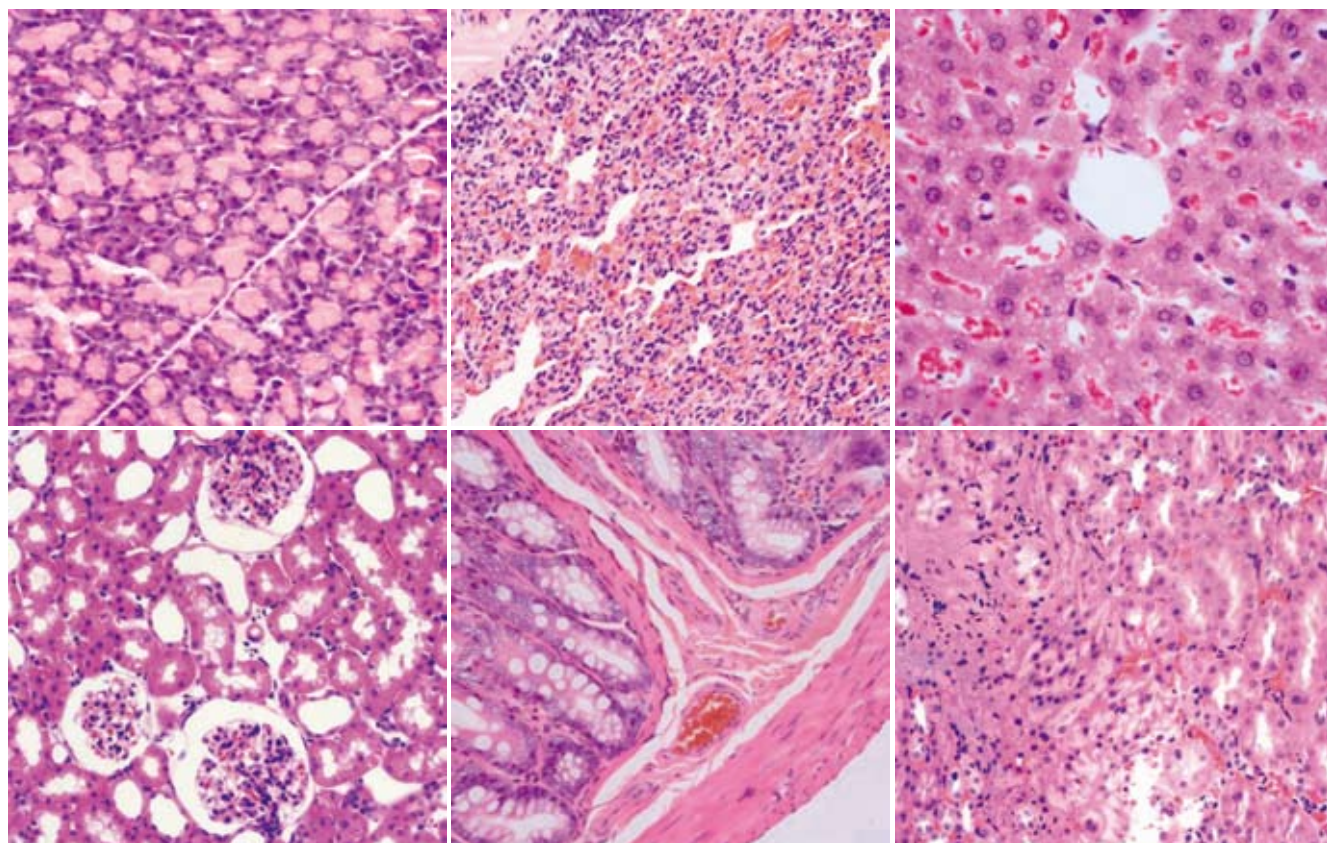


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 9 月 18 日 第 15 卷 第 26 期 (Volume 15 Number 26)



26 / 2007

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升副教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和副教授
王小众教授

编委

白爱平主治医师

白文元教授
白玉贤教授
别平教授
蔡淦教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
曹洁副教授
曹志成院士
苕新明教授
陈国凤主任医师

陈公琰主任医师
陈海龙教授
陈红松副研究员

陈积圣教授
陈建杰教授
陈建荣副教授

陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授

陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈强谱教授

陈仕珠主任医师
陈卫昌教授
陈耀凯副教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
陈知水教授

陈治水主任医师
陈祖林副教授
程爱国教授

程爱群主任医师
程斌副教授
程红岩教授

程树群副教授
迟宝荣教授
迟强教授

崔乃强教授
崔彦教授
崔毅主任医师

崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授

戴冬秋教授
党双锁副教授

邓长生教授
丁士刚主任医师

丁义涛教授
丁佑铭教授
董蕾教授

董明主任医师
杜群副研究员
杜祥教授

樊红副教授
范建高教授
范小玲主任医师

范志宁主任医师
房静远教授
冯红主任医师

冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
傅红副教授

傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授

高春芳研究员
高峰教授
高润平教授

高英堂研究员
戈之铮教授
龚国忠教授

龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师

顾岩教授
关玉盘教授
管冬元副教授

郭克建教授
郭晓钟教授
郭新宁教授

韩天权教授
韩新巍教授
郝春秋副教授

郝俊鸣副主任医师
何超教授
何生教授

何生松教授
何裕隆教授
何振平教授

洪天配教授
侯晓华教授

胡伏莲教授
胡和平主任医师

黄恒青主任医师
黄金华副教授
黄文林教授

黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授

黄志勇副教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授

季加孚教授
姜波健教授
姜春萌教授

姜慧卿教授
江家骥教授
蒋龙元副教授

金懋林教授
金瑞教授
匡安仁教授

兰平教授
蓝宇教授
劳绍贤教授

黎乐群教授
李定国教授
李东辉教授

李方儒教授
李国威教授
李华山副主任医师

李继强教授
李健丁教授
李杰副教授

李靖副教授
李军祥教授
李奇林教授

李胜研究员
李淑德教授
李涛主治医师

李小荣教授
李晓宇主任医师
李旭副教授

李延青教授
李永哲副研究员
李玉民教授

李玉明教授
李瑜元教授

李瑗教授
李增山副教授

李兆申教授
李振华教授
李智伟教授

李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授

林胜璋副教授
林勇讲师
林志辉教授

刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘冰熔教授

刘成海研究员
刘海林主任医师
刘建教授

刘鲁明教授
刘平教授
刘杞教授

刘铁夫教授
刘颖斌副教授
刘勇钢副主任医师

刘云鹏教授
刘占举教授
刘志苏教授

刘正稳教授
刘作金副教授
龙致贤教授

卢榜裕教授
卢实春教授
鲁华玉研究员

陆才德教授
陆伦根教授
陆云飞教授

禄韶英主治医师
吕明德教授
吕宁主任医师

吕云福教授
吕志武教授
马大烈教授

马金城教授
马力文主任医师
马欣主任医师

茅爱武主任医师
毛高平主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

梅林教授	施瑞华教授	王烈主任医师	许玲副教授	张军教授
梅铭惠教授	师英强博士	王鲁副教授	许文燮教授	张明辉副主任医师
孟庆华教授	石统东副教授	王石林主任医师	许亚平副教授	张青云研究员
宁琴教授	宋世兵主任医师	王晓艳副教授	宣世英教授	张群华教授
倪润洲教授	宋于刚教授	王效民教授	闫惠平研究员	张水军教授
牛建昭教授	宋振顺教授	王新月教授	严律南教授	张小晋主任医师
牛俊奇教授	孙诚谊教授	王学美研究员	严以群主任医师	张晓岚教授
欧希龙副教授	孙殿兴主任医师	王怡主任医师	阎晓初副教授	张绪清副教授
潘林娜教授	孙富强副教授	王正康教授	杨冬华教授	张学教授
潘兴华副主任医师	孙家邦教授	王志刚副主任医师	杨广顺教授	张肇达教授
潘秀珍教授	孙侃教授	王忠裕教授	杨建民教授	张占卿主任医师
彭波副教授	孙秀发教授	卫洪波教授	杨建勇教授	张志坚教授
彭吉润主任医师	孙学英教授	魏经国教授	杨林副研究员	张宗明教授
彭曦副研究员	孙延平副主任医师	魏来教授	杨维良教授	赵桂鸣主任医师
彭心宇教授	邵升副教授	闻勤生教授	杨希山教授	赵桂珍教授
彭志海教授	谭德明教授	吴德全教授	杨尹默教授	赵景民教授
朴熙绪主任医师	谭群友副教授	吴河水教授	杨幼林主任医师	赵连三教授
朴云峰教授	谭学瑞教授	吴建国教授	杨云生教授	赵平副教授
钱建民教授	汤恢焕教授	吴健雄教授	杨昭徐教授	赵晓晏教授
钱林学主任医师	汤展宏副教授	吴金术教授	姚登福教授	赵增仁副主任医师
秦波教授	唐采白副教授	吴君主任医师	姚鹏副教授	郑加生主任医师
秦成勇教授	唐笑爱教授	吴萍主任医师	姚树坤教授	郑民华教授
秦春宏副主任医师	唐霓副研究员	吴晴教授	叶红军主任医师	郑鹏远教授
秦华东教授	唐丽安教授	吴泰璜教授	伊力亚尔·夏合丁教授	智发朝教授
秦环龙教授	唐世刚教授	吴晓东教授	阴赅宏研究员	钟德珩教授
秦仁义教授	唐文富主治医师	吴志勇教授	殷正丰教授	周伯平教授
邱宝安主任医师	唐文皓副主任医师	席启主任医师	于恩达教授	周丁华主任医师
邱双健副教授	唐晓鹏教授	夏建川研究员	于聪慧教授	周国雄主任医师
邱伟华副主任医师	唐旭东主任医师	向德兵讲师	于红刚副教授	周士胜教授
仇毓东副教授	唐志鹏研究员	肖恩华教授	于健春教授	周伟平教授
裘正军教授	田德安主任医师	谢敏主任医师	于良副教授	周文兴教授
曲智威副主任医师	田素礼教授	谢青教授	于晓峰主任医师	周霞秋教授
任超世研究员	田晓峰教授	谢晓华副教授	于颖彦教授	周晓东研究员
任粉玉副教授	童强主任医师	邢光明教授	于则利教授	周晓武副主任医师
任建安教授	屠红副研究员	熊斌教授	余宏宇教授	朱传武副主任医师
任建林教授	万军教授	徐爱民副教授	郁宝铭教授	朱春兰主任医师
邵成浩讲师	汪波副主任医师	徐存拴教授	郁正亚副教授	朱立元教授
邵先玉教授	汪思应教授	徐大华主任医师	喻荣彬副教授	朱人敏教授
邵永孚教授	王邦茂教授	徐德忠教授	袁伟建教授	庄林主任医师
沈柏用副教授	王炳元教授	徐列明教授	曾勇教授	邹小明教授
沈洪教授	王承党副教授	徐宁志研究员	展玉涛副主任医师	左国营副主任药师
沈俊教授	王春友教授	徐小元教授	张柏和教授	
沈琳主任医师	王广义教授	徐秀英副教授	张方信主任医师	
沈世强教授	王济明教授	徐迎新研究员	张凤春教授	
沈守荣教授	王吉耀教授	徐智教授	张国梁主任医师	
沈薇教授	王健生副教授	许春舫主任医师	张集昌主任医师	
沈岩主任医师	王凯教授	许戈良教授	张吉翔教授	
施诚仁教授	王莉瑛教授	许乐主任医师	张锦生教授	

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 9 月 18 日 第 15 卷 第 26 期 (总第214期)

述 评

- 2763 小肠出血的病因和诊断
陆云飞
- 2768 胰液分子生物学检测诊断胰腺癌研究进展
李淑德, 蒋斐, 李兆申
- 2772 Ether à go-go钾通道与恶性肿瘤
丁祥武, 罗和生

基础 研究

- 2780 低浓度一氧化碳在防止大鼠小肠脂多糖诱导损伤中的保护作用
刘少华, 马可, 许兵, 徐鑫荣
- 2786 肠缺血灌注时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响
赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽

临 床 研 究

- 2790 慢性乙型肝炎患者CD4+CD25+Treg细胞的检测及意义
沈俊辉, 李宁, 范学工

文 献 综 述

- 2796 经胃腹腔镜内镜手术的研究进展
孙涛, 王少鑫
- 2800 肝细胞钙振荡的研究进展
张嫣璐, 张宗明
- 2805 移植肝的保存
卢思聪, 吕凌, 张峰
- 2809 干扰素治疗肝纤维化机制的研究进展
胡静, 李智伟
- 2814 大肠腺瘤细胞癌变过程中差异表达蛋白的研究进展
彭佳远, 秦环龙

研 究 快 报

- 2821 启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸的磷酸化
司富春
- 2825 替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及Ghrelin、P物质表达的影响
魏良洲, 杨林, 王利华, 张民生, 李新华, 田宇彬
- 2831 抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸调节的肝星状细胞系靶基因
樊文梅, 李国力, 魏红山
- 2835 CXC趋化因子受体3和其配体在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的表达
刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭

临 床 经 验

- 2839 p16基因高甲基化在胃癌发展中的作用
刘文天, 焦焕利, 杨玉龙, 王栋, 张维铭
- 2844 紫杉醇联合希罗达治疗晚期胃癌31例
伍小平, 庄英帜, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元
- 2847 HIF-1 α 及其调控基因PTEN在胃癌中表达的相互关系及临床病理意义
孙威, 张丹丹, 郭琳, 王强
- 2852 18岁以下青少年肝病患者肝脏切除23例
陈立波, 王国斌

	2856 腹腔镜和开腹直肠癌保肛手术对机体应激反应的影响 周保军, 张国建, 段国强, 张占学, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉
致 谢	2860 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2767 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报 2779 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》 2789 世界华人消化杂志的同行评价 2795 中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知 2799 消化内镜诊疗技术研讨班通知(第一轮) 2804 2007全国早期胃癌及消化病进展研讨会征文通知 2808 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 2824 中国学术期刊综合引证报告(2006) 2830 APASL 2008 Seoul 2838 世界华人消化杂志在线办公系统 2843 2007年国际会议 2855 第三届国际微创外科论坛暨2007年天津市消化内镜学会征文通知 2859 第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知
封面故事	Xi-Ping Zhang, Qian Ye, Xin-Ge Jiang, Mei-Li Ma, Fei-Bo Zhu, Rui-Ping Zhang, Qi-Hui Cheng. Preparation method of an ideal model of multiple organ injury of rat with severe acute pancreatitis. <i>World J Gastroenterol</i> 2007; 13(34): 4566-4573 http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4566.asp
国际会议	Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology 11-12 October 2007 Dresden symposia@falkfoundation.de

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2007-09-18

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生

编辑部主任 张海宁 责任编辑 何 燕

中文编辑 程剑侠 何 燕 王晓瑜 张焕兰

电子编辑 何基才 郭海丽

英文编辑 理文编辑

期刊名称 世界华人消化杂志

主管单位 山西省科学技术厅

主办单位 太原消化病防治中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

030001, 山西省太原市双塔西街77号

电话: 0351-4078656

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版 世界华人消化杂志编辑部

030001, 山西省太原市双塔西街77号

电话: 0351-4078656

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

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 世界华人消化杂志编辑部

030001, 山西省太原市双塔西街77号

电话: 0351-4078656

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

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。

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://wcjd.wjgnet.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部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。

2007年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 26

EDITORIAL	2763 Etiology and diagnosis of small intestinal bleeding <i>Lu YF</i> 2768 Progress in molecular biological diagnosis of pancreatic carcinoma by detection in pancreatic juice <i>Li SD, Jiang F, Li ZS</i> 2772 Ether à go-go potassium channel and malignant tumors <i>Ding XW, Luo HS</i>
BASIC RESEARCH	2780 Low-concentration carbon monoxide protects against lipopolysaccharide-induced rat small intestine injury <i>Liu SH, Ma K, Xu B, Xu XR</i> 2786 Effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury <i>Zhao JY, Hao JH, Li P, Guo H</i>
CLINICAL RESEARCH	2790 Significance of CD4+CD25+ regulatory T cells in peripheral blood of chronic hepatitis B patients <i>Shen JH, Li N, Fan XG</i>
REVIEW	2796 Advances in experimental studies of peroral transgastric endosurgery <i>Sun T, Wang SX</i> 2800 Advances in calcium oscillations of hepatocytes <i>Zhang YL, Zhang ZM</i> 2805 Preservation of liver grafts <i>Lu SC, Lv L, Zhang F</i> 2809 Therapeutic mechanism of interferon's anti-hepatic fibrosis action <i>Hu J, Li ZW</i> 2814 Differential expression of proteins during the canceration of colorectal adenoma cells <i>Peng JY, Qin HL</i>
RAPID COMMUNICATION	2821 Inhibitory effects of <i>Qigesan</i> and its individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC-γ1 in primary cultured esophageal carcinoma cells <i>Si FC</i> 2825 Effect of tegaserod on gastric emptying and the expression of ghrelin and substance P in diabetic rats <i>Wei LZ, Yang L, Wang LH, Zhang MS, Li XH, Tian ZB</i> 2831 Screening for genes regulated by gamma aminobutyric acid in hepatic stellate cells using suppression subtractive hybridization <i>Fan WM, Li GL, Wei HS</i> 2835 Expression of the CXC chemokine receptor 3 and its ligands in the livers of ischemia/reperfusion injured rats <i>Liu Z, Xu WX, Zhang XB, Liu BL, Cui DX</i>

CLINICAL PRACTICE	2839 Correlation of p16 hypermethylation with tumorigenesis and the development of gastric cancer <i>Liu WT, Jiao HL, Yang YL, Wang D, Zhang WM</i> 2844 Treatment of patients with advanced gastric cancer with paclitaxel combined with Xeloda: an analysis of 31 cases <i>Wu XP, Zhuang YZ, Jiang H, Wu YH, Dai WX, Ai XH, Tang SY</i> 2847 Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and its regulator phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10 in gastric cancer <i>Sun W, Zhang DD, Guo L, Wang Q</i> 2852 Adolescent hepatectomy: an analysis of 23 cases <i>Chen LB, Wang GB</i> 2856 Clinical comparison of systemic stress responses between laparoscopic or open anterior resection in rectal cancer patients with anal sphincter preservation <i>Zhou BJ, Zhang GJ, Duan GQ, Zhang ZX, Yan QH, Song WQ, Cai JH</i>
ACKNOWLEDGMENT	2860 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Zhang XP, Ye Q, Jiang XG, Ma ML, Zhu FB, Zhang RP, Cheng QH.</i> Preparation method of an ideal model of multiple organ injury of rat with severe acute pancreatitis. <i>World J Gastroenterol</i> 2007; 13(34): 4566-4573 http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4566.asp
INTERNATIONAL MEETINGS	Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology 11–12 October 2007 Dresden symposia@falkfoundation.de

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date September 18, 2007

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
 Department of Science and Technology
 of Shanxi Province

SPONSOR
 Taiyuan Research and Treatment Center
 for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
 Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING
 Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
 Telephone: +86-351-4078656
 E-mail: wcjd@wcjdnet.com

PRINTING
 Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
 Telephone: +86-351-4078656
 E-mail: wcjd@wcjdnet.com
<http://www.wcjdnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
 China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY-EDITOR-IN-CHIEF
 Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
 Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
 Deputy Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION
 RMB 24 Yuan for each issue,
 RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2007 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2007 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

小肠出血的病因和诊断

陆云飞

陆云飞, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科 广西壮族自治区南宁市 530021

陆云飞, 1985年广西医科大学研究生, 教授, 主要从事普通外科, 专于胃肠外科临床研究。

通讯作者: 陆云飞, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科。

luyunfei5351360@yahoo.com.cn

电话: 0771-5350100 传真: 0771-5352627

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-09-01

Etiology and diagnosis of small intestinal bleeding

Yun-Fei Lu

Yun-Fei Lu, Department of Gastrointestinal and Glands Surgery, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China

Correspondence to: Yun-Fei Lu, Department of Gastrointestinal and Glands Surgery, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China. luyunfei5351360@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-09-01

Abstract

The etiology of intestinal bleeding is complicated and its diagnosis is relatively difficult because clinical symptoms and signs commonly obscure alimentary tract bleeding. Present diagnostic methods include enteroscopy, barium and air double contrast X-ray examination, selective angiography, nuclear scintigraphy, and helical computed tomography. Application of double-balloon enteroscopy and wireless capsule endoscopy offers new methods for the diagnosis of small intestinal bleeding. Such patients sometimes still need to undergo laparoscopy or exploration laparotomy even when advanced investigation methods are used. This paper reviews the etiology of small intestinal bleeding and evaluates the advantages and disadvantages of different diagnostic methods to provide clinicians with a reference for etiological analysis and clinical determination of small intestinal bleeding.

Key Words: Small intestinal bleeding; Etiology; Diagnosis

Lu YF. Etiology and diagnosis of small intestinal bleeding. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(26): 2763-2767

摘要

小肠出血的病因较复杂, 临床上常表现为原因不明的消化道出血, 诊断比较困难。目前常用的诊断方法有纤维内镜、气钡双重对比造影、选择性动脉造影、核素显像和螺旋CT等。双气囊小肠镜、胶囊内镜的应用, 为小肠出血的诊断提供了新的手段。尽管如此多的先进检查方法, 一些病例仍不能明确病因, 需要作腹腔镜检查或剖腹探查。本文对小肠出血的病因分类及各种诊断方法的优缺点进行综述, 为小肠出血的病因分析及临床决策提供参考。

关键词: 小肠出血; 病因; 诊断方法

陆云飞. 小肠出血的病因和诊断. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2763-2767

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2763.asp>

0 引言

小肠出血通常是指Treitz韧带到回盲瓣之间肠道的出血, 约占整个消化道出血的2%-15%^[1]。由于小肠肠管长、系膜短、排列折叠、腹腔内活动度大等解剖特点, 常规的胃镜或结肠镜不能对小肠进行全面的检查, 其出血的病因和部位不易得到确诊, 因而小肠出血的诊断长期以来是临床工作的难点之一。小肠出血的病因较多, 患者在临床上常表现为原因不明的消化道出血, 多次就诊以及进行胃镜或结肠镜检查均难以明确病因, 各种X线检查、血管造影剂以及核素扫描对小肠出血的诊断率也不尽如人意^[2]。近年来小肠镜、胶囊内镜的应用, 为小肠出血的诊断提供了新手段。本文对小肠出血的病因分类及各种诊断方法的优缺点进行综述, 为小肠出血的病因分析及选择诊断方法提供参考。

1 小肠出血的病因

小肠出血的病因较多, 可以分为肿瘤、血管病变、炎症性病变、小肠憩室、肠道寄生虫病、

■背景资料

由于小肠的解剖特点, 小肠出血的诊断长期以来是临床工作的难点之一。小肠出血的患者在临床上常表现为原因不明的消化道出血, 多次就诊以及进行内镜检查、X线检查、血管造影以及核素扫描均难以明确病因。近年来小肠镜、胶囊内镜的应用, 显著提高了小肠出血的诊断率。本文对小肠出血的病因分类及各种诊断方法的优缺点进行综述。

■研发前沿

小肠镜、胶囊内镜、腹腔镜各自都有其显著特点, 对小肠出血的诊断均有较大价值, 目前国内外正在深入研究这几种检查方法的适应证和优缺点。

克罗恩病等。国内报道小肠出血病因与国外有所不同。国内报道小肠出血病因中肿瘤占首位, 依次为血管病变、小肠憩室等。国外报告则是血管病变占首位, 然后是肿瘤、溃疡性疾病、小肠憩室等^[3]。具体如下, (1)肿瘤, 小肠的长度约占整个消化道的75%, 但仅2%的胃肠道肿瘤起源于小肠^[4]。良性肿瘤、恶性肿瘤均可导致小肠出血。文献报告引起小肠出血的良性肿瘤有: 管状腺瘤、平滑肌瘤、神经鞘膜瘤、腺瘤、脂肪瘤、嗜铬细胞瘤、血管内皮瘤、家族性肠息肉病及胃肠道间质瘤等。引起小肠出血的恶性肿瘤有: 平滑肌肉瘤、恶性淋巴瘤、恶性胃肠道间质瘤、恶性神经鞘膜瘤、恶性组织细胞病、空肠癌和回肠癌等。小肠恶性肿瘤一般发生于间叶组织, 发生于小肠上皮者较少, 以平滑肌肉瘤、恶性淋巴瘤、恶性胃肠道间质瘤为主, 空肠癌、回肠癌较少见。(2)血管病变, 引起小肠出血的血管病变包括血管畸形、血管发育不良、血管扩张、动静脉瘘、血管瘤、肠系膜上动脉血栓形成、肠系膜静脉血栓形成等。其中以血管畸形、血管发育不良、血管扩张及血管瘤报道较多。(3)炎症性病变, 包括小肠非特异性炎症、小肠结核、嗜酸性粒细胞性肠炎、急性出血性坏死性小肠炎、肠伤寒、小肠黏膜糜烂或溃疡等。(4)Meckel憩室、多发性小肠憩室均可引起小肠出血。我院25例出血病例中, 小肠憩室占11例。(5)克罗恩病是临床上较常见的疾病, 同时也是小肠出血的病因之一。(6)小肠钩虫病、粪类原线虫病均可以引起小肠出血。(7)小肠异位胰腺、小肠转移癌等也是小肠出血的病因^[5-6]。

2 小肠出血的诊断方法

2.1 纤维内镜 对不明原因的消化道出血患者, 用纤维胃镜检查排除食管、胃和十二指肠出血, 以及用纤维结肠镜检查排除结直肠出血后, 则可以诊断为小肠出血。靠近Treitz韧带的空肠病变, 或靠近回盲部的回肠病变, 有时可以经胃镜或结肠镜发现。刘国先 *et al*^[7]报告采用一些特殊手法, 可以使纤维胃镜进入Treitz韧带以下50 cm的空肠, 使纤维结肠镜进入距回盲部100 cm的回肠, 因此能够扩大纤维胃镜及纤维结肠镜检查范围。由于纤维胃镜及纤维结肠镜已经广泛应用于各级医院, 对临床上拟诊为小肠出血的患者, 尽量争取用纤维胃镜或纤维结肠镜检查部分小肠是有一定价值的, 因为出血病灶可能正好位于被检查的肠段。

2.2 气钡双重对比造影 消化道气钡双重对比造影检查是目前应用很广的检查方法, 其操作简单、安全、无创伤, 对诊断小肠肿瘤、憩室、克罗恩病均有价值。但小肠出血病灶多为外生型生长, 消化道气钡双重对比造影时肿瘤不易显影, 常表现为假阴性^[8]。Ba *et al*^[9]报告76例小肠气钡双重对比造影, 发现13例病变, 主要为小肠肿瘤和Meckel憩室。在胃镜引导下将导管经口插入空肠, 用稀钡经导管进行小肠钡灌肠, 能提高小肠出血的诊断率。我院气钡双重对比造影检查对小肠出血的诊断率为23%^[10]。诊断率的高低与造影的技术水平、钡剂的质量以及X线设备的分辨力也有关系。随着胶囊内镜、双气囊小肠镜的发展, 气钡双重对比造影在小肠出血诊断中的应用已逐渐减少。

2.3 肠系膜上动脉造影 适用于小肠活动性出血的诊断。有选择性肠系膜上动脉造影和选择性肠系膜上动脉加腹腔动脉造影两种方式。目前认为该检查法具有定位和定性双重价值。造影剂外溢是出血部位的直接征象, 异常血管是小肠出血的间接征象。小肠血管病变活动性出血期间除可见造影剂外溢, 还可见以下征象: 肠壁内血管扩张扭曲, 动脉的分支末端呈异常血管丛征象; 小肠良性肿瘤表现为局限、边缘清楚的肿瘤染色; 小肠恶性肿瘤表现为典型的肿瘤新生血管征、肿瘤压迫征和肿瘤侵犯血管征。选择性动脉造影的诊断率受出血速度的影响, 当消化道出血速度达到0.5 mL/min以上时, 选择性动脉造影对于出血部位的检出率达到50%-72%, 而当出血速度低于0.5 mL/min时其检出率为25%-50%^[11]。Rollins *et al*^[12]报告动脉造影对小肠出血的诊断率为40%。用数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)检查19例小肠出血患者, 发现阳性结果12例(63.2%), 其中6例急诊DSA者5例阳性, 13例择期DSA者7例阳性^[13]。虽然选择性动脉造影可以同时部分消化道出血进行介入性的止血治疗, 但是动脉造影和介入治疗均是创伤性的操作, 有可能引发一些严重的并发症, 因此临床上进行选择动脉造影检查应严格掌握适应症, 并需注意预防并发症的发生。近年有人主张在出血间歇期作选择性动脉造影时, 经导管注入血管扩张剂前列腺素E、肝素、尿激酶等延长或诱发出血, 以提高阳性率, 但有可能诱发致命性的出血^[14]。由于存在较大风险, 同时有风险较小的其他检查法可以选择, 因此这种注入血管扩张剂的检查

■相关报道

国内报道小肠出血病因中肿瘤占首位, 依次为血管病变、小肠憩室等。国外报告则是血管病变占首位, 然后是肿瘤、溃疡性疾病、小肠憩室等。纤维内镜、气钡双重对比造影、肠系膜上动脉造影、核素显像、螺旋CT、双气囊小肠镜检查、腹腔镜检查均对小肠出血有诊断价值。

法不宜提倡. 动脉造影对小肠活动性出血的诊断意义是肯定的. 但动脉造影对非持续性出血或大面积黏膜糜烂出血检出率低, 同时不能显示小肠形态及小肠与出血之间的关系.

2.4 核素显像 ^{99m}Tc 标记红细胞核素扫描对少量出血较为适用. 在出血速度为0.05-0.1 mL/min时, 标记的红细胞可在出血部位溢出形成浓染区, 可据此判断出血部位. 由于 ^{99m}Tc 标记红细胞在血管内有较长半衰期, 因此可以通过反复扫描确定出血部位. 核素显像对诊断出血速度慢的病变优于选择性动脉造影, 但定位不准确. 如果进入肠道的同位素在两次扫描期间向肠道远端移动, 将会出现定位假象. 采用此检查法应进行动态观察, 以提高定位诊断率. Dusold *et al*^[15]报告153例消化道出血, ^{99m}Tc 标记红细胞核素扫描阳性率达59%. 总体来说核素显像对小肠出血的诊断是一种较好的检查方法, 安全、可靠、灵敏、无创伤, 但假阳性率和假阴性率均较高, 定位准确率低, 不能单凭核素扫描结果来决定手术或其他介入治疗^[16].

2.5 螺旋CT 螺旋CT具有多通道的快速采集、iv单次扫描覆盖范围大、微体素成像、亚毫米层厚、更高的空间分辨力及强大的图象后处理功能等优点, 可清晰显示小肠形态、小肠壁及腔内病变. MSCT是非侵袭性检查, 可以同时显示大范围的多支血管, 相对于DSA其对比剂用量小, 经济安全, 影像质量及分辨力较高, 并可显示血管与病灶、血管与临近解剖结构的关系. Ernst *et al*^[17]报告螺旋CT对小肠出血的诊断率为79%. Yoon *et al*^[18]报告26例消化道出血, 螺旋CT动脉相诊断的敏感性为90.9%. 但也有作者持不同意见, Abbas *et al*^[19]报告认为引起小肠出血的间质瘤、小肠血管瘤或Meckel憩室的体积一般较小, CT扫描诊断价值有限. 鉴于报道较少, CT扫描对小肠出血的诊断价值还有待于观察更多的病例.

2.6 双气囊小肠镜检查 双气囊小肠镜经口插入可达回肠中下段, 部分病例可达回肠末端; 经肛门插入可以检查回肠. 通过经口、经肛两条途径, 双气囊小肠镜可以检查全部小肠, 因而极大的提高了小肠疾病的诊断率. 其主要适应症为: 不明原因的小肠疾病患者, 如消化道出血、腹痛、腹泻等; 不完全性小肠梗阻者; 诊断明确但不了解小肠病变范围者; 小肠疾病治疗后复查. Lewis^[2]报告小肠镜对小肠出血性病变的检出率为50%, 小肠镜术前的病灶定位与术中发现的病

变部位基本一致, 其临床价值值得肯定, 是一项安全、直观、可靠的检查手段. Suzuki *et al*^[20]报告78.9%的患者经双气囊小肠镜检查发现了出血部位. 目前双气囊小肠镜诊断小肠出血已得到临床医师的认可. 存在的问题是: 双气囊小肠镜发现的某些异常组织结构的外科意义尚不明确, 如双气囊小肠镜发现的有些粗大的血管并非出血原因, 进一步分析和归纳双气囊小肠镜提示的异常征象, 探讨其临床意义是必要的. 另外, 双气囊小肠镜诊断小肠出血需要较长时间, 患者极度不适, 可引起出血、穿孔等并发症, 假阴性率较高, 因而临床应用受到一定限制^[21].

2.7 胶囊内镜 采用的仪器为以色列Given影像公司生产的杰文诊断图象系统, 胶囊内镜为M2A型, 尺寸为11 mm×26 mm, 质量约3.7 g. 图象特征包括140度范围的视野, 1:8的放大比例, 1-30 mm的可视深度, 最小观察直径为0.1 mm, 获取图象2帧/s, 记录时间8-10 h, 每例患者可获取50 000张左右图象. 胶囊内镜是一种新的检查手段, 与纤维电子内镜有很大的不同^[22-23]. 胶囊内镜经口吞服即可进行检查, 简便、安全、可靠、受检者耐受性好, 对不明原因小肠出血的病变检出率高、重复性好^[24]. 但消化道狭窄或瘻管形成、消化道梗阻、胃肠道功能障碍、小肠憩室引起的小肠出血是胶囊内镜检查的禁忌证. 李运红 *et al*^[25]报告手术治疗17例小肠出血, 术中诊断定位和术前胶囊内镜定位完全吻合. Viazis *et al*^[26]报告96例小肠出血患者, 经胃镜、结肠镜、小肠钡灌及双气囊小肠镜检查均为阴性, 但胶囊内镜检查发现41.7%患者有小肠病变, 主要为血管病变. Ersoy *et al*^[27]报告39例胶囊内镜检查, 其中26例发现小肠病变. 目前认为胶囊内镜是很有价值的诊断工具, 患者容易接受, 有良好的应用前景.

2.8 腹腔镜检查 腹腔镜能够检查小肠腔外的病变, 在一定程度上弥补纤维内镜检查和影像学检查的不足. Hahm *et al*^[28]应用腹腔镜对12例小肠出血进行检查, 12例患者都得到明确诊断, 其中4例术前内镜检查和影像学检查均阴性, 但腹腔镜检查都发现小肠病变. Ba *et al*^[29]报告对22例小肠大出血患者进行腹腔镜检查, 全部成功发现出血部位, 并进行了处理. 腹腔镜检查的优点是手术创伤小、恢复快、并发症发生率低, 还可以同时进行病变处理. 腹腔镜和双气囊小肠镜两种手段同时应用, 可能对提高小肠出血的诊断率有更大意义. 但腹腔镜检查毕竟是一种

■应用要点

本文提出对于原因不明的消化道出血应首先采用内镜检查排除食管、胃十二指肠及结、直肠病变, 然后应用相关检查明确小肠病变的部位. 选择检查方法一般应按照从普通到特殊、从简单到复杂、从无创性检查到创伤性检查的程序. 同时还应根据患者的个体情况选用合适的诊断方法, 同时还应根据所在医院的设备和条件进行选择.

■名词解释

胶囊内镜: 采用的仪器为杰文诊断图象系统, 胶囊内镜尺寸为11 mm × 26 mm, 质量约3.7 g。胶囊内镜经口吞服即可进行检查, 每例患者可获取50 000张左右图象。简便、安全、可靠、受检者耐受性好, 对不明原因小肠出血的病变检出率高。

创伤性检查, 有可能引起一些并发症, 甚至严重的并发症, 因此选择腹腔镜检查应权衡利弊, 严格掌握适应证。

2.9 剖腹探查 剖腹探查是小肠出血定位诊断中最终的选择方法。具体操作主要包括逐段全面视诊、触诊、肠壁透光试验、经肠系膜上动脉注入亚甲蓝, 以及对可疑病变处切开肠壁直接检查等。剖腹探查不仅能够对小肠进行全面彻底的检查及对出血部位进行明确的定位, 而且能够同时实施手术治疗。单纯剖腹探查对消化道出血的诊断率为31%-65%, 而术中内镜辅助下剖腹探查对消化道出血诊断率达50%-100%^[30-31]。Wagner *et al*^[32]报告9例剖腹探查5例发现病变, 2例经术中小肠镜检查找到病灶。术中内镜的使用方法是: 在小肠中段切开肠壁一个小口, 将纤维结肠镜或双气囊小肠镜插入腹腔, 向上检查至十二指肠, 向下检查至回盲部, 全部小肠都能进行细致充分的检查。术中内镜检查可明确小肠出血的原因、部位和病变性质, 有助于确定手术方式和切除小肠的长度。一般来说, 剖腹探查适用于经各种检查未能发现病变的小肠出血者; 出血不止、有肠梗阻、或疑有恶变者; 急性大出血危及生命者。

3 小肠出血诊断方法的选择

原因不明的消化道出血应首先采用纤维胃镜和纤维结肠镜检查排除食管、胃十二指肠及结肠、直肠病变, 然后应用相关检查明确小肠病变的部位。选择检查方法一般应按照从普通到特殊、从简单到复杂、从无创伤性检查到创伤性检查的程序。由于各种诊断方法均有其适应症和优缺点, 应根据患者的个体情况选用合适的诊断方法。同时还应根据所在医院的设备和条件进行选择。生命体征平稳的病例可先作消化道气钡双重对比造影、双气囊小肠镜或胶囊内镜检查。胶囊内镜有其显著特点, 已经引起越来越多的关注^[33]。关于胶囊内镜和双气囊小肠镜的选择, 有作者认为对怀疑小肠出血的病例, 应选择胶囊内镜作初步检查, 当出血部位确定之后, 再用双气囊小肠镜作组织病理学诊断或者治疗^[34]。生命体征不平稳的大出血患者应尽早进行肠系膜上动脉造影、核素显像或腹腔镜检查以了解出血的病因。小肠反复出血经过各种检查仍未能明确病因者应作剖腹探查, 必要时作术中内镜检查以明确诊断。对于出血不能控制、合并休克和病情危重的病例, 在经急诊纤维内镜检

查判断为小肠出血以后, 在具备术中纤维内镜协助检查技术的条件下, 应果断决策行急诊剖腹探查术, 以免延误最佳诊治时机。

4 参考文献

- 1 Jensen DM, Machicado GA. Diagnosis and treatment of severe hematochezia. The role of urgent colonoscopy after purge. *Gastroenterology* 1988; 95: 1569-1574
- 2 Lewis BS. Small intestinal bleeding. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 67-95
- 3 Kovacs TO. Small Bowel Bleeding. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005; 8: 31-38
- 4 Torres M, Matta E, Chinae B, Dueno MI, Martinez-Souss J, Ojeda A, Vega W, Toro DH. Malignant tumors of the small intestine. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 372-380
- 5 Prochorec-Sobieszek M, Windyga J, Maryniak RK, Misiak A, Szczepanik A. Angiodysplasia as a cause of recurrent bleeding from the small bowel in patients with von Willebrand disease. Report of 4 patients. *Pol J Pathol* 2004; 55: 173-176
- 6 Loualidi A, Spooren PF, Grubben MJ, Blomjous CE, Goey SH. Duodenal metastasis: an uncommon cause of occult small intestinal bleeding. *Neth J Med* 2004; 62: 201-205
- 7 刘国先, 毛朝亮. 深部胃、肠镜联合术中内镜诊治小肠出血22例. *临床荟萃* 2006; 21: 11
- 8 Nguyen NQ, Rayner CK, Schoeman MN. Push enteroscopy alters management in a majority of patients with obscure gastrointestinal bleeding. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 716-721
- 9 Ba MC, Qing SH, Huang XC, Wen Y, Li GX, Yu J. Diagnosis and treatment of small intestinal bleeding: Retrospective analysis of 76 cases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7371-7374
- 10 解乃昌, 陆云飞, 张小龙. 小肠出血25例诊治分析. *腹部外科* 2006; 19: 334-335
- 11 Howarth DM, Tang K, Lees W. The clinical utility of nuclear medicine imaging for the detection of occult gastrointestinal haemorrhage. *Nucl Med Commun* 2002; 23: 591-594
- 12 Rollins ES, Picus D, Hicks ME, Darcy MD, Bower BL, Kleinhoffer MA. Angiography is useful in detecting the source of chronic gastrointestinal bleeding of obscure origin. *AJR Am J Roentgenol* 1991; 156: 385-388
- 13 王兴清, 吴菊英, 陈明高. 小肠出血数字减影血管造影的临床分析. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2002-2003
- 14 陆玮. 动脉造影对小肠出血的诊断价值. *胃肠病学* 2002; 7: 102-104
- 15 Dusold R, Burke K, Carpentier W, Dyck WP. The accuracy of technetium-99m-labeled red cell scintigraphy in localizing gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 345-348
- 16 Rantis PC Jr, Harford FJ, Wagner RH, Henkin RE. Technetium-labelled red blood cell scintigraphy: is it useful in acute lower gastrointestinal bleeding? *Int J Colorectal Dis* 1995; 10: 210-215
- 17 Ernst O, Bulois P, Saint-Drenant S, Leroy C, Paris JC, Sergeant G. Helical CT in acute lower gastrointestinal bleeding. *Eur Radiol* 2003; 13: 114-117
- 18 Yoon W, Jeong YY, Shin SS, Lim HS, Song SG, Jang NG, Kim JK, Kang HK. Acute massive gastrointestinal bleeding: detection and localization

- with arterial phase multi-detector row helical CT. *Radiology* 2006; 239: 160-167
- 19 Abbas MA, Al-Kandari M, Dashti FM. Laparoscopic-assisted resection of bleeding jejunal leiomyoma. *Surg Endosc* 2001; 15: 1359
- 20 Suzuki T, Matsushima M, Okita I, Ito H, Gocho S, Tajima H, Tokiwa K, Teraoka H, Watanabe K, Shirai T, Mine T. Clinical utility of double-balloon enteroscopy for small intestinal bleeding. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1914-1918
- 21 Martinez-Ares D, Gonzalez-Conde B, Yanez J, Estevez E, Arnal F, Lorenzo J, Diz-Lois MT, Vazquez-Iglesias JL. Jejunal leiomyosarcoma, a rare cause of obscure gastrointestinal bleeding diagnosed by wireless capsule endoscopy. *Surg Endosc* 2004; 18: 554-556
- 22 Yu M. M2A capsule endoscopy. A breakthrough diagnostic tool for small intestine imaging. *Gastroenterol Nurs* 2002; 25: 24-27
- 23 Lewis B, Goldfarb N. Review article: The advent of capsule endoscopy--a not-so-futuristic approach to obscure gastrointestinal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1085-1096
- 24 Ziegler KM, Flamm CR, Aronson N. Wireless capsule endoscopy in patients with obscure small-intestinal bleeding. *J Am Coll Radiol* 2005; 2: 818-820
- 25 李运红, 徐肇敏, 陈隆典, 韩树堂, 于成功, 张志宏. 胶囊内镜诊断小肠出血及与手术结果的对照研究. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 313-315
- 26 Viazis N, Papaxoinis K, Theodoropoulos I, Sgouros S, Vlachogiannakos J, Pipis P, Markoglou C, Avgerinos A. Impact of capsule endoscopy in obscure small-bowel bleeding: defining strict diagnostic criteria for a favorable outcome. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 717-722
- 27 Ersoy O, Sivri B, Arslan S, Batman F, Bayraktar Y. How much helpful is the capsule endoscopy for the diagnosis of small bowel lesions? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3906-3910
- 28 Hahm KB, Kim JH, You BM, Kim YS, Cho SW, Yim H, Ahn BO, Kim WB. Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 1998; 17: 153-157
- 29 Ba MC, Qing SH, Huang XC, Wen Y, Li GX, Yu J. Application of laparoscopy in diagnosis and treatment of massive small intestinal bleeding: report of 22 cases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7051-7054
- 30 Chamberlain SA, Soybel DI. Occult and obscure sources of gastrointestinal bleeding. *Curr Probl Surg* 2000; 37: 861-916
- 31 Douard R, Wind P, Panis Y, Marteau P, Bouhnik Y, Cellier C, Cugnenc P, Valleur P. Intraoperative enteroscopy for diagnosis and management of unexplained gastrointestinal bleeding. *Am J Surg* 2000; 180: 181-184
- 32 Wagner HE, Stain SC, Gilg M, Gertsch P. Systematic assessment of massive bleeding of the lower part of the gastrointestinal tract. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 175: 445-449
- 33 Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2407-2418
- 34 Nakamura M, Niwa Y, Ohmiya N, Miyahara R, Ohashi A, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Preliminary comparison of capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2006; 38: 59-66

■同行评价

本文综述了小肠出血的病因和诊断方法, 论述全面, 有一定的临床指导意义和参考价值。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展, 中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作。此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊, 其中, 社科期刊110种、科技期刊86种。评估结果如下: 一级(优秀)期刊共88种, 其中社科期刊42种, 科技期刊46种, 包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志; 二级期刊共103种, 其中社科期刊64种, 科技期刊39种; 三级期刊共5种, 其中社科期刊4种, 科技期刊1种。(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅)

胰液分子生物学检测诊断胰腺癌研究进展

李淑德, 蒋斐, 李兆申

■背景资料

胰腺癌恶性程度高, 早期诊断困难。目前临床上常用的血清肿瘤标记物(如CA19-9)检测与影像学(如CT, MR)检查仍不能解决其早期诊断问题。胰液作为极有意义的研究对象, 具有高度的组织专一性。胰腺癌95%以上起源于胰管上皮, 且癌细胞比正常细胞黏附力弱, 容易剥离出现在胰液中, 因而通过收集胰液进行分子生物学检测对诊断具有重要意义。近年来这方面的研究正在增加。

李淑德, 蒋斐, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

李淑德, 1995年上海第二军医大学博士, 教授, 主任医师, 主要从事胰腺癌基础和临床研究。

通讯作者: 李淑德, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科。lishude57@126.com

电话: 021-25074719

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-08-25

Progress in molecular biological diagnosis of pancreatic carcinoma by detection in pancreatic juice

Shu-De Li, Fei Jiang, Zhao-Shen Li

Shu-De Li, Fei Jiang, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Shu-De Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. lishude57@126.com

Received: 2007-05-18 Revised: 2007-08-25

Abstract

The early diagnosis of pancreatic carcinoma is very difficult, although molecular biological diagnosis by detection in pancreatic juice has promise. This article reviews progress in this area that includes analysis of oncogenes (*k-ras*), tumor suppressor gene (*p53*), telomerase activity and proteomes in human pancreatic juice.

Key Words: Molecular biology; Diagnosis; Pancreatic juice; Pancreatic carcinoma

Li SD, Jiang F, Li ZS. Progress in molecular biological diagnosis of pancreatic carcinoma by detection in pancreatic juice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2768-2771

摘要

胰腺癌早期诊断十分困难, 预后极差。近年胰液分子生物学检测对胰腺癌早期诊断带来了希望, 包括胰液的癌基因、抑癌基因、微卫星不稳定性、蛋白质组学分析等。本文综述了上述研究进展。

关键词: 分子生物学; 诊断; 胰液; 胰腺癌

李淑德, 蒋斐, 李兆申. 胰液分子生物学检测诊断胰腺癌研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15(26): 2768-2771

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2768.asp>

0 引言

胰腺癌恶性程度高, 转移早, 早期诊断困难, 手术切除率与5 a生存率低。目前临床上常用的血清肿瘤标记物(如CA19-9)检测与影像学(如CT, MR)检查仍不能解决其早期诊断问题。胰液作为极有意义的研究对象, 具有高度的组织专一性, 其蛋白质含量丰富, 不但可以体现胰腺外分泌功能, 还包含了疾病状态下病变组织及其微环境所特有的分泌入胰液的蛋白质。胰腺癌95%以上起源于胰管上皮, 且癌细胞比正常细胞黏附力弱, 容易剥离出现在胰液中, 因而通过收集胰液进行分子生物学检测对诊断有重要意义。近年这方面的研究正在增加, 本文就此作一综述。

1 癌基因(*k-ras*基因)检测

Bos *et al*^[1]分析人体肿瘤中*k-ras*基因点突变的发生率, 发现其在胰腺癌中发生率最高(阳性率70%-90%), 其中以*k-ras* 12密码子点突变最常见。1993年Tada *et al*^[2]首先在胰腺癌患者的胰液中检测*k-ras*基因点突变, 突变率为50%-100%, 平均72%(98/137)。Ha *et al*^[3]对胰液上清与沉淀部分同时进行*k-ras*基因突变检测, 发现胰腺癌($n = 19$)与慢性胰腺炎患者($n = 25$)胰液上清*k-ras*基因突变率分别为89%和28%, 胰液沉淀部分突变率分别为79%和20%, 认为胰液上清与沉淀部分联合检测可提高胰腺癌诊断率。Boadas *et al*^[4]对胰腺癌($n = 40$)和慢性胰腺炎($n = 50$)患者胰液同时进行细胞学与*k-ras*基因突变检测, 阳性率分别为27%和44%, 在11例细胞学阴性的胰腺癌中, 有4例患者*k-ras*基因突变阳性。因取材太小无法进行细胞学诊断的2例患者中, 有1例*k-ras*基因突变阳性, *k-ras*基因突变检测诊断早期胰腺癌1例; 慢性胰腺炎胰液*k-ras*基因突变率为16%(8/49), 其中1例

发生癌变. 认为对出现 $k-ras$ 基因突变的慢性胰腺炎患者, 应视为胰腺癌高危人群定期进行随访. Queneau *et al*^[5]检测36例慢性胰腺炎患者胰液, $k-ras$ 基因突变率为27.8%, 其中2例患者分别在随访的第7个月和第17个月时发生癌变, 而无突变者未出现癌变($P<0.03$), 认为 $k-ras$ 基因突变是发生胰腺癌的危险因素. Lu *et al*^[6]采用PCR-RFLP法对201例患者胰液中 $k-ras$ 基因进行分析(其中76例分别被手术、病理、临床确诊为胰腺癌), 发现 $k-ras$ 基因点突变检出率为87.8%(36/41), 在胰腺良性疾病中为23.5%(4/17)($P<0.0005$), 诊断的特异性、准确性和敏感性分别为76.5%(13/17)、84.5%(49/58)和87.8%(36/41).

尽管 $k-ras$ 基因点突变主要见于胰腺癌, 但胰腺良性疾病中也有 $k-ras$ 基因突变^[5]. 在胰腺癌众多的癌基因中, $k-ras$ 突变被认为是出现于胰腺癌发生的早期. 胰液中 $k-ras$ 基因突变对胰腺癌的特异性, 报道尚不一致. 对出现胰液 $k-ras$ 基因突变阳性的慢性胰腺炎患者长期随访结果, 提示突变可能存在假阳性结果^[7]. 因此, 胰液 $k-ras$ 基因点突变作为诊断胰腺癌的标志物, 仍需大样本前瞻性研究证实^[8].

2 抑癌基因(p53基因)检测

$p53$ 基因的失活与胰腺癌的发生发展密切相关. Yamaguchi *et al*^[9]用PCR-SSCP法检测26例经手术证实胰腺癌患者胰液 $p53$ 基因突变, 其中11例检出 $p53$ 基因的突变(占42.3%). 突变位点均位于外显子5, 6, 7, 8区内, 而16例慢性胰腺炎患者的胰液中未检测到 $p53$ 基因的突变. 认为 $p53$ 基因突变在胰腺癌中有较高的特异性. Sawabu *et al*^[10]报道, 胰腺癌患者胰液中 $p53$ 基因突变率为4%-50%, 慢性胰腺炎胰液中未检测到 $p53$ 基因突变; 在细胞学诊断阴性的15例胰腺癌中有7例(47%)存在 $p53$ 基因突变. Lu *et al*^[6]对201例患者采用PCR-SSCP方法对胰腺癌胰液中的 $p53$ 基因突变进行分析(其中76例分别被手术、病理、临床确诊患胰腺癌), 结果显示在胰腺癌患者胰液中 $p53$ 基因突变率为47.4%(18/38), 诊断特异性为87.5%, 认为 $p53$ 基因突变可作为诊断胰腺癌或鉴别慢性胰腺炎的指标. Lohr *et al*^[11]检测66例慢性胰腺炎患者胰液, $p53$ 基因突变率为7.5%, 这些患者胰液肿瘤细胞学检测均为阴性, 在切除标本中未见到癌细胞或癌前病变; 对患者随访(26 ± 3)mo, 无1例患者出现癌变.

总之, 胰液中 $p53$ 基因突变率虽较 $k-ras$ 基因

之降低, 但特异性较强, 是诊断胰腺癌有价值的分子生物学指标.

3 端粒酶活性检测

自1994年Kim建立TRAP方法检测端粒酶活性以来, 对端粒酶在细胞增殖及恶性病变中的重要作用有了更深入的研究, 发现恶性肿瘤组织中端粒酶活性存在高表达. Uehara *et al*^[12]在ERP下收集胰腺癌($n=10$), 慢性胰腺炎($n=3$)和胰腺正常对照个体($n=3$)的胰液, 并对胰液中端粒酶活性(TRAP法, 以端粒酶活性 >5.0 为临界值)进行检测, 发现端粒酶活性对胰腺癌诊断的敏感性为80%, 特异性为100%, 阳性预测值为100%, 阴性预测值为75%. Seki *et al*^[13]报道, 胰腺癌、慢性胰腺炎及正常对照个体胰液中端粒酶催化亚单位(hTERT)mRNA表达存在显著差异, 分别为88%($n=17$), 17%($n=12$)和0%($n=7$). 认为胰液hTERT mRNA表达是胰腺癌和慢性胰腺炎鉴别的重要指标. Sawabu *et al*^[10]报道, 胰腺癌与慢性胰腺炎患者胰液中端粒酶活性阳性率分别为 $>80\%$ 和 $<20\%$, 与上述结果相似. Mizumoto *et al*^[14]报道, 胰腺癌、慢性胰腺炎及胰腺腺瘤患者胰液中端粒酶活性阳性率分别为83.3%($n=24$), 0%($n=23$)和4.3%($n=23$). Ohuchida *et al*^[15]的研究结果显示, 胰液中hTERT mRNA定量测定对区分胰腺癌和导管内乳头状黏液瘤(IPMN)更有价值, 当hTERT mRNA特异性设为100%, 两者的区分敏感性为43.55%, 较肿瘤细胞学区分的敏感性(22%)显著提高. Ohuchida *et al*^[16]认为, 通常用于测定端粒酶活性的TRAP法并不适合临床应用, 因为存在操作复杂、测定时间长、受检测标本中存在PCR反应抑制物的影响等, 而杂交保护测定与TRAP联合(TRAP/HPA)应用, 可使敏感性提高1000倍.

总之, 胰液端粒酶活性对胰腺癌有较高的敏感性和特异性, 是诊断胰腺癌重要的分子指标. 但应注意的是, 许多胰腺癌患者胰液中因癌细胞数目较少而使端粒酶活性较低. 当应用TRAP法使检测敏感性增高后, 来自淋巴细胞的端粒酶也能被检测出来, 从而使检测的特异性降低^[14].

4 分子生物学标记联合检测

为克服单项分子生物学指标检测存在敏感性、特异性上的不足, 大多数学者对上述指标采用联合检测的方法. Yamaguchi *et al*^[9]报道, 单独检测胰液中 $p53$ 基因诊断的敏感性较低, 如联合检

■ 研发前沿

胰腺癌的基因诊断是当今研究的热点. 所选研究材料中血清所含成分复杂, 特异性较差, 检查组织学而存在创伤性, 取材较为困难. 因此对胰液进行分子生物学检测, 有可能克服上述不足, 提高胰腺癌的早期诊断率.

