ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

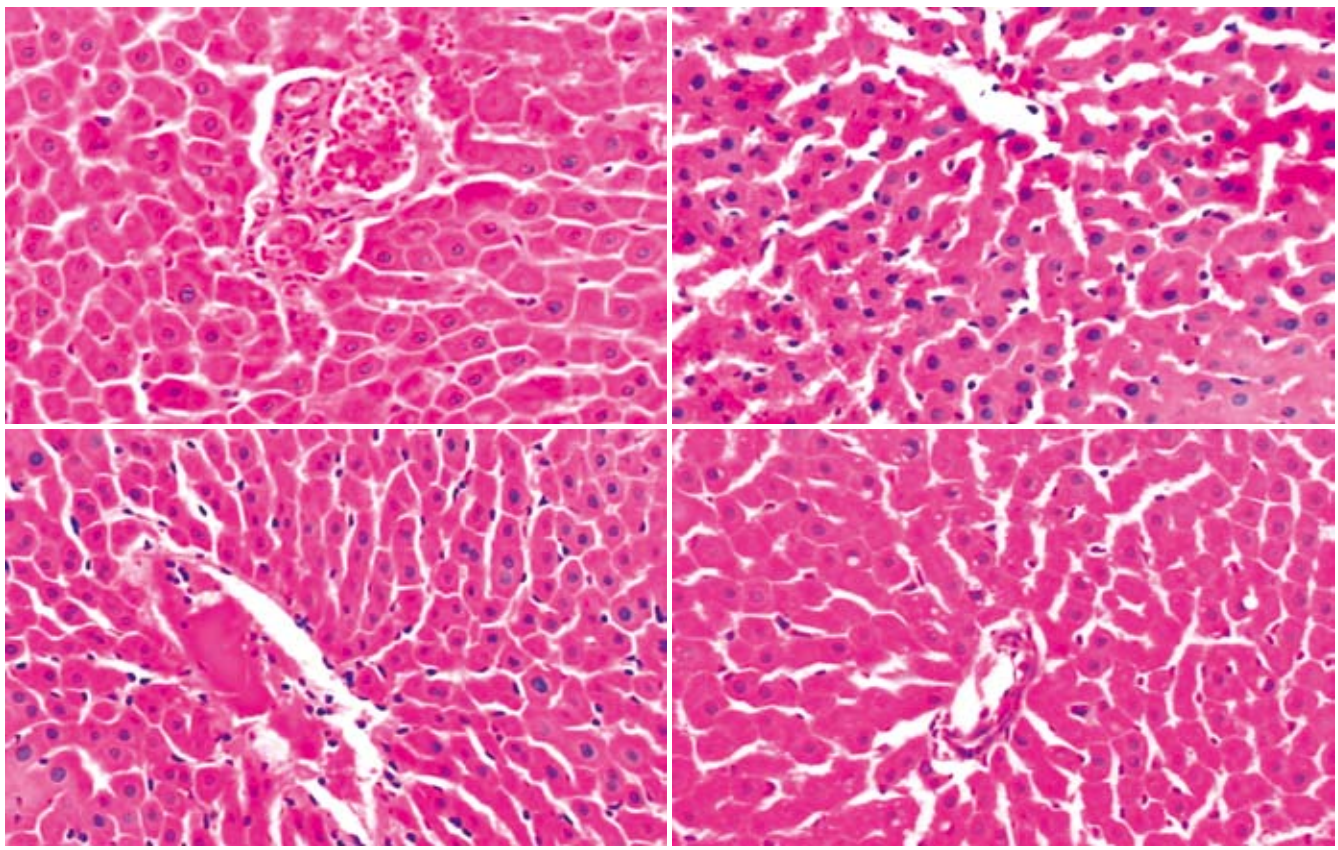
2010 年 4 月 8 日　第 18 卷　第 10 期　(Volume 18 Number 10)

www.wjgnet.com

二零一零年四月八日

第十八卷

第十期



10 / 2010

ISSN 1009-3079

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，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》和俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31
wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
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

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
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
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
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
苌新明教授
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田字彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凛教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授
李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邰升副教授
汤恢焕教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔•夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师
沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赖宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2010 年 4 月 8 日　第 18 卷　第 10 期　(总第306期)

述　评

971 侧群细胞与肝癌干细胞
强光辉, 余德才, 江春平

基础研究

975 中药单体氢溴酸槟榔碱对糖尿病胃轻瘫大鼠胃动力的影响
张新华, 高峰, 严祥, 陈明, 刘纯

981 紧密连接蛋白Occludin在非酒精性脂肪肝大鼠肠上皮细胞中的表达及其与TNF-α的关系
许腊梅, 孙丹莉, 张予蜀, 张振玉, 李晓翠

987 姜黄素对大鼠肝缺血再灌注早期肝组织一氧化氮表达的影响
向进见, 田夫, 李文岗, 李明忠, 蒋雪峰, 程本静

993 干细胞因子对糖尿病小鼠小肠平滑肌细胞慢波的影响
杨琰, 余跃, 高显奎, 陈军, 王巧民

临床研究

998 GAGE-7自身抗体在食管鳞状细胞癌中的表达
王皓, 钟理, 徐家馨, 张小刚, 王建飞

1004 Kiss-1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床病理意义
赵志华, 陈妍琼, 高冬玲, 张岚, 张蕾

1010 CDK5在肝细胞癌中的异常表达
董贾中, 杨玉秀, 白杨秋, 张立达

文献综述

1016 丙型肝炎病毒蛋白在转基因模型中的作用机制研究进展
焦健, 王江滨, 赵平

1021 内质网应激与肝损伤研究进展
钟卫卫, 林世德

1026 hTERT表达的表观遗传调控研究进展
李伟, 陶凯雄

研究快报

1032 复方中药安胃汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠TGF-α、COX-2 mRNA表达的影响
韦维, 林寿宁, 黄贵华, 朱永革, 万小刚, 刘伟峰, 朱光辉, 张倩

1037 衣霉素诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡
邢俊丽, 冯若, 李海春, 王亚强, 许培仁, 张钦宪

1041 HBV复制子pHY106-BHBV转染HepG2细胞基因表达差异
赵凤林, 崔长青, 张锦前, 魏红山

1046 *N*-乙酰半胱氨酸对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的抑制作用
刘石龙, 廖雯俊, 邬林泉

1051 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠NF-κB活性、NF-κB及TNF-α mRNA表达的影响
张超贤, 郭晓凤, 秦咏梅

临床经验

1056 中医药治疗慢性萎缩性胃炎的系统评价
黄宣, 吕宾

1063 洛铂联合5-氟尿嘧啶与甲酰四氢叶酸治疗晚期胃癌30例
杨升, 卢辉山, 张祥福, 黄昌明, 王川, 吴心愿, 官国先

1067 内镜胆道内支架引流治疗伴肝脏转移的胰头癌16例
赵志峰, 麻树人, 张宁, 杨卓, 韩笑, 赵云峰, 高飞, 宫照杰, 杨琳
1071 急性肠系膜动脉性缺血26例
顾全凯, 王军, 张宝良, 袁庆鑫

附　　录

1074 《世界华人消化杂志》投稿须知
1079 2010年国内国际会议预告

志　　谢

1080 志谢世界华人消化杂志编委

消　　息

986 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务
992 *WJG*成功通过评审被PMC收录
997 《世界华人消化杂志》出版流程
1003 汤姆森–路透公布2008年*WJG*影响因子2.081
1020 《世界华人消化杂志》修回稿须知
1025 《世界华人消化杂志》栏目设置
1031 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729
1036 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》
1040 《世界华人消化杂志》正文要求
1045 《世界华人消化杂志》计量单位标准
1050 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序
1055 《世界华人消化杂志》外文字符标准
1073 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

封面故事

向进见, 田夫, 李文岗, 李明忠, 蒋雪峰, 程本静. 姜黄素对大鼠肝缺血再灌注早期肝组织一氧化氮表达的影响.
世界华人消化杂志 2010; 18(10): 987-992
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/987.asp

本期责任人

编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮;
形式规范 马连生

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2010-04-08
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 李军亮
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 太原消化病研治中心

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

世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊，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》和俄罗斯《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://www.baishideng.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.

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.

2010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56.00元 全年2016.00元　广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

April 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 10

EDITORIAL

971 Side population cells and liver cancer stem cells
Qiang GH, Yu DC, Jiang CP

BASIC RESEARCH

975 Traditional Chinese medicine monomer arecoline promotes gastric motility in diabetic gastroparesis rats
Zhang XH, Gao F, Yan X, Chen M, Liu C

981 Relationship between occludin expression in intestinal epithelial cells and tumor necrosis factor-α level in rats with nonalcoholic fatty liver disease
Xu LM, Sun DL, Zhang YS, Zhang ZY, Li XC

987 Curcumin reduces hepatic nitric oxide production in early-stage ischemia/reperfusion in rats
Xiang JJ, Tian F, Li WG, Li MZ, Jiang XF, Cheng BJ

993 Effects of stem cell factor on the slow waves in intestinal smooth muscle of diabetic mice
Yang Y, Yu Y, Gao XK, Chen J, Wang QM

CLINICAL RESEARCH

998 Detection of serum autoantibody against GAGE-7 in patients with esophageal squamous cell carcinoma
Wang H, Zhong L, Xu JX, Zhang XG, Wang JF

1004 Clinicopathological significance of Kiss-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma
Zhao ZH, Chen YQ, Gao DL, Zhang L, Zhang L

1010 Abnormal expression of cyclin-dependent kinase 5 in hepatocellular carcinoma
Dong JZ, Yang YX, Bai YQ, Zhang LD

REVIEW

1016 Advances in understanding the role of HCV proteins in the pathogenesis of HCV-induced liver diseases in animal models
Jiao J, Wang JB, Zhao P

1021 Role of endoplasmic reticulum stress in hepatocytes in the pathogenesis of liver injury
Zhong WW, Lin SD

1026 Advances in research of the epigenetic regulation of hTERT expression
Li W, Tao KX

RAPID COMMUNICATION

1032 Anwei Decoction up-regulates TGF-α mRNA expression but down-regulates COX-2 mRNA expression in the gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis
Wei W, Lin SN, Huang GH, Zhu YP, Wan XG, Liu WF, Zhu GH, Zhang Q

1037 Tunicamycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823
Xing JL, Feng R, Li HC, Wang YQ, Xu PR, Zhang QX

1041 Differential gene expression profiling of HepG2 cells transfected with a hepatitis B virus replicon
Zhao FL, Cui CQ, Zhang JQ, Wei HS

1046 *N*-acetylcysteine protects against liver injury in rats with severe acute pancreatitis
Liu SL, Liao WJ, Wu LQ

1051 Huangqi Injection reduces NF-κB activity and down-regulates TNF-α mRNA expression in rats with acute pancreatitis
Zhang CX, Guo XF, Qin YM

CLINICAL PRACTICE

1056 Treatment of chronic atrophic gastritis with Chinese medicines: a systematic review
Huang X, Lv B

1063 Efficacy of lobaplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced gastric cancer: a report of 30 cases
Yang S, Lu HS, Zhang XF, Huang CM, Wang C, Wu XY, Guan GX

1067 Endoscopic biliary drainage by stent placement for carcinoma of the head of the pancreas with hepatic metastasis: a report of 16 cases
Zhao ZF, Ma SR, Zhang N, Yang Z, Han X, Zhao YF, Gao F, Gong ZJ, Yang L

1071 Diagnosis and treatment of acute mesenteric artery ischemia: an analysis of 26 cases
Gu QK, Wang J, Zhang BL, Yuan QX

APPENDIX

1074 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

1079 Meeting events calendar in 2010

ACKNOWLEDGMENT

1080 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Xiang JJ, Tian F, Li WG, Li MZ, Jiang XF, Cheng BJ. Curcumin reduces hepatic nitric oxide production in early-stage ischemia/reperfusion in rats.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 987-992
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/987.asp

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiao-Fang Liu* Review Editor: *Jun-Liang Li* Electronic Page Editor: *Ji-Cai He*
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Jun-Liang Li* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 April 8, 2010

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@wjgnet.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@wjgnet.com
http://www.wjgnet.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
Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION
RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT
© 2010 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 © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 971-974
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

侧群细胞与肝癌干细胞

强光辉, 余德才, 江春平

强光辉, 余德才, 江春平, 南京医科大学附属鼓楼临床医学院肝胆外科 江苏省南京市 210008
江春平, 南京大学附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
江春平, 教授, 主任医师, 主要从事消化系统恶性肿瘤综合治疗领域的研究.
江苏省南京市卫生局科技发展基金资助项目, No. ZKX08025
作者贡献分布: 本文综述由强光辉完成, 余德才修改, 江春平审校.
通讯作者: 江春平, 教授, 210008, 江苏省南京市, 南京大学附属鼓楼医院肝胆外科. chunpingjiang@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-01-06 修回日期: 2010-03-08
接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-08

Side population cells and liver cancer stem cells

Guang-Hui Qiang, De-Cai Yu, Chun-Ping Jiang

Guang-Hui Qiang, De-Cai Yu, Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by: the Science Foundation of Nanjing City, No. ZKX08025
Correspondence to: Professor Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. chunpingjiang@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-06 Revised: 2010-03-08
Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-08

Abstract
Liver cancer is a life-threatening disease whose etiology and pathogenesis remain unclear now. No effective therapeutic targets for the disease have been found. Recent studies suggest that a small population of cells having the potential of self-renewal and differentiation in tumors may be the source of tumor metastasis and recurrence. Liver cancer stem cells may also exist. The side population (SP) cells, a small population of tumor cells, have many properties of stem cells and are easy to isolate. Identification and isolation of SP cells in liver cancer may help us find liver cancer stem cells, elucidate the mechanisms behind the metastasis and recurrence of liver cancer, and provide an efficient target for therapy of liver cancer.

Key Words: Side population cell; Liver cancer; Stem cell

Qiang GH, Yu DC, Jiang CP. Side population cells and liver cancer stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 971-974

摘要
肝癌是严重威胁人类生命和健康的一种疾病. 其病因和发病机制尚不完全清楚, 治疗缺少有效靶点. 对肝癌恶性生长、转移及复发机制的研究正在逐渐深入. 近年来的研究认为, 肿瘤中存在一小群具有自我更新和分化潜能的细胞, 即肿瘤干细胞, 可能是肿瘤转移和复发的根源. 肝癌中应同样存在这样的一群细胞. 侧群(side population, SP)细胞是肿瘤细胞中一小部分, 具备干细胞的多种特性且易于分离. 肝癌组织中SP细胞的鉴定和分离有可能找到肝癌干细胞, 有助于肝癌的转移和复发机制的研究, 并为肝癌治疗提供有效治疗靶点.

关键词: 侧群细胞; 肝癌; 干细胞

强光辉, 余德才, 江春平. 侧群细胞与肝癌干细胞. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 971-974
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/971.asp

0 引言
肿瘤干细胞假说最先在血液肿瘤中被提出. 在急性单核细胞白血病中$CD34^+$和$CD38^-$细胞富含具有肿瘤开始能力的细胞[1,2], 被认为是肿瘤干细胞-肿瘤生长、转移和复发的根源. 随着研究的进展, 人们在脑肿瘤[3]、结肠癌[4]和乳腺癌[5]等实体肿瘤中均发现肿瘤干细胞的存在. 肝癌作为常见的一种恶性肿瘤, 是否存在肝癌干细胞备受人们关注. 在一些实体肿瘤中人们使用一些特异性表面标志物鉴别肿瘤干细胞, 不同类型的肿瘤可能存在不同的肿瘤干细胞标志. 在肝癌中人们尝试使用CD133、CD90等表面标志来鉴别肝癌干细胞, 但都不是理想的特异性表面标志物. 研究发现在一些肿瘤组织包括肝癌组织中存在侧群(side population, SP)细胞, 其具有类似于干细胞的特性. 因此人们认为SP细胞至少组成了肝癌干细胞的一部分, SP细胞的发现为肿瘤干

■背景资料
肝癌作为常见的一种恶性肿瘤, 是否存在肝癌干细胞备受人们关注. 在一些实体肿瘤中人们使用一些特异性表面标志物鉴别肿瘤干细胞, 不同类型的肿瘤可能存在不同的肿瘤干细胞标志. 在肝癌中人们尝试使用CD133、CD90等表面标志来鉴别肝癌干细胞, 但都不是理想的特异性表面标志物. 研究发现在一些肿瘤组织包括肝癌组织中存在侧群(SP)细胞, 其具有类似于干细胞的特性. 因此人们认为SP细胞至少组成了肝癌干细胞的一部分, SP细胞的发现为肿瘤干细胞的鉴别和分离提供了一种新方法.

■同行评议者
余宏宇, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科

■研发前沿
如何分离纯化肿瘤干细胞是一个亟待解决的问题，在肝癌中目前仍没有发现一个高特异性和敏感性表面标志物.

细胞的鉴别和分离提供了一种新方法.

1 SP细胞

Goodell等[6]在用Hoechst33342荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时，发现极少数的细胞能将此荧光染料排出，表现为细胞核不着色或着色程度很低，且这群细胞在流式二维分析点阵图上呈彗星状分布在细胞主群的一侧，因此将这群细胞称为SP细胞. 自从小鼠骨髓中SP细胞发现以后，学者们已经在多种组织中鉴别出了SP细胞，包括皮肤、肺、肝脏、心脏、脑、乳腺以及骨骼肌等组织[7]. 在正常组织中，这些细胞高水平表达干细胞相似基因以及具有多向分化潜能. 因此，他们被认为具有干细胞相似的特性.

2 SP细胞的特性

SP细胞的研究在逐步深入，人们发现SP细胞存在于多种组织中. 他们仅占细胞总群的一小部分，并具有许多类似于干细胞的特性. 在细胞周期中相对静止是干细胞的一个重要特性[8]，研究发现多种肿瘤细胞株中SP细胞处于相对静止期，如：鼠卵巢癌细胞系MOVCAR7的SP细胞主要处于细胞周期的G_1期[9]，Huh7细胞株中的SP细胞80%处于G_0期[10].

SP细胞的鉴别是利用其能排出Hoechst染料这一特性，Hoechst染料排出以细胞膜上的一种ATP结合蛋白[ATP-binding cassette superfamily G(White)member 2]为运载体. 从小鼠各种组织检测到的SP细胞相比于非SP细胞ABC运载体明显高表达. Zhou等[11]发现SP细胞表型的形成与ABCG2有着最直接的联系. SP细胞的细胞周期相对静止和高表达ABCG2的特性使其能够逃避一些化疗药物的损害. SP细胞处于相对静止期，可以免受杀伤DNA复制期细胞的药物的作用，此外其高表达的ABC转运蛋白能将毒性药物大量泵出.

SP细胞还具有自我更新和多向分化潜能. SP细胞最早发现于小鼠骨髓中，Challen等[12]研究发现随着造血干细胞的长期传代，SP细胞比例越来越高. 在一些肿瘤细胞系中，SP细胞具有自我更新和无限增殖的潜能. 在鼠卵巢癌细胞系MOVCAR7和4306[9]、肝癌细胞系Huh7及PLC/PRE/5[13]中分离的SP细胞体外培养能产生SP细胞和非SP细胞，SP细胞比例升高. SP细胞还能多向分化，Kondo等[14]证明由大鼠胶质瘤细胞系C6中分离的SP细胞，能在其体内分化为神经元细胞及胶质细胞. 小鼠乳腺中分离的SP细胞注入小鼠乳腺脂肪垫中可产生完整的腺小管及腺小叶组织[15]，Wulf等[16]发现肝脏SP细胞体外培养可以分化为肝细胞和造血细胞，将肝脏的SP细胞移植到DDC药物引起的损伤肝脏中，可以发现SP细胞可分化为肝实质细胞和胆管上皮细胞而修复肝脏.

总之，无论是正常组织还是肿瘤细胞系中分离的SP细胞均具有干细胞样特性. 在肿瘤细胞系中分离的SP细胞还具有高致瘤性-一种肿瘤干细胞特性. 从肝癌[13]、肺癌[17]、胃癌[18]、C6神经胶质瘤细胞[14]和鼻咽癌[19]细胞株中分离出的SP细胞具有较高的肿瘤形成能力. 肝癌细胞系Huh7及PLC/PRE/5中的1×10^3 SP细胞可以使NOD/SCID小鼠皮下成瘤，皮下注射1×10^6非SP细胞却不能成瘤[13].

3 肝癌干细胞的鉴别与分离

研究肝癌干细胞生物学特性首先需要将其分离出来. 在肝癌干细胞的分离过程中研究者尝试使用各种细胞表面标志，如CD133、CD90. Ma等[21]发现$CD133^+$肝癌细胞高表达与干细胞自我更新、增殖等相关性基因，具有分化为非肝细胞的潜能和高致瘤性. 但许多肝癌细胞株中并未检测到$CD133^+$肝癌细胞[20,21]，在Huh7肝癌细胞株中$CD133^+$肝细胞占65%，在Hep3B中占90%[21]，这与肿瘤干细胞仅占肿瘤细胞中一小部分的理论不符.

Yang等[22]研究显示从多种人肝癌细胞系分离到的$CD90^+$细胞，可在免疫缺陷小鼠体内形成肿瘤. 各种肝癌细胞系中$CD90^+$细胞比例与该细胞系的成瘤性和转移能力呈正相关. $CD90^+$细胞的干细胞特性与CD45、CD44的表达相关. 在所有肝癌标本及90%的肝癌患者血样本中分离到了$CD45^-CD90^+$细胞，这些细胞均可在免疫缺陷小鼠体内成瘤. CD44抗体可诱导$CD90^+$细胞体外凋亡. 但是Yamashita等[23]证实CD90只在EpCAM-AFP-的肝癌细胞系中表达. 因此CD133、CD90作为肝癌干细胞的表面标志仍缺乏特异性和敏感性，需进一步研究予以证实.

SP细胞目前也已应用于肝癌干细胞的鉴别，Chiba等[13]在肝癌细胞系Huh7及PLC/PRE/5均分离出SP细胞，比例分别是0.25%，0.80%. 这群细胞具有自我更新、多向分化潜能，且具有高致瘤性. 人的肝细胞癌组织中也存在SP细胞，但在

Hep2和Huh6这两个肝癌细胞株中未检测到SP细胞. 因此SP法也不是一个完美的鉴别肝癌干细胞的方法, 且Hoechst33342具有DNA毒性, 分选后的细胞生物学特性是否发生改变存有疑问. 分选出来的SP细胞和非SP细胞难于比较各自的生物学特性. 所以需寻求另一种表面标志用于分选SP细胞, 比如利用ABCG2特异性抗体结合后再用流式细胞仪分选可能成为SP细胞分选的新方法.

4 SP细胞与肝癌干细胞

肿瘤干细胞是恶性肿瘤的根源, 与肿瘤的恶性程度和预后有一定的关系, 因此肿瘤干细胞可能是肿瘤治疗的一个有效靶点. 鉴于以上资料, SP细胞虽不等同于肝癌干细胞, 但SP细胞至少包含了部分肝癌干细胞, 因此在发现特异性肝癌干细胞表面标志物前SP细胞可以作为肝癌治疗的靶点.

SP细胞不仅有开始肿瘤的潜能还能通过其外排机制抵抗化疗药物, 这些细胞可能在肿瘤维持和复发中起着重要的作用. Shi等[24]研究表明肝癌标本中存在SP细胞, 其比例与肝癌术后早期转移复发相关, 因此改变SP细胞的比例可能降低肿瘤复发机率. ABCG2与SP表型有直接相关性, 因此能影响ABCG2蛋白表达、功能状态、组织分布的因素均可影响SP表型. 研究发现在MHCC-97L肝细胞癌细胞株中Akt信号通路抑制剂和血清供给可以调节SP细胞的比例, 具体机制是通过改变ABCG2运输体的亚细胞定位从而调节SP细胞的外排活力[25]. ABCG2分子能够被钙离子拮抗剂维拉帕米非特异性阻断, 抑制染料外排, 逆转耐药, 减少SP细胞; 加入维拉帕米后可见SP亚群明显减少. 在间充质肿瘤、侵袭性纤维瘤病中干扰素可以导致SP细胞数量的增加[26]. 以上结果表明一些化学性因素具有改变SP数量的能力, 具有这种能力的因子可以结合常规化疗用于减少或清除致瘤细胞预防肿瘤复发.

除了通过改变SP细胞的数量改善肿瘤预后外, 还可能通过改变SP细胞的特性如自我更新、致瘤性等来防止肿瘤复发. 基因BMI1参与各种不同干细胞的自我更新[27,28], 研究表明其对白血病干细胞自我更新能力的维持是必需的[29]. Chiba等[30]研究发现Huh7和PLC/PRF/5肝癌细胞株中的SP细胞BMI1表达高于非SP细胞, 通过基因敲除技术研究发现BMI1敲除后细胞活力下降, SP细胞具有自我更新和产生非SP细胞的能力, BMI1缺失可导致SP细胞的数量下降, 提示BMI1亦调节肝细胞癌中SP细胞的自我更新能力, BMI1缺失加快了SP向无致瘤性的非SP细胞方向分化. 相反, 在Huh7肝癌细胞株中BMI1基因的过度表达导致SP亚群显著的增长, CD133阳性的细胞与阴性相比具有更强的致瘤性, SP细胞中CD133的表达较非SP细胞强, BMI1缺失可导致CD133数量下降, 反之则CD133数量增多, BMI1与代表肿瘤干细胞表型的SP细胞以及CD133阳性细胞均密切相关. Huh7和PLC/PRF/5肝癌细胞株中的1×10^3 SP细胞即可在NOD/SCID小鼠体内形成移植瘤, 但10倍的BMI1缺失的SP细胞却失败了, BMI1的缺失使起始肿瘤的能力显著的降低. SP细胞具有异质性, 不同的细胞株BMI1对SP表型的作用不同, BMI1可能只是众多SP细胞自我更新调节因子中的一种, 因此需要更多的研究来明确调节肝癌干细胞具体机制. BMI1与SP细胞细胞活力、自我更新能力以及致瘤性有关, 因此他可能成为一个清除肝细胞癌中的肿瘤干细胞的治疗靶点.

■应用要点
肝癌SP细胞具有明确的高致瘤性等肝癌干细胞特性, 尽管他不等同于肝癌干细胞, 但SP表型仍可作为研究肝癌干细胞的重要手段.

5 结论

随着对肿瘤干细胞更进一步的认识, 肿瘤干细胞学说在不断发展. 如何分离纯化肿瘤干细胞是一个亟待解决的问题, 在肝癌中目前仍没有发现一个高特异性和敏感性表面标志物. 肝癌SP细胞具有明确的高致瘤性等肝癌干细胞特性, 尽管他不等同于肝癌干细胞, 但SP表型仍可作为研究肝癌干细胞的重要手段. 同时, 人们还将SP细胞作为治疗肿瘤的一个靶点进行了大量的研究并取得了一定的进展, 虽然离应用于临床治疗恶性肿瘤还有一定的距离, 但这为恶性肿瘤的治疗带来了新的希望. 肿瘤干细胞生物学行为的深入研究, 也许能帮助发现真正治愈恶性肿瘤的方法.

6 参考文献

1 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648

2 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737

3 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating

■同行评价
本文选题尚可，内容丰富，参考文献引用合理，可读性较好.

cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
4 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
5 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
6 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
7 Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 2008; 268: 1-9
8 Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 2008; 132: 299-310
9 Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11154-11159
10 Kamohara Y, Haraguchi N, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M, Kanematsu T. The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2008; 144: 119-124
11 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
12 Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3-12
13 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
14 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 781-786
15 Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3547-3549
16 Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003; 88: 368-378
17 Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 4827-4833
18 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
19 Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67: 3716-3724
20 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-824
21 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
22 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
23 Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136: 1012-1024
24 Shi GM, Xu Y, Fan J, Zhou J, Yang XR, Qiu SJ, Liao Y, Wu WZ, Ji Y, Ke AW, Ding ZB, He YZ, Wu B, Yang GH, Qin WZ, Zhang W, Zhu J, Min ZH, Wu ZQ. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1155-1163
25 Hu C, Li H, Li J, Zhu Z, Yin S, Hao X, Yao M, Zheng S, Gu J. Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2289-2297
26 Tjandra SS, Hsu C, Goh YI, Gurung A, Poon R, Nadesan P, Alman BA. IFN-{beta} signaling positively regulates tumorigenesis in aggressive fibromatosis, potentially by modulating mesenchymal progenitors. *Cancer Res* 2007; 67: 7124-7131
27 Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 302-305
28 Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003; 425: 962-967
29 Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003; 423: 255-260
30 Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 7742-7749

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 975-980
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

中药单体氢溴酸槟榔碱对糖尿病胃轻瘫大鼠胃动力的影响

张新华, 高 峰, 严 祥, 陈 明, 刘 纯

张新华, 甘肃省人民医院超声科 甘肃省兰州市 730000
高峰, 甘肃省人民医院输血科 甘肃省兰州市 730000
严祥, 兰州大学第一医院干部病房 甘肃省兰州市 730000
陈明, 刘纯, 兰州大学第一医院核医学科 甘肃省兰州市 730000
张新华, 硕士, 主治医师, 主要从事糖尿病并发症研究.
兰州大学医学科研基金资助项目, No. LZVYX200641
作者贡献分布: 张新华、高峰及严祥对此文所作贡献均等; 此课题由张新华、高峰及严祥设计; 研究过程由张新华、高峰、严祥、陈明及刘纯操作完成; 研究所用试剂及仪器设备由陈明与刘纯提供; 数据分析由张新华、高峰及严祥完成; 本论文写作由张新华、高峰及严祥完成.
通讯作者: 高峰, 主管检验师, 730000, 甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院输血科. zxh97@yahoo.cn
电话: 0931-8281737 传真: 0931-8281969
收稿日期: 2010-01-04 修回日期: 2010-03-06
接受日期: 2010-03-09 在线出版日期: 2010-04-08

Traditional Chinese medicine monomer arecoline promotes gastric motility in diabetic gastroparesis rats

Xin-Hua Zhang, Feng Gao, Xiang Yan, Ming Chen, Chun Liu

Xin-Hua Zhang, Department of Diagnostic Ultrasound, Gansu Province People Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Feng Gao, Department of Blood Transfusion, Gansu Province People Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Xiang Yan, Department of Geriatrics, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Ming Chen, Chun Liu, Department of Nuclear Medicine, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Supported by: the Medical Research Foundation of Lanzhou University, No. LZVYX200641
Correspondence to: Feng-Gao, Department of Blood Transfusion, Gansu Province People Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. zxh97@yahoo.cn
Received: 2010-01-04 Revised: 2010-03-06
Accepted: 2010-03-09 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of traditional Chinese medicine (TCM) monomer arecoline (ARE) on gastric emptying in diabetic gastroparesis (DGP) rats by single-photon emission computed tomography (SPECT).

METHODS: Ninety-five specific pathogen-free male Wistar rats were divided randomly into two groups: control group (n = 20) and experimental group (n = 75). The control group was fed a normal diet for 20 wk, while the experimental group was fed a fat- and caloric-rich diet for the same duration and injected with small dose of streptozotocin (STZ) at week 6 to induce diabetes. Gastric emptying half-time ($GET_{1/2}$) was measured by SPECT. DGP rats were then subdivided into three groups: model group (n = 20), ARE group (n = 20) and erythromycin (ERY) group (n = 20). These three groups were intravenously injected with normal saline, ARE and erythromycin, respectively. $GET_{1/2}$ was measured again. Blood glucose (GLU), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were measured using biochemical method.

RESULTS: The $GET_{1/2}$ was significantly longer in the DGP model group than in the normal control group (161.90 min ± 10.61 min *vs* 71.96 min ± 14.60 min, $P < 0.05$). Treatment with both ARE and ERY significantly shortened $GET_{1/2}$ (99.60 min ± 16.60 min *vs* 165.80 min ± 18.30 min and 133.30 min ± 19.70 min *vs* 164.10 min ± 20.71 min, both $P < 0.05$). The shortened $GET_{1/2}$ was more significant in the ARE group than in the ERY group ($P < 0.05$). At the end of the experiment, fasting GLU and TG levels were significantly higher in the model group than in the normal control group. In contrast, TG level was significantly lower in the ARE group and ERY group than in the model group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Both ARE and ERY can promote gastric emptying in DGP rats. ARE is superior to ERY in promoting gastric emptying in DGP rats. Treatment with both ERY and ARE reduces blood TG level.

Key Words: Traditional Chinese medicine monomer arecoline; Erythromycin; Diabetic gastroparesis; Single-photon emission computed tomography; Rat

Zhang XH, Gao F, Yan X, Chen M, Liu C. Traditional Chinese medicine monomer arecoline promotes gastric motility in diabetic gastroparesis rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 975-980

■背景资料
随着糖尿病发病率逐年增加, 糖尿病胃轻瘫的诊断与治疗水平一直徘徊不前, 远期疗效不理想, 临床应用促进胃排空的药物缓解症状, 疗效欠佳, 因对心血管的不良反应使其应用受限. 而中医中药是祖国传统医学的瑰宝, 有许多研究证实中药方剂及其单体对胃肠运动具有较强的促进作用, 其中槟榔是具有开发前景的促胃肠动力中药, 本研究应用胃排空测定金标准SPECT技术观察氢溴酸槟榔碱促胃肠动力作用, 旨在探索治疗DGP胃肠功能障碍的新途径.

■同行评议者
任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所

■研发前沿
目前促胃排空药物治疗糖尿病轻瘫, 疗效欠佳, 长期以来诊断与治疗水平一直徘徊不前, 远期疗效亦不理想, 故探讨其发病机制, 探索其有效治疗具有重要意义.

摘要

目的: 应用放射性核素单光子发射断层显像技术胃排空测定法(SPECT)观察中药单体氢溴酸槟榔碱(ARE)对糖尿病胃轻瘫(DGP)大鼠胃动力的影响及可能的作用机制.

方法: 清洁级(SPF)♂Wistar大鼠95只, 随机分为正常对照组(n = 20)、实验组(n = 75). 正常对照组以普通饲料喂养20 wk, 实验组以高脂高糖饲料喂养6 wk后, 小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立糖尿病模型, 以高糖高脂饲料及饮食失节法继续诱导20 wk后, 应用SPECT筛检出DGP大鼠模型, 随机分为模型组、氢溴酸槟榔组(ARE)及红霉素组(ERY), 而后进行药物尾静脉注射, 前后再次测定胃排空. 实验结束时各组大鼠空腹12 h(禁食不禁水)后采血用生物化学方法测定血脂、血糖.

结果: 正常对照组、DGP模型组胃半排空时间($GET_{1/2}$)分别为71.96 min±14.60 min、161.9 min±10.61 min, 模型组$GET_{1/2}$显著高于正常对照组, 差异有统计学意义(P<0.05), ARE组大鼠治疗后$GET_{1/2}$(165.8 min±18.30 min)缩短为99.6 min±16.60 min, ERY组大鼠治疗后$GET_{1/2}$(164.1 min±20.71 min)缩短为133.3 min±19.70 min, 与本组治疗前比较均显著缩短, 差异有统计学意义(P<0.05). ARE组$GET_{1/2}$较ERY组缩短显著, 组间比较差异有统计学意义(P<0.05), 模型组治疗前后比较差异无统计学意义. 实验结束时模型组大鼠空腹血糖(GLU)、三酰甘油(TC)较正常对照组明显升高, ARE组及ERY组治疗后TG较模型组下降, 差异有统计学意义(P<0.05), GLU、TC、LDL-C均有下降趋势, 差异无统计学意义.

结论: ARE及ERY均可促进DGP大鼠的$GET_{1/2}$, 其中ARE的治疗效果优于ERY; 给予ARE及ERY治疗后TG水平下降.

关键词: 中药单体氢溴酸槟榔碱; 红霉素; 糖尿病胃轻瘫; 放射性核素胃排空测定法; 大鼠

张新华, 高峰, 严祥, 陈明, 刘纯. 中药单体氢溴酸槟榔碱对糖尿病胃轻瘫大鼠胃动力的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 975-980

http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/975.asp

0 引言

随着人们生活水平的提高, 生活方式的改变及社会的老龄化, 糖尿病患病率逐年增加, 其中各种慢性并发症是导致患者死亡的主要原因[1]. 临床上出现上腹胀、早饱、嗳气、恶心、呕吐等胃肠运动障碍及胃排空功能受损. 1958年Kassander等[2]将其命名为糖尿病性胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP). 临床治疗主要以控制血糖, 应用促进胃排空的药物缓解上消化系症状, 疗效欠佳. 而DGP在晚期糖尿病患者中高达75%, 由于胃肠运动障碍及胃排空功能受损影响降糖药及其他药物的药代动力学, 使降糖药的吸收迟滞, 与进食后血糖的高峰不匹配, 造成血糖控制不良, 与此同时由于血药浓度高峰的迟滞又可能引起低血糖, 造成血糖不稳定, 影响降糖药的疗效. DGP不仅影响糖尿病患者的生存质量, 更影响糖尿病的有效控制, 长期以来诊断与治疗水平一直徘徊不前, 远期疗效亦不理想. 所以对DGP胃肠动力障碍的研究显得十分重要. 放射性核素单光子发射断层显像技术胃排空测定(single photon emission computer tomography, SPECT)技术由于不影响基本生理、无需插管、试餐应用不受限制、测定间期患者可正常活动, 是一种灵敏的、无创的、符合生理过程的检测方法, 在目前被认为是测定胃排空的金标准[3]. 氢溴酸槟榔碱(arecaline, ARE)对生理状态下胃排空功能的影响, 尤其是应用胃排空测定金标准SPECT技术对DGP大鼠胃排空运动的影响尚未见报道. 本研究应用SPECT技术观察ARE及红霉素(erythromycin, ERY)对DGP大鼠胃动力的影响及其作用机制, 旨在探索治疗DGP胃肠功能障碍的新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级Wistar大鼠95只, ♂, 体质量225 g±15 g, 由甘肃中医学院SPF动物实验中心提供, 动物实验在甘肃中医学院SPF动物实验中心实验室进行, 合格证编号: SCXK(甘)2004-007-0001555. 实验用STZ购自美国Sigma公司; 氢胆固醇和胆酸钠, 淮北市创凯生化原料厂. ARE购自中国药品生物制品检定所; ERY购自上海新先锋药业有限公司. 血糖测定仪及试纸由强生公司提供; 核素锝99mTc2二亚乙三胺五醋酸(DTPA), 中国医学科学院提供. MK-2酶标仪JZW-I-20, 荷兰; 以色列Elscint Helix公司的双探头单光子发射计算机断层照相仪; 台式离心机, 北京医用离心机厂; 超低温冰箱, 日本三洋; LX20型全自动生化分析仪, 美国Beckman; 2510变频振荡器, 上海新波生物技术有限公司; 全自动微孔洗涤机, 上海新波生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 实验大鼠95只随机分为正常

对照组(n = 20)、实验组(n = 75). 正常对照组以标准大鼠饲料喂养, 实验组大鼠每天以高脂高糖饲料喂养, 连续6 wk, 每周定时称质量1次. 喂养6 wk后, 正常对照组经腹腔注射等量枸橼酸钠缓冲液, 实验组经腹腔注射枸橼酸缓冲液配制的链脲佐菌素(STZ), 剂量为30 mg/kg体质量, 72 h后尾静脉采血测定空腹血糖, 以空腹血糖高于16.7 mmol/L确定为糖尿病模型建立成功[4,5], 有65只达标, 8只不达标, 造模过程中死亡2只. 3 d后补注STZ(以15 mg/kg体质量剂量腹腔补注), 测定血糖2只达标, 6只不达标剔除实验. 67只糖尿病大鼠造模成功后, 不用胰岛素和任何降糖药物控制血糖, 以高脂高糖饲料以及饮食失节法[6]继续饲养20 wk, 每周检测血糖和体质量, 20 wk后应用SPECT技术, 以正常对照组为正常范围[7], 筛检出DGP大鼠60只, 而后DGP大鼠再随机分为模型组(n = 20只)、ERY组(n = 20只)及ARE(n = 20只)进行药物治疗后再次测定$GET_{1/2}$, 实验结束时各组大鼠空腹12 h(禁食不禁水)后采血用生物化学方法测定血脂、血糖.

1.2.2 *药物干预*: 正常对照组及模型组均给予等量注射用水尾静脉注射, ERY组经尾静脉给予注射用水配制的ERY 0.5 mg/kg治疗, ARE治疗组经尾静脉给予ARE 1 mg/kg治疗, 每天1次, 连续5 d, 在第5天各组再次以SPECT测定$GET_{1/2}$, 进行治疗前后及各组间比较.

