞质转移到细胞核, 与DNA结合蛋白结合, 共同调节转录编码细胞周期的抑制基因, 从而调节细胞凋亡[3,14]. 而这一机制在肠息肉的发生机制中尚未得到完全证实, 不同研究机构

■创新盘点

本文较系统、全面的从细胞学、分子生物学及基因水平上, 对该疾病的发病机制进行了阐述. 特别是在肠干细胞及其细胞内信号分子方面, 如BMP信号通路, PTEN信号通路及Wnt信号通路所组成的生长信号调控网络, 造成β-catenin在肠干细胞中的过度积聚, 导致肠干细胞增殖、分化和凋亡失去平衡的结果, 系统阐述了肠息肉发生的机制让读者对肠息肉的发生和发展机制最新进展有较全面的认识.

■应用要点
肠息肉的细胞和分子生物学发生机制, 可为肠息肉病的早期诊断以及为寻找新的治疗靶点及方法, 提供重要的理论指导.

在此点上仍有分歧. 除此以外, BMP通路中的SMAD4似乎可阻止Wnt配体与FZ受体的结合, 通过Wnt信号通路调节β-catenin, 从而调节细胞的更新与凋亡, 但其具体机制亦尚不清楚[13], 有待进一步研究. 而另一方面, 激活后的Bmpr1a还可影响PTEN通路. 其激活后的Bmpr1a可通过促进PTEN抑制PI3K-AKT通路, 进而影响Wnt通路, 共同调节β-catenin的代谢, 平衡细胞的更新和凋亡[5,8,13]. 因此, 这3条通路共同构成了一个网络系统, 调节β-catenin在细胞中的降解和积累, 控制肠道干细胞的增殖分化和肠隐窝的分裂, 与肠息肉的发生密切相关(图1).

4 肠息肉病与上述细胞信号分子的基因突变的关系

4.1 BRRS, CS与*PTEN*基因突变 近年来研究发现, 大约有60%的BRRS患者, 80%-85%的CS患者不仅有PTEN基因的突变[3,12], 并且与PTEN基因的突变密切相关[14]. 而PTEN基因作为一种肿瘤抑制基因, 位于10q23[3]. 除了外显子1, 4, 9外, PTEN基因的其他各个部位都可发现有突变. 突变类型主要包括有意义的突变、无意义的突变、缺失、插入、剪切位点突变等类型. 并且众多研究还证实，其外显子5是PTEN基因突变的热点[3-12], 而该区域则主要编码PTEN蛋白作为磷酸酶的核心部位, 该部位在PTEN通路中起着重要作用, 调节β-catenin在肠干细胞中的降解代谢[3]. 且尽管BRRS与CS都存在PTEN的变异, 但二者在临床表现等各方面仍有所不同, 因此可能在每一种综合征中存在着其某种独立基因的突变[3], 但现在机制尚不清楚. 而另外一种观点则认为BRRS和CS是同一种类型的不同表现, 统称二者为“PTEN错构瘤综合征”[3]. 且这个称呼从细胞分子发生机制上看似乎更为确切[14].

4.2 FAP, GS, Furcot's综合征与APC基因 对于腺瘤中的FAP、Gardner综合征(GS)、Furcot's综合征则主要与wnt通路中的APC基因的变异有关[15]. APC亦是一种肿瘤抑制基因, 位于5q21[12]. 当其基因突变造成APC某功能结构异常后, 可影响β-catenin的代谢, 造成β-catenin在肠道干细胞中的过度积聚, 与肠息肉的发生密切相关. 其中对于FAP的患者来说, 常常可发现有其中一个等位基因的突变. 突变类型以点突变, 插入, 缺失为主, 而1-8个碱基对之间的插入和丢失所造成的基因移码是最常见的, 他们常导致异常的终止密码子和功能失活的截断蛋白的产生. 其中有20%的突变在外显子15的5'区(1000-1600密码子)之间, 33%的突变在1061, 1309, 1465密码子[16]. 且不同的密码子基因的突变, 对于肠息肉发生的部位、数量、癌变倾向等似乎都有相应关系, 例如, 编码APC蛋白羧基端终末部分的2644密码子的突变只会造成部分的结肠息肉[12], 3'端至1250密码子之间基因的突变则更易出现腺瘤癌变[17]. 对于GS的患者, 虽在临床表现上与FAP稍有差异, 但在分子基因发生机制上, 亦与FAP一样, 同APC基因的突变密切相关. 因此, 现有观点认为GS与FAP是同一种疾病发展的不同阶段. 而Furcot's综合征, 则不仅与APC基因的突变相关, 并且还可见hMLH1、hMLH2基因突变[15], 但现研究较少, 具体机制尚不完全清楚.

4.3 JPS与Bmpr1a, SMAD4, PTEN基因突变 对JPS来说, 约有20%-30%的JPS患者与Bmpr1a基因的突变相关. 且He *et al*[5]在所研究设计的杂和Bmpr1a基因突变模型老鼠中, 发现了该小鼠所形成的肠息肉在组织学上与幼年性息肉综合征及其相似, 且细胞的扩增主要源于隐窝数量的增加. 而Bmpr1a基因则主要位于10q23[3,18]. 其基因的突变可通过影响PTEN-Wnt通路造成β-catenin在肠道干细胞中的积聚, 打破肠道上皮细胞增生与凋亡的平衡. 现研究已不仅证实了JPS与Bmpr1a基因的突变密切相关, 并且发现其突变主要有以下4种: (1)外显子1中44_47delTGTT, 导致35-36密码子的终止. (2) 外显子7G-C的交换导致Gln239Stop. (3)外显子7G-A的交换导致Trp271Stop. (4)外显子8中一个碱基的丢失-961delC[12,19-20]. 而对SMAD4来说, 在功能上也是一种抑癌基因. 约20%的JPS患者中有SMAD4的突变[20]. 且Takaku *et al*[21]曾在研究设计的杂合子SMAD4基因敲除模型老鼠中, 发现其在1.5-2 a可出现类似JPS的表现, 进一步证实了JPS的发生与SMAD4基因的突变密切相关. 而SMAD4基因则位于18q21.1, 一共有15个外显子, 其突变主要位于8个外显子中. 其突变类型主要包括丢失、插入、替换, 不包括剪接位点突变. 常见的SMAD4的突变除了Howe *et al*[22]发现的1244delACAC, 还包括414-416密码子的4个碱基对的缺失, 348密码子2个碱基对的缺失和229密码子1个碱基对的插入[3]. 这些突变都可引起SMAD4蛋白的功能缺失, 通过wnt通路阻碍β-catenin的降解. 而除此以外, 也有研究曾发现部分JPS的患者中存在着PTEN基因的突变, 但后来证实这部分JPS患者最后大部分被确诊为

CS或BRRS患者, 因此PTEN基因的突变与JPS是否有关, 尚在研究中[20,23].

4.4 PJS与STK11基因突变相关 *STK*11作为一种肿瘤抑制基因, 主要位于19q13.3. 437氨基酸蛋白的截断及基因的缺失、插入、异常终止密码子、剪切位点的突变都曾报道与PJS的发生有关[12]. 其中, Kruse *et al*[24]曾对部分PJS的患者的外周血进行STK11基因测序, 明确发现STK11基因突变有以下4种: (1)外显子4中(474-480del)所导致的移码突变; (2)外显子1中(125-137del) 所导致的移码突变; (3)外显子4中(516-517insT)所导致的移码突变; (4)外显子5中(Q220X)的无意义突变. 而在PJ患者中发现除了有*STK*11基因的突变, 同时也可存在其他基因的突变, 如*p*53的突变, β-catenin的突变等. 并在最近的一个研究中发现, 在所有的PJ患者的肠上皮细胞中都可见有β-catenin在细胞核中的堆积. 这提示, STK11涉及到多种途径, 包括Wnt/β-catenin/TCF-4途径, 是PJ综合征的“看门人”[3]. 但STK11参与各种途径的具体机制现还尚不清楚, 有待进一步研究.

总之, 近年来的研究证实, 肠息肉的研究不仅在细胞和分子生物学发生机制上取得了巨大的进展和成就, 阐明了许多以肠息肉发生为主要表型的疾病的病因, 而且其信号通道网络分子及基因突变在肠息肉发病间联系的证实, 为息肉发病机制的最终阐明, 必将做出重要的贡献. 并在不远的将来, 可为肠息肉病的早期诊断以及为寻找新的治疗靶点及方法, 提供重要的理论指导.

5 参考文献

1 Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 21-25

2 Luk GD. Diagnosis and therapy of hereditary polyposis syndromes. *Gastroenterologist* 1995; 3: 153-167

3 John M. Carethers MD. Hamartomatous polyposis syndromes: genetic pathways. *Current Opinion in Gastroenterology* 2002; 18: 60-67

4 Hauck AL, Swanson KS, Kenis PJ, Leckband DE, Gaskins HR, Schook LB. Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75: 58-71

5 He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 2004; 36: 1117-1121

6 Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 2005; 307: 1904-1909

7 He XC, Zhang J, Li L. Cellular and molecular regulation of hematopoietic and intestinal stem cell behavior. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1049: 28-38

8 van den Brink GR. Linking pathways in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 1038-1039

9 Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320

10 Wang D, Mann JR, DuBois RN. WNT and cyclooxygenase-2 cross-talk accelerates adenoma growth. *Cell Cycle* 2004; 3: 1512-1515

11 Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 2002; 66: 131-144

12 Cohen MM Jr. Molecular dimensions of gastrointestinal tumors: some thoughts for digestion. *Am J Med Genet A* 2003; 122: 303-314

13 Tian Q, He XC, Hood L, Li L. Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 kinase/Akt and 14-3-3zeta. *Cell Cycle* 2005; 4: 215-216

14 Eng C. To be or not to BMP. *Nat Genet* 2001; 28: 105-107

15 Strate LL, Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 201-213

16 Lal G, Gallinger S. Familial adenomatous polyposis. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 314-323

17 Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 2001; 48: 515-521

18 Astrom AK, Jin D, Imamura T, Roijer E, Rosenzweig B, Miyazono K, ten Dijke P, Stenman G. Chromosomal localization of three human genes encoding bone morphogenetic protein receptors. *Mamm Genome* 1999; 10: 299-302

19 Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, Velculescu VE, Traverso G, Vogelstein B. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001; 28: 184-187

20 Merg A, Howe JR. Genetic conditions associated with intestinal juvenile polyps. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; 129: 44-55

21 Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998; 92: 645-656

22 Howe JR, Shellnut J, Wagner B, Ringold JC, Sayed MG, Ahmed AF, Lynch PM, Amos CI, Sistonen P, Aaltonen LA. Common deletion of SMAD4 in juvenile polyposis is a mutational hotspot. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1357-1362

23 Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1634-1640

24 Kruse R, Uhlhaas S, Lamberti C, Keller KM, Jackisch C, Steinhard J, Knopfle G, Loff S, Back W, Stolte M, Jungck M, Propping P, Friedl W, Jenne DE. Peutz-Jeghers syndrome: four novel inactivating germline mutations in the STK11 gene. Mutations in brief no. 227. Online. *Hum Mutat* 1999; 13: 257-258

■同行评价

本文对肠息肉发生和发展的原因和机制进行了较全面而详细的综述, 基本反映本专题的研究进展. 结构合理, 逻辑性强, 具有较高的科学性和应用性.

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2962-2964
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

高频电针刺激足三里促进大鼠结肠推进运动

陈兰, 刘诗

陈兰, 刘诗, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
通讯作者: 刘诗, 430022, 湖北省武汉市, 湖北武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. shiliugao@yahoo.com
电话: 027-85726381
收稿日期: 2006-08-24 接受日期: 2006-09-20

■背景资料
临床上针灸已经用于治疗多种胃肠功能性疾病. 电针刺激则是将针灸和电流刺激结合一起的方法, 近年来更多用于功能性胃肠疾病的临床治疗和科学研究, 但对结肠运动的研究十分少见, 仅少数国外学者报道电针刺激足三里穴可促进大鼠结肠传输. 足三里穴为胃经的主要穴位, 通过高频电针刺激足三里穴观察大鼠结肠推进运动的改变, 揭示电针刺激足三里穴对结肠运动功能的影响.

■创新盘点
本实验比较研究针刺足三里、电针刺激足三里、电针刺激非经非穴组各组刺激前后小珠排出时间的差异, 进一步验证高频电针刺激足三里对大鼠结肠的推进运动功能的促进作用.

High-frequency electroacupuncture at *Zusanli* point promotes colonic propulsive motility in rats

Lan Chen, Shi Liu

Lan Chen, Shi Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Shi Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. shiliugao@yahoo.com
Received: 2006-08-24 Accepted: 2006-09-20

Abstract
AIM: To observe the changes of colonic propulsive movement in rats after high-frequency electroacupuncture stimulation (EAS) at *Zusanli* (ST-36).

METHODS: A total of 33 adult male Sprague-Dawley rats were randomly and averagely divided into *Zusanli* acupuncture, sham EAS, and *Zusanli* EAS group, named A, B, and C, respectively. The parameters of EAS were set at 100 Hz, 3 mA. In the experiment, one plastic bead (3 mm in diameter) was pushed 3 cm into the rats' rectum with a slender tube, and the time for bead excretion was recorded in all the rats.

RESULTS: The time for bead excretion under EAS condition was shortened about 27% in group C as compared with that under normal condition, and there was significant difference (1142.8 ± 123.9 s *vs* 1563.5 ± 155.9 s, $P < 0.01$). However, the time in group A and B were not significantly different before and after stimulation ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Colonic propulsive movement can be obviously promoted by high-frequency EAS at ST-36.

Key Words: Acupuncture; Electroacupuncture stimulation; *Zusanli*; Colonic propulsive movement; Colonic motility

Chen L, Liu S. High-frequency electroacupuncture at *Zusanli* point promotes colonic propulsive motility in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2962-2964

摘要
目的: 通过高频电针刺激足三里穴观察大鼠结肠推进运动的改变, 进一步验证电针刺激足三里穴对结肠运动的促进作用.

方法: SD大鼠33只, 随机分为3组, 即针刺足三里组(组1)、电针非经穴组(组2)、电针足三里组(组3), 每组11只. 各组大鼠均以细软管将1个直径约3 mm的塑料小珠由肛门推入直肠3 cm处, 分别记录正常情况下和给予相应刺激后的小珠排出时间.