■创新盘点

国内外文献对胰液进行分子生物学研究报道,内容相对单一,即仅对某一基因进行检测。本文对胰液中癌基因、抑癌基因、端粒酶、蛋白质组学的研究进行综述比较,在小结中提出自己的观点,对从事这方面的研究者具有一定的指导作用。

测 $k-ras$ 基因则敏感性可提高到92%,特异性为100%。Yan *et al*^[17]对146例患者胰液标本进行基因联合检测,胰腺癌($n = 57$)、慢性胰腺炎($n = 67$)和胆管结石(正常对照)患者($n = 61$) $k-ras$ 基因突变率分别为54%, 34%和21%, $p53$ 基因突变率分别为42%(20/48), 4%(2/49)和0%(0/49);高水平($>12\%$) $p16$ 基因启动子甲基化检出率分别为62%(26/42), 8%(2/26)和13%(3/24); $p53$ 基因突变或高水平 $p16$ 基因启动子甲基化在胰腺癌、慢性胰腺炎与胆管结石阳性率分别为80%(29/36), 13%(3/22)和13%(3/24)。认为联合检测可提高胰腺癌与上述良性疾病的鉴别。Wang *et al*^[18]对胰液上清与沉淀部分同时行 $k-ras$ 与 $p53$ 基因突变检测,胰腺癌患者胰液上清 $p53$ 基因与 $k-ras$ 基因突变率分别为42.9%(9/21)和81%(17/21),胰液沉淀部分突变率分别为28.6%和71.4%; 25例慢性胰腺炎患者胰液上清与沉淀部分均未检出 $p53$ 基因突变,而 $k-ras$ 基因突变率分别为28%和20%;胰液上清与沉淀部分联合检测,胰腺癌患者 $p53$ 基因突变率上升到52.4%(11/21),且细胞学阴性的胰腺癌患者46%(7/15)被检测到。Myung *et al*^[19]联合检测31例胰液 $k-ras$ 基因突变率与端粒酶活性,胰腺癌患者($n = 12$) $k-ras$ 基因突变率为75%,慢性胰腺炎($n = 11$)为27%,正常对照组($n = 8$)未发现突变;胰腺癌患者端粒酶阳性率为92%,慢性胰腺炎为18%。两项指标同时检测,特异性为100%。朱萱 *et al*^[20]对58例胰腺癌高危患者内镜抽取的纯胰液行细胞学、 $k-ras$ 基因点突变及端粒酶活性联合检测,5例胰液中发现可疑恶性细胞(8.62%),点突变阳性率为37.9%,端粒酶活性弱阳性13.8%,3例均阳性6.89%。 $k-ras$ 基因点突变及端粒酶活性两者阳性12.06%。Tada *et al*^[21]对经ERCP获取的胰液进行 $k-ras$ 基因突变检测,并与EUS-FNA获取组织检测结果进行比较,发现胰液 $k-ras$ 基因突变率为63%(12/19),EUS-FNA获取组织突变率为77%(20/26)。EUS-FNA细胞学诊断阳性率为62%(16/26),若与FNA穿刺物 $k-ras$ 基因突变联合检测,诊断的阳性率为81%(21/26);上述两项指标再与胰液 $k-ras$ 基因突变联合检测,诊断的阳性率增加到88%(23/26)。Futakawa *et al*^[22]联合检测胰腺癌患者胰液 $k-ras$ 基因点突变、胰液CA19-9与CEA水平,发现胰液 $k-ras$ 基因点突变率较胰腺良性病显著增加($P = 0.0448$), $k-ras$ 基因点突变对诊断的阳性预测值为83%;多变量分析显示,胰液 $k-ras$ 基因点突变、胰液CA19-9与CEA水平是诊断胰腺癌的

独立指标,3者联合检测诊断的准确性达90%。刘晓川 *et al*^[23]对32例临床与手术证实的胰腺癌患者ERCP胰液收集标本行PCR-SSCP分析,发现 $k-ras$ 12密码子点突变率为56.3%,且与肿瘤的大小相关($P < 0.05$); $k-ras$ 12密码子点突变阳性与阴性表达病例3 a复发率分别为66.7%和33.3%。高血清CA19-9水平且 $k-ras$ 12密码子点突变阳性病例3 a复发率为69.2%,低血清CA19-9水平且 $k-ras$ 12密码子点突变阳性病例3 a复发率为20%($P < 0.05$)。认为联合检测 $k-ras$ 12密码子点突变及血清CA19-9水平可作为胰腺癌术后复发的有效指标。

5 蛋白质组学研究

应用蛋白质组学分析胰液中的蛋白成分和检测生物学标记为胰腺癌的早期诊断提供了有用的手段。Rosty *et al*^[24]用蛋白质芯片和SELDI-MS技术对胰腺癌($n = 15$)和胰腺良性病患者($n = 7$)的胰液进行了比较,发现67%胰腺癌患者胰液样品中有分子质量为16 570 Da的蛋白表达,而只有1例其他胰腺疾病患者出现此种蛋白表达。蛋白质芯片免疫测定确定这种蛋白为HIP/PAP-1(hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated-protein 1)。进一步定量ELISA检测胰腺癌患者($n = 53$)和胰腺良性病患者($n = 45$)胰液中HIP/PAP-1水平,发现胰腺癌患者胰液中HIP/PAP-1较胰腺良性病患者显著增高,其敏感性和特异性分别为75%和87%,认为胰液中的HIP/PAP-1可作为胰腺癌诊断的标志物。Gronborg *et al*^[25]应用液相色谱和串联色谱(LC-MS/MS)分析胰腺癌患者的胰液蛋白质变化,共分离出170种蛋白质,其中包括已知的胰腺癌肿瘤标记物(如CEA, MUC1)。同时,他们对胰腺癌患者胰液中突出高表达的HIP/PAP和lipocalin 2以及先前未见报道的肿瘤排斥抗原pg96和azurocidin等蛋白也进行了详细研究,并鉴定出一种与HIP/PAP有85%同源性的新蛋白质,命名为PAP-2。作者认为上述在胰液中被确定的蛋白质可作为胰腺癌早期诊断的新蛋白标记物。

总之,胰液的分子生物学检测为胰腺癌的早期诊断提供了新的途径。单一的分子生物学检测存在敏感性和特异性的不足,联合检测(如胰液上清和沉淀部分同时检测; $k-ras$ 基因, $p53$ 基因突变,端粒酶活性联合检测)可提高诊断的敏感性和特异性。胰液蛋白质组学的研究使胰腺癌的早期诊断出现了希望,将有助于发现胰腺癌新的特异性标记物。

■应用要点

本文指出对胰液单一的分子生物学检测存在敏感性和特异性不足,联合检测可提高诊断的敏感性和特异性,特别是胰液蛋白质组学的研究将有助于发现胰腺癌新的特异性标记物。

6 参考文献

- 1 Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689
- 2 Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2472-2474
- 3 Ha A, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Wang Y, Motoo Y, Okai T, Wakabayashi T, Sawabu N. Usefulness of supernatant of pancreatic juice for genetic analysis of K-ras in diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* 2001; 23: 356-363
- 4 Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cusso X, Capella G, Lluís F, Farre A. Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1153-1159
- 5 Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Mantion C, Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 700-704
- 6 Lu X, Xu T, Qian J, Wen X, Wu D. Detecting K-ras and p53 gene mutation from stool and pancreatic juice for diagnosis of early pancreatic cancer. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 1632-1636
- 7 Furuya N, Kawa S, Akamatsu T, Furihata K. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology* 1997; 113: 593-598
- 8 Teich N, Mossner J. Molecular analysis of pancreatic juice: a helpful tool to differentiate benign and malignant pancreatic tumors? *Dig Dis* 2004; 22: 235-238
- 9 Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1147-1153
- 10 Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas* 2004; 28: 263-267
- 11 Lohr M, Muller P, Mora J, Brinkmann B, Ostwald C, Farre A, Lluís F, Adam U, Stubbe J, Plath F, Nizze H, Hopt UT, Barten M, Capella G, Liebe S. p53 and K-ras mutations in pancreatic juice samples from patients with chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 734-743
- 12 Uehara H, Nakaizumi A, Tatsuta M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Iishi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Okada S, Kakizoe T. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2513-2518
- 13 Seki K, Suda T, Aoyagi Y, Sugawara S, Natsui M, Motoyama H, Shirai Y, Sekine T, Kawai H, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M, Asakura H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in pancreatic juice with sample qualification. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1976-1981
- 14 Mizumoto K, Tanaka M. Genetic diagnosis of pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 39-44
- 15 Ohuchida K, Mizumoto K, Yamada D, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Quantitative analysis of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2066-2069
- 16 Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Sato N, Nagai E, Yamaguchi K, Takaishi H, Ide T, Tanaka M. A highly sensitive and quantitative telomerase activity assay with pancreatic juice is useful for diagnosis of pancreatic carcinoma without problems due to polymerase chain reaction inhibitors: analysis of 100 samples of pancreatic juice from consecutive patients. *Cancer* 2004; 101: 2309-2317
- 17 Yan L, McFaul C, Howes N, Leslie J, Lancaster G, Wong T, Threadgold J, Evans J, Gilmore I, Smart H, Lombard M, Neoptolemos J, Greenhalf W. Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups. *Gastroenterology* 2005; 128: 2124-2130
- 18 Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, Ohtsubo K, Motoo Y, Sawabu N. Detection of p53 gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from patients with pancreatic carcinomas. *Pancreas* 2004; 28: 13-19
- 19 Myung SJ, Kim MH, Kim YS, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Wan Seo D, Lee SK, Min YI, Kim JY. Telomerase activity in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer may be complementary to K-ras mutation. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 708-713
- 20 朱萱, 李弼民, 陈兴玲, 张昆和, 陈江, 张小茜. 胰液细胞学及肿瘤相关标志物联合检测在胰腺癌诊断中的价值. *江西医药* 2006; 41: 343-345
- 21 Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, Shiratori Y, Omata M. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263-2270
- 22 Futakawa N, Kimura W, Yamagata S, Zhao B, Ilsoo H, Inoue T, Sata N, Kawaguchi Y, Kubota Y, Muto T. Significance of K-ras mutation and CEA level in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 63-71
- 23 刘晓川, 孟垂华, 刘铁夫, 梁桃. 胰液K-ras密码子点突变联合血清CA19-9水平的胰腺癌复发关系的研究. *临床消化病杂志* 2006; 18: 95-97
- 24 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemo KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
- 25 Gronborg M, Bunkenborg J, Kristiansen TZ, Jensen ON, Yeo CJ, Hruban RH, Maitra A, Goggins MG, Pandey A. Comprehensive proteomic analysis of human pancreatic juice. *J Proteome Res* 2004; 3: 1042-1055

■同行评价

本文总结了近年来胰液中的分子标记物检测和诊断胰腺癌的研究进展, 内容丰富, 结构严谨, 层次分明, 有较好的临床指导作用。

编辑 程剑侠 电编 何基才

Ether à go-go钾通道与恶性肿瘤

丁祥武, 罗和生

■背景资料

细胞膜离子通道是跨膜蛋白, 作用广泛, 包括参与电信号、肌肉收缩、激素分泌、免疫调节、细胞周期和代谢等过程。也与许多病理过程有关, 可以是原发病因(离子通道病), 也可以在疾病的发生过程中起调节作用。

丁祥武, 襄樊市中心医院消化科 湖北省襄樊市 441021
罗和生, 武汉大学人民医院消化科 湖北省武汉市 430060
罗和生, 教授, 博士生导师, 主要从事消化系统疾病基础与临床研究。

湖北省卫生厅科研基金指导性资助项目, No. JX3C44

通讯作者: 丁祥武, 441021, 湖北省襄樊市, 襄樊市中心医院消化科. xwding@hotmail.com

电话: 0710-3524360

收稿日期: 2007-07-20 修回日期: 2007-09-02

Ether à go-go potassium channel and malignant tumors

Xiang-Wu Ding, He-Sheng Luo

Xiang-Wu Ding, Department of Gastroenterology, Xiangfan Central Hospital, Xiangfan 441021, Hubei Province, China
He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Department of Health of Hubei Province, No. JX3C44

Correspondence to: Xiang-Wu Ding, Department of Gastroenterology, Xiangfan Central Hospital, Xiangfan 441021, China. xwding@hotmail.com

Received: 2007-07-20 Revised: 2007-09-02

Abstract

Recently, increasing evidence from cell biology and pharmacology demonstrates that cancer cells exhibit ion channel expression patterns, ion conductances and electric properties that are very different from those of resting cells. These peculiar properties are functionally involved in cancer pathogenesis. In particular, because of its oncogenic properties, distribution, modulation and pharmacology, human ether à go-go potassium channel (Eag1, K_v10.1, KCNH1) is considered a critical ion channel-encoding gene involved in the establishment and maintenance of neoplastic growth. This review summarizes most of the findings regarding Eag1 channels and malignant tumors, focusing on cellular mechanisms, mRNA and protein expression in tissues, oncogenic properties, modulation and pharmacology.

Key Words: Ether à go-go potassium channels; Malignant tumor; Cell cycle; Targeted therapy

Ding XW, Luo HS. Ether à go-go potassium channel and

malignant tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2772-2779

摘要

离子通道与恶性肿瘤的研究相关性日益受到重视, 其中以钾通道的研究最为深入. Ether à go-go钾通道(Eag1)由于在体内局限性分布、具有癌基因的特性以及在多种临床肿瘤组织中高频率表达的特点, 已经成为前景乐观的恶性肿瘤诊治的靶点. 本文综述Eag1钾通道与细胞周期和增殖的关系、致癌性及其致癌机制、在恶性肿瘤中的表达及其意义、分子成像技术检测活体内Eag1以及Eag1作为治疗靶点的实验研究进展.

关键词: Eag1钾通道; 恶性肿瘤; 细胞周期; 靶向治疗

丁祥武, 罗和生. Ether à go-go钾通道与恶性肿瘤. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2772-2779

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2772.asp>

0 引言

10 a前Wonderlin的一篇优秀综述总结了钾通道在细胞增殖和细胞周期G1期前进中的作用^[1], 激发了离子通道与肿瘤关系研究的极大兴趣. 近年发表了约20篇精辟的综述, 总结了该研究领域的最新进展^[2-19]. Debes *et al*的一项前瞻性研究也证实了长期服用钙通道阻断剂能降低发生前列腺癌的风险^[20]. 这些成果已经引起了广泛兴趣, 对该领域的基础和临床前研究正在逐步深入.

离子通道与肿瘤的相关性研究中, 以钾通道的研究最为深入. 其中ether à go-go钾通道(Eag1, K_v10.1, KCNH1)由于在体内局限性分布、具有癌基因的特性以及在多种临床肿瘤组织中高频率表达的特点, 已经成为前景乐观的恶性肿瘤诊治的靶点. Camacho总结了2004年及此前Eag1和HERG钾通道与癌相关性的研究进展, 如与细胞周期的关系, 在肿瘤中的表达、致癌性及机制和药物干预的影响等^[7]. 本文将略述该综述的部分内容, 并着重介绍近3 a Eag1钾通道与恶性肿瘤的最新进展.

表 1 Ether-à-go-go钾通道(Eag1)简介

IUPHAR命名法	K _v 10.1
人类基因命名法	KCNH1
其他名称	ether-à-go-go, EAG1a, EAG1b, KCNH1a, KCNH1b ^[22-23,25,28,61]
特点	电压门控钾通道, 延迟整流
分子信息	人类: 989aa, NM_172362, chr.:1q32-41, KCNH1, Gene ID: 3756 ^[61] 小鼠: 989aa, NM_010600, chr. 1 大鼠: 962aa, NM_031742, chr. 13q27
相关亚单位	Hyperkinetic (HK) ^[62] , CaM ^[45-46] , Slob ^[63] , epsin ^[47] , KCR1 (K channel regulator) ^[64]
功能分析	电压门控
电流	延迟整流
电导	未确定
离子选择	K ⁺ 和Ca ²⁺ ^[24] , 对Cs ⁺ 不确定
活化特点	细胞外Mg ²⁺ , Ca ²⁺ 和其他二价阳离子可以剂量和电压依赖方式减慢其活化 ^[27,65] , 细胞外低pH也减慢其活化; 其作用也可不依赖离子流动, 在Eag1的电位感受器出现构象改变时, 难以用电流方式检测, 这种转变可能是Eag1在有或无细胞外Mg ²⁺ 时出现激活的原因 ^[39] .
失活特点	未确定
活化调节	超极化减慢活化的动力学, 去极化加速活化的动力学 ^[25]
阻断剂	奎尼定(1.4 μM) ^[26] ; Ca ²⁺ /CaM(480 nM) ^[45, 65]
正常分布	脑(扁桃腺、尾核、大脑皮质、小脑、壳核、海马、额叶、枕叶、颞叶、丘脑下核; 在黑质、丘脑和延髓髓质中无表达)、成肌细胞、骨骼肌、黑色素瘤细胞、大鼠螺旋韧带、间充质干细胞 ^[33,50,66-69] , 在外周局限分布 ^[28-30,70]
生理作用	Eag1编码非失活延迟整流钾通道K _{Na} , 在人成肌细胞分化启动前活化 ^[28] , r-Eag1可能参与调节神经元谷氨酸突触的突触后信号 ^[33]
病理学	调节肿瘤细胞的周期进展和/或细胞增殖 ^[29,37] ; 与多数临床肿瘤相关 ^[30,51-55]
药理意义	可被用作靶向治疗 ^[29,41,51,58-60,71-72]
其他	该通道有GFG(不是常见的GYG)钾通道标记序列、PAS区域(位于胞浆N-末端远侧)、cNBD区域(位于C-末端近侧)、C-末端装配区域、CaM结合区域和C-末端bNLS区域各一个, 通道装配需要C-末端区域 ^[73] 和正确完整的糖基化过程 ^[31] ; K _v 10.1和K _v 10.2的C末端TCC区决定多聚体形成的特异性, K _v 10.1/K _v 10.2可组成异源性多聚体, K _v 10.x/K _v 11.1不能组合 ^[74] ; 该C-末端TCC区域在多数其他通道中可检测, TCC突变与遗传性通道病有关联; 随细胞周期进展, 电导出现相应的变化 ^[36] ; 丙咪嗪和阿司咪唑以及多菲莱德(dofetilide)hEag1对阻断的机制不同, 他们有各自相应的结合位点 ^[72]

aa, amino acids氨基酸; chr, chromosome染色体; CaM, calmodulin钙调蛋白; TCC, tetramerizing coiled-coiled缠绕的四聚体。

1 Eag1钾通道简介

2005年国际药理学联合会对Eag1钾通道作了简要的介绍(表1, 稍修改和补充)^[21]。

Eag1是在对乙醚麻醉时出现腿震颤的黑腹果蝇作突变检测时发现的一个独立基因位点, 表现为缓慢节律性的腿震颤行为, 随后被命名为ether à go-go^[22-23]。进一步研究表明Eag1基因编码与细胞兴奋有关的蛋白电压门控钾通道, 对K⁺和Ca²⁺有通透性^[24]。Eag1钾通道具有特定的电压依赖性和药理学特点, 该电流激活缓慢, 明显依赖前脉冲电位激活, 不表现失活^[25]; Cole-Moore转换接近10 ms级, 比非Eag1家族慢; Eag1的Cole-Moore转换比Eag2陡峭^[26]; 生理范围内提高细胞外镁离子浓度可增强Eag1通道的Cole-

■ 相关报道

近10 a来的研究发现, 钾、钠、氯、钙等离子通道与细胞增殖和/或癌的密切相关是维持癌细胞内环境稳定的重要因素, 其中某些特定的离子通道可调控肿瘤细胞的膜电压和Ca²⁺信号, 调节胞质内离子浓度、pH和细胞体积, 与一些信号转导途径之间有复杂的相互作用, 参与肿瘤细胞的增殖和/或凋亡。其中以钾离子通道与肿瘤的相关性研究最深入。

Moore转换^[27]。根据这些特点(Eag1电生理指纹)可以测定Eag1电流。

Eag1在脑中表达丰富, 但在外周正常组织的表达非常局限。研究发现即将融合前的成肌细胞和胎盘可检测到Eag1表达^[28-29]。Hemmerlein *et al*^[30]联合实时定量逆转录PCR和免疫组化检测外周正常组织中Eag1的表达情况, 发现两种方法的检测结果相符。在胃肠道, 仅胃腺主细胞和胰腺腺泡呈阳性表达; 男性生殖系统, 仅精原细胞阳性表达; 女性生殖系统, 子宫颈内膜和子宫内膜上皮细胞呈中度阳性表达, 尤其在有分泌活性的内膜腺体; 正常乳腺组织的导管小叶单位有不同程度的染色, 而导管上皮无染色(但这些正常的乳腺组织来源于乳腺肿瘤或纤维

■创新盘点

目前,有些学者倾向于将恶性肿瘤划归到“离子通道病”的范畴。离子通道将成为恶性肿瘤非常有价值的诊治靶点。

囊性增生者术后病灶的临近正常标本,而不是正常乳腺的活检标本);骨髓、脾、淋巴结、胸腺、扁桃体均阴性表达;反应性淋巴结淋巴滤泡的生发中心可检测到阳性表达;肥大细胞和组织巨噬细胞中常呈强阳性表达(可作为染色的内参照);在内分泌系统,垂体前叶和肾上腺的皮质和髓质呈弱阳性表达^[30]。这些阳性表达的细胞都是各系细胞的末期分化细胞,基本上失去了增殖的能力。

Eag1的装配需要正确完整的糖基化过程,以正确的运送到质膜,并且这种糖基化过程对已插入质膜的Eag1钾通道发挥正常的功能也非常重要^[31]。与其他多数钾通道类似,Eag1亚单位装配成四聚体时形成功能性通道;每个亚单位有6个跨膜区域,含电位感受器(富含带正电的氨基酸序列),其细胞内C-末端有一个PAS(Per-Arnt-Sim)区域,N-末端有一个环状核苷酸结合区域。PAS区域被认为是氧感受器,Eag1通道可通过缺氧或者缺氧相关的蛋白调控^[32]。

Eag1在外周正常细胞中的功能可能与人成肌细胞分化相关^[28]。尽管Eag1在脑大量表达,但关于他在神经系统中的功能的文献很少。Jeng *et al*^[33]发现Eag1和Eag2参与调节树状突细胞和体细胞的兴奋性过程,而Eag1可能还参与调节神经元谷氨酸突触的突触后信号。

2 Eag1钾通道的活性及其与细胞周期和增殖的关系

最初证实大鼠Eag1(r-Eag1)的激活依赖于钳制电位,超极化可减慢其激活动力学,而去极化加快其激活动力学^[25]。果蝇Eag1钾通道对K⁺和Ca²⁺有通透性,并依赖于膜电压和环腺苷酸调控。这种介导钾外流和钙内流的电流对于调节中枢和外周神经系统的突触传递非常重要^[24]。另外,大鼠Eag1的活化强烈依赖于细胞膜静息电位和细胞外Mg²⁺浓度,从而可精确调节神经细胞钾通道功能;降低细胞外pH,也可减慢其激活^[27]。

细胞周期是各类细胞进行有丝分裂的关键过程。Arcangeli *et al*^[34]首先在成神经细胞瘤细胞系发现细胞周期依赖性的内向整流钾通道,并证实为Eag1通道。随后,Bruggemann *et al*^[35]发现有丝分裂促进因子(mitosis-promoting factor, MPF)也抑制Eag1通道的活性,进一步证实Eag1通道具有细胞周期敏感性。他们继续深入研究发现了细胞周期M期Eag1电流的3个特点:电流密度减少、对细胞内钠离子阻断作用的敏感性增加和

对钾离子的选择性增加^[36]。而Camacho *et al*^[37]发现Eag1钾通道与细胞骨架成分有复杂的相互作用,细胞周期G2/M转换时,细胞骨架的重排具有调节Eag1钾通道电流的作用。

Meyer *et al*^[38]证实人成神经细胞瘤细胞以细胞周期依赖的方式表达Eag1钾通道,并依赖于细胞外Mg²⁺浓度,细胞内Ca²⁺对其有阻断作用。Bannister *et al*^[39]研究表明,Eag1的电位感受器出现构象改变时,难以用电流方式检测,这种转变可能是Eag1在有或无细胞外Mg²⁺时出现激活的原因。Hegle *et al*^[40]发现Eag1钾通道也可依赖电位感受器的构象变化调节细胞内信号转导(不依赖电流的变化)而引起细胞增殖,证实Eag1钾通道除通过电流变化方式引起细胞增殖外,其增殖作用还可能与非电流变化的MAP激酶信号途径有关。

3 Eag1的致癌性及其致癌机制

Pardo *et al*^[29]在1999年发表的一项研究成果,是Eag1与癌相关性研究的里程碑。他们将Eag1转染乳腺癌的几种细胞株,证实其过表达促进细胞增殖,抑制其表达则减少增殖。Eag1转染的细胞可以在无血清的培养基中生长,在琼脂培养基的生长缺乏接触抑制,注入裸鼠能促进肿瘤生长,从而证实他是致癌因子。Ouidid-Ahidouch *et al*^[41]的研究也表明Eag1钾通道对乳腺癌细胞的增殖和细胞周期进展非常重要。

新近Ousingsawat *et al*^[42]用化学致癌剂建立小鼠结肠癌变模型,发现电压门控通道(包括K_v1.3、K_v1.5、K_v3.1和Eag1等)mRNA和蛋白在癌变过程中的表达增多,其中以Eag1的增多最为明显。这项动物实验进一步验证了Eag1在癌变过程中的作用。鉴于Eag1钾通道具有原癌基因的特点,其致癌机制的研究也在逐步深入。

缺氧在肿瘤进展中起重要作用,Eag1通道可通过缺氧来调节癌细胞的适应性。Murata *et al*^[43]发现人神经母细胞瘤表达肿瘤抑制基因VHL(von Hippel-Lindau)时Eag1介导的电流完全关闭,抑制VHL表达时可激活Eag1通道。而缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)在VHL蛋白缺失的肿瘤形成过程起关键作用,VHL蛋白缺失时,HIF可稳定的诱导其靶基因表达,调节血管形成、细胞增殖和成活^[44]。

Schönherr *et al*^[45]在爪蟾卵细胞克隆人Eag1基因,发现细胞内Ca²⁺可抑制Eag1电流,这是通过Ca²⁺依赖的钙调蛋白CaM与Eag1的C-末端结

合来实现的. Ziechner *et al*^[46]的研究也证实Ca²⁺/CaM可与Eag1钾通道的胞质内N-末端和C-末端结合, 从而抑制其活性.

Piros *et al*^[47]认为epsin蛋白可与Eag1通道结合并调节其电压门控特性. Epsins是质膜细胞内吞作用过程执行内化步骤的功能蛋白, epsin与Eag1结合, 提示细胞功能与Eag1通道有密切关系, 值得深入研究.

Borowiec *et al*^[48]也证实胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-1)可通过Akt依赖信号途径激活乳腺癌细胞Eag1钾通道. 他们发现: (1)IGF-1可在短时间内增加MCF-7细胞钾电流的密度并激发细胞超极化; (2)IGF-1以剂量依赖的方式增加Eag1 mRNA的表达, 其增加的水平与促进细胞增殖的作用同步; (3)IGF-1诱导的MCF-7细胞增殖作用能被Eag1抑制剂, 如阿司咪唑或奎尼定, 以及特异性很高的Eag1-siRNA抑制; (4)IGF-1短时间的作用能迅速刺激MCF-7细胞Akt磷酸化; (5)Wortmannin能阻断IGF-1对钾电流的作用, 而且Wortmannin抑制Akt磷酸化或特异性抑制Akt激酶的活性, 能降低Eag1 mRNA水平. 这项研究证实IGF-1可通过Akt依赖途径上调Eag1通道的表达和活性, 促进细胞增殖.

Eag1电流受到细胞周期和细胞骨架相互作用的调节^[37]. 基于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和细胞骨架和癌进展中的作用, Toral *et al*^[49]对野生型和外源性表达Eag1钾通道的CHO细胞进行研究, 发现ECM成分是Eag1阳性表达细胞的重要调节因素. 由此推测, Eag1可能与EMC相互作用, 促进癌细胞的浸润和转移.

4 Eag1在恶性肿瘤中的表达及其意义

Pardo *et al*^[29]率先用RT-PCR检测发现Eag1在实体癌细胞系, 如宫颈癌HeLa细胞、神经母细胞瘤SHSY-5Y细胞、乳腺癌MCF-7和EFM-19细胞中呈阳性表达, 但是乳腺癌COLO-824细胞和乳腺导管癌BT-747细胞的Eag1表达非常微弱. Meyer *et al*^[38,50]发现黑色素瘤细胞IGR1和IPC298细胞以及神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞中Eag1呈阳性表达. Mello *et al*^[51]证实横纹肌肉瘤TE-671和A-204细胞、纤维肉瘤HT-1080和Hs 633t细胞呈阳性表达. 我们也发现结肠癌LoVo和HT-29细胞^[52], 以及胃癌SGC-7901和BGC-823细胞Eag1呈阳性表达^[53].

关于Eag1在临床癌症中的表达, Farias *et al*^[54]率先对宫颈癌进行了研究. 他们检测

取自人子宫颈的新鲜标本: 5例癌活检标本的原代培养细胞、1例癌新鲜组织、12例对照正常组织活检标本(巴氏涂片阴性). 通过逆转录PCR和Southern印迹实验, 发现6例癌标本全部阳性表达, 正常对照活检标本33%呈阳性表达. 免疫组化显示原代培养呈阳性者, 其宫颈活检标本也呈阳性表达. 在原代培养细胞中可检测出Eag1介导的电流, 该电流受Mg²⁺调节, 呈现明显的Cole-Moore转换. 他们还观察到1例巴氏涂片阴性的Eag1阳性表达患者, 术前无宫颈癌的证据, 术后活检证实为癌. 另外, Eag1呈阳性表达者中, 1例证实人乳头状瘤病毒感染, 其他均为不典型性腺瘤增生(癌前状态). 因此Eag1阳性表达可能是肿瘤发展的早期表现, 并且可作为其诊断标志. Patt *et al*^[55]也检测到Eag1 mRNA在神经胶质瘤中呈阳性表达, 并与其恶性程度有关.

随后Mello *et al*^[51]用免疫组化检测210例软组织肉瘤Eag1的表达. 所有肿瘤的阳性率为71%, 其中各种组织类型的阳性率分别为: 脂肪肉瘤56%(18/32)、纤维肉瘤67%(8/12)、平滑肌肉瘤73%(19/26)、滑膜肉瘤75%(9/12)、恶性纤维组织细胞瘤81%(18/22)、横纹肌肉瘤82%(14/17). Eag1蛋白表达水平与组织类型有关, 但与性别、年龄、肿瘤分级或大小无相关性. 他们同时开始进行前瞻性研究, 分析Eag1钾通道对预后判断的价值. 在短暂的2 a随访期间, 共有19例患者死亡, 其中17例Eag1呈强阳性表达. 在32例脂肪肉瘤病例(18例阳性表达, 其中13例强阳性、5例弱阳性)中, 6例(19%)在2 a内死亡, 其中的5例Eag1阳性表达; 死亡率占强阳性表达患者的38%(5/13), 而93%(13/14)阴性表达者在2 a随访期内存活. 他们还发现Eag1阳性表达者的复发率(13%)明显高于阴性表达者(6%). 因此, Eag1钾通道的阳性表达可能是有价值的预后判断因素. 鉴于随访时间短, 随访的样本数少, 有必要继续进行长时间的随访研究.

Hemmerlein *et al*^[30]用免疫组化检测了多种正常组织和临床肿瘤Eag1钾通道的表达(表2). 所用的一抗分别为Eag1全抗体(Whole antibody)和重组的单链抗体(Recombinant PhoA scFv). 应用重组的单链抗体是为了避免非特异性染色. 两种抗体对正常组织染色的结果相似; 对于肿瘤标本, 重组单链抗体染色的阳性率稍低. 对相应标本作实时定量逆转录PCR检测的结果类似.

我们也检测了Eag1在大肠癌的表达: Eag1

■应用要点

Pardo和Stuhmer研究小组所在的研究所(Max-Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany)率先开展Eag1钾通道与癌相关的研究, 证实了Eag1钾通道是癌基因, 并且是恶性肿瘤有效的诊治靶点. 他们开创和深入了Eag1钾通道与恶性肿瘤相关性的研究, 为Eag1将来的临床应用提出了重要的理论基础和证据.

■同行评价

本文详细综述了Eag1钾通道与恶性肿瘤的关系和意义,立题新颖,内容丰富,层次清晰,对临床和基础研究都有较强的指导意义和参考价值。

蛋白阳性表达率为76.3%(58/76), mRNA为77%(10/13);对应正常组织均阴性表达。免疫组化检测9例腺瘤性息肉,1例染色阳性。Eag1蛋白表达半定量表达水平与性别、年龄、发病部位、分化程度等无相关性,而与肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移和Dukes'分期有关。因此Eag1不仅与肿瘤的浸润和转移关系密切,而且可能与肿瘤发生的早期事件有关^[52]。我们对胃癌的检测结果也与此相似^[53]。同样, Ousingsawat *et al*^[42]近期也证实了Eag1在结肠癌中的表达。

5 分子成像技术检测活体内Eag1

近期近红外线荧光成像技术(near-infrared fluorescent, NIF)的进展,联合应用特异性抗体,已能对小动物体内进行分子成像^[56-57]。该方法所用的抗体需用红外线发射性染料如AlexaFluor 680或Cy5.5来标记,对肿瘤动物模型的研究更为便利,既可反复观察肿瘤在体内的生长和转移,又可观察靶向治疗对肿瘤的效果,而不会伤害活体的模型动物。

Pardo *et al*^[12,17]应用该方法作了相关研究。他们用AlexaFluor 680标记特异性单克隆Eag1抗体,将该标记的抗体100 μ g注射入接种乳腺癌MBA-MB-413S细胞(Eag1阳性表达)、并在形成肿瘤的裸鼠肿瘤模型体内,24 h后检查发现原发性肿瘤和哨兵淋巴结清晰的成像,证实标记的抗体能与肿瘤细胞表面的Eag1表位结合。

6 Eag1作为治疗靶点

Ouadid-Ahidouch *et al*^[41]对MCF-7的研究证实Eag1钾通道在调控细胞增殖和/或细胞周期进程中起重要作用。他们发现经典的钾通道阻断剂四乙胺可完全抑制MCF-7细胞去极化期的外向整流电流,同时抑制细胞增殖。与细胞周期G1期进展的细胞比较, G0/G1期停滞的细胞呈去极化表现,其IK电流密度小;这种IK电流对Mg²⁺、阿司咪唑和四乙胺很敏感;Eag1 mRNA在细胞周期过程中也有相应的变化。

Gavrilova-Ruch *et al*^[58]对人恶性黑色素瘤的模型细胞IGR1中离子通道对细胞增殖的影响进行了研究,发现丙咪唑可减少细胞DNA的代谢和合成, Eag1钾通道对丙咪唑最敏感; Eag1对黑色素瘤细胞的增殖最重要,而钾钙通道和氯通道对其增殖几乎不发挥作用。我们应用丙咪唑干预胃癌细胞SGC-7901和BGC-823,发现这两种细胞的增殖受到抑制^[53]。

表 2 免疫组化检测Eag1在恶性肿瘤中的表达

肿瘤类型	全抗体		重组的单链抗体	
	<i>n</i>	阳性 <i>n</i>	<i>n</i>	阳性 <i>n</i>
食管癌	8	8	12	8
胃癌	10	9	14	6
结肠癌	8	6	40	31
肝癌	10	10	8	5
胰腺癌	8	6	1	1
肾细胞癌	9	9	9	6
移行细胞癌	9	8	6	4
前列腺癌	56	55	1	1
宫颈癌	9	7	—	—
子宫内膜癌	10	10	—	—
卵巢囊腺癌	10	10	—	—
乳腺癌	230	195	116	95
支气管癌	10	9	73	41
甲状腺乳头状癌	9	9	3	2
基底细胞癌、脊细胞癌	10	1	—	—
恶性黑色素瘤	59	22	1	1
总计	470	378 (80%)	286	202 (71%)

这些药物的特异性较差,有必要开发特异性抑制剂来研究Eag1钾通道对细胞增殖的作用。Pardo *et al*^[29]用反义寡脱氧核糖核苷酸(ODN)技术抑制Eag1钾通道,发现SH-SY5Y细胞的Eag1电流密度明显下降,细胞增殖受到显著的抑制。他们应用基因沉默技术对多个肿瘤细胞进行研究,发现Eag1 siRNA能在mRNA、蛋白和电流水平抑制Eag1钾通道的表达,并且多个细胞系在Eag1 siRNA干预后,细胞增殖能力被显著抑制^[59]。最近, Gomez-Varela *et al*^[60]用特异性hEag1 mAb阻断肿瘤细胞的Eag1钾通道,明显抑制了体外和体内肿瘤细胞的生长。该研究为开发对离子通道具有拮抗作用的功能性mAb提供了初步的经验。因此,不管是从基因水平,还是从蛋白水平, Eag1都有可能成为恶性肿瘤诊治有价值的靶点。

总之, Eag1是膜蛋白,可在细胞膜表面接触,参与细胞的信号转导,在正常组织和恶性肿瘤中有独特的表达特点,因此Eag1也定会成为癌症诊治的有效靶点。

与其他已确定的治疗方法比较, Eag1的靶向治疗有其独到的优势。首先,由于Eag1在绝大多数肿瘤中有很高的阳性表达率, Eag1的靶向治疗可应用于绝大多数肿瘤患者;其次, Eag1在正常组织的表达非常局限: Eag1主要在脑中表达,血脑屏障可发挥其保护作用; Eag1在外周局限性表

达于分化终末期细胞, Eag1靶向治疗的副作用很小. 应该继续深入Eag1与肿瘤的相关性研究, 为早日利用他作为临床癌症的诊疗工具提供可靠的临床前依据.

7 参考文献

- 1 Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* 1996; 154: 91-107
- 2 Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stuhmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 2005; 205: 115-124
- 3 Schonherr R. Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol* 2005; 205: 175-184
- 4 Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 2005; 205: 147-157
- 5 Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 2005; 205: 159-173
- 6 Schreiber R. Ca²⁺ signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *J Membr Biol* 2005; 205: 129-137
- 7 Camacho J. Ether a go-go potassium channels and cancer. *Cancer Lett* 2006; 233: 1-9
- 8 Witchel HJ. The hERG potassium channel as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 321-336
- 9 Boddington M. TRP proteins and cancer. *Cell Signal* 2007; 19: 617-624
- 10 Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martinez-Marmol R, Sole L, Ferreres JC, Condom E. Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 375-385
- 11 Tilley L, Nash GB, Jones GL, Sawyer WH. Decreased rotational diffusion of band 3 in Melanesian ovalocytes from Papua, New Guinea. *J Membr Biol* 1991; 121: 59-66
- 12 Gray LS, Macdonald TL. The pharmacology and regulation of T type calcium channels: new opportunities for unique therapeutics for cancer. *Cell Calcium* 2006; 40: 115-120
- 13 Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takahashi N. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 2006; 209: 21-29
- 14 Panner A, Wurster RD. T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* 2006; 40: 253-259
- 15 Roger S, Potier M, Vandier C, Besson P, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3681-3695
- 16 Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2249-2270
- 17 Stuhmer W, Alves F, Hartung F, Zientkowska M, Pardo LA. Potassium channels as tumour markers. *FEBS Lett* 2006; 580: 2850-2852
- 18 Zhang L, Barritt GJ. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 27-38
- 19 Arcangeli A. Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp* 2005; 266: 225-232; discussion 232-234
- 20 Debes JD, Roberts RO, Jacobson DJ, Girman CJ, Lieber MM, Tindall DJ, Jacobsen SJ. Inverse association between prostate cancer and the use of calcium channel blockers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 255-259
- 21 Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 473-508
- 22 Kaplan WD, Trout WE 3rd. The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* 1969; 61: 399-409
- 23 Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* 1991; 252: 1560-1562
- 24 Bruggemann A, Pardo LA, Stuhmer W, Pongs O. Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* 1993; 365: 445-448
- 25 Ludwig J, Terlau H, Wunder F, Bruggemann A, Pardo LA, Marquardt A, Stuhmer W, Pongs O. Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *EMBO J* 1994; 13: 4451-4458
- 26 Schonherr R, Gessner G, Lober K, Heinemann SH. Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett* 2002; 514: 204-208
- 27 Terlau H, Ludwig J, Steffan R, Pongs O, Stuhmer W, Heinemann SH. Extracellular Mg²⁺ regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch* 1996; 432: 301-312
- 28 Occhiodoro T, Bernheim L, Liu JH, Bijlenga P, Sinnreich M, Bader CR, Fischer-Lougheed J. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett* 1998; 434: 177-182
- 29 Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* 1999; 18: 5540-5547
- 30 Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knotgen H, Sanchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz-Joachim-Radzun, Stuhmer W, Pardo LA. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* 2006; 5: 41
- 31 Napp J, Monje F, Stuhmer W, Pardo LA. Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) potassium channels: intracellular trafficking and functional consequences. *J Biol Chem* 2005; 280: 29506-29512
- 32 Pellequer JL, Brudler R, Getzoff ED. Biological sensors: More than one way to sense oxygen. *Curr Biol* 1999; 9: R416-418
- 33 Jeng CJ, Chang CC, Tang CY. Differential localization of rat Eag1 and Eag2 K⁺ channels in hippocampal neurons. *Neuroreport* 2005; 16: 229-233
- 34 Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, Olivotto M, Wanke E. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* 1995; 489 (

- Pt 2): 455-471
- 35 Bruggemann A, Stuhmer W, Pardo LA. Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 537-542
 - 36 Pardo LA, Bruggemann A, Camacho J, Stuhmer W. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J Cell Biol* 1998; 143: 767-775
 - 37 Camacho J, Sanchez A, Stuhmer W, Pardo LA. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. *Pflugers Arch* 2000; 441: 167-174
 - 38 Meyer R, Heinemann SH. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol* 1998; 508 (Pt 1): 49-56
 - 39 Bannister JP, Chanda B, Bezanilla F, Papazian DM. Optical detection of rate-determining ion-modulated conformational changes of the ether-a-go-go K⁺ channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18718-18723
 - 40 Hegle AP, Marble DD, Wilson GF. A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-a-go-go K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2886-2891
 - 41 Ouadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M, Toillon RA, Delcourt P, Prevarskaia N. Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K⁺ channel. *Receptors Channels* 2001; 7: 345-356
 - 42 Ousingsawat J, Spitzner M, Puntheeranurak S, Terracciano L, Tornillo L, Bubendorf L, Kunzelmann K, Schreiber R. Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 824-831
 - 43 Murata H, Tajima N, Nagashima Y, Yao M, Baba M, Goto M, Kawamoto S, Yamamoto I, Okuda K, Kanno H. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein transforms human neuroblastoma cells into functional neuron-like cells. *Cancer Res* 2002; 62: 7004-7011
 - 44 Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4991-5004
 - 45 Schonherr R, Lober K, Heinemann SH. Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca(2+)/calmodulin. *EMBO J* 2000; 19: 3263-3271
 - 46 Ziechner U, Schonherr R, Born AK, Gavrilova-Ruch O, Glaser RW, Malesevic M, Kullertz G, Heinemann SH. Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca²⁺/calmodulin binding to the cytosolic N- and C-termini. *FEBS J* 2006; 273: 1074-1086
 - 47 Piros ET, Shen L, Huang XY. Purification of an EH domain-binding protein from rat brain that modulates the gating of the rat ether-a-go-go channel. *J Biol Chem* 1999; 274: 33677-33683
 - 48 Borowiec AS, Hague F, Harir N, Guenin S, Guerineau F, Gouilleux F, Roudbaraki M, Lassoued K, Ouadid-Ahidouch H. IGF-1 activates hEAG K(+) channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: Role in cell proliferation. *J Cell Physiol* 2007; 212: 690-701
 - 49 Toral C, Mendoza-Garrido ME, Azorin E, Hernandez-Gallegos E, Gomora JC, Delgadillo DM, Solano-Agama C, Camacho J. Effect of extracellular matrix on adhesion, viability, actin cytoskeleton and K⁺ currents of cells expressing human ether a go-go channels. *Life Sci* 2007; 81: 255-265
 - 50 Meyer R, Schonherr R, Gavrilova-Ruch O, Wohlrab W, Heinemann SH. Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol* 1999; 171: 107-115
 - 51 Mello de Queiroz F, Suarez-Kurtz G, Stuhmer W, Pardo LA. Ether a go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Mol Cancer* 2006; 5: 42
 - 52 Ding XW, Yan JJ, An P, Lu P, Luo HS. Aberrant expression of ether a go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1257-1261
 - 53 Ding XW, Luo HS, Jin X, Yan JJ, Ai YW. Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines. *Medical Oncology* 2007; 24: 345-350
 - 54 Farias LM, Ocana DB, Diaz L, Larrea F, Avila-Chavez E, Cadena A, Hinojosa LM, Lara G, Villanueva LA, Vargas C, Hernandez-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Duenas-Gonzalez A, Perez-Cardenas E, Pardo LA, Morales A, Taja-Chayeb L, Escamilla J, Sanchez-Pena C, Camacho J. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 2004; 64: 6996-7001
 - 55 Patt S, Preussat K, Beetz C, Kraft R, Schrey M, Kalff R, Schonherr K, Heinemann SH. Expression of ether a go-go potassium channels in human gliomas. *Neurosci Lett* 2004; 368: 249-253
 - 56 Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 626-634
 - 57 Shah K. Current advances in molecular imaging of gene and cell therapy for cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 518-523
 - 58 Gavrilova-Ruch O, Schonherr K, Gessner G, Schonherr R, Klapperstuck T, Wohlrab W, Heinemann SH. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol* 2002; 188: 137-149
 - 59 Weber C, Mello de Queiroz F, Downie BR, Suckow A, Stuhmer W, Pardo LA. Silencing the activity and proliferative properties of the human Eag1 Potassium Channel by RNA Interference. *J Biol Chem* 2006; 281: 13030-13037
 - 60 Gomez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knotgen H, Sanchez A, Hettmann T, Ossipov D, Weseloh R, Contreras-Jurado C, Rothe M, Stuhmer W, Pardo LA. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res* 2007; 67: 7343-7349
 - 61 Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3438-3442
 - 62 Wilson GF, Wang Z, Chouinard SW, Griffith LC, Ganetzky B. Interaction of the K channel beta subunit, Hyperkinetic, with eag family members. *J Biol Chem* 1998; 273: 6389-6394
 - 63 Schopperle WM, Holmqvist MH, Zhou Y, Wang J, Wang Z, Griffith LC, Keselman I, Kusnitz F, Dagan D, Levitan IB. Slob, a novel protein that interacts with the Slowpoke calcium-dependent potassium channel. *Neuron* 1998; 20: 565-573
 - 64 Hoshi N, Takahashi H, Shahidullah M, Yokoyama S, Higashida H. KCRI1, a membrane protein that facilitates functional expression of non-inactivating

- K⁺ currents associates with rat EAG voltage-dependent K⁺ channels. *J Biol Chem* 1998; 273: 23080-23085
- 65 Stansfeld CE, Roper J, Ludwig J, Weseloh RM, Marsh SJ, Brown DA, Pongs O. Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9910-9914
- 66 Lecain E, Sauvaget E, Crisanti P, Van Den Abbeele T, Huy PT. Potassium channel ether a go-go mRNA expression in the spiral ligament of the rat. *Hear Res* 1999; 133: 133-138
- 67 Saganich MJ, Vega-Saenz de Miera E, Nadal MS, Baker H, Coetzee WA, Rudy B. Cloning of components of a novel subthreshold-activating K(+) channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex. *J Neurosci* 1999; 19: 10789-10802
- 68 Saganich MJ, Machado E, Rudy B. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J Neurosci* 2001; 21: 4609-4624
- 69 Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, Medico E, Madon E, Vercelli A, Fagioli F. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types. *Exp Hematol* 2006; 34: 1563-1572
- 70 Liu JH, Bijlenga P, Fischer-Lougheed J, Occhiodoro T, Kaelin A, Bader CR, Bernheim L. Role of an inward rectifier K⁺ current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J Physiol* 1998; 510 (Pt 2): 467-476
- 71 Garcia-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stuhmer W, Pardo LA. Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole. *J Gen Physiol* 2004; 124: 301-317
- 72 Gomez-Varela D, Contreras-Jurado C, Furini S, Garcia-Ferreiro R, Stuhmer W, Pardo LA. Different relevance of inactivation and F468 residue in the mechanisms of hEag1 channel blockage by astemizole, imipramine and dofetilide. *FEBS Lett* 2006; 580: 5059-5066
- 73 Ludwig J, Owen D, Pongs O. Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel. *EMBO J* 1997; 16: 6337-6345
- 74 Jenke M, Sanchez A, Monje F, Stuhmer W, Weseloh RM, Pardo LA. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J* 2003; 22: 395-403

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

欢迎订阅 2008 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。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下内容: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。

《世界华人消化杂志》2008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人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

低浓度一氧化碳在防止大鼠小肠脂多糖诱导损伤中的保护作用

刘少华, 马可, 许兵, 徐鑫荣

■背景资料

与一氧化氮类似的一氧化碳(CO)的研究如火如荼, 数项动物和人体观察表明, 低浓度CO有重要的细胞保护作用, 但其机制、量-时-效关系等尚待阐明。本文观察了CO不同给予方式对脂多糖诱导大鼠小肠损伤的影响, 及p38 MAPK信号传导通路的作用。

刘少华, 马可, 许兵, 徐鑫荣, 南京医科大学第一附属医院ICU 江苏省南京市 210029

刘少华, 2006年南京医科大学普通外科学博士研究生, 副主任医师, 讲师, 主要从事危重病的基础和临床研究。

通讯作者: 刘少华, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院ICU. liush67@hotmail.com

电话: 025-83714511-6800

收稿日期: 2006-12-15 修回日期: 2007-09-03

Low-concentration carbon monoxide protects against lipopolysaccharide-induced rat small intestine injury

Shao-Hua Liu, Ke Ma, Bing Xu, Xin-Rong Xu

Shao-Hua Liu, Ke Ma, Bing Xu, Xin-Rong Xu, Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Shao-Hua Liu, Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. liush67@hotmail.com

Received: 2006-12-15 Revised: 2007-09-03

Abstract

AIM: To observe the effects of the inhalation or intraperitoneal infusion of a low concentration of carbon monoxide (CO) on lipopolysaccharide (LPS)-induced rat small intestine injury, and to identify the roles of the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) pathway in these effects.

METHODS: Sprague-Dawley rats with small intestine injury induced by a 5 mg/kg LPS intravenous injection or an equal volume of NS were divided into six groups: A, control group (inhalation of room air); B, CO group (inhalation of 2.5×10^{-4} V/V CO); C, CO intraperitoneal infusion group (intraperitoneal infusion of 2.5×10^{-4} V/V CO); D, LPS group (inhalation of room air); E, LPS + CO group (inhalation of 2.5×10^{-4} V/V CO); and F, LPS + CO intraperitoneal infusion group (intraperitoneal infusion of 2.5×10^{-4} V/V CO). Rats were sacrificed by exsanguination and small intestinal tissues were homogenized

for testing. The levels of platelet activator factor (PAF) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Maleic dialdehyde (MDA) content and myeloperoxidase (MPO) activity were determined by chemical methods. The extent of cell apoptosis was determined by flow cytometry. The expression level of the heme oxygenase-1 (HO-1) gene was analyzed by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and the level of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity was determined by Western blot. Pathology was determined by light microscopy.

RESULTS: The levels of PAF, ICAM-1, MDA and MPO ($P < 0.05$), and the rates of apoptosis, were lower in groups E (0.87 ± 0.18 ng/g, 2.96 ± 0.39 ng/g, 1.74 ± 0.17 mmol/g, 35.34 ± 14.67 μ kat/g, $30.56\% \pm 6.33\%$) and F (0.82 ± 0.16 ng/g, 2.69 ± 0.23 ng/g, 1.71 ± 0.24 mmol/g, 33.01 ± 12.84 μ kat/g, $34.45\% \pm 5.77\%$) than in group D (1.15 ± 0.21 ng/g, 3.48 ± 0.36 ng/g, 2.75 ± 0.76 mmol/g, 68.01 ± 18.67 μ kat/g, $41.52\% \pm 3.36\%$, $P < 0.05$). The levels of HO-1 mRNA and phosphorylated p38 MAPK were higher in groups E (6.29 ± 1.56 , $14\ 219 \pm 1724$) and F (7.21 ± 1.78 , $13\ 774 \pm 1886$) than in group D (3.97 ± 1.16 , $10\ 227 \pm 1312$; $P < 0.05$). In contrast to group D rats, the small intestine injury in rats in groups E and F was ameliorated. There were no significant differences between groups E and F.

CONCLUSION: Low-concentration CO inhalation and intraperitoneal infusion exert similar protection against LPS-induced rat small intestine injury via anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms, as well as through the up-regulation of HO-1 expression. This may involve the p38 MAPK pathway.

Key Words: Carbon monoxide; Lipopolysaccharide; Platelet activator factor; Intercellular adhesion molecule-1; Maleic dialdehyde; Myeloperoxidase; Heme oxygenase-1; Mitogen-activated protein kinase; Enzyme lined immunosorbent assay; Semi-

quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blotting

Liu SH, Ma K, Xu B, Xu XR. Low-concentration carbon monoxide protects against lipopolysaccharide-induced rat small intestine injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2780-2785

摘要

目的: 观察低浓度一氧化碳(CO)吸入和腹腔给予在防止脂多糖(LPS)诱导大鼠小肠损伤中的作用, 探讨其可能的信号转导机制。

方法: 6组SD大鼠ip 5 mg/kg体质量LPS或等容量生理盐水1 h后, 对照组(A)吸入室内空气, CO组(B)吸入体积分数为 2.5×10^{-4} CO, CO腹腔组(C)腹腔通入体积分数为 2.5×10^{-4} CO, LPS组(D)吸入室内空气, LPS+CO组(E)吸入体积分数为 2.5×10^{-4} CO, LPS+CO腹腔组(F)腹腔通入体积分数为 2.5×10^{-4} CO。观察3 h放血处死, 取小肠, 酶联免疫吸附法测定血小板活化因子(PAF)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平; 化学比色法测定丙二醛(MDA)含量及髓过氧化物酶(MPO)活性; 流式细胞仪测定细胞凋亡率; 半定量逆转录聚合酶链反应测定血红素氧合酶-1(HO-1)mRNA, 蛋白印迹法测定磷酸化p38 MAPK表达; 光镜观察形态学变化。

结果: E和F组PAF、ICAM-1、MDA、MPO的表达(0.87 ± 0.18 ng/g, 0.82 ± 0.16 ng/g vs 1.15 ± 0.21 ng/g; 2.96 ± 0.39 ng/g, 2.69 ± 0.23 ng/g vs 3.48 ± 0.36 ng/g; 1.74 ± 0.17 mmol/g, 1.71 ± 0.24 mmol/g vs 2.75 ± 0.76 mmol/g; 35.34 ± 14.67 μ kat/g, 33.01 ± 12.84 μ kat/g vs 68.01 ± 18.67 μ kat/g; $P < 0.05$)以及细胞凋亡率均明显低于D组($30.56\% \pm 6.33\%$, $34.45\% \pm 5.77\%$ vs $41.52\% \pm 3.36\%$; $P < 0.05$), 而HO-1 mRNA及磷酸化p38 MAPK的表达显著高于D组(6.29 ± 1.56 , 7.21 ± 1.78 vs 3.97 ± 1.16 , 14219 ± 1724 , 13774 ± 1886 vs 10227 ± 1312 ; $P < 0.05$), E和F组小肠损伤较D组减轻, 组间比较, 差异无统计学意义。

结论: 低浓度CO吸入和腹腔给予通过抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡及上调HO-1表达, 在防止大鼠小肠避免LPS诱导损伤中的保护作用; p38 MAPK可能参与CO保护作用的信号转导。

关键词: 一氧化碳; 脂多糖; 血小板活化因子; 细胞间黏附分子-1; 丙二醛; 髓过氧化物酶; 血红素氧合酶-1; 丝裂原活化蛋白激酶; 酶联免疫吸附法; 半定

量逆转录聚合酶链反应; 蛋白印迹法

刘少华, 马可, 许兵, 徐鑫荣. 低浓度一氧化碳在防止大鼠小肠脂多糖诱导损伤中的保护作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15(26): 2780-2785

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2780.asp>

0 引言

我们以前的研究观察到低浓度一氧化碳(CO)吸入可以抑制细菌脂多糖(LPS)诱导的大鼠肺和肠组织过氧化、炎症性损伤及细胞凋亡从而起保护作用^[1-3]。丝裂原活化蛋白激酶p38(p38 MAPK)信号转导通路已被广泛证明参与抑制LPS诱导的炎症损伤及细胞凋亡^[4-5]。因此推测p38 MAPK通路可能参与CO的上述保护作用。本文在前述研究基础上, 观察CO给予方式改变的影响、及影响过程中磷酸化p38 MAPK表达的变化, 探讨其可能的信号转导机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康♂SD大鼠, 南京医科大学动物实验中心提供, 体质量200-250 g, 清洁级, 合格证号: NMXX(苏)2004-0018。LPS (*E.coli* O111: B4, Sigma公司), 血小板活化因子(PAF)和细胞间黏附因子-1(ICAM-1)试剂盒(上海晶美生物公司), 丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)和考马斯亮兰蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程有限公司), 膜联蛋白-V-异硫氰酸荧光素(Annexin-V-FITC)、碘化吡啶(PI)(美国BD Pharmingen公司), 流式细胞仪(FACS Vantage SE, 美国BD公司), TRIzol总RNA提取试剂、反转录和PCR扩增所需酶(美国Promega公司), 硝酸纤维素膜(美国Amersham公司), 小鼠抗大鼠actins mAb, FITC-羊抗小鼠IgG(二抗), 均购自美国Santa Cruz公司, DAB显色系统(武汉博士德), CO气体(南京特种气体厂, 储存浓度的体积分数分别为1.0、 2.5×10^{-4} , 后者平衡气体为空气)。

1.2 方法 36只大鼠按照随机数字表法分为对照, CO, CO腹腔, LPS, LPS+CO吸入和LPS+CO腹腔6组。1 g/L戊巴比妥钠30 mg/kg ip麻醉, 后3组iv 5 mg/kg LPS, 前3组iv等容量生理盐水。1 h后, 对照组吸入室内空气, CO组吸入体积分数为 2.5×10^{-4} CO, CO腹腔组腹腔通入体积分数为 2.5×10^{-4} CO, LPS组吸入室内空气, LPS+CO吸入组吸入体积分数为 2.5×10^{-4} CO, LPS+CO腹腔组腹腔通入体积分数为 2.5×10^{-4} CO。采用有明显组织形态学改变为肠道损伤的判断标准。

■ 相关报道

继一氧化碳作用的全面阐述, 与其有类似作用而非自由基的一氧化碳(CO)的研究成为近年热点。数项动物和人体观察表明, 低浓度CO有抗氧化、抗炎、抗凋亡作用, 并开始临床应用用于脂多糖(LPS)诱导的炎症、高浓度氧及机械通气相关肺损伤、器官移植、血管炎、缺血-再灌注损伤等, 取得了令人鼓舞的效果。在动物肺损伤研究中还观察了50-1000 ppm及较长时间(6-72 h)CO吸入有相似的保护作用, 其机制可能与MAPK、JNK的转导有关。但对LPS诱导肠道损伤的作用及其机制, 量-时-效关系尚未阐明。

■创新盘点

本文的创新在于观察了CO不同给予方式对LPS诱导大鼠肠道损伤的影响、及影响过程中p38 MAPK信号转导通路的作用。

CO给予参照文献[6]并作改进,预先准备一只两端开口、充满空气的36 L密闭容器,向内注入9 mL体积分数为1.0的CO,充分混匀,自一端开口以2 L/min持续通入CO体积分数为 2.5×10^{-4} 的压缩气体,另一端接管向室外排气;分别在大鼠右下及左上腹穿刺小孔,自右下腹孔以2 L/min持续通入体积分数为 2.5×10^{-4} CO,左上腹孔接管向外排气。实验过程中随机3次气体采样,经CO浓度测定仪(Interscan Co., CA)证实容器及大鼠腹腔内CO浓度的体积分数基本稳定在 2.5×10^{-4} ,继续下列实验。

大鼠置入容器及腹腔内持续通气3 h,观察结束时,予10 g/L戊巴比妥钠20 mg/kg ip麻醉,剖腹自腹主动脉放血处死,取回盲部上小肠,4℃生理盐水冲洗干净,组织匀浆,离心(3000 r/min, 10 min),取上清液,考马斯亮兰法测定蛋白含量,结果以毫克蛋白中的含量表示。

1.2.1 PAF, ICAM-1, MDA和MPO测定 肠组织匀浆离心后的上清液,按试剂盒说明书用酶联免疫吸附法测定PAF, ICAM-1含量,化学比色法测定MDA含量和MPO活性。

1.2.2 细胞凋亡测定 参照文献[7],用Annexin-V/PI双染色流式细胞仪法测定。将制备的单细胞悬液0.5 mL,在0℃-4℃,用700 mL/L乙醇固定30 min, 1500 r/min离心4 min,去除上清液,加入1 g/L的Rnase 0.2 mL, 37℃孵育30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗1次,再加入碘化丙啶(PI) 1 mL(浓度50 mg/L), 0℃-4℃暗处放置48 h,以480 nm激光激发,流式细胞仪双通道接受Annexin-V和PI,检测10 000个细胞,Mod Fit 2.3分析软件绘制细胞周期分布图,计算正常二倍体峰前凋亡细胞峰曲线下面积占整个分布曲线下面积的比例,用百分比表示细胞凋亡程度。

1.2.3 肠组织HO-1 mRNA 参照文献[7],用半定量逆转录聚合酶链反应检测。一步法提取小肠组织匀浆总RNA后先进行逆转录,扩增(65℃, 10 min)后置于冰上冷却,再次提取总RNA后扩增(42℃, 90 min, 94℃, 2 min)及PCR。HO-1上游引物5'-AAGATTGCCAGAAAGCCCTGGAC-3',下游引物5'-AACTGTCGCCACCAGAAAGCTGAG-3',经PCR扩增后,目的片段长395 bp。β-actin上游引物5'-ATGGATGATGATATCGCCGCG-3',下游引物5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3',经PCR扩增后,目的片段长240 bp。本实验中,使用0.5 μg总RNA,HO-1和β-actin PCR的具体循环参数为:HO-1: 94℃×4 min, 94℃×50 s, 63℃×

50 s, 72℃×1 min, 32个循环,末次延伸时间72℃×10 min; β-actin: 94℃×3 min, 94℃×1 min, 55℃×1 min, 72℃×1 min, 72℃×10 min, 32个循环,取10 μL PCR产物进行电泳,摄像,产物半定量用Tiger 920G图像分析系统扫描电泳图的HO-1和相应的β-actin,测得积分光密度值,结果以HO-1积分光密度与相应的β-actin积分光密度的比值表示表达强度。

1.2.4 组织形态学观察 组织经40 g/L多聚甲醛溶液固定24 h,石蜡包埋,6 μm切片HE染色,由本院病理科医师用光镜观察形态学变化。

1.2.5 Western blot法检测磷酸化p38 MAPK 组织采用裂解液4℃下制作匀浆,12 000 g, 4℃离心30 min,吸取上清液。定量蛋白后,取20 μg样品蛋白行120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 4 h)后,转入硝酸纤维素膜。用30 g/L的脱脂奶粉(PBS稀释)、室温封闭硝酸纤维素膜30 min,加入1:100的磷酸化小鼠抗大鼠mAb, 4℃过夜。PBS洗膜后,用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠mAb及DAB显色系统进行反应,以出现棕黄色条带为阳性结果,其强度用密度扫描仪并经Chem Image 5500计算机软件(UVP, USA)定量分析(单位: densitometry unit, DU)。

统计学处理 数据以mean±SD表示,经SPSS11.0统计软件处理,采用单因素方差分析和最小显著法检验。

2 结果

2.1 PAF, ICAM-1, MDA和MPO变化 前3组间比较,差异无统计学意义;LPS组明显高于前3组($P<0.05$);LPS+CO组及LPS+CO腹腔组显著低于LPS组(均 $P<0.05$),组间比较,差异无统计学意义(表1)。

2.2 细胞凋亡率变化 前3组间比较,差异无统计学意义;LPS组明显高于前3组(均 $P<0.01$);LPS+CO组及LPS+CO腹腔组显著低于LPS组(均 $P<0.05$),组间比较,差异无统计学意义(表1)。

2.3 HO-1 mRNA变化 前3组间比较,差异无统计学意义;LPS组高于前3组(均 $P<0.01$)。LPS+CO组及LPS+CO腹腔组进一步升高,高于LPS组(均 $P<0.05$)(表1),组间比较,差异无统计学意义。

2.4 组织形态学变化 对照组肠绒毛结构完整,无炎症细胞浸润(图1A);CO吸入及腹腔给予组无明显形态学改变(图1B-C);LPS组大量肠绒毛脱落,广泛炎症细胞浸润(图1D)。LPS+CO组及LPS+CO腹腔组有相似但减轻的形态学改变(图1E-F)。

表 1 PAF, ICAM-1, MDA, MPO, 细胞凋亡率, HO-1 mRNA及磷酸化p38 MAPK表达的变化(mean $\pm$ SD, $n = 6$)

分组	PAF ng/g	ICAM-1 ng/g	MDA μ mol/g	MPO μ kat/g	细胞凋亡率 (%)	HO-1 mRNA	P-p38 MAPK (DU)
对照	0.43 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.19	0.61 $\pm$ 0.06	27.51 $\pm$ 4.67	8.02 $\pm$ 2.10	1.00 $\pm$ 0.00	2142 $\pm$ 539
CO	0.49 $\pm$ 0.04	1.71 $\pm$ 0.19	0.57 $\pm$ 0.07	26.07 $\pm$ 2.67	7.71 $\pm$ 1.50	1.12 $\pm$ 0.04	3176 $\pm$ 420
CO腹腔	0.39 $\pm$ 0.06	1.57 $\pm$ 0.21	0.58 $\pm$ 0.06	28.67 $\pm$ 5.17	10.60 $\pm$ 3.16	1.08 $\pm$ 0.03	2347 $\pm$ 465
LPS	1.15 $\pm$ 0.21 ^a	3.48 $\pm$ 0.36 ^a	2.75 $\pm$ 0.76 ^a	68.01 $\pm$ 18.67 ^a	41.52 $\pm$ 3.36 ^b	3.97 $\pm$ 1.16 ^b	10 227 $\pm$ 1312 ^b
LPS+CO吸入	0.87 $\pm$ 0.18 ^{ac}	2.96 $\pm$ 0.39 ^{ac}	1.74 $\pm$ 0.17 ^{ac}	35.34 $\pm$ 14.67 ^{ac}	30.56 $\pm$ 6.33 ^{bc}	6.29 $\pm$ 1.56 ^{bc}	14 219 $\pm$ 1724 ^{bc}
LPS+CO腹腔	0.82 $\pm$ 0.16 ^{ac}	2.68 $\pm$ 0.23 ^{ac}	1.71 $\pm$ 0.24 ^{ac}	33.01 $\pm$ 12.84 ^{ac}	34.45 $\pm$ 5.77 ^{bc}	7.21 $\pm$ 1.78 ^{bc}	13 774 $\pm$ 1886 ^{bc}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照、CO吸入及CO腹腔给予组; ^c $P < 0.05$ vs LPS组.