1.2.3 *核素胃排空功能测定*: 大鼠禁食12 h, 禁水6 h后, 应用含有核素锝(99mTc-DTPA 0.5 mCi)标记的蒙牛纯牛奶1.5 mL, 通过灌胃器缓慢注入胃内之后立即将大鼠仰卧绑缚于特制固定架上, 用Elscint Helix公司的双探头单光子发射计算机断层照相仪, 以大鼠腹部为目标区(窗宽20%, 矩阵128×128, 放大倍数30)行放射性活性采集. 各组分别于药物治疗前后采用SPECT技术检测$GET_{1/2}$. 前半小时每5 min采集1次, 然后每30 min采集1次, 每次30 s, 共采集240 min, 通过随机软件, 计算出各项指标的校正值及胃的排空曲线.

1.2.4 *标本采集与保存检测*: 各组大鼠分别于药物干预前(禁食不禁水)在吸入乙醚麻醉后, 心脏采血, 分离血清. 干预后12 h(禁食不禁水)在吸入乙醚麻醉后, 上腔静脉采血, 其中1 mL在4 h内测定生化指标, 其余血浆-80 ℃冰箱保存. GLU、TC、TG、LDL-C、HDL-C采用美国Beckman公司LX20型全自动生化分析仪测定.

统计学处理 各组指标用mean±SD表示, 采用单因素方差分析和q检验, 以P<0.05为有统计学意义. 应用SPSS11.5软件进行数据处理, Sigmaplot10.0软件作图.

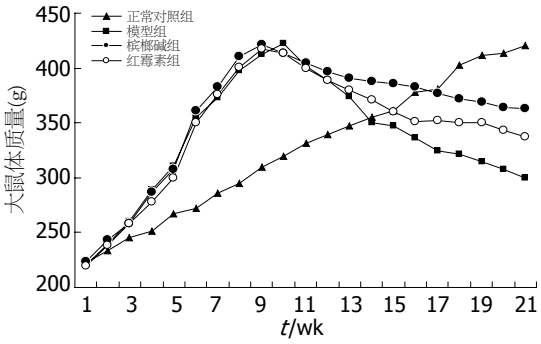


图 1 各组大鼠体质量变化.

表 1 DGP各组治疗前后$GET_{1/2}$比较 (n = 20, mean ± SD, min)

分组	治疗前	治疗后
MOD组	161.9 ± 10.61	159.7 ± 18.21
ARE组	165.8 ± 18.30	99.6 ± 16.60[a]
ERY组	164.1 ± 20.71	133.3 ± 19.70[a]

[a]P<0.05 *vs* 模型组、治疗前.

2 结果

2.1 *各组大鼠体质量* 正常对照组大鼠体质量在实验期间由223.0 g±16.4 g增至420.0 g±18.2 g, 实验组大鼠初始体质量为221.0 g±28.9 g, 与正常对照组大鼠体质量差异无统计学意义. 造模前6 wk实验组大鼠体质量增长迅速, 经STZ诱导为糖尿病模型20 wk后, 实验组大鼠体质量较成模前明显下降(P<0.05), 正常对照组大鼠体质量的增长显著高于DGP组(P<0.05). 药物干预后三组大鼠体质量较干预前有下降趋势, 但前后比较差异无统计学意义(图1).

2.2 *各组DGP大鼠干预前后核素$GET_{1/2}$及胃排空显像* 正常对照组大鼠胃半排空时间($GET_{1/2}$)为71.96 min±14.60 min, 以正常对照组为正常范围[7], 筛检出DGP大鼠$GET_{1/2}$为161.9 min±10.61 min, 显著高于正常对照组, 差异有统计学意义(P<0.05), ARE组大鼠治疗后$GET_{1/2}$ 165.8 min±18.30 min缩短为99.6 min±16.60 min, ERY组大鼠治疗后$GET_{1/2}$ 164.1 min±20.71 min缩短为133.3 min±19.70 min, 与本组治疗前比较均显著缩短, 治疗前后差异有统计学意义(P<0.05), ARE组$GET_{1/2}$较ERY组缩短明显, 组间比较差异有统计学意义(P<0.05), 模型组治疗前后比较差异无统计学意义(表1, 图2, 3).

■相关报道

目前, 胃肠动力的研究多为有创腔内压测定、胃电图和胃张力测定等, 应用ARE多为观察离体大小肠平滑肌条、平滑肌细胞收缩功能.

■应用要点
本研究应用SPECT技术观察中药单体ARE促胃肠动力的作用，其疗效、安全性及其治疗DGP可能的作用机制，旨在探索治疗DGP胃肠功能障碍的新途径.

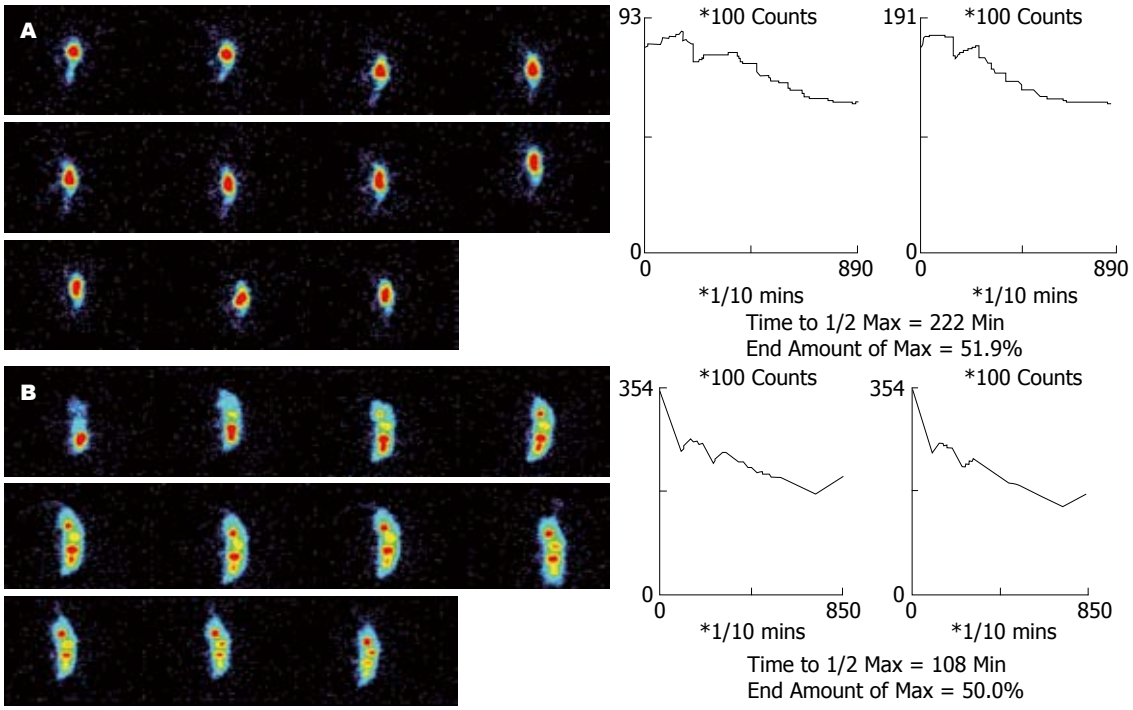


图 2 ARE组治疗前后胃排空显像及排空曲线. A: 治疗前; B: 治疗后.

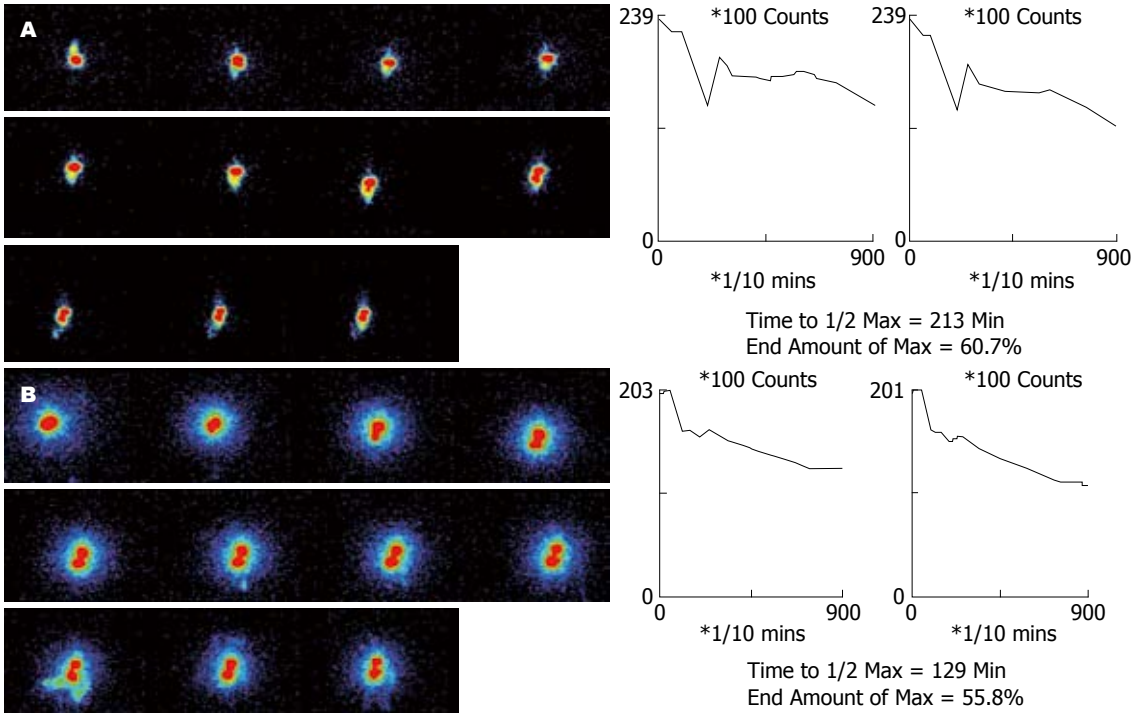


图 3 ERY组治疗前后胃排空显像及排空曲线. A: 干预前; B: 干预后.

2.3 各组大鼠血清生化指标组间比较 实验结束时模型组大鼠GLU、TG较正常对照组明显升高，差异有统计学意义(P<0.05)，ARE组和ERY组治疗后，TG较模型组及治疗前明显下降，差异有统计学意义(P<0.05)；GLU、TC、LDL-C较模型组及治疗前有下降趋势，但差异无统计学意义，HDL-C较模型组及治疗后有升高趋势，但差异无统计学意义(表2).

3 讨论

中医中药是祖国传统医学的瑰宝，许多研究证实中药方剂及其单体对胃肠运动具有较强的促进作用. 其中槟榔是具有开发前景的促胃肠动力中药[8,9]. 槟榔有杀虫、消积、行气化湿、利

表 2 各组大鼠血清生化指标组间比较 (n = 20, mean ± SD)

血糖、血脂 (mmol/L)	对照组	模型组	ARE组		ERY组	
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
GLU	5.70 ± 0.80	21.50 ± 4.70	19.08 ± 0.42	17.02 ± 0.98	18.08 ± 0.22	15.02 ± 0.98
TG	0.64 ± 0.24	2.21 ± 0.35	1.29 ± 0.54	0.79 ± 0.25[a]	2.29 ± 0.58	1.09 ± 0.57[a]
TC	2.56 ± 0.31	3.07 ± 2.07	2.20 ± 0.59	2.10 ± 0.67	2.82 ± 0.59	2.68 ± 0.24
LDL-C	0.96 ± 0.16	2.02 ± 1.08	1.23 ± 0.15	1.21 ± 0.80	1.23 ± 0.26	1.16 ± 0.60
HDL-C	0.98 ± 0.18	0.89 ± 0.39	1.11 ± 0.33	0.99 ± 0.69	1.01 ± 0.23	0.94 ± 0.26

[a]P<0.05 *vs* 模型组、治疗前.

■**同行评价**
本实验设计合理, 方法得当, 具有一定的学术价值.

湿通便的功用, 主要治疗食积气滞, 腹痛胀满, 腹水, 痢疾, 虫证等病症[10,11]. 槟榔系棕榈科植物干燥成熟种子, 历代本草多有记载. 如《新修本草》认为其“治腹胀, 生捣末服, 利水谷道”. 《明医别录》说其“消谷除水, 除痰癖”. 《本草明言》认为“槟榔入胸腹破滞气而不停”. 《用药心法》认为槟榔“苦以破滞, 辛以散邪, 专破滞气下行”. 槟榔的主要有效成分槟榔碱为M受体激动剂[12,13], 化学名为*N*-甲基-1, 2, 5, 6-四氢烟酸甲酯. 近年来的研究已证实, ARE是一种M受体激动剂, 通过激动M2受体, 槟榔碱可兴奋神经元[8], 有较强的促胃肠运动作用, 可作为合成其他M受体激动剂的原料[14,15]. 可引起胃肠道平滑肌蠕动增加, 并促进胃肠腺体分泌, 促胃肠动力效应以增强胃排空最为显著[16,17]. 有研究报道[18], 可引起结肠平滑肌细胞收缩, 增加细胞内钙离子浓度[19], 其收缩效应可以被M受体阻断剂阿托品所抑制[20,21]. 还可兴奋大小鼠离体小肠平滑肌条[22], 促进小鼠胃肠推进率[23,24], 促进家兔十二指肠肠管的运动, 增高肠管张力, 减小收缩波平均振幅[25].

SPECT是一种灵敏的、无创、符合生理过程的检测技术, 其用于$GET_{1/2}$测量被认为是胃排空定量分析的金标准. 可采取液体胃排空、固体胃排空以及液体-固体胃排空联合测定, 方法简单、安全、重复性好.

ERY是临床常用的一种大环内酯类抗生素, 因用药后常见腹部不适、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道刺激症状, 使某些患者不能耐受, 影响了其在临床的广泛应用. 近来的研究[26,27]表明ERY及其衍生物是胃动素受体激动剂, ERY分子电荷及空间结构与胃动素完全相同, 直接与平滑肌细胞膜胃动素受体结合后, 可阻断细胞外钙离子内流, 同时细胞内钙离子外流增加, 使胃窦收缩, 促进胃排空. ERY表现为全胃肠道促动力作用, 这一作用呈量效关系, 小剂量诱发消化间期移行性复合运动, 大剂量使胃肠平滑肌强烈收缩, 引起恶心、呕吐、腹痛等[27].

本研究采用高糖高脂饲料、饮食失节法及腹腔注射STZ成功复制DGP模型, 应用SPECT技术观察, 实验结果表明ARE有显著的促大鼠胃排空的作用, 研究结果与文献提示结果一致, 进一步证实了ARE的药效, 表明其促胃排空作用强于ERY, 是一种较强的胃肠动力中药单体. 本研究结果说明ARE及ERY可以不同程度降低高脂、高糖饮食诱发的高TC、GLU、TG、LDL-C, 机制可能与其促进DGP胃肠动力, 加速胃排空, 降低肠腔pH值, 促进胆汁酸代谢, 降低胆固醇, 提高胰岛细胞外周敏感性等有关[28,29]. ARE促胃排空作用强于ERY, 可用于DGP的治疗及进一步研究开发, 但其可产生肌震颤、共济失调和肌强直等增强副交感活动的不良反应[30]. ARE对胃肠动力的影响也引起了人们的重视, 安全实验结果表明, ARE是较为安全的药物[31]. 近来国内外学者研究显示, 长期大量食用槟榔有导致口腔癌和口腔黏膜纤维化等不良反应[32-36], 槟榔促胃肠运动的量效关系、作用机制、药效成分与不良反应的关系仍有待于进一步研究.

4 参考文献

1 Screening for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26 Suppl 1: S21-S24
2 Kassander P. Asymptomatic gastric retention in diabetics (gastroparesis diabeticorum). *Ann Intern Med* 1958; 48: 797-812
3 Parkman HP, Harris AD, Krevsky B, Urbain JL, Maurer AH, Fisher RS. Gastroduodenal motility and dysmotility: an update on techniques available for evaluation. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 869-892
4 于德民, 吴锐, 尹潍, 袁咏. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究. 中国糖尿病杂志 1995; 39: 105-109
5 刘学政, 羊惠君, 李瑞祥. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的建立与研究. 四川解剖学杂志 1996; 4:

169-174
6 张琴, 刘文全. STZ联合饮食失节法诱导糖尿病胃轻瘫大鼠模型方法探讨. 中国中医急症 2005; 14: 672-673
7 严祥, 刘纯, 刘永铭, 陈大安, 王晶, 刘维英, 何津祥, 杨鹏. 应用ECT技术对功能性消化不良胃排空影响因素的研究. 中华消化杂志 2000; 20: 416-417
8 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 史洪涛, 桂先勇. 15味中药促胃肠动力作用的筛选研究. 第三军医大学学报 2000; 22: 436
9 邹百仓, 魏兰福, 魏睦新. 槟榔对功能性消化不良模型大鼠胃运动的影响. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 6-8
10 丁兆梦. 中药药效与临床. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 276-276
11 梁宁霞. 槟榔药理作用研究进展. 江苏中医药 2004; 25: 55-57
12 Soncrant TT, Holloway HW, Greig NH, Rapoport SI. Regional brain metabolic responsivity to the muscarinic cholinergic agonist arecoline is similar in young and aged Fischer-344 rats. *Brain Res* 1989; 487: 255-266
13 Vanderheyden P, Gies JP, Ebinger G, De Keyser J, Landry Y, Vauquelin G. Human M1-, M2- and M3-muscarinic cholinergic receptors: binding characteristics of agonists and antagonists. *J Neurol Sci* 1990; 97: 67-80
14 Yang YR, Chang KC, Chen CL, Chiu TH. Arecoline excites rat locus coeruleus neurons by activating the M2-muscarinic receptor. *Chin J Physiol* 2000; 43: 23-28
15 Xie DP, Chen LB, Liu CY, Zhang CL, Liu KJ, Wang PS. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M3 receptor in rabbits. *Chin J Physiol* 2004; 47: 89-94
16 黄海霞, 王伟, 曲瑞瑶, 李利生, 曾祖平, 何薇, 危北海. “木香−槟榔”制剂对大鼠胃肠运动的影响. 深圳中西医结合杂志 2003; 13: 80
17 陈潮燕. 槟榔碱的提取分离及其对胃肠道平滑肌收缩作用的影响. 广东药学 2000; 10: 48-50
18 倪依东, 王建华, 王汝俊. 槟榔水提液对胃肠运动的影响. 中药药理与临床 2003; 19: 27-29
19 Leonard A, Cuq P, Magous R, Bali JP. M3-subtype muscarinic receptor that controls intracellular calcium release and inositol phosphate accumulation in gastric parietal cells. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 839-845
20 梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 胡凡, 刘翠萍, 魏睦新. 槟榔碱促结肠平滑肌细胞收缩及对胞内钙离子浓度的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 676-681
21 周吕, 柯美云. 胃肠动力学−基础与临床. 北京: 科学出版社, 1999: 773-774
22 姚伟星, 夏国瑾, 李泱, 傅丽英, 邓静萍, 吴世玉, 王少林. 槟榔碱对大鼠门静脉和钙通道电流的剂量与效应关系. 中国寄生虫病防治杂志 2001; 14: 139-141
23 杨颖丽, 郑天珍, 瞿颂义. 槟榔对大鼠小肠纵行肌条运动的影响. 兰州大学学报(自然科学版) 2000; 36: 43-46
24 杜志敏, 万新祥, 伍爱禅. 槟榔碱对小鼠小肠运动的影响. 广州医高专学报 1999; 22: 27-28
25 杜志敏, 万新祥, 伍爱蝉. 槟榔碱对离体肠自发性蠕动的影响. 解放军医学高等专科学校学报 1999; 27: 87-89
26 Lu G, Sarr MG, Szurszewski JH. Effect of motilin and erythromycin on calcium-activated potassium channels in rabbit colonic myocytes. *Gastroenterology* 1998; 114: 748-754
27 Koenig JB, Sawhney S, Cote N, LaMarre J. Effect of intraluminal distension or ischemic strangulation obstruction of the equine jejunum on jejunal motilin receptors and binding of erythromycin lactobionate. *Am J Vet Res* 2006; 67: 815-820
28 Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001; 414: 821-827
29 Zhao WH, Xiao JZ, Yang WY, Wang N, Wang X, Chen XP, Bu S. [Relationship between hepatic insulin resistance and the expression of genes involved in hepatic glucose output] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 45-48
30 Feng Q, Li G, Yang Y, Gao J. [Studies on the increasing-effect components for molluscicides in nut of Areca catech] *Zhongyaocai* 1999; 22: 572-574
31 Parkman HP, Pagano AP, Vozzelli MA, Ryan JP. Gastrokinetic effects of erythromycin: myogenic and neurogenic mechanisms of action in rabbit stomach. *Am J Physiol* 1995; 269: G418-G426
32 Chang BE, Liao MH, Kuo MY, Chen CH. Developmental toxicity of arecoline, the major alkaloid in betel nuts, in zebrafish embryos. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70: 28-36
33 冯云枝, 凌天牖. 槟榔提取物对口腔粘膜成纤维细胞表达细胞间粘附分子-1的影响. 华西口腔医学杂志 2002; 20: 241
34 Yang SF, Hsieh YS, Tsai CH, Chou MY, Chang YC. The upregulation of type I plasminogen activator inhibitor in oral submucous fibrosis. *Oral Oncol* 2003; 39: 367-372
35 Jeng JH, Wang YJ, Chiang BL, Lee PH, Chan CP, Ho YS, Wang TM, Lee JJ, Hahn LJ, Chang MC. Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the prostaglandin E2, interleukin-6 and TNF-alpha production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1301-1315
36 翦新春, 刘蜀蕃, 沈子华. 口腔黏膜下纤维性变的临床研究. 中华口腔医学杂志 1989; 15: 299

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 981-986
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

紧密连接蛋白Occludin在非酒精性脂肪肝大鼠肠上皮细胞中的表达及其与TNF-α的关系

许腊梅, 孙丹莉, 张予蜀, 张振玉, 李晓翠

许腊梅, 孙丹莉, 张予蜀, 张振玉, 李晓翠, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006
许腊梅, 2007级南京医科大学在读硕士, 主要从事肝脏疾病研究.
作者贡献分布: 许腊梅与孙丹莉对此文贡献均等; 此课题由孙丹莉、许腊梅、张予蜀及张振玉设计完成; 研究过程由许腊梅、孙丹莉、张予蜀、张振玉及李晓翠完成; 研究经费由孙丹莉提供; 数据分析由许腊梅完成; 论文写作由许腊梅与孙丹莉完成.
通讯作者: 孙丹莉, 主任医师, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京医科大学附属南京第一医院消化科. sundanli_nj@126.com
电话: 025-52271260
收稿日期: 2009-12-23 修回日期: 2010-02-10
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Relationship between occludin expression in intestinal epithelial cells and tumor necrosis factor-α level in rats with nonalcoholic fatty liver disease

La-Mei Xu, Dan-Li Sun, Yu-Shu Zhang, Zhen-Yu Zhang, Xiao-Cui Li

La-Mei Xu, Dan-Li Sun, Yu-Shu Zhang, Zhen-Yu Zhang, Xiao-Cui Li, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dan-Li Sun, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. sundanli_nj@126.com
Received: 2009-12-23 Revised: 2010-02-10
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of tight junction protein occludin in intestinal epithelial cells and to analyze its relationship with tumor necrosis factor-α (TNF-α) level in rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: Thirty male Sprague-Dawley rats were divided into two groups: control group and model group. The control group was fed a normal diet while the model group was fed a high-fat diet. All the animals were sacrificed after 12 wk of feeding. Hematoxylin & eosin staining of hepatic tissue was performed to confirm if NAFLD was induced successfully. Serum TNF-α level was determined by radioimmunoassay. The expression of TNF-α in hepatic cells and occludin in intestinal epithelial cells was detected by immunohistochemistry. Intestinal epithelial tight junctions were observed by electron microscopy.

RESULTS: Serum TNF-α level in the model group was significantly higher than that in the control group (3.21 μg/L ± 0.45 μg/L *vs* 2.10 μg/L ± 0.29 μg/L, t = -6.157, P < 0.01). In the model group, TNF-α was mainly distributed in the cytoplasm of liver cells, presenting with brownish-yellow fine granules, whereas only scattered positive cells were seen in the control group. Immunohistochemistry analysis showed that occludin was localized to the apical region of the intestinal lateral plasma membrane and distributed in a continuous pattern in the control group but significantly down-regulated and distributed in a non-continuous pattern in the model group. Electron microscopy analysis demonstrated that tight junctions were significantly shorter in the model group than in the control group (0.50 μm ± 0.21 μm *vs* 0.78 μm ± 0.19 μm, P < 0.05).

CONCLUSION: TNF-α may inhibit the expression of tight junction protein occludin in intestinal epithelial cells, which may result in intestinal barrier dysfunction and promote the development and progression of NAFLD.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Tumor necrosis factor-α; Occludin; Immunohistochemistry

Xu LM, Sun DL, Zhang YS, Zhang ZY, Li XC. Relationship between occludin expression in intestinal epithelial cells and tumor necrosis factor-α level in rats with nonalcoholic fatty liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 981-986

摘要

目的: 研究非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠肠上皮细胞中紧密连接蛋白Occludin的表达及与肿瘤坏死因子α(TNF-α)的关系.

■**背景资料**
非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种获得性代谢性应激相关的肝脏疾病, 目前国内外发病率呈明显上升趋势. NAFLD临床上包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(NASH)和脂肪性肝硬化三种类型. 患者从单纯性脂肪肝进展为NASH的发生机制尚不明确.

■**同行评议者**
宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科

■研发前沿
TNF-α抑制肠上皮紧密连接蛋白Occludin的表达，使肠道机械屏障受损，这一表现可能是NAFL发展为NASH的病理生理和发病机制中的一重要环节. 这一发现为临床预防和治疗NAFLD提供了一种可能的途径.

方法: 30只♂SD大鼠平均分为2组，对照组普通饮食，模型组给予高脂饮食，喂养12 wk后处死. 模型组肝脏HE染色显示脂肪肝造模成功. 采用放免法检测血清TNF-α水平，取肝脏组织行免疫组织化学检测TNF-α的表达，取空肠组织应用免疫组织化学检测肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin表达并电镜下观察肠上皮细胞间紧密连接部位的变化.

结果: 模型组血清TNF-α水平较对照组明显增高，差异具有统计学意义(3.21 μg/L±0.45 μg/L *vs* 2.10 μg/L±0.29 μg/L, t = -6.157, P<0.01). 模型组大鼠肝脏TNF-α阳性物质主要分布在肝细胞的胞质，呈棕黄色细颗粒状，而对照组仅个别散在肝细胞阳性. 对照组Occludin蛋白主要沿大鼠空肠黏膜上皮细胞膜的顶端呈线状分布，而模型组阳性染色较之明显减弱，呈非连续性分布. 电镜下模型组紧密连接明显短于对照组，具有显著性差异(0.50 μm±0.21 μm *vs* 0.78 μm±0.19 μm, P<0.05).

结论: TNF-α可能抑制了空肠上皮细胞中紧密连接蛋白Occludin的表达，从而破坏了肠黏膜机械屏障，促进NAFLD的发生及发展.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 肿瘤坏死因子α; Occludin; 免疫组织化学

许腊梅，孙丹莉，张予蜀，张振玉，李晓翠. 紧密连接蛋白Occludin在非酒精性脂肪肝大鼠肠上皮细胞中的表达及其与TNF-α的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 981-986
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/981.asp

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种获得性代谢性应激相关的肝脏疾病，以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为病理特征，但无过量饮酒史. 临床上包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和脂肪性肝硬化三种类型[1]. 患者从单纯性脂肪肝进展为NASH的发生机制尚不明确，但近年来研究证实，内毒素(endotoxin, ET)在NASH的发病机制中发挥了重要作用. 单纯性脂肪肝时常已伴有肠道菌群紊乱和/或内毒素血症. 某些细胞因子(如TNF-α)可以诱导肠上皮细胞凋亡[2-4]和细胞间紧密连接蛋白结构及功能的改变[5]，导致肠上皮通透性增加[6]，从而发生细菌移位及内毒素血症，形成恶性循环[7]. 目前已有研究[8,9]证实，肝硬化、急性肝功能衰竭等疾病时肠紧密连接蛋白的表达下降，并与TNF-α有一定相关性，而关于NAFLD时紧密连接蛋白表达的改变尚未见报道. 本研究在于探讨NAFLD大鼠肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin的表达及与TNF-α的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠30只，♂，周龄6-8 wk，体质量180-220 g，由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供. 兔抗Occludin多克隆抗体，美国Zymed公司；兔抗TNF-α多克隆抗体，荷兰HBT公司；PV6001兔二步法免疫组织化学试剂盒，北京中杉金桥公司. TNF-α放免试剂盒，中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所.

1.2 方法

1.2.1 脂肪肝动物模型制备: 适应性喂养1 wk后，随机平均分为2组: 正常对照组给予普通饲料喂养，模型组以10%猪油、2%胆固醇、0.5%蛋黄粉、0.2%脱氧胆酸钠及87.3%基础饲料构成的高脂饲料喂养. 两组均自由饮水. 喂养12 wk后处死所有动物. 立即取出肝脏，滤纸吸干表面水分后称其湿质量，计算肝指数[肝指数 = (肝湿质量/大鼠体质量)×100]. 取部分肝组织及空肠组织置于40 g/L甲醛中固定制备石蜡标本. 留取部分空肠组织固定于4%戊二醛中，以备电镜检查.

1.2.2 空肠免疫组织化学染色观察肠上皮紧密连接蛋白Occludin的表达: 石蜡切片常规脱蜡水化，蛋白酶K 37 ℃消化10 min，PBS冲洗，兔抗大鼠多克隆Occludin抗体4 ℃过夜，PBS冲洗，二抗PV6001抗体37 ℃ 30 min，PBS冲洗. DAB显色，镜下控制显色时间. PBS代替一抗做空白对照.

1.2.3 肝脏免疫组织化学染色观察TNF-α的表达: 石蜡切片脱蜡水化，取pH6.0柠檬酸盐缓冲液1 500 mL于压力锅中，大火加热直至沸腾，将脱蜡水化后的组织切片置于不锈钢架上，放入已沸腾的缓冲液中，盖上锅盖，扣上压力阀，继续加热至喷汽，从喷汽开始计时，2 min后，压力锅离开热源，冷却至室温，取出玻片. PBS冲洗，兔抗大鼠多克隆Occludin抗体4 ℃过夜，PBS冲洗，二抗PV6001抗体37 ℃ 30 min，PBS冲洗. DAB显色，镜下控制显色时间. PBS代替一抗做空白对照.

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行统计分析，数据采用mean±SD表示. 两组间指标的差异采用t检验.

2 结果

2.1 动物模型的建立指标

2.1.1 体质量改变: 实验过程中，各组大鼠均无死

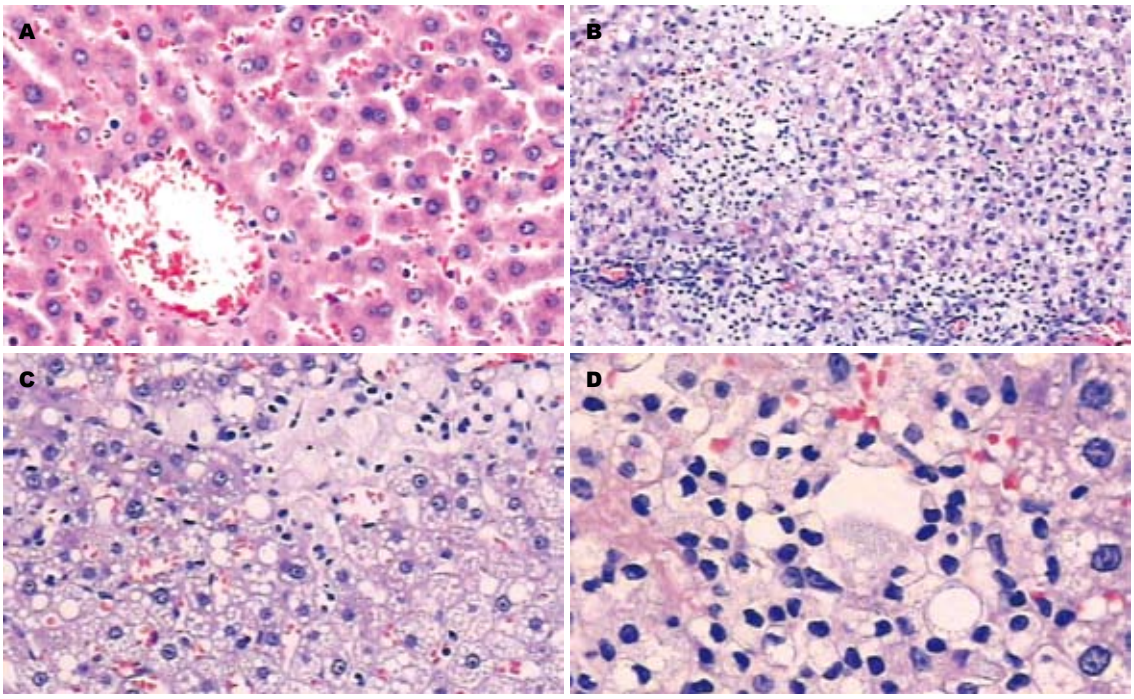


图 1 两组大鼠肝脏光镜下表现(HE染色). A: 对照组(×200); B: 模型组(×100); C: 模型组(×200); D: 模型组(×400).

■**相关报道**
马力等报道肝硬化、急性肝衰竭大鼠肠紧密连接蛋白的表达下降, 并与TNF-α有一定相关性. Patrick等的研究显示TNF-α能降解紧密连接蛋白, 抑制Occludin的表达.

亡, 皮毛光泽度好, 进食饮水可, 活动自如, 对外界刺激反应迅速. 12 wk末模型组大鼠体质量、肝湿质量及肝指数明显增加, 与对照组相比有显著差异(P<0.01, 表1).

2.1.2 肝脏的病理改变: 肉眼观察, 12 wk处死的对照组大鼠肝脏颜色呈暗红; 模型组大鼠肝脏体积增大, 包膜稍紧张, 边缘圆钝, 呈奶黄色, 有油腻感. 病理切片观察, 对照组: 肝小叶结构清晰, 肝细胞索排列无异常, 肝细胞质呈细密颗粒状, 门管区无炎细胞浸润; 模型组大鼠均呈现脂肪性肝炎状态, 表现为: 肝窦狭窄, 肝细胞肿胀, 胞质内充满大小不等的空泡, 部分肝细胞呈气球样形态, 可见灶状坏死及小叶内炎性细胞浸润. 部分切片可见门管区炎细胞浸润及纤维增多(图1).

2.2 血清TNF-α水平的比较 模型组血清TNF-α水平较对照组明显增高, 差异具有统计学意义(3.21 μg/L±0.45 μg/L *vs* 2.10 μg/L±0.29 μg/L, t = -6.157, P<0.01).

2.3 肝脏TNF-α免疫组织化学染色 细胞中棕黄色颗粒存在为阳性. 模型组阳性物质主要分布在胞质, 呈棕黄色细颗粒状, 部分浸润单核细胞和少数汇管区. 而对照组仅个别散在肝细胞阳性(图2).

2.4 空肠Occludin免疫组织化学染色 对照组Occludin蛋白主要沿大鼠空肠黏膜上皮细胞膜的顶端呈线状分布, 呈棕褐色信号. 而模型组阳性染色较之明显减弱, 呈非连续性分布, 定位与对照组无显著区别(图3).

表 1 模型组与对照组体质量、肝湿质量、肝指数 (n = 15)

分组	体质量(g)	肝湿质量(g)	肝指数
对照组	331.33 ± 30.93	8.72 ± 0.67	2.64 ± 0.21
模型组	397.06 ± 23.50	14.39 ± 1.98	3.62 ± 0.43
t值	−5.076	−8.134	−6.061
P值	0.008	0.001	0.002

2.5 电镜结果 对照组电镜下肠黏膜上皮排列规则、紧密, 上皮细胞表面微绒毛丰富, 排列规则, 细胞间靠腔面为紧密连接, 下方为桥粒结构, 紧密连接比较长, 结构清晰, 连接缝隙小, 桥粒结构丰富, 胞质内各类细胞器结构良好, 上皮细胞核位于基底; 模型组电镜下肠黏膜上皮排列紧密, 上皮细胞表面微绒毛丰富, 排列规则, 少数细胞微绒毛倒伏, 细胞间靠腔面为紧密连接, 下方为桥粒结构, 紧密连接较正常组稍变短, 桥粒结构良好, 其他细胞器结构良好. 电镜下模型组紧密连接明显低于对照组, 具有显著性差异(0.50 μm±0.21 μm *vs* 0.78 μm±0.19 μm, t = 2.31, P<0.05, 图4).

3 讨论

NAFLD是遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 具体发病机制尚未明确, 但较为公认的机制

■**创新盘点**
本研究在于探讨NAFLD大鼠肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin的表达及与TNF-α的关系, 为NAFLD的发病机制提出了新论点和依据. 国内外尚无此方面的报道.

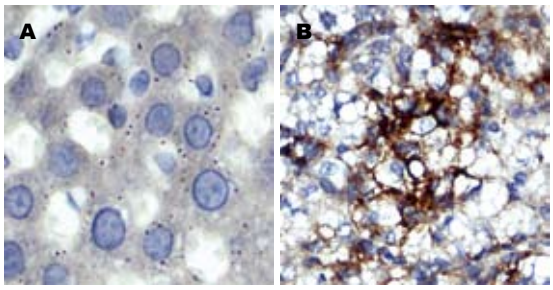


图 2 两组大鼠肝脏组织TNF-α表达(免疫组织化学×400). A: 对照组; B: 模型组.

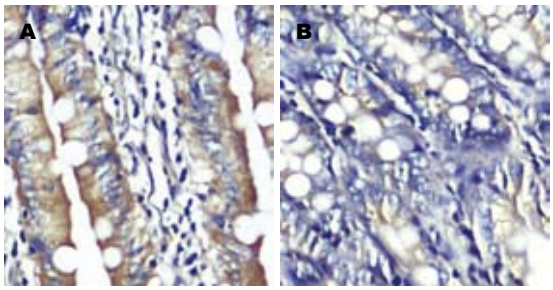


图 3 肠黏膜上皮细胞Occludin蛋白表达(免疫组织化学×400). A: 对照组; B: 模型组.

为“二次打击”学说: 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)引起的肝细胞内脂肪过度积聚及肝细胞对损害因子的敏感性增加是NAFLD形成的“第一次打击”, 是肝内脂肪积聚的关键机制; “第一次打击”将促进“第二次打击”发生, 导致肝细胞损伤、炎症及纤维化形成, 诱导肝细胞损伤的两条主要途径是氧应激诱导的脂质过氧化和细胞因子介导的损伤. 此外, 肠道细菌产生的ET可能作为“第二次打击”的因素参与NAFLD的发病. 传统上认为如果肝脏能够适应脂肪变性的发生, 则仅表现为脂肪变性, 如果肝脏不能够适应, 在有其他病理生理异常的情况下将发生非酒精性脂肪性肝炎, 甚至肝硬化及肝癌[10]. 西方国家NAFLD患病率约20%-30%, 亚太地区接近12%-24%[11], 其中约10%的患者发展成NASH, NASH中近30%的患者可进展为肝硬化, 或者发生终末期的肝功能衰竭, 需行肝脏移植手术[12]. 单纯性脂肪肝的近期预后良好, 而NASH的长期预后并不优于HCV引起的肝硬化[13].

正常情况下, 少量肠源性ET经门脉系统入肝, 主要由库普弗细胞(Kupffer cell, KC)吞噬清除, 维持肝脏内环境的稳定. 但在多种肝脏疾病时, 因肠道功能紊乱、KC功能受损和/或侧枝循环形成等多种因素作用, ET产生增加, 不能被有效清除而进入体循环, 从而形成肠源性ET血症[14]. 由“二次打击”学说可以看出, ET在

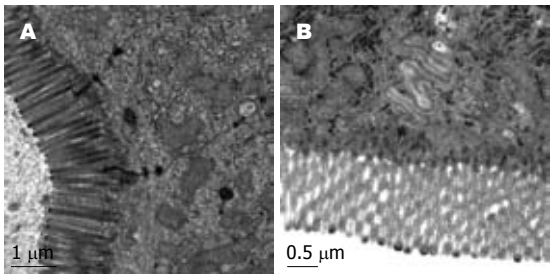


图 4 两组肠黏膜上皮细胞间紧密连接的电镜下表现. A: 对照组; B: 模型组.

NASH的发病机制中起重要作用. 其一方面通过直接细胞毒性作用, 诱导细胞凋亡、坏死. 更为重要的是, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与受体结合诱导以KC为主的肝脏间质细胞活化, 产生释放IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α等炎症因子以及一氧化氮(NO)、氧自由基等生物活性物质, 构成炎症介质网络, 扩大LPS作用, 促进NASH的发生发展[15,16].