结果: 组3刺激后小珠排出时间较刺激前增快约27%, 有明显统计学差异(1142.8±123.9 *vs* 1563.5±155.9, $P<0.01$); 而组1及组2刺激后小球排出时间与刺激前相比无统计学差异($P>0.05$).

结论: 高频电针刺激足三里穴对结肠推进运动有着显著的促进作用.

关键词: 针刺; 电针刺激; 足三里; 结肠推进运动; 结肠动力

陈兰, 刘诗. 高频电针刺激足三里促进大鼠结肠推进运动. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2962-2964
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2962.asp

0 引言
针灸在中国已经应用了3000多年, 并且越来越广泛的被全世界的医生和患者所接受. 临床上针灸已经用于治疗胃肠功能性疾病[1], 包括便秘和腹

泻、功能性消化不良[2-3]、肠易激综合征[4-6]. 但针灸对胃肠运动的确切作用及机制尚不清楚. 电针刺激是将针灸和电流刺激结合一起的方法, 具有可重复性优点, 近年来更多用于功能性胃肠疾病的临床治疗和科学研究[7]. 足三里穴作为胃经的主要穴位, 最常用于治疗功能性胃肠疾病[2,5,8]. 目前, 有关电针刺激对结肠运动的研究十分少见, 仅少数国外学者报道电针刺激足三里穴可促进大鼠结肠传输, 增加远段结肠运动幅度[9-10]. 本研究目的在于通过高频电针刺激足三里穴观察大鼠结肠推进运动的改变, 进一步验证电针刺激足三里穴对结肠运动的促进作用, 从而为电针刺激治疗结肠运动障碍性疾病提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂SD大鼠(250-300 g)33只, 由同济医学院实验动物所提供. 大鼠于标准条件(12 h光照/黑暗循环; 22℃, 50%湿度; 自由获得食物和水)下至少适应7 d. 电针刺激仪为上海华谊医用仪器厂生产.

1.2 方法 33只大鼠随机分为3组, 即针刺足三里组(组1)、电针非经穴组(组2)、电针足三里组(组3), 每组11只. 组1针刺双侧足三里而不给予电刺激; 组2电针刺激足三里穴水平旁开1 cm处, 刺激参数设为100 Hz, 3 mA; 组3电针刺激双侧足三里穴, 刺激参数设为100 Hz, 3 mA. 进针均为直刺7 mm. 结肠推进运动的检测采用小珠排出实验[11]. 各组大鼠禁食24 h, 并装入限制笼里. 待大鼠适应环境改变后, 用细软管将1个直径约3 mm的光滑塑料小珠由大鼠肛门推入直肠3 cm处, 然后开始计时, 待小珠排出, 立刻记录截止时间. 第一次实验结束. 实验大鼠恢复30 min后, 重新装入限制笼内, 相应预刺激5 min后, 再行刺激条件下的小珠排出实验, 方法同上, 推入小珠后, 相应刺激持续至小珠排出, 并记录第二次小珠排出时间.

统计学处理 结果以均数±标准误(mean±SE)表示, 应用SPSS软件行配对t检验分析. $P<0.05$表示差异有统计学意义.

2 结果

电针刺激足三里组刺激后小珠排出时间较刺激前增快约27%, 有明显统计学差异(1142.8±123.9 *vs* 1563.5±155.9, $P<0.01$); 而针刺足三里组和电针非经穴组刺激前后小珠排出时间均无显著性差异($P>0.05$)(表1).

表 1 各组大鼠刺激前后结肠小珠排出时间(mean ± SD, s)

	针刺足三里组 (组1)	电针非经穴组 (组2)	电针足三里组(组3)
刺激前	1379.3 ± 144.9	1483.6 ± 105.9	1563.5 ± 155.9
刺激后	1353.1 ± 166.2	1269.4 ± 147.7	1142.8 ± 123.9[b]

[b]$P<0.01$ *vs* 刺激前.

3 讨论

电针刺激相关穴位可通过调节肠神经系统及神经递质、胃肠激素的释放, 来调控胃肠动力. 目前, 国内外关于电针刺激足三里穴对胃运动影响的研究较多. Liu *et al*[12], Ouyang *et al*[13]研究认为, 电针刺激足三里穴可促进由迷走神经调控的胃肌电活动性, 从而促进胃排空. 有学者曾报道电针刺激足三里穴可明显改善束缚应激引起胃排空延迟症状, 并可促进小肠动力, 而迷走神经和坐骨神经的切断都能取消这种效应[14-16]. 常小荣 *et al*[17], 孙大勇 *et al*[18]发现电针刺激足三里穴可引起家兔及犬多种脑肠肽的变化从而影响其胃胆运动功能. 皮肤－胃肠运动反射神经机制的相关研究表明后肢穴位的刺激可通过增加胃迷走传出神经活性来增强胃运动[19]. 电针刺激足三里穴对结肠运动功能的影响方面研究甚少. 最近, Sevcencu *et al*[20]发现序列电刺激可促进猪的降结肠推进运动, 这种作用是通过硝基能和胆碱能神经通路来调节. Iwa *et al*[9]研究报道电针刺激大鼠双侧后肢足三里穴可显著加快结肠传输, 并可明显增加远端结肠运动幅度. 此效应可被预先注射的阿托品阻断, 若预先将远端结肠进行去外在神经处理也可使这种促进效应消失, 故推断这种促进效应是通过骶骨副交感传出神经来进行的. 前原曾电针刺激Wistar♂大鼠双侧后肢足三里穴处, 分为低频及高频刺激, 刺激强度由1 mA增至3 mA, 观察对结肠动力的影响, 其结果表明低频刺激(3 Hz, 15 Hz)对结肠影响不明显, 而高频刺激(100 Hz)可使脑、脊髓释放胆囊收缩素(CCK), 并与存在于中枢的CCK-A受体结合引起结肠的长爆发棘波(long spike burst, LSB)明显增加, 促进结肠动力[10].

高荣慧[10]在相关文章中阐述: 山口 *et al*曾报道低频电针刺激仅对胃动力有促进作用; 岩昌宏 *et al*亦认为低频电针刺激对结肠影响不明显, 仅高频(100Hz)电针刺激才能促进结肠运动; 前原 *et al*也曾报道(100 Hz, 3 mA)高频电针刺激对结肠动力的促进作用非常显著. 故本次实验采用

■**应用要点**
本研究结果表明, 高频电针刺激足三里穴可显著促进大鼠结肠推进运动, 与国外学者的相关研究结果相一致, 从而为电针刺激治疗结肠运动障碍性疾病提供实验依据.

■同行评价
本文通过高频电针刺激足三里穴观察大鼠结肠推进运动的改变，进一步验证电针刺激足三里穴对结肠运动的促进作用，实验方法和结果基本可信.

100 Hz, 3 mA作为刺激参数, 结果显示, 高频电针刺激大鼠双侧足三里穴组刺激后的小珠排出时间较刺激前明显缩短27%, 差异有统计学差异(P<0.01), 表明该刺激频率明显促进大鼠结肠推进运动. 而针刺足三里穴组刺激前后小珠排出时间的差异无统计学意义, 与前人研究结果相一致. 另外, 高频电针刺激非经穴组刺激后小珠排出时间虽较刺激前增快14%, 但此差异仍无统计学意义, 由此说明了单纯高频刺激所致的机械应激对结肠推进运动无明显影响, 另一方面也验证了足三里穴对结肠动力的影响.

高频电针刺激足三里穴对结肠推进运动有明显促进作用, 但这种效应机制仍然不清楚. 黄裕新 *et al*[21]认为电针刺激足三里穴(感受器、神经末梢)很可能是通过腓总神经、坐骨神经、脊髓、延髓神经中枢(NTS, DMV)、迷走神经最终影响到胃肠功能. Iwa *et al*[9]也认为这种刺激形式是通过骶骨副交感传出神经加快结肠传输. Sevcencu *et al*[20]认为序列电刺激促进降结肠推进运动是通过硝基能和胆碱能通路来调节. Liu *et al*[12]发现, 这种促进效应在双侧迷走神经切断术后可完全消失, 且迷走神经背侧核(the dorsal vagal complex, DVC)中SP能神经纤维的平均光密度在电针刺激穴位后增加.

总之, 高频电针刺激足三里穴促进结肠推进运动的确切机制仍需要进行深入研究探讨, 并且如何将其转变为临床上治疗胃肠动力障碍性疾病的一种手段也是非常关键的问题.

4 参考文献

1 许冠荪, 许能贵, 刘涌. 针灸对胃肠道作用研究进展. 世界华人消化杂志 1998; 6: 110-111
2 Takahashi T. Acupuncture for functional gastrointestinal disorders. *J Gastroenterol* 2006; 41: 408-417
3 Ouyang H, Chen JD. Review article: therapeutic roles of acupuncture in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 831-841
4 Iwa M, Strickland C, Nakade Y, Pappas TN, Takahashi T. Electroacupuncture reduces rectal distension-induced blood pressure changes in conscious dogs. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1264-1270
5 Xing J, Larive B, Mekhail N, Soffer E. Transcutaneous electrical acustimulation can reduce visceral perception in patients with the irritable bowel syndrome: a pilot study. *Altern Ther Health Med* 2004; 10: 38-42
6 Xiao WB, Liu YL. Rectal hypersensitivity reduced by acupoint TENS in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 312-319
7 齐清会, 王简, 回建峰, 江力, 吴咸中. 大承气汤和针刺治疗胃肠运动功能障碍疾病的研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 129-132
8 Chen LL, Hsu SF, Wang MH, Chen CL, Lin YD, Lai JS. Use of acupressure to improve gastrointestinal motility in women after trans-abdominal hysterectomy. *Am J Chin Med* 2003; 31: 781-790
9 Iwa M, Matsushima M, Nakade Y, Pappas TN, Fujimiya M, Takahashi T. Electroacupuncture at ST-36 accelerates colonic motility and transit in freely moving conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G285-G292
10 高荣慧. 电针刺激对大鼠生理功能的影响. 国外医学中医中药分册 2003; 25: 280-282
11 Nakamura T, Sakai A, Isogami I, Noda K, Ueno K, Yano S. Abatement of morphine-induced slowing in gastrointestinal transit by Dai-kenchu-to, a traditional Japanese herbal medicine. *Jpn J Pharmacol* 2002; 88: 217-221
12 Liu JH, Yan J, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Hu JM. Effects of electroacupuncture on gastric myoelectric activity and substance P in the dorsal vagal complex of rats. *Neurosci Lett* 2004; 356: 99-102
13 Ouyang H, Yin J, Wang Z, Pasricha PJ, Chen JD. Electroacupuncture accelerates gastric emptying in association with changes in vagal activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G390-G396
14 Iwa M, Nakade Y, Pappas TN, Takahashi T. Electroacupuncture improves restraint stress-induced delay of gastric emptying via central glutaminergic pathways in conscious rats. *Neurosci Lett* 2006; 399: 6-10
15 Tabosa A, Yamamura Y, Forno ER, Mello LE. A comparative study of the effects of electroacupuncture and moxibustion in the gastrointestinal motility of the rat. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 602-610
16 Sugai GC, Freire Ade O, Tabosa A, Yamamura Y, Tufik S, Mello LE. Serotonin involvement in the electroacupuncture- and moxibustion-induced gastric emptying in rats. *Physiol Behav* 2004; 82: 855-861
17 常小荣, 严洁, 刘玉群, 张泓, 易受乡, 林亚平. 电针足三里和阳陵泉穴对家兔胃胆运动及脑肠肽的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1662-1668
18 孙大勇, 黄裕新, 褚自宏, 高巍, 王庆莉. 电针对犬幽门括约肌压力的影响及与胃黏膜组织中脑肠肽的关系. 世界华人消化杂志 1999; 7: 997-998
19 Tada H, Fujita M, Harris M, Tatewaki M, Nakagawa K, Yamamura T, Pappas TN, Takahashi T. Neural mechanism of acupuncture-induced gastric relaxations in rats. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 59-68
20 Sevcencu C, Rijkhoff NJ, Gregersen H, Sinkjaer T. Propulsive activity induced by sequential electrical stimulation in the descending colon of the pig. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 376-387
21 黄裕新, 王景杰, 王晓斌, 王键. 胃经穴位电针调节胃运动的神经作用机制. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 358-362

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2965-2970
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

缺氧诱导因子-1α在胰腺癌中的作用

陈干涛, 白少华, 高志强

陈干涛, 第一人民医院消化内科 湖北省仙桃市 443000
白少华, 第一人民医院普通外科 湖北省仙桃市 443000
高志强, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科 湖北省武汉市 430032
通讯作者: 陈干涛, 443000, 湖北省仙桃市, 湖北省仙桃市第一人民医院消化内科. doctor_nancy518@yahoo.com
电话: 0728-3242554
收稿日期: 2006-04-17 接受日期: 2006-05-11

Role of hypoxia-inducible factor-1α in pancreatic cancer

Gan-Tao Chen, Shao-Hua Bai, Zhi-Qiang Gao

Gan-Tao Chen, Department of Digestive Diseases, the First People's Hospital, Xiantao 443000, Hubei Province, China
Shao-Hua Bai, Department of General Surgery, the First People's Hospital, Xiantao 443000, Hubei Province, China
Zhi-Qiang Gao, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430032, Hubei Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, No. No. 0447054
Correspondence to: Gan-Tao Chen, Department of Digestive Diseases, the First People's Hospital, Xiantao 443000, Hubei Province, China. doctor_nancy518@yahoo.com
Received: 2006-04-17 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To study the level changes of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α), vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT1) and multidrug resistance gene (MDR1) in pancreatic carcinoma cells SW1990 exposed to hypoxia, and to explore the possible molecular mechanism.

METHODS: $CoCl_2$ was used to induce chemical hypoxia, and SW1990 cells were divided into normal oxygen group and hypoxia group. The expression of HIF-1α, VEGF, GLUT1 and MDR1 at the mRNA and protein levels were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blot, respectively, in the above groups 24 h after treatment with hypoxia and transfected with plasmid HIF-1α/PCDNA3.

RESULTS: Chemical hypoxia induced significant expression of HIF-1α protein (P = 0.0089), but not mRNA (P = 0.057). After exposure to hypoxia, the expression of VEGF (P = 0.046, 0.039), GLUT1 (P = 0.0024, 0.036) and MDR1 (P = 0.021, 0.038) were significantly increased at the mRNA and protein level. Furthermore, the mRNA and protein expression of HIF-1α, VEGF, GLUT1 and MDR1 were all elevated to some extent after transfection with plasmid HIF-1α/PCDNA3.