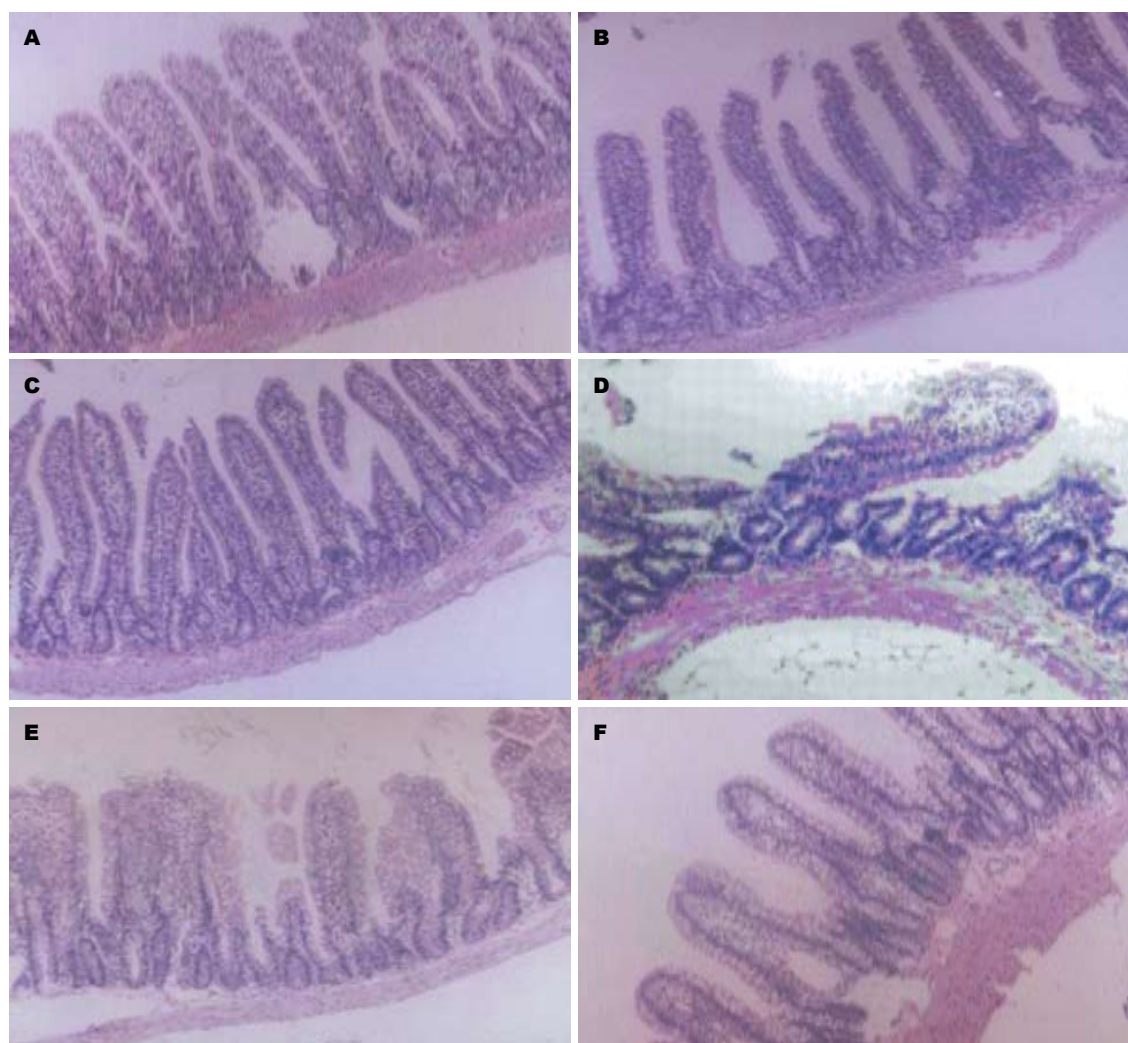


图 1 肠组织形态学变化 (HE $\times$ 200). A: 对照; B: CO吸入; C: CO腹腔给予; D: LPS注入; E: LPS注入+CO吸入; F: LPS注入+CO腹腔.

2.5 磷酸化p38 MAPK表达的变化 前3组表达极少, 强度相似; LPS组表达增加, 强度(10 227 $\pm$ 1312)DU高于前3组(均 $P < 0.01$); LPS+CO组及LPS+CO腹腔组表达进一步增加, 强度(14 219 $\pm$ 1724)DU和(13 774 $\pm$ 1886)DU高于LPS组(均 $P < 0.05$), 组间比较无差异(表1, 图2).

3 讨论

本实验结果显示, LPS诱导大鼠小肠损伤时, 肠组织PAF、ICAM-1、MDA、MPO及细胞凋亡率显著升高, 提示过氧化、促炎介质表达及细胞凋亡增加参与了LPS诱导的肠道损伤; 而给予CO在减轻损伤的同时, 明显降低损伤肠PAF、

■名词解释

1 MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶, 是细胞内3条主要信号转导通路(Janus激酶-STAT、MAPK、NF- κ B)之一, 活化后在细胞浆及细胞核内协同或拮抗, 共同完成信号转导, 介导病理生理作用.

2 HO-1: 为3种血红素氧合酶之一(诱导型), 是人类和其他哺乳动物器官和组织中广泛存在的一种加氧酶, 调节细胞内血红素的稳态, 降解血红素为强抗氧化作用的胆绿素、一氧化碳和铁离子, 有重要细胞保护作用.

■同行评价

本文研究了CO在大鼠小肠避免CPS诱导损伤中的保护作用, 研究内容丰富, 采用的方法较恰当, 得出的结果结论较可信, 有一定的学术价值。

ICAM-1、MDA、MPO及细胞凋亡率, 这提示CO可抑制LPS诱导的小肠过氧化物、促炎细胞因子产生及细胞凋亡而起保护作用。

肠道既是重症感染最易受损的部位, 又是阻止继发感染和多器官功能障碍的关键。LPS诱导肠道损伤时, 炎症细胞通过呼吸爆发, 产生大量氧自由基, 损伤肠道屏障功能。MDA是氧自由基攻击生物膜中不饱和脂肪酸的代谢产物, 间接反映氧自由基生成量及活性。LPS注入时, MDA升高, 损伤严重^[1,3,6,8-10]。中性粒细胞含有MPO, 他还原过氧化氢, 减少自由基生成。测定MPO, 反映中性粒细胞数量和活性。LPS诱导肠道损伤时, 肠微循环内扣留粒细胞增多, 活性增强, 使MPO升高^[1,3,8-10]。PAF是内源性脂类介质, 可导致微循环血运障碍和通透性增高, 增加炎症细胞及血小板黏附和活化, 介导损伤^[6,8,10-12]。ICAM-1参与粒细胞趋化作用及细胞间黏附, 继而引起炎症损伤、血栓形成和细胞凋亡^[6,8,10-13]。LPS诱导小肠细胞凋亡增加, 使黏膜萎缩、通透性增高、浅表溃疡形成^[1,3,8,10]。

CO抗氧化、抗炎症和抑制细胞凋亡作用, 已在我们^[1-3]和许多学者研究^[6-17]中得到证实。CO阻止氧自由基生成、增加其清除, 降低组织过氧化物含量, 增强对抗自由基诱导的细胞凋亡^[1-3,6,8-10]。CO下调促炎介质表达, 增加抗炎细胞因子生成, 抑制白细胞活化及与内皮细胞黏附, 减少炎症细胞浸润和细胞凋亡^[1-3,6,9-17]。许多学者还发现, CO吸入抑制促凋亡基因*Fax*、*Bax*和*P53*的转录, 增加抗凋亡蛋白*Bcl-2*、*IAP*等的表达, 抑制凋亡蛋白酶活性, 减少细胞凋亡^[6,8-10,14-17]。吸入CO升高IL-10和SOD, 增强组织抗炎、抗氧化能力^[9,18-19]。HO-1的细胞保护作用亦得到研究证实^[2,7,20]。本实验中我们发现, 吸入或腹腔给予CO 3 h, 肠组织HO-1表达增加, 提示CO可反馈上调HO-1, 这与Nakao *et al*^[6]和Moore *et al*^[8]的观察一致。HO-1及其降解血红素代谢产物均具有抗氧化、抗炎作用, 协同增加CO的细胞保护作用^[2,7,20]。

本研究结果还显示, CO给予使LPS诱导表达增加的磷酸化p38 MAPK进一步增强, 提示p38 MAPK通路可能参与了CO给予后LPS诱导小肠损伤的保护作用。p38 MAPK通路活化参与LPS诱发的氧化、炎症损伤及细胞凋亡^[4-5], CO有抗氧化、抗炎及抑制细胞凋亡作用, 因此习惯认为CO可能抑制LPS对p38 MAPK的激活。但本文及许多学者观察^[9,18-28]表明, CO给予

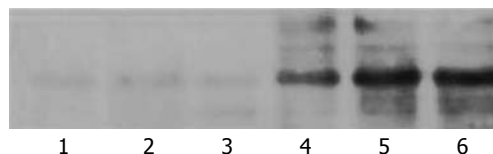


图2 肠组织磷酸化p38 MAPK表达的变化。1: 对照; 2: CO吸入; 3: CO腹腔给予; 4: LPS注入; 5: LPS注入+CO吸入; 6: LPS注入+CO腹腔。

活化而非抑制p38 MAPK参与其细胞保护作用。Otterbein *et al*^[19]观察到MKK3/p38 MAPK通路活化, 介导LPS损伤小鼠吸入250 ppm CO后促炎介质产生的抑制和肺细胞凋亡, 增加IL-10合成。Reunanen *et al*^[23]和Ranganathan *et al*^[24]研究发现, p38 MAPK参与CO调控LPS诱导的氧化/抗氧化失衡。Brouard *et al*^[15]认为HO-1源性CO活化p38 MAPK, 抑制TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡。结合我们的观察, 有理由相信, CO的抗氧化、抗炎及抑制细胞凋亡依赖MAPK参与。CO给予活化p38 MAPK, 改变后续信号传导通路, 调控介质、酶等的表达^[22,25], 或通过能与p38 MAPK活化后启动子区不同反应元件结合的中间分子, 介导不同蛋白合成^[26]。Otterbein *et al*^[19]认为CO与p38 MAPK上游激酶内的血红素结构单元结合而起抗炎作用。

总之, 过氧化损伤、促炎介质失控表达及细胞凋亡增多在LPS诱导肠道损伤的发生发展中起重要作用。外源性低浓度CO吸入和腹腔给予通过抗氧化、抗炎症、抑制细胞凋亡和上调HO-1表达而起相似的保护作用; p38 MAPK信号转导通路可能参与了这一过程。

4 参考文献

- 1 刘少华, 马可, 许兵, 徐鑫荣. 一氧化碳吸入对内毒素诱导大鼠多器官损伤的影响及其机制. 中华实验外科杂志 2006; 23: 758-761, 封三
- 2 Liu SH, Ma K, Xu B, Xu XR. Carbon monoxide inhalation protects lung from lipopolysaccharide-induced injury in rat. *Sheng Li Xue Bao* 2006; 58: 483-489
- 3 马可, 刘少华, 许兵, 徐鑫荣. 一氧化碳对内毒素血症肠道细胞凋亡的影响. 中华急诊医学杂志 2006; 15: 323-327
- 4 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40
- 5 刘辉, 姚咏明. 细胞内炎症信号通路交汇作用研究. 中国病理生理杂志 2005; 21: 1607-1613, 1627
- 6 Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; 163: 1587-1598
- 7 Lang D, Reuter S, Buzescu T, August C, Heidenreich S. Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis

- despite caspase-3 up-regulation. *Int Immunol* 2005; 17: 155-165
- 8 Moore BA, Otterbein LE, Turler A, Choi AM, Bauer AJ. Inhaled carbon monoxide suppresses the development of postoperative ileus in the murine small intestine. *Gastroenterology* 2003; 124: 377-391
 - 9 Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 551-571
 - 10 Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556: 325-336
 - 11 Morisaki H, Katayama T, Kotake Y, Ito M, Tamatani T, Sakamoto S, Ishimura Y, Takeda J, Suematsu M. Roles of carbon monoxide in leukocyte and platelet dynamics in rat mesenteric during sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 2001; 95: 192-199
 - 12 Morisaki H, Katayama T, Kotake Y, Ito M, Handa M, Ikeda Y, Takeda J, Suematsu M. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced microvascular leukocyte adhesion through platelet-dependent mechanisms. *Anesthesiology* 2002; 97: 701-709
 - 13 闫文生, 阙文宏, 黄巧冰, 姜勇, 赵克森. 脂多糖诱导小鼠肠组织ICAM-1表达的变化及p38 MAPK在其中的作用. *中国病理生理杂志* 2002; 18: 1029-1033
 - 14 Wang X, Wang Y, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J Biol Chem* 2007; 282: 1718-1726
 - 15 Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 1015-1026
 - 16 Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Gallo D, Liu F, Ifedigbo E, Otterbein LE, Billiar TR. Carbon monoxide prevents multiple organ injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 2005; 23: 527-532
 - 17 Mayr FB, Spiel A, Leitner J, Marsik C, Germann P, Ullrich R, Wagner O, Jilma B. Effects of carbon monoxide inhalation during experimental endotoxemia in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 354-360
 - 18 Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wisk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422-428
 - 19 Otterbein LE, Otterbein SL, Ifedigbo E, Liu F, Morse DE, Fearn C, Ulevitch RJ, Knickelbein R, Flavell RA, Choi AM. MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Am J Pathol* 2003; 163: 2555-2563
 - 20 Silva G, Cunha A, Gregoire IP, Seldon MP, Soares MP. The antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 in endothelial cells involves the degradation of p38 alpha MAPK isoform. *J Immunol* 2006; 177: 1894-1903
 - 21 Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235: 249-263
 - 22 Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, Lee PJ. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem* 2003; 278: 22061-22070
 - 23 Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM. Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem* 2002; 277: 32360-32368
 - 24 Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, Kim KH, Tower GB, Rutter JL, Brinckerhoff CE, Huang TT, Epstein CJ, Jeffrey JJ, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 14264-14270
 - 25 Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, Davis RJ, Choi AM, Lee PJ. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* 2003; 278: 1248-1258
 - 26 Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY, Lee PJ. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem* 2005; 280: 8714-8721
 - 27 Mishra S, Fujita T, Lama VN, Nam D, Liao H, Okada M, Minamoto K, Yoshikawa Y, Harada H, Pinsky DJ. Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5191-5196
 - 28 Kohmoto J, Nakao A, Stolz DB, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, Shimizu H, Takahashi T, Tomiyama K, Sugimoto R, Choi AM, Billiar TR, Murase N, McCurry KR. Carbon Monoxide Protects Rat Lung Transplants From Ischemia-Reperfusion Injury via a Mechanism Involving p38 MAPK Pathway. *Am J Transplant* 2007; 7: 2279-2290

编辑 张焕兰 电编 郭海丽

肠缺血灌流时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响

赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽

■背景资料

肠上皮细胞和细胞间紧密连接是构成肠黏膜机械屏障的重要组成部分, 直接与外界细菌及毒素直接接触。严重应激状态下, 肠上皮细胞的损害使肠黏膜的通透性增加, 造成细菌及内毒素的移位, 引起肠源性内毒素血症和脓毒症。这一过程与脓毒症和MODS的发生有密切关系。为此, 减轻肠上皮细胞损害一直是临床研究热点之一。

赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽, 中国人民解放军总医院第一附属医院麻醉科 北京市 100037

赵京禹, 在读医学博士, 主要从事麻醉基础与临床的研究。
通讯作者: 赵京禹, 100037, 北京市海淀区阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院麻醉科。zoubai185@163.com
电话: 010-68159178

收稿日期: 2007-01-11 修回日期: 2007-09-03

Effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury

Jing-Yu Zhao, Jian-Hua Hao, Ping Li, Hui Guo

Jing-Yu Zhao, Jian-Hua Hao, Ping Li, Hui Guo, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Correspondence to: Jing-Yu Zhao, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, 51 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100037, China. zoubai185@163.com
Received: 2007-01-11 Revised: 2007-09-03

Abstract

AIM: To investigate the effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion (I/R) injury.

METHODS: Ninety-six Wistar rats were randomly divided into three groups: sham operation, control (I/R + saline) and propofol (I/R + propofol) groups. Propofol (0.1 mg/kg) was injected into the guts of rats in the I/R + propofol group immediately after the superior mesenteric artery (SMA) was clipped. The rate of apoptosis of intestinal epithelial cells was determined using the TdT-mediated d-UTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method. The expression of Caspase-3 and bcl-2 proteins in intestinal epithelial cells was examined by immunohistochemistry. Pathological changes in gut epithelial cells were assessed by Chiu's scores. Measurements were taken at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes after reperfusion.

RESULTS: The rate of apoptosis of intestinal epithelial cells ($P < 0.01$) and the levels of Caspase-3 protein were significantly lower in the

I/R + propofol group than that in the control group at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes after reperfusion (104.4 ± 5.3 vs 146.4 ± 7.6 ; 97.4 ± 6.2 vs 130.4 ± 7.4 ; 134.4 ± 5.1 vs 170.4 ± 8.1 ; 125.4 ± 6.2 vs 160.4 ± 9.5 ; and 101 ± 5.8 vs 120.4 ± 8.2 , respectively, all $P < 0.01$), whereas the levels of bcl-2 protein increased dramatically (13.34 ± 4.12 vs 6.72 ± 2.59 ; 14.96 ± 4.85 vs 8.24 ± 3.13 ; 15.29 ± 5.28 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 5.96 ± 1.93 ; 11.08 ± 4.83 vs 6.87 ± 2.43 , respectively, all $P < 0.01$). Pathological injuries were seen to have been alleviated.

CONCLUSION: Enteral administration of propofol reduces apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury.

Key Words: Ischemia-reperfusion; Propofol; Epithelial cells; Apoptosis; TdT-mediated d-UTP-biotin nick end-labeling

Zhao JY, Hao JH, Li P, Guo H. Effects of propofol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2786-2789

摘要

目的: 研究缺血再灌流时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响及可能机制。

方法: 96只成年♂Wistar大鼠, 随机分为假手术组、缺血再灌流+生理盐水组(I/R+NS)和I/R+异丙酚组(I/R+Pr)。采用夹闭肠系膜上动脉(SMA)的方法制作肠缺血再灌流模型。以上各组分别在再灌流后0, 30, 60, 120和240 min(每时间点8只)处死动物取肠袋组织。采用病理学方法观察肠上皮细胞损伤指数; 原位DNA末端标记法(TUNEL)检测肠上皮细胞凋亡率的变化; 免疫组化法检测肠上皮细胞Caspase-3, bcl-2表达的变化。

结果: I/R+Pr组与I/R+NS组相比, 肠上皮细胞病理变化较轻, 肠上皮细胞的凋亡率明显下降($P < 0.01$), 再灌流后0, 30, 60, 120和240 min肠上皮细胞中Caspase-3阳性细胞数明显

减少(104.4 ± 5.3 vs 146.4 ± 7.6 ; 97.4 ± 6.2 vs 130.4 ± 7.4 ; 134.4 ± 5.1 vs 170.4 ± 8.1 ; 125.4 ± 6.2 vs 160.4 ± 9.5 ; 101 ± 5.8 vs 120.4 ± 8.2 , 均 $P < 0.01$), 而bcl-2阳性细胞数明显增加(13.34 ± 4.12 vs 6.72 ± 2.59 ; 14.96 ± 4.85 vs 8.24 ± 3.13 ; 15.29 ± 5.28 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 9.63 ± 2.89 ; 10.39 ± 3.61 vs 5.96 ± 1.93 ; 11.08 ± 4.83 vs 6.87 ± 2.43 , 均 $P < 0.01$).

结论: 异丙酚能抑制缺血再灌流时肠上皮细胞Caspase-3表达, 而增加bcl-2表达, 减少肠上皮细胞的凋亡。

关键词: 缺血-再灌流; 异丙酚; 肠上皮细胞; 凋亡; 原位DNA末端标记法

赵京禹, 郝建华, 李平, 郭徽. 肠缺血灌流时异丙酚对肠上皮细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2786-2789
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2786.asp>

0 引言

以往认为肠上皮细胞坏死是造成肠黏膜结构破坏, 屏障功能受损的细胞学基础, 但近来研究表明, 肠道缺血再灌流损伤细胞凋亡是肠上皮细胞死亡的主要形式^[1-2]. 我们旨在通过大鼠肠缺血再灌流模型, 观察异丙酚对缺血再灌流时小肠上皮细胞凋亡率、凋亡相关基因Caspase-3、bcl-2的表达及病理形态学的影响, 探讨异丙酚对肠上皮细胞凋亡的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠96只, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 体质量230-250 g. TUNEL试剂盒(德国宝灵曼公司), 采用Power Vision TM两步法进行免疫组织化学检测试剂盒(北京天来生物医学科技公司), 其他试剂均为分析纯. 异丙酚(山东正大福瑞达制药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型分组 实验前适应性饲养1 wk, 术前12 h禁食, 自由饮水. 巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg), 麻醉成功后, 仰卧固定于手术台上, 常规备皮消毒铺无菌洞巾. 取腹部正中切口长约3-4 cm, 将肠管外置并覆盖温盐水纱布, 外用烤灯加温, 保持肠管的湿润和温度. 在距离十二指肠悬韧带后10 cm和18 cm处, 分别用两根一号丝线结扎肠管, 造成长约8 cm肠袋. 无损伤动脉夹夹闭异丙酚, SMA起始部, 阻断SMA血流45 min后, 松夹恢复肠系膜血流, 制成肠缺血再灌流模型. 动物

随机分为缺血再灌流+生理盐水组(I/R+NS组)、缺血再灌流+异丙酚组(I/R+Pr组)和假手术组. I/R+Pr组阻断SMA血流45 min后肠袋内注射异丙酚(0.1 mg/kg), I/R+NS组注射等体积生理盐水. 假手术组行上述操作, 而未夹闭SMA. 以上各组分别在再灌流后0, 30, 60, 120和240 min(每时间点8只)处死动物取肠袋组织. 冲洗后用40 g/L的甲醛溶液固定48 h, 脱水, 常规石蜡包埋, 切片.

1.2.2 苏木素-伊红染色 石蜡切片常规脱蜡至水后, 进行HE染色, 用于光镜下观察病理变化和肠上皮损伤. 每份切片在400倍光镜下随机选择10个视野由病理医师观察, 根据Chiu's^[4]评分方法进行肠上皮损伤测定。

1.2.3 肠黏膜上皮细胞凋亡检测 应用TUNEL法进行细胞凋亡的检测, 在末端脱氧核苷酸转移酶介导下, 使生物素标记的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)掺合在凋亡细胞DNA片段的3-OH末端, 利用标记过氧化物酶的链霉抗生物素蛋白与生物素的特异结合, 加入底物, 通过DAB染色, 在显微镜下凋亡细胞核呈棕黄色. 连续观察10个绒毛、隐窝的高倍视野, 以平均每100个细胞含凋亡细胞个数为凋亡指数(AI)。

1.2.4 Caspase-3和bcl-2在凋亡细胞中表达的检测 对凋亡细胞采用Power Vision TM两步法进行免疫组织化学双染检测, 操作按说明书进行. 石蜡切片常规脱蜡至水, 经过氧化氢处理后, 进行酶修复, 然后用1:100稀释的抗体, 4℃过夜孵育, DAB显色, 甲基绿复染, 常规脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察. 以PBS代替一抗作为阴性对照. 在同一放大倍数下观察, 细胞浆棕色者为阳性, 每个时相点随机取10个视野(400×)进行计数, 计算阳性细胞数。

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示, 用SPSS11.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 光镜下病理改变 正常组肠上皮细胞呈柱状, 刷状缘清晰, 排列整齐. 对照组从再灌流开始时肠上皮细胞略有肿胀, 再灌流时间延长, 肠上皮细胞肿胀逐渐加重, 并出现坏死, 脱落. 黏膜层炎症细胞浸润, 固有层红细胞增多. 治疗组损伤变化趋势同对照组, 但病变程度明显减轻。

2.2 TUNEL染色结果 TUNEL标记阳性染色为棕褐色, 主要位于胞核. 检测表明缺血再灌流组各时间点凋亡指数明显高于假手术组($P < 0.01$),

■创新盘点

外科手术中选用适当的麻醉剂非常重要, 本文通过观察异丙酚对肠缺血再灌流时的上皮细胞凋亡基因及病理变化的影响, 发现异丙酚能抑制缺血再灌流时肠上皮细胞Caspase-3的表达等, 设计恰当简单, 思路较新颖。

■同行评价

本文观察了异丙酚对肠缺血再灌注时上皮细胞凋亡基因及病理变化的影响,设计简单,层次分明,对基础研究和临床研究有一定的参考意义。

表 1 缺血再灌注期间Caspase-3和bcl-2阳性细胞数变化(mean ± SD)

分组	再灌注时间				
	0 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Caspase-3					
假手术组	57.4 ± 4.7	54.9 ± 4.9	55.9 ± 4.4	58.4 ± 3.4	55.4 ± 4.8
I/R+NS组	146.4 ± 7.6 ^b	130.4 ± 7.4 ^b	170.4 ± 8.1 ^b	160.4 ± 9.5 ^b	120.4 ± 8.2 ^b
I/R+Pr组	104.4 ± 5.3 ^d	97.4 ± 6.2 ^d	134.4 ± 5.1 ^d	125.4 ± 6.2 ^d	101 ± 5.8 ^d
bcl-2					
假手术组	18.51 ± 7.73	19.92 ± 8.01	18.74 ± 7.39	20.15 ± 6.85	18.27 ± 7.29
I/R+NS组	6.72 ± 2.59 ^b	8.24 ± 3.13 ^b	9.63 ± 2.89 ^b	5.96 ± 1.93 ^b	6.87 ± 2.43 ^b
I/R+Pr组	13.34 ± 4.12 ^{bd}	14.96 ± 4.85 ^{bd}	15.29 ± 5.28 ^{bd}	10.39 ± 3.61 ^{bd}	11.08 ± 4.83 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 假手术组; ^d $P < 0.01$ vs I/R+NS组。

治疗组时间点凋亡指数明显低于缺血再灌注组($P < 0.01$),但比假手术组高($P < 0.01$,图1)。

2.3 Caspase-3和bcl-2表达 Caspase-3和bcl-2阳性染色为胞质黄染。Caspase-3的表达在I/R组远高于假手术组($P < 0.01$),治疗组的表达明显低于I/R组($P < 0.01$,表1)。bcl-2在I/R组的表达较假手术组低($P < 0.01$),治疗组的表达远高于I/R组($P < 0.01$,表1)。

3 讨论

肠道既是创伤、休克后损伤发生的靶器官,又是SIRS的“启动器官”,肠黏膜缺血再灌注损伤是最终导致MODS的重要病因学基础及中心环节^[3-5]。休克、创伤及复苏过程中脏器尤其是肠道的缺血再灌注损伤的防治已成为相关学科研究的热点和难点。新近研究表明在小肠的缺血再灌注损伤发生时除坏死外,还存在另一种细胞死亡形式—细胞凋亡,而且证实凋亡是肠黏膜上皮细胞死亡的主要方式,占死亡细胞总数的80%^[6]。

异丙酚是一种新型静脉麻醉药,除了麻醉作用外,现认为对缺血再灌注损伤有较强的保护作用。首先异丙酚可减少自由基的生成和维持细胞膜及线粒体功能稳定等作用,对缺血/再灌注损伤具有保护作用^[7]。在化学结构上与内源性抗氧化剂维生素E和已知的抗氧化剂丁化羟基甲苯十分相似。其抗氧化作用的结构基础也正是这种类似的酚羟基结构。异丙酚可直接与自由基反应,生成2,6-二异丙基苯氧基团,同时使自由基灭活。其次,异丙酚能抑制细胞因子的产生和释放。大量研究证明,异丙酚能够影响TNF- α 的产生和释放,且在低浓度时便有较强

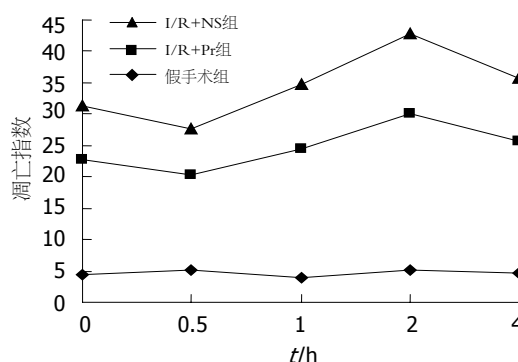


图 1 凋亡指数的变化。

的抑制作用^[8]。另外,异丙酚能抑制细胞内钙离子浓度。有研究表明异丙酚对心肌细胞钙离子通道有抑制作用,降低细胞内钙超载。目前,肠缺血再灌注损伤细胞凋亡的具体发生机制尚未完全阐明。缺血再灌注损伤引起肠上皮细胞凋亡的发生可能包括以下机制:氧自由基直接损伤DNA或攻击蛋白质使许多具有酶活性的蛋白质功能丧失而诱导细胞凋亡;缺血再灌注期间多种因素造成细胞内钙离子超载而导致细胞凋亡;受损的小肠上皮细胞及内皮细胞释放细胞因子和炎症介质,同时加重炎症反应和细胞凋亡;缺血再灌注期间线粒体功能改变而诱导凋亡的发生。进一步研究证实,细胞凋亡的发生主要受凋亡相关基因和酶的调控,这些基因和酶包括起诱导作用的如Caspase家族的酶类、P53等与起抑制作用的如bcl-2等,这些促调因素和抑调因素相互作用,决定了凋亡的启动和抑制。其中Caspase为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteine-requiring aspartate protease, Caspase)家族成员,被认为是各种凋亡刺激因子激活的Caspase家族中的关键酶,活化的Caspase-3可作

用于一些其他Caspase成员而产生瀑布式级联反应,引起细胞形态上的改变,使凋亡最终得以完成^[9-10];同时,Caspase-3直接酶解bcl-2片段使其功能发生根本转变,使后者从抑制凋亡转为触发凋亡.本实验观察到大鼠肠缺血再灌流期间肠黏膜组织Caspase-3表达在缺血再灌流组明显升高,而在治疗组其表达显著降低,Caspase-3阳性表达与TUNEL染色结果基本一致;且治疗组肠黏膜病理损伤明显减轻,提示缺血再灌流时肠黏膜上皮细胞凋亡的发生与促凋亡因素的增强有关.异丙酚能通过抑制促凋亡基因Caspase-3表达,从而抑制缺血再灌流期间肠黏膜上皮细胞凋亡的发生,防治缺血再灌流期间肠黏膜的损伤.本实验结果表明,bcl-2的表达在I/R组降低,而I/R+Pr组bcl-2表达较I/R组显著增高,且I/R+Pr组肠黏膜病理损伤明显减轻,提示缺血再灌流时肠黏膜上皮细胞凋亡的发生与促凋亡因素的增强和抑凋亡因素的减弱有关,异丙酚可能通过抑制促凋亡基因Caspase-3表达同时增加抑凋亡基因bcl-2的表达,从而抑制缺血再灌流期间肠黏膜上皮细胞凋亡的发生,防治缺血再灌流期间肠黏膜的损伤.此外,bcl-2表达与Caspase-3表达的反向趋势变化现象,亦可能与一定量的bcl-2蛋白被Caspase-3酶解有关.

我们的研究表明,肠缺血再灌流损伤期间,Caspase-3高水平表达和bcl-2降低可能是肠黏膜上皮细胞发生异常凋亡的重要机制;而异丙酚通过下调Caspase-3和上调bcl-2表达,从而抑制肠黏膜缺血再灌流时肠黏膜上皮细胞的异常凋亡,减轻肠黏膜缺血再灌流损伤.但异丙酚对

Caspase-3和bcl-2的具体调控机制,有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2029-2032
- 2 Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-528
- 3 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 475-485
- 4 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421
- 5 胡森, 姜小国, 石德光, 吕艺, 黎君友, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. 中国危重病急救医学 2003; 15: 748-750
- 6 Yoo KY, Yang SY, Lee J, Im WM, Jeong CY, Chung SS, Kwak SH. Intracoronary propofol attenuates myocardial but not coronary endothelial dysfunction after brief ischaemia and reperfusion in dogs. *Br J Anaesth* 1999; 82: 90-96
- 7 Gilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, McMurray TJ. The choice of anesthetic maintenance technique influences the antiinflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anesth Analg* 1997; 85: 1394-1398
- 8 Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998; 42: 530-537
- 9 Wang JX, Zheng S. Caspase-3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1821-1824
- 10 Zhan Y, van de Water B, Wang Y, Stevens JL. The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene* 1999; 18: 6505-6512

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

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

慢性乙型肝炎患者CD4+CD25+Treg细胞的检测及意义

沈俊辉, 李 宁, 范学工

■背景资料

CD4+CD25+T调节细胞(regulatory T cell, Treg)是近年来发现的一种新型免疫抑制性调节细胞, 他一方面能保护机体免受过激炎症的损伤, 另一方面亦减轻巨噬细胞等对病原体的杀伤作用, 使机体处于感染的慢性化过程中。

沈俊辉, 范学工, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

李宁, 中南大学湘雅医院输血科 湖南省长沙市 410008
沈俊辉, 2004年邵阳医学院学士, 现为中南大学湘雅医院在读硕士, 主要从事病毒性肝炎的研究。

湖南省科技厅科研基金资助项目, No. 06SK3024

通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院感染病科. xgfan@hotmail.com

电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2007-06-19 修回日期: 2007-08-13

Significance of CD4+CD25+ regulatory T cells in peripheral blood of chronic hepatitis B patients

Jun-Hui Shen, Ning Li, Xue-Gong Fan

Jun-Hui Shen, Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hu'nan Province, China

Ning Li, Department of Blood Transfusion, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hu'nan Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Science and Technology of Hu'nan Province, No. 06SK3024

Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hu'nan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2007-06-19 Revised: 2007-08-13

Abstract

AIM: To investigate the frequency of CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B (CHB) and those with chronic severe hepatitis B (CSHB).

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 19 patients with CHB, 28 with CSHB, 19 hepatitis B carriers, and 19 healthy controls were analyzed for Treg frequency using flow cytometry. The expression of forkhead/winged helix transcription factor (FOXP3) protein in PBMCs was examined by immunohistochemistry. The correlations between Treg frequency and total bilirubin (TBIL), prothrombin activity (PTA) or HBV-DNA were also analyzed.

RESULTS: Results were evaluated for Tregs/PBMCs. The number of Tregs in patients with

CSHB ($4.80\% \pm 1.50\%$) significantly exceeded that in CHB ($1.67\% \pm 0.87\%$), hepatitis B carriers ($0.59\% \pm 0.37\%$) and normal controls ($0.50\% \pm 0.34\%$) ($P < 0.01$). The same results were found between CHB and hepatitis B carriers as well as normal controls ($P < 0.01$). The expression of FOXP3 protein also increased in CSHB and CHB, which paralleled the variation in the number of Tregs. The variation in the number of Tregs correlated positively with that of TBIL ($r = 0.43$, $P < 0.01$) but negatively with that of PTA ($r = -0.57$, $P < 0.05$). There was no correlation between the difference in the number Tregs and that of HBV DNA levels ($r = 0.22$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The results indicate that variations in the number of Tregs are the result of excessive immune and inflammatory reactions. However, the function of Tregs in CSHB and CHB may be defective. The expression of FOXP3 protein also increases in CSHB and CHB patients, paralleling the variations in the number of Tregs.

Key Words: Chronic hepatitis B; Chronic severe hepatitis B; Regulatory T cell; Forkhead/winged helix transcription factor

Shen JH, Li N, Fan XG. Significance of CD4+CD25+ regulatory T cells in peripheral blood of chronic hepatitis B patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2790-2795

摘要

目的: 探讨慢性乙型肝炎患者外周血CD4+CD25+T调节细胞(regulatory T cell, Treg)的变化及其意义。

方法: 采用流式细胞术对66例乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者和19例健康对照者外周血CD4+CD25+Treg细胞进行检测, 并观察CD4+CD25+Treg细胞与患者总胆红素(total bilirubin, TBIL)、凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)和病毒复制指标HBV DNA水平的关系。免疫组化检测叉状头/翅膀状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor, FOXP3)蛋白的表达水平。

结果: 慢性重型肝炎组CD4+CD25+Treg细胞(4.80 ± 1.50)%分别高于慢性肝炎组(1.67 ± 0.87)%、HBV携带者组(0.53 ± 0.37)%和正常对照组(0.50 ± 0.34)%, ($P < 0.01$); 慢性肝炎组与HBV携带者组和正常对照组相比有显著性差异($P < 0.01$); 慢性重型乙型肝炎患者和慢性乙型肝炎患者FOXP3蛋白表达也相应增高, 且与CD4+CD25+Treg细胞的变化相平行. CD4+CD25+Treg细胞的变化与TBIL的变化成正相关($r = 0.43, P < 0.01$), 与PTA的变化成负相关($r = -0.57, P < 0.05$), 与HBV-DNA水平的变化没有相关性($r = 0.22, P > 0.05$).

结论: 在慢性乙型肝炎发病过程中, CD4+CD25+Treg细胞水平相应增高, FOXP3蛋白变化与CD4+CD25+Treg细胞的改变相平行.

关键词: 慢性乙型肝炎; 慢性重型肝炎; CD4+CD25+Treg细胞; 叉状头/翅膀状螺旋转录因子

沈俊辉, 李宁, 范学工. 慢性乙型肝炎患者CD4+CD25+Treg细胞的检测及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2790-2795
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2790.asp>

0 引言

CD4+CD25+T调节细胞(regulatory T cell, Treg)是近年来发现的一种新型免疫抑制性调节细胞, 1995年由Sakaguchi *et al*^[1]首次报道. CD4+CD25+Treg细胞具有低反应性和免疫抑制性两大功能特征^[2]. 而叉状头/翅膀状螺旋转录因子^[3](forkhead/winged helix transcription factor, FOXP3)在CD4+CD25+Treg细胞上特异性表达, 是CD4+CD25+Treg细胞发育和产生功能效应的主要因素.

基于CD4+CD25+Treg细胞独特的免疫效应, 我们认为在慢性乙型肝炎发病过程中, CD4+CD25+Treg对机体的免疫反应可能起着一定的调节作用. 因此, 本研究旨在通过检测慢性乙型肝炎患者CD4+CD25+Treg细胞数量及FOXP3的表达, 来探讨CD4+CD25+Treg细胞在慢性乙型肝炎发病机制中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-06/12湘雅医院感染科门诊及住院乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者66例, 男46例, 女20例, 年龄17-69(平均43)岁. 慢性乙型肝炎组19例, 慢性重型乙型肝炎组28

例, HBV携带者组19例. 另收集健康志愿者组19例, 作为正常对照. 诊断符合2000-09中华传染病与寄生虫病学会、肝病学会西安会议标准^[4]. 排除其他病毒性肝炎、慢性酒精性肝病、药物性肝炎、自身免疫性肝病、遗传性肝病等; 同时排除合并有严重感染、败血症、脓毒症以及近6 mo接受过免疫调节剂和/或抗病毒治疗的患者. PE标记抗CD4和FITC标记抗CD25(Ebioscience公司, 美国); 流式细胞仪(FACSAria™ Cell Sorter, BD公司, 美国); 流式细胞分析软件(FACSDiva Software, BD公司, 美国); 免疫组化所用一抗是小鼠抗人FOXP3抗体(BioLegend公司, 美国); SABC-AP免疫组化试剂盒SA1051(武汉博士德生物工程有限公司, 中国); 倒置显微镜IX-70和高分辨摄像显微镜BX-41(Olympus公司, 日本).

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光标记和流式细胞分析 采集慢性重型乙型肝炎患者组, 慢性乙型肝炎患者组, HBV携带者组, 正常对照组肝素抗凝血5 mL, 淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 采用免疫荧光双标记方法标记细胞表面CD4和CD25分子, 室温中避光孵育30 min. 同型对照管另取1 mL细胞加入鼠抗人CD4-PE 10 μ L, 鼠抗人IgG1-FITC 10 μ L. 流式细胞仪分析细胞表面CD4, CD25分子表达水平. 由全自动生化分析仪测定肝功能、PTA等.

1.2.2 免疫组化检测和涂片法制成PBMC切片 经消除内源性过氧化物酶处理后, 参照免疫组化三步法试剂盒说明书进行免疫组化染色. 最后在高分辨摄像显微镜下摄片, 再用Motic3.2图像分析软件测量免疫阳性灰度值.

统计学处理 数所有数据处理均在SPSS11.0软件包上进行均数 t 检验和ANOVA检验. 各组间比较用多个样本均数间的多重比较, 假设检验采用LSD- t 检验, 组内比较采用配对 t 检验, 两组数据间的相关关系用直线相关分析方法, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 CD4+CD25+Treg细胞数量的变化 实验结果以CD4+CD25+/PBMC来评价. 正常对照组、HBV携带者组、慢性乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组CD4+CD25+Treg细胞表达水平分别为(0.50 ± 0.34)%, (0.53 ± 0.37)%, (1.67 ± 0.87)%和(4.80 ± 1.50)%. 慢性重型肝炎组分别

■ 相关报道

1995年Sakaguchi *et al*首次报道CD4+CD25+Treg调节细胞是一种新型免疫抑制性调节细胞; 2003年Hori *et al*均证明FOXP3在CD4+CD25+Treg细胞上特异性表达, 且FOXP3在CD4+CD25+Treg细胞的发育和功能上是必需的; 2005年Stoop *et al*报道慢性HBV感染者外周血CD4+CD25+Treg细胞数量较正常人增多, 去除CD4+CD25+Treg细胞后, HBV特异性增殖反应增强.

■应用要点

本文研究结果再一次证实了检测乙型肝炎患者外周血CD4+CD25+Treg细胞的临床意义,对深入探讨乙型肝炎的发病机制,寻求有效治疗措施具有指导意义

表 1 各组CD4+CD25+Treg细胞,肝功能指标和免疫阳性的灰度值(mean ± SD)

分组	n	CD4+CD25+Treg细胞(%)	TBIL(μmol/L)	PTA(%)	灰度值
正常对照	19	0.50 ± 0.34 ^{bd}	11.20 ± 2.34	87.70 ± 8.84	165.10 ± 6.21 ^b
HBV携带者	19	0.53 ± 0.37 ^{bd}	11.60 ± 2.32	83.80 ± 7.42	154.70 ± 18.18 ^b
慢性乙型肝炎	19	1.67 ± 0.87 ^b	70.42 ± 36.4	53.70 ± 8.17	147.30 ± 13.36 ^b
轻度	6	0.48 ± 0.30 ^f	25.00 ± 4.61	67.70 ± 2.73	156.94 ± 11.30 ^f
中度	6	1.03 ± 0.15 ^{fh}	71.70 ± 16.57	58.00 ± 5.40	143.98 ± 3.03 ^{fh}
重度	7	4.00 ± 0.90	107.70 ± 11.11	50.30 ± 4.23	133.04 ± 7.66
慢性重型乙型肝炎	28	4.80 ± 1.50	487.30 ± 119.10	34.70 ± 4.42	117.8 ± 25.54
未恢复	12	3.40 ± 0.90	500.00 ± 120.92	35.10 ± 4.28	112.42 ± 20.99
恢复	16	4.00 ± 1.10	475.80 ± 116.27	34.40 ± 4.66	123.16 ± 30.09

^b*P*<0.01 vs 慢性重型乙型肝炎; ^d*P*<0.01 vs 慢性乙型肝炎; ^f*P*<0.01 vs 重度肝炎; ^h*P*<0.01 vs 轻度肝炎.

高于慢性肝炎组、HBV携带者组和正常对照组(*P*<0.01);慢性肝炎组高于HBV携带者组和正常对照组(*P*<0.01);与正常对照组相比,HBV携带者组CD4+CD25+Treg细胞的变化无明显差异(*P*>0.05)(表1,图1).在19例慢性肝炎患者中,其中包括慢性重度肝炎、慢性中度肝炎和慢性轻度肝炎,他们的CD4+CD25+Treg细胞分别为(4.00±0.90)%, (1.03±0.15)%, (0.48±0.30)%.慢性重度肝炎组分别高于慢性中度和慢性轻度肝炎组(*P*<0.01);慢性中度肝炎组高于慢性轻度肝炎组(*P*<0.01,表1).

追踪观察28例慢性重型肝炎患者,其中12例患者病情恶化,未恢复,其在发病期CD4+CD25+Treg细胞为(3.40±0.90)%;16例患者恢复好转,其在发病期CD4+CD25+Treg细胞为(4.00±1.10)%,这两者之间比较差异无显著性意义(*P*>0.05,表1).

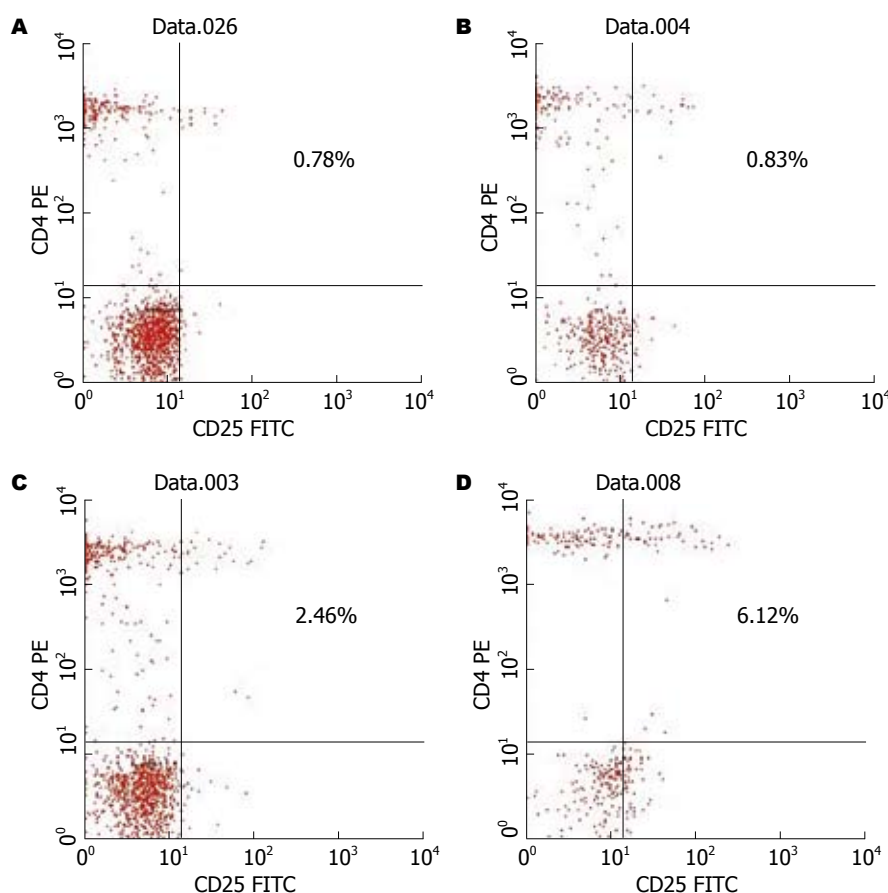
2.2 免疫组织化学检测FOXP3的表达 根据Motic3.2图像分析软件测量结果,免疫阳性反应越强其灰度值则越低,即FOXP3表达越强则灰度值越低.慢性重型肝炎组免疫阳性灰度值(117.80±25.54)分别低于慢性肝炎组(147.30±13.36)、HBV携带者组(154.70±18.18)和正常对照组(165.10±6.21)(*P*<0.01,表1,图2).在慢性肝炎患者组中,慢性重度肝炎组免疫阳性灰度值(133.04±7.66)分别低于慢性中度肝炎组(143.98±3.03)和慢性轻度肝炎组(156.94±11.3)(*P*<0.01);慢性中度肝炎组免疫阳性灰度值(143.98±3.03)低于慢性轻度肝炎组(156.94±11.30)(*P*<0.01,表1).慢性重型肝炎恢复组免疫阳性灰度值(123.16±30.09)和未恢复组(112.42±20.99)比较,差异无显著性意义(*P*>0.05,表1).

2.3 CD4+CD25+Treg细胞的变化与FOXP3, TBIL, PTA, HBV-DNA的直线相关性分析 CD4+CD25+Treg细胞的变化与FOXP3水平的变化没有相关性[*n* = 47(包括慢性肝炎组和慢性重型肝炎组), *r* = -0.22, *P*>0.05];与TBIL的变化成正相关[*n* = 47(包括慢性肝炎组和慢性重型肝炎组), *r* = 0.43, *P*<0.01];与PTA的变化成负相关[*n* = 47(包括慢性肝炎组和慢性重型肝炎组), *r* = -0.57, *P*<0.05];与HBV-DNA水平的变化没有相关性[*n* = 47(包括慢性肝炎组和慢性重型肝炎组), *r* = 0.22, *P*>0.05](图3).

3 讨论

免疫应答时序和强弱的调节是保证机体自稳的重要机制.在长期的进化过程中,机体的免疫系统形成了精密的调节机制,以控制免疫应答的质和量.20世纪70年代免疫学家就发现机体存在抑制性T细胞,是维持外周免疫耐受的重要因素,然而由于缺乏特异性标志,难以得到认同.近年来有关CD4+CD25+Treg细胞的研究使得人们逐渐接受调节性T细胞的概念^[5-8].

国外报道了CD4+CD25+Treg细胞在慢性乙型肝炎发病机制中的作用,该细胞可以通过抑制HBV特异性的CD8+T细胞的激活,一方面抑制过度免疫病理损伤,另一方面也可能有利于病毒的持续感染^[9-11].2005年Stoop *et al*^[12]报道慢性HBV感染者外周血CD4+CD25+Treg细胞数量较正常人增多,去除CD4+CD25+Treg细胞后,HBV特异性增殖反应增强.我们起初认为,慢性乙型肝炎发病过程中可能存在CD4+CD25+Treg细胞数量减少和/或功能的缺陷,以至于不能抑制机体的过强的免疫反应从而导致肝细胞的损害.我们的实验结果显示:慢性重型乙型肝炎患者和慢



同行评价

本文研究慢性乙型肝炎患者CD4+CD25+Treg的检测及意义, 文章层次清楚, 数据可信, 结果客观, 有一定的学术和实际应用价值。

图1 流式细胞仪检测各组的CD4+CD25+Treg细胞示意图。A: 正常对照; B: HBV携带者; C: 慢性肝炎; D: 重型肝炎。右上角表示CD4+CD25+Treg细胞/PBMC。CD4+CD25+Treg细胞数由低到高依次为: 正常对照组<HBV携带者组<慢性乙型肝炎组<慢性重型肝炎组。

性乙型肝炎患者CD4+CD25+Treg细胞水平明显高于HBV携带者和正常人。在19例慢性肝炎患者中, 慢性重度肝炎组高于慢性中度和慢性轻度肝炎组, 慢性中度组高于慢性轻度肝炎组。目前CD4+CD25+Treg细胞水平增高的原因仍然不明确, 我们考虑可能的原因有: (1)慢性的HBV感染过程中宿主出现过度的免疫病理损伤和炎症反应, 导致CD4+CD25+Treg细胞水平相应增高, 使得二者之间在一个新的高度达到平衡; (2)虽然在慢性重型乙型肝炎患者和慢性乙型肝炎患者中的CD4+CD25+Treg细胞水平明显增高, 但是他的功能可能存在缺陷, 所以仍然不能有效抑制机体过度的免疫反应; (3)还有其他很多因素参与肝损伤的发病过程, 例如肝损伤后继发引起肠源性内毒素血症, 内毒素介导产生细胞因子和炎症介质对肝脏产生毒性作用, 造成微循环障碍等。这些因素的共同作用可能超过CD4+CD25+Treg细胞的免疫抑制作用, 所以出现了肝损伤。总之, 目前CD4+CD25+Treg细胞水平增高的原因仍不明确, 有待于日后的研究进一步探讨。

我们的研究发现, HBV携带者的

CD4+CD25+Treg细胞水平变化和正常对照组无明显差异, 考虑可能的原因是: 虽然HBV携带者的临床免疫状态是非消除性免疫, 但是机体免疫系统仍处于一个相对平衡的状态。所以HBV携带者的CD4+CD25+Treg细胞数量和功能基本正常。本组资料显示, CD4+CD25+Treg细胞水平与外周血浆TBIL呈显著正相关, 与PTA呈负相关, 说明CD4+CD25+Treg细胞水平与病情的严重程度相关。此外, 我们还发现, CD4+CD25+Treg细胞水平与HBV-DNA的水平变化无相关关系, 提示CD4+CD25+Treg细胞水平与HBV复制是否活跃不存在相关关系。

追踪观察23例慢性重型肝炎患者, 发现未恢复的患者发病期CD4+CD25+Treg细胞表达水平与恢复的患者CD4+CD25+Treg细胞表达水平差异无显著性意义。提示CD4+CD25+Treg细胞表达水平不能反应慢性乙型肝炎患者的预后。有多种因素可以影响慢性乙型肝炎患者的预后。

2003年Hori *et al*^[13-15]研究小组均证明FOXP3在CD4+CD25+Treg细胞上特异性表达, 且FOXP3在CD4+CD25+Treg细胞的发育和功能上

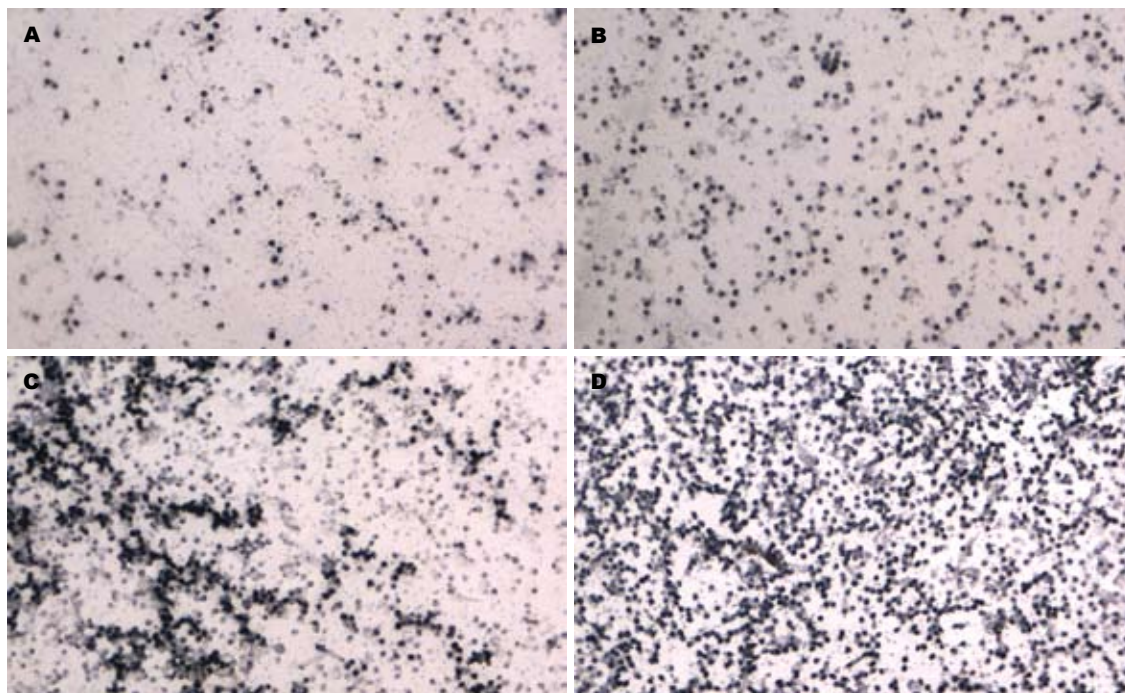


图2 各组细胞FOXP3的表达情况示意图($\times 100$)。A: 正常对照; B: HBV携带者; C: 慢性乙型肝炎; D: 慢性重型乙型肝炎。因免疫组化试剂盒所用的显色底物为溴氯羟吲哚磷酸盐(5-bromo-4-chloro-3-indodol phosphate, BCIP), 经酶水解并氧化形成靛蓝, 而氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)在此氧化过程中被还原成不溶性紫蓝色沉淀。所以免疫阳性细胞呈现紫蓝色。免疫阳性细胞数由低到高依次为: 正常对照组<HBV携带者组<慢性乙型肝炎组<慢性重型肝炎组。

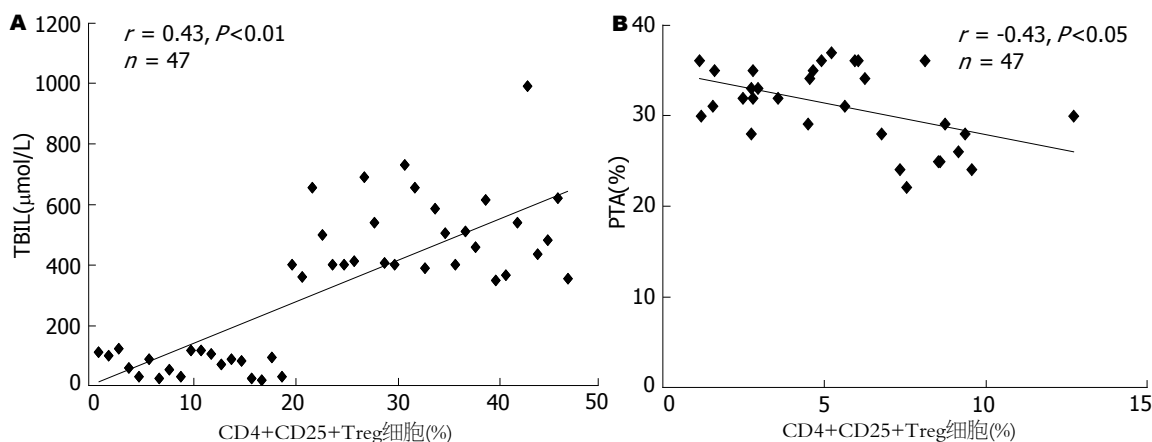


图3 CD4+CD25+Treg细胞与TBIL, PTA直线相关性分析。A: CD4+CD25+Treg细胞与TBIL; B: CD4+CD25+Treg细胞与PTA。

是必需的。然而FOXP3表达和CD4+CD25+Treg细胞并不完全一致。实验证实^[16], 缺失功能性的FOXP3可导致CD4+CD25+Treg细胞种群全部丧失对自身反应细胞的抑制功能, 从而大大加剧自身免疫性疾病的某些症状, 以至Scurfy鼠迅速死亡, 而通过去除鼠的CD4+CD25+Treg细胞引起的自身免疫性疾病不会导致鼠的迅速死亡。由此可见, 目前CD4+CD25+Treg细胞和FOXP3的对应关系还存在争议。我们的研究也发现, 慢性乙型肝炎及慢性重型乙肝患者FOXP3蛋白的表达均高于HBV携带者组和正常人组, 其变

化与CD4+CD25+Treg细胞数量的改变相平行。但是二者之间没有相关关系($r = -0.22$, $P > 0.05$)。其确切原因不清楚, 可能还有其他细胞表达FOXP3 mRNA和/或FOXP3 mRNA的表达受到其他基因调控的影响。

4 参考文献

- 1 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.