TNF-α是一种促炎性细胞因子, 在免疫反应、炎症和对损伤反应中起重要作用, 正常情况下主要是由脂肪组织产生, 其血清水平与机体的脂肪含量和胰岛素敏感性相关. 有研究发现, 脂酶活性抑制和IR导致的肝细胞内脂肪积累可能是NAFLD发病关键环节, 而TNF-α基因表达水平增加可以抑制脂肪组织的脂酶活性, 而导致血清中三酰甘油浓度的升高[17,18], 还可诱导IL-1、IL-6等细胞因子的产生, 共同参与肝损害. 另外还可引起中性粒细胞趋化, 进而导致肝脏炎症反应, 并通过脂质过氧化使细胞受损, 最终导致肝细胞坏死[19]. 本研究NAFLD大鼠血清及肝脏组织TNF-α水平均高于对照组, 提示TNF-α参与了高脂饮食脂肪肝损伤过程. 最近越来越多的研究表明, TNF-α还可以增加肠上皮细胞细胞旁的通透性[20], 降低肠上皮细胞屏障的跨上皮电阻, 并认为这是TNF-α引起肠黏膜屏障通透性增高的主要原因[4,21].

肠黏膜屏障在保护机体免受食物抗原、微生物及其产生的有害代谢产物的损害, 保持机体内环境的稳定方面起重要作用[22-24]. 正常情况下肠黏膜具有完善的机械屏障, 以抵御较强的刺激和正常菌群的侵犯. 机械屏障由肠黏膜表面黏液、微绒毛、上皮细胞及其间的紧密连接以及黏膜的特殊结构组成[25]. 多种炎症因子可损害肠上皮细胞屏障功能, 导致肠黏膜通透性增高, 包括ET、TNF-α、γ-干扰素等. 肠上皮细胞间连接由紧密连接、黏附连接、缝隙连

接等构成. 紧密连接为一狭窄的带状结构, 位于上皮细胞膜外侧的顶部, 相邻细胞互相包裹, 形成融合点或吻合点, 连接起来就形成一个连续的渔网状结构. 紧密连接是肠上皮细胞间的主要连接方式, 对维持上皮细胞极性及调节肠屏障的通透性发挥着重要的作用. 紧密连接主要由Claudin蛋白、Occludin蛋白、JAM、ZOs等结构蛋白及各类连接蛋白分子共同组成[26,27]. Occludin蛋白作为紧密连接蛋白之一, 相对分子质量为65 kDa, 4个跨膜结构将Occludin分为2个细胞外环和2个细胞内环, 相邻细胞就是通过外环以拉链状结合而封闭细胞旁间隙[28-30]. 低氧、炎性因子刺激等病理情况可引起Occludin等分布异常、表达减少, 导致紧密连接结构和功能异常, 细胞间隙增宽, 从而导致内皮间通透性升高[31,32]. 有学者[33]认为缺乏Occludin则不能形成典型的紧密连接结构. 维持肠上皮的完整性对于保护肠道屏障功能、防止细菌内毒素及毒性大分子物质进入体内具有重要意义.

本研究发现NAFLD大鼠小肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin的表达下降, 紧密连接明显缩短, 提示肠道机械屏障受损在NAFLD的病理生理机制中发挥一定的作用, 为临床预防和治疗NAFLD提供了一种可能的途径. 既往体外研究证实TNF-α能降解紧密连接蛋白[34], 抑制Occludin的表达[35], 使肠道上皮细胞的通透性增加. 本研究高脂饮食脂肪肝大鼠血及肝脏TNF-α水平增高, 而肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin表达下降, 提示NAFLD大鼠肠上皮紧密连接蛋白Occludin表达下降与TNF-α升高存在一定的相关性. TNF-α可能抑制了小肠上皮细胞中紧密连接蛋白Occludin的表达, 从而破坏了肠黏膜机械屏障, 促进NAFLD的发生及发展. 肠上皮细胞间紧密连接带破坏、肠黏膜通透性增高、小肠细菌过度繁殖(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)、内毒素及TNF-α的产生、肠腔内乙醇产物增加、高脂饮食及果糖摄入过多、抗氧化物水平降低等, 通过肠-肝对话诱致肝细胞脂变、肝性IR、氧化应激及亚临床系统性炎症的发生和发展. 而内脏肥胖、脂肪肝和IR都是前炎状态, 其特点是促炎因子增多及选择性巨噬细胞浸润(第二次打击), 内脏脂肪和肝脏通过对脂肪酸的转运和处理进行对话, 由此扩大代谢-炎症及代谢-免疫的相互关联, 介导肝性IR、NASH、代谢综合征(metabolism syndrome, MS)及心血管疾病的发生[13]. 目前NAFLD尚无特效治疗药物, 本实验为NAFLD的治疗提供了方向.

■应用要点

本研究高脂饮食脂肪肝大鼠血及肝脏TNF-α水平增高, 而肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin表达下降, 提示NAFLD大鼠肠上皮紧密连接蛋白Occludin表达下降与TNF-α升高存在一定的相关性. TNF-α可能抑制了小肠上皮细胞中紧密连接蛋白Occludin的表达, 从而破坏了肠黏膜机械屏障, 促进NAFLD的发生及发展.

4 参考文献

1 Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002; 60: 289-293

2 Pinkoski MJ, Droin NM, Green DR. Tumor necrosis factor alpha up-regulates non-lymphoid Fas-ligand following superantigen-induced peripheral lymphocyte activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 42380-42385

3 Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, Mankertz J, Fromm M, Wagner S, Riecken EO, Schulzke JD. Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 270-274

4 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172

5 Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 2004; 116: 14-18

6 Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G367-G376

7 Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211

8 马力, 崔巍, 鲁学恒. 实验性肝硬化大鼠肠上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin表达下降. 中国组织化学与细胞化学杂志 2007; 16: 416-418

9 崔巍, 王颖, 马力, 闻颖, 刘沛. 肿瘤坏死因子α对暴发性肝衰竭小鼠肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的影响. 中华内科杂志 2007; 46: 478-481

10 丁晓东, 范建高. 非酒精性脂肪性肝病的发生机制. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 15-20

11 Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, Sollano JD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 775-777

12 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219

13 曾民德. 非酒精性脂肪性肝病研究的关切点. 肝脏 2009; 14: 321-324

14 Enomoto N, Ikejima K, Bradford BU, Rivera CA, Kono H, Goto M, Yamashina S, Schemmer P, Kitamura T, Oide H, Takei Y, Hirose M, Shimizu H, Miyazaki A, Brenner DA, Sato N, Thurman RG. Role of Kupffer cells and gut-derived endotoxins in alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D20-D25

15 Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? *Gut* 2002; 50: 585-588

16 Zhang H, Li Y, Wang S, Zhang K, Li L, Wu X. LPS-induced NF-kappa B activation requires Ca2+ as a

■同行评价
本研究选题和思路都很好, 从总体的讨论和实验过程来看, 值得肯定, 有较好的学术价值.

mediator in isolated pancreatic acinar cells of rat. *Chin Med J* (Engl) 2003; 116: 1662-1667
17 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
18 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
19 范建高, 曾民德. 脂肪肝. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 69
20 Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 3218-3234
21 Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 193-203
22 武金宝, 王继德, 张亚历. 肠黏膜屏障研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 619-623
23 Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000; 49: 306-313
24 Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 145-153
25 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002; 10: 3-6
26 Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550
27 宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF-α影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1303-1306
28 Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeansonne B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1227-1237
29 Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 2000; 275: 29816-29822
30 Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 1999; 9: 268-273
31 Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52: 439-451
32 高志光, 秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的生物学功能及在肠屏障中的作用. 肠外与肠内营养 2005; 12: 299-302
33 Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 1998; 141: 397-408
34 Patrick DM, Leone AK, Shellenberger JJ, Dudowicz KA, King JM. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC Physiol* 2006; 6: 2
35 Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 11): 2085-2090

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28,《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务, 出版各类文章774篇, 全部经过同行专家评议. 其中评论性文章158篇(20.41%), 原创性文章237篇(30.62%), 研究快报91篇(11.76%), 临床经验253篇(32.69%), 病例报告13篇(1.68%), 会议纪要2篇(0.26%).

2010年, 《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 987-992
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

姜黄素对大鼠肝缺血再灌注早期肝组织一氧化氮表达的影响

向进见, 田 夫, 李文岗, 李明忠, 蒋雪峰, 程本静

向进见, 田夫, 李明忠, 蒋雪峰, 程本静, 长江大学附属第一医院普通外科3病区 湖北省荆州市 434000
李文岗, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科 福建省厦门市 361000
向进见, 博士, 主治医师, 主要从事肝脏保护、肝癌临床综合治疗方面的研究.
作者贡献分布: 此课题由向进见与田夫设计; 动物模型的建立及取材由向进见、李文岗、李明忠及蒋雪峰完成; 指标检测由向进见与程本静完成; 数据分析及论文写作由向进见完成.
通讯作者: 田夫, 主任医师, 434000, 湖北省荆州市, 长江大学附属第一医院普通外科3病区. futian56734@126.com
电话: 0716-8115027
收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-02-07
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Curcumin reduces hepatic nitric oxide production in early-stage ischemia/reperfusion in rats

Jin-Jian Xiang, Fu Tian, Wen-Gang Li, Ming-Zhong Li, Xue-Feng Jiang, Ben-Jing Cheng

Jin-Jian Xiang, Fu Tian, Ming-Zhong Li, Xue-Feng Jiang, Ben-Jing Cheng, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China
Wen-Gang Li, Department of Vascular-Hepatic-Biliary-Pancreatic Surgery, the First Hospital of Xiamen Affiliated to Fujian Medical University, Xiamen 361000, Fujian Province, China
Correspondence to: Fu Tian, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China. futian56734@126.com
Received: 2010-01-08 Revised: 2010-02-07
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of curcumin on the microcirculation in early-stage ischemia/reperfusion injury in rats.

METHODS: Wistar rats were randomized into three groups: sham-operation group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group (treated with 1 mL of DMSO twice) and curcumin group (treated with 40 mg/kg of curcumin twice). The level of serum transaminase, the content of hepatic nitric oxide (NO), and the expression of nitric oxide synthase (NOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNAs in liver tissue were determined to evaluate the effects of curcumin on the microcirculation in early-stage ischemia/reperfusion (reperfusion for 1 h and 3 h).

RESULTS: Compared with the DMSO group, curcumin decreased the levels of serum alanine transaminase (603.8 U/L ± 64.5 U/L *vs* 758.1 U/L ± 114.7 U/L and 837.1 U/L ± 33.3 U/L *vs* 1012.7 U/L ± 119.8 U/L, respectively; both $P < 0.01$) and aspartate aminotransferase (605.7 U/L ± 65.7 U/L *vs* 779.5 U/L ± 124.3 U/L and 849.6 U/L ± 36.0 U/L *vs* 1027.8 U/L ± 139.8 U/L, respectively; both $P < 0.01$), relieved hepatic pathological damage, reduced the content of NO (0.455 ± 0.056 *vs* 0.594 ± 0.087 and 0.492 ± 0.040 *vs* 0.671 ± 0.079, respectively; both $P < 0.01$) derived from iNOS, and down-regulated the expression of iNOS mRNA (0.426 ± 0.075 *vs* 0.569 ± 0.073 and 0.527 ± 0.066 *vs* 0.702 ± 0.089, respectively; both $P < 0.01$) in the liver tissue in early-stage ischemia/reperfusion (reperfusion for 1 h and 3 h).

CONCLUSION: Curcumin can relieve hepatic cell injury by decreasing the content of NO derived from iNOS and reducing hepatic microcirculation disturbance in early-stage ischemia/reperfusion injury in rats.

Key Words: Curcumin; Nitric oxide; Rat; Reperfusion injury; Microcirculation

Xiang JJ, Tian F, Li WG, Li MZ, Jiang XF, Cheng BJ. Curcumin reduces hepatic nitric oxide production in early-stage ischemia/reperfusion in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 987-992

摘要

目的: 探讨姜黄素对大鼠肝脏缺血再灌注早期损伤微循环的影响.

方法: 将大鼠随机分为假手术组、对照组和实验组(姜黄素40 mg/kg, 2次给药). 通过检测再灌注早期1、3 h血清转氨酶水平、肝组织中一氧化氮(nitricoxide, NO)、一

■背景资料
自20世纪70年代以来, 国内外对姜黄素的药理作用及临床应用方面做了大量研究, 表明其具有抗炎、抗氧化、抗突变、抗血小板聚集、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等作用. 姜黄素已应用于心脏、肾、肠、肝和脑等脏器缺血再灌注损伤的研究.

■同行评议者
周伟平, 教授, 上海东方肝胆外科医院肝外三科

■研发前沿
姜黄素有着广泛的药理作用, 已用于心、脑、肾、肝等脏器缺血再灌注损伤的研究, 但其作用机制仍需要进一步研究.

氧化氮合酶(nitricoxide synthase, NOS), 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitricoxide synthase, iNOS)mRNA及内皮型一氧化氮合酶(endothelium nitricoxide synthase, eNOS) mRNA水平, 以及肝组织病理学检查来评价姜黄素对大鼠肝脏缺血再灌注早期损伤微循环的影响.

结果: 相对于对照组, 姜黄素可降低大鼠肝脏缺血再灌注早期损伤1、3 h血清谷丙转氨酶(ALT)的水平(603.8 U/L±64.5 U/L *vs* 758.1 U/L±114.7 U/L, 837.1 U/L±33.3 U/L *vs* 1012.7 U/L±119.8 U/L, 均P<0.01)和谷草转氨酶(AST)的水平(605.7 U/L±65.7 U/L *vs* 779.5 U/L±124.3 U/L, 849.6 U/L±36.0 U/L *vs* 1027.8 U/L±139.8 U/L, 均P<0.01); 改善肝组织病理学损害; 减少肝脏缺血再灌注早期损伤1、3 h肝组织由iNOS产生的NO蛋白水平(0.455±0.056 *vs* 0.594±0.087, 0.492±0.040 *vs* 0.671±0.079, 均P<0.01); 降低肝脏缺血再灌注早期损伤1、3 h肝组织iNOS mRNA的表达强度(0.426±0.075 *vs* 0.569±0.073, 0.527±0.066 *vs* 0.702±0.089, 均P<0.01).

结论: 姜黄素可通过减轻肝组织中由iNOS产生的NO生成, 来改善肝缺血再灌注早期损伤中微循环的紊乱, 从而减少对肝缺血再灌注肝实质细胞的损伤.

关键词: 姜黄素; 一氧化氮; 大鼠; 再灌注损伤; 微循环

向进见, 田夫, 李文岗, 李明忠, 蒋雪峰, 程本静. 姜黄素对大鼠肝缺血再灌注早期肝组织一氧化氮表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 987-992
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/987.asp

0 引言

一氧化氮(nitricoxide, NO)是一种具有多种生物活性的小分子物质, 参与多种生理及病理过程, 他与肝缺血再灌注(hepatic ischemia reperfusion, HIR)损伤密切相关. 本研究从肝组织NO、一氧化氮合酶(nitricoxide synthase, NOS)及NOS mRNA水平的改变来探讨姜黄素(curcumin)对大鼠实验性HIR早期损伤微循环的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD大鼠, 雌雄不限, 体质量240 g±20 g, 购于武汉大学人民医院动物室; 姜黄素购于美国Sigma公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于武汉天源生物有限公司; 一氧化氮试剂盒、一氧化氮合酶试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购于南京建成生物工程公司; 根据美国国立图书馆NCBI中GenBank提供的诱导型一氧化氮合酶(inducible nitricoxide synthase, iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(endothelium nitricoxide synthase, eNOS)和三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)三者cDNA序列, 参照相关文献由上海赛百盛公司合成下列引物序列, 其中iNOS生产编号: 0517-07, eNOS生产编号: 0830-01, GAPDH生产编号: 0517-05; iNOS上游引物为TTCTTTGCTTCTGTGCTAATGCG, 下游引物为GTTGTTGCTGAACTTCCAATCGT, 扩增长度1 061 bp; eNOS上游引物为TGGGCAGCATCACCTACGATA, GGAACCACTCCTTTTGATCGAGTTAT, 扩增长度202 bp; GAPDH上游引物为TCCCTCAAGATTGTCAGCAA, 下游引物AGATCCACAACGGATACATT, 扩增长度309 bp.

1.2 方法

1.2.1 HIR模型的建立: 大鼠术前12 h禁食, 不禁水. 腹腔内注射20%乌拉坦溶液5 mL/kg麻醉, 然后上腹部正中切口开腹, 分离门静脉和肝动脉主干、左右分支和肠系膜上静脉. 经肠系膜上静脉分支插管, 用小血管夹夹闭肝左中叶脉管以阻断左中叶血供, 造成左中叶肝缺血. 1 h后松开小血管夹, 恢复血流, 形成再灌注. 操作过程中所有动物注意保温且经插管注射37 ℃生理盐水8 mL/kg, 以保持血液动力学的稳定.

1.2.2 分组: 将48只大鼠按随机数字表随机分为假手术组、对照组和实验组. 假手术组不给药, 除不夹闭肝左中叶脉管外, 手术过程同上述模型. 对照组分别于左中肝血流阻断前30 min和再灌注开始时经肠系膜上静脉分支插管注入DMSO 1 mL, 同样情况下, 实验组按姜黄素40 mg/kg量溶于DMSO 1 mL注入.

1.2.3 标本收集: (1)假手术组开腹及游离血管后1 h(n = 8)、3 h(n = 8)取肝左中叶于-70 ℃冰箱保存待用, 同时经肝上下腔静脉取血2 mL, 离心, 取血清, 置4 ℃冰箱备用; (2)对照组和实验组肝脏再灌注1 h(n = 8)、3 h(n = 8)取肝左中叶于-70 ℃冰箱保存待用, 同时经肝上下腔静脉取血2 mL后离心, 取血清, 置4 ℃冰箱备用.

1.2.4 指标检测: 血清谷丙转氨酶(alanine transarninase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)含量由医院检验科检测. 取适量肝组织制成10%匀浆, 再取适量10%匀浆

表 1 姜黄素对大鼠实验性HIR血清转氨酶的影响 (U/L)

血清转氨酶	假手术组	对照组	实验组	*F*值
ALT				
1 h	85.2 ± 12.3	758.1 ± 114.7[b]	603.8 ± 64.5[bd]	285.265
3 h	93.6 ± 13.1	1 012.7 ± 119.8[b]	837.1 ± 33.3[bd]	88.925
AST				
1 h	88.6 ± 6.5	779.5 ± 124.3[b]	605.7 ± 65.7[bd]	259.272
3 h	103.6 ± 13.0	1 027.8 ± 139.8[b]	849.6 ± 36.0[bd]	115.119

[b]*P*<0.01 *vs* 假手术组; [d]*P*<0.01 *vs* 对照组; TNOS: 总NOS.

表 2 姜黄素对大鼠实验性HIR肝组织中NO、NOS的影响

	假手术组	对照组	实验组	*F*值
NO(μmol/g · prot)				
1 h	0.48 ± 0.04	0.38 ± 0.03[a]	0.30 ± 0.05[cb]	38.292
3 h	0.47 ± 0.03	0.29 ± 0.04[c]	0.25 ± 0.03[cb]	95.428
TNOS(U/mg · prot)				
1 h	0.409 ± 0.068	0.712 ± 0.111[c]	0.526 ± 0.057[cb]	28.247
3 h	0.408 ± 0.075	0.754 ± 0.069[c]	0.565 ± 0.062[cd]	50.720
iNOS(U/mg · prot)				
1 h	0.333 ± 0.050	0.594 ± 0.087[c]	0.455 ± 0.056[cd]	31.015
3 h	0.337 ± 0.033	0.671 ± 0.079[c]	0.492 ± 0.040[cd]	75.343
eNOS(U/mg · prot)				
1 h	0.081 ± 0.010	0.081 ± 0.013	0.083 ± 0.011	0.056
3 h	0.083 ± 0.010	0.078 ± 0.009	0.087 ± 0.013	1.351

[a]*P*<0.05, [b]*P*<0.01 *vs* 假手术组; [c]*P*<0.05, [d]*P*<0.01 *vs* 对照组; TNOS: 总NOS.

■相关报道
有实验表明姜黄素可抑制由脂多糖激活的小胶质细胞iNOS的表达. Chan等研究口服(92 mg/kg)姜黄素对脂多糖(LPS)诱导的小鼠肝损害的作用时, 发现其可降低肝脏50%-70% iNOS mRNA的表达.

与生理盐水按1∶9稀释成1%匀浆, 分别用于测定NO、NOS与总蛋白质含量. NO、NOS及总蛋白含量均按试剂盒说明测定. 采用RT-PCR法检测肝组织中的iNOS mRNA、eNOS mRNA含量.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示, 用SPSS10.0软件进行统计学分析. 组间比较采用One-way ANOVA法, 其中两组间比较采用S-N-K法.

2 结果

2.1 姜黄素对大鼠实验性HIR 1、3 h血清转氨酶的影响 对照组1、3 h血清ALT、AST含量较假手术组明显升高(*P*<0.01, 表1), 实验组1、3 h血清ALT、AST含量低于对照组, 有统计学差异(*P*<0.01, 表1).

2.2 病理学检查结果 假手术组1、3 h肝组织HE染色结果类似(图1A), 可见肝索排列整齐, 肝窦形态正常, 无狭窄与扩张, 肝细胞边界清楚、形态正常. 对照组1 h肝组织肝索排列部分紊乱, 肝窦扩张明显, 部分肝细胞边界不清、空泡变性(图1B); 对照组3 h肝组织肝索排列明显紊乱, 肝窦形态不规则, 部分内皮细胞脱落, 有少量中性粒细胞浸润, 可见少量肝细胞核消失(图1C). 实验组1、3 h肝组织肝索排列尚整齐; 但可见肝窦轻度扩张, 3 h组扩张较1 h组明显; 肝细胞边界形态尚清楚、正常; 未见中性粒细胞浸润(图1D, E).

2.3 NO及NOS水平 姜黄素对大鼠实验性HIR 1、3 h肝组织NO及NOS水平的影响见表2.

2.4 iNOS mRNA、eNOS mRNA表达强度 假手术组1、3 h肝组织中iNOS mRNA无表达; 实验组1、3 h均低于对照组肝组织中iNOS mRNA表达, 差异有统计学意义(*P*<0.01, 表3, 图2). 假手术组、对照组和实验组1、3 h肝组织中eNOS mRNA表达无明显区别, 差异无统计学意义(*P*>0.05, 表3, 图2).

3 讨论

HIR损伤常存在于肝切除、肝移植术、外伤和

■**创新盘点**
本研究探讨姜黄素对肝脏诱导型一氧化氮合酶的表达影响，结果表明姜黄素可降低诱导型一氧化氮合酶的表达，从而改善了肝缺血再灌注早期损伤中微循环的紊乱.

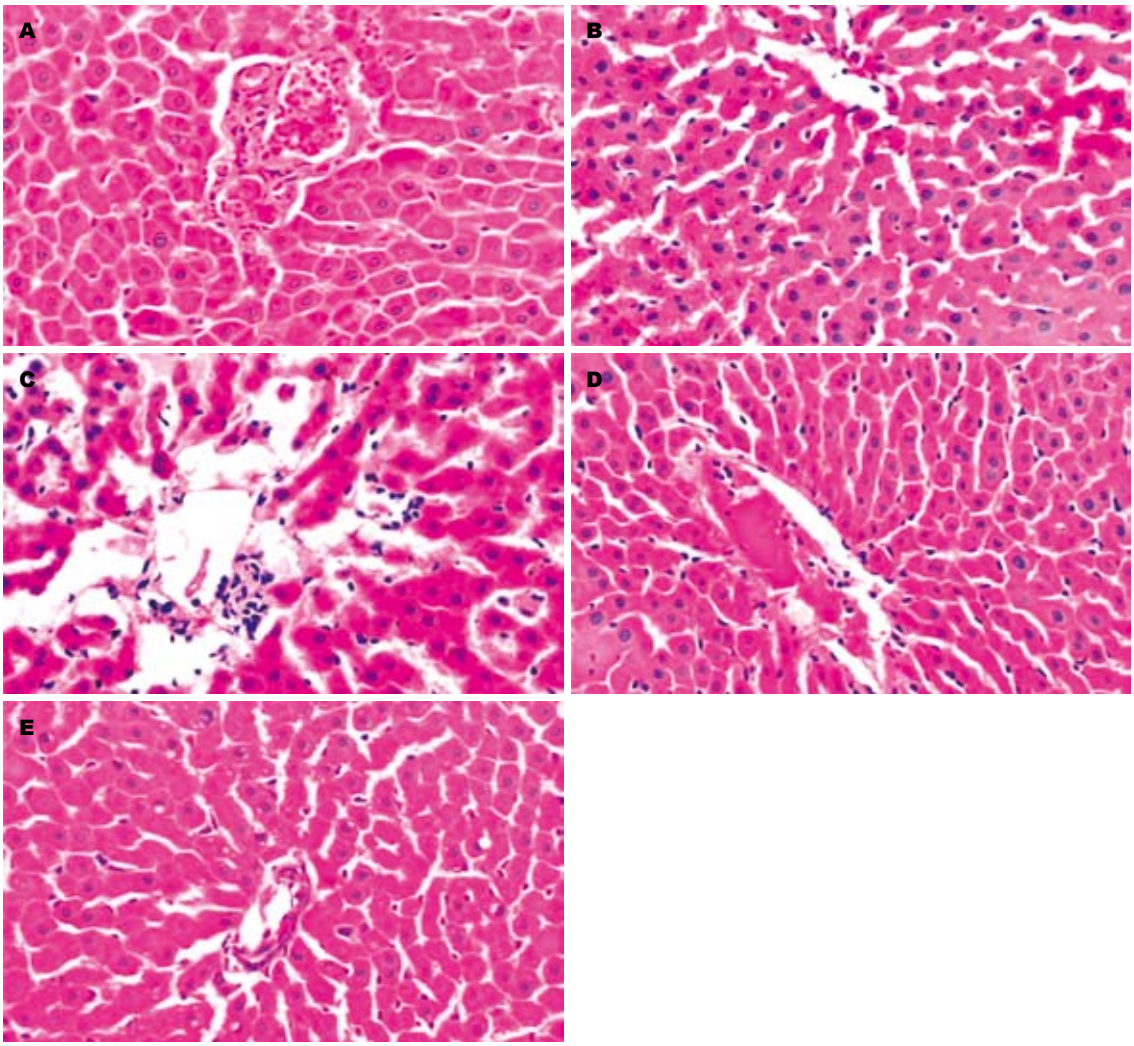


图 1 各组肝组织病理学(HE × 200). A: 假手术组; B, C: 对照组; D, E: 实验组; B, D: 1 h; C, E: 3 h.

表 3 姜黄素对大鼠实验性HIR肝组织中iNOS mRNA、eNOS mRNA表达强度的影响

	假手术组	对照组	实验组	*F*值
iNOS /GAPDH				
1 h	0	0.569 ± 0.073[b]	0.426 ± 0.075[bd]	193.560
3 h	0	0.702 ± 0.089[b]	0.527 ± 0.066[bd]	261.770
eNOS/GAPDH				
1 h	0.102 ± 0.019	0.102 ± 0.024	0.106 ± 0.019	0.092
3 h	0.106 ± 0.016	0.103 ± 0.020	0.104 ± 0.013	0.917

[b]$P<0.01$ *vs* 假手术组; [d]$P<0.01$ *vs* 对照组.

休克中，可造成肝脏功能的损害. HIR损伤主要由肝脏微循环障碍引起[1]. 肝缺血再灌注损伤又包括肝早期缺血再灌注损伤(再灌注6 h内，主要在前2 h内)和肝晚期再灌注损伤(再灌注6 h以后，主要在18-24 h)[2-4]. 在肝脏早期(<6 h)缺血再灌注损伤中，肝脏微循环障碍主要因收缩和舒张血管的物质产生不平衡引起. 目前研究在HIR损伤中起作用的收缩和舒张血管的物质主要包括NO、ET、CO、前列腺素E1(prostaglandin E-1, PGE-1)等[5,6]. NO对HIR损伤中微循环的调节起着重要的作用. NOS在机体内有3种异构酶: iNOS、cNOS/eNOS和nNOS，肝脏中主要存在前两种. 目前认为NO在HIR中作用取决于生成NO的NOS的类型、部位和酶的活性有关. 一般认为

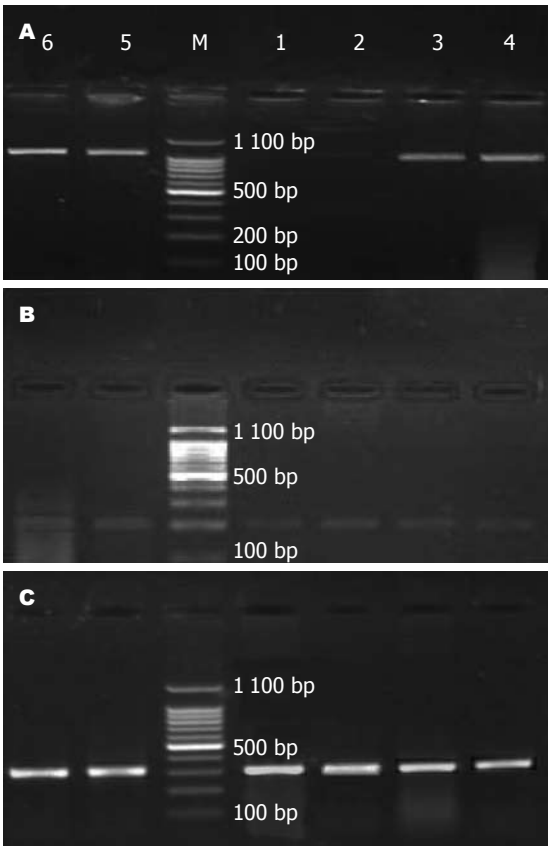


图 2 肝组织iNOS mRNA、eNOS及内参GAPDH的PCR电泳图. A: iNOS mRNA; B: eNOS; C: 内参GAPDH; 1, 2: 假手术组1、3 h; 3, 4: 实验组1、3 h; 5, 6: 对照组1、3 h; M: Marker.

在iNOS作用下产生的NO对肝脏有损害作用, 而在eNOS作用下产生的NO对肝脏有保护作用[6-8].

本实验对照组相对于假手术组, 肝组织中的总NOS(TNOS)含量增加, 但NO含量下降, 这是因为在肝脏缺血低氧状态下, 肝组织中NO合成所必需的*L*-Arg酶、NADPH和O_2不足导致[9]. 姜黄素是从中药姜黄中提取的酚类化合物, 他不仅可作为色素添加剂, 还有着广泛的药理作用: 抗炎[10,11]、抗氧化[12,13]、抗突变[14]、抗血小板聚集[15]、降血脂[16]、抗动脉粥样硬化[17]和抗肿瘤[18-20]等. 有实验表明姜黄素可抑制由脂多糖激活的小胶质细胞iNOS的表达[21]. Chan等[22]研究口服(92 mg/kg)姜黄素对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠肝损害的作用时, 发现其可降低肝脏50%-70% iNOS mRNA的表达. 有研究表明姜黄素对心、肾、脑、肝脏等脏器的缺血再灌注损伤有保护作用[23-27].

本实验研究表明, 姜黄素可抑制大鼠HIR 1、3 h的肝组织中iNOS mRNA表达, 而对eNOS mRNA表达无影响, 从而降低了肝组织中TNOS的含量, 最终导致姜黄素组1、3 h肝组织中的NO水平较对照组水平更低. 本实验说明, 姜黄素通过抑制iNOS所产生的NO, 从而减轻了大鼠早期HIR损伤肝组织微循环紊乱, 进而对大鼠早期HIR损伤肝组织起到了抑制作用.

■同行评价
本研究实验设计合理, 能从机制上初步证实姜黄素对肝脏的保护作用, 有较好的理论价值.

4 参考文献

1 Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145: 1421-1431
2 Arii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 189-194
3 Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988; 81: 1240-1246
4 Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991; 15: 277-284
5 Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 86-93
6 Hossain MA, Izuishi K, Maeta H. Effect of short-term administration of prostaglandin E1 on viability after ischemia/reperfusion injury with extended hepatectomy in cirrhotic rat liver. *World J Surg* 2003; 27: 1155-1160
7 Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, Traynor O, Geoghegan J, Hegarty JE, O'Farrelly C. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 250-256
8 Taniai H, Hines IN, Bharwani S, Maloney RE, Nimura Y, Gao B, Flores SC, McCord JM, Grisham MB, Aw TY. Susceptibility of murine periportal hepatocytes to hypoxia-reoxygenation: role for NO and Kupffer cell-derived oxidants. *Hepatology* 2004; 39: 1544-1552
9 侍阳, 钱海鑫, 秦磊, 周晓俊. 大鼠肝缺血/再灌注后肝组织一氧化氮和不同亚型一氧化氮合酶的变化. 肝胆胰外科杂志 2008; 20: 13-15, 19
10 夏剑, 邓长生, 张明, 孙泽群, 姜华. 姜黄素对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜内NF-κB及TNF-α表达的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 255-257
11 Lal B, Kapoor AK, Asthana OP, Agrawal PK, Prasad R, Kumar P, Srimal RC. Efficacy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis. *Phytother Res* 1999; 13: 318-322
12 尹蓉, 王沁, 富翠芹. 姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1383-1387
13 Weber WM, Hunsaker LA, Abcouwer SF, Deck LM, Vander Jagt DL. Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 3811-3820
14 Nagabhushan M, Amonkar AJ, Bhide SV. In vitro antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol* 1987; 25: 545-547
15 Srivastava R, Dikshit M, Srimal RC, Dhawan BN. Anti-thrombotic effect of curcumin. *Thromb Res*

1985; 40: 413-417
16 Rukkumani R, Sri Balasubashini M, Vishwanathan P, Menon VP. Comparative effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on alcohol- and polyunsaturated fatty acid-induced hyperlipidemia. *Pharmacol Res* 2002; 46: 257-264
17 沃兴德, 洪行球, 赵革平, 唐利华. 姜黄素对低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢的影响. 中国动脉硬化杂志 1999; 7: 339-341
18 侯伟, 覃华, 刘南植, 刘爽, 王颖, 赵秋, 田德安. 姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2234-2238
19 Kuttan G, Vasudevan DM, Kuttan R. Isolation and identification of a tumour reducing component from mistletoe extract (Iscador). *Cancer Lett* 1988; 41: 307-314
20 Deeb D, Xu YX, Jiang H, Gao X, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. Curcumin (diferuloylmethane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 95-103
21 杨开艳, 顾建兰, 施建华, 沈勤. 姜黄素对脂多糖激活的小胶质细胞诱导型一氧化氮合酶表达的抑制作用. 江苏大学学报(医学版) 2007; 17: 105-110
22 Chan MM, Huang HI, Fenton MR, Fong D. In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1955-1962
23 Shahed AR, Jones E, Shoskes D. Quercetin and curcumin up-regulate antioxidant gene expression in rat kidney after ureteral obstruction or ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001; 33: 2988
24 Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Jensen MD, Shelat PB, Rottinghaus GE, MacDonald RS, Miller DK, Lubahn DE, Weisman GA, Sun GY. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J Neurosci Res* 2005; 82: 138-148
25 Yeh CH, Chen TP, Wu YC, Lin YM, Jing Lin P. Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2005; 125: 109-116
26 Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 2004; 74: 969-985
27 Shen SQ, Zhang Y, Xiang JJ, Xiong CL. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1953-1961

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录.《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊.《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology*, *WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 993-997
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

干细胞因子对糖尿病小鼠小肠平滑肌细胞慢波的影响

杨 琰, 余 跃, 高显奎, 陈 军, 王巧民

杨琰, 余跃, 高显奎, 陈军, 王巧民, 安徽医科大学附属省立医院消化内科 安徽省合肥市 230001
杨琰, 2008级在读硕士, 主要从事胃肠动力性疾病的研究.
安徽省自然科学基金资助项目, No. 070413142
作者贡献分布: 杨琰与余跃对此文所作贡献均等; 此课题由余跃教授与王巧民设计; 研究过程由杨琰、高显奎及陈军完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈军与高显奎提供; 数据分析由杨琰与陈军完成; 本论文写作由杨琰完成与余跃审校.
通讯作者: 余跃, 教授, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属省立医院消化内科.
yuyuemd@yahoo.com.cn
电话: 0551-2283380
收稿日期: 2010-01-05 修回日期: 2010-03-01
接受日期: 2010-03-09 在线出版日期: 2010-04-08

Effects of stem cell factor on the slow waves in intestinal smooth muscle of diabetic mice

Yan Yang, Yue Yu, Xian-Kui Gao, Jun Chen, Qiao-Min Wang

Yan Yang, Yue Yu, Xian-Kui Gao, Jun Chen, Qiao-Min Wang, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 070413142
Correspondence to: Professor Yue Yu, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. yuyuemd@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-05 Revised: 2010-03-01
Accepted: 2010-03-09 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To explore the effects of stem cell factor (SCF) on the slow waves in duodenal smooth muscle of diabetic mice.

METHODS: Diabetes mellitus (DM) was induced in Balb/c male mice by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 150 mg/kg, ip). Mice were then divided into three groups (n = 6 per group): normal control group, DM model group and SCF treatment group. The SCF treatment group was given SCF 0.20 μg/(kg•d, ip), while the normal control group and DM model group were given equal volume of phosphate buffer solution (pH7.40). After six weeks of intervention, all the mice were given Indian ink for determination of the small intestinal transit rate. The changes in the slow waves in duodenal smooth muscle were recorded.

RESULTS: Small intestine transit rate was significantly reduced in the DM model group when compared with the normal control group (44.05% ± 5.48% *vs* 82.75% ± 6.56%, P < 0.01). Small intestine transit rate in the SCF treatment group was significantly higher than that in the DM model group (75.89% ± 3.61% *vs* 44.05% ± 5.48%, P < 0.01), but lower than that in the normal control group (75.89% ± 3.61% *vs* 82.75% ± 6.56%, P < 0.05). Compared with the normal control group, the frequency and amplitude of slow waves in duodenal smooth muscle were significantly reduced in the DM model group (13.33 ± 4.27 *vs* 30.67 ± 3.33 and 5.17 ± 3.71 *vs* 35.17 ± 3.71, respectively; both P < 0.01). The frequency and amplitude of slow waves in duodenal smooth muscle in the SCF treatment group were significantly higher than those in the DM model group (26.50 ± 1.87 *vs* 13.33 ± 4.27 and 27.50 ± 2.26 *vs* 15.17 ± 3.71, respectively; both P < 0.01), but lower than those in the normal control group (26.50 ± 1.87 *vs* 30.67 ± 3.33, P < 0.05; 27.50 ± 2.26 *vs* 35.17 ± 3.71, P < 0.01).

CONCLUSION: Exogenous SCF is able to improve duodenal motility in diabetic mice.

Key Words: Diabetes; Stem cell factor; Duodenum; Smooth muscle cell; Slow wave

Yang Y, Yu Y, Gao XK, Chen J, Wang QM. Effects of stem cell factor on the slow waves in intestinal smooth muscle of diabetic mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 993-997

摘要

目的: 探讨外源性干细胞因子(stem cell factor, SCF)对糖尿病(diabetes mellitus, DM)小鼠小肠动力障碍时小肠平滑肌细胞慢波的影响.

方法: ♂Balb/c小鼠一次性腹腔注射(ip)链脲佐菌素(STZ, 150 mg/kg)造模, 将小鼠分为正常组、DM组、DM+外源性SCF组(DM+SCF组);

■**背景资料**
胃肠动力障碍是糖尿病常见的慢性并发症之一, 深入研究胃肠动力障碍的机制, 并针对此寻求有效的治疗措施成为当今研究的重点.

■**同行评议者**
陆伦根, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

■研发前沿
近些年, 干细胞因子在Cajal间质细胞以及胃肠动力障碍中的病理机制成为研究热点.

DM+SCF组ip SCF 0.20 μg/(kg•d), 正常组和DM组每天ip等量的磷酸盐缓冲液(pH7.40). 所有小鼠干预6 wk结束后, 给予印度墨水灌胃测定小肠传输速率, 用微电极细胞内记录仪记录各组小鼠十二指肠平滑肌细胞内慢波的变化.