CONCLUSION: HIF-1α plays an important role in promoting the progression, relapse and resistance to chemotherapeutics of pancreatic carcinoma by up-regulating the expression of the related genes such as VEGF, GLUT1 and MDR1.

Key Words: Hypoxia-inducible factor-1α; Vascular endothelial growth factor; Glucose transporter 1; Multidrug resistance gene 1

Chen GT, Bai SH, Gao ZQ. Role of hypoxia-inducible factor-1α in pancreatic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2965-2970

摘要

目的: 探讨缺氧环境下胰腺癌细胞胰腺癌肿瘤细胞株SW1990中缺氧诱导因子HIF-1α、血管生长因子VEGF、葡萄糖转运体GLUT1、和耐药基因MDR1的变化, 并阐明其中可能存在的分子调控机制.

方法: 将胰腺癌肿瘤细胞株SW1990分为常氧组和化学诱导缺氧组($CoCl_2$诱导), 分别采用RT-PCR方法和Western blot方法观察两组HIF-1α、VEGE、GLUT1及MDR1基因和蛋白的表达; 再分别将两组分为对照组、空白质粒转染组和HIF-1α/PCDNA3.0质粒转染组, 观察上述因子的基因和蛋白水平表达的变化.

结果: 化学诱导的缺氧能明显诱导细胞HIF-1α蛋白的表达(P = 0.0089), 但对其mRNA的表达没有明显影响(P = 0.057); 缺氧时胰腺癌肿瘤细胞株SW1990中的VEGF(P = 0.046, 0.039)、GLUT1(P = 0.0024, 0.036)、MDR1(P = 0.021, 0.038)基因和蛋白的表达水平都明显增高. 转染质粒的缺氧组与常氧组相比, HIF-1α、VEGF、GLUT1、MDR1的基因与蛋白

■背景资料
有关HIF-1α和恶性肿瘤关系的研究报道很多, 且开发了许多以HIF-1α为靶点的基因和药物治疗恶性肿瘤, 这些治疗作用目前在实验阶段已经取得了一定的成就. 胰腺癌因为缺乏敏感检测物发现晚、临床治疗效果差预后极差, 临床科研工作者都期盼能找到有效的方法控制胰腺癌. HIF-1α与胰腺癌的诊断、治疗、预后以及其他生物学行为也相关, 本研究目的不仅在于探讨HIF-1和胰腺癌的相关性, 更在于探讨HIF-1α作用于胰腺癌的具体机制, 为用抑制HIF-1α的表达从而达到控制甚至逆转胰腺癌的临床研究提供背景资料.

■创新盘点
本研究虽然仅仅运用了RT-PCR和Western blot等较传统的半定量的方法，相对一些大课题而言说服力略差，但对于HIF-1α的下游因子如VEGF、GLUT1、MDR1等都做了研究，对HIF-1，在胰腺癌中的功能作用介绍的范围较广，这在国内外研究中少见.

水平都相应的有所增高.

结论：缺氧时，胰腺癌细胞通过上调HIF-1α的表达引起其下游的靶基因VEGF、GLUT1和MDR1的表达，从而耐受缺氧并进一步恶性进展.

关键词：缺氧诱导因子-1α；血管内皮生长因子；葡萄糖转运体1；多耐药相关基因1

陈干涛，白少华，高志强. 缺氧诱导因子-1α在胰腺癌中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2965-2970
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2965.asp

0 引言

实体肿瘤在发生、发展的过程中，局部微环境最显著的变化是缺氧，而肿瘤耐受缺氧并进一步恶性演变的调控分子为缺氧诱导因子HIF-1α[1]. 研究表明，当环境氧含量低于30 mL/L时，细胞的生理代谢会发生一系列的改变，其中最主要的反应是机体通过增加葡萄糖转运体GLUT1来增加糖酵解提供必须的能源，而局部组织则通过提高血管内皮细胞生长因子VEGF水平促进新生血管形成以改善局部的血液供应，肿瘤细胞在缺氧的环境中，同样会发生上述改变[2-3]. HIF-1α作为肿瘤演变的一个中枢环节，在于他下游的40多个调控基因，他们可以促进肿瘤血管的形成、无氧糖酵解、细胞增殖、抗凋亡、耐药等[4]，其中，最常见且很重要的有VEGF、GLUT1、MDR1. 有研究表明，胰腺癌组织中HIF-1α的含量和胰腺癌恶性生物学行为正相关[5-6]，虽然对于晚期胰腺癌目前在术前多配合化疗或者放疗，但胰腺癌患者因为缺乏早期诊断的敏感指标而发现晚、目前有限的治疗方式效果差致使其预后普遍差，这促使研究人员努力寻找有效的新的治疗方式. 目前，HIF-1α因为其与肿瘤的密切相关性而成为研究的热点，且以HIF-1α为靶点的基因和药物治疗在实验阶段取得了很好的成绩，胰腺癌发展过程中HIF-1α发挥作用的分子作用机制尚不明，本研究利用$CoCL_2$化学缺氧法制造体外培养胰腺癌细胞的缺氧环境，观察体外低氧培养条件下的胰腺癌肿瘤细胞株SW1990中HIF-1α，VEGF，GLUT1，MDR1的基因和蛋白的表达，并通过上调HIF-1α的表达观察VEGF，GLUT1，MDR1的表达情况，来探讨胰腺癌细胞常氧和缺氧环境下血管新生和能量代谢的调控机制，明确HIF-1a的功能，以期为临床治疗胰腺癌提供可靠的分子靶点.

1 材料和方法

1.1 材料 培养箱为三气培养箱(NU4950型)、美国NUAIRE公司出品；人胰腺癌肿瘤细胞株SW1990购自美国典型物种保藏中心(ATCC)；化学诱导低氧组由150 μmol/L $CoCl_2$美国Sigma公司；脂质体lipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司；1640完全培养基购自美国sigma公司；TRIzol试剂、SupperScript逆转录试剂盒、PCR试剂盒等购自晶美生物公司；引物由上海生工生物公司合成；兔抗人HIF-1α抗体、鼠抗人VEGF抗体由武汉博士德公司购买；兔抗人GLUT1抗体由福建迈新生物工程公司提供，鼠抗人多药耐药相关蛋白P-GP多克隆抗体购自晶美生物公司，羊抗兔IgG，羊抗鼠IgG、国产胎牛血清购自北京中山生物技术公司；其他各种化学试剂均为武汉博士德公司提供.

1.2 方法

1.2.1细胞培养及分组 人胰腺癌肿瘤细胞株SW1990培养于100 mL/L小牛血清RPMI-1640培养液中，置于50 mL/LCO_2、饱和湿度的培养箱中(含21 mL/L O_2，74 mL/L N_2)为常氧组；将150 μmol/L $CoCl_2$加入培养基中，余同常氧组，为化学性低氧组，24 h后分别快速提取细胞总的RNA和蛋白进行检测.

1.2.2 质粒转染 HIF-1α/PCDNA3.0质粒转染：通过预实验，SW1990细胞融合达到70%-80%时，按1 μg∶6 μL比例混合HIF-1α/PCDNA3.0质粒和脂质体lipofectamineTM 2000，滴加于细胞表面. 同时平行转染带有lacZ基因的PCDNA3.0质粒，以x-gal为底物，铁氰化钾和亚铁氰化钾染色确定转染效率. 转染5 h后更换含质粒的无血清1640培养基为含200 mL/L胎牛血清的1640培养基.

1.2.3 RT-PCR检测HIF-1α、VEGF、GLUT1和MDR1 mRNA用TRIzol试剂“一步法”提取细胞总RNA，将RNA溶于0.1% DEPC处理水中，紫外分光光度计测定样品在260 nm，280 nm波长上的吸光度(*A*值)，估计RNA的纯度和浓度. 2 μg总RNA逆转录合成cDNA，PCR反应条件根据文献并稍加改进为：94℃预变性1 min，然后94℃变性30 s，56 ℃退火30 s，72℃延伸30 s，扩增30个循环；最后一次72℃延伸7 min. 别取5 μL PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳. 待测基因mRNA表达的半定量分析：待测基因mRNA表达丰度的半定量是根据同一细胞株中待测基因与β-actin基因的RT-PCR产物进行比较，从而判断待测基因mRNA在不同细胞中表达丰度的高

■应用要点
目前对以HIF-α为靶点的研究较为热门, 本研究可以为以HIF-α为靶点的药物用于治疗胰腺癌提供依据.

表 1 各因子的引物设计表

基因	引物		t (℃)	片段大小 (bp)
β-actin	正义链	AAGAGAGGCATCCTCACCCT	60	218
	反义链	TACATGGCTGGGGTGTTGAA		
HIF-1a	正义链	TCAAAGTCGGACAGCCTCA	53	460
	反义链	CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT		
VEGF	正义链	TCGGGCCTCCGAAACCATGA	55	500
	反义链	CCTGGTGAGAGATCTGGTTC		
GLUT1	正义链	TCATCGTGGCTGAACTCTTCAG	60	314
	反义链	TCACACTTGGGAATCAGCCCC		
MDR1	正义链	CATTGGTGTGGTGAGTCAGG	58	174
	反义链	CTCTCTCTCCAACCAGGGTG		

表 2 各组检测的相应因子mRNA的表达 (mean ± SD)

分组	HIF-1α	VEGF	GLUT1	MDR1
常氧 (A_1)	0.121 ± 0.098	0.189 ± 0.043	0.095 ± 0.113	0.117 ± 0.082
常氧加空质粒转染 (A_2)	0.144 ± 0.087	0.213 ± 0.162	0.088 ± 0.187	0.095 ± 0.109
常氧加质粒转染 (A_3)	0.409 ± 0.123[c]	0.531 ± 0.205[c]	0.312 ± 0.146[c]	0.351 ± 0.150[c]
缺氧 (B_1)	0.135 ± 0.086	0.468 ± 0.157[a]	0.413 ± 0.095[a]	0.399 ± 0.069[a]
缺氧加空质粒转染 (B_2)	0.143 ± 0.047	0.518 ± 0.094	0.526 ± 0.049	0.402 ± 0.105
缺氧加质粒转染 (B_3)	0.729 ± 0.164[e]	0.856 ± 0.163[e]	0.722 ± 0.204[e]	0.698 ± 0.207[e]

[a]P<0.05 *vs* A_1组; [c]P<0.05 *vs* A_1, A_2组; [e]P<0.05 *vs* A_3, B_1, B_2组.

表 3 各组检测的相应因子蛋白的表达 (mean ± SD)

分组	HIF-1α	VEGF	GLUT1	P-GP
常氧对照 (A_1)	60 ± 12	82 ± 15	97 ± 14	74 ± 23
常氧加空质粒转染 (A_2)	57 ± 18	91 ± 24	78 ± 89	81 ± 37
常氧加质粒转染 (A_3)	273 ± 42[c]	408 ± 27[c]	354 ± 73[c]	392 ± 38[c]
缺氧对照 (B_1)	187 ± 15[b]	391 ± 59[a]	391 ± 57[a]	401 ± 12[a]
缺氧加空质粒转染 (B_2)	163 ± 37	486 ± 24	425 ± 16	385 ± 27
缺氧加质粒转染 (B_3)	342 ± 12[e]	702 ± 21[e]	781 ± 51[e]	521 ± 13[e]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* A_1组; [c]P<0.05 *vs* A_1, A_2组; [e]P<0.05 *vs* A_3, B_1, B_2组.

低, 各待测基因与β-actin基因的RT-PCR在同一试管内进行. 总RNA提取参照TRIzol Reagent试剂盒说明书进行, 转录合成cDNA: 将RNA稀释为1 g/L, 在20 μL反应体积中用5 μg的RNA合成cDNA, 42℃水浴50 min. 15 min失活反应, 各待测基因的引物由上海生工生物公司合成且进行扩增时分别按各因子的引物说明要求进行退火温度的设定(见表1).

1.2.4 *三去污剂法提取细胞总蛋白* 按文献方法[7]配制三去污剂, 临用前加入100 mg/L苯甲基磺酰氟(PMSF)和1 mg/L抑肽酶, 预冷后加入细胞表面(5 μL/cm^2), 冰上作用30 min, 收集裂解液, 离心取上清, 置于-70℃备用.

1.2.5 *Western blot检测相关因子蛋白水平的表达* 50 μg细胞蛋白SDS-PAGE凝胶电泳, 半干法电转移至硝酸纤维素膜, 丽春红染色证实转移成功, 一抗封闭过夜, 二抗孵育1 h, 化学发光法显色, 洗片. 一抗: HIF-1α抗体1∶500稀释, 鼠抗人VEGF多克隆抗体, 兔抗人GLUT1抗体, 鼠抗人P-GP抗体0.15 mg/L, 羊抗兔、羊抗鼠IgG均以1∶5000稀释(以上所有试验均重复3次, 结果取其均值).

统计学处理 所有统计学分析采用SPSS 10.0软件包, 结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 数据比较采用方差分析和t检验.

2 结果

常氧组及化学诱导缺氧组分别于处理后24 h提取细胞总RNA和蛋白(表2, 表3, 图1, 图2)

2.1 *经$CoCl_2$处理造成化学缺氧后相应因子的变化* 缺氧处理后HIF-1α的基因表达水平与常氧对照组无明显差异(P = 0. 057, >0.05), 而缺氧处理后HIF-1α的蛋白表达较常氧对照组明显升高(P

■同行评价
本文准确反映了研究工作的科学问题和特定内容, 简明而有特色. 结果科学结论较明确, 实验证据较充足. 有一定的科学性、创新性和可读性.

= 0. 0089, <0.01); 缺氧处理后VEGF、GLUT1、MDR1的基因和相应蛋白水平都较常氧组有显著升高(两组VEGF的基因和蛋白*P*值分别为0.046和0.039, GLUT1的*P*值为0.0024和0.036 , MDR1的*P*值为0.021和0.038, 均小于0.05、有统计学意义).