- J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- 2 Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400
- 3 Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 37672-37679
- 4 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 肝脏 2000; 5: 257-262
- 5 Furtado GC, Olivares-Villagomez D, Curotto de Lafaille MA, Wensky AK, Latkowski JA, Lafaille JJ. Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev* 2001; 182: 122-134
- 6 Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004; 78: 2454-2459
- 7 Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502-507
- 8 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1062-1071
- 9 Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WA. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108: 219-225
- 10 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-3328
- 11 Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 2003; 198: 889-901
- 12 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778
- 13 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061
- 14 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337-342
- 15 Ramsdell F, Ziegler SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 718-724
- 16 Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000; 106: R75-R81

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知

本刊讯 由中华医学会消化内镜学分会主办, 江西省医学会消化内镜专业委员会、南昌大学第一附属医院承办的中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学术研讨会将于2007-11-02/04在江西南昌举行. 届时将邀请美国、香港等国家和地区的国际著名消化内镜专家及国内知名消化内镜专家莅临大会.

1 会议内容

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会; 青年内镜医师培训讲座; 消化内镜新进展讲座; 青年委员专题讲座.

2 联系方式

徐萍, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科. 电话: 0791-8692506或0791-8692540, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn.

经胃腹腔内镜手术的研究进展

孙涛, 王少鑫

■研究前沿

当前“微创”所要求的不仅仅是如何减轻痛苦和缩短恢复时间,更重要的是如何最大限度的减少创伤,避免一切并发症。经口经胃进入腹腔进行的一系列镜下手术操作过程部分地解决了这一难题。

孙涛, 王少鑫, 中国人民解放军海军总医院消化内科 北京市 100037

通讯作者: 孙涛, 100037, 北京市, 中国人民解放军海军总医院
消化内科. haijunxiaohua@sohu.com

电话: 010-66958121

收稿日期: 2007-02-08 修回日期: 2007-09-03

Advances in experimental studies of peroral transgastric endosurgery

Tao Sun, Shao-Xin Wang

Tao Sun, Shao-Xin Wang, Department of Gastroenterology, Navy General Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100037, China

Correspondence to: Tao Sun, Department of Gastroenterology, Navy General Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100037, China. haijunxiaohua@sohu.com

Received: 2007-02-08 Revised: 2007-09-03

Abstract

Since peritoneoscopic surgery was first carried out, this minimal trauma surgery has become widely applied. Recently, endoscopic surgeries from a natural orifice into the abdominal cavity have become a reality, especially for transgastric surgery of the abdomen. Various animal studies, such as those involving transgastric endoscopic gastrojejunostomy and cholecystectomy, transgastric abdominal tissue biopsy, transgastric cholecystic surgery, transgastric ligation of fallopian tubes, transgastric endoscopic spleen resection, endoscopic appendectomy and transgastric peripancreatic necrosis debridement, have been reported. Some of these surgical procedures have been performed in patients, indicating the emergence of this form of minimal trauma abdominal surgery. However, these surgical techniques are still at a primary stage. Further coordination between specialists should help overcome any remaining deficiencies and enable perfection of this technique, leading to its eventual clinical application.

Key Words: Laparoscope; Endosurgery

Sun T, Wang SX. Advances in experimental studies of peroral transgastric endosurgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2796-2799

摘要

自从人类首次行腹腔镜胆囊手术以来,微创手术已有了巨大发展。近2 a来人们又开始了由天然管腔(natural orifice)进入腹腔进行一系列内镜下的手术操作,特别是由胃腔进入腹腔。人们已先后在动物完成了经胃内镜胃空肠吻合术和胆囊切除术;经胃腹腔内组织活检;经胃胆道系统内镜手术;经胃输卵管接扎;经胃内镜脾切除;经胃阑尾切除;经胃内镜腹膜后胰腺清创术等手术。其中一些手术已在人类完成,这为腹部手术进入真正微创提供了一个新平台。但此项技术仍处于早期发展阶段,他涉及多专科的合作,仍需要克服许多不足,不断使之完善,最终服务于临床。

关键词: 腹腔镜; 腹腔内镜手术

孙涛, 王少鑫. 经胃腹腔内镜手术的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2796-2799

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2796.asp>

0 引言

自从1987年首次行腹腔镜胆囊手术以来,微创手术领域已有了巨大发展。当前“微创”所要求的不仅仅是如何减轻痛苦和缩短恢复时间,更重要的是如何最大限度的减少创伤,避免一切并发症。由天然管腔“natural orifice”进入腹腔进行的一系列镜下手术操作过程部分地解决了这一难题,这一新技术预示着腹部手术正进入微创的新阶段。

1 内镜下经胃腹腔手术

1.1 内镜胃空肠吻合术和胆囊切除术 1991年由 Swain *et al*^[1]在动物实验中首次描述了采用弹簧压缩扣(spring compression button)或(magnets)进行胃空肠吻合术,在此项实验中利用的是微小腹腔镜进入空肠。此后该研究组又报道了活体猪在超声内镜引导下由胃进入空肠和胆囊腔,并最终完成吻合术的实验研究^[2]。12只实验猪中,其中6只动物成功的进行了胃空肠吻合术,而其他6只动物成功进行了胃胆囊吻合。在术

后第4天、第1、2周中进行的内镜检查和死后21 d和28 d进行的尸检中均证实了手术切口的完全吻合,直径在3-9 mm之间。而Bergstrom *et al*^[3]仅采用双腔内镜下即完成了对12只猪进行的胃空肠吻合术的研究。将猪用流食喂养3 d后行全身麻醉,采用可曲式内镜经口伸入胃中、用针刀将胃壁切开,括约肌切开刀将切开口扩大至1.5 cm,双孔道内镜由此伸入腹腔中,通过胃镜将腹腔充气,待腹腔视野清晰后,对邻近小肠用钳子后面的勒除器(snare-over-forceps)将空肠拖入胃内,并在胃的深层肌肉中进行成对缝合,将小肠与胃牢固地连接在一起,进入胃内的小肠再用针刀切开、以便使吻合口开放,随后观察10 d,实验猪均存活良好。整个实验证实了单独采用新型双腔内镜完成经胃内镜下胃空肠吻合术是可行的。而且随着仪器设备的改进,通过内镜途径减轻梗阻性肿瘤、如胰腺癌的压迫症状,进而缓解患者病情将是非常具有发展潜力的。

1.2 经胃腹腔镜内组织活检 2004年由Kalloo *et al*^[4]研究组首次报道了经口内镜下腹腔内肝活检的研究。对12只50 kg猪先在胃造口前用抗生素溶液灌洗胃,然后用针刀造成急性胃穿孔,后胃切口由牵拉型扩约肌牵张器或球囊扩张器扩大。腹腔内由内镜注气以便看清右半肝区,再用内镜活检钳进行肝活检,然后用4到6个内镜夹将切口关闭。所有猪均在此过程后24 h内恢复进食,在14 d的内镜检查中显示胃切口完全恢复。同时被处死动物的尸检表明肝活检部位完全愈合,无腹腔感染的证据。此项研究表明,在猪模型中可以安全的采用内镜技术经胃进入腹腔,并完成组织观察和器官活检等操作。但若在人完成上述工作,还需要进一步的研究,以确立此项技术的安全性和适应性。

1.3 经胃胆系内镜手术 2005年来自于伦敦的Park *et al*^[5]在猪身上采用单腔和双腔内镜进行了经胃胆囊切除术和胆囊胃吻合术,并报道了相关研究结果,检验了为配合此项实验设计的内镜设备、内镜缝合器以及针刀,导丝组合装置进行实验的可行性。在胃体或胃窦部利用针刀产生胃切口,并在导丝引导下进入腹腔。引导丝利用18 mm直径球囊扩张肌层,随后内镜被推进腹腔,充气产生并维持气腹,然后利用内镜夹拖胆囊壁进入胃中进行了胆囊胃的吻合,再利用内镜缝合器完成整个吻合过程。整个过程需要的时间从40 min到2.5 h不等,8只猪的存活研究被相继完成,所有猪均存活14-28 d。采用经球

囊扩张肌层的方法,相对于括约肌切开更有益于当内镜撤除时自发关闭气腹,而后者则要求整个关闭过程更为精细。内镜缝合器由新式缝针、标志线组成,并通过2.8 mm的内镜辅助孔径完成,整个胃壁切口的关闭只需2到4个缝线即可完成。此研究结果预示随着此项技术的发展成熟,减肥手术将成为可能。

1.4 经胃输卵管接扎 2005年Jagannath *et al*^[6]完成了对6只动物进行的经口内镜下行经胃输卵管接扎的可行性和安全性的研究。术前首先对内镜设备进行严格消毒(戊二醛灭菌和环氧乙烷消毒),并用新霉素/硫酸多黏菌素-B溶液灌胃,然后对子宫输卵管进行基础造影摄片。胃壁用针刀切开并由一个球囊扩张至20 mm,进入腹腔后由内镜注气并维持气腹,再通过开放的内圈套放置抓取钳,以便抓取输卵管。两个内圈套被放置在一个单独的输卵管上,而另一个输卵管进行对照。在无需关闭胃壁切口的情况下内镜被撤除。操作后的子宫输卵管造影摄片表明输卵管完全闭塞。在进行输卵管接扎后,1只猪被立即处死,而其他5只猪则分别在2-3 wk后先后进行尸检。尸检结果证实所有动物均无腹腔内感染的征象,接扎管腔闭塞、并无脓肿存在。此项研究证实了在猪模型中经胃内镜下输卵管接扎的安全性和有效性。但在人类还缺乏一定的研究结果加以证实,一旦此安全性和技术问题被解决,此项技术将很快应用到需行避孕措施的人群^[7]。

1.5 经胃内镜脾切除 2006年Kantsevov *et al*^[8]对3只猪成功的实施了经胃脾切除的可行性研究。利用一双腔内镜和一扩约器,产生了1.5 cm的胃壁切口。内镜由此切口进入,并由内镜注气造成气腹,在左上腹找到脾脏,由内镜辅助管腔伸入内圈套接扎脾血管,用钝性电烙器切除脾脏。术后3只猪均未发现明显出血等并发症,实验的安全性得到证实。但此项手术是否可在人类进行尚无研究证实。

1.6 经胃阑尾切除 自1976年Wirtschafter *et al*^[9]首次施行镜下切除阑尾残端手术并获得成功以来,关于内镜下阑尾切除术已有多家报道,但多于结肠镜下进行。2005年由Unger *et al*报道的一项结肠镜下行腔内阑尾切除术的研究中证实了在人类此方法也可进行。在11例人尸体结肠中,将导丝通过内镜辅助管腔伸入顶端、利用反转装置将阑尾反转入盲肠腔,在阑尾基底部利用内圈套、夹子或线打结关闭阑尾腔,最后采用

■应用要点

经胃腹腔镜内镜手术可以成功识别大多数腹腔内脏器官,并顺利完成器官和病灶的手术操作过程,技术上可行、并发症少。随着此项技术的逐步完善,有望逐渐代替传统的开腹手术。

■同行评价

本文较全面的综述了经胃腹腔内镜手术的研究进展,内容新颖,行文流畅,论述全面,层次清晰,有一定的可读性。

勒除器透热法完成整个阑尾切除过程。而Ponsky *et al*^[10-11]则报道了胃镜下实施阑尾切除术的成功,内镜进入腹腔的方法与前类似,入腹腔后在内圈套和内镜夹的协作下阑尾被切除,并由胃切口移除,术后未见并发症发生。

1.7 经胃内镜腹膜后胰腺清创术 Seifert *et al*^[12]报道了利用Dormia取石网在3位患者行经胃内镜下坏死胰腺清创术的研究,而其中的一位患者同时还进行了经胃坏死脾脏的切除。对胰腺邻近胃壁切开造口,内镜下直接进入腹腔内,再将感染的坏死胰腺组织用Dormia取石网清除,术后3位患者均获得症状上较快的临床缓解、并无严重的并发症发生。经胃内镜手术的操作过程不同于开放清创术具有较高的发病率和死亡率,而是一种新型可替代的微创技术。

2 经胃腹腔内镜手术的优势

尽管内镜手术需要产生的穿孔曾被认为是内镜检查的主要并发症,然而近来的多项研究表明采用传统内镜经口经胃途径进入腹腔在技术上是安全、有效的,手术范围明显扩大,而且此方法避免了腹部切口、使传统手术中可能出现的,如伤口感染、疝膨出、腹壁瘢痕、慢性腹壁疼痛、粘连等并发症减少到最低,具有降低病死率的潜力。另一方面,由于此过程中减轻了麻醉深度、使相应的麻醉风险也大大降低,康复时间明显缩短。同时鉴于此过程的创伤小,可能更有利于在肥胖、衰弱患者以及需要重复操作监测腹腔内转移癌种植等患者中进行,当然此类潜在优势还有待进一步长期研究。在人们对减少手术创伤和降低术后并发症的要求愈来愈高的今天,为避免各种额外创伤,经天然管腔进行手术不能不说是一项理想的选择。

3 经胃内镜手术存在的局限性

1995年以来已有多个研究证实了可曲式内镜行经胃腹腔手术的可行性,包括器官的活检、切除、输卵管接扎以及脏器间的吻合等。但在前沿技术的飞速发展,早期的不成熟不可避免的将要面临一些不合理因素,必须解决这些技术上的缺憾。

3.1 术后感染 众所周知,由于胃具有较好的血运、而且器官壁较厚,胃损伤后会很快恢复。只要胃pH值在3到4之间细菌的种植就会非常低,空腹时胃穿孔,腹腔的细菌感染是很少见的。而如果对胃腔进行抗生素灌洗处理则可能使pH值

持续上升,引起细菌如肠杆菌,念珠菌和假单孢菌的过度生长。Merrifield *et al*^[13]在实验中为了促进胃切口的愈合使用的抗酸和质子泵抑制剂可能对经胃手术过程非常不利。而且所有术中内镜均必须通过口腔下行沿口咽管和食道进入胃,不可避免的传播了细菌,内镜顶端是工作内镜出口部位也会被污染,尽力避免术后感染,则须大量实验来证实其安全性。

3.2 内镜装置的不完善 在由Merrifield *et al*^[13]进行的研究中2/5猪由于胃切口未完全闭合而呈现出脓毒并发症,在经口食物摄入后胃内细菌负荷增加了,胃内污染成分的持续渗漏和溢出导致了腹膜炎。当前实验研究中对胃切口的关闭多采用内镜夹进行,而内镜夹主要用途在于止血,若胃切口有较大间隔和组织血肿,可能使切口的关闭非常困难,改进有效的内镜缝合器、吻合器或内镜夹对于严密关闭胃切口是非常必要的,否则会造成严重的并发症,若能够改进和使用安全性良好、令人信服的胃关闭设备,在人类实施简单的经胃手术将很快实现。另一方面,当前使用的内镜过于屈曲不能提供有力的抓取和/或吻合部位的回缩,限制了一些复杂手术的进行。手术中大多数被处理的病理标本都有较大尺寸,常合并感染、癌变等,而可曲式内镜设备孔径有限,经胃、经食管、最终经口取出标本的最大尺寸也受限;感染或癌性器官在切除和取出过程中还可能引起腹腔渗漏和肿瘤出血,增加手术过程的复杂性,在当前辅助设备的帮助下还不能保证其完全进入内袋,将标本取出,需进行精细调整方可很好控制,大大延长了操作时间和增加其复杂性^[14]。因此,改进当前内镜设备,使之能够在腹腔内或胃内将组织压缩或处理才能方便手术。

3.3 组织损伤 在内镜手术中由于内镜较长又比较屈曲,操作过程中前端触感会明显降低,直接和间接邻近器官的撕裂或不慎出血都可能发生,而即使较少的出血也有引发感染血肿的危险。而且屈曲的内镜不能够提供强有力的抓取,使腹腔内内镜复杂操作和固定都很困难,在手术过程中对邻近器官组织的损伤有时是不可避免的。

3.4 学科界定 经胃内镜手术进入腹腔后所进行的无论手术或活检操作,已超出目前胃镜医生所涉及范围。他累及腹腔所有器官,不光是内外科还涉及其他多学科,由谁来完成操作,是否需专科医生指导,临床上仍将是需进行界定的问题。

人们对手术条件和预后要求的不断增加, 有力的刺激了对手术方法的改进, 未来手术毫无疑问的将继续集中于微创领域. 采用较小的手术切口可以减轻术后疼痛和缩短术后恢复时间, 内镜下经胃行腹腔手术巧妙地利用了潜在的天然管腔达到诊断治疗目的, 使微创理念得到了合理的延伸. 实验研究表明采用此方法可以成功识别大多数腹腔内脏器官, 并顺利完成器官和病灶的手术操作过程, 技术上可行、并发症少. 随着此项技术的逐步完善, 有望逐渐代替传统的开腹手术. 但此项技术仍处于早期发展阶段, 仍具有一定的局限性, 还有待进一步研究改进.

4 参考文献

- 1 Swain CP, Mills TN. Anastomosis at flexible endoscopy: an experimental study of compression button gastrojejunostomy. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 628-631
- 2 Fritscher-Ravens A, Mosse CA, Mukherjee D, Mills T, Park PO, Swain CP. Transluminal endosurgery: single lumen access anastomotic device for flexible endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 585-591
- 3 Bergstrom M, Ikeda K, Swain P, Park PO. Transgastric anastomosis by using flexible endoscopy in a porcine model (with video). *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 307-312
- 4 Kalloo AN, Singh VK, Jagannath SB, Niiyama H, Hill SL, Vaughn CA, Magee CA, Kantsevov SV. Flexible transgastric peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 114-117
- 5 Park PO, Bergstrom M, Ikeda K, Fritscher-Ravens A, Swain P. Experimental studies of transgastric gallbladder surgery: cholecystectomy and cholecystogastric anastomosis (videos). *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 601-606
- 6 Jagannath SB, Kantsevov SV, Vaughn CA, Chung SS, Cotton PB, Gostout CJ, Hawes RH, Pasricha PJ, Scorpio DG, Magee CA, Pipitone LJ, Kalloo AN. Peroral transgastric endoscopic ligation of fallopian tubes with long-term survival in a porcine model. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 449-453
- 7 Westhoff C, Davis A. Tubal sterilization: focus on the U.S. experience. *Fertil Steril* 2000; 73: 913-922
- 8 Kantsevov SV, Hu B, Jagannath SB, Vaughn CA, Beitler DM, Chung SS, Cotton PB, Gostout CJ, Hawes RH, Pasricha PJ, Magee CA, Pipitone LJ, Talamini MA, Kalloo AN. Transgastric endoscopic splenectomy: is it possible? *Surg Endosc* 2006; 20: 522-525
- 9 Wirtschafter SK, Kaufman H. Endoscopic appendectomy. *Gastrointest Endosc* 1976; 22: 173-174
- 10 Ponsky JL. Gastroenterologists as surgeons: what they need to know. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 454
- 11 Hochberger J, Lamade W. Transgastric surgery in the abdomen: the dawn of a new era? *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 293-296
- 12 Seifert H, Wehrmann T, Schmitt T, Zeuzem S, Caspary WF. Retroperitoneal endoscopic debridement for infected peripancreatic necrosis. *Lancet* 2000; 356: 653-655
- 13 Merrifield BF, Wagh MS, Thompson CC. Peroral transgastric organ resection: a feasibility study in pigs. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 693-697
- 14 Swannstrom LL, Kozarek R, Pasricha PJ, Gross S, Birkett D, Park PO, Saadat V, Ewers R, Swain P. Development of a new access device for transgastric surgery. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1129-1136; discussion 1136-1137

编辑 王晓瑜 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

消化内镜诊疗技术研讨班通知(第一轮)

本刊讯 2007年国家继续医学教育项目“消化内镜诊疗技术研讨班”(项目编号2007-03-03-046)将于2007-11在青岛市举办, 由青岛大学医学院附属医院主办、世界华人消化杂志协办, 特邀国内外著名专家进行专题讲座和现场演示, 欢迎消化内镜工作者投稿参会, 优秀稿件可优先发表. 回执或投稿请于2007-09月底前寄青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心, 刘希双收, 邮编: 266003, E-mail: liuxishuang1@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672.

肝细胞钙振荡的研究进展

张嫣璐, 张宗明

■背景资料

钙振荡是胞质游离钙的一种较为普遍的运动形式。肝细胞在受到激动剂刺激后出现规律性的钙振荡, 其发生机制仍有许多未知环节。肝细胞钙振荡参与肝细胞的多种生理功能, 对其进行深入研究, 具有重要的基础医学理论和临床医学实践意义。

张嫣璐, 同济大学附属同济医院普外一科 上海市 200065
张宗明, 清华大学第一附属医院消化中心普外科 北京市 100016
国家自然科学基金资助项目, No. 30270532, 30670774
教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金资助项目, 教技函 No. 2002-48
清华-裕元医学科学研究基金资助项目, No. 20240000531, 20240000547
通讯作者: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化中心普外科。
zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322
收稿日期: 2007-07-27 修回日期: 2007-09-11

Advances in calcium oscillations of hepatocytes

Yan-Lu Zhang, Zong-Ming Zhang

Yan-Lu Zhang, Department of 1st General Surgery of Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China
Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30270532, 30670774; Trans-Century Training Programme Foundation for the Talents by the Ministry of Education of China, Official Letter No. 2002-48; and Tsinghua-Yu-Yuan Medical Sciences Fund, No. 20240000531, 20240000547

Correspondence to: Professor Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, 6 Yijiefang, Jiuxian Bridge, Chaoyang District, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2007-07-27 Revised: 2007-09-11

Abstract

In hepatocytes, agonists of calcium oscillations induce regular oscillations. Cooperation among the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor (IP_3R) of the endoplasmic reticulum (ER), calcium channels and Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases of the plasma membrane is involved in the mechanism underlying oscillations of $[Ca^{2+}]_i$. The characteristics and means of propagation of Ca^{2+} oscillations are different between single cells and multicellular systems (for example, vasopressin, ATP and agonists of α -adrenergic receptors) and inhibitors (such as cations, niflumic acid, U73122, SK&F96365, 2-APB and tetrandrine) are often used to investigate calcium oscillations. Calcium oscillations play an essential role in several physiological functions.

It is significant to regulate it to improve the physiological functions.

Key Words: Hepatocytes; Calcium oscillations; Agonists; Inhibitors

Zhang YL, Zhang ZM. Advances in calcium oscillations of hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2800-2804

摘要

肝细胞在受到激动剂刺激后出现规律性钙振荡, 其发生机制与肝细胞内质网膜上的 IP_3R 、质膜上的钙离子通道及钙泵有关。单个肝细胞的钙振荡与耦合肝细胞群的钙振荡具有各自的特征及传播方式。常用的肝细胞钙振荡激动剂有血管加压素、三磷酸腺苷、 α 受体激动剂等。常用的肝细胞钙振荡抑制剂有阳离子、尼氟灭酸、U73122、SK&F96365、2-APB、粉防己碱等。肝细胞钙振荡参与肝细胞的多种生理功能, 对钙振荡进行有效调节, 对提高肝细胞生理功能有着重要的意义。

关键词: 肝细胞; 钙振荡; 激动剂; 抑制剂

张嫣璐, 张宗明. 肝细胞钙振荡的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(26): 2800-2804

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2800.asp>

0 引言

钙振荡是胞质游离钙的一种较为普遍的运动形式。肝细胞是一种非兴奋性细胞, 不存在自发钙振荡, 但在受到激动剂刺激后出现规律性的钙振荡。胞质内钙离子通常以浓度振荡的方式转导多种生理学信息, 影响细胞分化、成熟和凋亡等各种生理过程。肝细胞钙振荡与肝细胞的多种生理功能相关, 因此研究肝细胞钙振荡具有重要的基础医学理论和临床医学实践意义, 现将肝细胞钙振荡的研究进展综述如下:

1 肝细胞钙振荡发生机制

关于兴奋性细胞钙振荡的发生, 一般认为与细胞质膜的去极化和电压依赖性钙离子通道有

关. 对于非兴奋性细胞, 目前比较认可的钙振荡发生机制理论是: 激动剂在胞外与细胞膜上的G蛋白耦联受体结合后, 胞内G蛋白的G α 亚基被激活, 进而激活磷脂酶C(PLC); 活化的PLC催化膜脂肌醇二磷酸(PIP₂)水解产生三磷酸肌醇(IP₃)和甘油二酯(DG); IP₃与内质网(ER)膜上的特异性受体结合, 导致胞内钙池的Ca²⁺通道开放, 引起钙池内的Ca²⁺大量释放, 胞质Ca²⁺浓度升高; 起始阶段的Ca²⁺释放可以促使质膜的Ca²⁺通道(CRAC通道, Ca²⁺ release-activated Ca²⁺通道)开放, 引起胞外的Ca²⁺内流, 当胞质Ca²⁺浓度上升到一定程度时, Ca²⁺通道被阻断; 通过位于质膜上的钙泵将胞质Ca²⁺泵出细胞外, 或者通过位于内质网膜上的钙泵泵入钙池内, 胞质Ca²⁺浓度又逐渐降低. 如此循环形成周期性变化, 即细胞质钙离子浓度振荡. 迄今, 该理论仍有许多未知环节, 如上述起始阶段的Ca²⁺释放如何促使质膜的Ca²⁺通道开放, 质膜Ca²⁺通道的特性及胞内调节机制如何, 有待进一步深入研究. 新近的研究指出, Orai1蛋白和STIM1蛋白在CRAC通道激活过程中具有重要作用^[1-10], 为上述问题的解决提供了新线索和途径.

2 肝细胞钙振荡的基本特征

2.1 波型和振幅 钙振荡的波型大致可分为3类: 尖峰型、正弦波型及“钙指纹”型. 胡清华 *et al*^[11]最先使用苯肾上腺素、三磷酸腺苷诱导鼠肝细胞产生钙振荡, 呈尖峰波型, 且振幅恒定于600-800 nmol/L; 峰宽不依赖激动剂浓度, 而随激动剂种类变化, 如苯肾上腺素诱导的峰宽约为7 s, 而三磷酸腺苷则为40 s. 实验还发现激动剂诱发肝细胞钙振荡时, 尖峰的下落期随激动剂的种类而变化, 此现象被称为激动剂特异性波型.

正弦波型钙振荡的振幅比尖峰波型小, 使用浓度为1 μ mol/L和10 μ mol/L的去甲肾上腺素刺激大鼠肝细胞诱发的钙振荡接近于正弦波型. 有些细胞的钙振荡既不是尖峰型, 也不是正弦波型, 他们的波型根据不同的激动剂而呈现不同的波型, 于是有人将这种钙振荡波型多样化的特点描述为“钙指纹”^[11].

2.2 频率 钙振荡的频率依赖于胞外Ca²⁺浓度, 且受Ca²⁺内流能力的影响. Green *et al*^[12]发现钙振荡最初产生的位置是位于靠近质膜的一个特定的区域, 认为质膜的钙离子内流是决定钙振荡频率的关键.

2.3 单个肝细胞钙振荡的特征 对于单个肝细胞而言, 应用作用于磷酸肌醇系统的激素作为激动剂所诱导产生的Ca²⁺振荡, 其频率显著依赖于激动剂的浓度. 对于培养的肝细胞, 通过钙成像技术, 发现胞内钙波是源于细胞膜下的一个特异的位点, 然后以20-25 μ m/s稳定的速度在肝细胞内进行传播, 这个速度是不依赖于激动剂浓度的^[13].

2.4 耦合肝细胞群钙振荡的特征 在耦合肝细胞群, 甚至是对于完整的肝脏来说, 他们之间的钙振荡是具有同步性和并列性的, 对于这种具有缝隙连接结构的细胞而言, 其钙振荡的产生可能是依赖于Ca²⁺或者IP₃的扩散^[14].

对于细胞间钙波的传播, Gaspers *et al*^[15]提出两种模型: (1)激素激发整个肝小叶IP₃水平上升, 最初的Ca²⁺上升与IP₃一起进一步促使Ca²⁺从内质网中释放出来(CICR). Ca²⁺通过缝隙连接来激活邻近细胞的IP₃R从而产生钙波. 此处Ca²⁺浓度的上升和胞间钙波的传播率是不依赖于激动剂的浓度的. (2)最初Ca²⁺浓度的上升, 刺激PLC激活, 从而使得IP₃大量产生, 继而触发内质网释放Ca²⁺.

Combettes *et al*^[13]通过对肝细胞耦合细胞群的研究证明: 钙信号先起源于1个细胞, 继而按顺序传播到与其连接的细胞. 这种从第一个发生钙振荡的细胞开始, 顺序激活其余细胞产生钙振荡的机制, 是肝细胞耦合细胞群的内在特性. Combettes *et al*^[13]同时还观察到以下的现象: (1)对于同一个肝细胞, 反复使用激素会重复引发钙振荡; (2)反复加入激素, 不会改变耦合细胞群内激活的先后顺序; (3)即使把血管加压素和去甲肾上腺素浓度增加100倍也不会改变耦合细胞群中细胞激活的先后顺序; (4)耦合细胞群内钙振荡的激活速度与激动剂的浓度是显著相关的; (5)抑制耦合细胞群内处于中间位置的细胞, 是不会影响到剩余细胞的激动顺序; (6)耦合细胞群比单个肝细胞对激素的作用更为敏感.

3 常用的肝细胞钙振荡激动剂

钙振荡的激动剂主要是增加三磷酸肌醇浓度的药物, 比较常用的有血管加压素、三磷酸腺苷和 α 受体激动剂等.

3.1 血管加压素(vasopressin) 血管加压素通过与肝细胞膜上的G蛋白受体结合, 进而激活PLC, 通过磷脂酰肌醇系统, 动员胞内钙池释放, 使胞内Ca²⁺浓度增加^[16]. 通常使用的能够有效引发规

■ 研发前沿

肝细胞钙振荡的发生机制与肝细胞内质网膜上的IP₃R、质膜上的钙离子通道及钙泵有关, 但仍有诸多具体环节不清. 单个肝细胞的钙振荡与耦合肝细胞群的钙振荡具有各自的特征及传播方式.

■创新盘点

有关肝细胞钙振荡的综述尚未见报道。本文较全面地总结了肝细胞钙振荡的发生机制、波形特征、常用激动剂和抑制剂,并对其生理和病理学意义进行了系统总结。

律钙振荡的浓度为20-500 pmol/L, 频率为0.3-0.8次/min, 幅度为600-800 nmol/L。

3.2 三磷酸腺苷(ATP) 细胞外ATP作为一种重要的信号分子, 通过作用于细胞膜上的特异性受体来调控细胞内的各种生理活动, 其效果具有时间和浓度依赖性。ATP作用的细胞膜受体是 P_2 嘌呤受体, 目前分为 P_2X 和 P_2Y 两大类, P_2X 属配体门控通道离子型, 生理条件下对 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 具有选择性通透作用。 P_2Y 属G蛋白偶联受体^[17]。胞外 P_2Y 受体的信号传递机制是通过激活PLC信号系统, 产生第二信使物质 IP_3 , 激活 IP_3R , 从而动员胞内钙池释放, 使胞内 Ca^{2+} 浓度增加。肝细胞中, 高浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 的ATP能够耗竭胞内钙库, 从而打开胞外钙离子内流的通道。通常使用的能够有效引发规律钙振荡的浓度为0.5-1.2 $\mu\text{mol/L}$, 频率约为0.2次/min, 幅度为600-800 nmol/L。

3.3 α 受体激动剂 肝细胞膜上主要的肾上腺素素为 α_1 和 α_2 亚型。有报道称, 大鼠肝细胞膜上 Ca^{2+} 内流主要由 α_{1b} 肾上腺素受体介导^[18]。去甲肾上腺素, 作为代表性的 α 受体激动剂, 也是通过激活PLC信号系统, 产生第二信使物质 IP_3 , 激活 IP_3R , 从而动员胞内钙池释放, 使胞内 Ca^{2+} 浓度增加。

4 常用的肝细胞钙振荡抑制剂

针对肝细胞钙振荡的发生机制, 使用抑制剂抑制该产生过程中的相对应的步骤, 即可抑制钙振荡。常用的药物为阳离子、花生四烯酸抑制剂、PLC的抑制剂、胞外钙离子内流钙通道抑制剂等。

4.1 阳离子 最简单的肝细胞钙振荡抑制剂是 Ca^{2+} 模仿物, 如3价镧系阳离子和某些2价阳离子, 他们可以与肝细胞的钙池操纵的钙通道(store-operated calcium channels, SOC) Ca^{2+} 结合位点结合而抑制 Ca^{2+} 内流。例如 Gd^{3+} , 他是 Ca^{2+} 模拟物, 在肝细胞中, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Gd^{3+} 可以抑制肾上腺素和血管加压素所诱发的钙振荡^[18]。

4.2 花生四烯酸酶抑制剂 花生四烯酸可抑制肝细胞钙离子内流^[19], 环氧合酶参与花生四烯酸的代谢, 尼氟灭酸(niflumic acid)是环氧合酶的抑制剂。抑制花生四烯酸的代谢酶可以抑制SOC的机制目前不清楚, 可能与他们抑制线粒体ATP的合成, 从而抑制SOC及干扰胞质内pH值有关^[20]。

4.3 PLC的抑制剂 U73122是PLC的阻断剂之一, 可以通过作用于PLC而进一步影响钙离子的浓度。但Berven *et al*^[21]发现25 $\mu\text{mol/L}$ 的U73122能够完全抑制甘油磷酸肌醇二磷酸(GPIP2)和

thapsigargin诱导肝细胞胞外钙离子内流, 而这个钙内流过程是不需要PLC参与的。他们提出, 对于肝细胞而言, U73122抑制SOC钙离子内流的机制与抑制PLC活化机制是不同的。U73122的抑制作用, 可能是由于抑制了SOC介导的钙内流过程中的一个环节, U73122对于SOC钙离子内流的抑制作用比他对于PLC的抑制作用更敏感。

4.4 胞外钙离子内流阻断剂 SK&F96365是咪唑类化合物, 最初将其定义为受体介导的钙内流通道抑制剂, 并可抑制电压依赖性钙离子通道(voltage-dependent calcium channels, VDCC), 在人白细胞、血小板及内皮细胞上均发现其可抑制激动剂激活的钙内流(IC_{50} 约为10 $\mu\text{mol/L}$)^[22]。后来有实验陆续报道其可以抑制HL-60、淋巴细胞等多种细胞的SOC。所以, 应用SK&F96365作为SOC抑制剂, 限于没有VDCC的非兴奋性细胞^[20]。肝细胞中, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的SK&F96365能够抑制血管加压素和肾上腺素诱导的钙振荡^[18]。

2-APB是一种具有多种作用的具有细胞膜通透性的有机复合物, 在H4-IIIE肝细胞中, 75 mmol/L的2-APB并不抑制 IP_3 诱发的 Ca^{2+} 释放, 100 mmol/L的2-APB对垂体后叶素诱导的钙池内钙释放亦无影响, 但对SOC却有抑制作用, 提示2-APB抑制SOC的同时并不抑制 IP_3 诱导的钙池内钙释放^[20]。在肝细胞中, 75 $\mu\text{mol/L}$ 的2-APB可以抑制完全血管加压素和肾上腺素诱导的钙振荡^[18], 并发现2-APB的抑制作用是可逆的, 提示2-APB可能直接作用于SOC。

粉防己碱(tetrandrine)是从防己科植物粉防己根中提取的生物碱, 为双苄基异喹啉衍生物, 之前认为其是磷脂酶 A_2 (PLA₂)的抑制剂。有实验证明, 粉防己碱可提高四氯化碳损伤的肝细胞活力, 减少丙二醛形成和乳酸脱氢酶释放, 减低细胞内钙离子浓度^[23]。但是, Rychkov *et al*^[19]通过膜片钳试验提出, 粉防己碱可能不是PLA₂的抑制剂, 因为粉防己碱对于肝细胞SOC电流(Isoc)具有迅速以及可逆的抑制作用。

5 肝细胞钙振荡的生理和病理学意义

5.1 细胞自身保护作用 细胞 Ca^{2+} 振荡既触发了相应的生理或病理效应, 又最大限度地利用、节约了能量, 同时还限制细胞过分摄钙, 避免磷酸酶、蛋白酶等活化造成的细胞损伤, 维护细胞对刺激的反应性。

5.2 周期性生理效应 胞质游离 Ca^{2+} 是细胞内第2

信使, 其浓度的周期性升降, 必然引起他所介导的生物效应如分泌等过程呈周期性起伏. 胰岛素分泌与钙振荡之间有着密切的关系^[24], 肝脏也是人体的一个重要的分泌器官, 对于肝细胞分泌与其钙振荡之间的关系, 也有待进一步的研究.

5.3 调控肝细胞糖原代谢 肝糖原降解可由去甲肾上腺素和血管加压素等激素促发, 而去甲肾上腺素、血管加压素能够导致反复性的钙离子振荡. 糖原降解是通过磷酸化-去磷酸化动力学过程进行的, 他是通过肝细胞内糖原磷酸化酶完成. 糖原磷酸化酶的功能是控制糖原降解, 他能感应细胞中的血糖水平, 在需要时降解糖原释放葡萄糖. 钙振荡频率越高, 磷酸化蛋白的转化率也越高, 促进糖原的分解. 频率降低, 会减缓糖原的分解.

5.4 调控肝细胞增殖 Thy-1是一种具有生长抑制作用的细胞膜表面糖蛋白, 可抑制ras基因引起的细胞恶变. Sugimoto *et al*^[25]通过实验发现, Thy-1通过抑制有丝分裂原诱发的钙振荡而发挥效应. 钙信号的变化可引起细胞生长缺陷, 从而可牵涉到某些癌症的成因机制. 与之相应地, 通过干扰钙振荡, 就能减少细胞的增殖.

5.5 调控肝细胞线粒体代谢 Hajnoczky *et al*^[26]通过比较肝细胞胞质钙振荡与线粒体内还原型辅酶 I / II 浓度变化之间的关系, 提出线粒体内氧化还原反应也存在与胞质钙振荡同步的振荡现象, 并且当胞质钙振荡的频率低于0.2次/min时, 可以在线粒体内观察到还原型辅酶 I / II 浓度的变化. 当胞质振荡频率增加时, 这种振荡波开始相互融合, 当胞质钙振荡频率达到0.5-1.0次/min时, 线粒体内的振荡波完全融合消失, 表现为还原型辅酶 I / II 浓度增加, 并维持在一定水平上. 该实验还提出这样一个概念: 相比较而言, 对于线粒体代谢的调节, 胞质钙离子浓度的频率变化比其幅度变化更重要.

5.6 调节肝细胞基因表达 肝细胞胞内钙振荡的主要涉及肝脏的代谢和基因的转录. 实验研究发现, Ca^{2+} 振荡作用可使T细胞在较弱的抗原刺激下即可被激活, 这相当于降低了有效 Ca^{2+} 的阈值, 钙信号可通过不同的振荡频率活化不同的转录因子, 从而精细调控T细胞活化后各种细胞因子基因的表达^[27].

另外, 钙振荡的频率通过刺激各种转录因子(NF-AT, NF- κ B和OAP)诱发不同的基因表达^[15], 从而可以调节Ras和MAP激酶通路^[28].

总之, 肝细胞的钙振荡参与肝细胞的多种生理功能. 深入探讨肝细胞钙振荡的发生机制和特征, 积极探寻影响其发生、发展的细胞内外因素, 并针对有关影响因素加以有效的干预, 对提高肝细胞生理功能、降低肝细胞病理损害具有重要意义.

6 参考文献

- Lorin-Nebel C, Xing J, Yan X, Strange K. CRAC channel activity in *C. elegans* is mediated by Orai1 and STIM1 homologues and is essential for ovulation and fertility. *J Physiol* 2007; 580: 67-85
- Strange K, Yan X, Lorin-Nebel C, Xing J. Physiological roles of STIM1 and Orai1 homologs and CRAC channels in the genetic model organism *Caenorhabditis elegans*. *Cell Calcium* 2007; 42: 193-203
- Li Z, Lu J, Xu P, Xie X, Chen L, Xu T. Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in CRAC channel activation. *J Biol Chem* 2007
- Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Singh BB, Gill D, Ambudkar IS. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* 2007; 282: 9105-9116
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1003-1010
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006; 281: 20661-20665
- Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4040-4045
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; 441: 179-185
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* 2006; 312: 1220-1223
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 2005; 437: 902-905
- 胡清华, 王迪浚. 钙振荡. *生理科学进展* 1994; 25: 131-136
- Green AK, Zolle O, Simpson AW. Regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations by plasma membrane Ca^{2+} fluxes: a role for natriuretic peptides. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 934-938
- Combettes L, Tran D, Tordjmann T, Laurent M, Berthon B, Claret M. Ca^{2+} -mobilizing hormones

■应用要点

本文深入探讨了肝细胞钙振荡的发生机制和特征, 积极探寻了影响其发生、发展的细胞内外因素, 和针对有关影响因素的有效干预措施, 对提高肝细胞生理功能、降低肝细胞病理损害具有重要意义.

■同行评价

本文全面的综述了肝细胞钙振荡研究进展,内容新颖,叙述全面,层次清楚,具有高度的科学性,继续研究性和可读性。

- induce sequentially ordered Ca^{2+} signals in multicellular systems of rat hepatocytes. *Biochem J* 1994; 304 (Pt 2): 585-594
- 14 Wu D, Jia Y, Zhan X, Yang L, Liu Q. Effects of gap junction to Ca^{2+} and to IP(3) on the synchronization of intercellular calcium oscillations in hepatocytes. *Biophys Chem* 2005; 113: 145-154
- 15 Gaspers LD, Thomas AP. Calcium signaling in liver. *Cell Calcium* 2005; 38: 329-342
- 16 Rychkov GY, Litjens T, Roberts ML, Barritt GJ. ATP and vasopressin activate a single type of store-operated Ca^{2+} channel, identified by patch-clamp recording, in rat hepatocytes. *Cell Calcium* 2005; 37: 183-191
- 17 王明霞, 任雷鸣, 王红芳. 细胞外ATP和腺苷及其受体与细胞凋亡. *中国药理学通报* 2006; 22: 1029-1034
- 18 Gregory RB, Barritt GJ. Evidence that Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} channels in rat hepatocytes are required for the maintenance of hormone-induced Ca^{2+} oscillations. *Biochem J* 2003; 370: 695-702
- 19 Rychkov GY, Litjens T, Roberts ML, Barritt GJ. Arachidonic acid inhibits the store-operated Ca^{2+} current in rat liver cells. *Biochem J* 2005; 385: 551-556
- 20 张驰, 张宗明. 钙池操纵的 Ca^{2+} 通道研究中工具药的应用及进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 231-234
- 21 Berven LA, Barritt GJ. Evidence obtained using single hepatocytes for inhibition by the phospholipase C inhibitor U73122 of store-operated Ca^{2+} inflow. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1373-1379
- 22 周华, 马嵘, 孔德虎. 库容性钙内流通道调节剂的研究进展. *国外医学药学分册* 2005; 32: 379-383
- 23 秦大莲, 余崇林. 粉防己碱药理及其在消化系统疾病中的应用研究进展. *泸州医学院学报* 2005; 28: 379-380, 384
- 24 Zhan X, Wu D, Yang L, Liu Q, Jia Y. Effects of both glucose and IP(3) concentrations on action potentials in pancreatic beta-cells. *Eur Biophys J* 2007; 36: 187-197
- 25 Sugimoto Y, Fu T, Hirochika R, Nakauchi H, Ikawa Y, Nozawa Y. Thy-1 inhibits mitogen-induced Ca^{2+} oscillation in ras-transformed mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 1992; 203: 230-235
- 26 Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 1995; 82: 415-424
- 27 杨琳, 郭明秋. 成熟和衰老T细胞活化后钙信号的研究进展. *中国免疫学杂志* 2006; 22: 192-194
- 28 Kupzig S, Walker SA, Cullen PJ. The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7577-7582

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 全国早期胃癌及消化病进展研讨会征文通知

本刊讯 由中华医学会消化内镜学会主办, 中华消化内镜学会胃病学组、浙江省消化内镜学会、温州医学院、上海市胃肠肿瘤重点学科承办的2007全国早期胃癌及消化病进展研讨会将于2007-11-16/18在浙江省温州市举行. 邀请国内外专家作专题讲演及内镜操作演示.

1 征文内容和要求

(1)有关早期胃癌及消化病进展; (2)胃癌及消化病诊疗的最新技术及研究成果. 投稿截止日期: 2007-10-10.

2 联系方式

夏宣平, 325000, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医学院附属第二医院消化内科; 贾国葆, 325000, 浙江省温州市温州医学院附属第一医院消化内科. Email: feyxh@163.com或xxpsummer@yahoo.com.cn.

移植肝的保存

卢思聪, 吕凌, 张峰

卢思聪, 吕凌, 张峰, 南京医科大学第一附属医院肝移植中心 江苏省南京市 210029
江苏省医学领军人才资助项目, No. 135-43
通讯作者: 张峰, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院肝移植中心. zhangfeng1958@hotmail.com
收稿日期: 2007-06-20 修回日期: 2007-09-04

Preservation of liver grafts

Si-Cong Lu, Ling Lv, Feng Zhang

Si-Cong Lu, Ling Lv, Feng Zhang, Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by: Medical Leading Talent Fund of Jiangsu Province, No. 135-43
Correspondence to: Feng Zhang, Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. zhangfeng1958@hotmail.com
Received: 2007-06-20 Revised: 2007-09-04

Abstract

How to reduce liver graft ischemia-reperfusion injury is one of the unresolved problems in the field of liver transplantation. In this paper the results achieved with different preservation solutions in preservation solutions, preservative-related complications and factors affecting preservation are reviewed by analyzing the pertinent literature. Methods that reduce liver graft ischemia-reperfusion injury by improving the preservation of liver grafts are explored.

Key Words: Liver transplantation; Preservation solution; Ischemia-reperfusion injury

Lu SC, Lv L, Zhang F. Preservation of liver grafts. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2805-2808

摘要

如何减少肝脏移植缺血再灌注损伤是肝移植领域待解决问题之一, 而肝脏移植缺血再灌注损伤轻重与保存过程密切相关. 保存液的发展经历了一个漫长的过程, 现阶段保存液通过改善配方能明显提高移植物的保存质量, 减少相关并发症. 移植肝的保存除需高质量的保存液, 与之相关的其他保存因素也影响着移植

物的保存质量和手术预后. 本文通过分析比较了目前常用的保存液的利弊及其相关并发症, 探讨更好保存供肝, 降低供肝缺血再灌注损伤的方法.

关键词: 肝移植; 保存液; 再灌注损伤

卢思聪, 吕凌, 张峰. 移植肝的保存. *世界华人消化杂志* 2007;15(26):2805-2808
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2805.asp>

■背景资料

肝移植是根治终末期肝病的主要手段之一. 供肝移植时的再灌注损伤难以避免. 减少供肝再灌注损伤是移植术成败的关键, 供肝的保存又决定了再灌注损伤的轻重.

0 引言

自1963年肝脏移植的先驱Starzl成功地进行了世界上首例人体肝移植, 经过40多年的努力, 肝脏移植已经被公认为治疗终末期肝脏疾病的一种理想方法. 在这40多年的发展过程中, 决定着肝脏移植成功与否的一个重要因素就是肝脏移植物的活力. 但在肝脏循环停止到在受体体内重新恢复循环之前往往有一段时间, 使得肝脏保存显得至关重要. 良好的肝脏保存使得肝移植术成为半择期手术, 术中发现受者无法进行肝移植时能为下一个肝移植患者赢得时间, 进行必要的术前准备^[1].

1 保存液

目前常用的3种保存液成分见表1^[2].

1.1 UW保存液 优点: (1)含足量的抗氧化成分和能量底物, 能给肝脏提供很好的营养, 减少缺血/再灌注损伤. (2)合理的渗透压和缓冲系统, 防止细胞水肿和细胞酸中毒. 其已经成为肝脏的标准保存液. 缺点: (1)引起较高的缺血型胆道损坏发生率(ITBLS)^[3]. (2)含有高分子量成分羟乙基淀粉, 高黏滞度, 不能充分灌注各肝窦, 导致循环紊乱并因此影响移植后移植物功能^[4].

1.2 HTK保存液 优点: 对肝细胞的保护效果和UW保存液相同. 低黏滞度, 能更好的灌注肝脏. 低钾, 再灌注前不需冲洗^[5]. 缺点: 若保存时间超过10 h, 与UW保存液相比原发移植物无功能的发生率会大幅度升高^[6]. Moray *et al*^[7]报道UW保存液和HTK保存液在活体肝移植物的灌注上,

■研发前沿

保存液的配方既要能为肝脏提供足够的养分又要能充分灌注脏器,但这往往是矛盾的,所以除了要改善保存液的配方外还要从影响保存液保存效果的因素上考虑,把这一矛盾调和。

有着相同的效应和安全性,但用HTK保存液能节省不少费用。

1.3 Celsior保存液 细胞外类型保存液,本来用于心脏保存,后来才用于腹部器官保存^[8]。在低温保存期和UW保存液相比能更好的抑制细胞凋亡。在动物实验中表明Celsior组中的ALT、 α 谷胱甘肽转移酶水平比UW组低。还发现Celsior组中的内皮素1也比较低,而内皮素1在缺血再灌注损伤中起主要作用^[9]。这表明Celsior比UW有更好的肝脏保存效果。还需要进一步临床实验来证明Celsior比UW保存效果更好。

2 保存液与并发症的关系

2.1 胆道并发症 胆道并发症在肝移植术后的发生率为10%-30%。虽然胆道并发症的真正原因尚未清楚,但很多研究表明缺血型胆道损坏(ITBLs)在胆道并发症发生中发挥了重要作用。Li *et al*^[3]报道ITBL在UW保存组中的发生率高于低黏滞度Collins保存组。其原因可能是高黏滞度保存液不能充分灌注胆道系统和小动脉,使得胆管得不到充足的养分。随后有研究表明当使用更高的灌注压力时ITBL的发生率有所下降^[10],这更进一步支持了解释。

虽然普遍认为HTK和Celsior保存液与UW保存液相比能更好的冲洗胆道系统,但Cascales *et al*^[11]表示UW保存液能更好的保护肝细胞,这可能与其含有高养分有关。Pirenne *et al*^[12]报道使用低黏滞度保存液通过肝动脉进行灌注,用高黏滞度但营养充足保存液(如UW保存液)从门静脉灌注,既可以减少胆道并发症又能更好的给肝细胞提供能量。这或许是解决这一矛盾的最好方法。

2.2 肝脏微循环紊乱 目前不少研究关注肝脏的微循环。这些研究显示接触保存液后红细胞的可变形性会遭到破坏。这些红细胞能堵塞窦状隙从而损坏肝脏小管道影响微循环。Chmiel *et al*^[13]报道在室温下分别用HTK保存液和UW保存液培育洗涤红细胞30 min, UW组红细胞的可变形性下降较严重。这说明对于肝脏微循环的保护HTK保存液更好些。该实验还发现当血液接触UW保存液中的羟乙基淀粉后,红细胞聚集成直径18-30 μm 的颗粒,其能堵塞直径为10 μm 的窦状隙。van der Plaats *et al*^[14]报道UW保存液和血液混合时,红细胞聚集程度升高了9倍,而用去除羟乙基淀粉的UW保存液时使得红细胞聚集程度比原来反而有所下降。所以基于保护肝脏微

表 1 保存液成分比较

种类	UW	HTK	Celsior
制造年份	1988	1975	1994
产地	美国	德国	法国
成分			
钠(mmol/L)	25-30	15	100
钾(mmol/L)	125-130	10	15
镁(mmol/L)	5	13	4
钙(mmol/L)	0	0.25	0.015
甘露醇(g/L)	0	30	60
乳酸盐(mmol/L)	100	0	80
羟乙基淀粉(g/L)	50	0	0
木棉糖(mmol/L)	30	0	0
组氨酸(mmol/L)	0	180	30
磷酸盐(mmol/L)	25	0	0
氢氧基(mmol/L)	0	0	100
谷胱甘肽(mmol/L)	3	0	3
别嘌呤醇(mmol/L)	0	1	0
腺苷(mmol/L)	5	0	0
二氯代丙酮(mmol/L)	0	1	0
色氨酸(mmol/L)	0	2	0
谷氨酸(mmol/L)	0	0	20
pH	7.4	7.2	7.3
渗透浓度(mOsm/L)	320	310	320

循环考虑,应该用一种低黏滞度并且没有羟乙基淀粉的保存液来代替UW保存液。

3 影响保存的因素

目前,移植肝常用的保存方法是:原位或离体状态下,将冷灌洗液(0℃-4℃)以80-100 cm的高度经门静脉及肝动脉以80-100 mL/min速度灌入供肝,使该肝脏迅速而又均匀地降温到10℃以下;再将供肝充分浸泡在冷保存液中然后将其置入冰盒中保持温度为1℃-4℃直到移植^[14]。当温度由37℃降至0℃时,代谢率可降低12-13倍。肝脏可耐受30 min的热缺血不致完全丧失功能,而低温可延长保存时间至6 h;低温另一个好处是保存了线粒体的功能,从而保证了移植后的能量代谢。

3.1 机器灌注保存 近来关于使用机器灌注保存的研究获得了很大的重视。Le(1770-1814)曾经说过如果谁能找到一种类似心脏的注射器,并有动脉血,这血可以是天然的或人造的,那么谁就能轻易保存身体的任何器官。使用机器灌注有可能实现这一设想。机器灌注保存与简单冷保存相比,主要优点是能持续给肝细胞提供维持其基本功能的能量底物,所以使用灌注机能更长时间的保存器官^[14]。但使用机器灌注所需设备复杂繁

多, 费用昂贵, 限制了其在临床的运用。

3.2 保存温度 控制缺血性损伤的关键是使ATP消耗保持在最低。低温保存的主要原则是减慢需要消耗ATP的活动。虽然每降低10℃代谢降低1.5-2倍, 但即使温度降低到1℃仍然有不小的新陈代谢活动。随着冷保存时间的延长, 内皮细胞出现进行性损坏, 细胞是否激活, 这可能是冷保存后导致移植失败的原因。肝窦细胞在冷保存4 h出现损坏和部分消失, 在8 h时全部消失^[15]。在使用机器灌注时, 低温灌注使得器官的需氧量低, 灌注液的流速要求也低。但低温能使得血管收缩甚至闭塞, 使得灌注不充分。Bessems *et al*^[16]报道使用机器对无心跳供体进行灌注的最佳温度为37℃。使用常温灌注保存的主要问题是现在常用的UW溶液和HTK溶液在常温下不稳定。为此新的保存液Polysol保存液问世, Bessems *et al*^[16]在大鼠上用该保存液进行常温机器灌注保存, 保存效果比使用UW、HTK保存液冷保存都好。Hata *et al*^[17]报道使用Polysol保存液对脂肪肝进行低温保存, 结果与HTK组相比, 能更好的抑制线粒体的氧化, 使脂肪肝的功能趋于完整。Polysol保存液适用于机器灌注和冷保存。如果能实现常温保存对降低缺血再灌注损伤有非常巨大的意义, 值得进一步深入研究。

3.3 缺血预处理 1986年, Reimer在做狗的心脏实验时发现, 反复短暂缺血(5 min)所造成的心肌ATP消耗并不累加, 反而可使心肌坏死面积减少25%, Murry *et al*^[18]将这一现象定义为缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC), 即: 组织在经过短暂的重复缺血后, 能增加其对缺血的耐受性。1993年, Lloris-Carsi *et al*^[19]首次在热缺血动物模型上进行了肝脏缺血预处理的实验。随后又有多个小组^[20-22]进行了缺血预处理的动物实验, 发现缺血5-10 min然后再恢复血流10-15 min, 能明显降低肝脏在随后的热缺血或冷缺血中的损伤。Serafin *et al*^[23]证明预处理生成大量IL-10, 从而抑制IL-1β的释放, 最终降低肝脏的缺血再灌注损伤。但当把缺血预处理用于临床肝移植时, 不同的小组有不同的结果, 难以肯定结论^[24]。本人认为缺血预处理在临床肝移植中难以开展, 特别是尸体肝移植占主导的今天。但可以研究缺血预处理的机制, 从而找出减少再灌注损伤的办法。

总之, 在肝脏移植的发展中, 移植排异和再灌注损伤一直是两个待解决的领域。目前众多研究专注于免疫排异的研究。移植肝恢复血流

随即发生再灌注损伤, 若不预防移植后的免疫排异更难处理。所以要进一步研究对移植肝的保存, 减少其再灌注损伤, 使其在受体中发挥最大的功能。在目前常用的保存液中, UW保存液虽然存在种种缺陷, 但由于其使用时间较长, 在临床上的运用经验丰富, 仍是保存液的金标准。新研制出的各种保存液需要进一步的临床实验才有替代其的可能性。保存液引发的并发症与其高黏滞度有很大关系, 但降低黏滞度必然会降低保存液的养分, 这一矛盾难以解决, 需要根据所需保存时间长短来决定取舍。为了更大的发挥保存液的功效, 不得不在影响其保存效果的因素上研究, 寻找一个最佳的灌注保存条件, 这需要不断的探索。移植肝的保存要在保存液、其相关并发症和影响因素上努力, 寻找一个最佳策略, 为临床工作更好的服务。

4 参考文献

- 1 El-Wahsh M. Liver graft preservation: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 12-16
- 2 Feng XN, Xu X, Zheng SS. Current status and perspective of liver preservation solutions. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 490-494
- 3 Li S, Stratta RJ, Langnas AN, Wood RP, Marujo W, Shaw BW Jr. Diffuse biliary tract injury after orthotopic liver transplantation. *Am J Surg* 1992; 164: 536-540
- 4 van der Plaats A, 't Hart NA, Morariu AM, Verkerke GJ, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Rakhorst G. Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. *Transpl Int* 2004; 17: 227-233
- 5 Pokorny H, Rasoul-Rockenschaub S, Langer F, Windhager T, Rosenstingl A, Lange R, Konigsrainer A, Ringe B, Muhlbacher F, Steininger R. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation-a prospective multi-centre observation study. *Transpl Int* 2004; 17: 256-260
- 6 Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 226-230
- 7 Moray G, Sevmis S, Karakayali FY, Gorur SK, Haberal M. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate and University of Wisconsin in living-donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 3572-3575
- 8 Meneu Diaz JC, Vicente E, Nuno J, Quijano Y, Lopez-Hervas P, Barcena R, Honrubia A, Sanchez S, Rodriguez G. Prospective comparative study of the efficacy of Celsior solution for preservation in clinical liver transplant. *Transplant Proc* 2002; 34: 49
- 9 Ohwada S, Sunose Y, Tsutsumi H, Iwazaki S, Aiba M, Kasahara M, Kawashima Y, Takeyoshi I, Matsumoto K, Morishita Y. Celsior is superior to UW for graft preservation from non-heart-beating donors in a canine liver transplantation model.