结果: DM组小肠推进率比正常组的明显降低(44.05%±5.48% *vs* 82.75%±6.56%, $P<0.01$); DM+SCF组比DM组的小肠推进率显著增加(75.89%±3.61% *vs* 44.05%±5.48%, $P<0.01$), 但比正常组的降低(75.89%±3.619% *vs* 82.75%±6.56%, $P<0.05$); DM组与正常小鼠相比, 十二指肠平滑肌细胞内慢波频率明显减慢(13.33±4.27 *vs* 30.67±3.33, $P<0.01$), 波幅明显减小(15.17±3.71 *vs* 35.17±3.71, $P<0.01$), 且波形杂乱不规则. DM+SCF组小鼠十二指肠平滑肌细胞内慢波频率和波幅比DM组增加(26.50±1.87 *vs* 13.33±4.27; 27.50±2.26 *vs* 15.17±3.71, 均$P<0.01$), 但比正常组减慢和降低(26.50±1.87 *vs* 30.67±3.33, $P<0.05$; 27.50±2.26 *vs* 35.17±3.71, $P<0.01$).

结论: 外源性SCF对DM小鼠的小肠动力障碍有一定的改善作用.

关键词: 糖尿病; 干细胞因子; 十二指肠; 平滑肌细胞; 慢波

杨琰, 余跃, 高显奎, 陈军, 王巧民. 干细胞因子对糖尿病小鼠小肠平滑肌细胞慢波的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 993-997
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/993.asp

0 引言

胃肠动力障碍是糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者的常见并发症之一, 其机制尚不清楚, 近年来研究认为[1], Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道的起搏细胞, ICC异常会影响平滑肌细胞内的慢波, 从而影响平滑肌正常的收缩运动, 导致整个胃肠动力障碍. 干细胞因子(stem cell factor, SCF)是ICC特异性标志物Kit受体的天然配体, 对ICC的增殖、分化和维持具有重要作用[2], 但对胃肠平滑肌慢波的影响国内外鲜见报道. 本研究通过记录DM小鼠十二指肠平滑肌细胞内慢波的变化, 以及外源性SCF干预后慢波的变化, 旨在明确外源性SCF能否改善DM小鼠小肠动力障碍.

■相关报道
Koth等的研究揭示出只有当ICC网络发育成熟时才可以记录到完整的慢波电位, 而ICC的生长发育、形态及功能的维持与SCF密切相关, 因此SCF正是通过改善ICC进而改善小肠平滑肌的慢波活动.

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c小鼠, ♂, 体质量18-22 g, 由安徽医科大学动物实验中心提供. 链脲佐菌素(streptozocin, STZ, Sigma, 美国), SCF(Sigma, 美国), 精蛋白锌胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司), 印度墨水(Solarbio cat, No.18060), 血糖仪(ACCU-CHEK, Active, 德国), 血糖试纸(ACCU-CHEK, 德国), 电极管(FHC, BOWDOINHAM, ME04008, 美国), 微电极拉制仪(NARISHIGE, 日本), 细胞内电流记录仪(Intra 767, 美国), 计算机信号采集分析系统(Powerlab/4sp, Australia), 微操仪(MC1000e, Controller, serial No.S1411).

1.2 方法

1.2.1 建立DM小鼠模型、分组及干预: 实验小鼠予一次性ip STZ(150 mg/kg)造模[3,4], 72 h后及1 wk后尾静脉采血, 2次随机血糖均≥12 mmol/L者为DM小鼠模型建立, 不符合条件者予以剔除. 将实验小鼠分为正常组(n = 6)、DM组(n = 6)和DM+外源性SCF干预组(DM+SCF组, n = 6). 干预(共6 wk): DM+SCF组给予SCF ip[0.20 μg/(kg•d)][5], 正常组和DM组每天ip等量的磷酸盐缓冲液(pH7.40), 6 wk结束.

1.2.2 一般状况: 造模成功后观察饮食、饮水、粪便, 毛色及精神情况, 每周称质量.

1.2.3 血糖值测定: 干预6 wk后各组小鼠测定血糖值.

1.2.4 小肠推进速率测定: 各组小鼠处死前予印度墨水10 mL/kg灌胃, 30 min后处死, 取出全胃肠道, 计算无张力下小肠推进率(墨水前端至幽门括约肌距离/小肠全长×100%)[6].

1.2.5 十二指肠平滑肌细胞内慢波记录: 开启稳压电源(220 V), 检查电路连线, 依次打开计算机、放大器、Powerlab信号采集系统, 仪器预热半小时, 电脑、灌流槽等妥善接地. 将小鼠脱臼处死, 剖腹迅速在靠近幽门处剪取1-2 cm的十二指肠肠段, 沿纵轴剖开肠管, 在装有Krebs液的烧杯内去除胃肠内容物. 将组织浆膜层面朝上平铺并固定于灌流槽中, 打开温水浴(37 ℃), 充氧, 打开灌流液开始灌流, 用镊子小心剥掉浆膜层, 待组织标本稳定1 h后, 用微操仪将充满KCl(3 mol/L)的微电极插入标本. 微电极拉制的电阻30-50 MΩ.

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 应用SPSS17.0统计软件进行处理, 多组资料间比较采用LSD检验分析, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般状况 造模成功后, DM小鼠出现多饮,

表 1 各组小鼠体质量、血糖的比较 (mean ± SD)

时间	分组	体质量(g)	血糖(mmol/L)
第1周	正常组	21.80 ± 2.03	8.28 ± 1.61
	DM组	21.43 ± 0.76	20.57 ± 3.99
	DM+SCF组	21.38 ± 0.81	17.95 ± 5.17
第6周	正常组	26.78 ± 2.09	9.38 ± 1.61
	DM组	15.42 ± 1.40[b]	26.77 ± 3.15[b]
	DM+SCF组	21.90 ± 2.70[d]	14.53 ± 5.65[c]

[b]P<0.01 *vs* 正常组或DM+SCF组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 正常组.

表 2 各组小鼠慢波频率, 波幅的比较 (mean ± SD)

分组	频率(次/分)	波幅(mV)
正常组	30.67 ± 3.33	35.17 ± 3.71
DM组	13.33 ± 4.27[b]	15.17 ± 3.71[b]
DM+SCF组	26.50 ± 1.87[c]	27.50 ± 2.26[d]

[b]P<0.01 *vs* 正常组或DM+SCF组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 正常组.

多食, 多尿, 消瘦, 精神萎靡, 行动迟缓, 毛色干枯, 无光泽. 干预6 wk后, DM+SCF组比DM组的多饮, 多食, 多尿症状减轻, 体质量明显增加(P<0.01), 精神状态好转, DM+SCF组体质量比正常组的降低(P<0.01, 表1).

2.2 血糖值测定结果 第6周DM组的血糖值显著高于正常组(P<0.01). DM+SCF组比DM组的血糖值显著降低(P<0.01), 但比正常组的升高(P<0.05, 表1).

2.3 小肠推进率测定 DM组的推进率比正常组的明显降低(44.05%±5.45% *vs* 82.75%±6.56%, P<0.01); DM+SCF组比DM组的推进率显著增加(75.89%±3.61% *vs* 44.05%±5.48%, P<0.01), 但比正常组的降低(75.89%±3.61% *vs* 82.75%±6.56%, P<0.05).

2.4 各组小鼠慢波变化 DM组的频率比正常组的显著降低(P<0.01); DM+SCF组比DM组的频率显著增加(P<0.01), 但比正常组的降低(P<0.05); DM组的波幅比正常组的明显降低(P<0.01); DM+SCF组比DM组的波幅显著增加(P<0.01), 但比正常组的降低(P<0.01, 图1, 表2).

3 讨论

胃肠动力障碍是临床常见的DM慢性并发症之一. DM患者中, 胃肠动力障碍的发病率为25%-76%[7]. DM胃肠动力障碍的病理生理特点是: 胃肠张力和收缩力低下、蠕动减慢、排空延迟[8], 其机制尚不清楚.

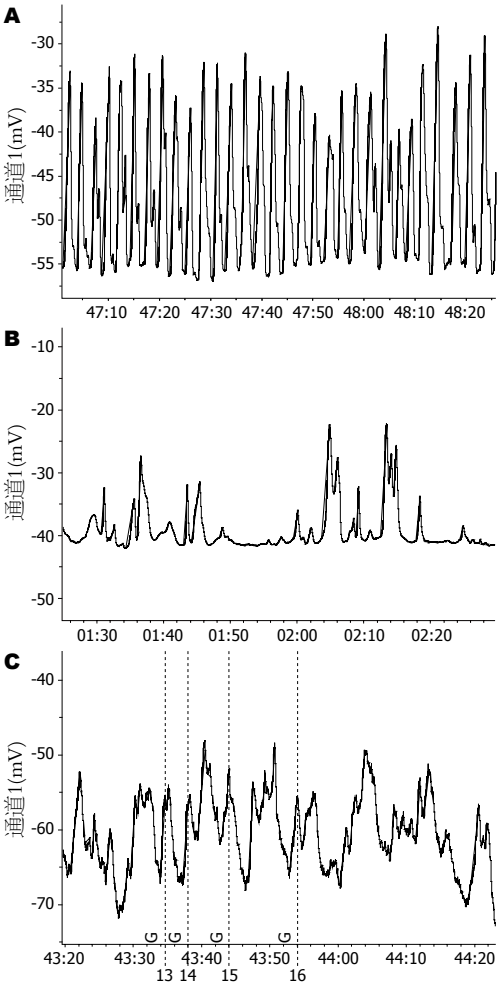


图 1 各组小鼠十二指肠平滑肌细胞内慢波. A: 正常组; B: DM组; C: DM+SCF组.

■创新盘点

应用外源性干细胞因子对平滑肌细胞慢波进行干预, 结果显示外源性干细胞因子对糖尿病小鼠的小肠动力障碍有一定的改善作用.

ICC是胃肠道运动起搏细胞, 且介导神经递质的产生和作用[9,10], ICC特异性表达酪氨酸激酶受体c-Kit, 其配体SCF[11]已被证实对ICC具有重要调控作用[12,13]. Kit是一种酪氨酸激酶受体, 而SCF是c-Kit受体的天然配体, 他与Kit结合组成Kit-SCF信号系统, 激活酪氨酸激酶, 导致一系列磷酸化过程. Kit-SCF信号系统参与了机体所有Kit阳性细胞的发育、分化、增殖等过程[14,15], 同样也与ICC的生长发育、形态及功能的维持关系密切[2,12].

胃肠ICC网络通过众多缝隙连接给邻近平滑肌细胞提供电流及起搏活动. 当ICC发出慢波, 通过缝隙连接传播至平滑肌细胞, 激活平滑肌细胞, 产生动作电位, 引起平滑肌收缩. 周吕、柯美云曾在《神经胃肠病学与动力》[16]中记录到胃肠道平滑肌的静息电位很不稳定, 波动较大, 其实测值一般为(-40 mV)-(-80 mV). 研究显示[17], 正常小鼠小肠ICC与平滑肌细胞慢波的频

■应用要点
本研究可能为临床治疗糖尿病胃肠动力障碍提供新的理论依据.

率一致, ICC慢波的波幅大于50 mV, 平滑肌细胞慢波的波幅一般在20-35 mV, 最大不超过50 mV. ICC异常可致胃肠道起搏功能和电兴奋传导减弱, 使平滑肌产生不规则慢波、收缩运动障碍、蠕动减少, 最终导致临床上出现胃肠动力障碍症状.

本研究发现, DM组的推进率比正常组的明显降低(P<0.01); DM+SCF组比DM组的推进率显著增加(P<0.01), 但比正常组的降低(P<0.05); 表明SCF能改善小肠动力, 促进小肠传输. 进一步观察到, DM组的频率比正常组的显著降低(P<0.01); DM+SCF组比DM组的频率显著增加(P<0.01), 但比正常组的降低(P<0.05); DM组的波幅比正常组的明显降低(P<0.01); DM+SCF组比DM组的波幅显著增加(P<0.01), 但比正常组的降低(P<0.01). 提示SCF通过改善小肠平滑肌的慢波活动来恢复正常的小肠运动, 这与国内外文献一致[18-20].

Ordög等[18]用c-Kit免疫染色揭示, DM小鼠模型中,胃体和胃窦部的ICC明显减少, 并以胃窦远端最为明显. 其肌间神经丛、环形肌和纵行肌内的ICC所占比例由11.2%±0.6%, 15.7%±2.1%, 17.0%±1.8%降至5.5%±0.4%, 7.7%±2.1%, 7.2%±2.6%. 表明ICC明显减少, Kit-SCF信号系统破坏, 与DM小鼠胃肠动力障碍密切相关.

还有大量实验表明, ICC可产生自发性的电活动, 而消除ICC, 则慢波电位不能产生. Koh等[19]在分离培养的小鼠小肠ICC上用膜片钳技术记录出有节律性、规则的慢波样去极化波形, 慢波样波宽度与波形均与肌条上记录的慢波相似. 当新生大鼠ICC网络结构发育不成熟时, 记录不到规律的电节律, 而当平滑肌的ICC网络基本形成, 就可记录到完整的自发的慢波电位. 在W/W(V)突变种鼠小肠[20], 干细胞突变型使鼠肠肌丛ICC不能发育因而缺乏起搏活动, 没有自发慢波和负载于其上的动作电位. 因而我们推测外源性SCF可能通过修复Kit-SCF信号系统, 改善小肠平滑肌的慢波活动, 进而恢复正常的小肠运动.

本研究证实了糖尿病小鼠确实存在胃肠动力障碍, 外源性SCF对DM小鼠小肠动力障碍有一定的改善作用. 本研究提示外源性SCF可能为临床治疗DM胃肠动力障碍提供新的理论依据, 其具体的机制有待于进一步研究.

4 参考文献

1 Battaglia E, Bassotti G, Bellone G, Dughera L, Serra AM, Chiusa L, Repici A, Mioli P, Emanuelli G. Loss of interstitial cells of Cajal network in severe idiopathic gastroparesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6172-6177

2 Horváth VJ, Vittal H, Lörincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordög T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770

3 Kitayama J, Faraci FM, Gunnett CA, Heistad DD. Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: role of inducible NO synthase. *Stroke* 2006; 37: 2129-2133

4 Yu X, Tesiram YA, Towner RA, Abbott A, Patterson E, Huang S, Garrett MW, Chandrasekaran S, Matsuzaki S, Szweda LI, Gordon BE, Kem DC. Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging (MRI). *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 6

5 徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 干细胞因子对糖尿病小鼠结肠Cajal间质细胞的干预效应. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1294-1298

6 许东强, 余保平, 高山, 王玮. 便秘宁对便秘小鼠排便作用的影响. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 295-296

7 Icks A, Haastert B, Rathmann W, Wareham N. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with type 2 diabetes: a population-based study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1067-1069; author reply 1069

8 Jung HK, Kim DY, Moon IH, Hong YS. Colonic transit time in diabetic patients--comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy. *Yonsei Med J* 2003; 44: 265-272

9 Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C710-C720

10 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256

11 Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand. *J Neurosci Res* 2000; 59: 384-401

12 Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726

13 Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, Nishi T, Ward S, Sanders KM. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 1999; 117: 140-148

14 Li J, Goodyer CG, Fellows F, Wang R. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 961-972

15 Bashamboo A, Taylor AH, Samuel K, Panthier JJ, Whetton AD, Forrester LM. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway. *J Cell Sci* 2006; 119: 3039-3046

16 周吕, 柯美云. 神经胃肠病学与动力基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 2005: 40-41

17 Kito Y, Suzuki H. Effects of temperature on

pacemaker potentials in the mouse small intestine. *Pflugers Arch* 2007; 454: 263-275
18 Ordög T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000; 49: 1731-1739
19 Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 1998; 513 (Pt 1): 203-213
20 Dickens EJ, Edwards FR, Hirst GD. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach. *J Physiol* 2001; 531: 827-833

■同行评价
本研究选题较好, 设计合理, 结论有一定参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行核对, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 998-1003
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

GAGE-7自身抗体在食管鳞状细胞癌中的表达

王 皓, 钟 理, 徐家馨, 张小刚, 王建飞

■背景资料
食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤, 我国是世界食管癌的高发区, 其中发病患者约占全世界发病总数的70%, 严重威胁着人民的健康. 食管鳞状细胞癌较多出现在发展中国家, 也是我国食管癌病发的主要类型. 尽管医疗技术日益先进, 但是总体食管癌患者存活率依然不足30%. 因此, 对于食管鳞状细胞癌的早期准确诊断必不可少.

王皓, 钟理, 张小刚, 王建飞, 河北大学生命科学学院生物芯片研究室 河北省保定市 071002
徐家馨, City of Hope National Medical Center, Duarte, California 91010, United States
王皓, 2007年河北大学在读硕士, 主要从事肿瘤标志物的筛选和癌症早期检测方面的研究.
作者贡献分布: 文献检索、实验操作、结果分析和论文撰写由王皓完成; 选题和审校由钟理完成; 研究所用新试剂及分析工具由徐家馨提供; 部分数据分析及文献检索由徐家馨、张小刚及王建飞完成.
通讯作者: 钟理, 教授, 071002, 河北省保定市五四东路180号, 河北大学生命科学学院生物芯片研究室. lee_z@yahoo.com
收稿日期: 2009-12-22 修回日期: 2010-02-05
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Detection of serum autoantibody against GAGE-7 in patients with esophageal squamous cell carcinoma

Hao Wang, Li Zhong, Jia-Xin Xu, Xiao-Gang Zhang, Jian-Fei Wang

Hao Wang, Li Zhong, Xiao-Gang Zhang, Jian-Fei Wang, Biochip Laboratory, College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei Province, China
Jia-Xin Xu, City of Hope National Medical Center, Duarte, California 91010, United States
Correspondence to: Professor Li Zhong, Biochip Laboratory, College of Life Sciences, Hebei University, 180 Wusi East Road, Baoding 071002, Hebei Province, China. lee_z@yahoo.com
Received: 2009-12-22 Revised: 2010-02-05
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To compare the level of serum autoantibody against cancer-testis antigens GAGE-7 between patients with esophageal squamous cell carcinoma and normal controls and to evaluate the possibility of using GAGE family members as diagnostic tumor markers.

METHODS: Recombinant GAGE-7 protein was expressed and purified. The level of serum autoantibody against GAGE-7 was detected in patients with esophageal squamous cell carcinoma serum and normal controls by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Meanwhile, total serum IgG was determined. The ratio of serum autoantibody against GAGE-7 to total serum IgG was then calculated.

RESULTS: The level of serum autoantibody against GAGE-7 was much higher in patients with esophageal squamous cell carcinoma than in normal controls ($P < 0.001$). The difference in the ratio of serum autoantibody against GAGE-7 to total serum IgG between the two groups of subjects was more significant than that in the level of serum autoantibody against GAGE-7. Logistic regression analysis showed that detection of the ratio of serum autoantibody against GAGE-7 to total serum IgG for discrimination of the two groups of subjects had a c value of 0.717, a sensitivity of 0.72, and a specificity of 0.62 ($P < 0.0001$).

CONCLUSION: The level of serum autoantibody against GAGE-7 differs significantly between patients with esophageal squamous cell carcinoma and normal controls. GAGE family members may be promising markers for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; GAGE family; Autoantibody; Serum; IgG

Wang H, Zhong L, Xu JX, Zhang XG, Wang JF. Detection of serum autoantibody against GAGE-7 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 998-1003

摘要

目的: 检测癌-睾丸抗原GAGE-7的自身抗体在食管鳞状细胞癌患者和正常人血清中表达的差异, 评价GAGE家族作为肿瘤诊断标志物的可行性.

方法: 在原核细菌中表达并纯化重组GAGE-7蛋白, 采用ELISA检测GAGE-7自身抗体在105份食管鳞状细胞癌患者血清和86份正常人血清中的表达水平. 同时检测各血清中总IgG的表达量, 计算GAGE-7自身抗体在总IgG中所占比例的差异.

结果: 血清中GAGE-7抗体在食管鳞状细胞癌中的含量与正常组比较差异显著($P<0.001$), 而GAGE-7抗体与总IgG比例, 患者组明显高

■同行评议者
欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

于正常组, 逻辑回归模型分析c值为0.717, 敏感性和特异性分别达到0.72和0.62, 且差异显著(P<0.0001).

结论: 癌-睾丸抗原GAGE-7的自身抗体在食管鳞状细胞癌血清中有较高表达, 且与正常组比较有显著差异, 其表达特性可被看做是较为理想的癌症检测标志物.

关键词: 食管鳞状细胞癌; GAGE家族; 自身抗体; 血清; IgG

王皓, 钟理, 徐家馨, 张小刚, 王建飞. GAGE-7自身抗体在食管鳞状细胞癌中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 998-1003

http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/998.asp

0 引言

食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤, 全世界每年约有34万人死于食管癌, 在世界常见肿瘤中占第8位[1]. 我国是世界食管癌的高发区, 其中发病患者约占全世界发病总数的70%, 严重威胁着人民的健康. 食管癌主要有两种类型, 食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌, 各自具有独特的病原和病理特征, 其中ESCC是主要的食管癌类型, 在世界范围的食管癌患者中约占95%. ESCC具有多种发病诱因, 包括遗传及环境的影响. 有研究表明, 酒精、烟草、维他命缺乏及年龄衰老等, 都是诱发ESCC的主要危险因素[2,3]. 在发达国家中, 较为常见的是食管腺癌, 而ESCC则较多出现在发展中国家. 因此, 对于ESCC的研究远不如对食管腺癌的研究深入, ESCC发生和发展的分子机制目前尚未明了[4]. 尽管医疗技术日益先进, 但是总体上5年以上的食管癌患者存活率依然不足30%[5]. 这在很大程度上是由于缺少高敏感性和特异性的早期诊断标志物造成的. 一些食管鳞状细胞癌常用标志物, 比如细胞角蛋白19片段[6]、鳞状上皮细胞癌抗原[7]和癌胚抗原[8], 敏感性均小于50%. 因此, 寻找高敏感性和特异性的肿瘤诊断标志物和诊断方法成为提高食管鳞状细胞癌患者存活率的关键. 近些年来, 一系列肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAA)相继被发现并得到确认. 其中一部分TAA属于肿瘤生殖系基因产物, 也被称为癌-睾丸抗原(cancer-testis antigens, CTA)家族[9]. 这些抗原带有一小段细胞蛋白多肽组成的膜结合一类HMC分子, 因此可以被机体免疫系统识别, 诱导免疫反应对抗肿瘤细胞[10]. CTA家族在广泛的肿瘤组织中有着不同水平的表达, 而在正常组织中的表达只限于生殖细胞中(睾丸及卵巢), 而生殖细胞没有或很少表达人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA), 因此不会引起机体的免疫应答[11].

G antigen(GAGE)基因属于CTA家族, 包括十多个不同的成员[12-14]. GAGE基因家族在大多数成年人正常组织中不表达, 但是表达在多种肿瘤组织中. 关于GAGE抗原的表达机制和生物学功能还不十分了解, 但是有研究表明GAGE的表达水平与许多人类肿瘤的发生和预后相关, 说明GAGE也许对于癌症细胞的有着显著的影响[13,15-16]. 由于GAGE单一表达在肿瘤组织中, 使得GAGE抗原成为一种潜在的诊断和预后标志物, 并且通过分析GAGE在正常组织和各种不同癌症组织的表达差异, 可以将GAGE作为免疫诊断的靶位[17]. GAGE蛋白能够引起机体产生细胞免疫[12]和体液免疫[18], 尤其是体液免疫反应可以产生自身抗体, 而这些特异性抗体可以在抗原存在十分稀少时被大量表达, 因此检测血清中的自身抗体可以作为肿瘤早期检测的方法之一[19,20]. 此外, 许多学者都证明恶性肿瘤患者的体液免疫常发生明显变化, 其中血清Ig的检测颇受重视并应用于临床检测[21-24]. 血清中某种特异性抗体的含量可能由于血清总IgG含量的不同而发生改变. 在本次研究中, 我们原核表达并纯化了GAGE-7蛋白, 并检测和比较了GAGE抗体在食管鳞状细胞癌患者血清和正常人血清的表达差异, 同时比较GAGE-7自身抗体在血清总IgG中所占比例的差异, 以期评价GAGE基因产物作为食管鳞状细胞癌检测的可能性.

■研发前沿

目前对于食管鳞状细胞癌的诊断中, 肿瘤标志物检测是较为常见且便利的方法. 存在或变量表达可以提示肿瘤的性质、种类, 可辅助诊断肿瘤、分析病程、指导治疗、监测复发或转移、判断预后. 目前一些常用的食管鳞状细胞癌单一标志物的敏感性和特异性依然有待提高. 作为近几年来新发现的抗原家族, GAGE由于单一表达在肿瘤组织中, 使其成为一种潜在的诊断和预后标志物.

1 材料和方法

1.1 材料 实验所使用血清来自河北大学附属医院, 年龄为50-80岁. 其中食管鳞状细胞癌患者血清105份, 正常人血清86份.

1.2 方法

1.2.1 目的基因表达载体的构建: 目的基因GAGE-7由人类全长cDNA克隆(Origene Technologies, Rockville, United States)获得. 依据GenBank收录GAGE-7, 设计引物(上游5'-TTTTTAACCATGGGCATGAGTTGGCGAGGAAGATC-3', 下游5'-TTTTTACTCGAGACACTGTGATTGCTTTTCACC-3'), 在目的基因两端分别插入*Nco* I和*Xho* I作为酶切位点. PCR

■相关报道
张师前等分别在卵巢癌和子宫内膜癌中检测肿瘤特异性抗原MAGE, GAGE, BAGE的表达, 他们认为MAGE, GAGE, BAGE基因在卵巢癌和子宫内膜癌中有较高表达, 其表达与卵巢癌有无淋巴结转移无关, GAGE1-2与子宫内膜癌的分期无关, 与分级有关, 可作为卵巢癌和子宫内膜癌患者免疫治疗的特异性靶点. Eichumller等检测皮肤T细胞淋巴瘤患者血清中GAGE-3至-7相应抗体, 结果15.8%(3/19)的患者血清中检测到抗体的存在, 而在6%黑素瘤患者组织中检测到GAGE-7b重组蛋白的自身免疫抗体.

扩增程序: 95 ℃变性30 s, 58 ℃退火30 s, 72 ℃延伸45 s, 共40个循环. 扩增结束后进行1.5%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测并纯化扩增产物. 将扩增产物从凝胶中回收(Gel Extraction Kit, Bioland Research Products, La Palma, United States)后, 将扩增产物和pET-28b(+)(Novagen, Madison, United States)在*Nco* Ⅰ和*Xho* Ⅰ位点进行酶切, 37 ℃, 3 h, 进行电泳纯化后在16 ℃将目的基因与pET-28b(+)质粒连接(DNA Ligation Kit, Novagen, Madison, United States)4 h, 目的基因下游连接6个His-tag序列. 将重组质粒转化至DH5α感受态菌中, 使用卡那霉素筛选阳性克隆. 随机挑选5个克隆, 提取重组质粒(Plasmid Miniprep Kit, Bioland Research Products, Cerritos, USA), 酶切检测并进行DNA测序(T7 Promoter引物).

1.2.2 GAGE-7蛋白表达与纯化: 将序列正确的重组质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3), 使用卡那霉素筛选阳性克隆, 挑选单个克隆接种于LB培养基, 37 ℃培养至菌液浓度A_{600} = 0.4-0.6, 用浓度为1 mmol/L的IPTG诱导3 h, 未诱导菌作对照. 离心收菌. 收集的细菌沉淀用裂解液(8 mol/L Urea, 100 mmol/L NaH_2PO_4, 10 mmol/L Tris, 10 mmol/L Imidazole, 1 mmol/L TCEP, pH8.0)室温裂解1 h, 离心后将上清液与Ni-NTA琼脂糖微珠(QIAGEN, Valencia, United States)室温孵育1 h, 清洗液(8 mol/L Urea, 100 mmol/L NaH_2PO_4, 10 mmol/L Tris, 10 mmol/L Imidazole, 1 mmol/L TCEP, pH6.3)清洗微珠4次后, 将蛋白用洗脱液(8 mol/L Urea, 100 mmol/L NaH_2PO_4, 10 mmol/L Tris, 10 mmol/L Imidazole, 1 mmol/L TCEP, pH4.5)从微珠上洗脱下来. 将纯化后蛋白进行15% SDS-PAGE电泳, 考马斯亮蓝染色分析目的蛋白的纯度. 并使用His-probe(H-3)antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, United States)进行Western blot检测.

1.2.3 酶联免疫吸附剂测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA): 血清中GAGE-7抗体含量由ELISA. 96孔板中每孔包被50 μL, 浓度为1 mg/L的GAGE-7蛋白, 4 ℃过夜. 3% BSA室温封闭1 h, 0.1% PBST洗板3次. 将患者及正常人血清以1∶160稀释于封闭液中, 每孔50 μL, 室温1 h, 羊抗人IgG Fc HRP(Jackson Immunoresearch, West Grove, United States)1∶5 000作为2抗, 每孔50 μL, 室温1 h. 清洗3次后加底物及反应终止液, 在450 nm下读取*A*值.

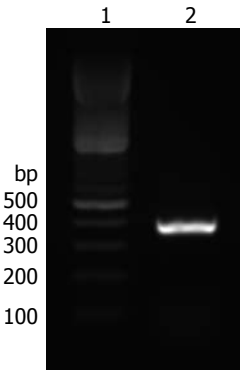


图1 GAGE-7基因PCR扩增产物. 1: 标准分子质量; 2: PCR扩增产物.

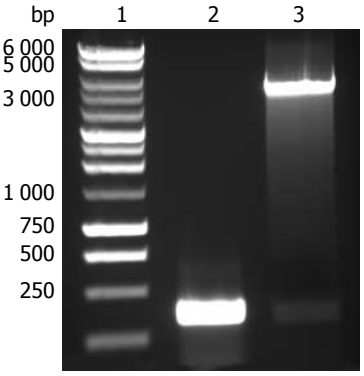


图2 重组质粒酶切电泳分析图. 1: 标准分子质量; 2: GAGE-7 PCR产物; 3: 重组质粒酶切产物.

1.2.4 血清总IgG检测: 血清总IgG含量的测定使用羊抗人IgG[F(ab')2](Thermo Scientific, Rockford, United States)包被96孔板, 3 mg/L, 每孔50 μL. 血清以1∶1 000 000稀释于3% BSA封闭液中, 每孔50 μL, 室温反应1 h. 2抗同样使用羊抗人IgG Fc HRP(Jackson Immunoresearch, West Grove, United States)1∶5 000, 每孔50 μL, 450 nm下读取*A*值.

统计学处理 采用*t*检验分别统计GAGE-7抗体和血清总IgG检测在患者和正常人的表达差异, 以及GAGE-7抗体与总IgG比例的差异. $P<0.05$差异有统计学意义.

2 结果

2.1 GAGE-7基因扩增 以人类全长cDNA克隆为模板扩增GAGE-7基因, 琼脂糖凝胶电泳出现一条大小约为350 bp的产物, 与设计产物大小一致(354 bp, 图1).

2.2 GAGE-7原核表达载体的构建 目的基因与pET-28b(+)质粒经酶切与连接后, 重组为含有GAGE-7-His-tag的质粒. 重组质粒经*Nco* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶切检测, 在电泳中出现两条大小有明显差异的条带. 其中小条带大小与PCR扩增产物一致, 大条带符合pET-28b(+)质粒大小(5 368 bp, 图2).

2.3 原核表达质粒的诱导与蛋白纯化 重组转化菌BL21(DE3)经IPTG诱导及纯化后, 在26 kDa

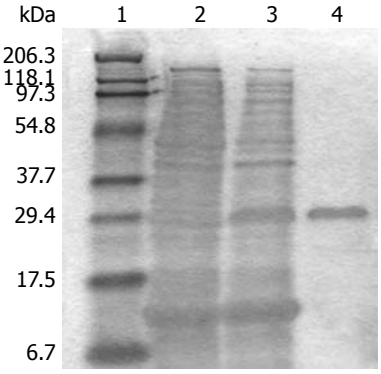


图 3 GAGE-7蛋白表达与纯化. 1: 标准分子量; 2. 未诱导细菌; 3: IPTG诱导3 h细菌; 4: 洗脱纯化蛋白.

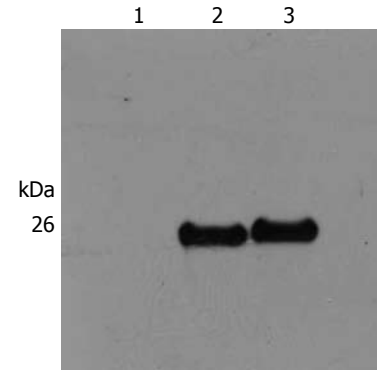


图 4 Western blot检测GAGE-7蛋白表达与纯化. 1: 未诱导细菌; 2: IPTG诱导3 h细菌; 3: 洗脱纯化蛋白.

处出现诱导蛋白, 而在没有经IPTG诱导的pET-28b(+)重组质粒细菌中没有目的蛋白出现. 经His-probe(H-3)antibody的Western blot检测, 可确定蛋白按所设计的序列表达His-tag(图3, 4). 将蛋白进行mass-spectrometry测序, 确定所表达蛋白为C段带有6个His-tag标签的GAGE-7蛋白.

2.4 ESCC及正常人血清中GAGE-7抗体表达量的差异 经ELISA测定, 食管鳞状细胞癌组血清总IgG明显低于正常组(P<0.0001). 血清中GAGE-7抗体在食管鳞状细胞癌血清中含量与正常组比较差异显著(P<0.001), 而GAGE-7抗体与总IgG比例, 患者组明显高于正常组, 逻辑回归模型分析c值为0.717, 敏感性和特异性分别达到0.72和0.62, 且差异显著(P<0.0001, 图5, 6).

3 讨论

自1995年, Van den Eynde等[12]从黑色素瘤细胞株cDNA文库中筛选出一种新的肿瘤抗原基因GAGE, 至今GAGE家族已经包括17个以上的成员[13,14-27]. GAGE基因家族定位于X染色体P11.23区域[13]. 各成员的基因序列有很高的同源性, 因此本实验以GAGE-7为抗原检测的血清抗体很有可能包括了所有GAGE家族抗体. GAGE基因通过细胞毒性T淋巴细胞筛选法鉴定, 目前已发现了GAGE基因家族的两个抗原肽, 其中抗原肽YRPRPRRY(aa9-16)为GAGE-1、-2和-8所共同

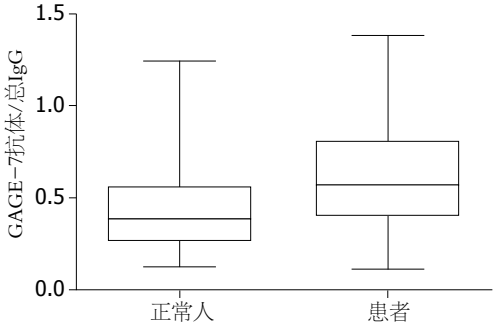


图 5 GAGE-7抗体与总IgG的比值在ESCC患者血清中高于正常人血清.

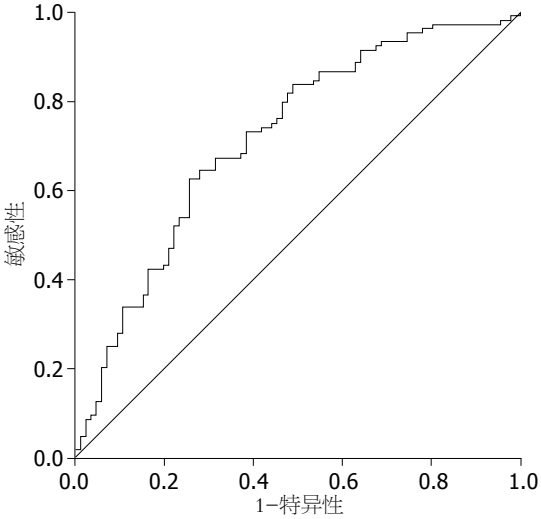


图 6 逻辑回归模型的敏感性和特异性比较. 模型分析了105位患者和86位正常人GAGE-7自身抗体与总IgG ELISA数值的比例, c值(曲线下面积)为0.717, 且差异极明显(P<0.0001).

享有, 由HLA-CW×0601分子递呈; 另一抗原肽YYWPRPRRY(aa9-17)为GAGE-3至-6和7/7B共有, 由HLA-A29分子递呈. 体外实验已证实这些抗原肽可被自身CTL识别[13].

GAGE基因的表达主要表现在mRNA水平和蛋白水平两方面. 在mRNA水平, 多种恶性肿瘤组织中均有表达, 比如黑色素瘤, 食管癌, 肝癌, 肺癌, 前列腺癌, 乳腺癌, 卵巢癌和子宫内膜癌等组织类型[13,17,28-30]. 而在正常组织中除睾丸和卵巢外没有表达. GAGE不仅可以引起机体的细胞免疫反应, 同时也可激活机体的体液免疫反应. 有研究[18]在13.6%的皮肤T细胞淋巴瘤患者血清中检测到GAGE抗体的存在. Bazhin等[31]在黑色素瘤患者血清中检测GAGE家族自身抗体, 有6%的患者血清有反应. 而在食管鳞状细胞癌血清中还尚未有人检测GAGE抗体的含量.

本实验从原核细菌中表达并纯化GAGE-7-

■创新盘点

本文通过原核表达及纯化GAGE-7蛋白, 检测GAGE-7自身抗体在食管鳞状细胞癌患者及正常人血清中的表达差异. 同时, 以患者和对照组血清总IgG作为统一参考, 来平衡各人之间血清表达能力水平的差异, 结果更具科学性.

■应用要点
本文通过对GAGE-7血清中自身抗体的表达检测, 说明GAGE家族在食管鳞状细胞癌有特异性表达, 具有作为肿瘤血清学诊断标志物以及肿瘤免疫治疗靶位的可能性.

His-tag重组蛋白, 运用ELISA方法, 在ESCC患者和正常人血清中分别检测了GAGE-7自身抗抗体的表达差异. 结果表明GAGE-7自身抗体在患者血清中表达水平高于正常组, 且差异显著(P<0.001). 除此以外, 本实验同时检测了血清中总IgG的表达量, 结果正常组中总IgG含量明显高于ESCC患者(P<0.0001). 梅强等[32]通过检测ESCC患者外周血清中IgG、IgA、IgM、C3、C4的含量, 结果食管癌患者体液免疫功能指标中受测各Ig的含量与常人组比较均见降低(P<0.05); 补体C3、C4含量均见升高, 认为食管癌患者体液免疫功能受损, 致使血清中Ig含量降低、补体升高. 刘志峰等[33]运用单项免疫扩散法检测肿瘤患者血清免疫球蛋白IgG、IgA、IgM的含量. 结果与对照比较食管癌血清IgG含量差异显著(P<0.05). 而黄雪芳等[34]检测食管癌与正常人血清总IgG含量, 结果食管癌中含量明显高于正常对照组(P<0.001), 而患者血清复合IgG含量显著低于正常对照组(P<0.001). 他们认为肿瘤患者的特异性体液免疫反应明显不足, 有关升高的Ig主要是非特异性的反应产物, 通过复合Ig的检测更有利于对患者免疫状况的评价. 由此可知血清总IgG在ESCC血清的变化可作为一项可参考的检测标志物. 通过比较GAGE-7自身抗体在血清总IgG中的比例在病患和正常组的不同, 结果差异比单一比较GAGE-7自身抗体含量变化更加明显(P<0.0001), 说明比较单一肿瘤标志物自身抗体在总IgG中的比例是一个更加敏感和准确的方法.

目前, GAGE基因及蛋白的功能尚不明确, 但其表达特性已被看做是较为理想的癌症检测和预后, 监测肿瘤发生和发展, 及复发和治疗状况的指标. 尽管目前尚未用于临床, 但由于GAGE在多种不同组织类型的肿瘤中均有较高表达, 使其在肿瘤免疫治疗的研究中备受关注. 由于肿瘤细胞的特异性, 及GAGE家族各成员结构和功能可能各不相同, 因此将GAGE家族作为高特异性和敏感性的肿瘤诊断标志物以及肿瘤免疫治疗靶位, 还需更加深入和全面的研究.