2.2 转染HIF-1α/PCDNA3.0质粒后相应因子的变化 常氧组转染HIF-1α/PCDNA3.0质粒后较转染空白质粒组和对照质粒组HIF-1α的基因和蛋白的表达水平明显升高(常氧组转染质粒与转染空质粒和未转染质粒HIF-1α的基因表达水平相比较, *P*值分别为0.034和0.041, 蛋白表达水平相比较*P*值分别为0.022和0.025, 均小于0.05), VEGF、GLUT1、MDR1的基因、相应蛋白表达水平也都随着明显升高(对于VEGF, 常氧组转染质粒后与转染空质粒以及未转染质粒基因表达比较, *P*值为0.025和0.032; 蛋白表达水平相比较*P*值为0.029和0.026, 均小于0.05; 同样, GLUT1的基因表达水平相比较*P*值分别为0.015和0.032, 蛋白相比较*P*值分别为0.023和0.034, 均小于0.05; MDR1的基因表达相比较后的*P*值分别为0.042和0.034, 蛋白表达相比较*P*值分别为0.044和0.038, 均小于0.05、有统计学意义); 缺氧组转染HIF-1α/PCDNA3.0质粒后较转染空白质粒组和对照未转染质粒组HIF-1a的基因和蛋白的表达水平明显升高(转染组和转染空质粒组以及未转染组相比较, 转染组HIF-1α的基因表达明显增高, *P*值分别为0.019和0.024、均小于0.05, HIF-1α的蛋白表达也有统计学意义上的升高, *P*值分别为0.032和0.026、均小于0.05), VEGF、GLUT1、MDR1的基因、相应蛋白表达水平也都明显随着升高(转染组和转染空白质粒组以及未转染组的VEGF的基因表达比较后*P*值分别为0.013和0.031, 均小于0.05; 蛋白表达相比较, *P*值分别为0.019和0.032, 均小于0.05、有统计学意义. 同样, GLUT1基因比较后的*P*值分别为0.033和0.041, 蛋白比较后*P*值分别为0.046和0.031, 均小于0.05. MDR1的基因比较后*P*值分别为0.038和0.034, 蛋白比较后*P*值分别为0.024和0.029, 均小于0.05、有统计学意义); 缺氧组和常氧组转染HIF-1α/PCDNA3.0质粒后相比较, HIF-1α, VEGF, GLUT1, MDR1的基因、相应蛋白表达水平有升高(其中, 两组HIF-1α的基因和蛋白表达水平相比较, *P*值分别为0.025和0.039; 同样, VEGF的*P*值分别为0.038和0.041; GLUT1的*P*值分别为0.037和0.035; MDR1的*P*值分别为0.043和0.039, 均小于0.05、有统计学意义).

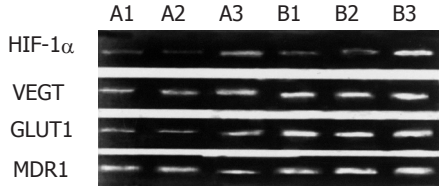


图 1 各检测因子的RT-PCR图. A1: 常氧组; A2: 常氧加空质粒转染组; A3: 常氧加质粒转染组; B1: 缺氧组; B2: 缺氧加空质粒转染组; B3: 缺氧加质粒转染组.

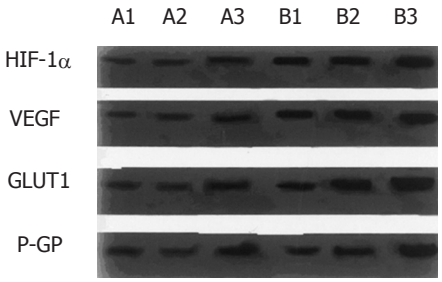


图 2 各因子Western blot图. A1: 常氧组; A2: 常氧加空质粒转染组; A3: 常氧加质粒转染组; B1: 缺氧组; B2: 缺氧加空质粒转染组; B3: 缺氧加质粒转染组.

2.3 转染空白质粒组 转染空白质粒组和未转染组相比较, HIF-1α, VEGF, GLUT1, MDR1的基因和蛋白水平在缺氧组和常氧组都无明显变化(两组HIF-1α的基因和蛋白表达水平相比较, *P*值分别为0.052和0.057, 均大于0.05; 同样, VEGF基因和蛋白表达后*P*值分别为0.054和0.061, 均大于0.05; GLUT1的*P*值分别为0.062和0.053, 均大于0.05; MDR1的*P*值分别为0.067和0.059, 均大于0.05, 都无统计学意义).

3 讨论

研究早已发现低氧是所有实体肿瘤的特征, 他与肿瘤的侵袭、血管生成及化疗耐药有关. 肿瘤在发生发展过程中不可避免的经历缺氧, 而HIF-1α是缺氧状态下一种最常见的中枢分子调控信号, 许多研究表明, HIF-1α是维持细胞和全身氧稳态的重要调节分子[8]. HIF-1由缺氧诱导的α亚基和组成型表达的β亚基组成, 所以, 缺氧时, HIF-1二聚体稳定性增加通过HIF-1α碳末端的入核信号诱导转位入核, 形成由HIF-1α/HIF-1β组成的异二聚体, 与DNA顺式作用元HRE(hypoxia response element, 缺氧反应元件)结合[9-10], 参与了缺氧早期组织的血管生成、糖酵解的增强和细胞增殖的调控. 而肿瘤为了对抗这种缺氧的微环境会发生一系列的适应性改变, 包括肿瘤细胞基因组和蛋白组学的变异, 表现出许多新的生物学性状, 如演进[11]、耐药[12]、无氧糖酵解[13]. 参与这些性状的许多

分子为HIF-1α所上调, 他们包含一段共同的基因调控序列包含一段HRE增强子/启动子序列. 该HRE包括一个或多个HBS(HIF-binding site, HIF-1结合位点)和HBS附近的一个或多个辅助的顺式作用元件HAS(HIF-1 ancillary sequence, HIF-1辅序列). 目前已知的HIF-1a的作用方式有约3种: (1) HIF-1α直接与效应基因的5'端的顺式作用元件结合; (2)HIF-1α通过蛋白与蛋白之间的相互作用和其他与效应基因的顺式作用元件相结合的蛋白结合, 间接调节效应基因的表达; (3)HIF-1α可诱导其他促进效应基因转录的因子的表达[14-15]. 常氧下HIF-1α通过泛素-蛋白酶体途径很快降解, 缺氧或由于特定环境下如肿瘤状态由于一些基因例如MAPK[16]、AKT[17]等表达增加时, HIF-1α的泛素化急剧减少, 并从胞质转移至胞核, 与HIF-1β形成二聚体, 促进缺氧诱导基因转录, 而引起一系列细胞对缺氧的反应[18]. 浸润生长和远处转移是恶性肿瘤重要的生物学特征, VEGF参与肿瘤细胞的这种生物学行为, VEGF是一种肝素亲和的外分泌二聚体糖蛋白, 具有高度保守性, 相对分子质量为25444-58444, 其基因定位于第6对染色体长臂, 包括交替选择剪接的8个外显子和7个内含子. VEGF是刺激血管内皮细胞增殖和移行的重要因子, 并可影响血管的通透性, 也称为血管通透因子(VPF), 对血管内皮细胞的分裂、增殖、抑制凋亡、水解基底膜、迁移和血管构建的调控作用较强, 且特异性高, 在胚胎发育、创伤修复、侧支循环建立等病理生理过程中发挥重要作用. 在VEGF作用下, 内皮细胞增殖、迁移, 细胞外基质蛋白水解, 毛细血管管腔形成. 由于mRNA差异剪接所致, VEGF有4种氨基酸残基数目不同的变异体, 分别为$VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$及$VEGF_{206}$, 其中$VEGF_{165}$活性最强, 分布范围广, $VEGF_{165}$为分泌型蛋白质可作用于内皮细胞上的Flt-1, Flk/KDR受体发挥作用[19], 是体内发挥作用的主要形式, 因此, 我们选择$VEGF_{165}$作为研究对象进行观察. 实体肿瘤在瘤体增大过程中经历无氧糖酵解. 葡萄糖经载体跨膜转运入细胞膜上GLUT-1数量的调节可能是组织对缺氧、缺血应激适应的一个重要机制, 环境和内在因素可在多个环节参与对GLUT-1蛋白表达的调控. GLUT-1受缺氧本身和缺氧导致的氧化磷酸化抑制的诱导, GLUT-1基因5'侧翼区的全长调控序列中有一个480 bp的SacⅠ/PstⅠ片段与$CoCl_2$(模拟缺氧本身)诱导的GLUT-1 mRNA相关[20], 高表达GLUT1与肿瘤的预后呈负相关[21]. 恶性肿瘤耐药复发是临床医疗工作人员最感棘手的问题, 而多药耐药基因是恶性肿瘤抵御治疗、复发和恶化的主要原因, 参与多药耐药的这些基因是遗传缺陷还是肿瘤生长过程中受环境诱导出现尚不清楚[22], 多药耐药基因MDR1属于人类MDR基因家族, 是目前公认的肿瘤多药耐药机制之一, 其产生机制可能是化疗药物激活肿瘤细胞中MDR1的启动子, 通过调控的转录和翻译实现MDR1基因过表达, 出现多药耐药表型. P糖蛋白P-glycoprotein, P-gp)为MDR1基因的编码产物, MDR1基因的扩增导致其过量表达. 其对应的蛋白形式P-gp是一种跨膜蛋白, 可将进入癌细胞内的抗癌药物泵出癌细胞, 从而导致癌细胞耐药. 近年来, 基因工程技术因为其简洁、方便、高效的特点成为研究基因功能组学和基因治疗应用最广泛的一种方法, 本实验在$CoCl_2$的化学诱导缺氧的基础上进一步导入外源基因HIF-1α, 上调HIF-1α的表达, 观察其对下游基因的效应去研究HIF的功能. 结果显示, 缺氧可以通过诱导HIF-1α的表达从而上调VEGF, GLUT1, MDR1的表达. HIF-1是一种异二聚体蛋白, 由α和β亚单位构成, β亚单位的表达较恒定, 而α亚单位的表达受多种因素调节, 其蛋白形式极不稳定. $CoCl_2$作用于细胞后, 可以明显增加HIF-1α蛋白的表达,但对其mRNA的表达没有明显影响, 提示$CoCl_2$可能是通过抑制HIF-1α蛋白的降解而使其蛋白表达增强, 而转染导入外源性的HIF-1α既能诱导HIF-1α蛋白的表达,又能上调RNA水平的表达, 这可能既与HIF-1α基因水平升高而在翻译为蛋白后胰腺癌细胞本身抑制HIF-1α蛋白降解的能力较强有关. 而在协同$CoCl_2$的作用抑制HIF-1α蛋白的降解的基础上成功导入外源HIF-1α基因后, 可以发现: HIF-1α, VEGF, GLUT1, MDR1基因及其相应的蛋白的表达均明显较其他实验组升高. 这至少可以部分解释, 在胰腺癌发生发展过程中, 由于经历了缺氧微环境改变过程, 这种缺氧微环境的改变当然主要是由于瘤体增大速度超过血液供应速度以及伴随坏死造成的物理缺氧, 同时也可能是由于肿瘤中异常的起稳定或上调HIF-1α表达的因子表达增加, 于是伴随了HIF的分子水平的改变, 从而导致其下游基因的变化, 进一步导致了胰腺癌的恶行性演进, 并耐受化疗、放疗以及复发、远处转移. 因此, 干扰HIF的表达可以从血管生成、营养供应以及

耐药几方面达到治疗胰腺癌的目的, 这一点国内外已经做了大量的研究工作[22-23], 本实验为胰腺癌的分子水平治疗进一步提供了可靠的靶点, 且证明其具有广阔的开发利用的前景.

本实验也存在明显不足之处, 如观察时间不长, 时间段的选取不多, 需进一步继续工作, 也可以进一步从以下几个方面加以改进: (1)可以观察在物理缺氧条件下HIF的改变; (2)在体胰腺瘤的发展中氧张力水平和HIF的关系改变; (3)通过基因敲除RNAi技术观察HIF降低后其下游基因的变化情况及胰腺癌细胞水平和动物模型上出现的效应性改变.

4 参考文献

1 Moulder JE, Rockwell S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 5: 313-341

2 高勇, 王杰军. 肿瘤血管生长和缺氧诱导因子. 国外医学肿瘤学分册 2001; 28: 4-7

3 樊利芳, 刁路明, 陈德基. 缺氧诱导因子-1a与肿瘤. 中华病理学杂志 2002; 31: 168-170

4 Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 139-168

5 Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001; 61: 6548-6554

6 Shibaji T, Nagao M, Ikeda N, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Fukumoto A, Nakajima Y. Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 4721-4727

7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3 rd ed. New York: Cold Sp ring HarborLaboratory Press, 1989

8 Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 2003; 22: 4082-4090

9 Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O_2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-7992

10 Qian D, Lin HY, Wang HM, Zhang X, Liu DL, Li QL, Zhu C. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 1822-1827

11 Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 2000; 88: 2606-2618

12 Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 297-307

13 Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, Wang J, Shindo M, Higashino F, Takeda K, Asaka M, Katoh H, Sugiyama T, Hosokawa M, Kobayashi M. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol* 2003; 162: 1283-1291

14 Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 2001; 8: 638-645

15 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-472

16 Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 32631-32637

17 Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; 14: 391-396

18 Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12: 1232-1235

19 Behrooz A, Ismail-Beigi F. Dual control of glut1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 5555-5562

20 Tohma T, Okazumi S, Makino H, Cho A, Mochizuki R, Shuto K, Kudo H, Matsubara K, Gunji H, Matsubara H, Ochiai T. Overexpression of glucose transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. *Dis Esophagus* 2005; 18: 185-189

21 Jiang EZ, Chang YJ, Lee JW, Lee WK, Kim JS, Sohn SK, Lee KB, Suh JS. Multi-drug resistance (MDR1) gene expression in de novo acute leukemia cells: correlations with CD surface markers and treatment outcome. *J Korean Med Sci* 1998; 13: 617-622

22 Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Lavey RS, Hines OJ. Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of VEGF gene expression. *Cancer* 2004; 100: 201-210

23 Hanze J, Eul BG, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F, Seeger W, Rose F. RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 571-577

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2971-2973
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

血管回声跟踪技术对肝硬化患者颈动脉弹性功能的定量检测

罗 燕, 张 梅, 谢 兵

罗燕, 张梅, 谢兵, 四川大学华西医院超声科 四川省成都市 610041
四川省卫生厅课题, No. 040032
通讯作者: 罗燕, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院超声科. luoyan77@vip.sina.com
电话: 028-85423192 传真: 028-85423192
收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-07-10

Quantitative evaluation of carotid elasticity in cirrhotic patients by echo-tracking technique

Yan Luo, Mei Zhang, Bin Xie

Yan Luo, Mei Zhang, Bin Xie, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by Sichuan Health Administration Foundation, No. 040032
Correspondence to: Dr. Yan Luo, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. luoyan77@vip.sina.com
Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To quantitatively detect the carotid elasticity in patients with liver cirrhosis by echo-tracking (ET) technique.