■相关报道

Shawn在Lancet上的一篇文章《Liver and kidney preservation by perfusion》中提到可以用持续灌注提高保存液对器官的保存效果, 并对常规保存方法和持续灌注做出了比较分析, 还分析了不同保存液用于不同保存方法的利弊, 有相当大的可读价值。

■创新盘点

本文分析了目前常用的肝脏保存液的利弊, 与保存液相关的并发症, 总结了影响保存的因素, 尝试找出减轻肝脏再灌注损伤的方法。

■同行评价

本文对肝脏保存液和影响保存的相关因素做了系统分析, 论点清晰, 论据充分, 并提出了有价值的个人观点, 对进一步提高肝脏保存液质量研究和指导临床合理应用具有指导意义, 有一定的学术价值。

- 10 Langrehr JM, Schneller A, Neuhaus R, Vogl T, Hintze R, Neuhaus P. Etiologic factors and incidence of ischemic type biliary lesions (ITBL) after liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998; 115: 1560-1562
- 11 Cascales P, Fernandez V, Tomas A, Sanchez del Campo F, Gonzalez F, Tascon E, Lumbreras B, Gonzalez J. Comparison of UW and Celsior solutions in experimental liver preservation by assessment of alpha-glutathione sulfotransferase. *Transplant Proc* 2002; 34: 53
- 12 Pirenne J, Van Gelder F, Coosemans W, Aerts R, Gunson B, Koshiha T, Fourneau I, Mirza D, Van Steenberghe W, Fevery J, Nevens F, McMaster P. Type of donor aortic preservation solution and not cold ischemia time is a major determinant of biliary strictures after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7: 540-545
- 13 Chmiel B, Cierpka L. Organ preservation solutions impair deformability of erythrocytes in vitro. *Transplant Proc* 2003; 35: 2163-2164
- 14 赵子麟, 张云生, 俞金龙, 高毅. 肝移植用保存液. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 77-79
- 15 St Peter SD, Imber CJ, Friend PJ. Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet* 2002; 359: 604-613
- 16 Bessems M, Doorschodt BM, Albers PS, Meijer AJ, van Gulik TM. Wash-out of the non-heart-beating donor liver: a matter of flush solution and temperature? *Liver Int* 2006; 26: 880-888
- 17 Hata K, Tolba RH, Wei L, Doorschodt BM, Buttner R, Yamamoto Y, Minor T. Impact of polysol, a newly developed preservation solution, on cold storage of steatotic rat livers. *Liver Transpl* 2007; 13: 114-121
- 18 Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
- 19 Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993; 25: 3303-3304
- 20 Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998; 66: 152-157
- 21 Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-937
- 22 Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 30: 1223-1231
- 23 Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Gelpi E, Rodes J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004; 39: 688-698
- 24 Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transpl Int* 2007; 20: 219-229

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。

干扰素治疗肝纤维化机制的研究进展

胡 静, 李智伟

胡静, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 李智伟, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. lizw@cmu2h.com

电话: 024-83955360

收稿日期: 2007-06-22 修回日期: 2007-09-04

Therapeutic mechanism of interferon's anti-hepatic fibrosis action

Jing Hu, Zhi-Wei Li

Jing Hu, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. lizw@cmu2h.com

Received: 2007-06-22 Revised: 2007-09-04

Abstract

Hepatic fibrosis is a common pathological change occurring in chronic liver disease which is induced by a variety of etiological factors. Hepatic fibrosis is a dynamic process, and a reversible pathological change. However, when it has progressed to hepatic cirrhosis, it is irreversible. Therefore, to block or reverse the course of hepatic fibrosis is a very significant target for the treatment of chronic liver disease. Interferon (IFN) has extensive functions, including anti-viral, anti-tumor and immunological roles. Recent research has reported that IFN possesses an anti-hepatic fibrosis function, with potential clinical application. However, the exact mechanism underlying its anti-hepatic fibrosis action remains unknown. Some scholars believe that this mechanism involves interferon's anti-viral effects, the inhibition of hepatic stellate cell (HSC) activation, the promotion of HSC apoptosis, the inhibition of extracellular matrix (ECM) synthesis and the promotion of ECM degradation.

Key Words: Interferon; Hepatic fibrosis; Extracellular matrix; Hepatic stellate cell

Hu J, Li ZW. Therapeutic mechanism of interferon's anti-hepatic fibrosis action. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2809-2813

摘要

肝纤维化是多种病因导致慢性肝病共有的病理改变, 肝纤维化为一动态过程, 属可逆性病变, 但若进一步发展至肝硬化阶段, 则不可逆, 因此阻断抑制或逆转肝纤维化是治疗慢性肝病的一个十分重要的目标. 干扰素(interferon, IFN)具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用. 目前有许多研究认为干扰素(IFN)具有抗肝纤维化作用, 并已在临床应用中取得一定效果, 但其抗肝纤维化的确切机制尚不明, 有学者认为可能与其抗病毒, 抑制肝星状细胞的活化增殖, 促进肝星状细胞的凋亡, 抑制细胞外基质(ECM)合成, 促进细胞外基质降解等作用有关.

关键词: 干扰素; 肝纤维化; 细胞外基质; 肝星状细胞

胡静, 李智伟. 干扰素治疗肝纤维化机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2809-2813

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2809.asp>

0 引言

抗肝纤维化是慢性肝炎治疗中的一个关键性问题, 目前治疗肝纤维化的药物大多数尚处于动物实验阶段, 干扰素(IFN)是抗肝纤维化药物之一. 本文复习了近年来有关文献, 对IFN与肝纤维化的关系综述如下.

1 材料和方法

干扰素(interferon, IFN)是细胞受某些反应刺激而产生的一类蛋白质, 干扰素按分子结构和抗原性可分 α 、 β 和 γ 型. IFN- α 主要由单核细胞和B细胞经病毒感染诱导, 免疫活性弱而建立抗病毒状态快; IFN- β 主要由成纤维细胞和上皮细胞产生, 在病毒感染反应中最早出现; IFN- γ 由自然杀伤(NK)细胞和致敏的T淋巴细胞产生, 是可溶性细胞外信号蛋白, 免疫活性强而建立抗病毒状态缓慢^[1]. IFN

■背景资料

抗病毒, 抗肝纤维化治疗是近年来慢性病毒性肝炎治疗的关键. 目前, IFN已广泛应用于慢性肝炎的抗病毒治疗中, 但其作用机制尚不清楚. 最近研究表明可能与其抗病毒, 抑制肝星状细胞(HSC)的活化增殖, 促进肝星状细胞(HSC)的凋亡, 抑制细胞外基质(ECM)合成, 促进细胞外基质(ECM)降解等作用有关.

■研究前沿

抗肝纤维化是慢性肝炎治疗中的一个关键性问题, 目前研究认为, IFN具有抗肝纤维化作用, 但其作用机制尚未完全清楚. 因此, IFN抗肝纤维化的作用机制是目前研究的热点之一.

都具有广泛的抗病毒, 抗肿瘤和免疫调节作用.

肝纤维化的形成机制目前多数认为是各种致病因素造成肝脏损伤, 激活枯否细胞(KC)分泌多种细胞因子如转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、表皮生长因子(EGF)、白介素-1(IL-1)等, 随同血小板、肝窦内皮细胞和肝细胞等分泌的多种细胞因子, 共同作用于肝星状细胞(HSC), 使静止期HSC转化为肌成纤维样母细胞(MFB)的活化形式并大量增殖, 活化HSC通过旁分泌与自分泌作用合成分泌多种细胞外基质(ECM), 同时合成、释放大量的金属蛋白酶抑制剂(TIMPs), 抑制胶原酶、明胶酶等金属蛋白酶(MMPs)活性, 减少ECM降解, 导致ECM合成大于降解, 最终过量积聚在肝内形成肝纤维化^[2-3].

早在80年代初就已发现IFN具有抗纤维化作用, 而肝纤维化是慢性肝炎向肝硬化发展的必经病理过程, 随着进一步研究, 目前认为IFN具有抗肝纤维化作用并已在临床应用中取得一定效果, 具有远大的研究前景.

2 IFN抗肝纤维化的机制

经过体内、外实验研究, 目前认为IFN抗肝纤维化机制主要包括: (1)IFN抗病毒作用与抗肝纤维化作用密切相关; (2)抑制肝星状细胞(HSC)的活化和增殖; (3)诱导激活的HSC凋亡; (4)抑制ECM合成; (5)促进ECM降解. 目前, 对IFN- α 的抗肝纤维化机制研究较为深入, 而对IFN- β 、IFN- γ 的研究较少.

2.1 IFN- α

2.1.1 IFN- α 抗病毒作用 IFN- α 通过抗病毒而发挥抗纤维化作用可能通过以下两个方面: (1)减轻炎症反应. 持续的抗病毒作用使肝内乙型肝炎病毒(HBV)或HCV载量下降, 病毒蛋白表达水平降低, 进而肝内炎症反应减轻. 炎症反应是刺激肝内纤维增生的主要因素, 炎症反应减轻可改善肝内纤维化. (2)可能通过抑制肝内病毒复制而降低肝纤维化发生和进展. Shindo *et al*^[4]报道, IFN- α 抗纤维化疗效与病毒载量的下降、肝组织内炎症得到控制等有直接的相关性. 对于IFN- α 治疗呈完全病毒学反应者, 其肝纤维化指标及炎症活动度(HAI)积分有好转.

2.1.2 IFN- α 抑制ECM的合成, 促进ECM的降解 IFN- α 能直接抑制ECM的形成, 对已经形成的肝纤维化, 使ECM降解是抗肝纤维化的重要策略^[5-8]. 参与ECM降解的主要是MMPs及TIMPs, 提高MMPs的表达和/或抑制TIMPs的水平都可

促进ECM的降解^[9-10]. Watanabe *et al*^[11]报道IFN- α 可提高MMP活性, 促进ECM降解. Ninomiya *et al*^[12]用IFN- α 对27例CHC患者治疗6 mo后, 发现有部分人肝纤维化明显改善. 在这些人中MMPs/TIMPs的比率升高, 而无效者中则比例下降, 表明IFN- α 可以直接影响MMPs及TIMPs的比率, 从而促进胶原的降解, 使患者的肝纤维化改善.

2.1.3 抑制HSC的活化和增殖 HSC是产生ECM的主要细胞, 其活化是肝纤维化形成的关键^[13-14]. 许多实验研究证实IFN- α 有抑制HSC活化和增殖作用^[15-16]. Inagaki *et al*^[17]对带有COLIA2基因启动子序列的转基因小鼠进行IFN- α 处理, 发现IFN- α 能明显抑制CCL₄引起的肝纤维化. 进一步分析发现IFN- α 能抑制TGF- β /Smad3引起的COLIA2复制, 抑制COLIA2启动子的活化, 从而抑制肝星状细胞的活化. TGF- β 1可使HSC激活、增殖, 而且TGF- β 1还诱导HSC转录TGF- β 1 mRNA, 成逐级放大作用^[18-19]. Tsushima *et al*^[20]对43例丙型肝炎患者用IFN- α 治疗6 mo, 治疗前后检测血浆TGF- β 1水平, 并对其中13例患者做治疗前后肝组织活检, 结果显示: (1)无论对于SR、NR或复发者, 治疗后血浆TGF- β 1水平较治疗前明显下降; (2)肝组织内TGF- β 1表达水平与血浆内TGF- β 1浓度高度相关; (3)肝内纤维化程度与血浆TGF- β 1水平相关.

2.1.4 诱导激活的HSC凋亡 HSC的凋亡具有重要意义: 一方面HSC数量的减少使细胞外基质(ECM)分泌减少, 更重要的是由活化的HSC分泌的金属蛋白酶抑制物减少从而降低对金属蛋白酶的抑制作用, 促进ECM的降解. 凋亡不引起溶酶体等细胞器的破坏, 凋亡细胞在数小时内被周围的细胞所吞噬, 很少引起微环境的炎症反应, 是一种理想的清除活化HSC的方式^[21]. Iredale *et al*^[22]认为肝纤维化的恢复期, 激活状态的HSC减少主要通过凋亡机制, 而不是表型的转化. IFN- α 可通过诱导活化的HSC凋亡阻断肝纤维化的瀑布式效应, 其作用机制是通过细胞因子的作用或肝细胞的作用间接促进HSC的凋亡, 尚有待进一步研究.

2.2 IFN- β IFN- β 与IFN- α 有许多相似之处, 两者的氨基酸组成有26%-30%的同源性. 和IFN- α 一样, IFN- β 不仅具有抗肝炎病毒的作用, 还具有抗肝纤维化的作用. Shen *et al*^[23]发现IFN- β 能抑制培养的HSC增殖以及BrdU(Bromo-2'-deoxyuridine)融合, 减少 α -平滑肌肌动力蛋白(α -SMA)的表达以及HSC的数量. 但IFN- β 抑制

肝脏纤维化的具体机制以往的研究尚未阐明。

α -SMA是HSC激活的标志,在静止的HSC中不表达,可以用来衡量HSC的激活程度。Rao *et al*^[24]的研究显示,IFN- β 能明显抑制 α -SMA的表达,并呈量效依赖关系。IFN- β 还能明显抑制I型胶原和III型胶原的表达,因此IFN- β 能明显抑制HSC的激活,从而抑制肝纤维化的进展。

HSC的激活过程十分复杂,是多种细胞因子的旁分泌和自分泌协同作用的结果^[25],其中TGF- β 以及PDGF是2个最重要的因子^[26-28]。Rao *et al*^[24]的研究显示,IFN- β 能下调HSC的TGF- β 活化通路中TGF- β 1以及TGF- β 1下游信号分子Smad4的蛋白表达,并能上调Smad7的蛋白表达。在Smad分子中Smad4是TGF- β 活化通路中关键的核心分子,而Smad7却抑制TGF- β 1的信息传递,从而阻断TGF- β 1所诱导的合成ECM以及阻断HSC的激活^[29]。IFN- β 能抑制TGF- β 1和Smad4的表达,增加Smad7的表达,表明IFN- β 能通过抑制TGF- β 通路的信号传导来抑制HSC的激活。同TGF- β 一样,PDGF也以正反馈的方式作用于HSC,形成放大效应,进一步促进HSC的激活。因此抑制HSC合成PDGF-BB,阻断PDGF-BB的放大效应,无疑有助于抑制HSC的激活,从而有助于减轻肝纤维化。Rao *et al*^[24]的研究显示,IFN- β 能下调PDGF-BB的蛋白表达,从而通过抑制PDGF-BB的信号转导来抑制HSC的激活,抑制肝纤维化的发生。

以上所述,IFN- β 能明显抑制 α -SMA、I型胶原和III型胶原的表达,提示IFN- β 能明显抑制HSC的激活。进一步研究发现,IFN- β 能通过下调TGF- β 1、TGF- β 1下游信号分子Smad4、PDGF-BB的蛋白表达,上调Smad7的蛋白表达,抑制HSC的激活,发挥抗肝纤维化的作用。这为临床应用IFN- β 进行抗肝纤维化治疗提供了理论依据。

2.3 IFN- γ 研究显示IFN- γ 具有抗肝纤维化作用^[30-32],主要由以下几个方面:(1)通过抑制HSC的激活,降低ECM的沉积。IFN- γ 可减少增殖和激活的HSC数量,降低由肝损伤诱导的HSC的激活。Baroni *et al*^[33]动态观察了分别用二甲亚硝胺(DMN)、IFN- γ 、DMN+IFN- γ 及生理盐水处理后的大鼠的HSC增殖、活化及各种ECM成分的表达情况,认为IFN- γ 通过减少HSC在局部的增殖、活化和对ECM的合成,抑制DMN诱导的肝纤维化的发展,而且可持续到肝纤维化后期。(2)与抗炎作用有关。Du *et al*^[31]用IFN- γ 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化20例,将治疗前后肝

活检结果进行比较发现,治疗后的炎症坏死程度较治疗前好转,炎症积分由治疗前约12.78 $\pm$ 5.19降至6.57 $\pm$ 2.95($P<0.01$),提示肝纤维化有的逆转。(3)直接抑制肝脏胶原的合成及促进其降解^[34-35]。(4)刺激其他促胶原降解的细胞因子(如PGE2)的释放,产生抗纤维化。(5)拮抗TGF- β 1。Masuhara *et al*^[36]研究证实,IFN- γ 对TGF- β 1促进ECM成分的合成有抑制作用。(6)抗脂质过氧化作用。Liu *et al*^[37]用DMN ip诱导大鼠肝纤维化,经IFN- γ 治疗后,其血清谷丙转氨酶(ALT)降低,肝组织羟脯氨酸(Hyp)及丙二醛(MDA)含量减少,奥古蛋白(SOD)活性增加,MDA与Hyp呈正相关($r = 0.880$, $P<0.01$)。但IFN- γ 亦可启动巨噬细胞生成IL-1, TNF- α ,而后两者能刺激HSC的DNA合成与增殖,使ECM合成增多,因此,其综合效应有待进一步研究。

3 影响IFN抗肝纤维化的因素

IFN对在体内抗肝纤维化虽有一定疗效,但还达不到体外试验的水平,这可能与体内环境及试验条件存在一定差异有关,此外还可能受到下列各种因素的影响。

3.1 病毒基因型 近年来的研究表明,病毒基因型与IFN- α 的治疗有一定关系。病毒基因型不仅影响临床过程,与抗纤维化治疗也密切相关。HCV基因分为1a、1b、2a、2b、3a、3b型,受2a和2b型基因病毒感染的肝硬化患者对治疗的反应较佳,而受1b型基因病毒感染的患者则反应较差。Collier *et al*^[38]报道IFN联合利巴韦林治疗CHC合并肝纤维化的患者时,无论是剂量大小和疗程长短,基因型为2和3型的都好于1型。Farrell *et al*^[39]对56例CHC合并肝硬化的患者用IFN- α 治疗24 wk后随访48 wk,发现基因型为2a和3a型者对IFN- α 的治疗效果好。以上实验说明,病毒基因型直接影响IFN- α 抗肝纤维化的疗效。

3.2 肝汇管区铁的沉积 慢性丙型肝炎患者肝内铁沉积和铁贮存量增高不利于IFN产生疗效。去铁疗法有利于患者血清转氨酶的降低,但不能改善IFN治疗的应答率^[40]。

3.3 血清中抗IFN抗体 IFN治疗过程中(也有在治疗之前)部分患者血清中可出现抗IFN抗体,他可能会中和IFN的生物活性,从而导致治疗失败,这时换用其他亚型的IFN可能会奏效。因此IFN抗体的测定对治疗有一定指导意义^[41]。

3.4 剂量、疗程及其他因素 许多研究表明,IFN治疗可减轻肝纤维化,但效果与剂量、疗程有

■相关报道

TGF- β 在肝纤维化形成过程中起极其重要的作用,研究发现IFN能抑制TGF- β 的表达,至于IFN- α 对TGF- β /Smad信号传导通路中Smad蛋白家族的影响尚在研究中。

■应用要点

慢性肝炎是我国引起肝纤维化及肝硬化的主要原因, IFN是目前慢性肝炎抗病毒治疗的主要药物, 已证实IFN具有抗肝纤维化的作用, 但具体作用机制尚未完全清楚. 本文对IFN抗肝纤维化的机制研究进展进行介绍, 为临床应用提供了理论依据.

关^[42-43]. Guerret *et al*^[44]用IFN- α 治疗24例CHC患者, 剂量由313万单位至791万单位不等, 疗程由7.5 mo至21.8 mo不等, 结果发现5 a后肝纤维化程度较治疗前均有不同程度的减轻, 与IFN- α 的剂量和疗程无关, 但大多数学者认为大剂量、长疗程的IFN- α 治疗对抗纤维化效果更好. Abe *et al*^[45]用测定80例CHC患者血清PIIINP和IV7S水平来论证大剂量IFN- α 抗纤维化效果, 先用10万单位IFN- α 每天im 1次, 连续10 d, 然后改为3次/wk, 共24 wk, 并将患者分为3组: 完全反应组, 部分反应组和无反应组, 结果发现大剂量的IFN- α 治疗6 mo, 可抑制完全反应组和部分反应组患者5 a内肝纤维化的进展. 国内有人用新近上市的聚乙二醇化IFN- α 治疗CHC, 结果发现有组织应答者的比例与IFN- α -2a比较差异无显著性(44% vs 51%), 但在治疗合并肝硬化的CHC时发现180 μ g的聚乙二醇化IFN- α 的组织应答率为54%(37/68), 而IFN- α -2a的组织应答率为31%(17/55), 两者比较差异有显著性^[46-47], 提示聚乙二醇化IFN- α 治疗CHC时抗肝纤维化和延缓肝硬化效果更佳. 临床及动物实验研究显示IFN- α 的治疗疗效亦与剂量有关^[31,35,48].

总之, 在进入肝硬化之前的肝纤维化过程具有一定的可逆性, 因此抗肝纤维化治疗至关重要. 干扰素是目前被公认有效的抗肝炎病毒药物之一. 目前对干扰素治疗肝纤维化的研究已取得不少令人瞩目的成就, 但是对其认识还没有完全清楚, 仍有许多问题尚未解答或有待进一步阐明, 如(1)肝纤维化的分子调节机制; (2)不同类型肝病的肝纤维化的具体发病机制; (3)肝纤维化逆转的控制因素; (4)干扰素抗肝纤维化治疗的剂量、疗程及影响因素; (5)对干扰素的有效性和安全性的临床实验评估. 因此, 干扰素抗纤维化的机制尚待进一步明确. 可以预见, 随着干扰素抗肝纤维化作用研究的进一步深入, 这方面的问题将会得到更深一步地阐明.

4 参考文献

- 1 Laso FJ, Iglesias-Osma C, Ciudad J, Lopez A, Pastor I, Orfao A. Chronic alcoholism is associated with an imbalanced production of Th-1/Th-2 cytokines by peripheral blood T cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 1306-1311
- 2 Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-77
- 3 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 427-436
- 4 Shindo M, Ken A, Okuno T. Varying incidence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients

with chronic hepatitis C responding differently to interferon therapy. *Cancer* 1999; 85: 1943-1950

- 5 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 6 袁新明, 常英, 贾皓, 张盈涛, 厉英超. 干扰素 α 对实验大鼠肝纤维化的治疗作用. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 12-18
- 7 Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2002; 99: 353-364
- 8 Brenard R. Practical management of patients treated with alpha interferon. *Acta Gastroenterol Belg* 1997; 60: 211-213
- 9 Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000; 31: 75-82
- 10 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839
- 11 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001; 35: 465-473
- 12 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirology* 2001; 44: 227-231
- 13 Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 1996; 54: S39-45
- 14 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 315-334, v-vi
- 15 Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Med Invest* 2002; 49: 172-181
- 16 Saile B, Eisenbach C, El-Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. Antiapoptotic effect of interferon-alpha on hepatic stellate cells (HSC): a novel pathway of IFN-alpha signal transduction via Janus kinase 2 (JAK2) and caspase-8. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 31-41
- 17 Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I. Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 890-899
- 18 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-140
- 19 Solis-Herruzo JA, de la Torre P, Munoz-Yague MT. Hepatic stellate cells (HSC): architects of hepatic fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 438-439, 436-437
- 20 Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, Doi Y, Yamada A, Oshikawa O, Matsuzawa Y. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C

- after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 1999; 30: 1-7
- 21 Rippe RA. Life or death: the fate of the hepatic stellate cell following hepatic injury. *Hepatology* 1998; 27: 1447-1448
 - 22 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
 - 23 Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. *BMC Cell Biol* 2002; 3: 9
 - 24 Rao HY, Wei L, Fei R, Wang JH, Jiang D, Zhang Q, Cong X. Inhibitory effect of interferon-beta on the activation of LX-2 and rHSC-99 hepatic stellate cells in culture. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2006; 14: 550-552
 - 25 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
 - 26 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2572-2576
 - 27 Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 397-410
 - 28 Nagy P, Schaff Z, Lapis K. Immunohistochemical detection of transforming growth factor-beta 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology* 1991; 14: 269-273
 - 29 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
 - 30 Rockey DC, Chung JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Invest Med* 1994; 42: 660-670
 - 31 Du X, Weng H, Cai W. Histological changes in 20 hepatic fibrosis patients with chronic hepatitis B after recombinant human interferon-gamma treatment. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001; 9: 273-275
 - 32 Cai WM. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1269
 - 33 Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, Benedetti A. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 1996; 23: 1189-1199
 - 34 Weng HL, Cai WM, Yang YH. Dynamic changes in collagen type I and collagen type III in rabbits infected with *Schistosoma japonicum* and the effect of gamma-interferon. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2001; 19: 26-29
 - 35 Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 42-48
 - 36 Masuhara M, Yasunaga M, Tanigawa K, Tamura F, Yamashita S, Sakaida I, Okita K. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta 1 messenger RNA in various human liver diseases and correlation with hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1996; 24: 323-329
 - 37 Liu C, Chen W, Liu P, Wang Z, Hu Y, Liu C. Changes of lipid peroxidation in liver fibrogenesis induced by dimethylnitrosamine and drugs' intervention. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001; 9 Suppl: 18-20
 - 38 Collier J, Chapman R. Combination therapy with interferon-alpha and ribavirin for hepatitis C: practical treatment issues. *BioDrugs* 2001; 15: 225-238
 - 39 Farrell G, Cooksley WG, Dudley FJ, Watson K. Efficacy and tolerance of a 6-month treatment course of daily interferon-alpha 2a for chronic hepatitis C with cirrhosis. The Australian Hepatitis C Study Group. *J Viral Hepat* 1997; 4: 317-323
 - 40 Banner BF, Barton AL, Cable EE, Smith L, Bonkovsky HL. A detailed analysis of the Knodell score and other histologic parameters as predictors of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Mod Pathol* 1995; 8: 232-238
 - 41 邱望龙, 李福元, 管岑, 潘志灵, 黄四邑. 慢性乙型肝炎 C 基因启动子变异与干扰素治疗响应的关系. *实用肝脏病学杂志* 1998; 3: 136-138
 - 42 Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Regression of hepatic fibrosis in hepatitis C with long-term interferon treatment. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2573-2576
 - 43 Rumi MG, del Ninno E, Parravicini ML, Romeo R, Soffredini R, Donato MF, Zahm F, Colombo M. Long-term titrated recombinant interferon-alpha 2a in chronic hepatitis C: a randomized controlled trial. *J Viral Hepat* 1995; 2: 73-76
 - 44 Guerret S, Desmouliere A, Chossegros P, Costa AM, Badid C, Trepo C, Grimaud JA, Chevallier M. Long-term administration of interferon-alpha in non-responder patients with chronic hepatitis C: follow-up of liver fibrosis over 5 years. *J Viral Hepat* 1999; 6: 125-133
 - 45 Abe S, Tabaru A, Ono M, Tai M, Narita R, Moriyama A, Otsuki M. High-dose interferon-alpha therapy lowers the levels of serum fibrogenesis markers over 5 years in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2003; 25: 22-31
 - 46 Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; 343: 1666-1672
 - 47 Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A, Hoffman J, De Pamphilis J. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1673-1680
 - 48 Weng HL, Cai WM, Wang BE, Jia JD, Zhou XQ, Shi DM, Zhang DF, Zhao YR, Hao LJ, Wang SY, Wu WF, Xian JZ. Clinical study of anti-hepatic fibrosis effect of IFN-gamma in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83: 943-947

■同行评价

本文对干扰素抗肝纤维化机制的研究进展进行了介绍, 有实验研究结果, 也有临床应用的报道, 从多方面阐述其抗肝纤维化的作用, 并对干扰素治疗肝纤维化的影响因素和临床问题进行了总结, 文章有一定的科学性, 可读性和实际临床意义。

编辑 程剑侠 电编 何基才

大肠腺瘤细胞癌变过程中差异表达蛋白的研究进展

彭佳远, 秦环龙

■背景资料

大肠癌是人类最常见的肿瘤之一, 其病因复杂。从正常黏膜到大肠癌形成是一个多环节的受多种因素影响的复杂转变过程。目前大肠腺瘤被公认为是大肠癌的癌前病变之一, 腺瘤发展为腺癌的过程中, 细胞许多蛋白的表达发生变化, 目前免疫组化及蛋白组学技术不断发展, 为筛选这些差异蛋白提供了有效的手段。

彭佳远, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233
上海市科委基金资助项目, No. 05DJ14010
通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院外科. hlqin@sjtu.edu.cn
电话: 021-64369181-8261
收稿日期: 2007-05-16 修回日期: 2007-09-02

Differential expression of proteins during the canceration of colorectal adenoma cells

Jia-Yuan Peng, Huan-Long Qin

Jia-Yuan Peng, Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Supported by: Science and Technology Program of Shanghai City, No. 05DJ14010
Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn
Received: 2007-05-16 Revised: 2007-09-02

Abstract

Colorectal carcinoma is one of the most frequently seen malignant tumors of the gastric tract. Colorectal adenomas are considered to be precancerous lesions of colorectal carcinoma. The adenoma-carcinoma sequence has traditionally been characterized as a uniform progression from normal mucosa to adenoma to carcinoma through an underlying homogenous carcinogenic pathway. Current research indicates that some proteins are differentially expressed in colorectal adenomas during their carcinomatous changes. These proteins include cell skeleton-related proteins, intracellular enzymes and proteins involved in cellular signal transduction. The functional roles of these proteins in the carcinomatous changes of colorectal adenomas differ greatly from each other and have not yet been fully clarified. This article reviews these differentially expressed proteins and briefly describes the possible mechanism by which these proteins cause the malignant transition from colorectal adenoma to colorectal carcinoma. Furthermore, proteomic technology has developed rapidly and has been

simultaneously applied to the detection and characterization of various kinds of proteins due to its high throughput and convenient nature. This article also introduces the utilization of proteomics to identify and compare proteins that are differentially expressed between colorectal adenoma and colorectal carcinoma. Research on these proteins may lead to the identification of cancer markers that could subsequently facilitate the early diagnosis and further understanding of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Colorectal adenoma; Proteomics

Peng JY, Qin HL. Differential expression of proteins during the canceration of colorectal adenoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2814-2820

摘要

大肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 而大肠腺瘤被认为是大肠癌的癌前病变之一, 腺瘤-腺癌序列(正常大肠上皮-腺瘤-腺癌)也被认为是经典的大肠癌发病过程。研究表明, 大肠腺瘤恶变的过程中, 多种蛋白的表达水平会发生变化, 某些蛋白发生结构的变化, 这些蛋白涉及许多种如细胞内酶蛋白、骨架相关蛋白、信号蛋白等。其致癌机制也有很大差别, 并且还未完全明确。本文就近年来这些差异表达的蛋白质进行综述, 并对其可能的致癌机制进行简要描述。近年来蛋白组学技术也得到了快速发展, 由于其检测手段先进, 高通量而且可以同时检测多种蛋白, 已经被逐步应用于差异蛋白的检测和定性, 所以本文就大肠腺瘤与腺癌之间的差异蛋白组学也做了简要介绍, 有助于早期发现大肠癌的标志物, 早期诊断及了解其发病机制。

关键词: 大肠腺瘤; 大肠腺瘤; 蛋白质组学

彭佳远, 秦环龙. 大肠腺瘤细胞癌变过程中差异表达蛋白的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(26): 2814-2820
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2814.asp>

0 引言

大肠癌是人类最常见的肿瘤之一, 其病因复杂。

从正常黏膜到大肠癌形成是一个多环节的受多种因素影响的复杂转变过程. 目前大肠腺瘤被公认为癌前病变之一, 腺瘤发展为腺癌的过程中, 细胞许多蛋白的表达发生变化. 本文就大肠腺瘤与大肠癌细胞之间差异表达的蛋白质进行归类综述, 找出这些差异蛋白既有助于明确结肠癌病因也利于大肠癌的早期诊断.

1 大肠腺瘤的病理及癌变

按照病理分型, 大肠腺瘤可以分为管状腺瘤、绒毛状腺瘤以及混合性腺瘤^[1]. 管状腺瘤体积较小, 可以多发, 直径1-2 cm左右, 大的可达数厘米, 表面光滑, 颜色接近正常黏膜, 常带蒂. 镜检发现管状腺瘤含有不同程度的腺体增生或上皮细胞的不典型增生. 绒毛状腺瘤常体积较大, 单发, 广基而无明显蒂, 表面粗绒毛状, 常有黏液覆盖. 镜下可见腺瘤含有许多乳头状分枝, 轴心为血管结缔组织, 表面为单层柱状上皮或假复层上皮以及杯状细胞, 腺体成分较少. 混合性腺瘤含有上述两种腺瘤的病理特点.

目前认为大肠腺瘤与腺癌关系密切, 主要体现在以下4个方面: (1)1/3的大肠癌患者同时患有一个或几个腺瘤. (2)大肠腺瘤患者的腺癌发病率高. (3)腺瘤与腺癌的解剖分布相似, 都主要发生于远端结肠、直肠和盲肠. (4)术后病理往往提示腺瘤与腺癌成分互含. 一般来说腺瘤恶变与腺瘤的大小、病理类型以及年龄等因素有关, 管状腺瘤直径<1 cm者, 癌变机率1%; 1-2 cm者为10%; >2 cm者为35%. 绒毛状腺瘤较管状腺瘤容易恶变, <1 cm者癌变机率10%; 1-2 cm者为10%; >2 cm者为53%. 从癌变的时间来讲, 腺瘤癌变是一个长期缓慢的过程, 平均10 a左右. 从分子水平的研究发现, 从正常黏膜发展到腺瘤的过程中较早发生改变的基因为APC基因(adenomatous polyposis coli), 该部位基因失活导致上皮增生乃至发展为腺瘤, 随后为一系列的基因发生改变, 如C-myc、K-ras、DCC、P53等, 这些基因的激活或者突变使腺瘤逐渐转变为浸润性腺癌直至发生肝转移. 按照国际抗癌联合会(UICC)的分期, 大肠腺瘤的癌变过程如下: 轻度异型增生腺瘤(adenoma with mild dysplasia)→中度异型增生腺瘤(adenoma with moderate dysplasia)→重度异型增生腺瘤(adenoma with severe dysplasia)→浸润癌.

2 腺瘤癌变过程中差异表达的蛋白质

许多研究表明, 除了基因水平的改变, 腺瘤与腺

癌在许多蛋白质的表达上存在差异, 这些差异包括表达水平的差异和结构上的差异. 这类差异蛋白涉及许多种类, 有些是细胞骨架蛋白, 有些是细胞内部的酶, 另一些为细胞的表面跨膜蛋白等. 目前, 对这类差异蛋白的研究手段以免疫组化染色和蛋白质组学为主, 下面按照这两种研究手段进行分类综述.

2.1 应用免疫组化染色发现的差异蛋白

2.1.1 细胞骨架相关蛋白 该类蛋白主要通过作用于细胞的某些骨架蛋白, 如肌动蛋白等, 调控细胞运动、分化、细胞间黏附等活动, 从而引起肿瘤细胞发生、脱落和转移. β -catenin蛋白是一种多功能糖蛋白, 是细胞黏附素家族的成员. 按照不同的生理条件或者内环境而分布于不同的亚细胞结构, 基本有两种细胞内的存在形式, 一种是胞膜连接的 β -catenin, 另一种是胞质内游离的 β -catenin^[2]. 前者与细胞膜黏附蛋白E-cadherin的胞内段互相作用, 共同介导细胞之间的正确黏附, 并且胞膜连接的 β -catenin通过 α -catenin蛋白为媒介与肌动蛋白的肌丝连接从而构成细胞骨架. 而胞质内游离的 β -catenin蛋白是Wnt信号转导途径的重要组成成分, 其胞内降解需要结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)蛋白参与, 正常情况下, APC与胞质内 β -catenin构成蛋白复合体. Wnt信号途径被激活后, APC蛋白缺乏磷酸化, 不能正常降解 β -catenin, 导致后者在胞质内大量堆积并且转移入细胞核, 引起细胞核内聚集, 并与TCF/LEF蛋白一起构成转录复合体(β -catenin-TCF/LEF transcription complex), 该复合体能够激活某些基因的表达, 而这些基因的产物具有调控细胞周期、细胞间黏附、细胞分化等作用. 这也是肿瘤可能发生的机制之一^[3-5].

Herter *et al*^[6]选用结肠癌标本60例和结肠腺瘤标本45例(其中30例为轻度和中度异型增生腺瘤, 15例为高度异型增生腺瘤)的 β -catenin进行免疫组化染色来检测其表达差异. 结果提示, 在多数轻度和中度异型增生的腺瘤上皮中, β -catenin主要分布于细胞间接触的胞膜侧, 同时胞质内有少量的 β -catenin染色, 而15例高度异型增生的腺瘤上皮中, 除了细胞间接触的胞膜侧的分布, 细胞质以及细胞核内同时存在较强染色. 而在结肠腺瘤的病例中, β -catenin分布和染色强度与高度异型增生的腺瘤上皮类似, 同时在肿瘤边缘的癌细胞以及脱落发生侵袭或转移的单个癌细胞中, 常可见细胞内有很强的

■ 相关报道

大肠腺瘤目前被公认为大肠癌的癌前病变, 以往国内外研究两者之间差异表达蛋白主要通过免疫组化染色, 现今, 随着蛋白质组学、组织芯片等技术的快速发展, 检测差异蛋白的手段更为先进, 许多新蛋白被检测出, 目前研究主要集中在研究这些蛋白的机制和意义, 寻找可能的早期诊断标志物.

■创新盘点

本文首次比较全面的综述了近年对于大肠腺瘤癌变过程差异表达的蛋白的研究成果,并且对其进行归类描述,同时对于蛋白组学所发现的蛋白做简要介绍,内容较新颖,论述较全面。

β -catenin染色,提示胞核和胞质内 β -catenin的异常积累可能与癌细胞恶性特征的形成与发展有关,例如肿瘤的浸润与侵袭。作者还发现个别中度异型增生腺瘤中某些小区域的免疫染色的强度与分布和结肠癌细胞相似,提示结肠癌可能起源于结肠腺瘤组织中的恶性隐窝(malignant foci)。此外,研究表明部分结肠癌细胞的免疫荧光强度与正常结肠黏膜相似,不存在异常的胞质和细胞核内的 β -catenin的异常积累,这种现象可能与同一肿瘤存在异质性的亚群(subpopulation)有关。Iwamoto *et al*^[7]则用免疫组化的方法同时检测完整长度APC蛋白(full-length APC protein)和 β -catenin在结肠腺瘤及腺癌标本表达情况,结果发现所有腺瘤和腺癌标本都有 β -catenin蛋白积聚,主要分布于胞质和胞核中且腺癌的荧光强度大于腺瘤。而完整长度APC蛋白的免疫荧光在83%的腺癌标本和29%的腺瘤标本中缺失,也就是说,APC蛋白缺失与 β -catenin蛋白在胞内积聚有关。

2.1.2 细胞内酶蛋白 该类蛋白可以通过降解细胞外基质引起肿瘤细胞转移或者间接调节细胞的分化和增殖而引起结肠黏膜的恶变。Cathepsin B(CB)和Cathepsin D(CD)蛋白为两种溶酶体蛋白水解酶。CB是半胱氨酸蛋白水解酶的1种,几乎分布于所有类型细胞的溶酶体中,具有广泛的底物特异性,参与多种蛋白的降解,包括基底膜的某些蛋白。同时CB还可能参与其他蛋白水解酶的级联激活^[8-9]。CD属于天冬氨酸蛋白水解酶家族,分布于大多数哺乳动物细胞的溶酶体中。一般细胞先合成CD的前体,然后通过酶切,形成具有活性的酶蛋白,后者能够降解细胞外基质。有研究表明,在某些肿瘤如食管癌^[10]、乳腺癌^[11]、前列腺癌^[12]中,CB和CD蛋白表达增加,导致细胞外基质蛋白降解,引起肿瘤的浸润和转移。Talieri *et al*^[13]用免疫组化方法来检测结肠腺瘤向结肠癌进展时CB和CD蛋白的表达情况,结果发现正常结肠黏膜和结肠腺瘤的CB和CD为阴性染色或仅仅微弱的颗粒状染色,分布于细胞核旁或顶部胞质,而腺癌的CB具有强染色,呈颗粒状弥漫分布于胞质或极化分布于胞质的基底侧。Campo *et al*^[14]对CB的研究也有相同结果。另外,Talieri *et al*^[13]还发现CB染色同样出现在肿瘤间质的成纤维细胞和巨噬细胞中,后两者常与肿瘤的侵袭有关。而CD在腺癌细胞呈粗颗粒状染色,分布于核周和核旁,同时间质

细胞也有相似染色。多因素相关分析发现CB和CD染色强度与肿瘤级别、Dukes分期、淋巴结转移呈正相关^[13]。Iacobuzio-Donahue *et al*^[15]采用Western blots, enzyme assay以及免疫组化等方法发现结肠癌与结肠腺瘤表达的CB在结构上有差别($P<0.01$),62例结肠腺瘤中,多数(79%)结肠腺瘤表达的CB的重链发生糖基化(分子量28 kDa);而18例腺瘤中,绝大多数(94%)的CB的重链未发生糖基化(分子量27 kDa)。同时作者研究了CB的表达水平与肿瘤进展的关系,发现中晚期腺瘤(直径 >1 cm)高于早期腺瘤(直径 <1 cm);而Dukes A和B期腺瘤高于Dukes D期腺瘤($P<0.03$);Dukes A和B期腺瘤高于所有的腺瘤($P<0.003$)。

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是非甾体类抗炎药作用的靶物,环氧合酶在体内能将花生四烯酸转变为前列腺素、血栓素、前列环素等等。COX有两种亚型,COX-1和COX-2,各自由独立的基因编码。COX-1在人体组织内组成型表达;而COX-2在受到某些外源性或内源性刺激诱导时表达增强,如细菌内毒素、肿瘤坏死因子、丝裂原等^[16]。COX-2的致肿瘤机制可以分为前列腺素E2(PGE2)依赖^[17]的和非PGE2依赖^[18]两种。前者主要是由PGE2触发,PGE2可能通过继发于表皮生长因子受体转录激活而调控细胞的增殖,或通过增强Bcl-2的表达而抑制凋亡从而引起肿瘤;非PGE2依赖的机制则与PGE2无关,主要通过COX-2直接激活致癌原或者通过其产物前列腺素H2(PGH2)发挥作用,PGH2可转变为致癌原丙二醛(malondialdehyde)而产生致癌作用。Sheehan *et al*^[19]用免疫组化的手段检测异型增生程度不同的结肠腺瘤中COX-2的表达情况。结果发现异型程度越高,COX-2表达增加,其中轻度、中度、重度异型增生的标本中COX-2的表达率分别为36.3%, 50%, 66.6%($P<0.001$)。此外COX-2的表达与腺瘤大小及病理分型有关,在较大的腺瘤中表达增加($P<0.0001$),绒毛状腺瘤的COX-2水平显著高于管状腺瘤($P=0.05$)。Eberhart *et al*^[20]也发现14例腺癌标本中有12例(86%)COX-2 mRNA水平显著增高,而14例腺瘤中只有6例检测到了COX-2 mRNA的转录,两者差别有统计学意义($P<0.05$)。糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)在机体糖原分解利用上发挥重要作用,在哺乳动物体内糖原磷酸化酶有3种同工酶,即肌肉型(muscle-type)、肝脏型(liver-type)和脑型(brain-type),

其中脑型糖原磷酸化酶(brain-type glycogen phosphorylase, BGP)主要与机体发生应激情况下的糖原分解有关. 关于BGP与肿瘤发展之间的具体联系目前知之甚少, 有研究表明, 在肿瘤组织及胚胎中发现的糖原磷酸化酶主要是BGP, 提示BGP可能与甲胎蛋白、癌胚抗原等肿瘤标志物类似^[21-22]. Tashima *et al*^[23]选取151例结直肠癌和腺癌患者的标本, 对组织进行BGP的免疫组化染色, 结果发现正常结直肠黏膜未发现BGP的染色; 轻度、中度、重度异型增生腺瘤及含有微小癌灶的腺瘤(microcarcinoma in adenoma)中的BGP染色阳性率分别为7.7%, 61.1%, 87.5%和93.8%. 轻度异型增生的腺瘤与中度和重度异型增生及微小癌灶的腺瘤在BGP染色阳性率上有明显的统计学差异($P<0.05$, $P<0.001$). 而结直肠癌的标本中BGP阳性染色率达83.3%, 且与肿瘤的发生部位无关.

2.1.3 细胞核内蛋白质 该类蛋白主要位于细胞核内, 可以通过干扰细胞的有丝分裂或者抑制细胞凋亡、调节某些肿瘤相关基因的表达等引起肿瘤.

Survivin蛋白属于凋亡抑制蛋白家族(family of inhibitor of apoptosis, IAP), 分子量16.5 kDa, 免疫组化发现survivin蛋白主要分布于细胞内两个不同的区域, 一是细胞核内, 位于有丝分裂中期染色体的着丝粒上以及分裂后期的中心纺锤体中部; 二是胞质内, 分布于有丝分裂间期的微管、中心体、纺锤体的两极以及分裂中后期的纺锤体微管上^[24]. survivin蛋白主要有两大功能: 调节细胞分裂和抑制凋亡. 在G2/M期中, survivin表达显著增加, 并和微管系统相互作用, 维持有丝分裂器官的正常两极化(bipolar), 调节细胞有丝分裂^[25]. 在抑制凋亡方面, 它能够直接抑制凋亡蛋白酶caspase-3和caspase-7的活性或者通过共价结合caspase-9而发挥抑制凋亡的作用^[26]. 此外, survivin与甲胎蛋白等肿瘤标志物类似, 在胎儿发育期间表达水平较高. 出生后, survivin在正常组织中的水平降低, 而在某些肿瘤患者中的表达有所增高^[27].

Lin *et al*^[28]用免疫组化染色研究结肠黏膜、腺瘤以及腺癌中survivin的表达水平的差异. 正常结肠黏膜中无免疫染色; 低度异型增生腺瘤、高度异型增生腺瘤、腺癌的survivin阳性率分别为31.7%, 56.7%和63.2%. 统计检验发现低度异型增生腺瘤与高度异型增生腺瘤以及低度

异型增生腺瘤与腺癌的survivin表达有显著差异($P<0.05$); 而高度异型增生腺瘤与腺癌的survivin表达差异无统计学意义. 由此作者推断, survivin的表达发生在结肠癌变的早期(低度异型增生腺瘤), survivin也可能成为一种新的结肠癌早期诊断和治疗的靶蛋白.

2.1.4 细胞信号传导相关的蛋白分子 这类蛋白主要包括细胞跨膜信号受体、与受体作用的相关蛋白以及胞质内或胞核内的信号转导分子. 上述各种蛋白可以通过增强、抑制或干扰正常的细胞传导来引起或抑制肿瘤的发生和发展.

KAI1蛋白(CD82)是III型跨膜蛋白, 属于Tetraspanin超家族, 而Tetraspanin家族成员常参与某些细胞生物学功能的调节如细胞迁移、融合、黏附、增殖等^[29]. KAI1蛋白结构上包括胞外段的大小两个茎环结构(loop)、典型的Tetraspanin跨膜结构域、胞内段的茎环结构以及胞质结构域^[30]. KAI1蛋白主要功能之一是通过抑制肿瘤细胞的迁移(migration)而抑制肿瘤转移, 可能的机制有二: 一是直接接触某种信号转导机制, 降低细胞的运动力^[31]; 二是与Tetraspanin家族的成员(例如CD9和CD81)、整合素(integrin)、MHC等细胞表面分子相互作用, 触发多种信号转导途径而发挥效应, 例如削弱尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)的溶蛋白活性、降低细胞表面的整合素及表皮生长因子受体(epidermal growth factor-receptor, EGFR)水平、抑制细胞突起(protrusion)和足板(lamellipodia)的形成, 最终抑制肿瘤细胞转移^[32-33]. Lombardi *et al*^[34]用Western blot和免疫组化手段分析正常10例结肠腺癌同时伴有结肠腺瘤的标本的KAI1表达情况, 作者按照KAI1免疫组化染色的强度级别和染色细胞的百分比计算KAI1平均分(KAI1 mean score, KMS)以便量化KAI1在标本中的表达水平, 结果发现正常黏膜、结肠腺瘤、腺癌的KMS分别为237, 174和62分, 统计检验表明3者之间有显著差异($P<0.0167$), 说明正常结肠黏膜→结肠腺瘤→腺癌的过程中, KAI1表达水平逐渐降低.

EGFR属于酪氨酸激酶家族的细胞表面受体. EGFR能够通过与相关配体(如生长因子、TGF- α)作用、胞内胞外段结构域的结构改变以及与其他信号传导通路协同作用而完成其本身的细胞信号传导作用, 主要参与调控细胞的增殖、分化等等. EGFR的错误激活引发异常的信号传导可能最终导致细胞的恶变而引起多种癌

■应用要点

由于腺癌恶变过程中有许多蛋白的参与, 寻找这些差异表达的蛋白将有助于大肠癌的早期诊断、判断患者的预后以及开发新型的抗癌药物, 对深入了解大肠癌发病机制具有重要意义.

■名词解释

大肠腺瘤是大肠良性肿瘤。按照病理分型,大肠腺瘤可以分为管状腺瘤、绒毛状腺瘤以及混合性腺瘤。管状腺瘤含有不同程度的腺体增生或上皮细胞的不典型增生;绒毛状腺瘤含有许多乳头状分枝,轴心为血管结缔组织,表面为单层柱状上皮或假复层上皮以及杯状细胞,腺体成分较少;混合性腺瘤含有上述两种腺瘤的病理特点。

症^[35-36]。表皮生长因子受体相关蛋白(ERRP)是一种EGFR的负调节蛋白^[37], Yu *et al*^[38]的研究表明,在核苷酸序列和氨基酸序列上, ERRP与EGFR胞外配体结合区域分别有84%和89%的同源性,同时ERRP的mRNA水平在胃肠道和肝脏很高,提示ERRP主要调节胃肠道的EGFR。用ERRP的cDNA分别转染结肠癌细胞株HCT116和Caco-2后,其增殖明显减弱,提示ERRP能够抑制肿瘤的增殖。深入研究表明, ERRP的表达往往伴随酪氨酸激酶活性的减弱以及EGFR磷酸化的抑制,提示ERRP的抗肿瘤作用与其抑制EGFR的功能有关,这与Wang *et al*^[39]的研究相似。Jaszewski *et al*^[40]用免疫组化染色研究正常黏膜经腺瘤到腺癌发展过程中ERRP的水平,正常结肠黏膜隐窝充满ERRP染色伴有核上染色,且从肠腔面到基底面染色逐渐减弱。10例分化程度不同的管状绒毛状腺瘤中,随着异型增生程度增加, ERRP的染色逐渐减弱并且ERRP典型的核上染色也丧失,而在腺癌细胞中,胞质内染色广泛减弱,且分化程度越差免疫染色越弱($P = 0.002$)。综上所述,研究者认为在结肠黏膜癌变过程中, ERRP的表达水平逐渐减弱同时分布也趋于异常。

信号转导因子和转录激活因子(signal transducers and activator of transcriptions, STATs)是胞质内转录因子,参与细胞因子和生长因子信号转导途径。目前一共有7种哺乳动物的STAT基因被检测出来, STAT-3就是其中1种。这些蛋白含有1个保守的结构,由750-850个氨基酸组成。细胞因子与其相应受体结合后,通过JAK蛋白激酶作用而使受体的酪氨酸磷酸化,磷酸化的酪氨酸为STATs提供结合位点,与后者结合后发生自身磷酸化,并且从受体中释放并转入细胞核,调节靶基因的表达。研究表明,信号转导因子和转录激活因子-3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT-3)在许多肿瘤组织组成型表达^[41-42],其可能通过作用于周期蛋白-D(Cyclin-D)或者调节Bcl-xL的表达来干扰细胞周期或抗凋亡而引起肿瘤的发生发展^[43-44]。

Kusaba *et al*^[45]用免疫组化的方法研究p-STAT-3(STAT-3的激活形式)在结肠腺瘤和腺癌的表达情况。结果发现44例腺瘤标本中8例出现p-STAT-3染色,而95例腺癌标本中有69例有p-STAT-3染色,两者有明显统计学差异($P < 0.001$)。同时研究者发现p-STAT-3的表达与肿瘤的分化程度无明显相关,但与肿瘤浸润的深

度以及淋巴结或静脉侵犯有关($P < 0.05$)。

2.2 应用蛋白质组学发现的差异表达蛋白 蛋白质组指的是细胞、组织和基因组所表达的全部蛋白质总和。蛋白质组学研究具有观察由多基因事件引起的多蛋白组分整体变化的独特优势。国内外蛋白质组研究表明,正常结肠黏膜、结肠腺瘤、结肠癌原发病灶之间存在差异表达的蛋白质,这些蛋白种类繁多,有些尚未完全定性,在此作简要介绍。Roblick *et al*^[46]提取正常结肠黏膜、结肠腺瘤、腺癌、肝转移灶的蛋白作双向电泳,共发现了112个差异蛋白斑点,72个斑点被鉴定出来,其中46种蛋白在结肠癌进展过程中表达增强,26种表达下调。这些蛋白包括细胞周期相关蛋白、细胞的骨架蛋白以及调节代谢的蛋白等。Kim *et al*^[47]将14例结肠癌组织标本与远处正常结肠黏膜作差异蛋白质组学研究发现14个蛋白斑点在癌组织种表达水平有显著变化,其中硒连蛋白(selenium-binding protein)水平在85%的癌组织中明显降低,而在结肠腺瘤中硒连蛋白含量丰富,同时研究者用组织微阵列技术研究了240例II期、III期结肠癌患者的生存率,发现其与硒连蛋白水平有一点关系,硒连蛋白水平正常的患者的累积生存率(85.3%)高于硒连蛋白水平降低者(71.5%)($P = 0.021$)。因此研究者提出硒连蛋白与结肠黏膜恶变以及结肠癌患者生存率降低相关。Stulik *et al*^[48]收集正常结肠黏膜、结肠腺瘤及结肠癌的标本,分别提取蛋白质作2-DE电泳和质谱分析,共发现3组可以定性的差异表达蛋白: A组包括两种蛋白: 肝脂肪酸连接蛋白(liver-fatty acid binding protein, L-FABP)和碳酸酐酶I(carbonic anhydrase I, CAH I),两者在腺瘤和腺癌组织中表达水平很低,而在正常黏膜中表达很高; B组包含7种蛋白: 钙连蛋白S100A11、碱性肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIASE)、膜联蛋白lii(annexin lii)、二甲基精氨酸水解酶(DDAH)、膜联蛋白IV、抑制素(prohibitin)、细胞角蛋白。这些蛋白在腺瘤和腺癌中的表达水平较正常黏膜高; C组包含以下几种蛋白: S100A9、S100A8、溶血磷脂酶(lyso-phospholipase)、酸性PPIASE、细胞周期蛋白、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)、nm23H1G(一种与肿瘤转移相关的蛋白,机制尚未完全明确)、延长因子2(EF-2)。这些蛋白在结肠癌组织中的表达水平较腺瘤和正常黏膜都高,故作者认为C组蛋白可能为结肠癌标志物。

总之, 大肠腺瘤是结肠内最常见的良性肿瘤, 目前认为大肠腺瘤可能是大肠腺癌的癌前病变, 其癌变过程伴随多种蛋白的表达发生改变, 免疫组化等方法已经检测出多种表达差异的蛋白, 为大肠癌的发病机制研究以及早期诊断治疗提供理论依据. 现今蛋白组学和蛋白芯片技术高速发展, 并且已经逐步应用于结肠肿瘤发生发展过程中差异表达蛋白的研究. 相信随着这些技术的不断成熟, 人们会对大肠腺瘤恶变过程蛋白表达差异有更深入的了解.

3 参考文献

- 1 吴阶平, 裘法祖. 黄家骊外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1209-1214
- 2 Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993; 9: 317-321
- 3 Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638-642
- 4 Takayama T, Shiozaki H, Doki Y, Oka H, Inoue M, Yamamoto M, Tamura S, Shibamoto S, Ito F, Monden M. Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 605-613
- 5 Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997; 431: 167-172
- 6 Herter P, Kuhnen C, Muller KM, Wittinghofer A, Muller O. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 297-304
- 7 Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH. Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1935-1940
- 8 Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 1992; 282 (Pt 1): 273-278
- 9 Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274: 13066-13076
- 10 Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, Orringer MB, Beer DG, Hanash S. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12410-12415
- 11 Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-307
- 12 Sinha AA, Gleason DF, Deleon OF, Wilson MJ, Sloane BF. Localization of a biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization. *Anat Rec* 1993; 235: 233-240
- 13 Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A, Xynopoulos D, Arnogianaki N, Plataniotis G, Yotis J, Agnanti N. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 205: 97-106
- 14 Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 1994; 145: 301-309
- 15 Iacobuzio-Donahue CA, Shuja S, Cai J, Peng P, Murnane MJ. Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression. *J Biol Chem* 1997; 272: 29190-29199
- 16 Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182
- 17 Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11280-11285
- 18 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-366
- 19 Sheehan KM, O'Connell F, O'Grady A, Conroy RM, Leader MB, Byrne MF, Murray FE, Kay EW. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 619-625
- 20 Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188
- 21 Newgard CB, Littman DR, van Genderen C, Smith M, Fletterick RJ. Human brain glycogen phosphorylase. Cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with the human liver and muscle isozymes. *J Biol Chem* 1988; 263: 3850-3857
- 22 Hashimoto K, Tamura K, Otani H, Tanaka O. Histochemical and immunohistochemical studies related to the role of glycogen in human developing digestive organs. *Anat Embryol (Berl)* 1995; 192: 497-505
- 23 Tashima S, Shimada S, Yamaguchi K, Tsuruta J, Ogawa M. Expression of brain-type glycogen phosphorylase is a potentially novel early biomarker in the carcinogenesis of human colorectal carcinomas. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 255-263
- 24 Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002; 115: 575-585
- 25 Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbisky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 2002; 62: 2462-2467
- 26 O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A*

■同行评价

本文较全面的综述了大肠腺瘤细胞癌变过程中差异表达蛋白的最新进展, 重要信息把握较好, 结构明了, 论述清楚, 轻重恰当, 对于开发大肠癌的诊断和治疗方法有一定的应用价值.