4 参考文献

1 Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-841

2 Asha G, Vijayalakshmi D, Veerendra Kumar KV. Relationship between risk factors and dietary intake of oesophageal cancer patients. *J Hum Ecol* 2005; 17: 39-42

3 Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1424-1433

4 Kashyap MK, Marimuthu A, Kishore CJ, Peri S, Keerthikumar S, Prasad TS, Mahmood R, Rao S, Ranganathan P, Sanjeeviah RC, Vijayakumar M, Kumar KV, Montgomery EA, Kumar RV, Pandey A. Genomewide mRNA profiling of esophageal squamous cell carcinoma for identification of cancer biomarkers. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 36-46

5 McCann J. Esophageal cancers: changing character, increasing incidence. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 497-498

6 Wakatsuki M, Suzuki Y, Nakamoto S, Ohno T, Ishikawa H, Kiyohara H, Kiyozuka M, Shirai K, Nakayama Y, Nakano T. Clinical usefulness of CYFRA 21-1 for esophageal squamous cell carcinoma in radiation therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 715-719

7 Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1677-1683

8 Yamabuki T, Daigo Y, Kato T, Hayama S, Tsunoda T, Miyamoto M, Ito T, Fujita M, Hosokawa M, Kondo S, Nakamura Y. Genome-wide gene expression profile analysis of esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2006; 28: 1375-1384

9 Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun* 2001; 1: 1

10 Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997; 18: 267-268

11 Hutter H, Dohr G. HLA expression on immature and mature human germ cells. *J Reprod Immunol* 1998; 38: 101-122

12 Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995; 182: 689-698

13 De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 1999; 59: 3157-3165

14 Chen ME, Lin SH, Chung LW, Sikes RA. Isolation and characterization of PAGE-1 and GAGE-7. New genes expressed in the LNCaP prostate cancer progression model that share homology with melanoma-associated antigens. *J Biol Chem* 1998; 273: 17618-17625

15 Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Brasseur F, Ashley DM. Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 335-341

16 Cheung IY, Cheung NK, Ghossein RA, Satagopan JM, Bhattacharya S, Coit DG. Association between molecular detection of GAGE and survival in patients with malignant melanoma: a retrospective cohort study. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2042-2047

17 Gjerstorff MF, Ditzel HJ. An overview of the GAGE

cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. *Tissue Antigens* 2008; 71: 187-192
18 Eichmüller S, Usener D, Thiel D, Schadendorf D. Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity. *Int J Cancer* 2003; 104: 482-487
19 Anderson KS, LaBaer J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res* 2005; 4: 1123-1133
20 Hanash S. Harnessing immunity for cancer marker discovery. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 37-38
21 Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56
22 Burnett PR, VanCott TC, Polonis VR, Redfield RR, Birx DL. Serum IgA-mediated neutralization of HIV type 1. *J Immunol* 1994; 152: 4642-4648
23 李思光, 彭宣宪, 黄雪芳, 林琳. 原发性肝癌和慢性肝病血清HBsAg特异性免疫复合物的检测比较. 上海免疫学杂志 1997; 17: 174-176
24 Peng XX, Wainberg MA, Tao Y, Brenner BG. Immunoglobulin and complement complexes in blood following infection with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3: 128-131
25 Brinkmann U, Vasmatzis G, Lee B, Pastan I. Novel genes in the PAGE and GAGE family of tumor antigens found by homology walking in the dbEST database. *Cancer Res* 1999; 59: 1445-1448
26 Cilensek ZM, Yehiely F, Kular RK, Deiss LP. A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 380-387
27 Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, Lee SY, Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Ritter G, Jäger D, Jäger E, Knuth A, Old LJ. Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. *Int J Cancer* 2002; 98: 485-492
28 赵飞兰, 蓝玲, 罗国容, 谢小薰. 肝癌细胞株中肿瘤特异性抗原GAGE基因mRNA的表达. 华夏医学 2006; 19: 392-393
29 吴喜梅, 张师前, 周晓亮, 石琰. 肿瘤特异性抗原MAGE, BAGE, GAGE在子宫内膜癌组织中表达的研究. 山东大学学报(医学版) 2006; 44: 1004-1007
30 张师前, 周晓亮, 张琳琳, 吴喜梅, 石琰. 卵巢癌组织及细胞株中肿瘤特异性抗原MAGE, GAGE, BAGE基因表达的研究. 山东大学学报(医学版) 2007; 45: 762-766
31 Bazhin AV, Wiedemann N, Schnölzer M, Schadendorf D, Eichmüller SB. Expression of GAGE family proteins in malignant melanoma. *Cancer Lett* 2007; 251: 258-267
32 梅强, 陈克能, 师晓天. 食管癌患者若干体液免疫功能的变化及其影响因素. 中国肿瘤临床与康复 1999; 6: 25-26
33 刘志峰, 侯小红. 138例肿瘤患者血清免疫球蛋白测定分析. 实用医技杂志 2002; 9: 85-86
34 黄雪芳, 王三英, 彭宣宪, 杨天赐. 恶性肿瘤患者血清中免疫球蛋白类型的剖析观察. 中国肿瘤临床 1998; 25: 597-600

■同行评价
本研究具有一定的新颖性, 设计科学合理, 结果可信.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布2008年*WJG*影响因子2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology*(*WJG*)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-06-19)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1004-1009
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

Kiss-1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床病理意义

赵志华, 陈妍琼, 高冬玲, 张 岚, 张 蕾

■背景资料
Kiss-1是由Lee等在人黑色素瘤中发现的一个新的肿瘤转移抑制基因. 研究表明, Kiss-1在多种恶性肿瘤组织中的表达降低或缺失与肿瘤的侵袭转移密切相关, 本研究对其在不同食管组织中蛋白和mRNA表达水平的检测有助于研究Kiss-1基因与食管鳞状细胞癌发生、发展中的关系.

赵志华, 高冬玲, 张岚, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市450052
陈妍琼, 张蕾, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市450052
赵志华, 在读博士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理研究.
河南省高校杰出科研人才创新工程基金资助项目, No. 2007KYCX005
作者贡献分布: 此课题由张蕾指导; 赵志华与陈妍琼设计; 研究过程由赵志华、陈妍琼、高冬玲及张岚操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张蕾提供; 数据分析由赵志华完成; 本论文写作由赵志华与陈妍琼完成.
通讯作者: 张蕾, 副教授, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院肿瘤科. zhanglei68616@yahoo.com.cn
电话: 0371-66658175 传真: 0371-66658175
收稿日期: 2009-12-26 修回日期: 2010-02-20
接受日期: 2010-03-02 在线出版日期: 2010-04-08

Clinicopathological significance of Kiss-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma

Zhi-Hua Zhao, Yan-Qiong Chen, Dong-Ling Gao, Lan Zhang, Lei Zhang

Zhi-Hua Zhao, Dong-Ling Gao, Lan Zhang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Key Laboratory for Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Yan-Qiong Chen, Lei Zhang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Henan Provincial Innovation Research Foundation for Talents in Colleges and Universities, No. 2007KYCX005
Correspondence to: Associate Professor Lei Zhang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhanglei68616@yahoo.com.cn
Received: 2009-12-26 Revised: 2010-02-20
Accepted: 2010-03-02 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of Kiss-1 mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze its clinicopathological significance.

METHODS: Sixty-two ESCC specimens, 31 atypical hyperplastic epithelial specimens, and 62 normal esophageal epithelial specimens were used in the study. The expression of Kiss-1 mRNA in these specimens was detected by in situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of Kiss-1 was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method. The clinicopathological significance of Kiss-1 expression in ESCC was then analyzed.

RESULTS: The positive rates of Kiss-1 protein expression in ESCC, adjacent atypical hyperplastic epithelium and normal esophageal epithelium tissues were 56.5%, 67.7%, 90.3%, respectively (all $P < 0.05$). The positive rates of Kiss-1 mRNA expression in ESCC, adjacent atypical hyperplastic epithelium and normal esophageal epithelium tissues were 51.6%, 74.2% and 95.2%, respectively, as revealed by *in situ* hybridization (all $P < 0.05$), and 54.8%, 71.0% and 88.7%, respectively, by RT-PCR (all $P < 0.05$). The positive rates of Kiss-1 protein and mRNA expression in ESCC were closely associated with lymph node metastasis (both $P < 0.05$), but not with sex, age, histological grade and infiltration depth (all $P > 0.05$). A positive correlation was noted not only between the positive rates revealed by *in situ* hybridization and RT-PCR ($P < 0.05$), but also between those revealed by immunohistochemistry and RT-PCR or *in situ* hybridization (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The low expression of Kiss-1 is closely associated with the development, progression and metastasis of ESCC. Kiss-1 may be used as an important parameter for early diagnosis and prognosis of ESCC.

Key Words: Esophageal neoplasm; Squamous cell carcinoma; Kiss-1

Zhao ZH, Chen YQ, Gao DL, Zhang L, Zhang L. Clinicopathological significance of Kiss-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1004-1009

摘要

目的: 观察Kiss-1蛋白及mRNA在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其临床病理意义.

方法: 采用免疫组织化学SP法、原位杂交和

■同行评议者
沈克平, 主任医师, 上海龙华医院肿瘤五科

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 联合检测了62例食管鳞状细胞癌、31例癌旁不典型增生及62例正常食管组织中Kiss-1蛋白和mRNA的表达, 并探讨其临床病理意义.

结果: 在食管鳞状细胞癌组织、癌旁不典型增生及正常食管组织中, Kiss-1蛋白的阳性表达率分别为56.5%、67.7%、90.3%(P<0.05); 用原位杂交检测Kiss-1 mRNA阳性表达率分别为51.6%、74.2%、95.2%(P<0.05); 用RT-PCR技术检测Kiss-1 mRNA阳性表达率分别为54.8%、71.0%、88.7%(P<0.05); 食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1蛋白及mRNA的低表达与淋巴结转移密切相关(P<0.05), 而与患者的性别、年龄、肿瘤的组织学分级无关(P>0.05); Kiss-1蛋白的低表达与浸润深度有关(P<0.05); 在食管鳞状细胞癌组织中, Kiss-1蛋白及mRNA的表达呈正相关(P<0.05), 用原位杂交及RT-PCR技术对Kiss-1 mRNA表达情况的检测结果也呈正相关(P<0.05).

结论: Kiss-1基因的表达降低或缺失和食管鳞状细胞癌的发生发展及转移有关, 有望成为食管鳞状细胞癌早期诊断和预后判断的重要指标之一.

关键词: 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; Kiss-1

赵志华, 陈妍琼, 高冬玲, 张岚, 张蕾. Kiss-1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1004-1009
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1004.asp

0 引言

Kiss-1是由Lee等在人黑色素瘤中发现的一个新的肿瘤转移抑制基因[1]. 研究表明, Kiss-1在多种恶性肿瘤组织中的表达降低或缺失与肿瘤的侵袭转移密切相关[2-10]. 本研究采用免疫组织化学、原位杂交和RT-PCR技术联合检测了Kiss-1蛋白及mRNA在食管鳞状细胞癌组织中的表达, 并探讨其阳性表达在食管鳞状细胞癌发生发展中的临床病理意义, 以期寻找食管鳞状细胞癌早期诊断和预后判断的指标.

1 材料和方法

1.1 材料 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/03-16取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院, 所有患者术前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 其中男36例, 女26例, 年龄38-75(平均60.6±9.5)岁. 全部病理组织学证实均为鳞状细胞癌. 其中组织学分级Ⅰ级15例, Ⅱ级25例, Ⅲ级22例; 伴淋巴结转移者20例, 无淋巴结转移者42例. 7例(浅层组)肿瘤浸润黏膜层、黏膜下层或浅肌层, 55例(深层组)肿瘤浸润深肌层或外膜层. 标本在离体0.5 h内, 在癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常食管黏膜组织分别取材, 将部分组织放在冻存管中置于-80 ℃冰箱中备用于RT-PCR的检测. 剩余组织经40 g/L甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋切片, 分别用于HE、免疫组织化学和原位杂交染色. 62例癌旁组织经病理学证实, 将其中31例中-重度不典型增生组织作为本文的对照观察对象. 羊抗人Kiss-1单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 免疫组织化学SP试剂盒、DAB显色试剂盒均购自由北京中杉金桥生物技术开发公司. TRIzol试剂购自Qiagen公司, 一步法RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司. 原位杂交预杂交液购自武汉博士德生物技术有限公司. 乙酰化BSA及BCIP/NBT均购自美国Sigma公司. 原位杂交5'端生物素标记、全硫代修饰探针、Kiss-1探针、引物和内参β-actin上下游引物序列均由北京奥科生物技术有限公司合成. Kiss-1探针序列为GCCTGGCAGTAGCAGCTGGCTTCCT; Kiss-1上游引物序列5'-AGAGGAAGCCAGCTGCTACTG-3', 下游引物序列为5'-GCCGAAGGAGTTCCAGTTGTA-3', 预期扩增片段大小为191 bp. 内参β-actin上游序列为5'-CATCCTGCGTCTGCACCT-3', 下游序列为5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3', 预期扩增片段大小为480 bp.

1.2 方法

1.2.1 Kiss-1蛋白及mRNA的水平检测: Kiss-1蛋白的表达采用免疫组织化学SP法进行检测; Kiss-1单克隆抗体按1∶100稀释. 染色步骤严格按说明书进行, DAB显色, 苏木素复染. 采用试剂盒中已知阳性结果为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 采用原位杂交和RT-PCR分别检测各组标本中Kiss-1 mRNA的水平. 具体方法步骤参照文献[11-13].

1.2.2 结果判定: Kiss-1蛋白阳性信号为棕黄色颗粒, 原位杂交Kiss-1 mRNA阳性信号呈蓝色颗粒, 二者均定位于细胞质中. 每例标本在高倍镜下随机选取5个高倍视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行综合判定. 免疫组织化学评分标准[13]: 按切片中阳性细胞着色深浅评分, 0分, 细胞无着色; 1分, 浅黄色; 2分, 棕黄色; 3分, 棕褐色. 按阳

■相关报道
国内外学者采用RT-PCR、原位杂交及免疫组织化学等技术分别检测了Kiss-1基因在胃癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤等肿瘤中的表达, 发现其与多种肿瘤发生、发展有关.

■**创新盘点**
本研究首次采用RT-PCR、原位杂交及免疫组织化学技术检测不同食管组织Kiss-1基因的表达情况及其转录终产物的阳性信号定位, 探讨Kiss-1基因在食管鳞状细胞癌发生发展中的作用.

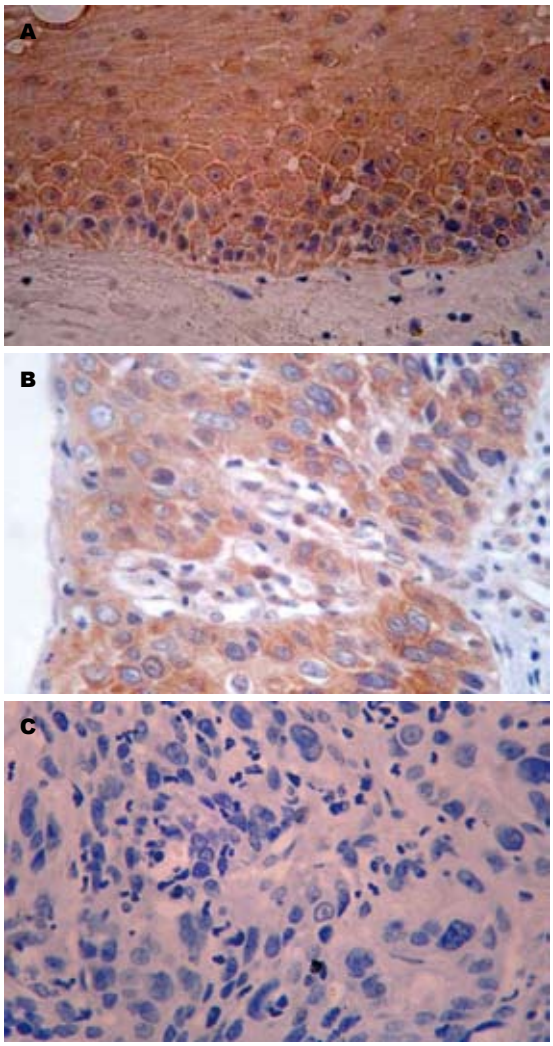


图 1 Kiss-1蛋白的表达(IHC × 400). A: 正常食管黏膜上皮组织; B: 癌旁不典型增生组织; C: 鳞状细胞癌组织.

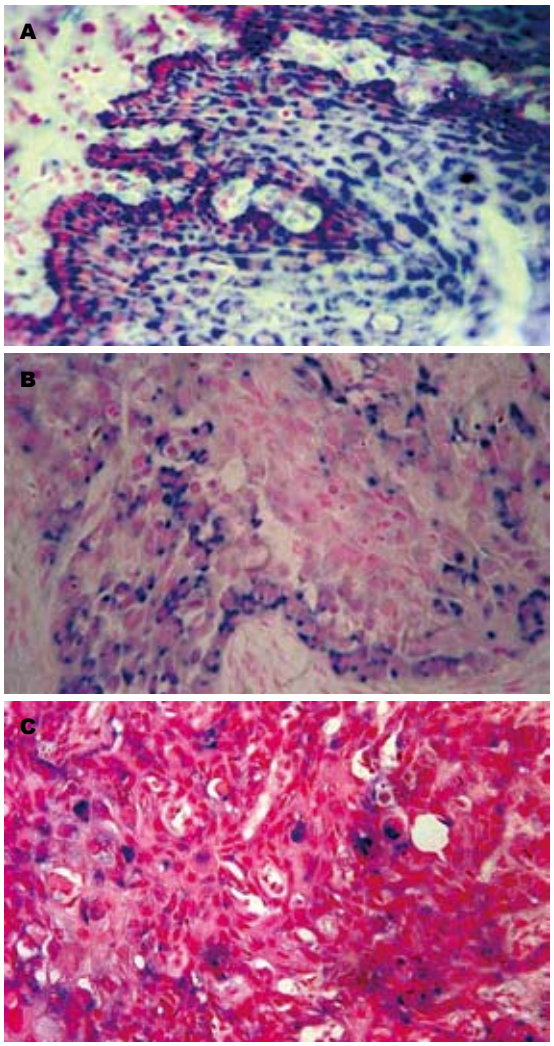


图 2 Kiss-1 mRNA的表达(ISH × 400). A: 正常食管黏膜上皮组织; B: 癌旁不典型增生组织; C: 鳞状细胞癌组织.

性细胞数占同类细胞数的百分比评比, <30%为1分, 30%-70%为2分, ≥70%为3分. 2项评分的乘积为总积分, 0-1分判为阴性, ≥2分为阳性. 原位杂交阳性计算方法[13]: 阳性细胞数≤10%、10%-30%、31%-70%和>70%分别记为1、2、3和4分. 按阳性着色程度: 杂交信号强度可分为弱(+)、中(++)、强(+++)三级, 分别计为1、2、3分: 弱阳性(+), 细胞质内可见浅紫蓝色颗粒, 明显高于背景底色; 阳性(++), 细胞质内可见较深紫蓝色颗粒; 强阳性(+++), 细胞质内可见大量深紫蓝色颗粒. 上述两种记分相乘, <1分为阴性, ≥1分为阳性.

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件, 采用χ^2检验. 检验水准$\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 Kiss-1蛋白在不同食管组织中的表达及其与临床生物学行为关系 免疫组织化学结果显示Kiss-1蛋白阳性表达为棕黄色颗粒, 定位于细胞质中(图1). 在食管鳞状细胞癌组织、癌旁不典型增生及正常食管组织中, Kiss-1蛋白的阳性表达率分别为56.5%、67.7%、90.3%(P<0.05); Kiss-1蛋白的低表达与浸润深度、淋巴结转移密切相关(均P<0.05, 表1, 2).

2.2 原位杂交检测Kiss-1 mRNA在不同食管组织中的表达及其与临床生物学行为关系 结果显示阳性表达主要位于细胞质内, 呈蓝色颗粒(图2). 在食管癌组织、癌旁不典型增生及正常食管组织中, Kiss-1 mRNA阳性表达率分别为51.6%、74.2%、95.2%(P<0.05); Kiss-1 mRNA低表达与淋巴结转移密切相关(均P<0.05, 表1, 2).

2.3 RT-PCR检测Kiss-1 mRNA在不同食管组织中的表达及其与临床生物学行为关系 扩增结果经凝胶电泳显示, Kiss-1 mRNA RT-PCR扩增产物与预计一致, 在191 bp处出现特异性的Kiss-1基因条带, 在480 bp处也有内参照β-actin条带(图3).

■应用要点
Kiss-1基因的表达减低或者缺失与食管鳞状细胞癌的发生发展及浸润转移有关, Kiss-1有望成为食管鳞状细胞癌早期诊断和预后判断的辅助指标.

表 1 不同食管组织中Kiss-1蛋白及mRNA的表达

分组	*n*	Kiss-1蛋白阳性率(%)	χ^2值	Kiss-1 mRNA			
				RT-PCR阳性率(%)	χ^2值	原位杂交阳性率(%)	χ^2值
正常黏膜组织	62	90.3		88.7		95.2	
癌旁组织	31	67.7	18.136[a]	71.0	17.503[a]	74.2	30.227[a]
癌组织	62	56.5		54.8		51.6	

[a]$P<0.05$.

表 2 食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1蛋白及mRNA的表达与临床病理学参数的关系

临床病理学参数	*n*	Kiss-1蛋白阳性率(%)	χ^2值	*P*值	Kiss-1 mRNA					
					RT-PCR阳性率(%)	χ^2值	*P*值	原位杂交阳性率(%)	χ^2值	*P*值
性别										
男	36	52.8	0.471	0.392	50.0	0.812	0.368	44.4	1.766	0.184
女	26	61.5			61.5			61.5		
年龄(岁)										
<60	29	58.6	1.104	0.603	51.7	0.213	0.644	51.7	0.000	0.987
≥60	33	54.5			57.6			51.5		
组织学分级										
Ⅰ	15	66.7			46.7			60.0		
Ⅱ	25	56.0	1.011	0.603	68.0	2.575	0.276	52.0	0.758	0.685
Ⅲ	22	50.0			45.4			45.4		
浸润深度										
浅层	7	100.0			71.4			71.4		
深层	55	50.9	–	0.015	64.4	1.131	0.718	49.1	1.241	0.265
淋巴结转移										
无	42	66.7	5.526	0.019	64.3	4.692	0.030	61.9	5.522	0.019
有	20	35.0			35.0			30.0		

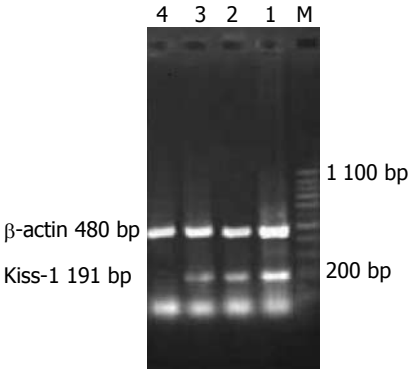


图 3 正常食管黏膜和鳞状细胞癌组织中Kiss-1 mRNA表达的RT-PCR电泳图. M: DNA Marker; 1: 正常食管黏膜组织; 2: 食管癌旁不典型增生组织; 3: 食管鳞状细胞癌组织弱表达; 4: 食管鳞状细胞癌组织阴性表达组织.

在正常食管组织、癌旁不典型增生及食管鳞状细胞癌组织中, Kiss-1 mRNA阳性表达率依次降低($P<0.05$, 表1). 由表2可知食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1 mRNA的低表达与淋巴结转移密切相关($P<0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤的组织学分级无关($P>0.05$).

表 3 食管鳞状细胞癌组织中两种方法检测Kiss-1 mRNA表达的相关性

原位杂交检测	*n*	RT-PCR检测		r_s	*P*值
		+	–		
+	32	26	6	0.548	0.000
–	30	8	22		

2.4 Kiss-1蛋白、mRNA在食管鳞状细胞癌组织中表达的相关性分析 在食管鳞状细胞癌组织中, Kiss-1蛋白及mRNA的表达呈正相关, 分别用原位杂交及RT-PCR技术对Kiss-1 mRNA表达情况的检测结果也呈正相关(均$P<0.05$, 表3, 4).

3 讨论

肿瘤的侵袭转移是一个众多因素参与的复杂

■同行评价
本研究设计合理，结果可靠，但创新性一般.

表 4 食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1蛋白、mRNA表达的相关性

Kiss-1 mRNA表达	n	Kiss-1蛋白表达		r_s	P值
		+	−		
原位杂交法					
+	32	24	8	0.386	0.002
−	30	11	19		
RT-PCR法					
+	34	27	7	0.510	0.000
−	28	8	20		

过程，其中癌基因的激活和抑癌基因的失活在病程的发展和演进过程中起着重要作用. Kiss-l基因是近年来发现的一个新的肿瘤转移抑制基因，他定位于人染色体1q32，由4个外显子组成. 其编码产物主要是G糖蛋白受体54(hGPR54或AXOR12)的天然配体[14-19]，他可以抑制细胞的趋化性，增强成簇黏附激酶的表达和活性. Lee等[20]研究发现Kiss-l基因的表达水平虽然不影响成瘤性但能抑制95%的肿瘤转移，说明其具有显著的肿瘤转移抑制效应. 随后Shirasaki等的研究报道给予了补充证实[21-23]. 一系列深入研究发现Kiss-l基因及其受体的表达异常还与胃癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌等[24-28]多种肿瘤侵袭转移密切相关，但其抑制肿瘤转移的具体的分子作用机制尚不完全清楚. 如何通过调控Kiss-l基因及其受体的表达，进而阻止肿瘤转移值得我们进一步的研究. 而有关Kiss-l基因与人食管鳞状细胞癌的发生及其侵袭和转移的关系报道较少[29]. 采用免疫组织化学，原位杂交及RT-PCR技术联合检测食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1蛋白及mRNA表达的研究，迄今尚未见文献报道.

本研究结果显示食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1蛋白及mRNA的阳性表达均低于正常食管黏膜和癌旁不典型增生组织，提示Kiss-1在癌组织的低表达可能在食管鳞状细胞癌的发生发展过程中起一定作用. 肿瘤细胞的浸润和侵袭能力是造成其转移扩散的主要原因，本研究结果还显示，Kiss-1蛋白及mRNA的阳性表达在无淋巴结转移组明显高于淋巴结转移组，表明Kiss-1蛋白及mRNA的表达减低或缺失可能与食管鳞状细胞癌的淋巴结转移有关；但与食管鳞状细胞癌的组织学分级及患者的年龄性别等因素无关，Kiss-1蛋白的低表达与食管鳞状细胞癌的浸润深度有关，这与Ikeguchi等[30]、Li等[31]的实验结果一致，李小丽等[32]报道Kiss-1蛋白表达随浸润深度的加深而减少，但统计学无显著差异，此可能与标本数量有关. 免疫组织化学检测Kiss-1蛋白、原位杂交和RT-PCR检测Kiss-1 mRNA的表达呈正相关关系，提示这三种检测方法具有一致性. 这些结果均表明Kiss-1蛋白及mRNA的表达减低或者缺失可能促进了食管鳞状细胞癌细胞脱离原发灶，发生转移. 进一步分析实验结果，我们发现Kiss-1 mRNA在食管癌中表达率较Kiss-1蛋白表达略低，这可能与实验过程中的mRNA被部分降解有关，而Kiss-1 mRNA与蛋白表达一致性提示应用免疫组织化学法检测食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1蛋白表达水平可能可以间接反映出Kiss-1的mRNA水平.

总之，Kiss-l基因的表达减低或者缺失与食管鳞状细胞癌的发生发展及浸润转移有关，Kiss-l有望成为食管鳞状细胞癌早期诊断和预后判断的辅助指标.

4 参考文献

1 Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-1737

2 Yao HL, Yang ZL, Li YG, Liu GW. [In situ hybridization study on the expression of Kiss-1 and KAI-1 metastasis suppressor genes in gastric cancer] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2007; 10: 274-277

3 Nicolle G, Comperat E, Nicolaïew N, Cancel-Tassin G, Cussenot O. Metastin (KISS-1) and metastin-coupled receptor (GPR54) expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Ann Oncol* 2007; 18: 605-607

4 Hata K, Dhar DK, Watanabe Y, Nakai H, Hoshiai H. Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1452-1459

5 Lee KH, Kim JR. Kiss-1 suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer. *Oncol Res* 2009; 18: 107-116

6 Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, Lingyun G, Aimin H. Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Anat Rec* (Hoboken) 2009; 292: 1128-1134

7 Pentheroudakis G, Kostadima L, Dova L, Georgiou I, Tzavaras T, Vartholomatos G, Wirtz RM, Fountzilas G, Malamou-Mitsi V, Pavlidis N. A twisted kiss: in vitro and in vivo evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis-suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Neoplasma* 2010; 57: 47-54

8 Zhang SL, Yu Y, Jiang T, Lin B, Gao H. [Expression and significance of KiSS-1 and its receptor GPR54 mRNA in epithelial ovarian cancer] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2005; 40: 689-692

9 Katagiri F, Nagai K, Kida A, Tomita K, Oishi S, Takeyama M, Doi R, Fujii N. Clinical significance of plasma metastin level in pancreatic cancer patients.

Oncol Rep 2009; 21: 815-819
10 Nagai K, Doi R, Katagiri F, Ito T, Kida A, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi Y, Tomita K, Oishi S, Fujii N, Uemoto S. Prognostic value of metastin expression in human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 9
11 胡志方, 黄缘, 钟琼. Pim-3异常表达在胃癌中的意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3515-3518
12 高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉. 金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1634-1638
13 Li SL, Gao DL, Zhao ZH, Liu ZW, Zhao QM, Yu JX, Chen KS, Zhang YH. Correlation of matrix metalloproteinase suppressor genes RECK, VEGF, and CD105 with angiogenesis and biological behavior in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6076-6081
14 Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636
15 Bellingham M, Fowler PA, Amezaga MR, Rhind SM, Cotinot C, Mandon-Pepin B, Sharpe RM, Evans NP. Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 1556-1562
16 Richard N, Corvaisier S, Camacho E, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides* 2009; 30: 123-129
17 Arai AC. The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. *Peptides* 2009; 30: 16-25
18 Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 682-692
19 Kaiser UB, Kuohung W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine* 2005; 26: 277-284
20 Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 1997; 57: 2384-2387
21 Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res* 2001; 61: 7422-7425
22 Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 191-198
23 Kostadima L, Pentheroudakis G, Pavlidis N. The missing kiss of life: transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 2499-2504
24 Zheng HC, Yu AM, Xin Y. Aberrant expression of Kiss-1 and matrix metalloproteinase-9 are closely linked to lymph node metastasis of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 2008; 23: 63-64
25 Shoji S, Tang XY, Umemura S, Itoh J, Takekoshi S, Shima M, Usui Y, Nagata Y, Uchida T, Osamura RY, Terachi T. Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with overexpression of metastin receptor. *Eur Urol* 2009; 55: 441-449
26 Liang S, Yang ZL. [Expression of KiSS-1mRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma and non-cancerous pancreatic tissues in SD rats] *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2007; 32: 109-113
27 Yoshioka K, Ohno Y, Horiguchi Y, Ozu C, Namiki K, Tachibana M. Effects of a KiSS-1 peptide, a metastasis suppressor gene, on the invasive ability of renal cell carcinoma cells through a modulation of a matrix metalloproteinase 2 expression. *Life Sci* 2008; 83: 332-338
28 Hou YK, Wang Y, Cong WM, Wu MC. [Expression of tumor metastasis-suppressor gene KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 in portal vein tumor thrombus of hepatocellular carcinoma] *Ai Zheng* 2007; 26: 591-595
29 Iiizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786: 87-104
30 Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1379-1383
31 Li N, Li SS, Zhang HY, Xuan XY, Zheng XZ, Wang F, Yan AH. [Effect of KISS-1 on invasive potential and proliferation of esophageal squamous carcinoma cell line EC-1] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2009; 38: 263-267
32 李小丽, 赵志华, 张蕾, 温洪涛, 李晟磊, 许柯. 人食管鳞状细胞癌组织中Kiss-1 mRNA及蛋白的表达. 郑州大学学报(医学版) 2008; 43: 634-636

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1010-1015
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

CDK5在肝细胞癌中的异常表达

董贾中, 杨玉秀, 白杨秋, 张立达

■背景资料
已经发现CDK5在前列腺癌、甲状腺髓样癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中呈现异常表达, 通过改变细胞增殖、凋亡引起肿瘤的发生发展. 目前, 有关CDK5在HCC中的生物学作用和临床价值尚不甚明了, 研究其异常表达机制及与临床病理特征之间的关系, 有望为肝癌的早期诊断和靶向治疗提供分子生物学依据.

董贾中, 郑州大学第一附属医院 河南省郑州市 450003
董贾中, 杨玉秀, 白阳秋, 张立达, 河南省人民医院消化内科 河南省郑州市 450003
董贾中, 2007级郑州大学第一附属医院在读硕士, 主要从事肝脏病方面的研究.
河南省医学创新基金资助项目, No. 20050080
作者贡献分布: 此课题由杨玉秀与董贾中设计; 论文由杨玉秀审校; 研究过程由董贾中与白阳秋操作完成; 研究所用分析工具由张立达提供; 数据分析由董贾中完成; 本论文写作由董贾中完成.
通讯作者: 杨玉秀, 教授, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院消化内科. yangyuxiu55@126.com
电话: 0371-65580767
收稿日期: 2009-12-28 修回日期: 2010-03-10
接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-08

Abnormal expression of cyclin-dependent kinase 5 in hepatocellular carcinoma

Jia-Zhong Dong, Yu-Xiu Yang, Yang-Qiu Bai, Li-Da Zhang

Jia-Zhong Dong, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Jia-Zhong Dong, Yu-Xiu Yang, Yang-Qiu Bai, Li-Da Zhang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Supported by: the Medical Innovation Foundation of Henan Province, No. 20050080
Correspondence to: Professor Yu-Xiu Yang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, 7 Weiwu Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. yangyuxiu55@126.com
Received: 2009-12-28 Revised: 2010-03-10
Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the abnormal expression of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: The expression of CDK5 mRNA and protein in normal liver tissue, liver cirrhosis and HCC was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. The relationship between CDK5 expression and the clinicopathological characteristics of HCC was then analyzed.

RESULTS: The expression of CDK5 mRNA was up-regulated in HCC when compared with noncancerous liver tissue. The positive rates of CDK5 mRNA expression were 29.4%, 64.3% and 89.7% in normal liver tissue, liver cirrhosis and HCC, respectively. Significant differences were noted in the positive rates of CDK5 mRNA expression between normal liver tissue and HCC ($P < 0.05$) and between liver cirrhosis and HCC ($P < 0.01$). Immunohistochemistry analysis also revealed up-regulated expression of CDK5 in HCC compared with noncancerous liver tissue. The positive rates of CDK5 protein were 29.4%, 64.3% and 89.7% in normal liver tissue, liver cirrhosis and HCC, respectively. Significant differences were noted in the positive rates of CDK5 protein expression among the three groups ($\chi^2 = 58.095$, all $P < 0.01$). The overexpression of CDK5 is significantly correlated with the pathological grade of HCC ($\chi^2 = 19.330$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: CDK5 is up-regulated in HCC compared with noncancerous liver tissue. CDK5 plays an important role in the carcinogenesis of HCC. CDK5 overexpression may be related to tumor differentiation in HCC.

Key Words: Reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry; Hepatocellular carcinoma; Cyclin-dependent kinase 5; Up-regulated expression

Dong JZ, Yang YX, Bai YQ, Zhang LD. Abnormal expression of cyclin-dependent kinase 5 in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1010-1015

摘要

目的: 研究周期素依赖性激酶5(cyclin-dependent kinase5, CDK5)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展中的异常表达.

方法: 应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测CDK5 mRNA的表达水平; 免疫组织化学技术检测CDK5蛋白在正常肝组织、肝硬化和HCC组织中的表达; 分析CDK5与临床病理学特征的关系.

■同行评议者
孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科; 宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科

结果: CDK5 mRNA在HCC中呈上调表达, 阳性表达率在正常肝组织、肝硬化和HCC组织中分别为35.3%、64.3%、89.7%; 正常肝组织与HCC组织有显著差异(P<0.05), 肝硬化组织与HCC组织也有显著差异(P<0.01). CDK5蛋白在HCC中高表达, 阳性表达率在人正常肝组织、肝硬化和HCC组织之间分别为29.4%, 64.3%, 89.7%, 三组之间差异有统计学意义(χ^2 = 58.095, P<0.01). HCC组织中CDK5蛋白表达强度与肿瘤的病理学分级显著相关(χ^2 = 19.330, P<0.01).

结论: CDK5在HCC中上调表达, 他的异常表达在HCC的发生发展过程中发挥重要的作用, 且与肿瘤的分化程度相关.

关键词: 反转录聚合酶链式反应; 免疫组织化学; 肝细胞癌; 周期素依赖性激酶5; 高表达

董贾中, 杨玉秀, 白杨秋, 张立达. CDK5在肝细胞癌中的异常表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1010-1015
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1010.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 是原发性肝癌最常见的一种组织学类型. 在我国, 肝癌死亡率已占恶性肿瘤的第2位, 严重威胁着人类的生命健康. 肝癌的发生是一个复杂的多病因、多阶段、多因素参与的过程, 其中抑癌基因的突变缺失、癌基因的异常扩增与表达、多基因网络式调控异常决定最终肿瘤表型的表达[1]. 慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致肝硬化和肝癌发生的主要原因[2], 在这一过程中涉及多基因的异常表达. 我们已应用含有19 378个已知基因的寡核苷酸芯片筛选出肝硬化及HCC差异基因表达谱[3], 发现周期素依赖性激酶5(cyclin-dependent kinase 5, CDK5)在HCC组织中是一个明显高表达的基因. CDK5是CDK家族中的一员, 以前CDK5的研究主要集中在神经系统疾病, 其调节蛋白P35主要在脑组织表达, P35/CDK5在阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)相关病理改变中起重要作用[4]. 目前已经发现CDK5在前列腺癌、甲状腺髓样癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中呈现异常表达, 通过改变细胞增殖、凋亡引起肿瘤的发生发展. 但是CDK5在HCC的发生发展过程中的作用尚不明了. 本研究应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)及免疫组织化学技术, 检测CDK5在人正常肝组织、肝硬化和HCC组织中的基因和蛋白的表达, 探讨CDK5在HCC演进过程中的作用及其与临床病理特征之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2009-01/2009-06收取正常肝组织17例, 肝硬化组织14例, HCC组织39例. 其中肝硬化和HCC组织标本HBsAg均阳性, 正常肝组织HBsAg均阴性. 疾病诊断均经病理证实. 标本取出后快速置于液氮冷冻, 后转移至-80 ℃冰箱冻存待用. 标本随机取自河南省人民医院肝脏手术切除组织, 其中正常肝组织取自肝血管瘤手术切除病变部位的周围组织, 肝硬化组织取自门静脉高压行贲门周围血管离断术要求行病理检查的肝脏组织, HCC组织取自HCC手术切除组织. 所取组织新鲜, 经过患者知情同意. TRIzol Total RNA Reagent购自美国Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自美国Promega公司, 兔抗人CDK5多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 货号(sc-173).

1.2 方法

1.2.1 反转录PCR: (1)抽提总RNA: 用TRIzol试剂分别抽提正常肝组织、肝硬化和HCC组织总RNA. (2)内参基因β-actin上游引物: 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATC-3', 下游引物: 5'-GTAGCCGCGCTCGGTGAGGATCTTCAT-3', 扩增片段长度: 409 bp; 目的基因CDK5上游引物: 5'-GGATTCCCGTCCGCTGTT-3', 下游引物: 5'-CCTGTGGCATTGAGTTTGG-3', 扩增片段长度: 322 bp. (3)RT-PCR反应: 按照Promega公司提供的RT-PCR试剂盒的要求步骤进行反转录聚合酶链式反应, 扩增产物用2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定. (4)扩增产物图像分析: 通过对CDK5扩增产物进行扫描和半定量分析, 结果用Syngene Gene Genius全自动凝胶成像系统(美国Syngene公司)检测图像灰度值.

1.2.2 免疫组织化学: (1)HCC组织病理学分级: 标本经过HE染色明确诊断, 并且进行病理学分级. HCC病理学分级参照Edmondson分级. Ⅰ级: 肿瘤细胞大小一致. 核浆比类似正常肝细胞, 瘤细胞呈细索状排列; Ⅱ级: 核浆比较Ⅰ级增大, 瘤细胞呈粗索状或腺管状排列; Ⅲ级: 核浆比明显失调. 多形性明显, 索状排列紊乱, 无假腺管或胆栓形成; Ⅳ级: 核浆比严重失调细胞核大小不一. 胞质量少, 多呈实团状, 索状结构不明显. 肿瘤分化介于Ⅱ-Ⅲ级或Ⅲ-Ⅳ级之间者, 分别归入Ⅲ或Ⅳ级. 在39例HCC中, Ⅰ级7例, Ⅱ级

■**研发前沿**
GCDK5/P35可以与多种蛋白发生相互作用, 如β-catenin,、CDK5抑制因子、GFAP、dbpa DNA结合蛋白、Pctaire1、α-actinin和Ca^{2+}-钙调蛋白依赖的蛋白激酶等, 而近年研究热点主要集中于肝癌细胞中CDK5是否也可以通过PIKE-A-Akt途径活化Akt, 致使细胞凋亡受阻, 异常增殖, 导致肝癌的形成.