METHODS: ET technique was used to determine the stiffness parameter (β), pressure-strain elasticity modulus (Ep), arterial compliance (AC), argumentation index (AI) and one-point pulse wave velocity (PWVβ) of carotid in 20 cirrhotic patients and 150 normal adults.

RESULTS: The values of β and AI in patients with liver cirrhosis were higher than those in normal adults (P = 0.02; P = 0.00), while of the values of Ep, AC and PWVβ were not markedly different between cirrhotic patients and normal adults (P > 0.05).

CONCLUSION: The carotid elasticity in cirrhotic patients is decreased, and it can be detected quantitatively by ET technique.

Key Words: Ultrasonography; Carotid artery; Elasticity; Liver cirrhosis

Yan L, Mei Z, Bin X. Quantitative evaluation of carotid elasticity in cirrhotic patients by E-Tracking technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2971-2973

摘要

目的: 探讨血管回声跟踪(echo-tracking, ET)技术检测肝硬化患者颈动脉弹性功能指标β、Ep、AC、AI、PWVβ及其意义.

方法: 应用ET技术检测20例肝硬化患者颈动脉的弹性指标, 包括僵硬度参数β、压力应变弹性系数Ep、动脉顺应性AC、脉搏波放大指数AI及脉搏波传递速度PWVβ, 并采用协方差分析与同期检查的150例正常人进行比较.

结果: 排除年龄因素影响后, 肝硬化组与正常人相比颈动脉的β、AI有差别(P = 0.02; P = 0.00), Ep、AC、PWVβ差异无差异(P>0.05).

结论: 肝硬化患者的颈动脉弹性较正常人差; ET术能够定量检测肝硬化患者的颈动脉弹性功能改变.

关键词: 超声波检查法; 颈动脉; 弹性; 肝硬化

罗燕, 张梅, 谢兵. 血管回声跟踪技术对肝硬化患者颈动脉弹性功能的定量检测. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2971-2973
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2971.asp

0 引言

肝硬化时机体长期呈高动力状态, 近年来国内外关于肝硬化时内脏血流动力学改变已有较多报道, 但是对肝硬化时外周动脉血流动力学及弹性的研究都不多, 有研究表明, 肝硬化时动脉弹性降低[1-5]. 血管回声技术(e-tracking, ET)是近年来新近发展起来的用超声检测动脉弹性的方法, 具有无创及实时的特点. 本文利用ET技术检测20例肝硬化患者颈动脉的僵硬度参数β、压力应变弹性系数Ep、动脉顺应性AC、脉搏波放大指数

■背景资料
肝硬化时机体长期呈高动力状态, 近年来国内外关于肝硬化时内脏血流动力学改变已有较多报道, 但是对肝硬化时外周动脉血流动力学及弹性的研究都不多, 值得深入研究.

■相关报道
已有研究表明内皮素、一氧化氮、血管紧张素Ⅱ等物质在肝硬化的发生及发展中发挥多种病理生理作用, 并认为内皮素受体拮抗剂及肾素-血管紧张素系统抑制剂有可能给门静脉高压及肝硬化的治疗带来希望.

■**创新盘点**
应用血管回声跟踪技术(ET)检测肝硬化患者颈动脉弹性功能指标β, Eρ, AC, AI, PWVβ及其意义, 尤其是参数AI及PWVβ的测量属于本文创新之处.

AI及脉搏波传递速度PWVβ, 旨在初步了解肝硬化时颈动脉弹性功能的变化及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-12/2006-04经临床确诊的肝硬化患者20例, 年龄22-56(平均43.2)岁, 均不合并高血压、心血管疾病、肾病及糖尿病. 同期正常人共150例, 年龄22-84(平均47.0)岁, 入选标准为健康体检者, 无高血压、心脑血管疾病、糖尿病、肝肾疾病、高血脂. 所有受检者检查前1 h内未抽烟、未饮酒或咖啡等.

1.2 方法 受检者静息15 min后用标准袖带水银血压计测量上肢肱动脉血压, 测量3次取其平均值. 然后行超声检测, 所用仪器为ALOKA彩色多普勒超声诊断仪器α-10及其13 MHz高频探头, 连接同步ECG; 在颈动脉中段纵断面上获得满意的最大断面时可启动ET功能, 将两根取样线分别置于颈动脉前、后壁的内膜上(图1), 连续获得3-5个以上稳定波形曲线时保留图像, 仪器可自动计算出该侧颈动脉的β, Eρ, AC, AI及PWVβ值(图2-3); 所有超声检查均保证有两个有经验的医师在场, 共同选取符合标准的图像进行数据测量, 波形图像不稳定时, 重复检查2-3次, 取其平均值; 记录所有受检者的β, Eρ, AC, AI及PWVβ值.

统计学处理 采用SAS 6.12软件进行统计分析. 计量资料以mean±SD表示; 采用协方差检验比较肝硬化患者与正常人的颈动脉弹性有无差异. $P<0.05$则认为差异有统计学意义.

2 结果

年龄对β, Eρ, AC, AI及PWVβ均有影响, 采用协方差分析消除年龄的混杂作用后, 肝硬化患者β, AI与正常人有差异, Eρ, AC及PWVβ与正常人无差异. 亦即肝硬化患者其颈动脉弹性较正常人降低(表1).

3 讨论

3.1 肝硬化对颈动脉弹性的影响 肝硬化时机体长期呈高动力状态, 近年来国内外关于肝硬化时内脏血流动力学改变已有较多报道, 但是对肝硬化时外周动脉血流动力学及弹性的研究都不多[1-5]. 已有研究表明, 内皮素、一氧化氮、一氧化氮酶、肿瘤坏死因子、血管紧张素Ⅱ等物质在肝硬化的发生、发展中发挥多种病理生理作用, 并认为内皮素受体拮抗剂及肾素一血管紧张素系统抑制剂有可能给门静脉高压及肝硬化的治疗带来希望. 内皮素、一氧化氮及血管紧张素Ⅱ均是强烈的缩舒血管的物质, 他们的改变势必引起血管舒缩功能的改变或血管弹性功能的改变, 因此研究肝硬化时血管的功能改变可能有一定临床意义[6-10].

3.2 ET检测动脉弹性功能 动脉弹性是动脉缓冲功能的体现, 包括了动脉的顺应性及扩张性. 临床检测动脉弹性的方法很多, 如脉搏波传导速度PWV、压力波放大指数AI、大小动脉弹性系数等, 他们各自有优缺点[11]. 超声技术的优点

■**名词解释**
血管回声跟踪技术: 指通过实时接受血管壁运动的射频信号, 检测因血管壁位移而引起的射频信号相位的微小改变, 从而精确测量血管直径的改变, 并自动以波形表示出来. 以10 MHz探头为例, 测量精度可达0.01 mm.

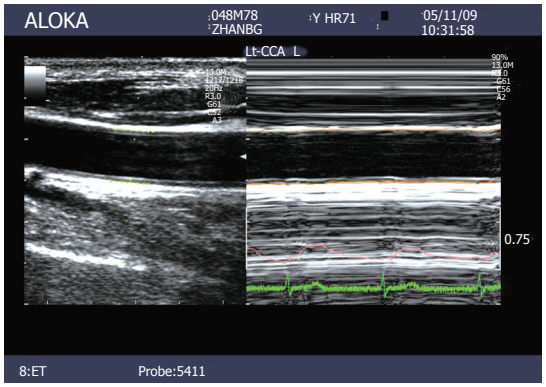


图 1 ET技术检测方法.

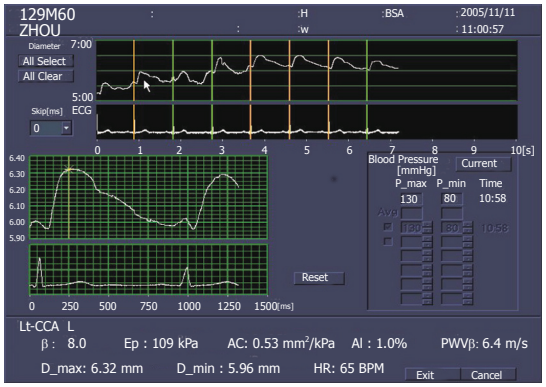


图 2 正常60岁男性颈动脉弹性指标.

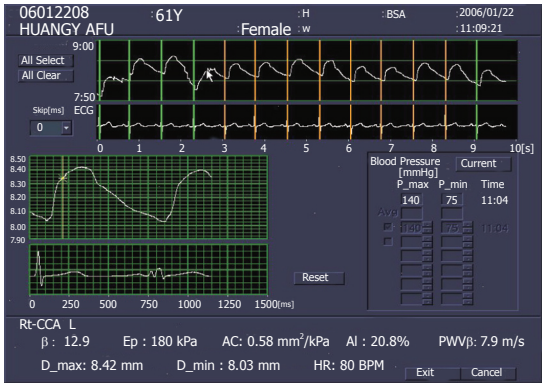


图 3 61岁男性肝硬化患者颈动脉弹性指标.

在于他能够同时给我们提供动脉结构和功能的信息, 新近推出的ET技术[12-13]除自动计算动脉僵硬度参数β、压力应变弹性模量Eρ、顺应性AC外, 又增加了脉搏波放大指数AI及单点脉搏波传导速度PWVβ的测定, 为超声更好测量动脉弹性增添了新的手段. 已有文献表明, 血管回声跟踪技术能较好反映血管弹性状态[13]. 本研究检测结果表明, 肝硬化者颈动脉的僵硬度参数β、脉搏波放大指数AI速度都增大, 亦即血管变硬, 与其他研究相似[5], 但是具体指标值无法比较, 原因在于是ET技术在国内使用不久, 尚没有超声检测肝硬化脉搏波放大指数及脉搏波传导速度报道; 且ET测量的AI及PWVβ由于原理与传统的非超声测量AI及PWV不完全一致, 因此正常值范围也不一致; 另外由于本组病例不多, 未对肝硬化患者进一步分层比较. 因此对于本组资料中每个弹性指标的正常参考值和意义都有待于进一步研究.

总之, 我们的初步经验表明, 肝硬化患者其颈动脉弹性功能降低, ET技术能够定量地检测这一改变, 更多的研究需要进一步进行.

表 1 肝硬化与正常人颈动脉β, Eρ, AC, AI及PWVβ的比较

	β	Eρ	AC	AI	PWVβ
n	340	340	340	340	340
R-Square	0.35	0.42	0.31	0.13	0.48
$P_{年龄}$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$P_{肝硬化}$	0.02	0.12	0.76	0.00	0.35

肝硬化者与正常人颈动脉弹性指标比较. *n*: 受检颈动脉例数; R-Square: 相关系数平方; $P_{年龄}$: 年龄的*P*值; $P_{肝硬化}$: 为肝硬化的*P*值.

■**同行评价**

由于ET技术是近1-2 a的超声新技术, 进入中国的历史也才1 a多, 各方面的研究都不多; 而新的ET增加了AI、PWVβ的开发及应用, 对这两个新指标的肝硬化研究, 国内尚未见报道. 属于创新, 值得进一步探讨.

4 参考文献

1 Kogan J, Turkot S, Golzman B, Oren S. Small artery compliance in cirrhotic patients during total paracentes. *Isr Med Assoc J* 2005; 7: 233-236

2 Henriksen JH, Fuglsang S, Bendtsen F, Christensen E, Moller S. Arterial compliance in patients with cirrhosis: stroke volume-pulse pressure ratio as simplified index. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G584-G594

3 Henriksen JH, Moller S, Schifter S, Abrahamsen J, Becker U. High arterial compliance in cirrhosis is related to low adrenaline and elevated circulating calcitonin gene related peptide but not to activated vasoconstrictor systems. *Gut* 2001; 49: 112-118

4 Moller S, Norgaard A, Henriksen JH, Frandsen E, Bendtsen F. Effects of tilting on central hemodynamics and homeostatic mechanisms in cirrhosis. *Hepatology* 2004; 40: 811-819

5 张静, 杨晓英, 徐卉,王润兰，卢菁菁. 应用E-Tracking技术评价晚期肝硬化患者颈动脉血管内皮功能. 中国超声医学杂志 2005; 21: 849-851

6 宋明, 张忠涛, 王宇. 内皮素受体拮抗剂治疗肝硬化门静脉高压症的研究进展. 中华外科杂志 2002; 40: 948-950

7 张晶, 魏红山, 李定国. 血管紧张素Ⅱ与肝硬化. 中华消化杂志 2002; 22: 363-365

8 聂青和. 肝纤维化的逆转策略及研究现状. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1165-1174

9 李蕴铷, 孙静媛, 王笑梅, 张首省, 杨胜彩. 一氧化氮和内皮素在肝硬变合并肝肾综合症患者中的变化及意义. 世界华人消化杂志 2000; 8: 484-485

10 李秋萍, 徐军全, 胡彩萍. 肝硬化患者血浆血管活性肠肽的变化及意义. 世界华人消化杂志 1999; 7: 437-438

11 张维忠. 动脉弹性功能检测的理论与实践. 心脑血管病防治 2003; 3: 1-2

12 Niki K, Sugawara M, Chang D, Harada A, Okada T, Sakai R, Uchida K, Tanaka R, Mumford CE. A new noninvasive measurement system for wave intensity: evaluation of carotid arterial wave intensity and reproducibility. *Heart Vessels* 2002; 17: 12-21

13 王建华, 王岳恒, 吴春玲, 杜昕, 张莉, 尹洪宁, 毛天杰. 血管回声跟踪技术定量评价正常人颈动脉弹性. 中华超声影像学杂志 2005; 14: 292-294

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2974-2976
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

雷帕霉素在合并急性肾功能不全肝移植患者中的初步应用

王 轩, 吴幼民, 许正昌, 张 斌, 李增才, 陆 雷, 郑以山

■背景资料
肝移植术后急性肾功能不全是肝移植术后常见并发症, 其死亡率可高达50%, 是严重影响肝移植患者术后存活的重要因素. 而目前常用免疫抑制方案无论是Fk506还是环孢素均对患者肾功能有损害, 因此寻找一种既无肾功能损害, 又具有较强抗排斥作用、经济实惠的免疫抑制方案是当今研究的热点之一.