- 2000; 97: 13103-13107
- 27 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8581-8589
- 28 Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 974-977
- 29 Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; 11: 428-442
- 30 Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994; 15: 588-594
- 31 Delaguillaumie A, Lagaudriere-Gesbert C, Popoff MR, Conjeaud H. Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci* 2002; 115: 433-443
- 32 Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol* 2000; 10: 1009-1012
- 33 Iwata S, Kobayashi H, Miyake-Nishijima R, Sasaki T, Souta-Kuribara A, Nori M, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Morimoto C. Distinctive signaling pathways through CD82 and beta1 integrins in human T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1328-1337
- 34 Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5724-5731
- 35 Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4016-4031
- 36 Garcia I, Vizoso F, Andicoechea A, Raigoso P, Verez P, Alexandre E, Garcia-Muniz JL, Allende MT. Clinical significance of epidermal growth factor receptor content in gastric cancer. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 183-188
- 37 Reddy S, Rishi AK, Xu H, Levi E, Sarkar FH, Majumdar AP. Mechanisms of curcumin- and EGF-receptor related protein (ERRP)-dependent growth inhibition of colon cancer cells. *Nutr Cancer* 2006; 55: 185-194
- 38 Yu Y, Rishi AK, Turner JR, Liu D, Black ED, Moshier JA, Majumdar AP. Cloning of a novel EGFR-related peptide: a putative negative regulator of EGFR. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1083-1089
- 39 Wang Z, Sengupta R, Banerjee S, Li Y, Zhang Y, Rahman KM, Aboukameel A, Mohammad R, Majumdar AP, Abbruzzese JL, Sarkar FH. Epidermal growth factor receptor-related protein inhibits cell growth and invasion in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7653-7660
- 40 Jaszewski R, Levi E, Sochacki P, Frank J, Kucuk O, Axelrod BN, Majumdar AP. Expression of epidermal growth factor-receptor related protein (ERRP) in human colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett* 2004; 213: 249-255
- 41 Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 594-600
- 42 Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST, Shiau AL, Wu CL, Su WC. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis. *Br J Cancer* 2003; 89: 344-349
- 43 Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3351-3355
- 44 Huang M, Page C, Reynolds RK, Lin J. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2000; 79: 67-73
- 45 Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Nagayasu T, Sekine I. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. *J Clin Pathol* 2005; 58: 833-838
- 46 Roblick UJ, Hirschberg D, Habermann JK, Palmberg C, Becker S, Kruger S, Gustafsson M, Bruch HP, Franzen B, Ried T, Bergmann T, Auer G, Jornvall H. Sequential proteome alterations during genesis and progression of colon cancer. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1246-1255
- 47 Kim H, Kang HJ, You KT, Kim SH, Lee KY, Kim TI, Kim C, Song SY, Kim HJ, Lee C, Kim H. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* 2006; 6: 3466-3476
- 48 Stulik J, Hernychova L, Porkertova S, Knizek J, Macela A, Bures J, Jandik P, Langridge JL, Jungblut PR. Proteome study of colorectal carcinogenesis. *Electrophoresis* 2001; 22: 3019-3025

编辑 何燕 电编 郭海丽

启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸的磷酸化

司富春

司富春, 河南中医学院中医药分子生物学实验室 河南省郑州市 450008
国家自然科学基金资助项目, No. 30171160, No. 30371716
通讯作者: 司富春, 450008, 河南省郑州市金水路1号, 河南中医学院中医药分子生物学实验室. sifc2000@hotmail.com
电话: 0371-65680049
收稿日期: 2007-01-18 修回日期: 2007-09-03

Inhibitory effects of *Qigesan* and its individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC- γ 1 in primary cultured esophageal carcinoma cells

Fu-Chun Si

Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Traditional Chinese Medicine, He'nan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, He'nan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171160 and No. 30371716

Correspondence to: Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Chinese Traditional Medicine, He'nan College of Traditional Chinese Medicine, 1 Jinshui Road, Zhengzhou 450008, He'nan Province, China. sifc2000@hotmail.com

Received: 2007-01-18 Revised: 2007-09-03

Abstract

AIM: To investigate the signaling pathways involved in the action of *Qigesan* in treating esophageal cancer, the effects of *Qigesan* and its different individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC- γ 1 were studied in primary cultured esophageal carcinoma cells.

METHODS: Cells from surgically resected human esophageal carcinoma specimens were primary cultured and treated with PDGF and the water extracts from *Qigesan* and its individual components. Total protein and tyrosine phosphorylated levels of PDGFR and PLC- γ 1 were assessed by Western blotting.

RESULTS: There was no difference in the levels of PDGFR β and PLC- γ 1 proteins before and

after treatment of primary cultured esophageal carcinoma cells with water extracts from *Qigesan* and its separated components for 15 minutes and PDGF-BB for 4 minutes. The tyrosine phosphorylation levels of PDGFR β and PLC- γ 1 were markedly increased by stimulation with PDGF-BB, and markedly decreased in cells treated with *Qigesan* and its separated components, which showed the best effects for promoting blood circulation group, while the second best was a whole prescription of *Qigesan*.

CONCLUSION: Inhibiting growth signaling via inhibition of tyrosine phosphorylation of PDGFR and PLC- γ 1 is an important mechanism in the treatment of esophageal cancer with *Qigesan* and its separated components.

Key Words: *Qigesan* prescription; Esophageal carcinoma; Phospholipase C- γ 1; Platelet-derived growth factor receptor; Tyrosine phosphorylation; Western blotting

Si FC. Inhibitory effects of *Qigesan* and its individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC- γ 1 in primary cultured esophageal carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2821-2824

摘要

目的: 观察启膈散及其活血和化痰2个拆方对原代培养的食管癌细胞血小板衍生生长因子受体(PDGFR)和磷脂酶C- γ 1(PLC- γ 1)酪氨酸磷酸化的影响, 以探讨启膈散治疗食管癌的作用机制。

方法: 从外科切除的原发性食管癌组织中采集食管上皮细胞进行原代培养, 加入PDGF和启膈散及其活血和化痰2个拆方的水提物, 免疫印迹法(Western blotting)测定PDGFR-PLC- γ 1蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平。

结果: 用PDGF-BB刺激4 min和启膈散及其拆方处理15 min前后, 原代培养食管癌细胞PDGFR β 和PLC- γ 1蛋白表达没有变化; 但PDGF-BB刺激后PDGFR β 和PLC- γ 1蛋白酪氨酸

■背景资料

自1989年报道 PLC- γ 1是PDGF受体酪氨酸激酶的底物以来, 已发现PDGFR-PLC- γ 1信号转导在多种生理和病理过程中起关键作用, 已成为肿瘤病理和药物研究重要的信号转导通路, 但有关在食管癌病变中的作用尚未报道。

■相关报道

PDGFR-PLC- γ 1 信号转导在对肝细胞、成骨肉瘤细胞、肾小球膜细胞和星状细胞等研究中已有报道, PDGFR-PLC- γ 1 信号转导机制除已知的PDGFR受体酪氨酸激酶使PLC- γ 1酪氨酸磷酸化外, 近年还发现PDGFR与PLC- γ 1直接结合的相互作用途径。

酸磷酸化明显增强, 启膈散及其拆方能不同程度地降低其蛋白磷酸化水平, 其中以活血组作用最好, 全方组次之。

结论: 食管癌病变与PDGFR-PLC- γ 1蛋白酪氨酸磷酸化增强有关, 启膈散及其拆方通过抑制PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化从而抑制生长信号转导是其治疗食管癌重要机制。

关键词: 启膈散; 食管癌; 磷脂酶C- γ 1; 血小板衍生生长因子受体; 蛋白酪氨酸磷酸化; 免疫印迹法

司富春. 启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸的磷酸化. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2821-2824

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2821.asp>

0 引言

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGFs)包括PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC和PDGF-DD, 分别通过与相对应的受体(platelet-derived growth factor receptor α/β , PDGFR)结合而对细胞发生作用^[1-4]。PDGFR有1个细胞外配体结合区、1个跨膜区和1个细胞内区, 细胞内区为酪氨酸蛋白激酶^[5]。PDGF与细胞表面受体结合引起受体聚合成二聚体和PDGF受体多肽链上特异酪氨酸残基磷酸化^[6]。受体自磷酸化激活其酪氨酸激酶活性, 向细胞内底物传导促细胞有丝分裂的信号^[7]。这些磷酸化的酪氨酸残基是细胞蛋白质结合的位点, 这种结合是通过与效应蛋白质的SH2区相互作用而实现^[8]。PDGF受体的底物包括磷脂酶C- γ 1(PLC- γ 1)、ras GTPase激活蛋白、PI3K调节单位P85、蛋白酪氨酸激酶P60src家族成员、Nck、Grb-2等^[9-10]。

PDGF及其受体参与各种各样生理活动, 例如胚胎发育和伤口愈合。PDGF异常高的活性在某些病理生理发生中起关键作用^[11]。PDGF B链对急性转染猿猴肉瘤病毒的sis癌基因是必需的, PDGF类生长因子在猿肉瘤感染细胞或转染sis癌基因的细胞中表达, 由于对PDGF受体持续的自分泌刺激, 导致这些细胞转型^[12]。PDGF和其受体在多种肿瘤如肺癌、前列腺癌、视网膜神经细胞瘤中起重要作用, 参与了肿瘤的自分泌刺激生长、刺激血管生成和转移^[13]。

PLC- γ 1作为PDGF受体细胞内底物, 被PDGF受体酪氨酸磷酸化激活, 是PDGF产生促细胞有丝分裂信号的重要通路^[14-15]。我们研究发

现食管癌组织中PLC- γ 1和PDGFR受体超量表达, PLC- γ 1介导的信号转导增强, 中医复方启膈散及其拆方可以抑制人食管癌肿瘤细胞Eca109细胞和原代培养的人食管癌细胞PLC- γ 1介导的信号作用, 并能降低PDGFR受体表达。为了深入研究PDGF-PLC- γ 1信号转导在食管癌病变中的作用和启膈散的作用机制, 我们观察了启膈散及其拆方对原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 丹参、郁金、砂仁壳、沙参、贝母、茯苓购于河南中医学院第三附属医院, 经鉴定皆为正品。分为全方组(W)、活血组(P)(丹参、郁金、砂仁壳)、化痰组(R)(沙参、贝母、茯苓), 每味药10 g, 煎煮、浓缩、5000 g离心、0.22 μ m滤膜过滤, 取部分干燥称重, 换算出浓度, 用时调至所需浓度。人食管癌组织来源于河南省肿瘤医院, 经病理确诊的患者, 病理类型为鳞癌。RPMI 1640培养基(Gibco公司); 胎牛血清(Hyclone公司); PMSF和Leupeptin (Amresco公司); 丙烯酰胺(Biomol公司); 胰蛋白酶、山羊抗小鼠IgG-HRP和山羊抗兔IgG-HRP(华美公司); ECL试剂盒(Santa Cruz公司); PLC- γ 1 mAb(韩国浦项科技大学国家信号传导网络实验室惠赠); rhPDGF-BB(R&D公司); PDGFR β 多克隆抗体(Santa Cruz公司); 抗phosphotyrosine mAb 4G10(UBI公司); 考马斯亮蓝G250(Amresco公司)。Heraeus细胞培养箱(德国 Kendro公司); 倒置显微镜(Zeiss公司); 紫外分光光度计(Thermo公司); SG-603生物安全柜(Bake公司); ELx800型酶标仪(Bio-Tek公司); 蛋白电泳系统(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 外科切除的原发性食管癌组织, 从肉眼可见的肿瘤组织和标本末端2个部位采集食管上皮组织, 用不含血清的RPMI 1640培养液10 mL冲洗3次, 去除其表面的凝血块及坏死组织, 一部分组织直接用于检测, 一部分用于体外培养。将体外培养的组织剪成泥状, 加入5 mL trypsin消化液, 37℃消化15 min, 用60目不锈钢网筛过滤, 1000 g离心10 min, 用10 mL不含血清的RPMI培养液洗3次, 台盼兰染色检测活细胞数在90%以上, 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI培养液悬浮细胞, 按实验分组要求分配于96孔培养板中和 Φ 60培养皿中, 37℃、50 mL/L CO₂培

■创新盘点

本文首次发现食管癌病变与PDGFR-PLC γ 1蛋白酪氨酸磷酸化增强有关, 启膈散及其拆方通过抑制PDGFR-PLC γ 1酪氨酸磷酸化从而抑制生长信号转导是其治疗食管癌的重要机制。

养箱培养。

1.2.2 PDGFR-PLC- γ 1蛋白表达及酪氨酸磷酸化水平检测 Western blot^[16]检测蛋白表达。用启膈散及其拆方水提物处理15 min后, 然后用PDGF-BB(30 μ g/L)处理4 min, 再用裂解液裂解细胞(裂解液组成: 20 mmol/L HEPES, pH7.2, 100 mL/L 甘油, 150 mmol/L NaCl, 10 mL/L TritonX-100, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mg/L Leupeptin和1 mmol/L PMSF), 提取蛋白, 用Bradford法测定蛋白浓度。用80 g/L SDS-PAGE电泳, 同一个凝胶左右上两套同样样品。分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜, 丽春红染色后, 将硝酸纤维素膜剪成左右两部分。50 g/L脱脂奶粉TTBS溶液封闭滤膜30 min(TTBS: 10 mmol/L, Tris, pH7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mL/L Tween 20), 一部分用PLC- γ 1 mAb或PDGFR β 多抗反应, 另一部分用抗磷酸酪氨酸mAb(4G10)反应, 再用辣根过氧化物酶偶联的抗鼠IgG抗体或抗兔IgG抗体检测 and ECL底物显影。

2 结果

启膈散及其拆方抑制PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化Western blot分析显示用PDGF-BB刺激4 min和用启膈散及其拆方处理15 min前后, 原代培养食管癌细胞PDGFR β 和PLC- γ 1蛋白表达没有变化; 但PDGF-BB刺激后PDGFR-PLC- γ 1蛋白酪氨酸磷酸化明显增强, 应用启膈散及其拆方处理的原代培养食管癌细胞磷酸化水平与对照组相比显著降低。说明启膈散及其拆方对PDGFR-PLC- γ 1蛋白酪氨酸磷酸化具有不同程度的抑制作用, 其中以P组作用最好, W组次之(图1)。

3 讨论

PDGFR是自磷酸化的酪氨酸蛋白激酶, 与其配体结合后, 受体发生空间构象改变, 酪氨酸残基相互作用发生磷酸化而激活, 并磷酸化多种下游分子, 启动级联信号传导^[17]。PLC- γ 1在肿瘤发生和发展中起关键作用, 其过量表达和激活引起肿瘤发生、浸润和转移^[18]。PLC- γ 1通过SH2区与PDGFR相互作用, 是以PDGFR为中心的多级蛋白质复合物的一个重要组成成分, 直接被PDGFR酪氨酸残基磷酸化而活化。PLC- γ 1酶活化后, 催化PIP2分解成产物IP3和DAG作为第2信使物质在细胞内发生作用, IP3能引起细胞内钙库的释放, DAG能激活PKC^[19-20]。通过这两条通路和其他未知通路从而激活多种细胞反应。PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化是PDGFR介导的

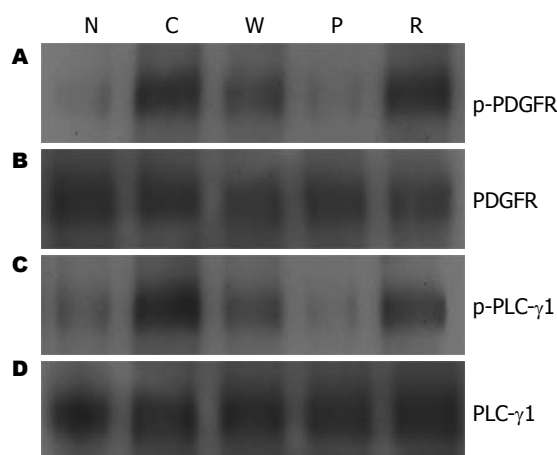


图1 启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化的Western blot。A: α pTyr; B: α PDGFR; C: α pTyr; D: PLC- γ 1。N: 不用PDGF刺激组; C: 对照组; W: 全方组; P: 活血组; R: 化痰组。

PDGFR-PLC- γ 1信号传导的前提条件。

食管癌细胞以自分泌PDGF的形式促进生存和增殖^[21]。我们研究发现, 食管癌组织中PDGFR超量表达、PDGFR-PLC- γ 1磷酸化水平升高、PLC- γ 1介导的信号转导增强, 中医复方启膈散及其拆方可以抑制PDGFR-PLC- γ 1的表达, 减弱PLC- γ 1介导的信号转导。为了进一步研究该方对PDGF受体介导的生长信号转导的影响, 我们用rhPDGF-BB刺激原代培养的食管癌细胞, 观察启膈散及其拆方对其PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化的作用, 发现启膈散及其拆方可以不同程度地抑制PDGFR-PLC- γ 1的酪氨酸磷酸化, 用中药短时间处理食管癌细胞, 并不影响PDGFR-PLC- γ 1蛋白表达。上述结果表明启膈散及其拆方可以通过抑制酪氨酸蛋白激酶受体的酪氨酸磷酸化而抑制PLC- γ 1介导的信号转导, 这也是启膈散治疗食管癌的部分重要机制。

4 参考文献

- Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1241-1257
- Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 275-286
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-1316
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 197-204
- Srinivasan DM, Kapoor M, Kojima F, Crofford LJ. Growth factor receptors: implications in tumor biology. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 1246-1249
- Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases:

■应用要点

本文对食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1信号转导异常的发现可以为食管癌病变提供新的认识, 为研制药物提供新的靶点。

■名词解释

蛋白酪氨酸激酶是一类催化ATP上 γ -磷酸转移到蛋白酪氨酸残基上的激酶, 能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化, 在细胞生长、增殖、分化中具有重要作用。根据PTK是否存在于细胞膜受体可将其分成非受体型和膜受体型。

■同行评价

本文研究了启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC γ 1酪氨酸磷酸化,设计合理,分析有据,对基础研究有一定的参考价值。

- mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 117-123
- 7 Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 205-213
- 8 Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991; 252: 668-674
- 9 Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 281-302
- 10 Schlesinger TK, Demali KA, Johnson GL, Kazlauskas A. Platelet-derived growth factor-dependent association of the GTPase-activating protein of Ras and Src. *Biochem J* 1999; 344 Pt 2: 519-526
- 11 Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 272-285
- 12 Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 1983; 221: 275-277
- 13 Jones AV, Cross NC. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2912-2923
- 14 Valius M, Kazlauskas A. Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 1993; 73: 321-334
- 15 Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis B, Kim JG, Schlessinger J, Rhee SG. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 1991; 65: 435-441
- 16 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. third edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 16: 25-26
- 17 Funa K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 647-658
- 18 Wells A, Grandis JR. Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 285-290
- 19 Kim MJ, Si F, Kim SJ, Hong SB, Hwang JI, Lee HJ, Lee SJ, Chang JS, Lee YH, Ryu SH, Suh PG. The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to translational elongation factor-1alpha. *Mol Cells* 1999; 9: 631-637
- 20 Piccolo E, Innominato PF, Mariggio MA, Maffucci T, Iacobelli S, Falasca M. The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration. *Oncogene* 2002; 21: 6520-6529
- 21 Liu YC, Chen SC, Chang C, Leu CM, Hu CP. Platelet-derived growth factor is an autocrine stimulator for the growth and survival of human esophageal carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 1996; 228: 206-211

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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].

替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及Ghrelin、P物质表达的影响

魏良洲, 杨林, 王利华, 张民生, 李新华, 田字彬

魏良洲, 杨林, 王利华, 张民生, 李新华, 田字彬, 青岛大学医学院附属医院 山东省青岛市 266003
通讯作者: 魏良洲, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科. weiliangzhou62@126.com
电话: 0532-82911304 传真: 0532-82911999
收稿日期: 2007-06-03 修回日期: 2007-09-02

Effect of tegaserod on gastric emptying and the expression of ghrelin and substance P in diabetic rats

Liang-Zhou Wei, Lin Yang, Li-Hua Wang,
Min-Sheng Zhang, Xin-Hua Li, Zi-Bin Tian

Liang-Zhou Wei, Lin Yang, Li-Hua Wang, Min-Sheng Zhang, Xin-Hua Li, Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Liang-Zhou Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. weiliangzhou62@126.com
Received: 2007-06-03 Revised: 2007-09-02

Abstract

AIM: To investigate the effect of tegaserod on gastric emptying and the expression of ghrelin and substance P (SP) in diabetic rats, and to explore the therapeutic effect of tegaserod on diabetic gastroparesis and its possible mechanism.

METHODS: Fifty Wistar rats were randomly divided into five groups: a normal control group (NC group, $n = 10$), a diabetes mellitus group (DM group, $n = 10$), a low dose tegaserod-treated group (TEG-L group, $n = 10$), a moderate dose tegaserod-treated group (TEG-M group, $n = 10$) and a high dose tegaserod-treated group (TEG-H group, $n = 10$). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After 8 weeks, tegaserod was administered by intraperitoneal injection at doses of 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg and 1 mg/kg in TEG-L, TEG-M and TEG-H groups, respectively, for 3 days. Gastric emptying was measured by intragastric admin-

istration of phenol red. The expression of ghrelin in the gastric mucosa and SP in the gastric antrum was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The staining intensities for ghrelin and SP in all TEG groups were significantly decreased compared with those in the NC group (ghrelin: 34.721 ± 6.759 , 33.547 ± 6.255 , 35.141 ± 5.987 vs 43.514 ± 5.323 , $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$; SP: 13.548 ± 1.078 , 13.952 ± 1.246 , 11.845 ± 1.567 vs 16.383 ± 2.275 , all $P < 0.01$) and increased compared with the DM group (ghrelin: 26.626 ± 4.596 , all $P < 0.05$; SP: 9.257 ± 1.636 , all $P < 0.01$). However, the differences in ghrelin staining intensities among TEG groups were not statistically significant. The staining intensities for SP in the TEG-L and TEG-M groups were increased compared with the TEG-H group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Tegaserod may improve delayed gastric emptying in diabetic rats by enhancing the expression and release of ghrelin and SP.

Key Words: Diabetes gastroparesis; Gastric emptying; Ghrelin; Substance P

Wei LZ, Yang L, Wang LH, Zhang MS, Li XH, Tian ZB. Effect of tegaserod on gastric emptying and the expression of ghrelin and substance P in diabetic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2825-2830

摘要

目的: 研究替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及胃组织Ghrelin、P物质表达的影响, 探讨替加色罗对糖尿病胃轻瘫的治疗作用及其可能的机制。

方法: 50只清洁级♂ Wistar大鼠随机分为正常对照组(NC组, $n = 10$)、糖尿病组(DM组, $n = 10$)、低剂量替加色罗治疗组(TEG-L组, $n = 10$)、中剂量替加色罗治疗组(TEG-M组, $n = 10$)和高剂量替加色罗治疗组(TEG-H组, $n = 10$)。ip链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病大鼠模型, 8 wk后分别以0.1、0.5和1 mg/kg的剂量

■背景资料

糖尿病慢性并发症已成为糖尿病患者致残致死的主要原因。对于糖尿病胃肠动力紊乱及其危害往往被忽视。据报道, 糖尿病胃轻瘫发生率高达30%-50%, 该并发症不仅影响糖尿病患者的生活质量, 还可以造成饮食及口服降糖药的吸收和排空障碍, 导致无规律的血糖波动, 从而影响患者的营养状况和治疗效果。

■研究前沿

相关研究发现约半数糖尿病患者存在胃排空障碍。胃固体排空的核素测定表明,不同阶段糖尿病的胃排空功能不同,有胃肠症状和(或)合并其他脏器并发病的糖尿病患者的胃排空延迟,胃液体排空则有排空延迟、加速和无明显变化等。目前认为,糖尿病患者发生胃排空障碍的机制主要认为与高血糖及其导致的自主神经病变、胃肠平滑肌变性、Cajal间质细胞异常、胃肠激素分泌调节失衡、微血管病变以及代谢紊乱等有关。

给予TEG-L, M和H组大鼠ip替加色罗连续3 d, 采用酚红灌胃法检测胃排空, 免疫组化技术检测各组大鼠胃黏膜Ghrelin与胃窦组织SP的表达。

结果: TEG各组大鼠Ghrelin(34.721 ± 6.759 , 33.547 ± 6.255 , 35.141 ± 5.987)与SP的积分光密度(13.548 ± 1.078 , 13.952 ± 1.246 , 11.845 ± 1.567)均低于NC组(Ghrelin: 43.514 ± 5.323 , $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$; SP: 16.383 ± 2.275 , 均 $P < 0.01$)而高于DM组(Ghrelin: 26.626 ± 4.596 , 均 $P < 0.05$; SP: 9.257 ± 1.636 , 均 $P < 0.01$); Ghrelin积分光密度在TEG各组之间无显著性差异, 而TEG-L, M组SP积分光密度均高于TEG-H组(均 $P < 0.05$)。

结论: 替加色罗可通过促进胃组织Ghrelin与SP的表达释放来改善糖尿病大鼠延迟的胃排空。

关键词: 糖尿病; 胃轻瘫; 胃排空; Ghrelin; P物质

魏良洲, 杨林, 王利华, 张民生, 李新华, 田宇彬. 替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及Ghrelin、P物质表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2825-2830
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2825.asp>

0 引言

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)是指糖尿病患者无机械性梗阻时并发的胃动力障碍和排空延迟^[1-6], 其发病机制主要与高血糖导致的自主神经病变、胃肠激素分泌异常、胃肠平滑肌变性、微血管病变及代谢紊乱等有关^[7-11], 治疗上主要包括积极控制血糖以及促胃肠动力药的使用^[1-6]。Ghrelin是近年来新发现的一种主要由胃底黏膜分泌的、可促进胃肠运动的脑肠肽^[12-18], 而P物质(substance P, SP)是一种广泛分布于胃肠道的兴奋性神经递质, 对胃运动和排空有促进作用^[19]。替加色罗(Tegaserod)是一种5-羟色胺4(5-HT₄)受体部分激动剂, 用于治疗便秘型肠易激综合征并显示出良好疗效。近年来研究发现替加色罗可以增加上消化道动力, 促进胃排空^[20]。我们通过研究替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及胃组织Ghrelin、P物质表达的影响来探讨替加色罗对糖尿病胃轻瘫的治疗作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂ Wistar大鼠50只, 体质量100 g左右, 购自青岛市动物实验中心, 链脲佐菌素

(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司。替加色罗原粉由北京诺华公司惠赠。Ghrelin、SP一抗(兔抗鼠血清), 分别购自美国凤凰公司和北京中山生物技术有限公司, 二抗购自北京中山生物技术有限公司, VIDAS计算机图像分析系统由德国OPTON公司生产, 1-甲基-2-吡咯烷酮(1-methyl-2-pyrrolidinone)购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作 随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病组(DM组)、低剂量替加色罗治疗组(TEG-L组)、中剂量替加色罗治疗组(TEG-M组)、高剂量替加色罗治疗组(TEG-H组), 每组10只。大鼠适应性饲养1 wk后, 禁食8 h。NC组大鼠以6 mL/kg的剂量ip 0.1 mmol/L, pH4.4的柠檬酸缓冲液, 其他各组大鼠以60 mg/kg的剂量一次性ip上述柠檬酸缓冲液配制而成的10 g/L STZ, 注射后72 h剪尾取血, 血糖仪测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L且稳定1 wk确定为糖尿病模型建立。模型建立后第9周进行实验。替加色罗原粉在1-甲基-2-吡咯烷酮中溶解后用生理盐水稀释成0.1, 0.5和1 g/L 3种浓度。NC组与DM组大鼠以1 mL/kg的剂量ip 1-甲基-2-吡咯烷酮; TEG-L, M和H组分别以0.1, 0.5和1 mg/kg的剂量给大鼠ip替加色罗, 连续3 d。第4天测定胃排空。

1.2.2 胃排空的测定 给予1.5 mmol/L的酚红溶液2 mL ig, 15 min后处死大鼠, 剖腹, 结扎贲门和幽门, 取出整个鼠胃, 沿胃大弯切开, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容为20 mL。而后加入0.5 mol/L NaOH 20 mL搅拌混匀, 静置1 h, 取5 mL上清液加入200 mL/L三氯乙酸0.5 mL去蛋白, 以3500 r/min(离心半径0.1 m)离心10 min, 取上清液用分光光度计在560 nm波长下测定光密度值; 另取酚红溶液2 mL, 先后加入蒸馏水18 mL, 0.5 mol/L NaOH 20 mL, 200 mL/L三氯乙酸4 mL搅拌混匀, 测定光密度值^[21]。大鼠胃排空率 = (1-实测酚红光密度/标准酚红光密度) $\times$ 100%。

1.2.3 免疫组化法检测Ghrelin和SP的表达 取1 cm $\times$ 0.3 cm大小的胃底、胃窦组织各1块置于40 g/L中性甲醛中固定, 石蜡包埋后切片、脱蜡, PBS溶液浸泡、微波修复抗原, 分别滴加Ghrelin、SP一抗及二抗, DAB显色, 苏木素复染。高倍镜下观察Ghrelin与SP阳性产物的表达情况, 并随机选取互不重叠的5个视野, 用VIDAS计算机图像分析系统测定每个视野阳性染色的积分光密度(积分光密度 = 染色强度 $\times$ 染色面积), 取其平均值作为该切片Ghrelin与SP表

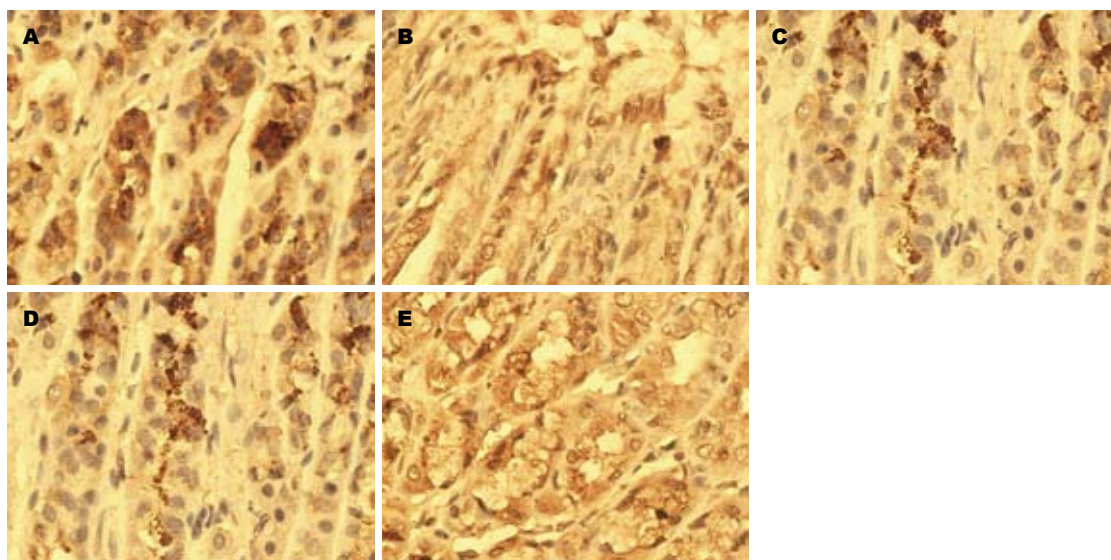


图1 各组大鼠胃底黏膜Ghrelin的表达($\times 400$)。A: NC组; B: DM组; C: TEG-L组; D: TEG-M组; E: TEG-H组。

■ 相关报道

糖尿病胃肠功能障碍的治疗一直是困扰临床医生的一个难题, 药物治疗仍然是一些应用已久的促动力药。胃复安仍是唯一的由FDA批准的治疗糖尿病胃轻瘫的药物。多潘立酮有较高的安全性和较少的迟发性运动障碍。红霉素由于具有一定的快速过敏和心脏毒性等问题使其应用价值受到了限制, 小剂量的三环类抗抑郁药物常被用来控制恶心或呕吐。

的定量指标。

统计学处理 数据均以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 应用SPSS11.0统计软件进行处理, 多组资料间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠一般状况 大鼠ip STZ 3 d后开始出现多饮、多食、多尿症状, 模型建立后1 wk糖尿病大鼠出现精神萎靡, 活动迟缓; 至第9周时糖尿病大鼠仍有多饮、多食、多尿, 但明显消瘦、懒动, 毛色干枯, 无光泽。实验期间大鼠死亡6只。

2.2 各组大鼠胃排空率的比较 DM组大鼠胃排空率较NC组明显降低($q = 18.21, P<0.01$); TEG各组大鼠胃排空率虽然也低于NC组($q = 8.54, P<0.01; q = 10.80, P<0.01; q = 14.75, P<0.01$), 但较DM组明显增加($q = 9.70, P<0.01; q = 7.56, P<0.01; q = 3.28, P<0.05$); 其中TEG-L组与TEG-M组大鼠胃排空率无明显差异($q = 2.20, P>0.05$), 均高于TEG-H组($q = 6.32, P<0.01; q = 4.19, P<0.01$)(表1)。

2.3 各组大鼠胃底黏膜Ghrelin阳性表达的变化 如图1和表1所示, 大鼠胃底黏膜Ghrelin阳性染色主要位于固有层腺体内, 为棕黄色颗粒沉积。DM组大鼠胃黏膜腺体内Ghrelin阳性染色较NC组明显变淡, 其积分光密度较NC组显著降低($q = 8.61, P<0.01$); 而TEG各组大鼠胃黏膜腺体内Ghrelin阳性染色强度与积分光密度均较DM组显著增加($q = 4.03, P<0.05; q = 3.45, P<0.05$;

表1 各组大鼠胃排空率及Ghrelin、SP阳性表达的比较(mean $\pm$ SD)

分组	n	胃排空率(%)	Ghrelin积分光密度	SP积分光密度
NC	10	68.35 $\pm$ 2.07	43.514 $\pm$ 5.323	16.383 $\pm$ 2.275
DM	8	49.71 $\pm$ 3.59 ^b	26.626 $\pm$ 4.596 ^b	9.257 $\pm$ 1.636 ^b
TEG-L	9	59.88 $\pm$ 3.16 ^{bdf}	34.721 $\pm$ 6.759 ^{ac}	13.548 $\pm$ 1.078 ^{bde}
TEG-M	9	57.64 $\pm$ 3.43 ^{bdf}	33.547 $\pm$ 6.255 ^{bc}	13.952 $\pm$ 1.246 ^{bde}
TEG-H	8	53.25 $\pm$ 2.94 ^{bc}	35.141 $\pm$ 5.987 ^{bc}	11.845 $\pm$ 1.567 ^{bd}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs NC; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs DM; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ vs TEG-H。

$q = 4.12, P<0.05$), 但仍低于NC组($q = 4.63, P<0.05; q = 5.25, P<0.01; q = 4.27, P<0.01$), 其中TEG-L、TEG-M和TEG-H 3组之间差异无显著性。

2.4 各组大鼠胃窦组织SP阳性表达的变化 如图2和表1所示, 免疫组化染色显示大鼠胃窦组织SP阳性产物呈棕色沉淀, 在黏膜层、腺腔内及黏膜下层表达较多, 而在肌层、肌间神经丛中表达较少。图像分析结果表明, DM组大鼠胃窦组织SP阳性产物的积分光密度较NC组显著降低($q = 12.99, P<0.01$); 而TEG各组大鼠胃窦组织SP阳性产物的积分光密度均较DM组显著增加($q = 7.64, P<0.01; q = 8.36, P<0.01; q = 4.48, P<0.01$), 但仍低于NC组($q = 5.34, P<0.01; q = 4.58, P<0.01; q = 8.28, P<0.01$), 其中TEG-L组与TEG-M组大鼠胃窦组织SP阳性产物的积分光密度无明显差异($q = 0.74, P>0.05$), 均高于TEG-H组($q = 3.03, P<0.05; q = 3.75, P<0.05$)。

■创新盘点

本文以动物模型为研究对象,实验条件控制严格,其实验方法为国际公认。药物的剂量分组合理,有利于观察到最为合理的药物剂量,为探索治疗糖尿病胃肠功能障碍的方法提供了新的研究思路。

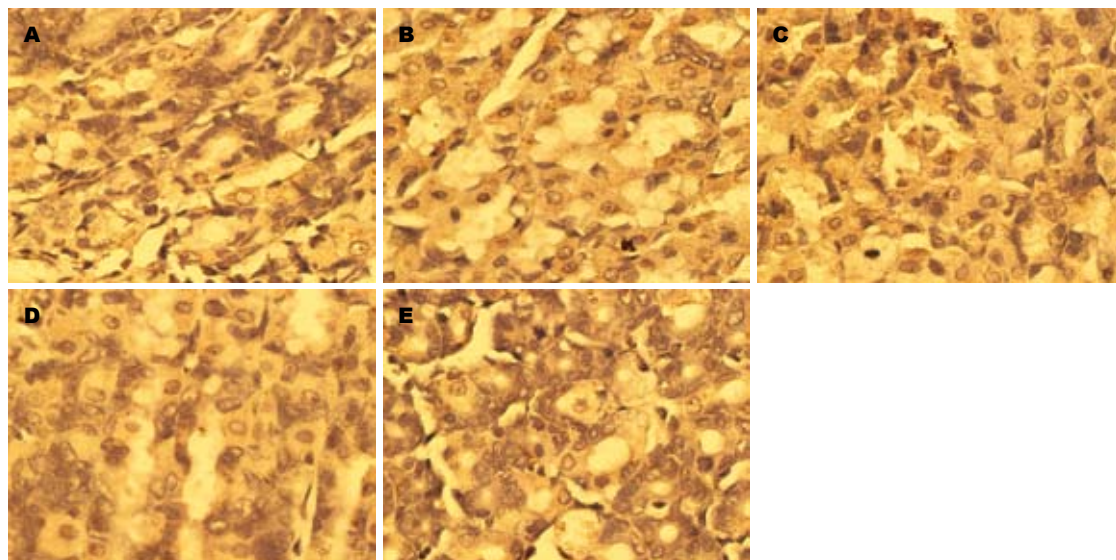


图2 各组大鼠胃窦组织SP的表达($\times 400$)。A: NC组; B: DM组; C: TEG-L组; D: TEG-M组; E: TEG-H组。

3 讨论

大鼠ip STZ可选择性破坏胰腺 β 细胞,制备的模型具有高血糖、体质量减轻、多饮、多食、多尿的特点,可用于糖尿病慢性并发症的研究。目前关于糖尿病患者胃液体排空研究的结果尚存在争论,可表现为排空延迟、加速和无明显变化等,可能与糖尿病的病程有关^[4,6,21]。而胃肠激素可通过血液循环以内分泌的形式作用于胃肠道平滑肌细胞相应的受体或作为肽能神经递质通过迷走神经介导,在中枢和外周水平上对胃运动进行调节。糖尿病长期高血糖引起的诸多胃肠激素分泌异常及调节失衡可导致胃动力学异常,与糖尿病胃轻瘫的发病密切相关^[1-4]。

Ghrelin是近年来新发现的一种由28个氨基酸残基组成的脑肠肽,主要由胃底部黏膜泌酸腺X/A细胞合成并分泌入血^[12-13,17]。Ghrelin与其受体结合后通过中枢和(或)外周途径来调节胃肠运动,表现出与胃动素类似的加速胃排空的作用^[22-27]。Rauma *et al*^[28]研究发现糖尿病小鼠胃肠道Ghrelin阳性细胞密度较正常对照组下降,认为这种变化有助于解释糖尿病胃肠病变中的胃排空延迟和肠运动减慢。而Murray *et al*^[29]研究发现,静脉给予Ghrelin可明显加快糖尿病胃轻瘫患者的胃排空。SP是调节胃肠运动的一种兴奋性神经递质,可直接作用于平滑肌或间接通过释放乙酰胆碱引起胃肠道平滑肌收缩。由于SP对胃平滑肌的兴奋作用大于对幽门括约肌的收缩作用,因此可促进胃排空^[19]。在本实验中,我们发现糖尿病大鼠模型建立后第9周时,DM组大鼠胃排空率较NC组明显降低,同时DM组大

鼠胃黏膜Ghrelin与胃窦组织SP的积分光密度也均较NC组显著降低,因此糖尿病大鼠胃排空延迟可能与促运动的胃肠激素Ghrelin与SP的表达减少有关。

国外研究发现,替加色罗作为一种5-羟色胺4(5-HT₄)受体部分激动剂可促进健康志愿者、胃轻瘫及消化不良患者的胃排空,减少餐后胃内滞留^[20,30]。James *et al*^[31]研究发现糖尿病胃轻瘫小鼠胃底运动减弱而幽门收缩增强是糖尿病胃排空延迟的重要原因之一;替加色罗对正常小鼠和糖尿病小鼠都有促进胃收缩的效应,且胃底的收缩要比胃窦明显。而Crowell *et al*^[32]通过实验证实低剂量的替加色罗(0.1 mg/kg)ip较中、高剂量更能明显改善糖尿病小鼠延迟的胃排空。

在本实验中,我们发现TEG各组大鼠胃排空率均较DM组明显增加,而胃黏膜Ghrelin与胃窦组织SP的积分光密度也均较DM组增加,说明替加色罗可能通过促进胃组织Ghrelin与SP的表达释放来改善糖尿病大鼠延迟的胃排空。替加色罗可选择性激活胃肠道的5-HT₄受体,通过胆碱能通路释放降钙素基因相关肽(CGRP)、P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)及乙酰胆碱(Ach)等神经递质,触发胃肠蠕动反射、减少时相性收缩、增加推进性运动^[33]。同时我们还得到了与Crowell *et al*^[32]相似的结论,即低、中剂量的替加色罗较高剂量更能明显改善糖尿病大鼠延迟的胃排空,其原因可能与以下几方面有关: (1) 替加色罗可剂量依赖性的增加SP的表达释放。较多的SP可使幽门括约肌收缩过强,影响了胃

窦、十二指肠的协调运动。(2)替加色罗对胃排空的促进作用可能不直接依赖于血药浓度,而取决于替加色罗在肠肌丛的生物利用度^[32]。(3)高剂量替加色罗对胃平滑肌受体起抑制作用,而低剂量替加色罗可激活肠肌丛特定的神经元^[34]。此外,TEG各组大鼠胃黏膜Ghrelin积分光密度无明显差异,提示替加色罗促进Ghrelin表达的机制与SP不同,可能不依赖于胆碱能通路,有待于进一步研究。

通过以上研究我们认为,替加色罗可通过促进胃组织Ghrelin与SP的表达释放来改善糖尿病大鼠延迟的胃排空。对其作用机制的进一步研究有助于更好的探讨糖尿病胃轻瘫的治疗方法,推动新的促胃肠动力药物的开发与应用。

4 参考文献

- Kong MF, Horowitz M. Diabetic gastroparesis. *Diabet Med* 2005; 22 Suppl 4: 13-18
- Smith DS, Ferris CD. Current concepts in diabetic gastroparesis. *Drugs* 2003; 63: 1339-1358
- Horowitz M, Su YC, Rayner CK, Jones KL. Gastroparesis: prevalence, clinical significance and treatment. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 805-813
- Kong MF, Horowitz M. Gastric emptying in diabetes mellitus: relationship to blood-glucose control. *Clin Geriatr Med* 1999; 15: 321-338
- Stacher G. Diabetes mellitus and the stomach. *Diabetologia* 2001; 44: 1080-1093
- Horowitz M, O'Donovan D, Jones KL, Feinle C, Rayner CK, Samsom M. Gastric emptying in diabetes: clinical significance and treatment. *Diabet Med* 2002; 19: 177-194
- Darwiche G, Almer LO, Bjorgell O, Cederholm C, Nilsson P. Delayed gastric emptying rate in Type 1 diabetics with cardiac autonomic neuropathy. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 128-134
- Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 2001; 24: 371-381
- Kockar MC, Kayahan IK, Bavbek N. Diabetic gastroparesis in association with autonomic neuropathy and microvasculopathy. *Acta Med Okayama* 2002; 56: 237-243
- Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am J Health Syst Pharm* 2004; 61: 160-173; quiz 175-176
- Vazeou A, Papadopoulou A, Papadimitriou A, Kitsou E, Stathatos M, Bartsocas CS. Autonomic neuropathy and gastrointestinal motility disorders in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 61-65
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337-345
- Levin F, Edholm T, Ehrstrom M, Wallin B, Schmidt PT, Kirchgessner AM, Hilsted LM, Hellstrom PM, Naslund E. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept* 2005; 131: 59-65
- Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice in vivo and in vitro. *Gut* 2005; 54: 1078-1084
- Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* 2003; 550: 227-240
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 2006; 55: 327-333
- Schmidt PT, Holst JJ. Tachykinins in regulation of gastric motility and secretion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 579-588
- Degen L, Matzinger D, Merz M, Appel-Dingemanse S, Osborne S, Luchinger S, Bertold R, Maacke H, Beglinger C. Tegaserod, a 5-HT₄ receptor partial agonist, accelerates gastric emptying and gastrointestinal transit in healthy male subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1745-1751
- Miyamoto Y, Yoneda M, Morikawa A, Itoh H, Makino I. Gastric neuropeptides and gastric motor abnormality in streptozotocin-induced diabetic rats: observation for four weeks after streptozotocin. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1596-1603
- Peeters TL. Central and peripheral mechanisms by which ghrelin regulates gut motility. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 Suppl 4: 95-103
- Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sci* 2001; 68: 991-996
- Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 2003; 120: 443-453
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 2000; 141: 4797-4800
- Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G948-952
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Verbeke K, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic

■应用要点

本文研究发现替加色罗能够改善糖尿病胃轻瘫的胃排空,并在其作用机制上进行了探讨,为临床治疗提供了有益的帮助,为开发新型的胃肠动力药物,用于治疗糖尿病胃肠功能障碍奠定了基础。

■同行评价

本文探讨了5-羟色胺受体部分激动剂替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及Ghrelin、P物质表达的影响。结果表明替加色罗既可促进糖尿病大鼠胃排空,又可促进胃组织Ghrelin与SP的表达,有一定的参考价值。

- 28 Rauma J, Spangeus A, El-Salhy M. Ghrelin cell density in the gastrointestinal tracts of animal models of human diabetes. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1-5
- 29 Murray CD, Martin NM, Patterson M, Taylor SA, Ghatei MA, Kamm MA, Johnston C, Bloom SR, Emmanuel AV. Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut* 2005; 54: 1693-1698
- 30 Degen L, Petrig C, Studer D, Schroll S, Beglinger C. Effect of tegaserod on gut transit in male and female subjects. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 821-826
- 31 James AN, Ryan JP, Crowell MD, Parkman HP. Regional gastric contractility alterations in a diabetic gastroparesis mouse model: effects of cholinergic and serotonergic stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G612-619
- 32 Crowell MD, Mathis C, Schettler VA, Yunus T, Lacy BE. The effects of tegaserod, a 5-HT receptor agonist, on gastric emptying in a murine model of diabetes mellitus. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 738-743
- 33 Lacy BE, Yu S. Tegaserod: a new 5-HT4 agonist. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 27-33
- 34 Prins NH, Van Haselen JF, Lefebvre RA, Briejer MR, Akkermans LM, Schuurkes JA. Pharmacological characterization of 5-HT4 receptors mediating relaxation of canine isolated rectum circular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1431-1437

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •



APASL 2008 Seoul



The 18th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver

March 23 (Sun) - 26 (Wed), 2008

COEX Convention Center, Seoul, Korea

Online abstract submission and registration is available at www.apaslseoul2008.org

Tentative Scientific Program

- 1 Postgraduate Courses: Viral Hepatitis; present and future
- 2 Symposia: Liver cancer: a critical reappraisal of current practice; New insights in NAFLD; New therapeutic approach to HCC; Therapy for viral hepatitis: promises and pitfalls; Management for complications of liver cirrhosis; Liver pathology: an update; Metabolic and autoimmune liver diseases
- 3 Plenary Presentations
- 4 New APASL Guideline of Chronic Hepatitis B Treatment
- 5 Research Workshop
- 6 State-of-the-art Lectures
- 7 Imaging Courses
- 8 Surgical Hepatology/ Transplantation
- 9 Endoscopy Course
- 10 AASLD-APASL Joint Workshop

Contact: APASL 2008 Seoul Secretariat, Tel: +82-2-3452-7241/Fax: +82-2-521-8683,

E-mail: info@apaslseoul2008.org

抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸调节的肝星状细胞系靶基因

樊文梅, 李国力, 魏红山

樊文梅, 李国力, 魏红山, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. dr_liver@hotmail.com

电话: 010-64211031-2358 传真: 010-64281540

收稿日期: 2007-05-24 修回日期: 2007-09-01

Screening for genes regulated by gamma aminobutyric acid in hepatic stellate cells using suppression subtractive hybridization

Wen-Mei Fan, Guo-Li Li, Hong-Shan Wei

Wen-Mei Fan, Guo-Li Li, Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. dr_liver@hotmail.com

Received: 2007-05-24 Revised: 2007-09-01

Abstract

AIM: To screen for genes regulated by gamma aminobutyric acid (GABA) in hepatic stellate cells (HSC) using suppression subtractive hybridization (SSH), and to investigate the biological function of GABA in the liver.

METHODS: The hepatic stellate cell line HSC-T6 was co-cultured with 10 μ mol/L GABA for 24 hours, after which mRNA was extracted and reverse transcribed into cDNA. HSC-T6 cells co-cultured with phosphate buffer saline (PBS) were used as controls. mRNAs upregulated by GABA were identified by SSH. Thirty one randomly selected clones were sequenced and analyzed bioinformatically.

RESULTS: Fifteen genes were found to be significantly up-regulated, including genes involved in DNA synthesis, apoptosis, mitochondrial function and tumor suppression. These results showed that GABA might promote HSC-T6 cell proliferation and inhibit

apoptosis.

CONCLUSION: SSH technology successfully enabled the identification of genes that are differentially expressed in the presence and absence of GABA, demonstrating that GABA can affect the gene expression profiles of HSCs.

Key Words: Gamma aminobutyric acid; Hepatic stellate cell; Suppression subtractive hybridization

Fan WM, Li GL, Wei HS. Screening for genes regulated by gamma aminobutyric acid in hepatic stellate cells using suppression subtractive hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2831-2834

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交技术(SSH)筛选 γ -氨基丁酸(GABA)作用肝星状细胞系HSC-T6后的差异表达基因。

方法: 10 μ mol/L的GABA作用于HSC-T6细胞24 h, 提取mRNA, 用分光光度计进行定量分析。以GABA处理和未处理的T6细胞mRNA为模板逆转录合成双链cDNA(dscDNA), 并分别标记为Tester和Driver, 酶切后与接头连接, 经两次杂交, 构建消减杂交文库, 将消减文库的扩增产物进行转化、克隆分析后应用生物信息学技术将测得序列再进行同源性分析。

结果: 15种基因表达上调, 其中包括与DNA合成、线粒体、肿瘤抑制以及凋亡相关的4类基因, 结果显示GABA可能促进HSC-T6细胞增殖而抑制凋亡。

结论: 用SSH技术可以成功获得GABA刺激肝星状细胞基因上调的监测, 证明GABA能够影响肝星状细胞的基因表达谱。

关键词: γ -氨基丁酸; 肝星状细胞; 抑制性消减杂交

樊文梅, 李国力, 魏红山. 抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸调节的肝星状细胞系靶基因. *世界华人消化杂志* 2007;15(26):2831-2834

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2831.asp>

■背景资料

临床研究表明, 在急性慢性肝病患者中, 血清GABA水平升高, 肝再生活性下降, GABA受体拮抗剂促进肝再生, 还可改善临床转归; 肝性脑病患者血清中GABA水平亦升高。

■研发前沿

最新研究发现, GABA可以逆转乙醇诱导的大鼠肝细胞毒性, 乙醇以剂量依赖的方式使细胞生存力下降, 而GABA处理能够恢复乙醇诱导的细胞毒性, 多胺也能逆转乙醇诱导的细胞毒性(Amino acid, 2007, 32: 419-423). 提示GABA可能与肝纤维化的发生相关, 但机制不明.

■创新盘点

肝星状细胞的激活是肝纤维化发生的中心环节, GABA与肝性脑病的发生密切相关. 本文把两个似乎毫不相干的领域联系起来, 科研思路具有创新性.

0 引言

肝星状细胞(HSC)位于肝窦周Disse腔内, 在肝纤维化的病理过程中HSC充当了重要的角色, 静止状态的HSC主要参与视黄醇的代谢调节, 活化后具有增殖、收缩调节肝窦张力与血流、分泌细胞因子、产生基质金属蛋白酶及其抑制物(TIMPs)、合成大量细胞外基质(ECM)等功能, 是肝纤维化时ECM的主要来源细胞^[1-2]. 因此, HSC的活化是肝纤维化发生的核心环节, 许多因素参与了该过程的调节, 其中细胞因子起主要作用. γ -氨基丁酸(GABA)是一种天然存在的功能性氨基酸, 是哺乳动物大脑的主要抑制性神经递质, 由肠道细菌产生. 近年在暴发性肝衰竭和肝性脑病的动物模型中发现GABA血浓度增高, 血脑屏障的通透性也增高, 大脑突触后神经元的GABA受体显著增多. 临床研究表明, 在急慢性肝病患者中, 血清GABA水平升高, 肝再生活性下降, GABA受体拮抗剂促进肝再生, 还可改善临床转归, 提示GABA可能抑制肝再生^[3-4]. 肝性脑病患者血清中GABA水平亦升高^[5]. GABA可能与肝纤维化的发生相关. 抑制性消减杂交技术(SSH)是一种简便有效、以抑制PCR和消减杂交为基础的分离差异表达基因的新技术^[6]. 该技术的操作流程包括2轮杂交和2轮PCR扩增, 对低丰度基因的扩增非常敏感. 本研究以一定浓度的GABA刺激HSC-T6, 用SSH技术筛选GABA对肝星状细胞上调的靶基因.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝脏星状细胞系T6细胞及大肠杆菌DH5a(本室保存), mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒(Clontech), 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6通用引物及pGEM-T载体(Promega). DNA序列测定由上海生物工程公司完成.

1.2 方法

1.2.1 药物处理及mRNA提取 培养瓶中常规培养T6细胞, 细胞生长至对数期时用2 g/L胰酶消化平均分成两瓶, 将10 μ mol/L的GABA加入细胞培养液中, 24 h后收获细胞. 使用mRNA Purification试剂盒, 直接提取GABA处理的T6细胞mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计分别进行定性、定量分析.

1.2.2 消减杂交文库的建立 采用PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规SSH方法按说明书进行: 以GABA处理和未处理的T6细胞mRNA为模板逆转录合成双链cDNA(dscDNA), 并分别标记为Tester和Driver, dscDNA经*Rsa* I (一种识别4碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将Tester的dscDNA分为2份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头Adapter 1和Adapter 2, 然后与过量的Driver dscDNA进行杂交; 合并两种杂交产物后再与Driver dscDNA作第2次杂交; 然后将杂交产物做选择性PCR扩增, 使Tester dscDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.3 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与pGEM-T easy载体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37℃培养18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以pGEM-T easy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增, 证明含有插入片段后(200-1000 bp), 测序. 应用生物信息学将测得序列与GenBank数据库进行同源性分析.

2 结果

2.1 mRNA的定性、定量分析 使用高质量的mRNA是保证cDNA高产量的前提. 紫外分光检测显示, GABA处理和未处理的T6细胞mRNA分别为13.08 mg/L和9.84 mg/L, A_{260}/A_{280} 分别为2.031和2.067. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳见mRNA为大于0.5 kb清晰慧尾片状条带, 证实mRNA质优量足.

2.2 dscDNA两端连接效率检测 dscDNA与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有Adaptor 1和Adaptor 2的2组dscDNA分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶G3PDH引物)进行28个循环扩增, 产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示2组dscDNA扩增产物浓度相当, 说明dscDNA已与接头高效率连接.

2.3 cDNA消减文库消减效率的鉴定 分别以消减及未消减PCR产物为模板, 用G3PDH引物进行PCR扩增, 分别在18, 23, 28和33次循环结束时从体系中吸取5 mL进行电泳鉴定. 结果显示: 与未消减组PCR产物相比, 消减组PCR产物中G3PDH基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图1).

2.4 差异表达cDNA片段的扩增及克隆 杂交产

物经2轮PCR扩增后, 菌落PCR扩增结果显示为200-1000 bp大小不等的插入片段, 所获得的85个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图2)。

2.5 cDNA测序与同源性分析结果 随机挑选31个克隆测序, 与GenBank数据库进行初步比较. 应用生物信息学技术分析发现, 均与已知基因的部分序列高度同源(94%-100%), 共编码15种基因(表1)。

3 讨论

GABA为主要的抑制性神经递质, 在肝性脑病中血清GABA水平升高, 预示GABA与肝脏疾病的相关性. SSH技术是通过消减杂交除去实验组和对照组之间的共有序列, 并使低丰度基因得到富集, 再通过抑制PCR使实验组和对照组之间差异表达的序列得到扩增, 是消减杂交与抑制性PCR的完美结合, 在克隆差异基因表达中具有绝对优势^[7-8]. 自从SSH技术建立以来, 在不同疾病中筛选差异表达基因中已得到了广泛的应用^[9-10].

本研究利用抑制性消减杂交技术筛选GABA刺激的肝星状细胞差异表达基因, 随机挑选31个克隆, 测序分析获得15种基因, 这些基因可分为4类: (1)与DNA合成、蛋白质降解有关的蛋白. 包括DNA聚合酶 δ 催化亚基、核糖体蛋白S 25、蛋白酶体亚基 β 4、蛋白酶体26S亚基非ATP酶7和核结合素1(Nucb1), 表明GABA刺激肝星状细胞的DNA合成和蛋白的降解. 蛋白酶体既存在于细胞核中又存在于细胞质溶胶中, 是溶酶外的蛋白水解体系, 显示多种肽酶的活性, 能够从碱性、酸性和中性氨基酸的羧基侧水解多种与泛素蛋白连接的蛋白质底物. 蛋白酶体可能通过对病毒抗原的加工而调节乙型肝炎病毒的适应性免疫^[11]. 核结合素Nuc, 也叫CalNuc, 是钙结合蛋白, 定位于核内、高尔基体和内质网中, Nucb1大小为63 kDa, 可能参与调节骨髓成熟^[12-13]. (2)与肿瘤抑制有关的蛋白. 大鼠肿瘤抑制因子ST13, 介导热休克蛋白HSP70和HSP90的接头蛋白, 并参与糖皮质激素受体的装配过程, 在结肠癌直肠癌中其水平下调, 提示他可能是肿瘤抑制基因^[14]. 钙蛋白酶(Calpain)是一类钙依赖性的高度保守的蛋白水解酶, 参与细胞骨架蛋白重整、细胞转化和迁移, 加快细胞循环. 研究发现, 钙蛋白酶抑制剂可以改善大鼠肝脏炎症^[15-16]. Calpain 1参与了凋亡诱导因子的释

表 1 阳性克隆与Genbank同源序列比较结果

同源蛋白基因	相同克隆数	同源性
1, 4- α 葡聚糖分支酶	4	99%
肿瘤抑制因子13(St13)	2	99%
CD48抗原	5	99%
核糖体蛋白S25	1	99%
蛋白磷酸酶4调节亚基2	2	100%
精氨酸-丝氨酸二肽富含性剪切因子1(SFRS1)	2	94%
核结合素1(Nucb1)	1	99%
电压依赖的离子通道2(Vdac2)	6	99%
钙蛋白酶小亚基1(Capns1)	1	97%
蛋白酶体亚基 β 型4(proteasome)	2	99%
蛋白酶体26S亚基非ATP酶7	1	100%
DNA聚合酶 δ 催化亚基	1	99%
类KIAA0877蛋白	1	100%
细胞色素氧化酶亚基 I 部分序列及 tRNA-丝氨酸基因 (Cox I)	1	99%
核糖体蛋白L23	1	100%

■名词解释

抑制性消减杂交: 是一种以抑制性PCR反应为基础, 将标准化测试cDNA单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术. 通过合成两个不同的接头, 接于经限制性内切酶消化后的测试cDNA片段的5'末端, 将测试和驱动进行两轮杂交. 标准化步骤均等了测试中的cDNA单链丰度, 消减杂交步骤去除测试和驱动之间的共同序列. 利用抑制性PCR选择性扩增目的cDNA片段, 同时抑制非目的cDNA的扩增. 因此, 抑制性消减杂交技术显著增加了获得低丰度差异表达基因的cDNA的概率。

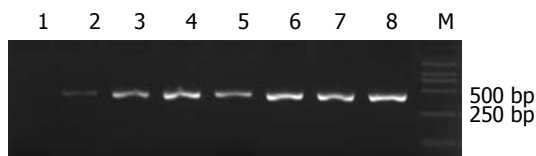


图 1 消减效率分析结果, 引物为G3PDH 5'3'. M: Marker; 1-4: 消减组, PCR循环次数分别为18, 23, 28, 33; 5-8: 未消减组, PCR循环次数分别为18, 23, 28, 33.