■相关报道
Sharma等已经证明血管生成抑制因子可以通过选择性抑制CDK5的表达诱导细胞凋亡. Goodyear等对浸润性乳腺癌细胞MDA-MB231应用选择性CDK5抑制剂-roscovitine, 免疫荧光显微技术观察到用药后24 h细胞开始出现凋亡改变, 而且细胞形态学的改变随着用药时间的增加变得更加明显.

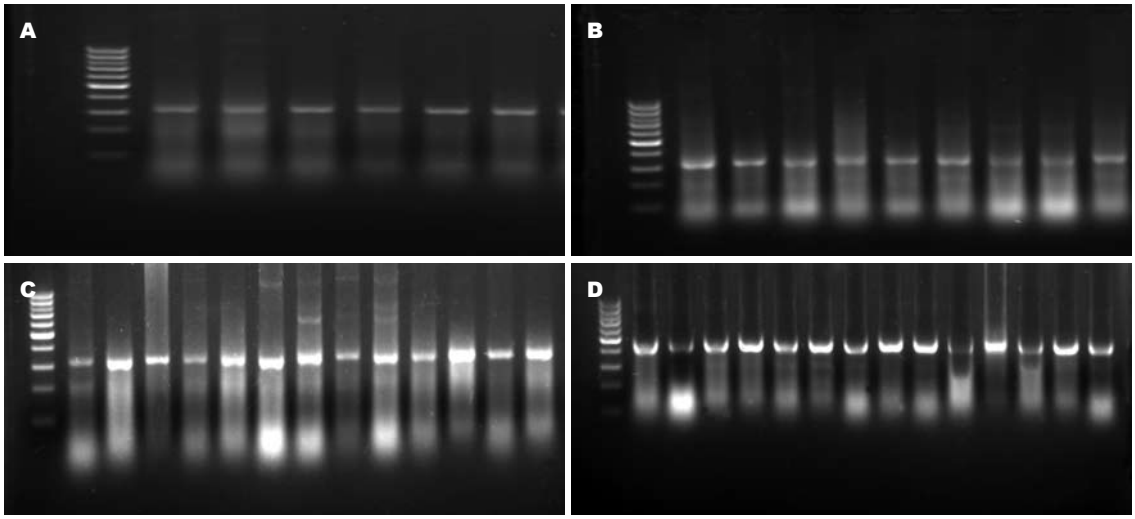


图 1 CDK5 RT-PCR产物电泳图. A: 正常肝组织; B: 肝硬化组织; C: HCC组织; D: 内参基因β-actin.

8例, Ⅲ级10例, Ⅳ级14例. (2)免疫组织化学检测CDK5: 肝组织经梯度解冻, 100 g/L的多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 制成4 μm厚的石蜡切片, HE染色, 组织学观察. 切片经高压热修复, 采用免疫组织化学PV法, DAB显色, 苏木素复染, 盐酸酒精分化, 无水乙醇脱水, 中性树胶封片. 以0.01 mol/L的PBS(pH7.4)代替一抗作为阴性对照, 以组织中显示棕黄色颗粒为CDK5表达阳性. (3)免疫组织化学结果判断标准: 以阳性细胞数≥10%作为阳性判断标准, 根据阳性细胞百分率分为阴性(-): 阳性细胞不可见或阳性细胞不足5%; 弱阳性(+): 阳性细胞散在或为组织细胞的1/3以下; 中度阳性(++): 阳性细胞呈局灶分布, 占全组织细胞1/3-2/3; 强阳性(+++): 阳性细胞呈弥漫分布,占全组织细胞2/3以上.

统计学处理 应用SPSS10.0进行Shapiro-Wilk检验、成组设计资料的t检验、χ^2检验、Fisher's精确检验和Kruskal-Wallis非参数检验的统计学处理, 以$\alpha = 0.05$为检验水准.

2 结果

2.1 RT-PCR 正常肝组织、肝硬化组织、HCC组织总RNA提取结果良好. 总RNA的吸光度A_{260}/A_{280}值均为1.8-2.0, 电泳结果证实RNA未降解. CDK5 RT-PCR扩增产物电泳图谱显示在相当于322 bp处有DNA片段区带, 内参基因扩增产物显示在409 bp处有DNA片段区带(图1). 17例正常肝组织中CDK5 mRNA阳性表达6例(35.3%), 14例肝硬化组织CDK5 mRNA阳性表达9例(64.3%), 39例HCC组织中CDK5 mRNA阳性表达35例(89.7%). 运用Fisher's检验得出: 正常肝组织与肝硬化组织中CDK5 mRNA表达差异无统计学意义(P>0.05), 正常肝组织与肝癌组织(P<0.01)以及肝硬化组织与肝癌组织(P = 0.044)CDK5 mRNA表达差异均有统计学意义. 以目的基因CDK5和内参基因β-actin的灰度比值作为统计学对象行mRNA半定量分析, 三组的Shapiro-Wilk检验P值分别为: 0.761、0.732、0.332, 提示各组样本符合正态分布, 运用成组设计资料t检验两两比较分析得出: 正常肝组织与肝硬化组织、正常肝组织与HCC组织以及肝硬化组织与HCC组织差异均有统计学意义(表1).

表 1 正常肝组织、肝硬化和HCC组织中CDK5 mRNA半定量分析 (mean ± SD)

分组	阳性n	CDK5 mRNA/β-actin mRNA 灰度比值
正常肝组织	6	0.820 ± 0.105[b]
肝硬化组织	9	0.966 ± 0.036[d]
HCC组织	35	1.037 ± 0.072[f]

[b]P = 0.002<0.01, t = −3.887 *vs* 肝硬化组织; [d]P = 0.007<0.01, t =−2.852 *vs* HCC组织; [f]P<0.01, t = −6.390 *vs* 正常肝组织.

2.2 免疫组织化学分析

2.2.1 CDK5的表达: CDK5阳性表达物呈棕黄色颗粒, 弥散分布于正常肝细胞、肝硬化细胞胞质, 在HCC细胞中细胞质和细胞核均弥漫分布, 细胞膜未见着色. 不同病例的阳性着色颗粒的大小、分布密度及着色深浅亦有不同(图2). 正常组、肝硬化组及HCC组CDK5蛋白阳性率分别为29.4%, 64.3%, 89.7%. 应用Fisher's检验得出: 正常肝组织与肝硬化组织中CDK5蛋白表达

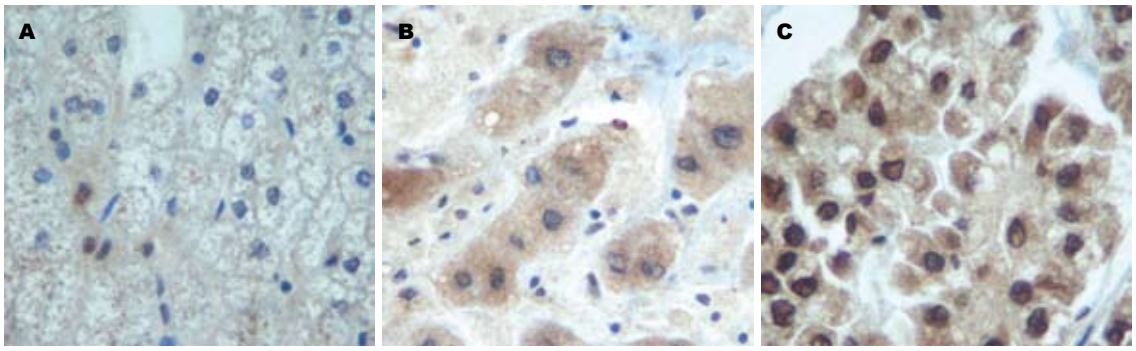


图 2 肝组织CDK5免疫组织化学结果(×400). A: 正常肝组织; B: 肝硬化组织; C: HCC组织.

■创新盘点
本研究从DNA、mRNA及蛋白水平上, 对正常肝组织、肝硬化组织、HCC组织中CDK5进行了全面系统的分析, 证明CDK5在肝癌的发展进程中呈上调表达趋势, 并与HCC的分化程度密切相关.

差异无统计学意义(P>0.05), 正常肝组织与肝癌组织(P<0.01)以及肝硬化组织与肝癌组织(P = 0.044)CDK5蛋白表达差异均有统计学意义. 对三种标本的CDK5表达强度, 应用非参数检验Kruskal-Wallis统计学方法分析数据得出: 三种组织中CDK5表达强度有明显差异(χ^2 = 58.095, P<0.01, 表2).

2.2.2 CDK5表达强度与HCC临床病理特征的关系: CDK5在中、低分化组中的阳性表达率明显高于高分化组, 低分化组与高分化组差异有统计学意义; 在病理学分级较高的HCC组织表达较强, EdmondsonⅣ级的阳性表达率明显高于EdmondsonⅠ级, 且差别显著. 运用Kruskal-Wallis统计方法检验显示不同分化程度以及不同病理分级的HCC组织CDK5表达强度差别有显著性, HCC组织CDK5表达越强, 分化程度就越低(χ^2 = 13.938, P = 0.001<0.01), 病理分级程度也越高(χ^2 = 19.330, P<0.01, 表3).

表 2 正常肝组织、肝硬化和HCC组织中CDK5蛋白的表达

分组	n	阳性	CDK5表达强度			
			−	+	++	+++
正常肝组织	17	5	12	3	1	1
肝硬化组织	14	9	5	2	4	3
HCC组织	39	35	4	5	10	20

3 讨论

有资料显示, 每年全球新患肝癌人数为62.6万人, 因肝癌死亡者高达59.8万人[5], 而新发肝癌病例中50%发生于中国[6], 我国的肝癌诊治形势十分严峻. 虽然目前肝癌的发病机制研究取得了一定的进展, 但是肝癌形成的分子生物学机制的多样性决定了仅限于目前的研究是远远不够的, 对肝癌形成的分子生物学机制仍需要进一步研究, 以便能为诊断和治疗提供分子生物学依据.

CDK是细胞周期调控网络的核心蛋白, 其表达活性的改变直接影响到细胞周期的长短, 决定着细胞的进程, 与机体细胞的生长、分化、运动、凋亡以及肿瘤的发生发展、转移关系密切[7-9]. CDK5是CDK家族中的一员. 研究表明, CDK5有60%的序列和CDK2同源, 同时CDK5也包含了全部的保守的蛋白激酶区域, 并且含有CDK家族成员共有的PSTAIRE结构域[10], 但他既非细胞周期素依赖, 也不调节细胞周期, 他通过与P35或P39相互作用在有丝分裂后神经元复杂迁移、突触传递和神经细胞死亡等活动中起重要作用[11,12]. 已经证明CDK5/P35可以与多种蛋白发生相互作用, 如β-catenin、CDK5抑制因子、GFAP、dbpa DNA结合蛋白、Pctaire1、α-actinin和Ca^{2+}-钙调蛋白依赖的蛋白激酶等[13]. 研究发现, CDK5蛋白不仅存在神经系统中, 在前列腺癌细胞中也呈现高表达, 还参与了前列腺癌细胞的转移. 在前列腺癌AT6.3细胞系中, 通过转染CDK5的反义RNA可以明显抑制癌细胞的迁移和转移[14]. 在浸润性乳腺癌细胞MDA-MB231中CDK5、P35和P25均表达, 且证明CDK5蛋白可以调控MDA-MB231细胞增殖[15]. Sharma等已经证明血管生成抑制因子可以通过选择性抑制CDK5的表达诱导细胞凋亡[16]. Goodyear对浸润性乳腺癌细胞MDA-MB231应用选择性CDK5抑制剂-roscovitine, 免疫荧光显微技术观察到用药后24 h细胞开始出现凋亡改变, 而且细胞形态学的改变随着用药时间的增加变得更加明显[15]. 由此推测, CDK5主要通过引起细胞增殖和凋亡异常引起肿瘤的发生发展的, 而不在细胞周期调节中发挥作用.

我们应用RT-PCR对CDK5 mRNA进行定性和半定量分析发现正常肝组织与HCC组织

■应用要点
CDK5在肝癌的发生发展中起到相当重要的作用, 可以作为HCC早期诊断的一个候选基因. 研究CDK5上调表达的分子机制, 有望为肝癌的靶向分子治疗提供分子生物学依据.

表 3 CDK5表达强度与HCC组织分化及核分级的关系

分组	*n*	阳性*n*(%)	Fisher's exact (*P*值)	CDK5表达强度			
				–	+	++	+++
HCC组织	39	35(89.7)		4	5	10	20
分化程度							
高	9	6(66.7)		3	4	1	1
中	14	13(92.9)	0.147	1	1	4	8
低	16	16(100.0)	0.037	0	0	5	11
Edmondson分级							
Ⅰ	7	3(42.9)		4	2	1	0
Ⅱ	8	8(100.0)	0.077	0	2	3	3
Ⅲ	10	10(100.0)	0.051	0	1	3	6
Ⅳ	14	14(100.0)	0.026	0	0	3	11

以及肝硬化组织与HCC组织差异均有统计学意义, HCC组织较正常组织mRNA表达明显升高($P<0.01$); 应用免疫组织化学对CDK5进行蛋白测定发现正常肝组织与肝硬化组织中CDK5蛋白表达无明显差异, HCC组织较正常肝组织、肝硬化组织与明显升高($P<0.05$), 并且其表达与HCC的分化程度、病理学分级有明显相关性($P<0.01$), CDK5在中、低分化组中的阳性表达率明显高于高分化组, 且低分化组与高分化组差别显著; 病理分级较高的HCC组织表达较强, EdmondsonⅣ级的阳性表达率明显高于EdmondsonⅠ级. RT-PCR和免疫组织化学二者相互印证, 并与基因芯片结果一致. 说明CDK5的高表达与HCC的发生发展有着密切的联系.

本研究发现CDK5蛋白在正常肝组织和肝硬化组织中主要分布于细胞质, 细胞核中很少见, 而HCC组织中细胞质和细胞核均弥漫分布. CDK5抑制剂可以使CDK5/P35和磷酸化STAT3在甲状腺髓样癌细胞核中分布减少, 从而延缓肿瘤的发生发展[17]; 已经证实现HCC中P-STAT3的阳性率明显高于癌周肝组织, 认为STAT3的激活可能是HCC发生的早期事件[18,19]. Gong等发现转录因子MEF-2是CDK5的细胞核内直接靶点, CDK5可磷酸化MEF-2转录激活结构域的特异丝氨酸, 从而抑制MEF-2的活性[20]. 我们在研究过程中发现CDK5蛋白在HCC细胞中的异常分布, 提示是否由于CDK5基因发生突变导致CDK5蛋白结构异常, 从而使CDK5蛋白产生跨膜运动, 在细胞核内堆积. CDK5抑制剂是否也可以减少HCC细胞核内CDK5/P35和磷酸化STAT3, 延缓HCC的发生发展, 以及CDK5是否也可以作用于HCC细胞内的转录因子MEF-2, 使转录发生异常, 有待于进一步研究.

有资料表明, 细胞内信息传递中的某些障碍与肿瘤发生有关, 这些控制细胞增殖、凋亡的信息传递通路中某一环节的异常都可以引起细胞生长失控、凋亡受阻, 最终导致肿瘤形成. 在胶质母细胞瘤中, CDK5可以使PIKE-A的Ser-279磷酸化, 从而使下游的Akt活化[21]. 研究表明Akt/mTOR是HCC形成过程中的关键的信号转导途径. mTOR信号通路在细胞生长中处于核心地位, mTOR信号传导通路活化可以抑制多种刺激诱发的细胞凋亡, 促进细胞周期进展, 从而促进细胞的生存和增殖, 同时参与血管形成, 在肿瘤的形成中扮演重要角色, 并参与肿瘤的侵袭和转移[22-26]. Akt活化可以激活mTOR, 活化的mTOR可以磷酸化激活P70S6激酶, 后者又使40S核糖体蛋白S6磷酸化, S6磷酸化使40S亚单位参与活跃的多核糖体翻译, 从而增加包括编码核糖体蛋白、延长因子、胰岛素生长因子Ⅱ在内的含有5末端寡聚嘧啶的mRNAs的翻译[27]. HCC细胞中CDK5是否也可以通过PIKE-A-Akt途径活化Akt, 进而激活mTOR信号传导通路, 引起肿瘤的发生发展, 有待于进一步研究. CDK5的高表达也很可能通过改变细胞内信号转导途径, 致使细胞凋亡受阻, 异常增殖, 导致HCC的形成.

CDK5的高表达在HCC的发生发展过程中起着重要的作用, 进一步研究CDK5的作用机制, 有望为临床诊断、潜在的分子靶向治疗及预后判断提供分子生物学依据.

4 参考文献

1 Lemmer ER, Friedman SL, Llovet JM. Molecular diagnosis of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: the potential of gene expression

profiling. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 373-384
2 Kao JH, Chen DS. Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver Int* 2005; 25: 696-703
3 白阳秋, 丁光伟, 杨玉秀. 肝癌发生过程中的差异基因表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2537-2541
4 Tsai LH, Lee MS, Cruz J. Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697: 137-142
5 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
6 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
7 Liu L, Schwartz B, Tsubota Y, Raines E, Kiyokawa H, Yonekawa K, Harlan JM, Schnapp LM. Cyclin-dependent kinase inhibitors block leukocyte adhesion and migration. *J Immunol* 2008; 180: 1808-1817
8 Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1770-1783
9 Cai D, Latham VM Jr, Zhang X, Shapiro GI. Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9270-9280
10 Tarricone C, Dhavan R, Peng J, Areces LB, Tsai LH, Musacchio A. Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex. *Mol Cell* 2001; 8: 657-669
11 Grant P, Sharma P, Pant HC. Cyclin-dependent protein kinase 5 (Cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism. *Eur J Biochem* 2001; 268: 1534-1546
12 Smith DS, Tsai LH. Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends Cell Biol* 2002; 12: 28-36
13 Honma N, Asada A, Takeshita S, Enomoto M, Yamakawa E, Tsutsumi K, Saito T, Satoh T, Itoh H, Kaziro Y, Kishimoto T, Hisanaga S. Apoptosis-associated tyrosine kinase is a Cdk5 activator p35 binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 398-404
14 Strock CJ, Park JI, Nakakura EK, Bova GS, Isaacs JT, Ball DW, Nelkin BD. Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 7509-7515
15 Goodyear S, Sharma MC. Roscovitine regulates invasive breast cancer cell (MDA-MB231) proliferation and survival through cell cycle regulatory protein cdk5. *Exp Mol Pathol* 2007; 82: 25-32
16 Sharma MR, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiostatin-induced inhibition of endothelial cell proliferation/apoptosis is associated with the down-regulation of cell cycle regulatory protein cdk5. *J Cell Biochem* 2004; 91: 398-409
17 Lin H, Chen MC, Chiu CY, Song YM, Lin SY. Cdk5 regulates STAT3 activation and cell proliferation in medullary thyroid carcinoma cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 2776-2784
18 Yu XT, Zhu SN, Xu ZD, Hu XQ, Zhu TF, Chen JQ, Lu SL. Roles of EGFR-Stat3 signal pathway in carcinogenesis of experimental hepatoma in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 145-152
19 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 33-36
20 Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D, Blair LA, Marshall J, Mao Z. Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* 2003; 38: 33-46
21 Liu R, Tian B, Gearing M, Hunter S, Ye K, Mao Z. Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7570-7575
22 Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, Allen AN, Kole TP, Zarek PE, Powell JD. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol* 2007; 178: 2163-2170
23 Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol* 2006; 169: 2171-2180
24 Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21: 6587-6597
25 Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* (Bethesda) 2006; 21: 362-369
26 Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C281-C291
27 彭贵主, 吴波, 单人锋, 周福庆. mTOR/P70S6K信号通路在肝细胞肝癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3279-3282

■同行评价
本研究创新性好, 设计合理, 思路清晰, 数据可靠, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1016-1020
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

丙型肝炎病毒蛋白在转基因模型中的作用机制研究进展

焦 健, 王江滨, 赵 平

■背景资料
自HCV被发现以来, 人们一直在对HCV如何逃避宿主免疫反应的慢性化机制进行探索, 由于HCV通常只在人和高级灵长类动物中形成自然感染, 因此极少有研究建立HCV长期感染的实验室模型, 转基因技术为研究人类疾病的分子机制提供了方法, 在此基础上开展的转基因细胞系, 嵌合体和转基因动物模型在感染性疾病研究中的价值已得到证实.

焦健, 王江滨, 赵平, 吉林大学中日联谊医院 吉林省长春市 130033
吉林省科技厅基金资助项目, No. 20080745
长春市科技局基金资助项目, No. 08SF02
作者贡献分布: 本文综述由焦健与赵平完成, 王江滨审校.
通讯作者: 焦健, 副主任医师, 130033, 吉林省长春市, 吉林大学中日联谊医院. jjian@jlu.edu.cn
电话: 0431-84995850
收稿日期: 2009-12-15 修回日期: 2010-02-10
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Advances in understanding the role of HCV proteins in the pathogenesis of HCV-induced liver diseases in animal models

Jian Jiao, Jiang-Bin Wang, Ping Zhao

Jian Jiao, Jiang-Bin Wang, Ping Zhao, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China
Supported by: the Research Foundation of Jilin Provincial Science & Technology Department, No. 20080745; and the Research Foundation of the Science & Technology Bureau of Changchun City, No. 08SF02
Correspondence to: Jian Jiao, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China. jjian@jlu.edu.cn
Received: 2009-12-15 Revised: 2010-02-10
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract
Hepatitis C virus (HCV) is closely associated with the occurrence of hepatitis, cirrhosis and liver cancer. As HCV naturally infects only humans and higher primates, few animal models of HCV infection have been established. As a result, limited knowledge on the pathophysiology of and host immune responses to HCV infection is obtained. Gene transfer approaches have been used to establish relevant animal models to investigate the molecular basis of HCV-induced liver diseases. This paper focuses on providing an overview of the recent advances in understanding the role of HCV proteins in the pathogenesis of HCV-induced liver diseases in animal models.

Key Words: Hepatitis C virus; Gene transfer; Model

Jiao J, Wang JB, Zhao P. Advances in understanding the role of HCV proteins in the pathogenesis of HCV-induced liver diseases in animal models. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1016-1020

■同行评议者
刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

摘要
丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)与肝炎、肝硬化和肝癌的发生密切相关. 由于HCV通常只在人和高级灵长类动物中形成自然感染, 因此极少有研究建立HCV长期感染的实验室模型, HCV感染的病理生理学变化及其与宿主相互作用的相关研究也因此受到限制. 近年来, 转基因技术为研究人类疾病的分子机制提供了方法, 在此基础上开展的转基因细胞系, 嵌合体和转基因动物模型在感染性疾病研究中的价值已得到证实. 本文综述了近年来HCV转基因模型中HCV蛋白相关的可能致病机制.

关键词: 丙型肝炎病毒; 转基因; 模型

焦健, 王江滨, 赵平. 丙型肝炎病毒蛋白在转基因模型中的作用机制研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1016-1020
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1016.asp

0 引言
丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链RNA病毒, 与肝炎、肝硬化和肝癌的发生密切相关. 由于HCV严格的嗜肝性, 且只在人和高级灵长类动物(如猩猩)中形成自然感染, 目前尚缺少HCV长期感染的实验室模型, HCV感染的病理生理学变化及其与宿主相互作用的相关研究也因此受到限制. 近年来, 转基因技术为研究人类疾病的分子机制提供了方法, 在此基础上开展的转基因细胞系, 嵌合体和转基因动物模型在感染性疾病研究中的价值已得到证实. 本文综述目前HCV转基因模型研究中所发现的HCV蛋白相关的可能致病机制.

1 HCV转基因模型
近年来, HCV组织培养模型和动物模型的研究都取得了重要进展. 组织培养模型主要以复制子系统为基础, 其为病毒在细胞内以及细胞培

养物中有效复制提供了方法, 让我们得以在体外模拟完整的病毒生活循环周期, 也为进一步的体内研究提供了线索[1]. 啮齿类动物因为其繁殖周期短, 体型小, 价格便宜从而最常用于动物模型研究. 采用不同启动子构建的多种小鼠模型为探讨HCV蛋白在HCV感染及致病机制中的作用提供了大量研究结果[2,3]. 最常见的转基因鼠模型式通过采用显微注射技术构建的, 即将HCV全长或部分基因组及某个特定的启动子基因引入小鼠卵细胞, 从而产生一个稳定表达HCV蛋白的小鼠系. 但此种转基因模型中, 病毒蛋白被认为是小鼠的自身抗原, 其表达对小鼠的免疫系统并不造成影响, 因此体内也不存在抗HCV抗体. 为了观察机体对HCV感染所产生的免疫学反应, Kohara等采用Cre/loxp技术, 构建了携带HCV核心蛋白, E1, E2蛋白和NS2蛋白cDNA的转基因小鼠, 通过感染Cre重组表达的腺病毒来表达这些蛋白以模拟HCV急性感染, 这种小鼠模型为探讨HCV引起的免疫反应和HCV感染发病机制提供了有力的工具[4]. 为改善转基因鼠HCV蛋白在肝中的表达过低的局限性, 近年来出现的非遗传的转基因方法[如尾静脉高压注射法, 即将质粒DNA表达载体或小干扰RNA(iRNA)通过高压注射的方法引入小鼠体内进行表达], 为探讨HCV相关的抗体产生、调节因子(regulatory elements)表达及评价基因治疗的效果提供了有效途径[5].

其他转基因方法, 如尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen, uPA)转基因小鼠[6], 以及通过致死量辐射去除正常免疫系统的小鼠与严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠的骨髓细胞重构后, 将体外感染HCV的人肝细胞移植到小鼠体内形成的三聚体小鼠模型[7,8]等都为探讨HCV蛋白的致病作用奠定了基础.

2 HCV蛋白在转基因模型中的作用

2.1 核心蛋白 目前有关HCV转基因模型的研究多集中在探讨HCV结构蛋白, 尤其是核心蛋白的作用. 胰岛素抵抗, 影响极低密度脂蛋白(very-low-density lipoprotein, VLDL)代谢已经被证实与HCV核心蛋白导致的肝脂肪变性, 纤维化和IFN抵抗密切相关. Koike等采用核心蛋白转基因鼠进行了糖耐受实验的研究, 结果显示, 转基因鼠比非转基因鼠具有更高的血糖值, 从而提示胰岛素降低血糖水平的能力在HCV核心蛋白转基因鼠中明显减弱, 这与慢性丙型肝炎患者中早已被观察到的胰岛素抵抗情况类似. 该研究还推测, HCV核心蛋白引起的SOCS3(细胞因子信号3抑制子)促进了蛋白酶体IRS1和IRS2(胰岛素受体底物1和2)通过泛化素机制的降解, 以及HCV核心蛋白促进TNF产生可能与胰岛素抵抗的机制相关[9-11].

此外, 还有报道提出, HCV核心蛋白可能通过影响脂蛋白代谢中的某些特殊途径而引起肝脏脂肪变. Perlemuter等通过转基因鼠体内模型的研究证实, 在小鼠肝脏过度表达HCV核心蛋白可干扰VLDL的装配和分泌[12]. 微粒体三酰甘油转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)在肝脏脂蛋白装配和分泌中起重要作用, 有研究发现, HCV核心蛋白转基因鼠中MTP的表达受到抑制, 可能与HCV相关的肝脂肪变相关[13].

值得提出的是, 在人类, HCV引起的脂肪变性的发展和纤维化进展可能是基因型依赖的. 有研究报道, 1型HCV感染者脂肪变的出现可能与HCV和非酒精性脂肪肝(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的共存有关, 且与BMI升高有一定的关联[14]. 而另一个研究提示, 脂肪变可能由病毒直接导致并可能与3型HCV感染相关[15,16]. 但目前在转基因鼠中没有发现相关的结果, 主要原因是目前研究所采用的转基因鼠几乎都是应用1b型HCV的基因序列.

HCV核心蛋白在肝癌进展中的作用已被转基因小鼠模型证实. 核心蛋白引起的肝细胞脂肪变, 过氧化压力以及其他信号途径的改变都可能最终导致肝细胞癌(hepato cellular carcinoma, HCC)的发生. 总结起来, HCV导致肝癌可能主要通过2种途径. (1)核心蛋白影响线粒体功能导致的过氧化压力可能出现细胞生长相关基因的异常. (2)调节细胞基因表达, 影响细胞间信号传导(如MAPK途径), 从而导致转录因子活化和出现异常的细胞周期等[17].

2.2 E1和E2蛋白 在目前HCV转基因鼠的研究中, 多数学者采用HCV E1、E2蛋白与核心蛋白同时表达以研究HCV相关的损伤. 仅有2个研究单独采用了包膜蛋白E1、E2转基因鼠(Koike等用E1和E2蛋白[18], Pasquienlli用E2蛋白[19]), 但并没有在转基因鼠中发现肝损伤. 值得关注的是, 有一项研究发现, E1和E2蛋白转基因鼠可出现HCV蛋白在肝外的表达并出现唾液腺和泪腺等腺体淋巴细胞浸润以及纤维组织增生的病理改

■**研发前沿**
HCV如何逃避宿主免疫反应而使感染持续存在, 并最终导致肝病恶化的机制一直是研究者们努力探索而尚未解决的问题. 探讨HCV对干扰素治疗的抵抗机制, 寻找更理想的抗HCV治疗方案是丙型肝炎领域另一亟待解决的关键问题.

■相关报道
2005年, Etienne等在Nature上发表文章提出, RIG-1分子系通过与一种被称为Cardif(card adaptor inducing IFN-β)的受体蛋白相互作用而引起NF-κB和IRF3的活化, 并进一步引起抗病毒免疫反应的. Cardif可以被HCV NS3/4A蛋白酶特异性切割, 从而改变IRF3和NF-κB传导途径, 影响机体的抗病毒免疫应答.

变[20]. 这个现象和HCV感染者Sjogren's综合征的发生非常类似.

2.3 非结构蛋白 如前所述, 目前HCV转基因鼠的研究多集中在探讨HCV核心蛋白的作用, 直到最近几年才出现了表达HCV非结构蛋白的转基因鼠, 在这些转基因鼠中均未发现肝脏的损伤性改变, 但都发现了转基因小鼠对致死量TNF介导的肝损伤的抵抗.

Majumder等于2002年采用肝特异性apoE启动子或鼠MUP启动子引入HCV NS5A基因片段构建了转基因FVB小鼠, 结果显示, 这些转基因鼠的表型与其他正常的同窝出生的小鼠相类似, 并没有明显的肝脏组织学改变, 该研究一直观察到24周龄. 但研究发现表达NS5A蛋白的转基因鼠对注射致死量TNF引起的肝细胞凋亡有明显的抵抗作用, 给这些转基因鼠注射抗Fas抗体却并不影响肝细胞的凋亡, 这就提示NS5A可能通过非Fas介导的机制影响肝细胞的凋亡过程[21].

2006年, Frelin等构建了能够在肝细胞稳定表达HCVNS3/4A蛋白的小鼠模型以研究HCVNS3/4A蛋白在体内的作用. 结果显示, 在肝脏表达HCVNS3/4A蛋白并不引起自发的肝脏疾病, 但能够改变肝内的免疫细胞亚群并对致死量TNF诱导的肝损伤具有保护作用, 而这种TNF抵抗作用能够被p38MAPK抑制剂逆转[22].

3 HCV蛋白对细胞信号传导的影响

3.1 IFN途径 转基因鼠的体内实验证实, 全长HCV蛋白的表达和核心蛋白的表达均能够抑制IFN的信号传导, 其机制可能是通过上调蛋白磷酸酶2A和STAT的去甲基化, 使STAT转录因子与干扰素刺激基因(interferon stimulating gene, ISG)启动子的结合被抑制[23].

Kawamuru等发现HCV核心蛋白能够通过抑制STAT1和刺激STAT3活化来保护感染的肝细胞免于细胞介导的免疫损伤并促进肝细胞的增殖[24]. Yoshida等认为, STAT3活化的机制可能是HCV核心蛋白通过酪氨酸位点的磷酸化直接与STAT3作用, 导致Bcl-xL, cyclin D1上调, 进而出现不依赖支持物生长(anchorage-independent growth, 非停泊性生长)的现象, 从而与肿瘤形成有关[25]. 此外, Miyoshi等2005年还报道, SOCS基因的衰减与IFNγ抵抗的产生与有关[26].

3.2 凋亡传导途径 Yang等2002年报道, Fas介导的p38活化在表达核心蛋白的HepG2细胞系以及转基因鼠的肝细胞中均受抑制[27]. 核心蛋白可阻断ASK1(凋亡信号调节激酶1)的活化, 而ASK1是一个p38途径中MAPKKK的上游的主要分子, p38和ASK活化是细胞抵抗Fas介导的凋亡而生存所必需的信号分子, 因此HCV核心蛋白转基因鼠中肝脏Fas介导细胞凋亡加速. Machida等采用HCV core-E1-E2-NS2转基因鼠则有不同的发现, 这些转基因小鼠对Fas抗体刺激导致的致死性具有抵抗作用, 提示HCV持续感染可能是Fas介导的细胞凋亡受抑制的结果[28]. 体外实验还发现, HCV NS5A具有使胞质内P53升高, 下调P21蛋白, 活化STAT3和抑制TNF-α介导的凋亡等作用, 但上述结果在体内实验中还未被证实[29].

3.3 过氧化和脂肪变相关信号研究 研究发现, 过氧化酶体增殖物激活型受体α(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARα)蛋白活化引起的某些蛋白质表达, 包括脂肪酸代谢酶和细胞循环调节子, 在HCV核心蛋白转基因鼠中明显升高[30]. 这就提示, PPARα活化可能与HCV核心蛋白介导的肝脏脂肪变和肝癌形成有关. 细胞间信号级联的改变, 如MAPK/cyclin D1-CDK4信号转导通路的活化也被认为与核心蛋白的表达相关. Koike等2007年报道, 过氧化压力的增加和清道夫系统(scavenger system)的活化与脂类和糖代谢的改变相关, 并可能与HCV持续感染及随后HCC的发展有关[31].

另外, 一氧化氮(nitric oxide, NO)可引起线粒体损伤并导致双链DNA的崩解和DNA的氧化损伤. Machida等报道, 在体外HCV感染细胞中, HCV感染可引起活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生并降低线粒体的膜转运能力, HCV感染细胞线粒体损伤和双链DNA的崩解是由NO和ROS介导的. 在HCV蛋白中, 核心蛋白, E1和NS3蛋白都是潜在的ROS诱生物, 他们的表达导致DNA损伤和STAT3的活化, 因此, 核心蛋白转基因鼠显示出高水平的脂质过氧化和DNA的过氧化损伤[32].

4 结论

尽管目前有关HCV蛋白致病机制的研究已经取得了很多进展, 但通过HCV转基因模型, 人们不仅获得了更多的体内研究结果, 而且有关HCV与宿主相互作用以及对宿主信号传导的影响也得到了很多突破性进展. 但什么种类的模型最接近于人类的真实感染? 哪些研究结果最符合人类HCV感染的真实状况? 很多问题都需要更深入的, 尤其是人类和小鼠的平行研究以进一步明确.

5 参考文献

1 Brass V, Moradpour D, Blum HE. Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. *J Viral Hepat* 2007; 14 Suppl 1: 64-67

2 Kremsdorf D, Brezillon N. New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2427-2435

3 Ilan E, Eren R, Lubin I, Nussbaum O, Zauberman A, Dagan S. The Trimera mouse: a system for generating human monoclonal antibodies and modeling human diseases. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4: 102-109

4 Wakita T, Katsume A, Kato J, Taya C, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, Miyamoto M, Hiasa Y, Kohara M. Possible role of cytotoxic T cells in acute liver injury in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by Cre/loxP system. *J Med Virol* 2000; 62: 308-317

5 Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther* 2007; 14: 99-107

6 Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 1990; 62: 447-456

7 Zhu Q, Oei Y, Mendel DB, Garrett EN, Patawaran MB, Hollenbach PW, Aukerman SL, Weiner AJ. Novel robust hepatitis C virus mouse efficacy model. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3260-3268

8 Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, Zauberman A, Eren R, Lubin I, Neville L, Ben-Moshe O, Kischitzky A, Litchi A, Margalit I, Gopher J, Mounir S, Cai W, Daudi N, Eid A, Jurim O, Czerniak A, Galun E, Dagan S. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* 2002; 185: 153-161

9 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004; 126: 840-848

10 Koike K. Hepatitis C virus infection can present with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 2006; 49: 51-57

11 Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Hanada S, Maeyama M, Baba S, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Ogata H, Yoshimura A, Sata M. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165: 1499-1508

12 Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chrétien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Bréchot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002; 16: 185-194

13 Mirandola S, Realdon S, Iqbal J, Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, Marcolongo M, Vario A, Datz C, Hussain MM, Alberti A. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1661-1669

14 Bosques-Padilla F. [Hepatitis-C infection and hepatic steatosis] *Gac Med Mex* 2004; 140 Suppl 2: S73-S76

15 Younossi ZM, McCullough AJ, Ong JP, Barnes DS, Post A, Tavill A, Bringman D, Martin LM, Assmann J, Gramlich T, Mullen KD, O'Shea R, Carey WD, Ferguson R. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 705-709

16 Ramalho F. Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Res* 2003; 60: 125-127

17 Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: S132-S135

18 Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Matsuura Y, Suzuki T, Saito I, Iino S, Kurokawa K, Miyamura T. Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 12): 3031-3038

19 Pasquinelli C, Shoenberger JM, Chung J, Chang KM, Guidotti LG, Selby M, Berger K, Lesniewski R, Houghton M, Chisari FV. Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology* 1997; 25: 719-727

20 Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Matsuura Y, Miyamura T. Sialadenitis histologically resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 233-236

21 Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Zhou XY, Phillips NJ, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* 2002; 294: 94-105

22 Frelin L, Brenndörfer ED, Ahlén G, Weiland M, Hultgren C, Alheim M, Glaumann H, Rozell B, Milich DR, Bode JG, Sällberg M. The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease. *Gut* 2006; 55: 1475-1483

23 Blindenbacher A, Duong FH, Hunziker L, Stutvoet ST, Wang X, Terracciano L, Moradpour D, Blum HE, Alonzi T, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Expression of hepatitis c virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1465-1475

24 Kawamura H, Govindarajan S, Aswad F, Machida K, Lai MM, Sung VM, Dennert G. HCV core expression in hepatocytes protects against autoimmune liver injury and promotes liver regeneration in mice. *Hepatology* 2006; 44: 936-944

25 Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002; 196: 641-653

26 Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol* 2005; 43: 757-763

27 Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS, Sung YC. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Mol Cells* 2002;

■应用要点

通过HCV转基因模型, 人们不仅获得了更多的体内研究结果, 而且有关HCV与宿主相互作用以及对宿主信号传导的影响也得到了很多突破性进展. 但很多问题需要更深入的, 尤其是人类和小鼠的平行研究以进一步明确.

■同行评价
本文综述了近年来HCV转基因模型中HCV蛋白相关的可能致病机制, 资料较详细, 内容反映了HCV蛋白在的研究现状, 文章有一定的可读性.

13: 452-462
28 Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, Toné S, Shibasaki F, Shimizu M, Takahashi H, Hayashi Y, Funata N, Taya C, Yonekawa H, Kohara M. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 12140-12146
29 Majumder M, Steele R, Ghosh AK, Zhou XY, Thornburg L, Ray R, Phillips NJ, Ray RB. Expression of hepatitis C virus non-structural 5A protein in the liver of transgenic mice. *FEBS Lett* 2003; 555: 528-532
30 Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 683-694
31 Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: Dual-pass carcinogenesis through activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatol Res* 2007; 37 Suppl 2: S115-S120
32 Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM, Lai MM. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 2006; 80: 7199-7207

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1021-1025
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

内质网应激与肝损伤研究进展

钟卫卫, 林世德

钟卫卫, 林世德, 遵义医学院附属医院感染科 贵州省遵义市 563003
作者贡献分布: 本文综述由钟卫卫完成; 林世德审校.
通讯作者: 林世德, 563003, 贵州省遵义市, 遵义医学院附属医院感染科. linshide8@yahoo.com.cn
电话: 0852-8609183
收稿日期: 2009-12-29 修回日期: 2010-02-10
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Role of endoplasmic reticulum stress in hepatocytes in the pathogenesis of liver injury

Wei-Wei Zhong, Shi-De Lin

Wei-Wei Zhong, Shi-De Lin, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China
Correspondence to: Shi-De Lin, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. linshide8@yahoo.com.cn
Received: 2009-12-29 Revised: 2010-02-10
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract
The necrosis and apoptosis of hepatocytes play an important role in the pathogenesis of liver injury. In recent years, numerous studies have shown that hepatocyte stress, such as endoplasmic reticulum stress, mitochondrial stress and oxidative stress, may occur in the process of liver injury. The research on endoplasmic reticulum stress has become a new hot topic. This paper will review the role of endoplasmic reticulum stress in hepatocytes in the pathogenesis of a variety of liver injuries.