王轩, 吴幼民, 许正昌, 张斌, 李增才, 陆雷, 郑以山, 中国人民解放军八一医院肝移植中心 江苏省南京市 210002
通讯作者: 王轩, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 中国人民解放军八一医院肝移植中心. wangxucn2002@hotmail.com
电话: 025-80864033 传真: 025-84458291
收稿日期: 2006-08-03 接受日期: 2006-08-22

Application of rapamycin in liver transplant patients with acute kidney malfunction

Xuan Wang, You-Min Wu, Zheng-Chang Xu, Bin Zhang, Zeng-Cai Li, Lei Lu, Yi-Shan Zheng

Xuan Wang, You-Min Wu, Zheng-Chang Xu, Bin Zhang, Zeng-Cai Li, Lei Lu, Yi-Shan Zheng, Liver Transplantation Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xuan Wang, Liver Transplantation Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. wangxucn2002@hotmail.com
Received: 2006-08-03 Accepted: 2006-08-22

Abstract
AIM: To explore the preventive effect of rapamycin on acute allograft rejection and kidney function recovery in liver transplant patients with acute kidney malfunction.

METHODS: A total of 25 liver transplant patients with acute kidney malfunction received rapamycin treatment as preventive measures for acute allograft rejection. Both the rejection rate and the change of kidney function were monitored.

RESULTS: Of the 25 cases, 23 survived till today with the longest time of 34 mo. The 3-mo acute rejection rate was 4%, and the kidney function of the 23 patients recovered to the normal range within 3 mo. It took more time to recover for the patients with impaired kidney function (45 ± 19 d) than that for the ones with normal kidney function (24 ± 15 d) before operation ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Rapamycin can prevent the occurrence of acute allograft rejection for liver transplant patients with acute kidney malfunction, while not affect the recovery of kidney function.

Key Words: Rapamycin; Liver transplantation; Acute kidney malfunction; Acute allograft rejection

Wang X, Wu YM, Xu ZC, Zhang B, Li ZC, Lu L, Zheng YS. Application of rapamycin in liver transplant patients with acute kidney malfunction. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2974-2976

摘要
目的: 探讨雷帕霉素(rapamycin, Rap)对合并急性肾功能不全肝移植患者术后急性排斥反应的抑制作用及对肾功能的影响.

方法: 对25例合并急性肾功能不全肝移植患者术后常规采用以Rap为主的免疫抑制方案, 观察移植术后急性排斥反应发生及肾功能的变化.

结果: 25例患者均随访, 23例存活至今, 最长存活已达34 mo. 术后3 mo内急性排斥反应发生率4%. 所有存活患者肾功能均在3 mo内恢复至正常范围, 术前肾功能有损害者, 术后血肌酐恢复正常所需要时间为(45±19 d), 较术前肌酐正常者(24±15 d)长.

结论: 以Rap为主免疫抑制方案完全可预防合并急性肾功能不全肝移植患者术后急性排斥反应发生, 同时不影响移植术后肾功能的恢复.

关键词: 雷帕霉素; 肝移植; 急性肾功能不全; 急性排斥反应

王轩, 吴幼民, 许正昌, 张斌, 李增才, 陆雷, 郑以山. 雷帕霉素在合并急性肾功能不全肝移植患者中的初步应用. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2974-2976
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2974.asp

0 引言
急性肾功能不全是肝移植术后常见的并发症[1-2], 如果处理不当, 常致严重后果. 由于目前临床常用的免疫抑制剂-神经碱钙蛋白抑制剂类(calcineurin inhibitor, CI)具有明显的肾

毒性[3-4], 因此, 对合并有肾功能不全的肝移植患者来讲, 合理应用免疫抑制剂显得极为重要. 雷帕霉素(rapamycin, Rap)作为一种新型免疫抑制剂, 具有较强抗排斥作用及延长移植物存活的能力, 而对肾无明显毒副作用[5-6]. 我们从2003-04/2005-12, 对25例术前或术后合并肾功能不全肝移植患者, 术后采用以Rap为主的免疫抑制方案预防急性排斥反应, 效果良好, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 25例患者, 男性22例, 女性3例, 年龄22-69(平均46.5)岁, 原发性肝癌3例, 肝炎后肝硬化17例, 暴发性肝衰竭3例, 血吸虫肝硬化2例. 肝功能分级: Child-Pugh评分为A级者2例, B级者10例, C级者13例. 根据术前血肌酐水平, 将25例患者分为术前血肌酐增高组(血肌酐≥132 μmol/L)6例, 血肌酐平均为225±47.8 μmol/L和术前血肌酐正常组(血肌酐<132 μmol/L)19例.

1.2 方法 1例行改良背驮式肝移植, 1例经典式肝移植, 23例行腔静脉成形肝移植[7]. 术中无肝期为57±16.5 min. 所有手术均未采用静脉转流. 免疫抑制剂采用Rap+骁悉(MMF)+强的松(Pred)三联方案. 手术后72 h内开始口服Rap, 起始量为4 mg/d, 次日2 mg/d; MMF 1500 mg/d, 分两次口服; 在常规甲基强的松龙用药结束后, 口服Pred 20 mg/d, 每周减少5 mg, 术后1 mo减至5 mg/d. 应用高压液相色谱法(HPLC)测定全血Rap浓度. 术后1-6 mo内Rap浓度谷值维持在8-10 μg/L, 6-12 mo在5-8 μg/L.

2 结果

2.1 人/肝存活情况 25例合并急性肾功能不全肝移植患者均得到随访, 1例术后35 d死于多脏器功能衰竭, 1例术后5 mo死于胆道并发症, 余23例均存活至今, 最长存活已34 mo, 最短2 mo. 有1例术后2 mo发生急性排斥反应, 经激素冲击治疗后获得逆转, 3 mo内肝急性排斥反应发生率为4%(1/25).

2.2 肾功能恢复情况 25例中除2例术后死于并发症外, 余23例患者血肌酐和尿素氮均在术后3 mo内恢复至正常范围. 血肌酐恢复正常最短时间9 d, 最长时间84 d. 术前肌酐正常组, 术后肌酐恢复正常时间为24±15 d; 术前肌酐增高组, 术后恢复正常时间45±19 d, 两者相比, 有显著性差异(P<0.01).

2.3 Rap的不良反应 有3例出现白细胞降低, 2例血小板减少, 经调整剂量及升白细胞药物后白细胞及血小板升致正常. 15例患者出现胆固醇和甘油三酯明显增高. 1例术后1 mo出现肝功能损害, 经暂时停药后, 肝功逐渐恢复正常.

3 讨论

急性肾功能不全是肝移植术后常见并发症, 其发生除与部分患者术前已有肾功能损害有关外, 主要与手术时切除病肝和供肝植入时下腔静脉部分或完全阻断有密切联系. 下腔静脉部分或完全阻断后, 可致双侧肾脏血液回流受阻, 回心血量不足, 进一步影响血压和双侧肾的血供. 因此肝移植术后患者大多会出现程度不等的血肌酐和尿素氮增高, 轻者可在数日内即可恢复正常, 但也有部分患者因术前已有肾功损害, 或术中腔静脉阻断时间较长, 术后表现肾功能损害较重, 术后肌酐短时难以恢复. 由于目前临床常规使用的免疫抑制方案均是以环孢素和Fk506为主, 而两者均有明显肾毒副作用[1,8-9], 在肾功能受明显损害的情况下继续使用环孢素和Fk506显然会进一步加重肾功能的损害. 因而此时免疫抑制剂合理使用就显得格外重要. Rap是一种新型强力免疫抑制剂, 是由吸湿链球菌属产生的天然发酵产物, 其作用机制与已知的环孢素和Fk506完全不同, 他不阻断白介素-2的转录, 而是通过阻断细胞因子诱导增生的信号传导, 抑制T淋巴细胞从细胞周期G1向S期转化[5]. Rap与环孢素和Fk506联合应用还可产生协同效应[10]. 此外, Rap无明显肾毒性是其一大显著特点. 以往在肾功能受损时, 临床多先使用白介素-2受体阻断剂如噻尼哌等, 推迟使用环孢素和Fk506, 但白介素-2受体阻断剂价格极其昂贵, 从而使其广泛应用受到一定程度限制. 针对Rap无肾毒性, 且具有较强免疫抑制作用这一特点, 我们从2003-08起, 对肝移植术后有中、重度肾功能损害的患者采用以Rap为主, 辅以MMF和类固醇的免疫抑制方案. 初步应用结果表明, 25例患者中有23例存活至今, 最长存活已达34 mo, 最短也已2 mo, 仅有1例于术后2 mo出现急性排斥反应, 移植术后3 mo总体排斥反应发生率为4%, 明显低于相关文献所报道的应用环孢素和Fk506所产生的排斥反应发生率(12%)[11-13]. 这说明, Rap辅以MMF和类固醇的免疫抑制方案安全有效, 完全能防止肝移植术后的急性排斥反应的发生. 对移植术后患者肾功能观察, 术后存活

■创新盘点

该研究首次将无肾毒性的免疫抑制剂雷帕霉素作为主要免疫抑制剂应用于肝移植术后出现急性肾功不全患者, 结果表明, 雷帕霉素不仅能完全抑制肝移植术后急性排斥反应的发生, 而且对患者肾功能无不良影响, 有利于患者术后肾功能的恢复, 因而该方案将为合并急性肾功能不全的肝移植患者术后抗排斥治疗提供一种全新的治疗方案, 值得临床进一步推广.

■同行评价
本文对25例术前或术后合并肾功能不全肝移植患者，术后采用以Rap为主的免疫抑制方案预防急性排斥反应，获得较好治疗效果，有一定临床参考价值.

的23例患者血肌酐和尿素氮均于术后3 mo内恢复至正常范围，恢复正常最短时间为9 d，最长时间为64 d，但术前血肌酐增高组术后恢复所需要时间(45±19 d)明显长于术前血酐正常组(24±15 d)，两者相比有显著性差异. 这说明移植术前患者肾功能情况直接影响到患者术后肾功能的恢复. 由于肝移植术后的肾功能损害多系急性功能性肾功能不全，在肝功能恢复后多能自行恢复，因此，对于术后血肌酐升高，我们认为不需要特别治疗，但要避免肾毒性药物的应用，同时维持出入量和水电平衡、提供足够能量. 在肾功能受损较重，血肌酐>700 μmol/L，存在水过多或电解质严重紊乱时，可考虑应用血透或血滤，以清除体内毒素，促进肾功能恢复. 本组有1例患者术后血肌酐最高升至960 μmol/L，经过3次间断性血滤后，血肌酐逐渐下降直至正常范围. 这也进一步证明，由Rap为主的免疫抑制方案无肾毒性，较为安全. 当然，Rap也有一些不良反应，如肝功能异常、贫血、白细胞降低等，其中较为突出的就是术后长期服用可致高脂血症. 本组有15例术后3-6 mo出现高胆固醇和高甘油三酯血症，发生率高达60%，对此我们必须高度重视. 对于高脂血症[14-15]，一方面可以减少Rap用量，另一方面也可等肌酐恢复正常后改换环孢素或Fk506，在必要时也可酌情考虑应用降脂药. 总之，初步临床试验结果表明，新型免疫抑制剂Rap配合骁悉和类固醇是一种新型高效低毒免疫抑制方案，他不但可以防止肝急性排斥反应的发生，而且无明显肾毒性，有利于肝移植术后肾功能的恢复，但对移植术后远期疗效的影响尚有待进一步观察.

4 参考文献

1 Junge G, Schewior LV, Kohler S, Neuhaus R, Langrehr JM, Tullius S, Kahl A, Frei U, Neuhaus P. Acute renal failure after liver transplantation: incidence, etiology, therapy, and outcome. *Transplant Proc* 2006; 38: 723-724

2 Cabezuelo JB, Ramirez P, Rios A, Acosta F, Torres D, Sansano T, Pons JA, Bru M, Montoya M, Bueno FS, Robles R, Parrilla P. Risk factors of acute renal failure after liver transplantation. *Kidney Int* 2006; 69: 1073-1080

3 de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 333-346

4 Emiroglu R, Ayvaz I, Moray G, Karakayali H, Haberal M. Tacrolimus-related neurologic and renal complications in liver transplantation: A single-center experience. *Transplant Proc* 2006; 38: 619-621

5 Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; 31: 335-340

6 Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003; 35: 7S-14S

7 Wu YM, Voigt M, Rayhill S, Katz D, Chenhsu RY, Schmidt W, Miller R, Mitros F, Labrecque D. Suprahepatic venacavaplasty (cavaplasty) with retrohepatic cava extension in liver transplantation: experience with first 115 cases. *Transplantation* 2001; 72: 1389-1394

8 Nielsen FT, Ottosen P, Starklint H, Dieperink H. Kidney function and morphology after short-term combination therapy with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 491-496

9 Ziolkowski J, Paczek L, Senatorski G, Niewczas M, Oldakowska-Jedynak U, Wyzgal J, Sanko-Resmer J, Pilecki T, Zieniewicz K, Nyckowski P, Patkowski W, Krawczyk M. Renal function after liver transplantation: calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2003; 35: 2307-2309

10 Ribes D, Kamar N, Esposito L, Rostaing L. Combined use of tacrolimus and sirolimus in de novo renal transplant patients: current data. *Transplant Proc* 2005; 37: 2813-2816

11 Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. *Lancet* 1994; 344: 423-428

12 Gonzalez-Pinto IM, Rimola A, Margarit C, Cuervas-Mons V, Abradelo M, Alvarez-Laso C, Londono MC, Bilbao I, Sanchez-Turrion V. Five-year follow-up of a trial comparing Tacrolimus and cyclosporine microemulsion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1713-1715

13 First MR. Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol* 2004; 17 Suppl 8: S25-31

14 Wlodarczyk Z, Vitko S, Salmela K, Czajkowski Z, Margreiter R. Lipid metabolism in renal transpl-ant patients receiving tacrolimus/sirolimus combination therapy. *Transplant Proc* 2005; 37: 1871-1873

15 Maheshwari A, Mishra R, Thuluvath PJ. Post-liver-transplant anemia: etiology and management. *Liver Transpl* 2004; 10: 165-173

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2977-2979
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

2型糖尿病合并脂肪肝危险因素临床分析

于晓静, 王晓梅, 冯海娟

于晓静, 王晓梅, 冯海娟, 大连大学附属中山医院内分泌科 辽宁省大连市 116001
通讯作者: 于晓静, 116001, 辽宁省大连市解放街6号, 大连大学附属中山医院内分泌科. yxj120400@mail.china.com
收稿日期: 2006-08-26 接受日期: 2006-09-26

Analysis of risk factors on nonalcoholic steatohepatitis in patients with type 2 diabetes

Xiao-Jing Yu, Xiao-Mei Wang, Hai-Juan Feng

Xiao-Jing Yu, Xiao-Mei Wang, Hai-Juan Feng, Department of Endocrinology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Xiao-Jing Yu, Department of Endocrinology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, 6 Jiefang Street, Zhongshan District, Dalian 116001, Liaoning Province, China. yxj120400@mail.china.com
Received: 2006-08-26 Accepted: 2006-09-26

Abstract

AIM: To study the prevalence and associated factor of fatty liver disease in type 2 diabetes patients.