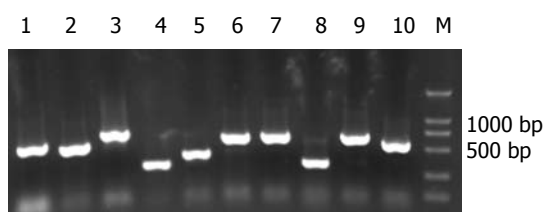


图 2 部分克隆(1-10)菌落PCR鉴定电泳图。

放^[17]. (3)与凋亡相关的蛋白. 电压依赖的离子通道2(Vdac2)是线粒体膜蛋白, 在哺乳动物中低丰度表达, Vdac2缺陷的细胞中, 增加BAK的寡聚化而更易于凋亡. 反之, 过表达Vdac2选择性抑制BAK激活, 并抑制线粒体的凋亡通路^[18]. 然而, 最近的报道发现电压依赖的离子通道对于线粒体的凋亡并不是必不可少的^[19]. 在GABA刺激的肝星状细胞中Vdac表达上调的机制还需进一步的研究. CD48抗原在本研究中筛出5个克隆, 表明CD48抗原上调较普遍, CD48可以保持T细胞和巨噬细胞的炎症反应^[20]. (4)线粒体相关蛋白. COX1在所有正常细胞中都有表达, 但在发生

■同行评价

本文应用抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸(GABA)作用下肝星状细胞系(HSC-T6)差异表达基因。研究结果表明GABA作用下的HSC-T6有15种基因表达上调,涉及DNA合成相关蛋白、肿瘤抑制相关蛋白、凋亡相关蛋白及线粒体相关蛋白。研究方法新颖,所研究的内容具有实际意义,有一定的参考价值。

肝硬化的星状细胞中COX1的表达水平高于正常肝脏星状细胞^[21]。蛋白磷酸酶4是蛋白磷酸酶2A(PP2A)家族的重要成员之一,他与多个调节亚基形成各种复合体参与诸多重要的细胞进程,具有抗凋亡活性^[22]。精氨酸-丝氨酸二肽富含性剪切因子1(SFRS1),具有与DNA、RNA以及蛋白质的结合活性,参与选择性剪切,同时有致癌潜力^[23]。类KIAA0877蛋白功能尚不清楚。总之,GABA可能促进HSC细胞增值和细胞凋亡过程,但其具体机制还有待于进一步的研究。

4 参考文献

- 1 蒋业贵,李兆申.肝星状细胞与肝纤维化的研究进展.世界华人消化杂志 2003; 11: 1443-1446
- 2 姜惠卿,姚希贤.肝星状细胞的活化与肝纤维化.胃肠病学和肝病杂志 2007; 16: 86-89
- 3 Minuk GY, Kren BT, Xu R, Zhang X, Burczynski F, Mulrooney NP, Fan G, Gong Y, Steer CJ. The effect of changes in hepatocyte membrane potential on immediate-early proto-oncogene expression following partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1997; 25: 1123-1127
- 4 Minuk GY, Gauthier T. The effect of gamma-aminobutyric acid on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 1993; 104: 217-221
- 5 Ferenci P, Schafer DF, Kleinberger G, Hoofnagle JH, Jones EA. Serum levels of gamma-aminobutyric-acid-like activity in acute and chronic hepatocellular disease. *Lancet* 1983; 2: 811-814
- 6 Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5640-5648
- 7 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6025-6030
- 8 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303: 349-380
- 9 Li AQ, Dai N, Yan J, Zhu YL. Screening for metronidazole-resistance associated gene fragments of *H pylori* by suppression subtractive hybridization. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1847-1850
- 10 Chen Y, Zhang YZ, Zhou ZG, Wang G, Yi ZN.

Identification of differently expressed genes in human colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1025-1032

- 11 Robek MD, Garcia ML, Boyd BS, Chisari FV. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus. *J Virol* 2007; 81: 483-491
- 12 Petersson U, Somogyi E, Reinholt FP, Karlsson T, Sugars RV, Wendel M. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. *Bone* 2004; 34: 949-960
- 13 de Alba E, Tjandra N. Structural studies on the Ca²⁺-binding domain of human nucleobindin (calnuc). *Biochemistry* 2004; 43: 10039-10049
- 14 Wang LB, Zheng S, Zhang SZ, Peng JP, Ye F, Fang SC, Wu JM. Expression of ST13 in colorectal cancer and adjacent normal tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 336-339
- 15 Rose R, Banerjee A, Ramaiah SK. Calpain inhibition attenuates iNOS production and midzonal hepatic necrosis in a repeat dose model of endotoxemia in rats. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 785-794
- 16 Mehendale HM, Limaye PB. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 232-236
- 17 Polster BM, Basanez G, Etchebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280: 6447-6454
- 18 Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003; 301: 513-517
- 19 Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 550-555
- 20 Abadia-Molina AC, Ji H, Faubion WA, Julien A, Latchman Y, Yagita H, Sharpe A, Bhan AK, Terhorst C. CD48 controls T-cell and antigen-presenting cell functions in experimental colitis. *Gastroenterology* 2006; 130: 424-434
- 21 Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G763-770
- 22 Mourtada-Maarabouni M, Kirkham L, Jenkins B, Rayner J, Gonda TJ, Starr R, Trayner I, Farzaneh F, Williams GT. Functional expression cloning reveals proapoptotic role for protein phosphatase 4. *Cell Death Differ* 2003; 10: 1016-1024
- 23 Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 185-193

编辑 何燕 电编 郭海丽

CXC趋化因子受体3和其配体在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的表达

刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭

刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭, 中国医科大学盛京医院普外一科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 刘臻, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学盛京医院普外一科, liuzhen1973@yahoo.com.cn

电话: 024-81365657

收稿日期: 2007-05-19 修回日期: 2007-09-02

Expression of the CXC chemokine receptor 3 and its ligands in the livers of ischemia/reperfusion injured rats

Zhen Liu, Wei-Xue Xu, Xiao-Bo Zhang, Bao-Lin Liu, Dong-Xu Cui

Zhen Liu, Wei-Xue Xu, Xiao-Bo Zhang, Bao-Lin Liu, Dong-Xu Cui, the First Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zhen Liu, the First Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shengyang 110004, Liaoning Province, China. liuzhen1973@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-19 Revised: 2007-09-02

Abstract

AIM: To explore the expression of the CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) and its ligands (IP-10, Mig) in the livers of ischemia/reperfusion (I/R) injured rats.

METHODS: Thirty-two Wistar rats were randomly divided into four groups, with 8 rats in each group: sham operation (SO) and 6-, 12- and 24-hour I/R groups. The level of tumor necrosis factor (TNF)- α in liver tissue was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of CXCR3 and its ligands (IP-10, Mig) were assessed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were also analyzed.

RESULTS: Low expression levels of CXCR3, IP-10 and Mig mRNAs were observed in the

SO group. The expression levels of CXCR3 and IP-10 mRNAs in the ischemic tissues of I/R animals were significantly higher than those in SO animals (CXCR3: 0.925 ± 0.109 , 0.786 ± 0.074 , 0.606 ± 0.082 vs 0.125 ± 0.028 , all $P < 0.01$; IP-10: 0.863 ± 0.091 , 0.680 ± 0.075 , 0.543 ± 0.284 vs 0.128 ± 0.027 , all $P < 0.01$). The expression levels of CXCR3 and IP-10 mRNAs in the ischemia tissues of 6-hour I/R animals were higher than those in the ischemic tissues of 12-hour I/R animals ($P < 0.01$). There was no difference in the level of Mig mRNA between the I/R group and the SO group. Compared with the SO group, the level of TNF- α was significantly increased in the I/R groups (154.88 ± 14.35 ng/L, 258.88 ± 13.73 ng/L, 182.87 ± 10.95 ng/L vs 23.63 ± 4.00 ng/L, all $P < 0.01$), reaching a peak at 12 hours after reperfusion.

CONCLUSION: The expression levels of mRNAs for CXCR3 and its ligand IP-10 are rapidly up-regulated in liver ischemia/reperfusion tissue, suggesting that CXCR3 plays an important role in liver injury induced by I/R.

Key Words: Liver transplantation; Reperfusion; Chemokine receptor

Liu Z, Xu WX, Zhang XB, Liu BL, Cui DX. Expression of the CXC chemokine receptor 3 and its ligands in the livers of ischemia/reperfusion injured rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2835-2838

摘要

目的: 探讨CXC趋化因子受体3(CXCR3)及其配体IP-10和Mig在大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤中的表达及作用。

方法: 32只Wistar大鼠随机分成4组, 每组8只。即假手术组, 部分肝脏缺血再灌注6, 12和24 h组。应用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测肝组织肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平。应用半定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定肝组织CXCR3及其配体IP-10, Mig mRNA的表达。同时检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸

■背景资料

肝缺血再灌注损伤是肝切除术、肝移植和低血容量休克中影响肝脏功能的一个主要因素, 这一损伤主要是急性炎症性应答的结果。趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子, 其中CXC趋化因子受体3(CXCR3)及其配体是介导炎症反应的主要趋化因子, 因此可能在肝脏I/R损伤中起调节作用。

■研究前沿

肝缺血再灌注损伤与细胞因子的关系是目前研究的热点之一,但相关研究报道较少。

转氨酶(AST)的含量。

结果:假手术组肝组织中CXCR3, IP-10, Mig mRNA低表达。缺血再灌注各组肝组织中CXCR3和IP-10 mRNA表达水平均明显高于假手术组(CXCR3: 0.925 ± 0.109 , 0.786 ± 0.074 , 0.606 ± 0.082 vs 0.125 ± 0.028 , 均 $P < 0.01$; IP-10: 0.863 ± 0.091 , 0.680 ± 0.075 , 0.543 ± 0.284 vs 0.128 ± 0.027 , 均 $P < 0.01$), 6 h组高于12 h组($P < 0.01$), 12h组与24h组无明显差别($P > 0.05$)。Mig mRNA水平较假手术组相比, 无显著差异($P > 0.05$)。缺血再灌注各组TNF- α 水平较假手术组明显升高(154.88 ± 14.35 ng/L, 258.88 ± 13.73 ng/L, 182.87 ± 10.95 ng/L vs 23.63 ± 4.00 ng/L, 均 $P < 0.01$), 再灌注12 h达高峰。

结论:CXCR3及其配体IP-10在肝脏缺血再灌注早期表达上调, 在缺血再灌注损伤中起重要的作用。

关键词:肝移植; 再灌注; 趋化因子受体

刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭。CXC趋化因子受体3和其配体在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的表达。世界华人消化杂志 2007;15(26):2835-2838

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2835.asp>

0 引言

肝缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是肝切除术、肝移植和低血容量休克中影响肝脏功能的一个主要因素, 他导致局部和广泛的细胞损伤和器官功能下降。这一损伤主要是急性炎症性应答的结果。炎症性应答由炎性介质的级联反应诱导, 引起白细胞聚集于缺血后组织, 导致间质细胞损伤。内源性调节机制试图控制这种炎症应答。炎症性反应在缺血再灌注损伤中起重要作用^[1]。趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子, 对白细胞的发育、分化、定位具有重要的调节作用^[2-3]。我们研究CXC趋化因子受体3(CXCR3)及其配体IP-10、Mig在肝脏I/R损伤时的表达, 了解他们在I/R损伤中是否起调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol试剂、IP-10、Mig、CXCR3和 β -actin引物购自大连宝生物工程公司。TNF- α 检测用ELISA试剂盒购自北京邦定泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 δ Wistar大鼠32只, 体质量200-250 g, 每组8只, 即假手术组(Sham operation, SO)及I/R 6 h, 12 h, 24 h组。并将I/R各组未行I/R的肝脏作为自身对照。术前禁食12 h, 不禁水。乙醚吸入麻醉, 由阴茎背静脉注入肝素200 U/kg, 腹部正中切口入腹, 将供应肝中叶、左叶的肝动脉、门静脉、胆管用微血管夹阻断, 而不阻断供应肝右叶、右外侧叶及尾状叶的动、静脉及胆管^[4]。待肝叶缺血达90 min, 再次开腹移去血管夹后关腹, 并给予乳酸林格液20 mL/kg, 以补充液体的丢失。SO组术前肝素化, 未结扎血管, 余操作相同。在灌注6, 12, 24 h分别处死动物取静脉血及肝组织标本。

1.2.2 CXCR3及其配体mRNA水平检测^[5] 采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)半定量法检测。采用异硫氰酸胍一步法提取RNA。取1.5 μ g RNA逆转录合成cDNA。引物序列: IP10: 5'-ccgcgctatcgccaatgagctgagc-3', 5'-cttggggacaccttttagcatcttttg-3'; Mig: 5'-gaactcagctctgccatgaa-3', 5'-ttgccgagtcggtatctagg-3'; CXCR3: 5'-tcactcttctgtcagccagc-3', 5'-caccaccaccaccaccacta-3'; β -actin: 5'-gagacaggccagagcaagagaggc-3', 5'-gctaggagccagggcagtaattcc-3'。扩增条件: 首先95 $^{\circ}$ C 2 min, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 之后95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 33次循环。扩增产物上样于10 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色20 min, 凝胶成像分析系统测定DNA光密度。 β -actin作为内参照。以各实验组各电泳条带密度与相对的内参照密度之比表示相对表达量。

1.2.3 肝组织TNF- α 水平和血清ALT, AST测定检测 肝组织应用超声粉碎仪粉碎后, 离心, 留取上清, 应用ELISA试剂盒, 酶标仪测定450 nm吸光度检测。血清ALT, AST测定采用日立全自动生化仪检测。

统计学处理 所有数据均通过SPSS13.0软件处理。以mean $\pm$ SD表示, 采用One-Way ANOVA方法检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肝功能变化 SO组及6, 12, 24 h I/R组ALT值分别为 97.38 ± 8.83 U/L, 1486.88 ± 196.45 U/L, 2272.63 ± 208.50 U/L和 3517.13 ± 235.04 U/L。SO组及6, 12, 24 h I/R组AST值分别为 86.75 ± 8.60 U/L, 1221.63 ± 105.93 U/L, 1984.38 ± 104.27 U/L和 2942.88 ± 202.93 U/L。I/R组, 随着再灌注时间的延长, ALT、AST逐渐升高, 于24 h达最高, 各

时段间比较, 差异显著($P<0.01$). 同假手术组比较, 缺血再灌注组各时段ALT、AST均显著升高($P<0.01$, 表1).

2.2 TNF- α 水平 SO组、6 h, 12 h, 24 h I/R组TNF- α 分别为 23.63 ± 4.00 ng/L, 154.88 ± 14.35 ng/L, 258.88 ± 13.73 ng/L, 182.87 ± 10.95 ng/L, 再灌注后肝组织TNF- α 水平升高, 12 h达高峰, 同6 h相比, 差异显著($P<0.01$), 至24 h下降, 但仍明显高于假手术组($P<0.01$). SO组、6 h、12 h、24 h I/R组未缺血肝组织TNF- α 水平为 21.13 ± 4.05 ng/L, 25.63 ± 4.60 ng/L, 23.63 ± 4.57 ng/L, 24.63 ± 4.98 ng/L, 各组之间比较无明显差别(表2).

2.3 CXCR3及其配体mRNA水平 实验组再灌注后, 肝组织CXCR3和IP-10 mRNA表达水平明显升高, 再灌注6 h达高峰, 6 h, 12 h, 24 h同SO组比较, 差异显著($P<0.01$). 实验组再灌注12 h同6 h相比, CXCR3和IP-10 mRNA表达水平明显下降($P<0.01$), 而同24 h相比, 无统计学差异($P>0.05$). Mig mRNA在再灌注后有所升高, 但同对照组比较, 无明显差别($P>0.05$)(表2).

3 讨论

肝缺血再灌注损伤是复杂的肝切除、肝外伤和肝移植等手术中不可避免的病理过程^[6]. 由缺血再灌注引起的肝损伤的确切生化机制非常复杂, 至今仍未完全清楚. 研究显示MCP-1、MIP-1、2在缺血再灌注损伤中表达明显升高^[7-8], 他们主要作用于中性粒细胞. 近年研究表明, 急性炎症性应答在这一过程中起重要的作用. 免疫抑制剂引起的全身性免疫抑制可以减轻缺血再灌注损伤, 而且无胸腺小鼠的肝脏缺血再灌注损伤下降, 这些都提示T淋巴细胞在其中可能起重要的作用^[9-10]. 多种途径参与淋巴细胞的活化, 趋化

表 1 肝脏缺血再灌注损伤后血清ALT、AST含量变化(U/L, mean $\pm$ SD)

分组	ALT	AST
SO组	97.38 $\pm$ 8.83	86.75 $\pm$ 8.60
I/R 6 h组	1486.88 $\pm$ 196.45 ^b	1221.63 $\pm$ 105.93 ^b
I/R 12 h组	2272.63 $\pm$ 208.50 ^{bd}	1984.38 $\pm$ 104.27 ^{bd}
I/R 24 h组	3517.13 $\pm$ 235.04 ^{be}	2942.88 $\pm$ 202.93 ^{be}

^b $P<0.01$ vs SO组; ^d $P<0.01$ vs 6 h组; ^e $P<0.01$ vs 12 h组.

因子受体途径是其中的重要途径. 最近研究结果也显示淋巴细胞在缺血再灌注损伤中起重要的作用^[11]. 实验发现淋巴细胞在再灌注早期在肝脏窦周聚集, 从而损伤组织.

趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子, 对白细胞的发育、分化、定位具有调节作用. 其属于小分子的分泌蛋白超家族, 根据N端半胱氨酸残基的数目和排列方式, 将趋化因子分为CXC、CC、C、CX3C 4个亚家族. 其中CXC趋化因子受体3(CXC chemokine receptor 3, CXCR3)及其配体IP-10、Mig与T细胞应答密切相关^[12]. 我们实验结果显示缺血再灌注后随着再灌注时间延长, 血清ALT、AST不断升高, 显示出肝细胞损害加重. 同时, 我们检测了缺血再灌注时CXCR3及其配体IP-10、Mig mRNA在肝脏中的表达, 发现缺血区肝组织再灌注后CXCR3、IP-10 mRNA表达增加, 于再灌注后6 h达最高峰, 之后表达水平逐渐下降, 6 h和12 h比较, 差异显著($P<0.01$), 而12 h和24 h之间无明显差别. 未缺血肝组织CXCR3、IP-10 mRNA水平无明显升高. 这表明CXCR3、IP-10在再灌注的早期即参与了肝脏损伤. Mig mRNA的表达水平在缺血肝组织虽有升高, 但与未缺血肝组织比较, 无显著差异($P>0.05$), 表明Mig在缺血再灌注

■应用要点

CXCR3趋化因子受体及其配体若在肝缺血再灌注损伤中起促进作用, 此趋化因子受体途径可作为阻断靶位和减轻缺血再灌注损伤的新途径.

表 2 肝组织中CXCR3、IP-10、Mig mRNA及TNF- α 比较(mean $\pm$ SD, $n = 8$)

组织	SO	I/R 6 h	I/R 12 h	I/R 24 h
CXCR3 mRNA	缺血组织	0.125 $\pm$ 0.028	0.925 $\pm$ 0.109 ^{be}	0.786 $\pm$ 0.074 ^{bde}
	非缺血组织	0.133 $\pm$ 0.041	0.159 $\pm$ 0.046	0.161 $\pm$ 0.043
IP-10 mRNA	缺血组织	0.128 $\pm$ 0.027	0.863 $\pm$ 0.091 ^{be}	0.680 $\pm$ 0.075 ^{bde}
	非缺血组织	0.128 $\pm$ 0.041	0.140 $\pm$ 0.040	0.136 $\pm$ 0.037
Mig mRNA	缺血组织	0.105 $\pm$ 0.024	0.104 $\pm$ 0.023	0.123 $\pm$ 0.020
	非缺血组织	0.104 $\pm$ 0.033	0.111 $\pm$ 0.032	0.124 $\pm$ 0.034
TNF- α (ng/L)	缺血组织	23.63 $\pm$ 4.00	154.88 $\pm$ 14.35 ^b	258.88 $\pm$ 13.73 ^{bd}
	非缺血组织	21.13 $\pm$ 4.05	25.63 $\pm$ 4.60	23.63 $\pm$ 4.57

^b $P<0.01$ vs SO; ^d $P<0.01$ vs 6 h组; ^e $P<0.01$ vs 非缺血组.

■同行评价

本文研究得出 CXCR3 及其配体 IP-10 在 I/R 早期表达上调, 方法成熟, 设计合理, 数据可信, 对临床研究有一定的参考价值。

损伤中无明显作用。在实验中, 我们应用 ELISA 监测各时段肝脏 TNF- α 水平。结果显示, 缺血再灌注后 TNF- α 水平升高, 再灌注 12 h 达最高峰, 之后逐渐下降, 各时段比较差异显著 ($P < 0.01$)。本实验显示 CXCR3、IP-10 mRNA 表达高峰早于 TNF- α , 表明在缺血再灌注损伤早期 T 细胞即起了一定的作用。这与 Khandoga *et al*^[11] 提出的淋巴细胞在再灌注早期即在肝脏窦周聚集, 从而损伤肝组织的研究结果一致。本研究发现趋化因子受体途径参与了肝脏缺血再灌注早期 T 细胞活化, 继之引起 TNF- α 等细胞因子的释放, 导致肝组织进一步受损伤, 但确切作用机制还需进一步探讨。

由此可见, 趋化因子 IP-10 及其受体 CXCR3 促进了淋巴细胞在缺血再灌注损伤中的作用, 若阻断此作用途径, 可能减轻早期肝脏缺血再灌注损伤。

4 参考文献

- 1 Husted TL, Lentsch AB. The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2867-2873
- 2 Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2: 102-107
- 3 Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007
- 4 Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002; 18: 529-535
- 5 McColl SR, Mahalingam S, Staykova M, Tylaska LA, Fisher KE, Strick CA, Gladue RP, Neote KS, Willenborg DO. Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands. *Lab Invest* 2004; 84: 1418-1429
- 6 姚宇锋, 项建斌, 蔡端. 肝脏缺血再灌注损伤发生机制研究进展. *肝胆胰外科杂志* 2005; 17: 249-251
- 7 Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhäuser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, Charo IF, Simpson KJ, Lukacs NW, Kunkel SL. Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. *Am J Pathol* 2000; 156: 1245-1252
- 8 Yamaguchi Y, Matsumura F, Takeya M, Ichiguchi O, Kuratsu JI, Horiuchi T, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Ohshiro H, Liang J, Mori K, Yamada S, Takahashi K, Ogawa M. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances expression of intercellular adhesion molecule-1 following ischemia-reperfusion of the liver in rats. *Hepatology* 1998; 27: 727-734
- 9 Shen XD, Ke B, Zhai Y, Amersi F, Gao F, Anselmo DM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. CD154-CD40 T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury, and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1 mediated cytoprotection. *Transplantation* 2002; 74: 315-319
- 10 Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997; 100: 279-289
- 11 Khandoga A, Hanschen M, O'Kessler JS, Krombach F. CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* 2006; 43: 306-315
- 12 Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 593-620

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。

p16基因高甲基化在胃癌发展中的作用

刘文天, 焦焕利, 杨玉龙, 王 栋, 张维铭

刘文天, 焦焕利, 杨玉龙, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052
张维铭, 王栋, 天津医科大学实验中心 天津市 300070
通讯作者: 刘文天, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科. lwentian@sohu.com
电话: 022-60363615
收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-09-01

Correlation of p16 hypermethylation with tumorigenesis and the development of gastric cancer

Wen-Tian Liu, Huan-Li Jiao, Yu-Long Yang, Dong Wang, Wei-Ming Zhang

Wen-Tian Liu, Huan-Li Jiao, Yu-Long Yang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Wei-Ming Zhang, Dong Wang, Central Laboratory of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Correspondence to: Wen-Tian Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. lwentian@sohu.com
Received: 2007-06-11 Revised: 2007-09-01

Abstract

AIM: Transcriptional silencing induced by hypermethylation of CpG islands in the promoter regions of genes is believed to be an important mechanism underlying tumorigenesis. This study explored the correlation of p16 hypermethylation with tumorigenesis and the development of gastric cancer.

METHODS: Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect methylation of the p16 gene in 41 specimens of gastric cancer, 40 specimens of premalignant lesions and 38 normal control specimens. The expression of p16 protein was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rate of p16 gene methylation was significantly higher in gastric cancer than in premalignant lesions and normal control specimens (56.1% vs 17.5%, 2.63%, both $P < 0.05$). The positive rate of p16 gene expression was significantly lower in gastric cancer than in premalignant lesions and normal control speci-

mens (51.2% vs 90.0%, 100.0%, both $P < 0.05$). The positive rate of p16 gene methylation was significantly higher in poorly differentiated cancer than in well-differentiated cancer (81.2% vs 40.0%, $P < 0.05$). The positive rate of p16 gene methylation was significantly higher in gastric cancers with metastasis to the lymph node than in those without metastasis to the lymph node (80.9% vs 30.0%, $P < 0.05$). The positive rate of p16 gene methylation was higher in gastric cancers with invasion to the serosa than in those without invasion to the serosa (60.0% vs 52.4%, $P > 0.05$). The positive rate of p16 protein expression in gastric cancers with p16 gene methylation was significantly lower than that in gastric cancers without p16 gene methylation (26.1% vs 83.3%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Hypermethylation of CpG islands in the promoter of the p16 gene exists in gastric cancer and can downregulate p16 expression. The level of hypermethylation of these CpG islands increases from premalignant lesions through lower degrees of malignancy to higher degrees of malignancy, and might be involved in tumorigenesis and the development of gastric cancer.

Key Words: Gastric neoplasm; Premalignant lesions; DNA methylation; p16; Methylation-specific polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Liu WT, Jiao HL, Yang YL, Wang D, Zhang WM. Correlation of p16 hypermethylation with tumorigenesis and the development of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2839-2843

摘要

目的: 通过检测胃癌、癌前病变和正常对照组中p16基因启动子区CpG岛甲基化水平及其表达, 并结合临床病理资料, 分析他们在胃癌发生、发展中的作用。

方法: 用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)检测41例胃癌组织、40例癌前病变组织和38例正常对照组中p16基因启动子5'CpG岛甲基化; 应用免疫组化检测基因的蛋白表达。

■背景资料

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 多种癌基因的活化和/或多种抑癌基因的失活导致了胃癌的发生。基因的表达不仅取决于DNA碱基排列顺序的改变, 还受DNA序列以外的机制所调节, 其中基因启动子区CpG岛高甲基化在调控抑癌基因的表达中具有重要作用, 也成为胃癌研究的热点。

■研究前沿

DNA甲基化作为表遗传学研究的重要部分,调控许多肿瘤抑制基因表达,已成为肿瘤预防、早期诊断和治疗的重要途径,具有广泛的前景。

结果: 胃癌组织中p16基因甲基化阳性率为56.1%(23/41),癌前病变组织中为17.5%(7/40),而正常对照组织中为2.6%(1/38),前组与后两组之间的差异有显著性($P<0.05$)。胃癌组织中p16基因表达阳性率为51.2%,癌前病变组织中为90.0%,正常对照组织中为100.0%,前组与后两组之间的差异有显著性($P<0.05$)。低分化型胃癌组织中的p16基因甲基化阳性率明显高于高分化型(81.3% vs 40.0%, $P<0.05$)。有淋巴结转移的胃癌组织中, p16基因甲基化阳性率与无转移组的差异有显著性(81.0% vs 30.0%, $P<0.05$)。浸润深达浆膜层的胃癌组织中, 甲基化阳性率与未达浆膜层组无统计学差异(60.0% vs 52.4%, $P>0.05$)。胃癌组织中p16基因甲基化阳性组的蛋白表达阳性率显著低于甲基化阴性组(26.1% vs 83.3%, $P<0.01$)。

结论: 胃癌组织中存在有p16基因启动子5'CpG岛高甲基化, 并导致其基因表达率显著低于正常对照及癌前病变组织。p16基因的高甲基化与胃癌分化程度、淋巴结转移相关。p16基因甲基化的发生, 从正常、癌前病变到胃癌有逐渐增加的趋势, 提示其基因CpG岛高甲基化有可能作为诊断早期胃癌的一项较为敏感的指标。

关键词: 胃癌; 癌前病变; DNA甲基化; p16基因; 甲基化特异性聚合酶链反应; 免疫组化

刘文天, 焦焕利, 杨玉龙, 王栋, 张维铭. p16基因高甲基化在胃癌发展中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2839-2843
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2839.asp>

0 引言

现认为胃癌的发病是许多基因异常表达的结果。基因的表达异常包括基因序列即遗传学(genetics)改变和基因表型遗传学(epigenetics)改变^[1-2], 而表型遗传学是研究在DNA序列没有改变的情况下所发生的遗传性基因表达的改变。这种基因表达的改变可通过DNA甲基化来实现。p16, p21等基因, 是一类抑制细胞增殖重要的抑癌基因, 在肿瘤的发生中起重要作用。目前对这些肿瘤相关基因高甲基化与胃癌发病关系的研究还很少^[3]。本实验采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)^[4]及免疫组织化学方法研究胃癌及癌前病变中p16基因启动子区甲基化状况及其蛋白表达, 旨在了解胃癌中p16基因启动子区域甲基化与蛋白表达的关系, 以及甲基化与胃癌临床病理指标之间的关系, 以认识p16基因高甲基化与胃癌发生、发

展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 天津医科大学总医院2004-11/2005-03胃镜活检标本。胃癌41例, 男23例, 女18例, 中位年龄54(38-72)岁, 高分化型(乳头状腺癌、管状腺癌)25例, 低分化型(黏液腺癌、印戒细胞癌)16例。癌前病变40例中慢性萎缩性胃炎伴中-重肠上皮化生28例, 慢性萎缩性胃炎伴中-重不典型增生24例, 中-重肠上皮化生合并中-重不典型增生12例; 其中男22例, 女18例, 中位年龄53岁(38-64岁); 对照组(正常胃黏膜及慢性浅表性胃炎)38例, 男21例, 女17例, 中位年龄53(44-68)岁。将标本一部分立即置液氮, 然后放入-70℃的低温冰箱中保存, 采用MSP检测甲基化。另一部分标本用40 g/L甲醛固定, 行常规病理及免疫组化检测。p16基因甲基化(M)和非甲基化(U)序列的特异性引物(上海生物工程有限公司合成)序列如下: p16(M): 5'TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC3'(上游), 3'CAACCCGAACCGACCGTAA5'(下游), 扩增片段长度为151 bp; p16(U): 5'TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT3'(上游), 3'CAACCCCAAACCAACCATAA5'(下游), 扩增片段长度为150 bp。dNTP, 10×Taq Buffer, Taq DNA聚合酶均为天为时代公司。生物素化羊抗兔IgG(北京中山生物技术有限公司), DAB显色液(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增p16基因 PCR反应体系为DMSO 0.7 μL, dNTP混合物2.0 μL(终浓度200 μmol/L), 10×Taq Buffer 2.5 μL, Taq DNA聚合酶0.6 μL (1.2 U), 引物0.7 μL, DNA 1.0 μL (0.2 μg), 加纯水至25 μL。循环条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 30个循环, 72℃ 7 min。琼脂糖凝胶电泳判定PCR产物。

1.2.2 免疫组化法检测 采用链霉素-抗生物素蛋白过氧化物酶连结法(SP法)。切片浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0), 微波炉加热, 使之维持在92℃-98℃ 15 min, 室温冷却20 min, 0.1 mol/L PBS洗2次。滴加正常山羊血清封闭液, 室温20 min, 甩去多余液体, 加1:50稀释的一抗, 以正常山羊血清代替一抗做阴性对照, 37℃孵育2 h后, 室温恢复20 min, 置4℃冰箱中过夜。取出切片, 室温恢复20 min, 0.1 mol/L PBS洗2 min×3次, 加生物素化羊抗兔IgG, 37℃孵育0.5 h, 0.1 mol/L PBS洗2 min×3次。滴加SP

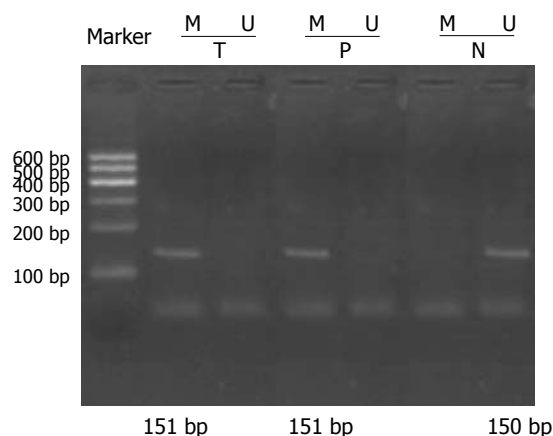


图1 p16的MSP分析. Marker: 标准品; U: 非甲基化扩增; M: 甲基化扩增; N: 正常对照; P: 癌前病变; T: 胃癌.

试剂, 37℃孵育0.5 h, 0.1 mol/L PBS洗5 min×3次. 滴加DAB显色液, 室温下显色, 镜下控制显色时间, 蒸馏水洗. 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片, 镜下观察结果. p16蛋白在黏膜上皮细胞膜着色呈棕黄色, 胞质也有很弱的着色, 为阳性表达. 取5个高倍视野计算阳性细胞占总细胞数的百分率作为阳性比例.

2 结果

2.1 p16基因甲基化检测结果 胃癌与癌前病变样品甲基化特异性引物扩增出151 bp的片段, 而正常对照样品非甲基化特异性引物扩增出150 bp的片段(图1).

2.2 p16基因的高甲基化及蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 p16蛋白表达在正常黏膜上皮及间质淋巴细胞中胞核阳性着棕黄色, 病变细胞的胞核着色很弱时判定为蛋白表达异常(图2). 胃癌、癌前病变和正常胃黏膜组p16甲基化阳性率分别为56.0%, 17.5%及2.6%, 各组检测阳性率比较见表1. 未分化型胃癌甲基化阳性率(81.2%)较高分化型(40.0%)增高, 且两组间比较有统计学意义($P<0.05$), 伴淋巴结转移的胃癌甲基化阳性率(80.9%)较不伴淋巴结转移的甲基化阳性率(30.0%)增高, 且两组间比较有统计学意义($P<0.05$). 浸润深达浆膜层的胃癌甲基化阳性率(60.0%)较未达浆膜层的甲基化阳性率(52.4%)增高, 但两组间比较无统计学意义($P>0.05$). p16蛋白在正常对照组, 癌前病变组和胃癌组表达阳性率分别为100.0%, 90.0%, 51.2%, 且逐渐降低. 胃癌组与正常对照组及癌前病变组p16表达阳性率比较有显著性差异($P<0.05$). 胃癌中p16基因甲基化阳性组p16蛋白表达阳性率为26.1%, 而阴性组p16蛋白

表1 p16基因高甲基化及蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 n (%)

分组	<i>n</i>	p16甲基化阳性率	p16表达阳性率
胃癌组	41	23(56.0%) ^a	21(51.2%) ^a
高分化	25	10(40.0%)	
低分化	16	13(81.2%) ^e	
淋巴结转移			
有	21	17(80.9%)	
无	20	6(30.0%) ^g	
浸润			
达浆膜	20	12(60.0%)	
未浆膜	21	11(52.4%)	
甲基化			
阳性	23		6(26.1%)
阴性	18		15(83.3%) ^h
癌前病变组	40	7(17.5%) ^c	36(90.0%)
正常对照组	38	1(2.6%)	38(100%)

^a $P<0.05$ vs 癌前病变; ^c $P<0.05$ vs 正常对照组; ^e $P<0.05$ vs 高分化; ^g $P<0.05$ vs 有淋巴结转移; ^h $P<0.05$ vs 甲基化阳性.

白表达阳性率为83.3%. 两组间比较有显著差异($P<0.05$)(表1).

3 讨论

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 多种癌基因的活化和/或多种抑癌基因的失活及多种外源致癌物的刺激因素的作用导致了胃癌的发生^[5]. 基因的表达不仅仅取决于DNA碱基排列顺序的改变, 还受DNA序列以外的机制所调控. DNA甲基化主要是由DNA甲基转移酶(DMT)催化, S-腺苷蛋氨酸(SAM)提供甲基给胞嘧啶, 形成5-甲基胞嘧啶. 5-甲基胞嘧啶是真核细胞中唯一存在的天然修饰方式, 约占整个胞嘧啶的3%-4%. 启动子区富含CpG序列, 故易发生甲基化. 基因启动子区甲基化可以在转录水平抑制基因表达. 在正常细胞中抑癌基因启动子区保持非甲基化状态, 基因可以正常转录、表达, 而在肿瘤细胞中, 抑癌基因启动子区甲基化, 转录受到抑制, 基因不能表达. 在肿瘤组织中常常有与DNA损伤修复、细胞周期等有关的肿瘤抑制基因失活, 从而导致恶性肿瘤的发生发展. 迄今已发现许多恶性肿瘤存在一个或多个肿瘤抑制基因CpG岛甲基化. 肿瘤抑制基因CpG岛甲基化是当今肿瘤分子生物学的热点^[6].

p16基因的功能产物p16蛋白是重要的细胞周期抑制因子. p16基因变异或失活, 将失去对细胞周期的调控作用, 引起细胞周期中G1期缩短, 过早地进入S期, 从而使细胞无控制地增殖. p16

■ 相关报道

有关p16基因甲基化与胃癌的关系的研究目前已有报道, 如Tang *et al*报道胃癌中p16基因甲基化阳性率为30%-60%. Kang *et al*报道p16、COX-2等基因在慢性胃炎、肠化中甲基化水平较低, 但在胃癌中有较高的甲基化率.

■ 创新盘点

本研究应用MSP方法及免疫组化方法对胃癌前病变和胃癌组织中p16基因甲基化及基因的蛋白表达进行了研究, 发现由癌前到胃癌的发展过程中甲基化水平呈逐步增高的趋势, 而其表达水平呈减低趋势, 提示p16基因甲基化有可能作为早期胃癌诊断和监测的手段.

应用要点

胃肠道肿瘤相关的抑癌基因p16基因启动子区CpG岛异常DNA甲基化可以依靠MSP方法检测,用于胃癌前病变的监测和早期胃癌的诊断。

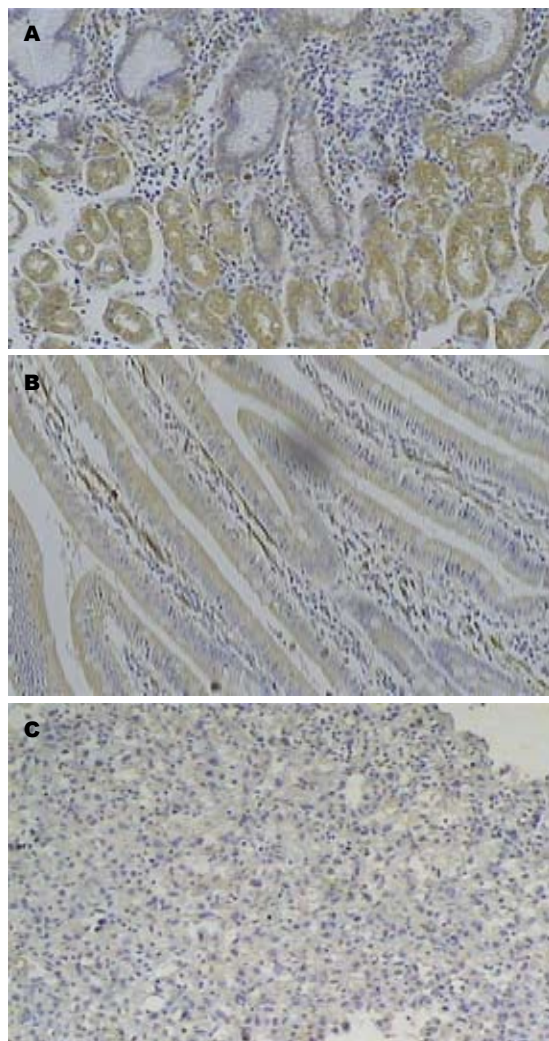


图2 p16蛋白(SP法)。A: 正常对照表达阳性(×100); B: 癌前病变阳性(×400); C: 胃癌阴性(×400)。

基因的失活存在于大多数肿瘤中,失活机制包括基因的缺失和高甲基化^[7-8]。本研究通过检测了p16基因启动子CpG岛甲基化的水平发现,胃癌中p16基因启动子CpG岛甲基化率达56.1%,而Tang *et al*^[9]报道胃癌中p16基因甲基化阳性率为30%-60%,两项结果相一致。通过对p16基因高甲基化与胃癌病理特征的分析发现,胃癌p16基因高甲基化与分化程度和淋巴结转移有关,而与浸润深度无关。未分化型胃癌p16基因启动子甲基化阳性率明显高于分化型,提示伴随着p16基因启动子甲基化程度增加,对基因表达的抑制程度增加,从而使肿瘤细胞的恶性程度增加。p16基因启动子甲基化多发生于低分化、有淋巴结转移病例,因此p16基因甲基化有可能作为评估胃癌预后的一个重要指标。由于胃癌的发病从癌前病变发展而来,在癌前病变中p16基因甲基化状态的研究也成为近年来较为有价值的方向^[10-12],所以本研究对胃癌前病变的p16基因甲

基化状态进行了检测,发现胃癌p16基因甲基化阳性率显著高于癌前病变及正常对照,但在癌前病变中p16基因甲基化阳性率为17.50%,在由正常、癌前病变到胃癌的转化过程中p16基因甲基化阳性率呈逐步增加的趋势,提示p16基因启动子CpG岛甲基化可能是发生于胃癌早期的分子事件。对p16基因甲基化与蛋白表达的关系研究发现,p16基因启动子区甲基化与蛋白表达缺失有密切的关系,在p16基因高甲基化组p16蛋白表达明显减低,在正常对照、癌前病变、胃癌中p16蛋白表达阳性率呈逐渐降低趋势,表明启动子区甲基化是p16基因在胃癌中失活的主要机制。

总之,肿瘤相关基因的甲基化状态异常可能是受损细胞的一种适应生存反应,在肿瘤发生的启动、促进和进展阶段均发挥着重要作用。这种CpG岛高甲基化异常在肿瘤预防和治疗中均有重要的应用价值。DNA甲基化在肿瘤诊断、化疗敏感性和预后评价等方面的应用价值已得到重视^[13]。发生DNA甲基化的肿瘤比DNA序列突变肿瘤,遗传性损伤容易纠正,经去甲基化治疗特异性地纠正过来,继而恢复其表达状态,已被认为是极有潜力的肿瘤基因治疗的新手段^[14-16]。

4 参考文献

- 1 Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174
- 2 朱新江, 戴冬秋. 表遗传学与胃肠道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3251-3256
- 3 Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 461-467
- 4 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 5 张维铭, 刘文天, 徐垚, 宣琪, 郑洁, 李艳云. 应用荧光差异显示法对胃癌及癌前病变相关基因的研究. *癌症* 2004; 23: 264-268
- 6 Luczak MW, Jagodzinski PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 143-154
- 7 Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2033-2040
- 8 Sanz-Casla MT, Maestro ML, Vidaurreta M, Maestro C, Arroyo M, Cerdan J. p16 Gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *Dig Dis* 2005; 23: 151-155
- 9 Tang S, Luo H, Yu J, Yang D, Shu J. Relationship between alterations of p16(INK4a) and p14(ARF)

名词解释

表型遗传学(epigenetics): 是研究在DNA序列没有改变的情况下所发生的遗传性基因表达的改变。这种基因表达的改变可通过DNA甲基化,组蛋白乙酰化等来实现。

- genes of CDKN2A locus and gastric carcinogenesis. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 1083-1087
- 10 Bai H, Gu L, Zhou J, Deng D. p16 hypermethylation during gastric carcinogenesis of Wistar rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat Res* 2003; 535: 73-78
 - 11 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
 - 12 Lee JH, Park SJ, Abraham SC, Seo JS, Nam JH, Choi C, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene* 2004; 23: 4646-4654
 - 13 Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer--the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet* 2006; 47: 365-375
 - 14 Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 55-60
 - 15 Yoo CB, Cheng JC, Jones PA. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 910-912
 - 16 Kalebic T. Epigenetic changes: potential therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 278-285

■同行评价

本文用甲基化特异性聚合酶链反应和免疫组化监测的方法,研究了p16基因启动子区GpG岛甲基化水平和p16蛋白的表达在胃癌发生发展中的作用。全文研究方法较恰当,设计较合理,引用的参考文献较新,有一定的参考价值。

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation
10 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007
15-18 October 2007
Kobe
apdw@convention.co.jp

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology
11-12 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

15th United European Gastroenterology Week, UEGW
27-31 October 2007
Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
12-17 October 2007
Pennsylvania Convention Center
Philadelphia, PA

Meeting The Liver Meeting® 2007 - 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases
2-6 November 2007
Boston - MA
www.aasld.org

紫杉醇联合希罗达治疗晚期胃癌31例

伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元

■背景资料

在我国, 胃癌发病率及死亡率高, 治愈率低, 每年死于胃癌者达160 000人, 占全部恶性肿瘤死亡人数的23%。我国的胃癌患者在确诊时大多数是晚期, 术后很快复发或根本失去手术机会难以治愈。

伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元, 南华大学附属第一医院肿瘤内科 湖南省衡阳市 421001

通讯作者: 伍小平, 421001, 湖南省衡阳市船山路69号, 南华大学附属第一医院肿瘤内科。wpx1973080@sina.com

收稿日期: 2007-06-26 修回日期: 2007-09-01

Treatment of patients with advanced gastric cancer with paclitaxel combined with Xeloda: an analysis of 31 cases

Xiao-Ping Wu, Ying-Zhi Zhuang, Hao Jiang, You-Hua Wu, Wen-Xiang Dai, Xiao-Hong Ai, San-Yuan Tang

Xiao-Ping Wu, Ying-Zhi Zhuang, Hao Jiang, You-Hua Wu, Wen-Xiang Dai, Xiao-Hong Ai, San-Yuan Tang, Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hu'nan Province, China. wpx19730806@sina.com

Correspondence to: Xiao-Ping Wu, Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, 69 Chuanshan Road, Hengyang 421001, Hu'nan Province, China. wpx1973080@sina.com

Received: 2007-06-26 Revised: 2007-09-01

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and adverse effects of a regimen of paclitaxel and Xeloda in the treatment of patients with advanced gastric cancer.

METHODS: Paclitaxel (175 mg/m^2) was administered by intravenous drip for 3 h in the first day of the experiment; Xeloda (1000 mg/m^2) was administered *po*, twice between the first day and the fourth day, and then every 21 or 28 days. Each patient was treated for more than two circles and evaluated four weeks later.

RESULTS: Among the 31 evaluable patients, 1 (3.2%) showed complete remission (CR), 15 (48.4%) showed partial remission (PR), 10 (32.3%) showed stable disease (SD) and 5 (16.1%) showed disease progression (PD). The overall response rate was 51.6% with a 95% confidence interval (CI) (range: 33%-70%); and 26 (83.9%) of the patients benefited (CR + PR + SD) from the clinical therapy with a 95% CI (range: 66%-90%). The mean time to tumor progression (TTP) was 5.32 ± 1.85 months, and the mean survival time

(MST) was 11.40 ± 1.68 months. The main side effects were nausea and vomiting, myelosuppression, diarrhea, hand-foot syndrome and alopecia.

CONCLUSION: A regimen of paclitaxel and Xeloda has a definite effect with acceptable toxicity in the treatment of patients with advanced gastric cancer.

Key Words: Advanced gastric cancer; Paclitaxel; Xeloda

Wu XP, Zhuang YZ, Jiang H, Wu YH, Dai WX, Ai XH, Tang SY. Treatment of patients with advanced gastric cancer with paclitaxel combined with Xeloda: an analysis of 31 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2844-2846

摘要

目的: 观察紫杉醇联合希罗达治疗31例晚期胃癌患者的疗效和副作用。

方法: 紫杉醇 175 mg/m^2 , 静脉滴注3 h, 第1天; 希罗达 1000 mg/m^2 , *po*, 2次/d, 第1-14天, 每21或28天为1个周期。每例患者治疗至少2个周期, 2个周期化疗4 wk后评价疗效。

结果: 在可评价疗效的31例患者中, 完全缓解(CR)1例(3.2%), 部分缓解(PR)15例(48.4%), 稳定(SD)10例(32.3%), 进展(PD)5例(16.1%), 总有效率(CR+PR)51.6%, 95%可信区间为33%-70%; 临床获益者(CR+PR+SD)共26例(83.9%), 95%可信区间为66%-94%; 平均肿瘤进展时间(TTP)为 $5.32 \pm 1.85 \text{ mo}$; 平均生存期(MST)为 $11.40 \pm 1.68 \text{ mo}$ 。不良反应主要为恶心呕吐、骨髓抑制、腹泻、手足综合征及脱发。

结论: 紫杉醇联合希罗达治疗晚期胃癌疗效好, 副作用小, 患者耐受性好。

关键词: 晚期胃癌; 紫杉醇; 希罗达

伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元. 紫杉醇联合希罗达治疗晚期胃癌31例. 世界华人消化杂志 2007; 15(26): 2844-2846

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2844.asp>

■研发前沿

化疗在治疗晚期胃癌中的地位已得到公认, 但目前胃癌化疗尚无标准方案。以往化疗基本上是采用以5-FU为主的方案, 进入21世纪多种新药组成联合化疗方案来治疗晚期胃癌, 疗效得到了一定的提高, 但副作用大, 患者难以耐受, 且5-FU是采用长期持续静脉滴注, 给患者的生活带来诸多不便。

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 我国胃癌的死亡率仅低于肺癌, 占各种恶性肿瘤的第2位, 每年约有超过160 000人死于胃癌^[1]. 在我国大多数胃癌患者就诊时已是晚期, 失去了手术根治切除的时机. 因此化疗在晚期胃癌的治疗中有重大的临床意义. 本文收集2004-07-01/2006-12-01我科以紫杉醇联合希罗达治疗31例晚期胃癌患者的资料, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组31例患者中, 男19例, 女12例, 年龄30-72(中位年龄54)岁. 17例因有远处转移未行手术治疗, 14例为手术后复发转移, 所有患者均通过手术或胃镜活检取得病理确诊, 所有患者的病灶均可通过测量评价疗效, 预计生存期超过3 mo, 都为初次应用化疗, 血常规、心脏、肝肾功能均正常, Karnofsky评分 ≥ 60 分.

1.2 方法 紫杉醇 175 mg/m^2 , 静脉滴注3 h, 第1天, 使用紫杉醇前先行预防过敏反应的预处理; 希罗达 1000 mg/m^2 , po, 每天2次, 第1-14天, 每21或28天为1个周期. 每例患者治疗至少2个周期, 2个周期化疗4 wk后评价疗效. 每个周期化疗前后复查血常规、心电图、肝肾功能. 31例患者共接受142个周期化疗, 每例患者平均疗程数为5(3-8)个周期. 疗效评定根据WHO关于实体瘤的客观疗效评定标准分为: 完全缓解(CR), 部分缓解(PR), 稳定(SD), 进展(PD). 有效率(RR)为CR+PR病例数占可评价疗效的百分数. 不良反应按WHO关于抗癌药物常见毒副反应分级标准分为0-IV度. 平均肿瘤进展时间(TTP)指治疗开始到肿瘤进展的平均时间; 平均生存期(MST)指化疗开始至死亡的平均时间. 采用电话随访, 最后随访时间2006-12-01, 全部病例均获随访.

统计学处理 数据分析利用SPSS10.0统计软件包进行处理, 计算有效率及临床获益率的95%可信区间、TTP及ST的均数.

2 结果

2.1 临床疗效 在可评价疗效的31例患者中, CR 1例(3.2%), PR 15例(48.4%), SD 10例(32.3%), PD 5例(16.1%), 总有效率(CR+PR)51.6%, 其95%可信区间为33%-70%; 临床获益者(CR+PR+SD)共26例, 占83.9%, 其95%可信区间为66%-94%. 紫杉醇联合希罗达方案治疗31例晚期胃癌患者的ST, TTP情况见图1. MST为 $11.40 \pm 1.68 \text{ mo}$, TTP为 $5.32 \pm 1.85 \text{ mo}$.

表1 紫杉醇联合希罗达方案治疗31例晚期胃癌患者的副作用

副作用	0	I	II	III	IV(n)	总发生率(%)	III-IV度比例(%)
恶心呕吐	16	12	2	1	0	48.4	3.2
骨髓抑制	14	3	5	5	4	54.8	29.0
腹泻	17	6	5	3	0	45.2	9.7
手足综合征	15	7	5	4	0	51.6	12.9
黏膜炎	23	3	3	2	0	25.8	6.4
脱发	2	10	11	7	1	93.5	25.8
肌肉关节痛	21	6	4	0	0	32.2	0

■ 相关报道

进入21世纪以来, 紫杉类、草酸铂、伊立替康及希罗达等新药用来治疗晚期胃癌, 使得晚期胃癌患者的生存期得以明显地改善.

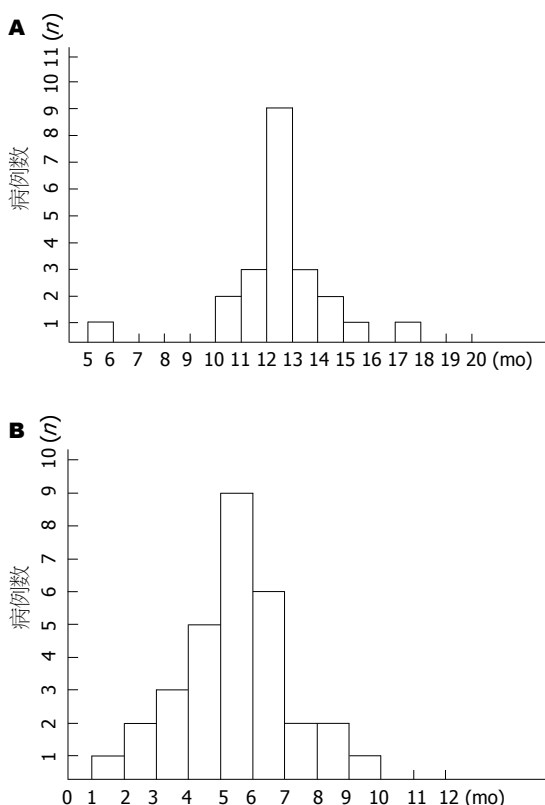


图1 紫杉醇联合希罗达治疗31例晚期胃癌患者的ST和TTP. A: ST; B: TTP.

2.2 不良反应 本组患者化疗副作用分析见表1.

3 讨论

在我国, 胃癌的发病率及死亡率均居恶性肿瘤之首, 每年死于胃癌者达160 000人, 占全部恶性肿瘤死亡人数的23%^[2]. 目前我国胃癌的防治现状是“三低一高”, 即早期诊断率低, 手术切除率低, 5 a生存率低, 根治术后复发转移率高^[3]. 患者在确诊时大多数已存在不同程度的转移, 术后很快复发或根本失去手术机会, 晚期胃癌难以治愈, 故晚期胃癌的治疗是以达到延长生存期, 提高生活质量的姑息治疗为目的. 而

■ 创新盘点

本文采用两种新药联合治疗晚期胃癌, 取得了理想的疗效. 且副作用轻微, 尤其是患者难以耐受的III/IV度副作用发生率低(主要为骨髓抑制、手足综合征及脱发, 发生率 $>10\%$), 副作用经支持对症处理后都能消失, 不影响下一周期化疗的进行. 且患者只需住院1 d输液化疗, 简易方便, 患者遵医嘱性好.

■应用要点

晚期胃癌患者具有消化功能差、耐受性差等体质特点,而本文所研究的方案毒副作用小,应用起来简易方便,近期及远期疗效好,值得临床推广使用。

全身化疗在晚期胃癌姑息治疗中的作用优于最好支持治疗早有定论,只进行最佳的支持治疗(BSC)而不接受化疗的晚期胃癌患者MST为3-5 mo,而接受化疗的晚期胃癌患者的MST可达9-11 mo,可见化疗较最好支持治疗能明显延长生存期^[4]。然而化疗药物的副作用较大,而晚期胃癌患者的一般情况较差,对化疗的耐受性较差,因此对晚期胃癌患者行联合化疗时要充分考虑到化疗的疗效,副作用及患者耐受性之间的平衡。

晚期胃癌以全身化疗为主,胃癌是对化疗相对敏感的恶性肿瘤,但目前胃癌治疗依然没有所谓的“金标准”化疗方案^[5]。以往化疗基本上是采用以5-FU为主的方案(如FAM、ECF等),进入21世纪多种新药(如紫杉类、草酸铂、伊立替康及希罗达等)组成联合化疗方案(如TCF、FOLFOX等)来治疗晚期胃癌,疗效得到了一定的提高,但副作用大^[6],患者难以耐受,且方案中的5-FU是采用持续静脉滴注,要求使用该方案的患者中心静脉置管带化疗泵,给患者的生活带来诸多不便,对于姑息治疗的患者来说一般难以接受,医从性差。

紫杉醇是一种新型抗微管药,通过促进微管蛋白装配成微管,并抑制其解聚,从而影响细胞的有丝分裂和增殖。1994年美国MDAnderson癌症中心的著名学者Ajani首先报道用于治疗晚期胃癌,紫杉醇治疗胃癌的单药有效率为20%-24%^[7],联合用药的有效率可达68%^[8]。希罗达通用名是卡培他滨,化学名 N_4 -戊基羧酸-5'-脱氧-5-氟胞嘧啶,是新一代 po 选择性氟尿嘧啶甲酸盐抗肿瘤药,是5-FU的前体药物, po 后经胃肠道以原形吸收,经过独特的3步激活计划,最后在到达肿瘤组织后转化为5-FU而发挥细胞毒作用,作用于细胞周期的S期,对肿瘤细胞具有很强的靶向性,希罗达每天 po 两次可保持恒定的血药浓度,与5-FU相比抗癌作用增强,毒副作用少^[9],且希罗达是 po 给药,可免除使用5-FU时长期静脉置管带泵之不便。紫杉类药物联合方案化疗增加了疗效,但骨髓抑制仍是最大问题。近年人们不断探索其他新药与紫杉醇联用或改变给药方法以期保证疗效或降低毒性,而5-FU类 po 药希罗达以其方便、低毒符合晚期胃癌患者的体质特点(消化功能差、耐受性差等)受到关注。紫杉类药物与希罗达联合应用,两药作用靶点部位不同,紫杉醇可上调肿瘤组织内的TP酶而增强希罗达疗效,虽未加用DDP但临床初步观察其疗效并未降低,而不良反应明显降

低^[10]。所以本方案有充分的理论依据,方便患者,疗效并得到本组临床观察的支持。

我组临床观察紫杉醇联合希罗达方案治疗晚期胃癌,总有效率为51.6%,95%可信区间为33%-70%;临床获益率为83.9%,95%可信区间为66%-94%;平均TTP为 5.32 ± 1.85 mo;MST为 11.40 ± 1.68 mo,化疗的近期有效率高,化疗后晚期胃癌患者的生活质量得到提高,生存期明显延长,且不良反应小,主要副作用为恶心呕吐、骨髓抑制、腹泻、手足综合征及脱发等,尤其是患者难以耐受的III/IV度副作用发生率(主要为骨髓抑制、手足综合征及脱发,发生率>10%),副作用经支持对症处理后都能消失,不影响下一周期化疗的进行,且患者只需住院1 d输液化疗,简易方便,患者医从性好。

总之,紫杉醇联合希罗达方案对晚期胃癌疗效确切,副作用小,患者的化疗耐受性好,用药简便易行,患者医从性好,很好地达到晚期胃癌姑息治疗的目的,值得临床推广。

4 参考文献

- 董志伟,乔友林,李连弟,陈育德,王润田,雷通海,饶克勤,王汝宽,赵平,游伟程,鲁凤珠,戴旭东,王国清,罗贤懋,周海城. 中国癌症控制策略研究报告. 中国肿瘤 2002; 11: 250-253
- 孙燕. 内科肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 549
- 金懋林. 胃癌内科化学治疗的新进展. 医学临床研究 2003; 20: 735-738
- Devita VT Jr, Hellman S and Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology (7th edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 938
- 储大同. 当代肿瘤内科治疗方案评价. 第2版. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 83
- Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2903-2909
- Yamada Y, Shirao K, Ohtsu A, Boku N, Hyodo I, Saitoh H, Miyata Y, Taguchi T. Phase II trial of paclitaxel by three-hour infusion for advanced gastric cancer with short premedication for prophylaxis against paclitaxel-associated hypersensitivity reactions. *Ann Oncol* 2001; 12: 1133-1137
- 周宁宁, 周中梅, 刘茂珍, 李宇红, 徐瑞华, 滕小玉, 向晓娟, 田维华, 刘冬耕, 胡丕丽, 张蓓, 丘惠娟, 钱穗毅, 何友兼. 紫杉醇和5-氟尿嘧啶/醛氢叶酸双周疗法治疗晚期胃癌的初步报告. 癌症 2003; 22: 867-869
- Schuller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 291-297
- Thuss-Patience PC, Kretschmar A, Dogan Y, Blau I, Pink D, Lebedinzew B, Micheel S, Dorken B, Reichardt P. Capecitabine and docetaxel for advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4068

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

■同行评价

本文阐述了紫杉醇联合希罗达治疗晚期胃癌疗效好,副作用小,患者耐受性好,设计简单,数据可信,有一定的临床意义。

HIF-1 α 及其调控基因PTEN在胃癌中表达的相互关系及临床病理意义

孙威, 张丹丹, 郭琳, 王强

孙威, 郭琳, 王强, 中国医科大学附属盛京医院普通外科 辽宁省沈阳市 110004

张丹丹, 中国医科大学附属第四医院胸外科 辽宁省沈阳市 110032

通讯作者: 孙威, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院普通外科. sunweii@hotmail.com

电话: 024-83955063 传真: 024-23929897

收稿日期: 2007-05-20 修回日期: 2007-09-01

Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and its regulator phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10 in gastric cancer

Wei Sun, Dan-Dan Zhang, Lin Guo, Qiang Wang

Wei Sun, Lin Guo, Qiang Wang, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Dan-Dan Zhang, Department of Thoracic Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Wei Sun, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunweii@hotmail.com

Received: 2007-05-20 Revised: 2007-09-01

Abstract

AIM: To study the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and its regulator phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10 (PTEN) in gastric cancer and their relationship with tumor angiogenesis and clinicopathologic features.