Key Words: Liver injury; Stress; Endoplasmic reticulum; Apoptosis

Zhong WW, Lin SD. Role of endoplasmic reticulum stress in hepatocytes in the pathogenesis of liver injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1021-1025

摘要
肝脏疾病组织学损伤, 在细胞水平上可分为坏死和凋亡. 近年来, 大量研究表明, 应激可能是肝损伤发生过程中的重要环节, 如内质网应激、线粒体应激和氧化应激等, 其中内质网应激是医学研究的一个新热点. 本文将以内质网应激为切入点, 探讨内质网应激的作用功能, 内质网应激对细胞凋亡的影响, 以及内质网应激与各种肝损伤之间的关系并对之进行综述.

关键词: 肝损伤; 应激; 内质网; 细胞凋亡

钟卫卫, 林世德. 内质网应激与肝损伤研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1021-1025
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1021.asp

■背景资料
内质网应激是一种信号反应通路系统, 属于细胞自我保护机制, 但应激反应过强或应激反应时间过长, 都会导致细胞损伤. 大量的研究发现, 内质网应激, 在各种原因所致肝损伤中, 占有十分重要的作用, 其机制也得到越来越多的关注.

0 引言
内质网(endoplasmic reticulum, ER)是一种重要的亚细胞器, 广泛分布于除成熟红细胞以外的所有真核细胞的细胞质中, ER生理作用是对细胞内合成的大约1/3的蛋白质进行修饰、折叠和寡聚化从而使之形成正确的构象, 并且参与脂质代谢和类固醇激素的合成以及钙的储存[1,2]. ER也是一个比较敏感的细胞器, 凡影响ER功能的因素都能引起ER应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)[3]. 如影响蛋白质翻译后修饰的因素二巯基苏糖醇(DTT)、同型半胱氨酸(homocystine)、葡萄糖胺(glucosamine)等, 均可致蛋白合成障碍; 病毒感染如肝炎病毒感染, 细胞则发生水分丢失, 出现脱水以及粗面ER上的核糖体脱落, 进而导致蛋白合成起始场所的缺失; 细菌性感染和有毒物质侵袭, 肝细胞产生浆细胞和解毒功能受到影响, ER变得肥大, 均可引起ERS[4-8]. 上述因素作用可引起ER摄取/释放Ca^{2+}障碍或蛋白质加工/运输障碍, 从而导致ER腔内错误折叠与未折叠蛋白聚集以及Ca^{2+}平衡紊乱, 激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)[3]. UPR可通过某些特定基因的转录而增强蛋白质折叠的能力, 保持ER稳态, 维持细胞正常功能的作用. 但当稳态不能重建, UPR信号传导途径将通过肝细胞凋亡而引起细胞损伤[9-11].

1 ERS的效应
1.1 UPR UPR是由未折叠或错误折叠蛋白不能

■同行评议者
张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■研发前沿
内质网应激(ERS)作为细胞对内外有害因素作用的一种自稳机制, 与肝损伤的发生和发展密切相关. 目前, 内质网应激在各种肝损伤, 如多种病毒所致肝损伤、中毒性肝损害、肝纤维化、应急所致肝损伤中的作用, 已得到更为深入的探讨, 但内质网应激, 在肝损伤的终极环节-肝衰竭中, 除了一方面可导致细胞凋亡外, 另一方面, 是否也影响了残余肝细胞的再生, 进而加剧肝衰竭, 其机制尚未阐明, 这需要进行更为深入的探讨, 以便为肝损伤的治疗提供全新的指导.

■相关报道
宋小燕等探讨了内质网应激反应通路及细胞转归; 闵敏等报道了内质网应激在多种原因所致肝损伤中的作用.

按正常途径移出ER, 在ER腔内聚集所致[12,13], 是目前研究较为深入的一种信号转导通路, 主要涉及ER与胞核、核糖体和高尔基体等多种细胞器之间的信号传递[14]. ER膜上存在三种感受腔内未折叠蛋白堆积的感受器蛋白, 即跨膜蛋白激酶1(inositol requiring enzyme 1, IRE-1, 又称核酸内切酶)、激活作用转录因子(activating transcription factor-6, ATF-6)和双链RNA依赖的蛋白激酶样ER激酶(PKR-like ER kinase, PERK)[15,16]. 当错误或未折叠蛋白在ER中积聚时, 这些感应蛋白可感知ERS信号, 通过三条途径保护ERS下的细胞[17]: (1)通过编码伴侣蛋白的基因如GRP78/BIP和GRP94转录上调, 以促进蛋白质正确折叠: 在非应激状态下, 2型穿膜蛋白ATF-6与BIP形成稳定的复合物, 通过BIP对ATF-6上高尔基体定位信号(golgi localization signal, GLS)的抑制作用而停留在ER膜上. ER腔内未折叠蛋白堆积信息能使ATF-6与BIP分离, 解除BIP对GLS的抑制, 从而使ATP-6转移到高尔基体得以活化[14,18]. ATF-6活化后分解出的胞质区域移位到细胞核, 激活一些基因启动子区域的ERS反应元件, 如GRP/BIP和GRP94和钙网膜蛋白等, 使其转录活化, 进而促进蛋白在ER腔内的正确折叠. (2)阻碍蛋白翻译, 减少ER内蛋白合成的负担: PEPK属于eIF2a(eukaryotic translation initiation factor 2, eIF2a)蛋白激酶家族成员, 活化后能特异性地磷酸化eIF2a上51位丝氨酸, 下调细胞内蛋白合成的整体水平[19-21]. 当病毒感染或ER内钙耗竭引起ERS时, 存在于胞质中的与PERK同源的PEK(pancreatic Eif2a kinase, PEK)也参与了eIF2a的磷酸化. 有研究表明[22]: PERK活化后能特异性地抑制细胞周期素D1的翻译表达, 导致G_1期的停顿. PERK磷酸化eIF2a后抑制细胞内大部分蛋白的翻译生成, 同时PERK激活后还会激活JNK(c-Jun NH-terminal kinases, JNK)及P38信号传导通路, 诱导UPR基因的转录. (3)ER相关降解, 以降低ER内非折叠蛋白的沉积[23]: 最近有研究表明, ER可能通过JNK的激活而快速地删除多余的或损坏的细胞器和部分胞质而起到降低内质网内未折叠蛋白的目的. 因此, 通过对未折叠蛋白快速的降解, 提高蛋白折叠能力, 增强对新生蛋白的承载以及对坏死ER的清除, 早期UPR可逆转ER内环境稳态的失衡, 减轻ERS, 从而起到抵御应激诱导所造成的有害影响.

2 ERS引起细胞凋亡

ERS细胞一方面积极调动UPR以抵御应激诱因所造成的有害影响, 另一方面当UPR不足以重建ER稳态, UPR信号通路则将通过细胞凋亡途径而引起细胞损伤甚至死亡[24,25]. 而UPR所引起的细胞保护性机制与细胞凋亡之间的过渡机制仍不清楚, 有研究表明[26,27], IRE-1信号通路在UPR所引起细胞保护性机制与细胞凋亡之间的转换中占有很重要的作用.

ERS引起的细胞凋亡有一套自身的信号传递通路, 称为ER相关性死亡(ER-associated death, ERAD)途径. ERAD途径包含ERS诱导CHOP/GADD153表达、JNK的活化和/或capase-12蛋白水解酶的活化[2,23,28-29]. 有研究表明ERS引起凋亡时胞质内的caspase-7转移至ER表面, 激活caspase-12[30,31]. 大量研究证实[32-36]: caspase-12是ERS介导细胞凋亡的一个主要调节因子. ERS时可通过Bcl-2蛋白家族中凋亡成员Bax/Bak影响内质网内Ca^{2+}的释放, 激活需钙蛋白酶(calpain), 裂解前caspase-12酶原或通过GRP78/casepase-7复合物介导使caspase-12激活. 激活的需钙蛋白酶(calpain)通过对线粒体内一系列蛋白激酶的激活, 协同激活的JNK调节细胞凋亡. CHOP/GADD153是转录因子家族C/EBP成员之一, 在正常生理状态下基本检测不到, 但在ERS时, 可被显著诱导表达, 并参与调节下游相关凋亡基因的表达, 促进凋亡[37-39].

3 ERS与肝损伤

ERS是独立于细胞膜受体或线粒体途径的第3条凋亡信号途径[1,33,40]. 近年来越来越多的研究发现ERS介导的细胞凋亡与乙型肝炎、丙型肝炎、非酒精性脂肪性肝病、烧伤所引起的肝损伤等都有密切的联系.

3.1 ERS与各种肝炎病毒感染所致肝损伤 各种肝炎病毒感染后, 大量的病毒复制产物蛋白质堆积在病毒感染的细胞内, 即可导致UPR[6]. 乙型肝炎病毒对细胞的损伤可能和乙型肝炎病毒感染和长期携带导致的ERS有关[3]. 当感染乙型肝炎病毒后, 乙型肝炎病毒表面抗原的大、中、小3种形式的包膜蛋白中, 大表面蛋白过表达, 使大、中、小蛋白的比例不能达到恰当水平, 三者无法结合成可分泌的病毒颗粒. 一方面导致亚病毒和病毒颗粒的分泌受阻而积聚, 造成肝细胞的毛玻璃样变性和对炎性细胞因子的高敏, 从而造成肝脏实质损伤; 另一方面变异蛋

白的表达还会妨碍内质网内正常可折叠蛋白的活性, 进一步促进UPR. ER是丙型肝炎病毒生命周期相关的最主要的细胞器[6], 丙型肝炎病毒感染后, 可能会诱导生成一些与ER膜相关的病毒复制产物NS3和NS5B, 参与URP途径, 从而增强病毒复制, 加重UPR.

3.2 ERS与非酒精性脂肪性肝病 随着生活水平的提高, 无节制高脂饮食已成为肥胖, 胰岛素抵抗, 非酒精性肝病等慢性疾病的重要诱因[41]. 非酒精性脂肪性肝病已越来越得到大家的认识, 由单纯的脂肪变性发展为非酒精性脂肪性肝炎再到肝硬化甚至肝细胞癌, 脂肪酸代谢紊乱已被公认为是其病变发展的基础[41,42]. 内质网是脂肪酸代谢的第一场所[43], ER小叶内大量的三酰甘油合成酶如磷脂酸磷酸酶, 脂酰CoA转移酶无疑使ER在脂肪酸代谢中起着重大的作用, 且脂肪酸在ER代谢产生的一定量的活性氧可攻击生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸, 形成脂质过氧化物, 诱发ERS[44]. ERS启动三条信号通路中, UPR和ER超负荷反应(endoplasmic reticulum overload response, EOR)由蛋白异常堆积引发, 固醇调节级联反应则是由内质网表面合成的胆固醇损耗所致[45,46]. 固醇调节级联反应信号通路被激活后, 固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element binding protein, SREBP-1c)表达上调, 增加脂肪酸合成酶的表达, 脂肪酸合成异常增多, 肝脏脂质代谢紊乱, 引起非酒精性脂肪性肝病[47]. 最近有研究表明[48]: ATF6的高表达可能参与了NASH(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的发病机制.

3.3 ERS与中毒性肝损害 随着多种药物的滥用及外源性毒物侵袭机会的增加, 中毒性肝损害已成为仅次于病毒性肝炎所致肝损害的又一重要因素[49]. 最新研究发现, 应激可能是中毒性肝损害发生的重要环节[45,50-52]. 各种毒性物质, 如CCl_4, *D*-氨基半乳糖, 内毒素脂多糖甚至一些生物毒性物质如动物胆等都可导致肝损伤, 因肝脏是体内最大的药物代谢器官, 是外源性毒物/药物攻击的主要靶器官. 多数外源性化合物须通过内质网膜上的混合功能氧化酶系统(如CYP450酶系)进行生物转化和代谢以形成无活性成分排出体外, 由此可见内质网在肝脏解毒作用中的地位十分重要, 但此过程另一方面也可能会影响内质网的结构或功能, 诱导内质网发生应激反应, 继而引起细胞凋亡、肝损伤等一系列级联反应. 研究表明[53-56], 经CCl_4及*D*-氨基半乳糖等生物毒性物质染毒后的动物, 组织GRP78蛋白有明显的表达, 且同时伴有caspase-12酶原的活化和表达减少, 表明CCl_4等生物毒性物质能引起ERS反应, 且ER应激诱导的细胞凋亡参与了中毒性肝损伤的发生机制.

3.4 ERS与肝硬化 肝硬化的主要病理是胶原纤维的异常增生, 而胶原纤维合成与内质网的功能直接相关[58]. 肝细胞损伤是肝纤维化的重要启动因素, 脂质过氧化物、酒精代谢产物的乙醛加合物等均可激发肝实质细胞胶原基因的表达, 导致胶原纤维异常增生[59]. 内质网在蛋白的合成及胶原纤维的正确折叠中占有很重要的作用, 他也是脂肪酸代谢的重要场所, 脂质过氧化物在细胞的堆积, 可诱发ERS. 研究发现[57], CCl_4诱导性肝硬化中GRP78蛋白和mRNA表达明显增高, 说明肝细胞内质网应激可能与肝硬化的发展过程有关. 而另有研究证实[58], 在CCl_4诱导性肝硬化的模型中, 通过降低ER诱发因素同型半胱氨酸的表达, 肝损害可得到明显缓解.

3.5 ERS与烧伤 肝细胞凋亡在烧伤后所致的肝脏功能障碍和肝损伤中占有很重要的作用[60], 而其潜在的机制, 已越来越多的证明与ERS有关[15,61-63]. 研究证明, 严重烧伤后, caspase-3的活性明显升高, 且内质网应激标志蛋白GRP78/BIP等在烧伤后开始表达上调, 且有持续的表达. 烧伤所致ER Stress和UPR的激活无疑为烧伤的研究带来新的领域, 也为烧伤的临床诊治开辟更为广阔的思路, 吸引着更多学者进行更为深入的探讨.

4 结论

肝损伤的终极环节-肝衰竭, 重大表现除了大片肝脏组织坏死外, 另一重要特征, 即存在肝再生障碍. 随着ERS在肝损伤中的作用-可致细胞凋亡, 越来越明确, ERS与残余肝细胞肝再生障碍之间的联系成为人们关注的焦点. ERS是否一方面可致细胞凋亡; 另一方面也可影响残余肝细胞的再生, 进而加剧肝衰竭, 其机制尚未阐明, 这需要进行更为深入的探讨, 以便为肝损伤的治疗提供全新的指导.

■创新盘点

本文比较全面地总结了ERS发生的相关性信号转导通路及机制, 以及在常见肝病发生中的作用, 并提出内质网应激在肝损伤的终极环节-肝衰竭中的可行机制, 为肝损伤的治疗提供全新的指导.

5 参考文献

1 袁国林, 邹萍. 内质网应激反应介导细胞凋亡的机制研究进展. 国外医学・生理、病理科学与临床分册 2003; 23: 614-617

2 杨艳华, 李国丽, 王晓鹏. Ca2+与未折叠蛋白应答介导内质网应激与细胞凋亡. 河北医科大学学报 2008; 29: 460-463

3 方欢, 申宗候. 内质网应激. 医学分子生物学杂志

■应用要点

本文通过介绍内质网应激在各种肝损伤中的研究结果，提出内质网应激是各种肝损伤发生发展的重要因素，对内质网应激的干预将可能成为预防肝损伤的重要环节，对判断病情及治疗均有重要的意义.

2004; 1: 36-39

4 晏春根. 高同型半胱氨酸血症、内质网应激与肝损伤. 中国全科医学 2006; 9: 513-515

5 Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem* 2003; 36: 431-441

6 王茜婷, 张卫光. 内质网应激介导肝细胞凋亡. 中国组织工程研究与临床康复 2008; 12: 3549-3552

7 林丽, 唐朝枢, 袁文俊. 内质网应激. 生理科学进展 2003; 34: 333-335

8 Watanabe Y, Suzuki O, Haruyama T, Akaike T. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem* 2003; 89: 244-253

9 Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007; 318: 944-949

10 Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 2005; 307: 935-939

11 王虎, 蔡定芳. Ca2+与内质网途径的细胞凋亡. 国际病理科学与临床杂志 2006; 26: 283-290

12 Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 20-28

13 Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 2002; 366: 585-594

14 温韬, 赵金垣. 内质网应激与中毒性肝损伤. 肝脏 2008; 13: 160-161

15 祝筱梅, 姚永明, 盛志勇. 内质网应激与急性损伤后免疫反应. 生理科学进展 2009; 40: 51-54

16 Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 921-932

17 Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 20915-20924

18 姜山, 谢青. 内质网应激与细胞凋亡. 国外医学・流行病学传染病学分册 2004; 31: 330-333

19 Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999; 397: 271-274

20 McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1249-1259

21 马涛, 薛承锐. 内质网未折叠蛋白反应与凋亡信号机制研究进展. 医学综述 2008; 14: 3565-3567

22 Brewer JW, Diehl JA. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12625-12630

23 Cudna RE, Dickson AJ. Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. *Biotechnol Bioeng* 2003; 81: 56-65

24 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展. 中国生物化学与分子生物学报 2004; 20: 283-288

25 Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004; 279: 25935-25938

26 Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007; 318: 944-949

27 Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 2006; 13: 374-384

28 Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002; 7: 335-345

29 Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; 22: 8608-8618

30 Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 33869-33874

31 Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-34294

32 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103

33 宋小燕, 赵永波. 未折叠蛋白反应与细胞转归. 国际神经病学神经外科学杂志 2007; 34: 99-102

34 Kouroku Y, Fujita E, Jimbo A, Kikuchi T, Yamagata T, Momoi MY, Kominami E, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T. Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1505-1515

35 Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci* 2006; 119: 3958-3966

36 Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 2002; 514: 122-128

37 Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-389

38 Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998; 12: 982-995

39 Endo M, Oyadomari S, Suga M, Mori M, Gotoh T. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *J Biochem* 2005; 138: 501-507

40 翟丽, 杨月, 郭秀丽, 刘新泳. 内质网应激介导的细胞凋亡途径及新靶点药物. 中国药学杂志 2008; 43: 1361-1364

41 陈璐璐, 李凝旭, 邓向群. 限食对高脂喂养大鼠肝

脏内质网应激的影响. 中国病理生理杂志 2008; 24: 568-572
42 闵敏, 陈东风, 王军, 艾正琳, 樊丽琳, 严丽丽. 葡萄糖调节蛋白78在大鼠非酒精性脂肪性肝炎中的表达及意义. 第三军医大学学报 2009; 31: 79-81
43 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695
44 王万凤, 陈东风. 内质网应激线粒体功能紊乱与非酒精性脂肪性肝病. 重庆医学 2009; 38: 423-424
45 林胜利, 卓德祥, 王晓红, 吴逸国, 王柯, 吴耀南, 张卫光, 李载权, 唐朝枢. 氧化损伤与内质网应激在四氯化碳致大鼠肝脂肪变性中的作用机制. 中国生物化学与分子生物学报 2006; 22: 422-430
46 Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev* 1999; 79: 683-701
47 Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 1133-1149
48 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义. 第三军医大学学报 2006; 28: 1063-1065
49 闵敏, 陈东风, 朱超慧, 艾正琳, 王军, 樊丽林. 活化转录因子6在非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织中的表达及意义. 重庆医学 2009; 38: 389-391
50 Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003; 349: 474-485
51 Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65: 166-176
52 Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* 2005; 13: 159-163
53 温韬, 张海燕, 卢静, 李胜利, 王晶晶, 朴正福. 内质网应激在四氯化碳致大鼠急性肝损伤中的作用探讨. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 786-789
54 周惠娟, 谢青, 姜山, 李光明, 周霞秋, 刘海防, 俞红, 郭清. Caspase-12在D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠急性肝功能衰竭中的表达及作用. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 685- 688
55 Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002; 36: 592-601
56 刘华川, 张鸿, 关一夫, 平贺紘一. CCl4诱发galectin-3基因敲除鼠急性肝损伤中GRP78和BAD表达. 中国医科大学学报 2008; 37: 204-207
57 张海燕, 温韬, 丁淑芹, 卢静, 李胜利, 王晶晶, 武彦宁, 朴正福. 内质网及氧化应激在大鼠慢性肝损伤中的变化. 肝脏 2009; 14: 23-26
58 王晓红, 张卫光, 林胜利, 田珑, 李载权, 张书永. 四氯化碳诱导性肝硬化大鼠肝组织葡萄糖调节蛋白78表达的研究. 解剖学报 2006; 37: 290-293
59 李岩, 王垂杰. 肝纤维化发病机制研究述要. 中医药学刊 2003; 21: 422-425
60 Erman F, Balkan J, Cevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication. *Amino Acids* 2004; 27: 199-205
61 Klein D, Schubert T, Horch RE, Jauch KW, Jeschke MG. Insulin treatment improves hepatic morphology and function through modulation of hepatic signals after severe trauma. *Ann Surg* 2004; 240: 340-349
62 万义福, 许宝华, 张玉珍, 万福生, 李国辉. 大鼠严重烧伤后心肌细胞GRP94表达变化及其意义. 中国比较医学杂志 2008; 18: 43-47
63 殷嫦嫦, 何海翔, 许宝华, 杨晓红, 李国辉, 万福生. 严重烧伤诱导大鼠心肌细胞内质网应激反应. 南昌大学学报(理科版) 2007; 31: 481-485

■同行评价
本文选题尚可, 内容完整, 有一定参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1063-1066
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

洛铂联合5-氟尿嘧啶与甲酰四氢叶酸治疗晚期胃癌30例

杨 升, 卢辉山, 张祥福, 黄昌明, 王 川, 吴心愿, 官国先

杨升, 卢辉山, 张祥福, 黄昌明, 王川, 吴心愿, 官国先, 福建医科大学附属协和医院肿瘤科 福建省福州市 350001
作者贡献分布: 此课题由杨升、卢辉山、张祥福、黄昌明及王川设计; 杨升、卢辉山、张祥福、黄昌明、王川、吴心愿及官国先进行实验操作; 杨升与卢辉山负责数据分析并进行论文写作; 卢辉山审校.
通讯作者: 卢辉山, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院肿瘤科. lhs801@163.com
电话: 0591-83357896
收稿日期: 2010-01-23 修回日期: 2010-02-21
接受日期: 2010-03-02 在线出版日期: 2010-04-08

Efficacy of lobaplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced gastric cancer: a report of 30 cases

Sheng Yang, Hui-Shan Lu, Xiang-Fu Zhang, Chang-Ming Huang, Chuan Wang, Xin-Yuan Wu, Guo-Xian Guan

Sheng Yang, Hui-Shan Lu, Xiang-Fu Zhang, Chang-Ming Huang, Chuan Wang, Xin-Yuan Wu, Guo-Xian Guan, Department of Oncology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Correspondence to: Professor Hui-Shan Lu, Department of Oncology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. lhs801@163.com
Received: 2010-01-23 Revised: 2010-02-21
Accepted: 2010-03-02 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of lobaplatin (LBP) plus 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (CF) in the treatment of advanced gastric cancer.

METHODS: The clinical data for 30 patients with advanced gastric cancer treated with LBP plus 5-FU and CF from March 2004 to September 2008 were retrospectively reviewed. All patients received at least two cycles of chemotherapy, each lasting 21 days and consisting of LBP 30 mg/m^2 IV d 1, 5-FU 300 mg/m^2 IV d 1-5, and CF 100 mg/m^2 IV d 1-5.

RESULTS: Thirty patients received 2 to 6 cycles of chemotherapy, with a median of three cycles. All patients were evaluable for efficacy and toxicity. No patients obtained a complete response. Partial response was achieved in 12 patients, stable disease in 5 patients, and progressive disease in 13 patients. The objective response rate was 40% (12/30). The tumor control rate was 56.7% (17/30). Therapy was generally well tolerated. Major toxicity was myelosuppression and gastrointestinal sensitivity, including anaemia, thrombocytopenia, leukocytopenia, and nausea and vomiting. No chemotherapy-related death occurred.

CONCLUSION: LBP plus 5-FU and CF regimen is effective and safe for patients with advanced gastric cancer.

Key Words: Lobaplatin; 5-fluorouracil; Leucovorin; Chemotherapy; Advanced gastric cancer

Yang S, Lu HS, Zhang XF, Huang CM, Wang C, Wu XY, Guan GX. Efficacy of lobaplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced gastric cancer: a report of 30 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1063-1066

摘要

目的: 观察洛铂(LBP)联合5-氟尿嘧啶(5-Fu)与甲酰四氢叶酸(CF)治疗晚期胃癌的临床疗效及不良反应.

方法: 回顾性分析我科2004-03/2008-09收治的30例具有完整临床资料的晚期胃癌患者接受LBP联合5-Fu与CF方案治疗的情况. LBP 30 mg/m^{2}静滴, 第1天; 5-FU 300 mg/m^{2}静滴, 第1-5天; CF 100 mg/m^{2}静滴, 第1-5天, 3 wk为1周期, 至少接受2个周期化疗后按照WHO标准评估疗效及不良作用.

结果: 30例患者共进行124个周期化疗, 中位3(2-6)个周期, 其中完全缓解(CR)0例, 部分缓解(PR)12例, 稳定(SD)5例, 进展(PD)13例, 客观有效率(ORR)为40%(12/30), 临床肿瘤控制率(TCR)为56.7%(17/30). 不良作用主要是骨髓抑制与胃肠道反应, 而肝功能异常及神经系统毒性等较轻, 无明显肾毒性和心脏毒性、未发生因化疗产生严重不良作用而终止治疗者和化疗相关性死亡病例.

■背景资料
胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内发病率仅次于肺癌, 位居第2位. 我国每年胃癌发病率约为60/10万, 位居所有恶性肿瘤死亡的第1位. 我国胃癌患者早期所占比例不足10%, 多数患者在就诊时已是局部晚期或发生转移, 失去根治性手术机会, 而单纯手术治疗预后亦未达到理想效果, 且其术后复发率也很高, 化学治疗已成为晚期胃癌姑息治疗主要手段. 因此寻找疗效显著且耐受性良好的化疗方案是面临的主要问题.

■同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

■研发前沿
当前, 长期临床实践证明联合化疗可以提高疗效, 延长晚期胃癌患者的生存期, 但迄今为止尚缺乏公认的金标准化疗方案. 因此, 开发新药物、设计新方案已成为胃癌研究的热点. 洛铂是第3代新型铂类抗癌药, 研究显示其毒性反应较第一、二代铂类药物轻微, 潜在良好应用前景.

结论: LBP联合5-FU与CF治疗晚期胃癌疗效确切, 不良反应可以耐受, 值得临床深入研究、推广.

关键词: 洛铂; 5-氟尿嘧啶; 甲酰四氢叶酸; 化学治疗; 晚期胃癌

杨升, 卢辉山, 张祥福, 黄昌明, 王川, 吴心愿, 官国先. 洛铂联合5-氟尿嘧啶与甲酰四氢叶酸治疗晚期胃癌30例. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1063-1066
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1063.asp

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤, 早期诊断率较低, 多数患者就诊时已是局部晚期或发生转移, 单纯手术治疗预后亦较差, 5年生存率仍徘徊在20%-30%, 且其术后复发率也很高[1,2]. 化学治疗已成为晚期胃癌的主要治疗手段, 研究表明, 联合化疗可以提高疗效, 延长晚期胃癌患者的生存期, 但迄今为止尚无公认的金标准. 因此, 开发新药物、设计新方案已成为胃癌研究的热点[3,4]. 洛铂(lobaplatin, LBP)是第3代新型铂类抗癌药, 研究显示其毒性反应较第一、二代铂类药物轻微. 本文回顾性分析我科2004-03/2008-09收治30例具有完整临床资料的晚期胃癌患者接受LBP联合5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)与甲酰四氢叶酸(leucovorin, CF)方案治疗情况, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 晚期胃癌患者30例, 其中男16例, 女14例, 年龄25-69(中位年龄47)岁, 均经病理学或细胞学证实、有远处转移、手术后复发或无法手术的晚期胃癌患者, 其中低分化腺癌15例、中分化腺癌10例、黏液腺癌4例、印戒细胞癌1例. 均有可测量病灶, 转移部位包括肝、肺、腹盆腔、淋巴结等(脑转移及伴其他不可测量病灶的骨转移除外), ECOG评分0-2, 预计生存时间超过3 mo, 根据UICC1997年分期标准均为IIIb-Ⅳ期, 其中IIIb期19例、Ⅳ期11例, 而初治者24例、复治者6例(既往均接受过全身联合静脉化疗). 无心、肝、肾功能异常, 血白细胞计数>4×10^9/L, 中性粒细胞>2×10^9/L, 血小板计数>80×10^9/L, 肝肾功能正常, 心电图无异常, 无脑及周围神经系统疾病, 无同时使用其他化疗药物.

1.2 方法

1.2.1 治疗方法: 第1天, LBP 30 mg/m^2, 静脉滴注; 第1-5天, 5-FU 300 mg/m^2, 静脉滴注; 第1-5天, CF 100 mg/m^2, 静脉滴注, 3 wk为1周期. 化疗前常规使用5-羟色胺3(5-hydroxytryptamine 3, 5-HT_3)拮抗剂预防恶心、呕吐反应及阿拓莫兰、易善复保护肝功能等. 全部患者均接受至少2周期的化疗, 每治疗2个周期后选择性应用B超、胃镜、CT或MR等影像学复查肿瘤病灶、综合评价, 治疗期间进行不良反应评估.

1.2.2 评价标准: 疗效评价按照1997年WHO制定标准进行临床评估, 完全缓解(complete remission, CR): 症状缓解, 阳性体征消失, 体检及影像学证实, 持续4 wk以上; 部分缓解(partial remission, PR): 肿块减小50%以上, 并持续4 wk以上, 无新病灶出现; 稳定(stable disease, SD): 症状减轻或缓解, 肿块减少不足50%或增大25%以下, 无新病灶出现; 进展(progression disease, PD): 肿块增大25%以上或出现新病灶. 客观有效率(objective response rate, ORR): CR+PR, 临床肿瘤控制率(tumor control rate, TCR): CR+PR+SD. 有效和稳定的患者经4 wk后重新评价确定. 不良反应按照美国癌症研究所(national institutes of health, NCI)的常规化疗毒性分级标准(common toxicity criteria, CTC)[5]进行观察和判断, 分为0-Ⅳ级. 随访截止2009-06, 生存时间按月记录, 为诊断开始日至末次随访日或死亡日(survival time, ST), 疾病进展时间为从治疗开始至肿瘤复发或进展的时间(time to progression, TTP).

2 结果

2.1 临床疗效 全部患者均可评价疗效. 30例患者共进行124个周期化疗, 中位3(2-6)个周期, 30例患者中17例患者肿瘤获得控制, 其中CR 0例, PR 12例, SD 5例, PD 13例, ORR为40%(12/30), TCR为56.7%(7/30). 病理类型与疗效关系中低分化腺癌PR 10例, PD 5例; 中分化腺癌PR 2例, SD 5例, PD 3例; 黏液腺癌与印戒细胞癌均无效. 中位疾病进展时间(media time to progression, mTTP)4.4(2-22) mo, 中位生存时间(media survival time, MST)8.3(4-32) mo, 中位随访时间(median follow-up time, MFT)12(2-28) mo, 1年生存率(survival rate, SR)为33.3%(10/30), 2年SR为13.3%(4/30).

2.2 不良作用 30例患者均完成至少2周期化疗, 共行124个周期化疗, 均可评价不良作用. 主要不良作用是骨髓抑制与胃肠道反应, 而肝功能异常及神经系统毒性等较轻. 骨髓抑制中以贫血发生率为最高, Ⅰ/Ⅱ度发生率15例(50.0%)、Ⅲ/Ⅳ度发生率2例(6.7%), 骨髓抑制其次表现为

血小板减少, Ⅰ/Ⅱ度发生率13例(43.3%)、Ⅲ/Ⅳ度发生率1例(3.3%), 而白细胞下降Ⅰ/Ⅱ度发生率为12例(40%), Ⅲ/Ⅳ度发生率亦为1例(3.3%); 胃肠道反应主要表现为恶心、呕吐, Ⅰ/Ⅱ度恶心、呕吐者14例(46.7%)、Ⅲ度1例(3.3%)、Ⅰ/Ⅱ度腹泻2例(6.7%)、无Ⅲ/Ⅳ度腹泻. 8例(26.7%)出现肝功能异常, 主要表现为血清转氨酶升高, 轻度至中度; 而周围神经症状、口腔黏膜炎等方面不良反应均为轻度. 无明显肾毒性和心脏毒性, 未发生因化疗产生严重不良反应而终止治疗者和化疗相关性死亡病例.

3 讨论

胃癌是对化疗较为敏感的消化系恶性肿瘤, 有关晚期胃癌的化疗益处在西方国家尽管争论已久. 但众所周知, 目前已有足够的证据支持化学治疗与最佳支持治疗相比, 可以显著改善晚期胃癌患者的预后. 应用化学治疗患者一般生存期为7.5-12 mo, 而仅接受最佳支持治疗的患者一般生存期为3-5 mo. 此外, 研究表明, 化疗组患者生活质量亦较最佳支持治疗组明显改善[6]. 20世纪80年代FAMTX(5-FU、阿霉素、甲氨喋呤)方案曾是晚期胃癌治疗的标准方案, 然而临床实践结果显示其缓解率、有效时间和中位生存期都很低. 其后出现的EAP(足叶乙甙、阿霉素、顺铂)、LEFP(甲酰四氢叶酸钙、5-FU、表阿霉素、顺铂)等方案有效率略有提高但不良反应大. 近期, 欧洲的一项大型随机研究表明, ECF(表阿霉素、5-FU、顺铂)方案治疗晚期胃癌无论有效率和患者生存时间均较FAMTX方案明显改善, 欧洲癌症研究与治疗组织(European organization for research on treatment of cancer, EORTC)推荐ECF方案作为胃癌的标准治疗方案, 但美国和日本等国家则在长期临床研究中确定5-FU联合DDP方案作为治疗胃癌的标准方案[7,8]. 当前以铂类+5-FU/CF为主的联合化疗方案在临床已广泛应用, 但第一代铂类药物顺铂、锡铂等严重的胃肠道反应、肾毒性与耳毒性限制了其在相当部分患者中应用, 而第二代铂类药物卡铂、依铂等胃肠道反应虽较第一代轻, 但骨髓抑制为其剂量限制性毒性, 且与第一代铂类表现出交叉耐药性, 故一、二代铂类药物在胃癌中的疗效亦未尽如人意. 第三代铂类药物奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)的出现为胃癌化疗带来了希望, 临床研究表明其对胃癌有着明显抗癌活性, 以其低毒、高效与氟尿嘧啶及CF联合应用取得了良好的疗效, 但仍因其CR率低、生存期延长不显著, 学者们仍在进行多种药物、多种方案的临床试验, 以找出更合理、更好疗效、更低毒性的化疗药物及药物组合[9,10].

LBP是第三代铂类抗肿瘤药物, 化学名为1, 2-二氨甲基-环丁烷-乳酸合铂非对映异构体铂类复合物. 其抗肿瘤机制与其他铂类相似, 源于形成DNA的链内和/或链间交联, 阻碍其复制和转录的过程, 从而干扰肿瘤细胞周期运行, 达到抑制肿瘤的目的[11]. Eliopoulos等[12]则研究了LBP影响c-Myc前致癌基因表达作用. c-Myc在调节肿瘤细胞增殖、分化、凋亡中起作用, LBP可导致c-Myc表达过度, 但对C-hras表达没有影响, 提示, LBP可能特异性地改变某些基因的表达而发挥作用. 国外研究证明, LBP的抗癌活性与顺铂和卡铂相似, 但治疗指数(therapeutic ratio, TR)等于或高于顺铂和卡铂, 且对部分顺铂和卡铂耐药的肿瘤依然有效[11]. Harstrick等[13]进行体外LBP与顺铂对胃癌细胞株细胞毒性实验表明, 在相同药物浓度(0.1 mm/L)情况下, LBP有着更强抗肿瘤生物学活性, 此外LBP对某些顺铂耐药性胃癌细胞株亦有明显抑制作用. 而国内开展多中心Ⅱ期临床研究结果显示, LBP单药对晚期胃癌患者临床肿瘤控制率可达75%[14]. 本组30例患者中17例患者肿瘤获得控制, 其中虽然CR无1例, 但PR 12例, SD 5例, PD 13例, ORR为40%(12/30), TCR为56.7%(17/30). mTTP 4.4 mo, MST 8.3 mo, 1、2年SR分别为33.3%和13.3%. 本组LBP联合5-FU与CF治疗晚期胃癌的效果与文献报道应用FOLFOX(奥沙利铂、CF、5-FU)、EOF(表阿霉素、奥沙利铂、5-FU)等方案治疗进展期胃癌疗效较相近[15-17]. 究其原因可能与本组患者多为初次治疗, 复发与治疗失败患者比例较低, 因而敏感性好, 耐药性发生相对低, 效果较为理想; 其次本组患者多为Ⅲb期, 基本为局部晚期, 广泛转移相对少见; 另外, 源自LBP本身具有广泛良好的抗癌活性. 本组黏液腺癌与印戒细胞癌患者接受联合化疗均无效, 这与他们的不敏感特性相关, 既往的不少研究已证实这一点[18]. 本方案最明显不良反应为骨髓抑制, 多数患者出现不同程度贫血、血小板减少、白细胞下降, 但多为Ⅰ/Ⅱ度, 且经选择性地使用重组人红细胞生成素、重组人白介素-11、粒细胞集落刺激因子或血小板生成素等处理均可逆性好转, Ⅲ/Ⅳ度骨髓抑制多出现在化疗第2周期以

■应用要点

本文回顾性分析提示洛铂是一种安全、有效的铂类新药, 其联合5-FU与CF治疗晚期胃癌疗效较好、临床受益率较高、可改善患者生活质量, 且耐受性好, 有着较广的适应范围, 可行大规模、多中心临床试验进一步深入研究.

■同行评价
本化疗方案是一种安全、有效的方法, 治疗晚期胃癌疗效较好, 临床受益率较高, 可改善患者生活质量, 且不良反应可以耐受, 值得临床深入研究, 进一步推广应用.

后每周期的第2周, 除予积极对症治疗刺激骨髓造血功能外, 尚需要抗生素防治感染, 所以应用LBP治疗后应较长时间严密监测患者外周血象变化. 胃肠道反应及时给予对症处理, 均能缓解基本恢复正常, 而肝功能异常及神经系统毒性等较轻, 未发生因化疗产生严重不良反应而终止治疗者和化疗相关性的死亡. 此与LBP在体内和白蛋白结合率低, 主要通过肾脏代谢, 给药24 h后74%±3%即可从尿中清除密切相关. 多项临床期研究均表明其主要为剂量限制性骨髓抑制, 肾毒性、耳毒性及神经毒性轻微[19].

总之, LBP是一种安全、有效的铂类新药, 其联合5-FU与CF治疗晚期胃癌疗效较好、临床受益率较高、可改善患者生活质量, 且耐受性好, 值得临床深入研究、进一步推广[14,20,21].