METHODS: Biochemical test, insulin monitoring and liver ultrasound examination were performed in 179 patients with type 2 diabetes.

RESULTS: The prevalence rate of fatty liver disease was 47.5% in type 2 diabetes patients, whose body mass index (BMI), fasting plasma glucose, insulin, and triglycerides (TG) level as well as homeostasis assessment model of insulin resistance (HOMA-IR) index were higher than those in the patients without fatty liver. The level of TG and HOMA-IR were increased with the increase of BMI, and the occurrence rate of fatty liver disease was also elevated. Logistic analysis showed that HOMA-IR had marked correlation with the occurrence rate of fatty liver disease (OR = 1.582, P = 0.023).

CONCLUSION: There are many influential factors for the occurrence of fatty liver disease in type 2 diabetes patients, and insulin resistance may be the main factor. The increase of body mass may affect the formation of fatty liver by TG and insulin resistance.

Key Words: Type 2 diabetes mullitus; Insulin resistance; Fatty liver

Yu XJ, Wang XM, Feng HJ. Analysis of risk factors on nonalcoholic steatohepatitis in patients with type 2 diabetes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(30):2977-2979

摘要

目的: 探讨2型糖尿病合并脂肪肝的患病率及相关因素.

方法: 对179例糖尿病患者进行临床、生化、胰岛素及肝脏彩超检查.

结果: 2型糖尿病合并脂肪肝的患病率为47.5%, 该组的体重指数、空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)及甘油三酯高于于非脂肪肝组, 2 h胰岛素无差异. 以不同的体重指数分层, 随着体重指数的增加, 甘油三酯及HOMA-IR亦升高, 而脂肪肝的患病率亦呈增加趋势. Logistic回归分析显示, HOMA-IR对于脂肪肝患病率的增加有显著意义(OR = 1.582, P = 0.023).

结论: 影响2型糖尿病合并脂肪肝的因素很多, 胰岛素抵抗可能为主要影响因素. 体重指数可能通过高甘油三酯及胰岛素抵抗影响脂肪肝的形成.

关键词: 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; 脂肪肝

于晓静, 王晓梅, 冯海娟. 2型糖尿病合并脂肪肝危险因素临床分析. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2977-2979
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2977.asp

0 引言

2型糖尿病(T2DM)合并脂肪肝非常常见, 空腹血糖升高与肝脏胰岛素抵抗有明确的相关性, 血糖控制后, 肝脏脂肪侵润情况将减轻, 肝功能损

■背景资料
随着肥胖和糖尿病发病率的提高, 糖尿病合并脂肪肝的发病率和检出率也不断增多, 在我国, 脂肪肝的发病率以非酒精性脂肪肝为主, 其中糖尿病合并脂肪肝占较大比率. 因此, 了解糖尿病合并脂肪肝的患病率及影响因素, 防治脂肪肝的形成显得极其重要. 目前, 对糖尿病合并脂肪肝后血脂、血糖等各代谢指标的变化情况研究较多, 而对哪些指标为独立危险因素的研究较少, 同时, 多数研究未根据不同体重进行分层, 研究脂肪肝的患病率及相关指标变化情况.

■**创新盘点**
本文通过对2型糖尿病合并脂肪肝的各血脂指标、体重指数及胰岛素情况进行分析. 同时, 根据不同体重指数分层, 总结不同体重指数下, 2型糖尿病合并脂肪肝与血脂及胰岛素抵抗指数之间的关系.

害可减轻[1]. 同时, 胰岛素敏感性将改善, 因此, 在临床上对患者进行脂肪肝筛查及探讨其危险因素极其重要.

1 材料和方法

1.1 *材料* 179例患者均为我院2004/2005住院随机选取的T2DM患者, 所有患者均符合1999年WHO规定糖尿病诊断标准, 男106例, 女73例, 平均年龄(60.26±12.92)岁, 平均病程(6.87±7.06)年, 所有患者均未服过调血脂药物或近半年内未服用调血脂药物, 无酗酒史及药物性肝炎, 所有患者肝炎病毒标志物均为阴性.

1.2 *方法* 所有患者均记录身高、体重, 计算体重指数(BMI)、病程、家族史、治疗情况、酗酒史、收缩压及舒张压(为入院后前3 d血压的平均值). 所有病例均为隔夜空腹12 h采血测定各项指标, 空腹(FPG)及餐后2 h血糖采用己糖激酶法测定, 糖化血红蛋白(HbA1c)采用亲和层析微柱法测定, 血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)采用氧化酶法测定、低密度脂蛋白(LDL-ch)采用直接测定法、高密度脂蛋白(HDL-ch)采用遮避法测定, 血清空腹胰岛素(FINS)及餐后2 h胰岛素(PINS)采用生物化学发光法测定, 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR = FPG×FINS/22.5). 肝脏超声检查采用德国产超声检查仪, 并由专人负责检查. 非乙醇性脂肪肝诊断标准: 按中华医学会肝病学分会2003年[2]脂肪肝诊断标准, 排除药物、乙醇、妊娠所致及病毒性肝炎.

统计学处理 统计数据处理在SPSS 11.5软件中进行, 结果采用Mean±SD表示, 计量资料采用*t*检验, 其中TG、HDL-ch、0 h胰岛素、2 h胰岛素及HOMA-IR指数取自然对数转化为正态分布后进行统计学分析(*t*检验). 计数资料采用χ^2检验, $P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 *脂肪肝患病率及相关因素分析* 179例糖尿病患者中, 合并脂肪肝85例(占47.5%), 年龄60.61±13.32岁, 非脂肪肝组94例(52.5%), 年龄59.95±13.32岁, 二组男/女分别为51/34及55/39, 年龄及性别比率均无差异. 伴脂肪肝组的BMI、TG、LDL-ch、0 h胰岛素、胰岛素抵抗指数及空腹血糖均高于于非脂肪肝组, 有统计学差异(表1).

2.2 在以糖尿病合并脂肪肝为因变量的单因素Logistic回归分析, 回归系数假设检验的水准为0.05, $P<0.05$的可以被引入方程, 结果筛选出5个有意义的变量, 为体重指数、空腹血糖、甘油三酯、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数, $P<0.05$.

2.3 糖尿病合并脂肪肝的多因素Logistic回归分析, 将单因素分析筛选出的5个变量进行多因素分析, 结果只有胰岛素抵抗指数进入方程, 偏回归系数为0.459, 标准回归系数为0.202, Wald统计量为5.173, *P*值为0.023, *OR*为1.582, 95%可信区间为1.066-2.350, 说明胰岛素抵抗指数为糖尿病合并脂肪肝的独立危险因素.

2.4 不同BMI与相应TG水平与脂肪肝患病率关系分析, 根据中国成人超重和肥胖症预防控制指南小组制定的中国成人BMI切点为依据[3], 将不同BMI分成3组, (1)组<24(kg/m^2)、 (2)组24-28(kg/m^2)、(3)组≥28(kg/m^2), 结果显示, 随着BMI增加, 甘油三酯、胰岛素抵抗指数及脂肪肝患并率有增加趋势, BMI为24-28(kg/m^2)和≥28(kg/m^2)组, 与BMI<24(kg/m^2)组比较, $P<0.01$, 差异有统计学意义. BMI≥28(kg/m^2)组与BMI为24-28(kg/m^2)组比较, 差异无统计学意义; 且相应的TG水平及HOMA-IR指数亦增加, $P<0.01$, 差别有统计学意义(表2).

3 讨论

随着肥胖和糖尿病发病率的提高, 糖尿病合并脂肪肝的发病率和检出率也不断增多, 在我国, 脂肪肝的发病率以非酒精性脂肪肝为主, 其中糖尿病脂肪肝占较大比率, 本研究显示T2DM合并脂肪肝的患病率为47.5%, 与文献[4-5]报道一致. 胰岛素抵抗可被看作肥胖和非胰岛素依赖型糖尿病的背景. 也有很多学者认为非酒精性脂肪肝是胰岛素抵抗代谢综合征(X综合征)的临床表现之一[6]. 胰岛素抵抗是由于组织对胰岛素反应不敏感, 以胰岛素受体后信号传导障碍为主, 是T2DM、肥胖、高血压、脂代谢紊乱的共同基础. 糖尿病由于脂肪组织对胰岛素抵抗和胰岛素相对不足, 脂肪酶活性增加, 中性脂肪分解为甘油三酯和游离脂肪酸, 大量游离脂肪酸进入肝脏, 游离脂肪酸是甘油三酯合成的原料, 大量甘油三酯生成超过肝脏转运的能力时, 在肝细胞内聚集, 引起肝细胞变性、肿大, 形成脂肪肝. 杨生 *et al*[4]研究发现, 胰岛素抵抗是脂肪肝形成的独立危险因素. T2DM胰岛素抵抗的原因主要在于胰岛素受体亲和力降低和胰岛素受体数目减少和受体后缺陷. 肥胖, 尤其是腹形肥胖, 既是脂肪肝的常见病因, 又是T2DM的病因. 有研究显示, 健康成人脂肪肝发病率与

表 1 脂肪肝与空腹血糖、0 h及2 h胰岛素、血脂及体重指数的关系 (mean ± SD)

组别	*n*	FPG (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-ch (mmol/L)	HDL-ch (mmol/L)	TC (mU/L)	FINS (mU/L)	PINS (mU/L)	HOMA-IR	BMI (kg/m^2)
脂肪肝组	85	10.88 ± 3.44	0.31 ± 0.26	0.02 ± 0.13	5.46 ± 1.31	5.46 ± 1.31	0.88 ± 0.24	1.33 ± 0.5	1.20 ± 0.66	24.77 ± 2.95
非脂肪肝组	94	9.14 ± 3.8^a	0.20 ± 0.21^a	0.06 ± 0.14	5.29 ± 1.32	5.29 ± 1.32	0.70 ± 0.26^b	1.23 ± 0.41	0.68 ± 0.64^b	26.09 ± 2.94^a

$^aP < 0.05$, $^bP \leqslant 0.01$ *vs* 脂肪肝组.

表 2 不同BMI脂肪肝患病率、TG水平及HOMA-IR指数的关系

体重指数 (kg/m^2)	甘油三酯 (mmol/L)	胰岛素抵抗指数	脂肪肝患并率(%)
< 24	0.15 ± 0.22	0.36 ± 0.73	23.8
24-28	0.27 ± 0.23^a	0.98 ± 0.62^b	52.9^a
≥28	0.33 ± 0.24^b	1.28 ± 0.60^b	60.6^a

$^aP<0.05$, $^bP\leqslant 0.01$ *vs* BMI<24(kg/m^2)组.

BMI、年龄、血糖及乙醇摄入等因素有关[7]; 非乙醇脂肪肝被认为与肥胖、高甘油三酯血症、高胰岛素血症及糖耐量减退有关, 部分学者认为非乙醇性脂肪肝是胰岛素抵抗综合征组成的一部分[8]; 本研究显示, T2DM合并脂肪肝组空腹血糖、BMI、TG与非脂肪肝组比较, 均高于非脂肪肝组; 而空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数则明显的高于非脂肪肝组, 肥胖、高甘油三酯血症、高血糖及高胰岛素血症共同参与T2DM合并脂肪肝的形成, 而胰岛素抵抗可能是形成脂肪肝的最大危险因素, 而胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇与脂肪肝的发生无相关性. 同时, 随着体重指数的增加, TG水平及胰岛素抵抗指数逐渐升高, 而脂肪肝的患病率亦增加.

总之, T2DM合并脂肪肝与脂代谢紊乱及胰岛素抵抗有关, 同时, 脂肪肝在一定程度可参与或加重胰岛素抵抗, 而脂肪肝可能是糖尿病前的一个阶段, 在临床上应加强对脂肪肝的筛查及干预.

■**应用要点**

通过对影响2型糖尿病合并脂肪肝的各因素分析, 为防治2型糖尿病合并脂肪肝提供依据, 从各危险因素入手, 更好的防治2型糖尿病合并脂肪肝.

4 参考文献

1 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病. 人民卫生出版社 2005; 220-228

2 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝诊断标准. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 325

3 中国肥胖工作组数据汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因子异常的预测价值: 适宜体重指数和腰围的切点研究. 中华流行病学杂志 2002; 23: 5-10

4 杨生, 岳桂英. 2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子-α水平与胰岛素抵抗指数相关性分析. 世界华人消化杂志 2004; 12 : 1485-1487

5 王艳容, 高宏伟, 马征, 赵一鸣. 2型糖尿病患者脂肪肝和脂代谢紊乱的关系. 临床荟萃 2001; 16: 151

6 丁效惠, 赵景民. 非酒精性脂肪肝炎的发病机制及治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 371-375

7 王光助, 应光荣, 朱旭星, 金晓蓉, 洪小飞, 胡复兴, 金忠海, 李新平, 陈圣洁. 脂肪肝患者相关危险因素的调查和分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1228-1229

8 卢和. 45岁以上中老年人脂肪肝患病情况分析. 临床内科杂志 2000; 17: 95-96

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2980-2982
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

慢性自身免疫性胰腺炎误诊1例

宋建功, 黄如川, 李红燕, 李雪玲

宋建功, 李红燕, 李雪玲, 河南省宜阳县人民医院消化科 河南省宜阳县 471600
黄如川, 海南省海口市琼州医院消化科 海南省海口市 571003
通讯作者: 宋建功, 471600, 河南省宜阳县, 河南省宜阳县人民医院消化科. yyxrmyy@163.com
电话: 0379-68882538
收稿日期: 2006-07-04 接受日期: 2006-09-01

摘要

总结1例AIP患者的临床表现及影像和病理特点, 探讨慢性自身免疫性胰腺炎(AIP)的临床表现与特点. 本例42岁发病, 以持续性腹痛1 mo伴进行性黄疸2 wk多处就医, 均误诊为胰腺癌, 经术中快速病检证实为AIP. 通过本病例, 可以看出AIP临床表现缺乏特异性, 临床医师时刻保持警惕及活组织病检是诊断AIP的重要手段.