METHODS: Immunohistochemistry was performed to detect the expression of HIF-1 α and its regulator PTEN in 54 cases of gastric cancer. The relationships among the expression of HIF-1 α and PTEN, tumor angiogenesis and clinicopathologic features of patients were analyzed.

RESULTS: The positive expression rate of HIF-1 α in gastric cancer (74.07%) was significantly higher than that in normal gastric tissue (0%,

$P < 0.01$); the expression of HIF-1 α in gastric cancer was significantly associated with TNM stage ($P < 0.05$), invasive depth ($P < 0.01$) and lymph-node metastasis ($P < 0.05$); the positive expression rate of PTEN in gastric cancers was low (51.9%), and reduced with increased invasive depth (38.5% vs 86.7%, $P < 0.01$) and clinical stage (28.6% vs 76.9%, $P < 0.01$), reduced histological differentiation (22.2% vs 70.6%, 63.2%, $P < 0.01$) and the occurrence of lymphatic (28.0% vs 72.4%, $P < 0.01$) and long distance metastases (16.7% vs 61.9%, $P < 0.05$). There was a negative correlation between the expression of HIF-1 α and PTEN ($r = -0.41$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: HIF-1 α and its regulator PTEN play a very important role in the development of gastric cancer and could be useful factors in the diagnosis of gastric cancer and estimation of prognosis.

Key Words: Hypoxia-inducible factor-1 α ; Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Sun W, Zhang DD, Guo L, Wang Q. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and its regulator phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10 in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2847-2851

摘要

目的: 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)及其调控基因PTEN在胃癌及正常胃组织中表达的相互关系以及他们在胃癌的发生发展、浸润和转移中的作用。

方法: 应用免疫组化SP法检测54例胃癌组织中HIF-1 α 和PTEN的表达情况, 探讨他们与胃癌临床病理因素的关系。

结果: HIF-1 α 在胃癌中的表达率(74.07%)明显高于正常胃组织(0%)($P < 0.01$); HIF-1 α 的表达与胃癌TNM分期($P < 0.05$)、肿瘤浸润深度($P < 0.01$)和淋巴结转移显著相关($P < 0.05$)。胃

■背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 虽然综合治疗使得胃癌的5 a生存率有所改善, 但其预后仍不理想, 5 a生存率总体来说仍徘徊在20%-30%之间。肿瘤侵袭转移是肿瘤治疗失败的主要原因。胃癌的发病机制目前仍然不是很清楚。缺氧因素在肿瘤的研究中越来越被重视。

■研究前沿

HIF-1 α 是新近发现的一种转录因子,研究发现他在多种恶性肿瘤中表达、并与肿瘤血管生成、肿瘤细胞的增殖、凋亡等过程密切相关,PTEN作为抑癌基因对HIF-1 α 具有调控作用。目前,国内外关于胃癌中HIF-1 α 与PTEN表达的关系报道甚少。

癌中PTEN低表达(51.9%),且在肿瘤浸润深(38.5% vs 86.7%, $P<0.01$)、有淋巴(28.0% vs 72.4%, $P<0.01$)和远隔转移(16.7% vs 61.9%, $P<0.05$)、临床分期高(28.6% vs 76.9%, $P<0.01$)、病理分化低(22.2% vs 70.6%, 63.2%, $P<0.01$)的胃癌组织表达明显降低。胃癌组织中HIF-1 α 与PTEN的表达呈负相关($r = -0.41$, $P<0.05$)。

结论: HIF-1 α 和PTEN在胃癌的发生发展中起重要作用,联合检测可作为判断胃癌恶性程度和预后的指标。

关键词: 缺氧诱导因子-1 α ; PTEN; 胃癌; 免疫组织化学

孙威, 张丹丹, 郭琳, 王强: HIF-1 α 及其调控基因PTEN在胃癌中表达的相互关系及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2847-2851

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2847.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,虽然综合治疗使得胃癌的5 a生存率有所改善,但其预后仍不理想,5 a生存率总体来说仍徘徊在20%-30%之间。肿瘤侵袭转移是肿瘤治疗失败的主要原因^[1]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是新近发现的一种转录因子,研究发现他在多种恶性肿瘤中可表达、并与肿瘤血管生成、肿瘤细胞的增殖、凋亡等过程密切相关,PTEN作为抑癌基因对HIF-1 α 具有调控作用。迄今为止,国内外关于胃癌中HIF-1 α 与PTEN表达的关系报道甚少。本研究采用免疫组织化学法,检测HIF-1 α 、PTEN在胃癌中的表达,探讨他们与胃癌肿瘤生物学行为的关系及二者之间的相关性,为临床上进一步了解胃癌的生物学行为、判断预后提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-03手术切除后病理证实为腺癌,临床病理及随访资料齐全的胃癌蜡块标本54例,患者术前均未行化疗或放疗。男37例,女17例;年龄38-78岁;肿瘤的原发灶大小、深度(T)、淋巴结转移(N)由病理确定,远处转移(M)由病理学和临床确定。其中肿瘤直径 <5 cm 37例, ≥ 5 cm 17例;肿瘤浸润深度在浆膜下者15例,浸透浆膜者39例;高分化19例,中分化17例,低分化18例;局部淋巴结无转移29例,有转移25例;远隔无转移42例,有转移12例。根据1997年国际抗癌联盟

(IUCC)制定的TNM分期标准进行临床分期, I期12例, II期14例, III期16例, IV期12例。另取正常胃组织15例作对照,标本取自胃溃疡或十二指肠溃疡手术标本中正常的胃组织,并经病理观察证实且排除重度不典型增生。男10例,女5例,年龄44-77岁。浓缩型兔抗人HIF-1 α mAb、浓缩型PTEN鼠抗人mAb购于北京中山生物制品有限公司; SP试剂盒及DAB显色试剂盒购自福州市迈新生物技术开发公司。枸橼酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH6.0)、磷酸氢二钠、氯化钠、二甲苯、乙醇、过氧化氢、苏木素等,普通实验室冰箱、切片机、烤片机、高压锅、温育箱、湿盒、恒温振荡器、Olympus BX₄₁显微镜、显微数码照相机Olympus BX₄₀F₄等,均由中国医科大学盛京医院病理科提供。

1.2 方法 常规HE染色,确定标本的组织分化程度。采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法检测HIF-1 α 和PTEN在胃癌及正常胃组织中的表达。具体操作步骤按常规进行,其一抗工作稀释度均为1:75。用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。HIF-1 α 阳性表达部位主要在胞核,而PTEN阳性表达部位主要在胞质。以细胞质内出现明显棕黄色颗粒为阳性细胞。先于低倍镜下观察,排除肿瘤坏死出血区及边缘反应区,于肿瘤内染色相对密集区选取5个视野分别进行细胞记数,高倍镜下进行观察,以阳性细胞数占同类记数细胞的百分比为阳性细胞率。阴性(-): 阳性细胞率 $<5\%$; 弱阳性(+): 阳性细胞率为5%-25%; 阳性(++): 阳性细胞率为25%-50%; 强阳性(+++): 阳性细胞率 $>50\%$ 。

统计学处理 采用SPSS12.0软件包进行统计分析。HIF-1 α 、PTEN各指标间的相关性研究采用相关分析,各检验方法皆以 $P<0.05$ 为差异显著标准。

2 结果

2.1 HIF-1 α 在胃癌组织中的表达及与临床病理因素的关系 HIF-1 α 阳性表达的黄色颗粒或棕黄色颗粒见于细胞核及胞质中,正常胃组织中未见HIF-1 α 的阳性表达。本组54例胃癌患者中14例(-), 8例(+), 11例(++), 12例(+++), 9例(+++); 总阳性表达率为74.07%(40/54)。HIF-1 α 在胃癌中的表达明显高于胃正常组织,差别有统计学意义($P<0.01$)。HIF-1 α 在胃癌TNM I、II和III、IV期的阳性表达率分别为61.5%和85.7%, 2组间

比较有显著性差异($P<0.05$); 胃癌浸润深度的不同(浆膜下和浆膜外), HIF-1 α 阳性表达率也明显不同(46.7%, 84.6%), 两组间比较有显著性差异($P<0.01$); 淋巴结转移组的HIF-1 α 阳性表达率92.0%, 显著高于淋巴结未转移组58.6%($P<0.05$). HIF-1 α 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小、分化程度及有无远隔转移无明显关系($P>0.05$)(表1).

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

2.3 胃癌组织中HIF-1 α 与VEGF的表达呈负相关 ($r = -0.41, P<0.05$).

3 讨论

缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是由HIF-1 α 及HIF-1 β 亚单位构成的异二聚体^[2]. 在非缺氧细胞核和胞质中, 可检测到HIF-1 β , 不能检测到HIF-1 α . 细胞缺氧时, HIF-1 β 从胞质转移到核, 而HIF-1 α 在核中显著增加. 暴露于正常氧浓度, HIF-1 β 重新出现在胞质中, 而核中高水平的HIF-1 α 很快降解^[3], 因此, HIF-1 α 对缺氧更具有敏感性. 研究表明HIF-1 α 在多数恶性肿瘤组织中都有表达^[4], 已有学者证实HIF-1 α 在肝癌、乳腺癌、脑肿瘤等多种肿瘤组织中表达并调节其生物学行为^[5]. 在常氧条件下, 88%的正常人体组织不表达HIF-1 α , 53%的恶性肿瘤组织表达HIF-1 α , 在相应的良性肿瘤中没有检测到HIF-1 α ^[6], 而且HIF-1 α 表达水平与肿瘤患者的预后呈负相关^[7]. HIF-1 α 对氧的依赖性较强, 当周围环境的氧浓度下降时, HIF-1 α 表达增加, 并且其表达增加表现在多个水平上, 包括转录和蛋白等水平, 但主要是蛋白水平的表达改变^[8]. 因为, 在明显的缺氧或低糖状态下, 编码翻译HIF-1 α 的mRNA水平并没有显著增高. HIF-1 α 在细胞内水平的增高仅仅只是因为缺氧或低糖的环境下HIF-1 α 的稳定性明显提高而在胞内积聚, 当缺氧或低糖得到改善时, HIF-1 α 被

表 1 HIF-1 α 和PTEN在胃癌中的表达与临床病理因素的关系 n (%)

临床病理因素	n	HIF-1 α	PTEN
年龄(岁)			
≤60	41	31(75.6)	21(51.2)
>60	13	9(69.2)	7(53.8)
性别			
男	37	28(75.7)	20(54.1)
女	17	12(70.6)	8(47.1)
肿瘤大小(cm)			
≤5	37	27(73.0)	19(51.4)
>5	17	13(76.5)	9(52.9)
组织学分型			
高分化	19	12(63.2)	12(63.2)
中分化	17	13(76.5)	12(70.6)
低分化	18	13(72.2)	4(22.2) ^b
浸润深度			
浆膜下	15	7(46.7)	13(86.7)
浆膜外	39	33(84.6) ^b	15(38.5) ^b
淋巴结转移			
无	29	17(58.6)	21(72.4)
有	25	23(92.0) ^a	7(28.0) ^b
远隔转移			
无	42	30(71.4)	26(61.9)
有	12	10(83.3)	2(16.7) ^a
TNM分期			
I、II期	26	16(61.5)	20(76.9)
III、IV期	28	24(85.7) ^a	8(28.6) ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

迅速降解^[9]. 肿瘤组织生长迅速, 必然会处于缺氧状态而诱导HIF-1 α 表达. 因此, 癌基因的激活及抑癌基因的失活可导致瘤细胞中HIF-1 α 的表达升高及活性的增强. Zhong *et al*^[6]利用HIF-1 α mAb检测了HIF-1 α 在多种肿瘤中的表达, 发现90%的结肠癌、肺癌及前列腺癌组织中HIF-1 α 表达升高, 而在肿瘤附近正常组织中则不表达.

本组实验中, 采用免疫组化的方法对HIF-1 α 进行标记, 结果证实HIF-1 α 主要表达于胞核, 胞质也有表达, 肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘HIF-1 α 表达明显增多, 周围正常组织及肿瘤间质无HIF-1 α 的表达. 这表明HIF-1 α 在肿瘤的发生、发展中具有重要作用, 他不仅调节血管形成, 调节众多的下游基因以维持或促进肿瘤的发展, 而且他可反馈接受肿瘤生长过程中所产生的因子或在缺氧环境中上调表达, 如此形成恶性循环促进肿瘤生长, 调节肿瘤的生物特性^[10]. 肿瘤的生长必须有新生毛细血

■应用要点

本文提示我们关于胃癌缺氧及其调控基因PTEN的深入研究与人为干预可能是胃癌治疗的一个新的方向. 为临床上进一步了解胃癌的生物学行为和判断预后提供了帮助.

■名词解释

1 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α): 是新近发现的一种转录因子, 研究发现他在多种恶性肿瘤中可表达, 并与肿瘤血管生成、肿瘤细胞的增殖、凋亡等过程密切相关。

2 PTEN: 即与张力蛋白同源的、第10染色体丢失的磷酸酶(PTEN)基因, 定位于人类染色体10q23.3, 编码由403个氨基酸残基组成的蛋白质。

管形成以供应生长快, 代谢旺盛的肿瘤细胞和组织, 另外大量的代谢产物需要运走, 也需要有新生血管形成。肿瘤细胞快速生长所造成的缺氧环境都可诱导HIF-1 α 的表达, 而HIF-1 α 又可调节其下游基因表达而促进血管形成和肿瘤生长^[11]。因此, 肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘HIF-1 α 表达明显增多。癌基因及抑癌基因突变, 通过各种途径导致HIF-1 α 在体内聚集, 后者可诱导各种低氧反应基因转录导致VEGF、GLUT等升高, 另外, HIF-1 α 与各种生长因子如IGF2的相互作用使细胞增生并且存活, 这些因素使肿瘤细胞在不断增殖的同时, 获得浸润和转移的能力^[12-13]。因此HIF-1 α 表达水平随临床分期的升高而增加, 两者呈显著的正相关, 有转移者HIF-1 α 阳性率较无转移者显著增高。

PTEN即与张力蛋白同源的、第10染色体丢失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10, PTEN)基因^[14-16], 定位于人类染色体10q23.3, 编码由403个氨基酸残基组成的蛋白质。PTEN蛋白包括氨基端的磷酸酶结构域、C2结构域和羧基端结构域^[17], 通过脂质磷酸酶活性特异性的去除磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸(phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate, PIP3)3'位上的磷酸基团, 负性调控PI3K/蛋白激酶B(PKB/Akt)通路, 使细胞周期依赖性激酶(CDK)抑制剂p27去磷酸化, 并可以提高caspase-3活性, 使细胞周期停滞在G₁期, 促进细胞凋亡, 抑制细胞外基质和基底膜的降解而发挥其抑癌作用^[18-19]。研究发现, PTEN在多种恶性肿瘤中均可以检测到突变与缺失, 胃癌中也可以检测到PTEN表达的异常^[20-23]。将野生型PTEN基因转导到肿瘤细胞中, 会发现肿瘤细胞的生长明显受到抑制^[24]。Weng *et al*^[25]发现, PTEN蛋白表达高低与患者的病理分级及预后有关, 预后越差, 恶性程度越高, PTEN蛋白表达水平越低。我们发现, PTEN在胃癌组织中的表达率明显低于在正常胃组织中的表达, 并随肿瘤病理分化程度的降低、浸润深度的加深、淋巴转移的发生、远隔转移的产生及临床分期的增高而降低($P<0.05$), 与文献报道相符, 提示PTEN基因表达的缺失与胃癌的发生发展、浸润和转移密切相关, 而且可能为判断胃癌的恶性程度提供依据。

如前所述, HIF-1 α 在胃癌中表达显著高于正常胃组织, 并与胃癌肿瘤生物学行为关系密切。但影响肿瘤发生、发展的因素很多, 而且各

种因素交互作用, 相互关联。目前认为, 调节肿瘤细胞内HIF-1 α 的机制非常复杂, 主要包括氧依赖的信号传导机制及遗传变异作用^[26]。近几年, 癌基因、抑癌基因对HIF-1 α 表达及活性的影响已成为研究的热点。

PTEN主要通过PI(3)k/Akt通路, 在抑制细胞周期进展, 介导细胞凋亡的过程中发挥作用^[27]。PTEN基因的突变或缺失可影响HIF-1 α 蛋白的表达和转录活性^[28]。在PTEN异常的胶质细胞肿瘤中, PI(3)k/Akt因PTEN的负调控作用丧失而呈现高活化状态, 使HIF-1及靶基因的表达上调。调节发生在HIF-1 α 蛋白质水平, 对HIF-1 α mRNA几乎没有影响^[29]。此外, Akt活化可稳定HIF-1 α 蛋白水平, 而PTEN蛋白则降低HIF-1 α 的稳定性^[27]。Huang *et al*^[30]报道, PTEN突变或缺失可以使PI(3)k/Akt途径失去调控, 促进VEGF介导的血管内皮细胞增殖和肿瘤血管的形成, 从而提高了肿瘤细胞的侵袭、转移能力。而野生型PTEN过表达可抑制PTEN缺失的细胞表达HIF-1 α 和VEGF。在前列腺癌中, 血管形成与PTEN功能丧失诱导表达HIF-1 α 密切相关; 而在前列腺癌细胞株PC3中导入野生型PTEN则可明显抑制HIF-1 α 蛋白的表达, 并可抑制VEGF的活性, 抑制血管形成^[31]。本试验相关性研究表明, 胃癌中HIF-1 α 与PTEN呈负相关, 即随着HIF-1 α 表达水平的增高, PTEN的表达呈下降趋势。结合文献, 我们认为PTEN基因在胃癌中存在突变或缺失, PTEN失表达使PIP3去磷酸化, 通过PI(3)K/Akt信号通路继而使HIF-1 α 蛋白的表达水平升高。

总之, 肿瘤的发生是一个多步骤多阶段的复杂过程, 这一过程涉及多个细胞因子的作用及多个原癌基因的激活与多个肿瘤抑制基因的失活。HIF-1 α 和PTEN基因及其表达产物与胃癌发生发展密切相关。HIF-1 α 的表达与胃癌的TNM分期、浸润深度和淋巴结转移有明显的相关性。HIF-1 α 的过表达与抑癌基因PTEN缺失或突变有关。

4 参考文献

- 1 桑海泉, 王强. 胃癌组织中MTA1, PTEN, E-cadherin的表达及其相互关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1096-1102
- 2 宗建春. HIF-1的生物学机制及在肿瘤研究中的进展. 重庆医学 2004; 33: 780-783
- 3 Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for

- nuclear accumulation of HIF-1 α . *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 8): 1203-1212
- 4 Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rossler K, Proding A, Budka H, Hainfellner JA. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 2001; 92: 165-171
 - 5 Giatromanolaki A, Harris AL. Tumour hypoxia, hypoxia signaling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 4317-4324
 - 6 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
 - 7 郭克勤, 于如同, 高文昌. HIF-1 α 、VEGF表达与脑胶质瘤预后的相关性. 徐州医学院学报 2003; 23: 228-232
 - 8 Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480
 - 9 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
 - 10 马雁彬, 靳风烁, 姚建忠, 杨永胜, 江军, 刘大为, 肖华亮, 向德兵, 张国伟. HIF-1 α 表达与膀胱癌生物学行为关系的研究. 贵州医药 2003; 27: 385-387
 - 11 Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C947-970
 - 12 杨菊红. 低氧诱导因子-1与恶性肿瘤的研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2002; 22: 17-19
 - 13 任宏, 孙光. HIF-1与肿瘤血管新生及其表达的基因调控. 国外医学泌尿系统分册 2005; 25: 180-183
 - 14 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
 - 15 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
 - 16 Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129
 - 17 Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 829-844
 - 18 Besson A, Robbins SM, Yong VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999; 263: 605-611
 - 19 Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; 264: 29-41
 - 20 Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165
 - 21 Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG, Zhang YC, Xin Y. Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1662-1666
 - 22 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
 - 23 周庆华, 刘丽娜, 吕申, 王梅, 刘春英. 胃癌组织 PTEN、cyclinE表达与幽门螺旋杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2560-2563
 - 24 Wu Y, Karas M, Dupont J, Zhao H, Toyoshima Y, Le Roith D. Multiple signaling pathways are involved in the regulation of IGF-I receptor inhibition of PTEN-enhanced apoptosis. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14: 52-58
 - 25 Weng LP, Smith WM, Brown JL, Eng C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 605-616
 - 26 Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1661-1668
 - 27 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
 - 28 Paez J, Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* 2003; 115: 145-167
 - 29 Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 363-369
 - 30 Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem* 2002; 277: 10760-10766
 - 31 Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-1545

■同行评价

本文对54例胃癌患者的癌组织和15例正常胃组织采用免疫组化方法检测了HIF-1 α 和PTEN的表达,并且分析了HIF-1 α 和PTEN与胃癌临床病理的关系,立题新颖研究样本量大,得出的结论较可信,有一定的先进性和科学意义。

编辑 何燕 电编 何基才

18岁以下青少年肝病患者肝脏切除23例

陈立波, 王国斌

■背景资料

18岁以下青少年具有自身发育特点, 肝脏及其他器官储备功能好, 肝脏病因学也存在特殊规律。本文拟对18岁以下青少年组肝病患者肝脏疾病发病学以及手术治疗效果、安全性进行初步总结。

陈立波, 王国斌, 华中科技大学协和医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430022

通讯作者: 陈立波, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学协和医院肝胆外科中心, libo_chen@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2007-05-08 修回日期: 2007-09-01

Adolescent hepatectomy: an analysis of 23 cases

Li-Bo Chen, Guo-Bin Wang

Li-Bo Chen, Guo-Bin Wang, Union Hospital Hepatobiliary Surgery Center, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Li-Bo Chen, Union Hospital Hepatobiliary Surgery Center, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com

Received: 2007-05-08 Revised: 2007-09-01

Abstract

AIM: To analyze the parameters related to adolescent hepatectomy.

METHODS: Twenty-three adolescent hepatectomies performed in the Union Hospital Hepatobiliary Surgery Center were analyzed.

RESULTS: Among the 23 adolescent hepatectomies, 6 were for hepatocellular carcinoma, 7 for hepatoblastoma, 3 for lymphoma, 2 for sarcoma, 3 for cavernous hemangioma, and 2 for focal nodular hyperplasia. Five received right-half hepatectomy, 6 left-half hepatectomy, 1 right trisegmentectomy, 2 left-half and caudate hepatectomy, 1 isolated caudatectomy, and 10 segmentectomy. The mean postoperative hospital stay was 8.3 ± 2.4 days, and 21 patients recovered to a preoperative liver function level at 7 d after operation. There was no liver failure or perioperative mortality.

CONCLUSION: Adolescent liver disease patients with diverse etiology, good liver compensation, can accept radical hepatectomy with rare postoperative complications, and recover quickly.

Key Words: Hepatectomy; Adolescent; Postoperative complications

Chen LB, Wang GB. Adolescent hepatectomy: an analysis of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2852-2855

摘要

目的: 分析18岁以下青少年肝病患者肝脏切除的相关因素。

方法: 对2004-06/2007-03在我中心接受手术的23例18岁以下青少年肝脏疾病患者的病因学, 手术方式, 相关情况进行分析, 以明确该年龄组肝脏切除的相关规律。

结果: 23例中, 原发性肝癌6例, 肝母细胞瘤7例, 肝淋巴瘤3例, 肝肉瘤2例, 肝海绵状血管瘤3例, 局灶性结节性增生2例; 行右半肝切除5例, 左半肝切除4例, 右三叶肝切除1例, 肝左叶加尾叶切除2例, 单独尾叶切除1例, 肝段切除10例。手术后平均住院时间 8.3 ± 2.4 d; 手术后7 d肝功能指标恢复至手术前水平21例, 无肝功能衰竭、围手术期死亡病例。

结论: 18岁以下青少年肝脏疾病患者肝脏原发病较为分散, 肝脏储备与代偿功能好, 可以接受极限性肝切除, 手术后并发症少, 手术后恢复快。

关键词: 肝切除; 青少年; 并发症

陈立波, 王国斌. 18岁以下青少年肝病患者肝脏切除23例. *世界华人消化杂志* 2007;15(26):2852-2855

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2852.asp>

0 引言

近年来, 青少年患肝脏疾病行外科手术治疗者明显增加。与成年患者相比, 青少年肝脏疾病的种类不同; 另外青少年由于肝脏再生能力强、手术后恢复时间明显缩短、手术后并发症的发生率较低。我们对2004-2007年在我科接受肝脏切除手术的青少年肝病患者相关情况进行分析, 以初

步明确青少年外科肝脏疾病及治疗的相关特征。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-06/2007-03在本中心接受肝脏手术的18岁以下肝脏疾病患者23例, 占同期接受肝脏手术患者的5.68%(23/405)。青少年肝病患者年龄8-18(平均年龄16.4)岁, 男10例, 女13例。按病因学分类: 原发性肝癌6例, 其中合并乙型肝炎5例, 肝母细胞瘤7例, 肝淋巴瘤3例, 肝肉瘤2例, 肝海绵状血管瘤3例, 局灶性结节性增生2例, 肿瘤直径5-17(平均直径 8.12 ± 2.47)cm。肝功能按Child-Pugh分级, 23例患者均为A级。选择2006-03/08在我科行手术治疗的肝脏疾病患者109例作为对照, 年龄23-74(平均年龄41.55)岁, 男72例, 女37例, 病因学分类: 肝细胞性肝癌61例, 其中合并肝炎、轻度肝硬化53例, 继发性肝癌2例, 胆管细胞癌19例, 肝脏淋巴瘤2例, 肝脏海绵状血管瘤11例, 肝内胆管结石14例。肝脏恶性肿瘤直径3-31(平均直径大小 9.35 ± 5.1)cm。肝功能A级82例、B级27例。

1.2 方法 对青少年组和成人组肝脏疾病病因学分类、手术方式、输血量、手术后肝功能恢复时间、术后住院时间、并发症发生率等进行对比分析。

2 结果

2.1 青少年组与成年组肝脏疾病病因学差异 青少年病例组中, 恶性肝脏疾病占肝脏疾病的78.26%(18/23), 与成年组肝脏疾病77.06%(84/109)相比无显著差异, 从恶性疾病分类看, 青少年组以肝母细胞瘤最多见(30.43%), 其次为原发性肝癌(21.74%), 肝脏间叶组织性恶性肿瘤如淋巴瘤、肝肉瘤等亦较多见。与成年组相比, 青少年组恶性肝脏疾病的病因较为分散, 肝脏良性肿瘤以海绵状血管瘤和局灶性结节性增生多见。

成年组以原发性肝细胞性肝癌最多见(55.97%), 其次为胆管细胞癌(17.43%), 而肝脏间叶组织肿瘤较为少见, 成年组肝脏良性病变病因与青少年组亦有明显差异, 以肝内胆管结石并发部分肝脏病变最为常见, 占12.84%, 其次为海绵状血管瘤。

2.2 肝脏切除的相关分析 青少年组中行右半肝切除5例, 左半肝切除4例, 右三叶肝切除1例, 肝左叶+尾叶切除2例, 单纯尾叶切除1例, 肝段切除10例; 术中全部行选择性、超选择性出入肝

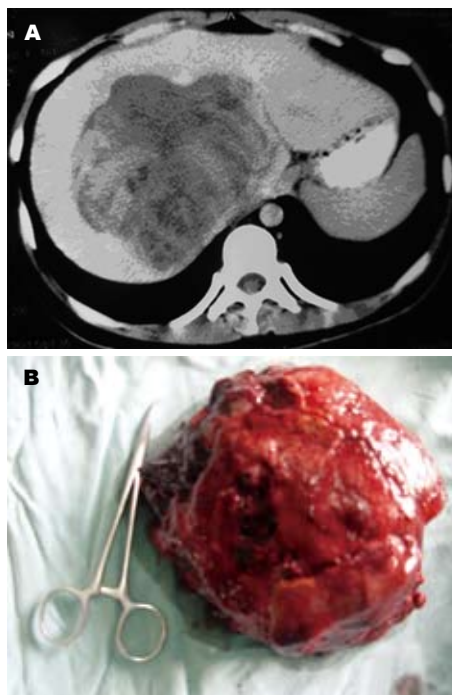


图1 青少年肝病患者尾叶切除的巨大肿瘤。A: 肝尾叶巨大肿瘤(13 cm × 13 cm); B: 切除巨大肝肿瘤(肉瘤)。

血管阻断15例, 余8例未阻断血管, 无第一肝门阻断; 术中未输血19例, 4例输血患者为右半肝切除1例、右三叶切除1例, 肝左叶+尾叶切除2例。3例输血量400-600 mL, 1例尾叶13 cm肿瘤患者行尾叶+左半肝切除术中输血4500 mL(图1)。

成年组行右半肝切除25例, 左半肝切除18例, 尾叶切除4例, 右三叶切除3例, 左外叶肝切除15例, 肝段、联合肝段切除28例, 肝脏局部切除16例, 合并脾切除11例; 行第一肝门间断阻断31例, 平均阻断时间23 min; 选择性、超选择性出入肝血管阻断43例; 术中接受输血者48例, 输血量400-2200 mL。

青少年组手术后住院时间7-10(平均住院时间 8.3 ± 2.4)d; 手术后7 d肝功能指标恢复至术前水平21例(91.3%), 无肝功能衰竭, 无围手术期相关死亡病例。成年组手术后住院时间8-24(平均住院时间 14.7 ± 4.5)d; 术后7 d肝功能恢复至术前水平者48例(47.44%), I-II级肝性脑病者8例, 胸腔、腹腔中度以上积液13例(11.93%), 腹腔感染2例, 胆漏1例, 切口愈合延迟4例, 总并发症发生率为18.35%, 围手术期死亡2例, 死亡原因为肝功能衰竭。

3 讨论

肝脏肿瘤在青少年中属于罕见疾病, 但近年来

■ 相关报道

对青少年组肝脏疾病发病和诊疗规律的相关研究少, 少数研究认为儿童组肝脏疾病以肝母细胞瘤等较为多见, 儿童组恶性肝脏疾病外科治疗效果差。

■ 应用要点

对青少年外科肝脏疾病的病因学和外科治疗预后、并发症进行总结, 发现青少年肝脏疾病病因较为分散, 肝脏储备功能好, 可以耐受极量肝切除, 术后并发症少, 患者恢复快。

■名词解释

极量肝切除:指健康人可以耐受的最大体积肝切除量。一般认为没有肝病背景的健康肝脏可以耐受75%肝切除,而没有严重并发症的发生。

有高发趋势。青少年组肝脏疾病的病因学和治疗学与成年及儿童患者相比均存在显著差异,因而有必要明确青少年肝脏疾病的特点。我们对近年在我科接受肝切除的青少年肝病患者进行分析,以初步明确该年龄组外科肝脏疾病的相关规律。(1)青少年肝脏肿瘤的病因学特点:非成年人肝脏良恶性肿瘤少见。据国外资料,美国20岁以下原发性肝脏肿瘤年发生率低于3/1 000 000,其中肝脏良性肿瘤少于1/3,主要为血管瘤(海绵状血管瘤、血管内皮瘤)、腺瘤、局灶性结节性增生、间质错构瘤等。20岁以下肝脏恶性肿瘤年发生100-150例,年发生率约为1.6/1 000 000,其中60%为肝母细胞瘤,33%为肝癌,其他为少见肉瘤^[1]。我国尚缺乏相关统计资料,据有关报道,小儿原发肝肿瘤是继肾胚瘤及神经母细胞瘤后第3位常见的腹腔恶性肿瘤,儿童组以肝母细胞瘤最多见^[2-3]。

本组资料中,青少年肝脏原发恶性肿瘤以肝母细胞瘤最为多见。与其他资料不同的是,原发性肝癌也较为常见,这可能与本组患者年龄分布较儿童组大有关。但与成年组、儿童组相比,青少年组恶性肝脏肿瘤病因较为分散,肝母细胞瘤、肝癌、间叶组织恶性肿瘤等都较为多见,成年人少见的肝肉瘤、肝脏淋巴瘤在青少年组中也较为常见,与小儿常见的肝母细胞瘤、血管内皮肉瘤等也有显著差异,说明青少年阶段肝脏肿瘤的发生有其独特的规律。

青少年组原发性肝癌的发生与乙肝病毒感染的关系极为密切,本组中肝癌合并乙肝病毒感染率为83.33%,与成年组肝癌合并乙肝病毒感染率接近。与成年患者不同的是,青少年肝癌合并乙肝病毒感染往往为母婴垂直传播,因而有效乙肝病毒疫苗接种、阻断母婴传播对青少年肝癌的预防有极为重要的意义。由于本组中肝癌病例较少,尚无法比较青少年组肝癌与成年组肝癌生物学的差异性。有文献对35岁以下年龄组肝癌与成年组肝癌生物学特性进行比较,发现青年组肝癌恶性程度高于成年组,表现在青年人弥漫型肝癌高于成年人,门静脉癌栓率高,手术切除率低;青年人肝癌中,HBsAg阳性率显著高于成年人($P<0.05$)。按肝炎→肝硬化→肝癌模式,表明青年人肝癌多数发生于乙肝病毒感染基础;背景肝病严重,预后较差,提示我们青少年肝癌的恶性生物学特性可能更高,预后更差^[4]。某些类型白血病在青少年组的预后明显差于其他年龄组^[5],都提示青少年组肿瘤

发生发展有其独特规律。

肝脏良性疾病的病因在成年组与青少年组亦有较大差别。本组中,成年组良性肝脏疾病依次为肝内胆管结石、肝脏海绵状血管瘤,偶见肝脏腺瘤、脂肪变性、局灶性结节性增生等;而青少年组以海绵状血管瘤、局灶性结节性增生最为常见。小儿肝脏良性肿瘤则以间叶性错构瘤、血管瘤等最为多见^[2]。(2)青少年组肝切除的相关特征:与成年组相比,青少年组肝脏疾病患者接受肝切除手术的安全性明显增加。成年恶性肝脏疾病患者多合并有肝功能异常,部分合并有肝硬化等;而青少年组肝脏疾病往往仅表现为肝脏包块,而不合并肝功能异常或肝脏的弥漫性损害。由于青少年肝脏储备功能强大,肝脏代偿增生能力强,可以耐受极量肝切除,因而对于青少年组肝脏肿瘤患者,只要肿瘤没有肝内外广泛播散、主要血管侵犯,应首选肝切除治疗。青少年组肝脏疾病患者可以耐受70%-80%的极量肝切除,手术后残余肝脏可以迅速代偿,术后并发症少。

本组中最大1例肝脏切除为右三叶切除,术中最多1例肝脏手术输血4500 mL为17岁女性患者,因肝脏尾状叶巨大肿瘤(13 cm×13 cm)行左半肝+尾状叶切除,术中因显露肿瘤困难,先在左半肝出入肝血管阻断下行左半肝切除;由于肿瘤包裹肝中、肝左静脉,行肝中、左静脉切除,肿瘤与肝右静脉紧密黏连,术中小心保留肝右静脉基础上完整切除肿瘤,该患者术后一般情况稳定,肝功能恢复迅速,并在术后7 d治愈出院。

由于青少年组患者的心肺肾等生命器官也具有良好的代偿功能,这类患者手术中主要以维持循环功能的稳定为主要目的,术后较少出现器官功能失代偿等并发症。本组切除病例中,所有病例术后均未出现明显并发症,均于术后1-2 wk顺利出院。对于青少年组肝脏恶性肿瘤,如一期切除有困难,也可以行化疗后再切除。据国外资料报告,术前化疗有助于减少肿瘤体积,提高肿瘤完整切除率^[6-8]。对于恶性肝脏肿瘤,术后定期化疗也有助于提高存活率。与成年组相比,18岁以下组肝癌远期生存率低于成年患者,可能与病情发现较晚、肿瘤恶性程度高^[9-10]有关。本组由于病例数少,随访时间短,尚缺乏相关资料。

尽管缺乏大宗病例资料,本组资料表明,青少年患者肝脏外科疾病的病因与治疗都有其自

身特点, 病因分布较为分散, 肝脏及其他器官储备功能好, 能耐受极量肝切除, 术后并发症少, 患者恢复快, 近期效果满意。

4 参考文献

- 1 Mattei P, 李龙. 小儿外科指南. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 656-658
- 2 王淑琴, 雷宇, 李龙, 黄柳明, 魏征, 柳平. 小儿肝肿瘤的外科治疗. 中华普通外科杂志 2006; 21: 32-34
- 3 Fabre M, Yilmaz F, Buendia MA. Hepatic tumors in childhood: experience on 245 tumors and review of literature. *Ann Pathol* 2004; 24: 536-555
- 4 杜成友, 杨祖奎, 王洪林, 黄平, 王济明, 罗亿治, 刘启富, 马绍华. 青年人肝癌24例分析. 肝胆外科杂志 2000; 8: 176-177
- 5 Couzin J. Oncology. In their prime, and dying of cancer. *Science* 2007; 317: 1160-1162
- 6 Tatekawa Y, Asonuma K, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K. Liver transplantation for biliary atresia associated with malignant hepatic tumors. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 436-439
- 7 Kim DY, Kim KH, Jung SE, Lee SC, Park KW, Kim WK. Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver: combination treatment by surgery and chemotherapy. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1419-1423
- 8 Bisogno G, Pilz T, Perilongo G, Ferrari A, Harms D, Ninfo V, Treuner J, Carli M. Undifferentiated sarcoma of the liver in childhood: a curable disease. *Cancer* 2002; 94: 252-257
- 9 张法标, 王义, 孙延富, 丛文铭, 吴孟超. 儿童与成人肝细胞癌的临床对比分析. 肝胆胰外科杂志 2006; 18: 211-214
- 10 张法标, 王义, 丛文铭, 孙延富, 张树辉, 姚晓平, 吴孟超. 儿童期及青春期肝细胞癌临床病理特点及影响术后生存率的多因素分析. 中华小儿外科杂志 2006; 27: 1-5

■同行评价

本文从病因学, 手术方式以及术后并发症全面的分析了18岁以下青少年肝病患者的肝脏切除情况, 立意新颖, 结构严谨, 讨论充分, 有较强的临床意义。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第三届国际微创外科论坛暨 2007 年天津市 消化内镜学会征文通知

本刊讯 为了跟踪国际发展的最新态势, 加强该领域的交流与合作, 由天津市医学会主办, 天津市南开医院、天津市微创外科中心承办的“第三届国际微创外科论坛暨2007年天津市消化内镜学会”将于2007-11-02/04在天津举办。

本次会议还将邀请澳大利亚、奥地利、日本、香港等国家和地区及国内内镜、腹腔镜领域的知名专家与会, 以专题讲座及操作演示等方式展示当前微创外科(肝胆胰胃肠)领域的最新前沿技术, 其中包括: 大会专题演讲及大会论文交流; 微创手术实况演示; 内镜操作实况演示; 世界级大师精彩手术实况演示; 国家级继续教育项目; 微创手术新技术与新器械; 微创外科手术设备与器械展示。

1 征文内容和要求

征文内容: 凡是与本次会议内容相关的实验研究、临床工作总结、新方法、新技术、新器械等论文, 尚未在全国性学术会议上交流和尚未在国内外正式刊物上发表过的论文。征文要求: 论文、摘要、软盘各一份, 论文字数限4000字以内, 摘要800字以内, 按“目的、方法、结果、结论”。摘要中写明: “题目、作者、单位(包括城市和邮编)。

2 联系方式

邹富胜, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院. 注明会议论文。

腹腔镜和开腹直肠癌保肛手术对机体应激反应的影响

周保军, 张国建, 段国强, 张占学, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉

■背景资料

腹腔镜手术由于其创伤小、恢复快在临床上开展的种类越来越多,同时与其相关的基础研究报道也相应增多,但不同腹腔镜手术对机体的影响不尽相同,本文通过对腹腔镜直肠癌保肛手术和常规开放手术对机体应激反应的影响对比探讨直肠癌保肛微创手术的优势。

周保军, 张国建, 段国强, 张占学, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000
河北医科大学第二医院科研基金资助, No. 2006038
通讯作者: 周保军, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科. zhoubaojun67@hotmail.com
电话: 0311-66002983
收稿日期: 2007-05-23 修回日期: 2007-09-03

Clinical comparison of systemic stress responses between laparoscopic or open anterior resection in rectal cancer patients with anal sphincter preservation

Bao-Jun Zhou, Guo-Jian Zhang, Guo-Qiang Duan, Zhan-Xue Zhang, Qing-Hui Yan, Wei-Qing Song, Jian-Hui Cai

Bao-Jun Zhou, Guo-Jian Zhang, Guo-Qiang Duan, Zhan-Xue Zhang, Qing-Hui Yan, Wei-Qing Song, Jian-Hui Cai, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Supported by: Science and Research Fund of The Second Hospital of Hebei Medical University, No. 2006038

Correspondence to: Bao-Jun Zhou, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhoubaojun67@hotmail.com

Received: 2007-05-23 Revised: 2007-09-03

Abstract

AIM: To compare systemic stress responses after laparoscopic and open anterior resection for rectal cancer patients with anal sphincter preservation to ascertain if the laparoscopic approach causes less stress than an open operation.

METHODS: Seventy-six patients seen from December 2004 to April 2007 were randomized into laparoscopic (36 patients) and open anterior resection (35 patients) groups. Body temperature, white blood cell (WBC) count, and plasma levels of cortisol (COR), interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) were measured before and after surgery. Visual analogue scale (VAS) scores were also recorded after operation.

RESULTS: Body temperature, WBC counts ($\times 10^9/L$), COR and IL-6, measured on the first postoperative day, showed significant differences between the laparoscopic and open groups ($37.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ vs $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$; 11.02 ± 2.53 vs 12.66 ± 2.93 ; 745 ± 159 nmol/L vs 998 ± 148 nmol/L; and 33.61 ± 6.15 ng/L vs 50.31 ± 10.83 ng/L; respectively, $P < 0.01$). However, there were no significant differences between the two groups before surgery and on the third and fifth days postoperatively ($P > 0.05$). The postoperative plasma levels of the CRP and VAS scores were significantly decreased in the laparoscopic group compared to the open group on the first, third and fifth days postoperatively (7.05 ± 2.08 mg/L vs 124.8 ± 31.2 mg/L, 10.43 ± 1.29 mg/L vs 156.2 ± 36.0 mg/L, and 5.68 ± 2.35 mg/L vs 85.3 ± 30.9 mg/L, $P < 0.01$; and 5.2 ± 2.0 vs 9.2 ± 2.8 , 2.7 ± 1.2 vs 4.6 ± 1.9 , and 1.6 ± 1.1 vs 2.2 ± 1.3 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: These findings suggest that there is less systemic stress response after laparoscopic anterior resection than after open anterior resection for rectal cancer patients with anal sphincter preservation.

Key Words: Laparoscopy; Rectal cancer; Stress response

Zhou BJ, Zhang GJ, Duan GQ, Zhang ZX, Yan QH, Song WQ, Cai JH. Clinical comparison of systemic stress responses between laparoscopic or open anterior resection in rectal cancer patients with anal sphincter preservation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2856-2859

摘要

目的: 探讨腹腔镜和开腹直肠癌保肛手术对机体应激反应的影响。

方法: 前瞻性随机选取2004-12/2007-04可行保肛手术直肠癌患者76例,随机分为腹腔镜手术组A(36例)和开腹手术组B(35例)进行手术,分别对两组患者术前、术后体温、白细胞计数、皮质醇(COR)、C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)以及术后疼痛视觉模拟评分(VAS)情况进行比较。

结果: A与B组相比, 术后1 d体温变化($37.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ vs $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$)、WBC计数 $\times 10^9/\text{L}$ (11.02 ± 2.53 vs 12.66 ± 2.93)、COR(745 ± 159 nmol/L vs 998 ± 148 nmol/L)、IL-6(33.61 ± 6.15 ng/L vs 50.31 ± 10.83 ng/L)均存在显著性差异($P < 0.01$), 术后1 d、3 d、5 d VAS, CRP测定结果A组与B组相比均存在显著性差异(5.2 ± 2.0 vs 9.2 ± 2.8 , 2.7 ± 1.2 vs 4.6 ± 1.9 , 1.6 ± 1.1 vs 2.2 ± 1.3 , $P < 0.05$; 7.05 ± 2.08 mg/L vs 124.8 ± 31.2 mg/L, 10.43 ± 1.29 mg/L vs 156.2 ± 36.0 mg/L, 5.68 ± 2.35 mg/L vs 85.3 ± 30.9 mg/L, $P < 0.01$), 术前1 d CRP测定结果A组与B组相比也存在显著性差异(0.29 ± 0.30 mg/L vs 2.5 ± 2.4 mg/L)。

结论: 腹腔镜直肠癌保肛术对机体应激反应的影响明显小于常规开腹组, 显示了微创的优越性。

关键词: 腹腔镜; 直肠癌; 应激反应

周保军, 张国建, 段国强, 张占学, 闫庆辉, 宋伟庆, 蔡建辉. 腹腔镜和开腹直肠癌保肛手术对机体应激反应的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2856-2859

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2856.asp>

0 引言

随着科学技术的发展和腹腔镜技术的提高, 腹腔镜结直肠手术成为日益成熟的手术方法, 因其创伤小、痛苦少、恢复快等优势在临床的应用越来越广泛, 同时与之相关的基础研究已逐渐成为人们关注的焦点. 本研究通过观察腹腔镜和常规直肠癌保肛手术患者不同时期C-反应蛋白(CRP)、皮质醇(COR)、白细胞介素-6(IL-6)、疼痛视觉模拟评分(VAS)、白细胞(WBC)计数及体温的变化, 说明不同手术方式对机体应激反应的影响, 探讨腹腔镜下直肠癌保肛手术的优越性。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2004-12/2007-04直肠癌患者76例, 入选标准: 直肠癌诊断明确非急诊手术患者、肿瘤下缘距肛缘5 cm以上, 术前检查无肝脏等远隔器官转移, 适合行保肛手术. 将患者随机分为A组(腹腔镜手术组)和B组(开腹手术组). 剔除标准: 术前新辅助治疗患者、术中探查肿瘤累及膀胱、子宫或盆腔内广泛转移不能行根治性手术和术后发生吻合口瘘的患者. 其中A组有2例患者、B组有3例患者由于以上原因被剔除. 全组患

者共71例, 其中A组36例, B组35例. A组患者男19例, 女17例, 年龄17-80(平均56)岁. B组患者男16例, 女19例, 年龄19-79(平均年龄55)岁. 根据术后病理结果进行Dukes分期, A期、B期、C1期、C2期, 腹腔镜手术组中患者分别对应为2、17、10、7例; 开腹手术组分别为2、15、12、6例; 两组患者在性别、年龄及临床病理分期等统计学上均无明显差异。

1.2 方法 两组分别采用腹腔镜直肠前切除或开腹直肠前切除进行直肠癌保肛手术. 术前和术后1、3、5 d分别测定患者体温, 3次/d, 取平均值. 于术后1、3、5 d对患者的疼痛情况进行评估, 采用视觉模拟评分法(visual analogue scales, VAS): “0”代表无痛, “10”代表最剧烈的疼痛. 两组患者分别于术前1 d, 术后1、3、5 d清晨6时采集外周静脉血8 mL, 分别测定WBC、C-反应蛋白(CRP)和皮质醇(COR), 采用酶联免疫法(ELISA)测定IL-6水平。

统计学处理 数据处理采用SPSS13.0统计软件包, 均数表达为mean $\pm$ SD, 用 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两组患者术前、术后体温、WBC、VAS测定结果比较 两组患者术前、术后3、5 d体温变化、WBC计数相比较均无显著性差异($P > 0.05$); 术后1 d体温变化、WBC计数, 术后1、3、5 d视觉模拟评分(VAS)测定结果两组均存在显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$, 表1)。

2.2 两组患者术前、术后COR、CRP、IL-6测定结果比较 术前和术后3 d、5 d测定COR、IL-6, 结果表明两组之间无显著性差异($P > 0.05$), 而术后1 d测定COR、IL-6结果显示两组之间存在显著性差异($P < 0.01$). 术前和术后1、3、5 d测定CRP两组结果之间均存在显著性差异($P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

任何手术方式对机体都存在一定程度的创伤, 腹腔镜手术比常规手术减少了对机体的创伤, 具有术后疼痛轻, 恢复快、并发症少、住院时间短等优点^[1-2]. 相关研究表明腹腔镜结直肠手术不但在肿瘤切除的范围以及淋巴结清除数量上与开腹手术相同, 能够达到根治术的要求^[3-4], 而且腹腔镜结直肠手术对机体免疫功能的影响同开腹手术比较没有显著性差异^[5]. 伴随着腹腔镜器械的发展和手术技术的不断提高, 腹腔

■创新盘点

本文通过分别对WBC、C-反应蛋白(CRP)和皮质醇(COR), IL-6水平等指标的测定发现腹腔镜直肠癌保肛手术对机体应激状态的影响明显小于常规开放性手术。

■应用要点

本研究表明腹腔镜直肠癌保肛手术对机体应激状态的影响明显小于常规开放性手术,为开展腹腔镜直肠癌保肛手术提供理论支持。

表 1 两组患者术前、术后体温、WBC、VAS测定结果比较(mean ± SD)

测定时间	体温(°C)		白细胞计数(WBC × 10 ⁹ /L)		视觉模拟评分(VAS)	
	A(n = 36)	B(n = 35)	A(n = 36)	B(n = 35)	A(n = 36)	B(n = 35)
术前1 d	36.5 ± 0.2	36.4 ± 0.3	5.64 ± 1.16	5.83 ± 1.46	—	—
术后1 d	37.3 ± 0.3	37.5 ± 0.2 ^b	11.02 ± 2.53	12.66 ± 2.93 ^b	5.2 ± 2.0	9.2 ± 2.8 ^b
术后3 d	37.1 ± 0.2	37.2 ± 0.3	8.93 ± 2.08	9.43 ± 2.65	2.7 ± 1.2	4.6 ± 1.9 ^b
术后5 d	36.8 ± 0.2	36.7 ± 0.2	5.91 ± 1.32	6.21 ± 1.56	1.6 ± 1.1	2.2 ± 1.3 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs A.

表 2 两组患者术前、术后COR、CRP、IL-6测定结果比较(mean ± SD)

测定时间	皮质醇(nmol/L)		C-反应蛋白(mg/L)		白细胞介素-6(ng/L)	
	A(n = 36)	B(n = 35)	A(n = 36)	B(n = 35)	A(n = 36)	B(n = 35)
术前1 d	533 ± 138	513 ± 112	0.29 ± 0.30	2.5 ± 2.4	5.08 ± 1.67	4.89 ± 1.37
术后1 d	745 ± 159	998 ± 148 ^b	7.05 ± 2.08	124.8 ± 31.2 ^b	33.61 ± 6.15	50.31 ± 10.83 ^b
术后3 d	561 ± 151	583 ± 134	10.43 ± 1.29	156.2 ± 36.0 ^b	11.03 ± 5.61	13.36 ± 7.32
术后5 d	549 ± 108	562 ± 109	5.68 ± 2.35	85.3 ± 30.9 ^b	6.39 ± 2.81	8.12 ± 3.05

^bP<0.01 vs A.

镜结直肠癌手术得到了推广和发展,成为日益成熟的手术方式。

手术创伤首先会造成机体的应激反应,除造成局部疼痛外,还会使巨噬细胞系统释放和激活细胞因子,刺激下丘脑体温调节中枢,引起神经内分泌变化的改变而导致发热反应、血白细胞增多等。同时手术还会造成的组织损伤、坏死刺激骨髓中白细胞的释放,使外周血中计数明显升高。创伤所致的炎症反应可引起体温和血WBC水平升高,两者对手术对机体的应激反应影响的估计和预后判断均有参考价值^[6]。本研究表明手术后1 d两组患者体温、WBC明显高于术前水平,但腹腔镜手术组体温及WBC明显低于常规开腹手术组,提示腹腔镜直肠癌保肛手术引起的机体应激反应较常规开腹手术轻微,此结果同国外文献报告相似^[7]。另外,疼痛程度也是反映机体应激状况的指标之一,疼痛程度同创伤程度成正比,本研究结果显示术后腹腔镜手术组视觉模拟评分(VAS)明显低于常规开腹手术组,从另一个角度说明腹腔镜直肠癌保肛手术比常规开腹手术对机体的应激反应影响较小。

手术创伤可引起下丘脑-垂体-肾上腺皮质激素轴反应并涉及到2种重要的应激激素:促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇,两者在各种应

激后均增高,尤以后者更为明显,其升高幅度和持续时间与手术创伤的大小成正比,其高峰期多出现在术后第1天,因而临床上常将其作为判断创伤反应强度的主要指标。本研究结果显示腹腔镜和开腹直肠癌保肛手术均可以引起血浆中皮质醇浓度的明显升高,但术后第1天腹腔镜组患者的皮质醇浓度明显低于开腹手术患者,这同国外学者的研究结果一致^[8-10]。同时研究发现术后第3、5天两组患者皮质醇浓度无明显差异,说明腹腔镜组皮质醇反应较开腹组轻微,但血浆中皮质醇的浓度维持时间短,回落快。

手术创伤可以刺激机体细胞产生一系列细胞内信息转导和相关基因的激活,表达相应的蛋白质,如多种急性期反应蛋白、细胞因子等。相关研究表明,手术后血清中白细胞介素6(IL-6)、C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)等相关应激因子水平与手术损伤大小呈正相关,可较敏感地反映组织损伤程度,其中CRP的升高与创伤应激程度比较密切。CRP由肝脏合成,在应激状态下可以明显升高,其含量与所受到的创伤成正比,创伤越严重,血CRP的升高越明显。CRP是一种敏感的指标,分析CRP浓度,是证明创伤程度较为理想的方法之一。外周血中IL-6在手术或创伤的早期则有表达,而且是最敏感的组织损伤标记物,他是一种具有多功

能的细胞因子, 主要由T细胞、B细胞、单核巨噬细胞以及造血循环中的基质细胞分泌, 其对手术创伤的急性期起重要作用, 与手术创伤程度密切相关^[11-12]. 本研究显示常规开腹手术组术后CRP浓度明显高于腹腔镜手术组($P<0.01$), 虽然术后3、5 d两组患者血浆中IL-6浓度相比无明显差别, 但是术后1 d常规开腹手术组的IL-6浓度明显高于腹腔镜手术组($P<0.01$), 说明两种手术方式均对机体应激反应造成一定影响, 常规开腹手术组的影响更大, 但均在短时间内恢复.

总之, 腹腔镜直肠癌保肛手术与常规开腹手术比较其机体的应激反应轻, 显示了腹腔镜手术微创的优越性.

4 参考文献

- 1 Luo K, Li JS, Li LT, Wang KH, Shun JM. Operative stress response and energy metabolism after laparoscopic cholecystectomy compared to open surgery. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 847-850
- 2 Haque Z, Rahman M, Siddique MA, Roy RK, Chowdhury RA, Rahman MM, Rabbi MA. Metabolic and stress responses of the body to trauma: produced by the laparoscopic and open cholecystectomy. *Mymensingh Med J* 2004; 13: 48-52
- 3 周保军, 宋伟庆, 闫庆辉, 蔡建辉, 刘津, 张国建, 段国强, 任鹏涛. 腹腔镜与开腹直肠癌保肛手术的临床对比研究. *中国内镜杂志* 2007; 13: 229-234
- 4 Nakamura T, Mitomi H, Ohtani Y, Kokuba Y, Sato T, Ozawa H, Ihara A, Watanabe M. Comparison of long-term outcome of laparoscopic and conventional surgery for advanced colon and rectosigmoid cancer. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 351-353
- 5 Tang CL, Eu KW, Tai BC, Soh JG, MacHin D, Seow-Choen F. Randomized clinical trial of the effect of open versus laparoscopically assisted colectomy on systemic immunity in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 801-807
- 6 Jakeways MS, Mitchell V, Hashim IA, Chadwick SJ, Shenkin A, Green CJ, Carli F. Metabolic and inflammatory responses after open or laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* 1994; 81: 127-131
- 7 Nishiguchi K, Okuda J, Toyoda M, Tanaka K, Tanigawa N. Comparative evaluation of surgical stress of laparoscopic and open surgeries for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 223-230
- 8 Lattermann R, Schricker T, Wachter U, Georgieff M, Schreiber M. Laparoscopic-assisted vaginal hysterectomy and the hyperglycemic response to surgery: an observational study. *Can J Anaesth* 2001; 48: 871-875
- 9 Crema E, Ribeiro EN, Hial AM, Alves Junior JT, Pastore R, Silva AA. Evaluation of the response of cortisol, corticotropin and blood platelets kinetics after laparoscopic and open cholecystectomy. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 364-367
- 10 Uzunkoy A, Coskun A, Akinci OF, Kocyigit A. Systemic stress responses after laparoscopic or open hernia repair. *Eur J Surg* 2000; 166: 467-471
- 11 Haq Z, Rahman M, Siddique MA, Roy RK, Rahman AM, Khatun M. Interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor-alpha in open and laparoscopic cholecystectomy. *Mymensingh Med J* 2004; 13: 153-156
- 12 Almagor M, Mintz A, Sibirsky O, Durst A. Preoperative and postoperative levels of interleukin-6 in patients with acute appendicitis: comparison between open and laparoscopic appendectomy. *Surg Endosc* 2005; 19: 331-333

■同行评价

本文通过前瞻性随机研究探讨腹腔镜和开腹直肠癌保肛手术对机体应激反应的影响, 结果证实了腹腔镜手术在这方面的优越性, 设计合理, 数据可信, 有一定的临床意义.

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知

本刊讯 为促进消化内镜诊治技术的发展和学术交流, 由中华消化内镜学会、黑龙江省医学会、黑龙江省医院、黑龙江省临床消化病研究所联合举办的第四届全国消化内镜学术会议定于2007-12-22/23在哈尔滨召开. 大会将邀请国内外著名专家作消化内镜进展方面专题报告及内镜演示, 并制定中华消化内镜学会消化内镜消毒指南(讨论稿). 欢迎消化届同仁积极投稿及参与, 参会代表授予国家继续教育 I 类学分.

1 投稿要求

论著要求800字以内摘要(目的、方法、结果、结论), 电脑打印(WORD格式), 网上投稿. 截稿时间: 2007-10-31.

2 联系方式

朱春兰, 150001, 哈尔滨和平邨宾馆(中山路171号), 哈尔滨市果戈里大街405号, 黑龙江省医院, 电话: 13845048249或0451-88025055, 传真: 0451-53625617, E-mail: zhuchulan@medmail.com.cn

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈克能 主任医师
北京大学临床肿瘤学院暨北京肿瘤医院胸一科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈亚军 教授
首都医科大学附属北京儿童医院普外科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

葛海燕 教授
同济大学附属第十人民医院普通外科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

何振平 教授
第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

胡和平 教授
第二军医大学附属东方肝胆医院消化科

季加孚 教授
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

王蒙 副教授
第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

魏经国 教授
第四军医大学唐都医院放射科

吴君 主任医师
贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

徐智 教授
北京大学第三医院外科

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

周丁华 主任医师
解放军二炮总医院普外科

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科

周晓武 副主任医师
解放军空军总医院普通外科

朱春兰 主任医师
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科