关键词: 慢性胰腺炎; 自身免疫性; 误诊

宋建功, 黄如川, 李红燕, 李雪玲. 慢性自身免疫性胰腺炎误诊1例. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2980-2982
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2980.asp

■背景资料
AIP在日本及韩国报道很多, 国内发病人数估计在4-5位数, 但截止2003年底尚无一例报道, 近年方有10余例个案报道. 本文通过对一经几家医院误诊, 至手术中才得以确诊的病例描述, 结合文献复习, 讨论了AIP的临床特点及治疗方法.

0 引言

慢性自身免疫性胰腺炎(AIP)并非罕见病, 但由于临床表现缺乏特异性, 论断十分困难, 国内报道极少. 我们报告1例并作一文献复习, 以期引起同仁的重视.

1 病例报告

女, 42岁, 因慢性不规则上腹痛1 mo伴进行性黄疸2 wk就医. 1 mo前无明显诱因出现不规则上腹痛, 呈发作性, 可忍受, 餐后半小时内痛较明显, 无放射痛及夜间痛, 伴腹胀不适, 无恶心、呕吐. 经某县医院胃镜检查诊断为“慢性充血渗出性胃炎、胃动力障碍”, 口服“吗丁啉、甲硝唑、阿莫西林”等, 效果不好. 2 wk前开始尿黄, 1 wk前发现巩膜黄染, 即赴某三级医院就诊, 经腹部B超、CT检查, 发现胰头胰体肿大, 胰周有少量渗出, ERCP示主胰管弥漫性狭窄, 管壁不规则, 胆总管下端狭窄, 上段扩张. 化验: 血常规正常, 大便常规及隐血正常, 尿胆素阳性, 尿胆原阴性, 肝功能正常, 甲肝、乙肝、丙肝标志物均阴性, BS 5.6 mmol/L, 血总胆红素138.4 μmol/L, 血碱性磷酸酶140 U/L, 血总蛋白68 g/L, 白蛋白34 g/L, 球蛋白34 g/L, A∶G = 1∶1, 凝血酶原时间、凝血酶时间、活化部分凝血酶时间测定均在正常范围, 肿瘤标记物CEA 48 μg/L. 诊断为胰腺癌晚期, 因经济困难, 转至本院手术. 术中依次打开腹腔, 顺利打开胃结肠韧带, 见胰头胰体明显充血, 水肿, 色较深, 腺小叶分割线消失, 与周围无黏连, 四周有少量液体渗出, 有数处肿大淋巴结约花生米大小, 无黏连, 胰腺与门静脉界限清, 与腹膜后无黏连, 腹腔探查未发现他处肿大淋巴结. 直视下所见与一般胰腺癌不符, 困术前已有内科医生提到慢性自身免疫性胰腺炎的可能, 即停止手术, 用21 G Surecut穿刺针在头、体部各二处活组织取材, 切除肿大淋巴结两枚一并快速病检. 经冰冻切片镜下可见: 腺泡细胞萎缩, 弥漫性间质纤维化, 有大量淋巴细胞浸润, 周围淋巴结可见大量浆细胞浸润呈滤泡样增生, 均未见肿瘤细胞. 经上级医院紧急病理会诊, 诊断为慢性自身免疫性胰腺炎, 遂缝合胃结肠韧带, 逐次关闭腹腔. 1 wk后伤口Ⅰ期愈合, 开始口服强的松10 mmg, 每日3次, 服药2 wk后腹痛消失, 黄疸消退, 4 wk后复查B超、CT胰腺形态及异常化验结果均恢复正常, 强的松开始每周减量5 mmg, 减至5 mmg时维持4 wk停药, 随访半年无复发.

2 讨论

慢性胰腺炎的最主要病因仍是胆结石性和乙醇性, 但仍有约30%的患者病因不明. 自1995年Yoshida *et al*[1]提出AIP这一命名以来, AIP作为一种特殊类型的胰腺炎逐渐被人们所认识, 但远未引起应有的重视. 据估算, 国内的发患者数应在4-5位数, 但截止2003年底尚无一例报道[2], 近2 a来方有10余例个案报道. 由于AIP的临床表现和影像及检验结果缺乏特异性, 诊断十分困难, 不少患者甚至要等到胰腺手术切除后方能确诊,

■相关报道
日本人Yoshida于1995年提出了AIP这一命名, 并进行了较为深入的研究, 国内上海第一医院巫协宁教授也对AIP潜心研究, 均认为AIP临床表现缺乏特异性, 诊断十分困难.

给患者的生理、精神及经济造成了极大的伤害且无法挽回, 我们报道的1例最终能避免重要脏器的切除, 亦属万幸. 从目前的资料不难推断, AIP不是只发生于某些地区或某些区域的地方病, 也不是罕见的疾病, 只要对该患者认识深刻, 时刻保持警惕性, 就能最大限度地减少误诊和漏诊. 故在此作一文献复习, 以期引起同仁的重视.

2.1 病因及发病机制 病因及发病机制目前均未明了, 据认为是自身免疫功能异常引起, 是一种自身免疫异常相关性疾病[1].

2.2 临床表现及实验室检查 发病年龄多在50岁以后, 男多于女. 临床表现无特异性, 可有周身不适、乏力、恶心、消化不良等非特异性症状, 可有不规则上腹部轻中度痛, 腹痛有时放射到背部. 腹痛及逐渐加重的梗阻性黄疸往往是患者就诊的主要原因. 体检多无阳性体征. 部分患者同时合并有其他自身免疫性疾病如干燥综合征、炎症性肠病、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎等. 化验提示半数患者的肿瘤标记物如CA19-9, CEA等可升高, 但升高的幅度可能低于胰腺癌患者[3]. 部分患者有高丙种球蛋白血症和IgG4升高, 特别是IgG4的升高, 约60%患者有血清碳酸酐酶Ⅱ型抗体阳性, 小部分有抗核抗体及抗甲状腺球蛋白及抗微粒体抗体阳性[4]. 有梗阻性黄疸者血胆红素、碱性磷酸酶、谷氨酸转肽酶升高.

2.3 影像学检查 通常, 腹痛和梗阻性黄疸患者的检查首选是B超, AIP患者表现为胰腺弥漫性低回声肿大(呈所谓腊肠样改变)或局限性肿大类似于胰腺癌的表现, 并且可以有肝外胆管的扩张, 很易与胰腺癌相混淆, 但可通过彩色多普勒检查发现AIP肿大的胰腺血供丰富[5]. AIP在CT和MRI上均表现为胰腺局限性或弥漫性肿大, 增强延迟, 无钙化或假性囊肿, 呈“腊肠样”改变, 和超声检查结果类似, 胰周可有包膜样环状影, 考虑为炎症、周围液体积聚或胰周脂肪组织纤维化所致[6], 在CT影像上该包膜样环状影表现为低密度影. 没有钙化是诊断AIP的基本条件, 有人报道CT对于诊断AIP的灵敏度和特异性可达86%和95%[7], 但如果病变较局限, 就很难和胰腺肿瘤相区别. MRI T_1权重示异常信号, 强度低于肝, 但老年人胰腺信号反应高于肝脏, T_2权重胰实质信号强度增加, 亦可有包膜样改变. ERCP示胰头或胰体增大, 个别有胰尾增大, 主胰管节段性或弥漫性狭窄, 并且管壁不规则, 胆总管下端常有狭窄, 其上段扩张.

2.4 组织病理学检查 活组织病理学检查对于AIP的诊断具有最重要的价值. 通常是通过超声内镜经胃针吸穿刺取得病理组织, 镜下可见胰腺弥漫性间质纤维化, 腺泡细胞萎缩和以T淋巴细胞为主的慢性炎性细胞浸润. 周围淋巴结可因大量浆细胞浸润而呈滤泡样增生[8]. 但该方法所需设备昂贵, 操作复杂, 很难在基层医院开展.

2.5 诊断与治疗 1995年, Yoshida *et al*[1]提出了AIP的诊断标准, 包括以下10个方面: (1)血清r球蛋白IgG4增高; (2)碳酸酐酶Ⅰ型或Ⅱ型抗体阳性; (3)胰头肿大甚于胰体、胰尾; (4)ERP示主胰管弥漫性或节段性不规则狭窄; (5)组织学示间质纤维化和淋巴细胞浸润; (6)ERC示胰内胆总管下端狭窄, 上段扩张; (7)症状无或轻, 无急性胰腺炎发作史; (8)无钙化或假性囊肿; (9)偶伴其他自身免疫性疾病或免疫介导性疾病; (10)皮质激素疗效佳. 目前已知激素是治疗AIP最有效的方法[9], 初始剂量常用30-40 mg/d, 约1 mo左右, 该病的症状、体征即可消失, 血清γ球蛋白恢复正常, B超、CT可示胰腺恢复正常大小, ERCP有显著改变, 若血清IgG4水平恢复正常, 应是中止治疗的良好指标. 停用激素时可每周减量5 mg, 减至5 mg/d时维持治疗1 mo, 少有复发. Tsubakio *et al*[10]报道用熊去氧胆酸治疗AIP也有较好效果, 为我们治疗AIP提供了更多的选择. 对于激素治疗无效或怀疑恶性肿瘤时, 就必须进行外科手术, 对有梗阻性黄疸、感染等合并症的患者, 在使用激素之前可行胆汁引流术并使用抗生素. AIP远期疗效尚不清楚, 其预后可能与伴发疾病如其他自身免疫性疾病的严重程度有关.

3 参考文献

1 Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1561-1568

2 巫协宁. 慢性自身免疫性胰腺炎. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 518-519

3 Aparisi L, Farre A, Gomez-Cambronero L, Martinez J, De Las Heras G, Corts J, Navarro S, Mora J, Lopez-Hoyos M, Sabater L, Ferrandez A, Bautista D, Perez-Mateo M, Mery S, Sastre J. Antibodies to carbonic anhydrase and IgG4 levels in idiopathic chronic pancreatitis: relevance for diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Gut* 2005; 54: 703-709

4 Komatsu K, Hamano H, Ochi Y, Takayama M, Muraki T, Yoshizawa K, Sakurai A, Ota M, Kawa S. High prevalence of hypothyroidism in patients with autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2005; 50:

■应用要点
临床医生只要对该病认识深刻, 时刻保持应有的警惕性, 再辅以相应的检查和激素治疗, 就能最大限度地减少漏诊及误诊. 提示临床医生时刻注意AIP的存在.

■名词解释
慢性自身免疫性胰腺炎(AIP): 是自身免疫功能异常引起, 是一种自身免疫异常相关性疾病, 临床表现缺乏特异性, 诊断困难, 极易漏误诊.

■同行评价
本文通过一个经几家医院诊治误诊, 最后到手术时才明确诊断的病例的描述及对该病的文献复习和讨论分析, 对提醒临床上认识此病有重要指导意义.

1052-1057
5 Susset MA, Kunz A, Sczepanski B, Littmann M, Blank W, Braun B. Autoimmune pancreatitis (AIMP) - a clinical entity of its own? *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 1294-1298
6 Irie H, Honda H, Baba S, Kuroiwa T, Yoshimitsu K, Tajima T, Jimi M, Sumii T, Masuda K. Autoimmune pancreatitis: CT and MR characteristics. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1323-1327
7 Procacci C, Carbognin G, Biasiutti C, Frulloni L, Bicego E, Spoto E, el-Khaldi M, Bassi C, Pagnotta N, Talamini G, Cavallini G. Autoimmune pancreatitis: possibilities of CT characterization. *Pancreatology* 2001; 1: 246-253
8 Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, Tsuruta K, Okamoto A, Amemiya K, Egawa N, Nakajima H. Close relationship between autoimmune pancreatitis and multifocal fibrosclerosis. *Gut* 2003; 52: 683-687
9 Horiuchi A, Kawa S, Akamatsu T, Aoki Y, Mukawa K, Furuya N, Ochi Y, Kiyosawa K. Characteristic pancreatic duct appearance in autoimmune chronic pancreatitis: a case report and review of the Japanese literature. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 260-263
10 Tsubakio K, Kiriyama K, Matsushima N, Taniguchi M, Shizusawa T, Katoh T, Manabe N, Yabu M, Kanayama Y, Himeno S. Autoimmune pancreatitis successfully treated with ursodeoxycholic acid. *Intern Med* 2002; 41: 1142-1146

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 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班.

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展. 征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送). 征文请于2007-06-30前邮寄.

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员. 参加学习班者授予国家继续教育学分12分；在大会有论文报告者另授继续教育学分6分.

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658.

世界华人消化杂志 2006年10月28日; 14(30): 2983-2987
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版. 世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. 2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01. 世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号.

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. 专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD_{50}, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或$T\frac{1}{2}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A*r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、−、±及-后列出. 如37.6±1.2℃, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d.3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/ L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2℃. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^9/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B_{12}用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外*uv*, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/ L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/ L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/ L或100 g/ L葡萄糖; 45 ppm=45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用*g*; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*υ*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP <0.05, ^bP <0.01(P >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^cP <0.05, ^dP <0.01; 第三套为^eP <0.05, ^fP <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行!

2.7 *标点符号* 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 *题名* 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 *作者* 论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 *单位* 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 *第一作者简介* 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 *基金资助项目* 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 *通讯作者* 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 *英文摘要*

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值), 中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. 世界华人消化杂志 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *P*值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在"Pang *et al*"的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣 *et al*[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿)，我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力，提高了《世界华人消化杂志》的学术质量，在此表示衷心感谢！

白爱平 主治医师
中山大学附属第一医院消化内科

白文元 教授
河北医科大学第二医院消化内科

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院普外科

陈积圣 教授
中山大学孙逸先纪念医院肝胆外科

陈立波 副教授
华中科技大学协和医院肝胆外科中心

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

范建高 主任医师
上海市第一人民医院消化科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院,上海市消化疾病研究所

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

龚建平 教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

郝春秋 副教授
第四军医大学唐都医院全军感染病防治中心(传染科)

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄金华 副教授
中山大学肿瘤医院影像介入科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

李旭 副教授
广州南方医院急诊科

刘占举 教授
郑州大学第二附属医院消化内科学

刘作金 副教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

任超世 研究员
中国协和医科大学生物医学工程研究所

王春友 教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

杨希山 教授
广东省中医药局消化内科

郁宝铭 主任医师
上海市第八人民医院结直肠外科