4 参考文献

1 万进, 吴泽宇. 胃癌的外科治疗现状与问题. 实用医学杂志 2007; 23: 2793-2795
2 Moehler M, Lyros O, Gockel I, Galle PR, Lang H. Multidisciplinary management of gastric and gastroesophageal cancers. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3773-3780
3 Kang GH, Kim GS, Lee HR, Yuh YJ, Kim SR. A Phase II Trial of Paclitaxel, 5-fluorouracil (5-FU) and Cisplatin in Patients with Metastatic or Recurrent Gastric Cancer. *Cancer Res Treat* 2008; 40: 106-110
4 Takanashi K, Minami S, Miyajima N, Hirako T, Hirakawa M, Koh Y, Saitoh T, Ueno Y, Sasagawa Y. [A long term survivor of advanced gastric cancer treated with multi-drug combination chemotherapy] *Gan To Kagaku Ryoho* 2009; 36: 2278-2280
5 万德森, 潘志忠. 大肠癌. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 428-437
6 Wils J. The treatment of advanced gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 397-406
7 Van Cutsem E, Van de Velde C, Roth A, Lordick F, Köhne CH, Cascinu S, Aapro M. Expert opinion on management of gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinoma on behalf of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)-gastrointestinal cancer group. *Eur J Cancer* 2008; 44: 182-194
8 曹妮达, 赵爱光, 朱莹杰, 杨金坤. 进展期胃癌化疗疗效的中国文献分析. 世界华人消化杂志 2008; 16: 436-442
9 Park YH, Kim BS, Ryoo BY, Yang SH. A phase II study of capecitabine plus 3-weekly oxaliplatin as first-line therapy for patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 959-963
10 Kitano Y, Hatabe S, Inoue K, Funai S, Tanaka A. [S-1 + CPT-11 combination therapy with continuing 30-month CR in a recurrent gastric cancer with para-aortic lymph node metastasis in adjuvant chemotherapy with S-1--a case report] *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 161-163
11 McKeage MJ. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 119-128
12 Eliopoulos AG, Kerr DJ, Maurer HR, Hilgard P, Spandidos DA. Induction of the c-myc but not the cH-ras promoter by platinum compounds. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 33-38
13 Harstrick A, Bokemeyer C, Scharnofkse M, Hapke G, Reile D, Schmoll HJ. Preclinical activity of a new platinum analogue, lobaplatin, in cisplatin-sensitive and -resistant human testicular, ovarian, and gastric carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; 33: 43-47
14 刘秀峰, 秦叔逵. 洛铂的临床研究进展. 临床肿瘤学杂志 2006; 11: 549-552
15 Santini D, Graziano F, Catalano V, Di Seri M, Testa E, Baldelli AM, Giordani P, La Cesa A, Spalletta B, Vincenzi B, Russo A, Caraglia M, Virzi V, Cascinu S, Tonini G. Weekly oxaliplatin, 5-fluorouracil and folinic acid (OXALF) as first-line chemotherapy for elderly patients with advanced gastric cancer: results of a phase II trial. *BMC Cancer* 2006; 6: 125
16 Oh SY, Kwon HC, Seo BG, Kim SH, Kim JS, Kim HJ. A phase II study of oxaliplatin with low dose leucovorin and bolus and continuous infusion 5-fluorouracil (modified FOLFOX-4) as first line therapy for patients with advanced gastric cancer. *Acta Oncol* 2007; 46: 336-341
17 Yan D, Dai H. [FOLFOX regimen in the patients with locally advanced or metastatic gastric cancer] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2009; 31: 217-219
18 王绍平, 范开席. IFL方案治疗晚期胃癌的临床研究. 中国肿瘤临床与康复 2009; 16: 242-244
19 周宏锋, 张玉新, 程黎阳, 丁洪亮. 洛铂、氟尿嘧啶与亚叶酸钙联合化疗的临床毒副作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 86-87
20 Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2075-2094
21 Zhang J, Liu D, Li Y, Sun J, Wang L, Zang A. Status of non-classical mononuclear platinum anticancer drug development. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 1357-1366

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1026-1031
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

hTERT表达的表观遗传调控研究进展

李 伟, 陶凯雄

■背景资料
端粒酶通过合成DNA末端重复序列以弥补细胞分裂过程中的DNA丢失, 对维持染色体完整性具有重要作用, 其不仅与细胞老化密切相关, 在肿瘤细胞永生化中也扮演重要角色, 而hTERT为端粒酶的催化亚单位, 具有高度肿瘤特异性, 表观遗传通过DNA甲基化, 组蛋白修饰和非编码RNA影响hTERT表达.

■同行评议者
颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

李伟, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
作者贡献分布: 本综述由李伟写作; 陶凯雄审校.
通讯作者: 陶凯雄, 主任医师, 博士生导师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科.
kaixgtao@public.wh.hb.cn
电话: 027-85351619
收稿日期: 2010-01-04 修回日期: 2010-03-09
接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-08

Advances in research of the epigenetic regulation of hTERT expression

Wei Li, Kai-Xiong Tao

Wei Li, Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. kaixgtao@public.wh.hb.cn
Received: 2010-01-04 Revised: 2010-03-09
Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-08

Abstract
Human telomerase reverse transcriptase (hTERT), the catalytic subunit of the telomerase, is the rate-limiting component for telomerase activity. Epigenetic regulation of gene transcription does not change DNA sequences but depends on chemical modification of either DNA or histones or non-coding RNAs. Epigenetic regulation is inheritable and plays an important role in controlling gene expression. The expression of hTERT may also be subjected to epigenetic regulation, such as DNA methylation, histone acetylation and methylation, and non-coding RNAs.

Key Words: Telomerase reverse transcriptase; Epigenetics; Methylation; Acetylation; Non-coding RNA

Li W, Tao KX. Advances in research of the epigenetic regulation of hTERT expression. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1026-1031

摘要
端粒酶逆转录酶(hTERT)是端粒酶的限速成分, hTERT基因的表达调控对端粒酶表达活性调节起决定性作用. 表观遗传学是在不改变DNA序列情况下, 通过DNA和组蛋白修饰或者非编码RNA影响基因表达, 这种改变具有可遗传性, 其在基因表达调控中具有重要作用. 同样, 表观遗传学可通过DNA甲基化, 组蛋白乙酰化与甲基化和非编码RNA来调节hTERT基因表达, 是端粒酶活性调节的重要机制.

关键词: 端粒酶逆转录酶; 表观遗传学; 甲基化; 乙酰化; 非编码RNA

李伟, 陶凯雄. hTERT表达的表观遗传调控研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1026-1031
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1026.asp

0 引言
端粒酶以自身的RNA为模板逆转录合成端粒DNA重复序列并添加到端粒末端, 以补偿因细胞每次分裂而丢失的末端碱基, 从而保证染色体结构的稳定性和完整性, 其由端粒酶RNA组份(hTER)、催化亚单位(端粒酶逆转录酶, human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和相关蛋白(TP1)组成. 在大多数正常细胞中, 由于缺乏端粒维持机制, 随着细胞分裂次数的增多, 端粒逐渐缩短, 最终触发细胞凋亡信号, 使细胞发生衰老和凋亡. 端粒酶活性在约90%的肿瘤细胞内呈阳性, 而正常组织细胞端粒酶为阴性[1]. hTERT是端粒酶催化亚单位, 在DNA末端, 由TP1的协助, 以hTER的RNA为模板逆转录合成六核苷酸(TTAGGG)DNA末端重复序列, 弥补DNA因细胞分裂而丢失的片段, 从而保持DNA完整性[2]. 端粒酶活性的肿瘤特异性正是由于hTERT在90%的肿瘤细胞中表达, 而在绝大多数正常细胞不表达. 与hTERT不同的是hTER和TP1为组成性表达, 即在正常细胞和肿瘤细胞中均有表达[3-5]. 因此, hTERT的表达调控成为端粒酶研究的焦点. 表观遗传学是不改变DNA序列而使基因表达发生可遗传性变化, 使带有相同的DNA序列的各种组织细胞具有不同的基因表达模式和生物学功能. 表观遗传学调控主要包

括DNA甲基化、组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化和非编码RNA等, 他们不仅在组织发生和个体发育起着重要作用, 在疾病的发生发展过程中同样扮演重要角色, 特别是在肿瘤疾病中, 可通过表观遗传学沉默抑癌基因、上调癌基因或改变其他效应基因而促进肿瘤的发生和进展. 由于hTERT在肿瘤细胞的增殖中具有决定性作用, 本文就表观遗传学对hTERT表达调控作一综述.

1 hTERT表达与DNA甲基化

DNA甲基化是一种表观遗传学修饰, 在DNA甲基转移酶催化下, DNA的CpG二核苷酸中胞嘧啶的5位碳原子加上一个甲基基团, 形成5甲基胞嘧啶. 成簇分布的CpG二核苷酸G和C含量大于50%, 碱基数大于200则构成CpG岛, 常位于基因上游调控区, 通过其甲基化状态影响着基因表达活性. 甲基化的DNA与转录因子的亲和力下降, 转录因子不能有效结合调控序列, 从而抑制基因转录[6]. 另外, 甲基化结合蛋白(MeCP)可与甲基化的DNA结合, 募集蛋白复合体使局部染色体由开放状态转变成聚缩构象, 间接阻碍转录因子的亲近[7,8]. 目前认为DNA甲基化主要通过上述两种机制来沉默基因表达, 然而在端粒酶阳性细胞中hTERT启动子和第一、第二外显子成高甲基化状态, hTERT调控区高甲基化并没有沉默hTERT的表达. Cong等[9]通过启动子删除分析表明hTERT基因启动子核心序列为ATG上游330 bp, 同时第一和第二外显子对hTERT的表达也有重要作用, 该调控区的GC含量高达78%. 研究者对膀胱、脑、心、乳腺、结肠和肾等组织样本的hTERT启动子序列作了大规模分析表明, 在端粒酶阳性细胞中, hTERT启动子核心区(-500 bp)呈现高度甲基化[10,11]. Nomoto等[12]对多个肿瘤细胞系和24例结直肠癌标本经亚硫酸氢盐处理后PCR和单链构象多态分析, 他们发现11个细胞系hTERT启动子序列呈高甲基化状态; 在肿瘤标本中, 6例hTERT启动子序列完全甲基化, 17例呈部分甲基化. Widschwendter等[13]实验表明hTERT启动子甲基化在宫颈癌中明显高于正常宫颈组织, 并且hTERT启动子甲基化程度越高预后越差. Moulin等[14]在研究眼色素层黑色素瘤肿瘤相关基因启动子CpG岛甲基化状态时发现, hTERT启动子甲基化比例最高达52%, 而RASSF1、RARB和TIMP3启动子甲基化比例为10%左右, p16更低. Guilleret等[15]用甲基化敏感的单链构象多态分析和亚硫酸氢盐修饰的测序法对56个肿瘤细胞系和来自不同器官的肿瘤组织与正常组织的hTERT启动子核心序列中27个CpG位点分析, 显示hTERT启动子甲基化与hTERT mRNA和端粒酶活性呈正相关. 此后, 他们用5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理的端粒酶阳性细胞系Lan-1、Hela和Col15细胞, hTERT表达下降, 并且在这些细胞中c-Myc没有发生明显改变, 即5-Aza-CdR不是通过上调P16来降低c-Myc表达从而间接抑制hTERT表达[16]. 这些似乎表明高甲基化与hTERT表达有正向关系, 即hTERT启动子高甲基化可促进hTERT表达, 然而, 这与目前认为的DNA甲基化沉默基因表达这一观点相反, 可能是DNA甲基化对hTERT表达没有影响, hTERT启动子的高甲基化仅为肿瘤细胞中抑癌基因高甲基化时旁观者效应的结果, 或者是hTERT启动子非必须区域普遍高甲基化掩盖局部低甲基化状态. Zinn等[17]研究似乎证实这一点, 他们发现hTERT启动子转录起始位点附近区域(-150 bp至+150 bp)的DNA低甲基化对hTERT表达具有决定性作用, 此段非甲基化可富集乙酰化-H3K9和二甲基-H3K4, 使染色体变为开放状态, 促进转录因子的结合和hTERT转录, 而甲基化DNA富集三甲基-H3K9和三甲基-H3K27, 阻碍转录因子与hTERT启动子结合, 抑制hTERT表达. Renaud等[18]和Choi等[19]也证实hTERT启动子完全甲基化使hTERT转录明显下降, 局部低甲基化对hTERT的表达是必须的. 同时他们发现CTCF(一种转录抑制因子)在hTERT第一外显子非甲基化状态下与之结合并抑制hTERT的转录起始, 当第一外显子发生甲基化时, CTCF不能与此结合位点结合从而解除CTCF对hTERT表达的抑制作用, 这部分解释甲基化可以促进hTERT表达的现象. 但是, hTERT启动子其他区域高甲基化与hTERT表达的关系还不明确, 其他区域高甲基化是否也能促进hTERT表达? 这些都有待于进一步研究.

2 hTERT表达与组蛋白修饰

组蛋白修饰包括丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化、赖氨酸残基的乙酰化、赖氨酸和精氨酸残基的甲基化、谷氨酸残基的核糖苷化、赖氨酸残基的乏素化和小乏素样蛋白修饰. 在表观遗传学中通常指组蛋白乙酰化和甲基化, 乙酰化或甲基化的组蛋白直接改变染色体构象或者募集染色体质量塑复合体间接改变染色体构象, 影响转录因子的亲近. Cong等[20]研究表

■研发前沿

基因表达改变既有DNA序列改变, 也有转录因子调控, 还有蛋白质产物修饰, 而表观遗传对基因表达调控同样具有重要作用, 是近几年的研究热点, 特别是microRNA, 因此, hTERTb表达的表观遗传调控也成为研究前沿.

■相关报道
Rebekah等认为hTERT基因转录起始点周围150 bp的DNA甲基化状态对hTERT基因转录具有决定作用,尽管启动子其他区域高甲基化, 此区域的低甲基化仍可活化hTERT基因转录, 这似乎解释了肿瘤细胞中hTERT启动子区处于高甲基化状态这一现象.

明端粒酶阴性细胞可被组蛋白去乙酰化抑制剂(TSA)诱导表达hTERT mRNA和端粒酶活性, 在此过程中, Mad与hTERT启动子上E-box结合募集HDAC, 使组蛋白去乙酰化, 染色体转变为聚缩状态, 阻碍转录因子亲近和结合, 从而抑制转录. 然而, 当E-box点突变时, TSA仍对hTERT启动子有诱导活性, 表明TSA的诱导同时也是Mad非依赖性的. Xu等[21]也证实这个观点, 同时他们发现HL60细胞分化时, 由Myc/Max二聚体转变为Mad1/Max二聚体结合于hTERT启动子区的E-box, Mad募集HDAC抑制hTERT表达. Takakura等[22]和Hou等[23]却认为TSA诱导正常细胞表达hTERT是Sp1依赖的, 因为他们外源性过表达Sp1可以增强正常细胞对TSA的反应性, hTERT启动子区Sp1结合位点突变可减弱TSA的效应, 但是E-box位点突变没有使TSA的作用发生明显改变. SP1在正常细胞中可募集HDAC1抑制转录活性, 同时, Sp1又可与具有HAT活性的p300结合激活转录. 可见Sp1对hTERT表达调控具有双重功能, 在不同的细胞环境中发挥着不同的功能. Sp3为Sp1的同簇分子, Sp3在神经酰胺抑制hTERT表达机制中起着关键作用[24], 内源性神经酰胺使SP3发生去乙酰化, 去乙酰化的SP3与hTERT启动子具有更强结合力, 与DNA结合的SP3可募集HDAC1和抑制RNA-pol II与启动子结合从而抑制hTERT基因的转录活性[25]. Xu等[26]发现人乳头瘤病毒(HPV16)的E6可通过影响组蛋白修饰来上调hTERT表达, 在正常细胞中NFX1-91与共抑制复合体mSin3A/HDAC共同作用抑制hTERT启动子活性, 泛素连接酶E6/E6AP通过降解NFX1-91促进组蛋白H3和H4乙酰化, 同时促进H3K4二甲基化进而活化hTER基因表达. 通常认为正常体细胞不表达hTERT, 但成纤维细胞在特定的细胞周期表达hTERT[27], Won等[28]对其深入研究表明, 细胞周期依赖的E2F-pocket protein-HDAC复合体的动态改变在其过程起重要作用, 当成纤维细胞进入S期时, CGK1026抑制HDAC与E2F-pocket protein复合体组装, 从而阻止HDAC对基因表达的抑制效应.

组蛋白甲基化是组蛋白修饰的另一种重要形式, 通常发生于组蛋白的赖氨酸和精氨酸残基上. 具体包括组蛋白H3上赖氨酸残基: H3K4 K3K9 H3K27 H3K36 H3K79, 精氨酸残基H3R2、H3R8、H3R17和H3R26, 组蛋白H4和H1分别为H4K20、H4R3和H1K26. 近年来有文献报道组蛋白甲基化也参与hTERT表达调控, Liu等[29]研究证明在肿瘤细胞中, 组蛋白甲基转移酶SMYD3可结合于hTERT启动子, 使H3K4发生三甲基化和染色体构象改变, 利于c-Myc和SP1的结合, 沉默SMYD3不仅使H3K4甲基化减弱, 也导致H3乙酰化减弱, 最终下调hTERT mRNA的转录和端粒酶活性. Zhu等[30]用ChIP证实精氨酸特异性去甲基化酶1(LSD1)可与hTERT启动子特定序列结合, 并且抑制肿瘤细胞中LSD1可增加hTERT启动子的H3K4二甲基化和H3乙酰化, 提高hTERT mRNA水平和端粒酶活性, 在分化的白血病细胞HL60中hTERT表达下调与hTERT启动子区LSD1富集正相关. 他们认为LSD1和HDAC共同参与维持正常细胞的hTERT抑制状态.

3 hTERT表达与非编码RNA

非编码RNA是一些不编码蛋白质但对蛋白质合成有调控作用的RNA, 包括核糖体RNA(rRNA)、转运RNA(tRNA)、小核RNA (snRNA)、小干扰RNA(siRNA)、重复相关小干扰RNA(rasiRNA)和微小RNA(miRNA)等. 近年来, RNA干扰和微小RNA成为基因表达调控的研究热点, 特别是miRNA. 生物信息学预测约三分之一的蛋白质编码基因受miRNA调控. 越来越多的实验证实非编码RNA与DNA甲基化、组蛋白修饰和染色体质量塑存在密切联系. 大量实验证实内源性双链RNA可与相应的启动子序列结合, 促使结合处特定的CG发生从头甲基化甚至Cs也出现甲基化[31-34]. Ziberman等[35]发现长siRNAs与AGO4蛋白共同作用, 不仅可影响DNA甲基化还可抑制组蛋白甲基化. 近年来, 不同的实验室报道用不同的方法构建siRNA表达载体并能成功阻断hTERT的表达, 促进肿瘤细胞衰老凋亡[36-40]. 新近的研究显示miRNA的表达也受到表观遗传学直接的调控, Lujambio等[41]实验发现在结肠癌细胞系HCT-116中, microRNA124a基因转录起始点上游高度甲基化, 甲基化后募集MeCP2和MBD2, 抑制H3和H4乙酰化和H3K4甲基化, 最终下调microRNA124a表达. miRNA124a的靶基因是CDK6, miRNA124a表达下降减弱对CDK6的抑制作用, 从而促进肿瘤的进展. Kozaki等[42]对18种口腔鳞状细胞癌细胞系研究发现148个miRNA中有54个表达下降, 其中miR-34b、miR-137、miR-193a和miR-203表达与启动子甲基化状态呈负相关, 可被5-Aza-CdR诱导上调, miR-137和miR-193a的改变最为显著. miR-137

和miR-193a的靶基因分别为周期素依赖激酶6(CDK6)和E2F, 肿瘤细胞可通过DNA甲基化抑制miR-137和miR-193a表达, 上调CDK6和E2F表达, 从而促进自身的进展. Grady等[43]发现在结直肠癌细胞中DNA甲基化可调控hsa-miR-342的表达, 并且hsa-miR-342调控区的甲基化改变可能是结直肠癌进展的早期事件. 可见, 非编码RNA特别是microRNA与DNA甲基化和组蛋白修饰在调控基因表达方面是相关的. 随着miRNA成为基因表达调控中研究热点, miRNA在端粒酶表达调控中的作用也逐渐被认识, Mitomo等[44]在对低分化甲状腺癌细胞研究发现miR-138表达与hTERT的表达呈显著性负相关, 外源性过表达miR-138可明显下调hTERT表达, 并且转染miR-138前体分子可抑制连接有hTERT3'非翻译区的报告载体的荧光素酶表达活性, 他们推测miR-138与hTERT的mRNA3'UTR靶点结合阻碍mRNA有效翻译, 从而下调hTERT表达,抑制低分化甲状腺癌细胞端粒酶活性. Miura等[45]研究发现在胶质母细胞瘤A172细胞、中度分化干细胞癌细胞(HMc-Li7)和低分化肝癌细胞系(HLF)中RGM249(编码miRNA前体基因)的表达可抑制hTERT基因转录, 降低hTERT mRNA水平. miRNA虽有广泛的基因调控功能, 可对细胞增殖、分化、凋亡和应激反应等多方面进行调控, 但由于其为近几年才被重视的分子, 对其具体调控功能知之甚少. 因此, miRNA的靶基因定位、miRNA对hTERT表达调控的具体机制、DNA甲基化和组蛋白修饰是否可以与miRNA相互作用来调控hTERT表达等尚需进一步研究.

4 结论

研究hTERT的表达调控不仅对生物的老化和死亡有更深入的了解, 更重要的是对疾病特别是肿瘤的发生发展有更清晰的认识, 从而为肿瘤的诊断和治疗提供新途径. 已有研究表明hTERT siRNA不仅单独可抑制乳腺癌细胞的增殖, 与多柔比星联合使用, 还能明显增强后者的杀乳腺癌细胞效应[46]; Nakamura等[36]在体外实验证实hTERT siRNA可增加HeLa和SiHah细胞对电离辐射和博来霉素的敏感性; 而Guo等[47]在小鼠体内实验显示, 表达hTERT siRNA的腺病毒可明显增强顺铂抑制种植瘤细胞SMMC-7721和HepG2生长效应. 这些研究为表观遗传调控hTERT表达在肿瘤治疗的应用方面奠定理论基础. hTERT的表观遗传学调控从另一角度揭示了端粒酶的调控机制, 表观遗传学主要通过DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA调节hTERT表达水平. 在很多肿瘤细胞中hTERT启动子高甲基化状态与hTERT表达水平正相关, 但高甲基化在hTERT表达调控中的具体生物效应还不是很明确, 这还有待于深入研究. 组蛋白修饰本身及与甲基化的相互作用对hTERT表达的影响也需进一步探索. 非编码RNA特别是miRNAs对基因表达有如此广泛的调控功能, 其生物学效应逐渐被重视, miRNAs对hTERT的表达调控也将成为研究热点.

■**创新盘点**
本文从基因表达调控的另一方式, 即表观遗传学角度比较全面地阐述了DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA对hTERT表达的调控.

5 参考文献

1 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015

2 Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; 275: 973-977

3 Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1558-1561

4 Kanaya T, Kyo S, Takakura M, Ito H, Namiki M, Inoue M. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 78: 539-543

5 Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 1999; 80: 60-63

6 Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* 1997; 195: 67-71

7 Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 1989; 58: 499-507

8 Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; 69: 905-914

9 Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 137-142

10 Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1037-1043

11 Choi JH, Park SH, Park J, Park BG, Cha SJ, Kong KH, Lee KH, Park AJ. Site-specific methylation of CpG nucleotides in the hTERT promoter region can control the expression of hTERT during malignant progression of colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 615-620

12 Nomoto K, Maekawa M, Sugano K, Ushiama M,

■应用要点
端粒酶几乎是大多肿瘤细胞永生化的必须“工具”，研究hTERT表达调控机制可为阻断肿瘤细胞增殖提供新的途径，为肿瘤治疗提供新的靶点.

Fukayama N, Fujita S, Kakizoe T. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 3-8

13 Widschwendter A, Müller HM, Hubalek MM, Wiedemair A, Fiegl H, Goebel G, Mueller-Holzner E, Marth C, Widschwendter M. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 407-416

14 Moulin AP, Clément G, Bosman FT, Zografos L, Benhattar J. Methylation of CpG island promoters in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 281-285

15 Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer* 2002; 101: 335-341

16 Guilleret I, Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Exp Cell Res* 2003; 289: 326-334

17 Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res* 2007; 67: 194-201

18 Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, Guilleret I, Bosman FT, Lobanenkov V, Benhattar J. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 1245-1256

19 Choi JH, Min NY, Park J, Kim JH, Park SH, Ko YJ, Kang Y, Moon YJ, Rhee S, Ham SW, Park AJ, Lee KH. TSA-induced DNMT1 down-regulation represses hTERT expression via recruiting CTCF into demethylated core promoter region of hTERT in HCT116. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 449-454

20 Cong YS, Bacchetti S. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 35665-35668

21 Xu D, Popov N, Hou M, Wang Q, Björkholm M, Gruber A, Menkel AR, Henriksson M. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3826-3831

22 Takakura M, Kyo S, Sowa Y, Wang Z, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Inoue M. Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 3006-3011

23 Hou M, Wang X, Popov N, Zhang A, Zhao X, Zhou R, Zetterberg A, Björkholm M, Henriksson M, Gruber A, Xu D. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A derepresses the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human cells. *Exp Cell Res* 2002; 274: 25-34

24 Wooten LG, Ogretmen B. Sp1/Sp3-dependent regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity by the bioactive sphingolipid ceramide. *J Biol Chem* 2005; 280: 28867-28876

25 Wooten-Blanks LG, Song P, Senkal CE, Ogretmen B. Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1. *FASEB J* 2007; 21: 3386-3397

26 Xu M, Luo W, Elzi DJ, Grandori C, Galloway DA. NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4819-4828

27 Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003; 114: 241-253

28 Won J, Chang S, Oh S, Kim TK. Small-molecule-based identification of dynamic assembly of E2F-pocket protein-histone deacetylase complex for telomerase regulation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11328-11333

29 Liu C, Fang X, Ge Z, Jalink M, Kyo S, Björkholm M, Gruber A, Sjöberg J, Xu D. The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer Res* 2007; 67: 2626-2631

30 Zhu Q, Liu C, Ge Z, Fang X, Zhang X, Strååt K, Björkholm M, Xu D. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) Is required for the transcriptional repression of the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *PLoS One* 2008; 3: e1446

31 Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000; 19: 5194-5201

32 Wassenegger M. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol* 2000; 43: 203-220

33 Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M. RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 Suppl 4: 16499-16506

34 Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol* 2009; 53: 245-257

35 Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 2003; 299: 716-719

36 Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Hahn WC, Inoue M. Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 859-868

37 Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, Botchkina IL, Hom YK, Cunha GR, Blackburn EH. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res* 2004; 64: 4833-4840

38 Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi-Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C. Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth.

Oncogene 2005; 24: 3923-3931
39 de Souza Nascimento P, Alves G, Fiedler W. Telomerase inhibition by an siRNA directed against hTERT leads to telomere attrition in HT29 cells. *Oncol Rep* 2006; 16: 423-428
40 Miri-Moghaddam E, Deezagi A, Soheili ZS. Downregulation of telomerase activity in human promyelocytic cell line using RNA interference. *Ann Hematol* 2009; 88: 1169-1176
41 Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1424-1429
42 Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 2094-2105
43 Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, Lee JH, Kim YH, Tsuchiya KD, Washington MK, Paraskeva C, Willson JK, Kaz AM, Kroh EM, Allen A, Fritz BR, Markowitz SD, Tewari M. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 3880-3888
44 Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Kotani K, Oikawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2008; 99: 280-286
45 Miura N, Sato R, Tsukamoto T, Shimizu M, Kabashima H, Takeda M, Takahashi S, Harada T, West JE, Drabkin H, Mejia JE, Shiota G, Murawaki Y, Virmani A, Gazdar AF, Oshimura M, Hasegawa J. A noncoding RNA gene on chromosome 10p15.3 may function upstream of hTERT. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 5
46 Dong X, Liu A, Zer C, Feng J, Zhen Z, Yang M, Zhong L. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 133
47 Guo X, Wang W, Zhou F, Lu Z, Fang R, Jia F, Bu X, Li R, Zhang B, Wu M, Wei L. siRNA-mediated inhibition of hTERT enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 1555-1560

■同行评价
本文选题为当前热点问题, 内容丰富, 参考文献引用合理, 具有较好的可读性.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《中国期刊引证报告（扩刊版）》发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告（扩刊版）》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统, 在“万方数据-数字化期刊群”基础上, 结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊. 对全部期刊的引文数据, 严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后, 进行规范化处理和有效链接, 经统计分析, 编制而成. 2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次, 影响因子0.729, 即年指标0.142, 引用期刊数732, 学科扩散指标0.533, 被引半衰期4.303, H指数8. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1032-1036
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

复方中药安胃汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠TGF-α、COX-2 mRNA表达的影响

韦 维, 林寿宁, 黄贵华, 朱永苹, 万小刚, 刘伟峰, 朱光辉, 张 倩

■背景资料
慢性萎缩性胃炎是常见消化病, 与胃癌的发生有着密切的关系, 尤其是胃窦萎缩性胃炎与肠型胃癌的关系较为肯定, 世界卫生组织已将CAG定为胃癌前状态. 因此对CAG防治具有重要的意义. 中药治疗可拓宽慢性胃炎的治疗途径, 进一步探讨中医药对CAG防治作用具有重要的意义.

韦维, 林寿宁, 朱永苹, 万小刚, 刘伟峰, 朱光辉, 张倩, 广西中医学院瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011
黄贵华, 广西中医学院一附院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530022
广西自然科学基金资助项目, 桂科自No. 0728187
作者贡献分布: 韦维、林寿宁及黄贵华对此文所作贡献均等; 此课题由林寿宁、韦维及黄贵华设计; 研究过程由韦维、朱永苹、万小刚、刘伟峰、朱光辉及张倩操作完成; 研究所用分析工具由林寿宁提供; 数据分析由林寿宁与韦维完成; 本论文写作由韦维、林寿宁及黄贵华完成.
通讯作者: 林寿宁, 教授, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号, 广西中医学院瑞康医院消化内科. lsn77766@sina.com
电话: 0771-2218105
收稿日期: 2009-10-29 修回日期: 2010-02-05
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Anwei Decoction up-regulates TGF-α mRNA expression but down-regulates COX-2 mRNA expression in the gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis

Wei Wei, Shou-Ning Lin, Gui-Hua Huang, Yong-Ping Zhu, Xiao-Gang Wan, Wei-Feng Liu, Guang-Hui Zhu, Qian Zhang

Wei Wei, Shou-Ning Lin, Yong-Ping Zhu, Xiao-Gang Wan, Wei-Feng Liu, Qian Zhang, Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Gui-Hua Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, Gui Ke Zi No. 0728187
Correspondence to: Professor Shou-Ning Lin, Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lsn77766@sina.com
Received: 2009-10-29 Revised: 2010-02-05
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of Anwei Decoction (AD) on the expression of transforming growth factor-α (TGF-α) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNAs in the gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis (CAG).

METHODS: Thirty-six healthy rats were randomly divided into three groups: model control group (untreated), AD treatment group (treated with AD) and Weifuchun treatment group (treated with Weifuchun). CAG was induced in rats using *N*-methy-*N*-nitro-*N*-nitroguanidine (MNNG). After treatment, the expression of TGF-α and COX-2 mRNAs in the gastric mucosa of rats was determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with the model control group, the expression of TGF-α mRNA was evidently enhanced in the AD treatment group and Weifuchun treatment group (0.78 ± 0.08 *vs* 1.54 ± 0.27 and 1.30 ± 0.15, respectively, both $P < 0.01$). Significant difference was also noted in the expression level of TGF-α mRNA between the two treatment groups ($P < 0.05$). In contrast, the expression level of COX-2 mRNA was remarkably reduced in the AD treatment group and Weifuchun treatment group compared with the model control group (0.36 ± 0.04 and 0.46 ± 0.06 *vs* 0.72 ± 0.13, respectively; both $P < 0.01$). Significant difference was also noted in the expression level of COX-2 mRNA between the two treatment groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: AD exerts therapeutic effects against CAG by enhancing TGF-α mRNA expression and reducing COX-2 mRNA expression in the gastric mucosa.

Key Words: Anwei Decoction; Atrophic gastritis; Transforming growth factor-alpha; Cyclooxygenase-2; Experimental research

Wei W, Lin SN, Huang GH, Zhu YP, Wan XG, Liu WF, Zhu GH, Zhang Q. Anwei Decoction up-regulates TGF-α mRNA expression but down-regulates COX-2 mRNA expression in the gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1032-1036

■同行评议者
高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

摘要

目的: 探讨复方中药安胃汤对实验性慢性萎

缩性胃炎大鼠模型TGF-α mRNA、COX-2 mRNA表达的影响.

方法: 采用甲基硝基亚硝基胍(MNNG)慢性萎缩性胃炎大鼠模型, 36只清洁级健康雄性Wistar大鼠随机分为病理模型组、安胃汤组、胃复春对照组, 共3组. 实时定量PCR方法观察复方中药安胃汤对实验性慢性萎缩性胃炎大鼠模型胃黏膜TGF-α、COX-2 mRNA表达的影响, 对后者进行图像分析及统计学处理.

结果: 与病理模型组相比, 复方中药安胃汤组和胃复春对照组均显著提高TGF-α mRNA/β-actin值(*A*值: 1.54±0.27 *vs* 0.78±0.08, 1.30±0.15 *vs* 0.78±0.08, $P<0.01$), 复方中药安胃汤组优于胃复春对照组($P<0.05$). 与病理模型组相比, 复方中药安胃汤组和胃复春对照组均显著降低COX-2 mRNA/β-actin值(*A*值: 0.36±0.04 *vs* 0.72±0.13, 0.46±0.06 *vs* 0.72±0.13, $P<0.01$), 安胃汤组优于胃复春对照组($P<0.05$).

结论: 复方中药安胃汤可能通过增加胃黏膜TGF-α mRNA表达, 降低胃黏膜COX-2 mRNA表达而起到治疗CAG作用.

关键词: 安胃汤; 慢性萎缩性胃炎; 转化生长因子-α; 环氧合酶-2; 实验研究

韦维, 林寿宁, 黄贵华, 朱永苹, 万小刚, 刘伟峰, 朱光辉, 张倩. 复方中药安胃汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠TGF-α、COX-2 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1032-1036

http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1032.asp

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是常见消化病, 与胃癌的发生密切相关, 尤其是胃窦萎缩性胃炎与肠型胃癌的关系较为肯定, 世界卫生组织已将CAG定为胃癌前状态, 因此对CAG的防治具有重要的意义. 中药治疗可拓宽慢性胃炎的治疗途径[1]. 转化生长因子-α(transforming growth factor alpha, TGF-α)是作用于上皮细胞的重要生长因子之一, 可促使细胞增殖和发生转化[2]. 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)既是正常胃肠组织表达的要素酶, 又是诱导酶, 在正常组织中几乎不能测出, 在炎症区域则表达增加, 其表达受多种因子(包括生长因子、细胞因子等)调节[3]. 复方中药安胃汤出自全国著名中医林沛湘教授治疗CAG的经验方, 临床上疗效显著[4], 但其作用机制尚未完全阐明, 我们通过动物实验观察其对胃黏膜TGF-α、COX-2 mRNA表达的影响, 探讨其防治CAG的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康♂Wistar大鼠, 体质量140-170 g, 由广西食品药品检验所实验动物中心提供(动物合格证号SCXX桂2003-0001). 复方中药安胃汤为免煎中药颗粒, 主要成分: 半夏、黄连、干姜、乌药、丹参、百合、白芍、薏苡仁、炙甘草, 其构成比为13∶5∶5∶7∶15∶20∶20∶10∶5. TRIzol试剂购自Invitrogen公司; Taq酶、Rnasin、MMLV RT反转录酶购自Promega公司; SYBRgreen购自美国ABI公司; DNA Marker购自广州东盛生物科技有限公司; *N*-甲基-*N*, -硝基-*N*-亚硝基胍为美国Fluka公司产品; Oligo dT序列, 引物序列由恒博和泰生物科技(北京)有限公司合成. Oligo dT序列: 5'-TTTTGTACAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; β-actin(263 bp): 上游5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3', 下游5'-AATGTCACGCACGATTTCCC-3'; COX-2(230 bp): 上游: 5'-GCCACCTCTGCGATGCTCTT-3', 下游: 5'-GTGTTTGGGGTGGGCTTCAG-3', TGF-α(246 bp): 上游: 5'-TCTGGGTACGTGGGTGTTCG-3', 下游: 5'-AGAGTGGCAGCAGGCAGTCC-3'. 7000型实时荧光定量PCR系统购自美国ABI公司; DU2640型紫外分光光度计购自Beckman公司; 3K220型低温高速离心机购自Sigma公司; DF2C型恒压恒流电泳仪购自北京六一仪器厂.

1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 36只实验大鼠随机分为3组(n = 12): 病理模型组、安胃汤组、胃复春对照组, 参照文献[5]造模. 3组均自由饮用170 mg/L的MNNG液, 造模期间不再给予其他饮水, 共8 wk, 均普通饲料饲养. 8 wk末, 各组随机抽取2只大鼠处死, 取胃, 行病理检查, 判断模型成功与否. 造模成功后从第9周开始: 病理模型组4 mL/d纯净水灌胃; 安胃汤组按1 mL/100 g体质量取复方中药安胃汤混悬液(2.5 kg/L)灌胃; 胃复春对照组取胃复春0.29 g配成液4 mL悬浊液灌胃, 每天1次, 至第12周结束.

1.2.2 光镜标本处理: 动物处死后, 取全胃, 沿胃大弯剪开, 取胃窦和胃体部. 4%多聚甲醛浸润固

■相关报道
梁卫江等发现在慢性浅表性胃炎、肠上皮化生、不典型增生及胃癌组织中, TGF-α均有表达. 甘爱华等研究显示从慢性浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠化生-不典型增生-早期胃癌-进展期胃癌的COX-2蛋白表达呈逐渐递增趋势.

■创新盘点
本研究运用实时定量PCR方法观察在体动物CAG模型胃黏膜TGF-α、COX-2 mRNA的表达, 探讨复方中药安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制, 为抗慢性萎缩性胃炎中医药研究积累可以借鉴的研究思路与方法, 同时从基因水平上阐释名老中医学术理论的科学性.

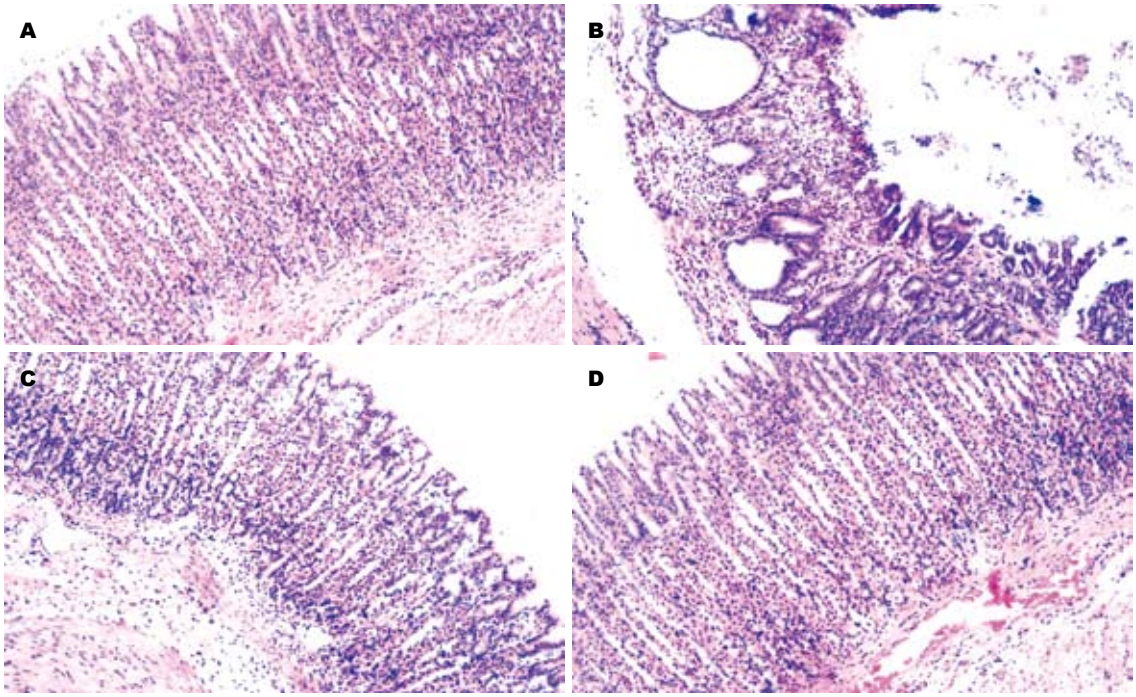


图 1 胃黏膜HE染色(×10). A: 正常组; B: 模型组; C: 安胃汤组; D: 胃复春组.

定12 h以上, 冲水24 h, 50%、75%、95%、100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡后, 石蜡包埋. 切片厚5 μm, 常规苏木精-伊红染色病理学检查.

1.2.3 胃组织和RNA提取: 各组于用药治疗4 wk后, 禁食12 h, 将大鼠用1%乌拉坦液, 按体质量1 mL/100 g麻醉, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开, 并向胃窦近幽门口至胃大弯方向取1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm胃黏膜组织, 放入0.1% DEPC水处理过的冻存管中, 并迅速加入1 mL TRIzol溶液. 封口膜封口后, 放入液氮中保存.

1.2.4 提取总RNA及反转录反应: TRIzol一步法提取总RNA. 紫外-分光光度计测定所提取RNA浓度. 反转录反应体系: 总RNA 2 μg, Oligo dT(0.5 kg/L)2 μL, dNTP(10 mol/L)3 μL, DTT(0.1 μmol/L)2 μL, Rnaseinhibitor(40 U/μL)1 μL, MMLV-RT (200 U/μL)1 μL, 5×MMLV-RT Buffer 6 μL, 加入DEPC处理过的无菌水至30 μL; 反应条件: 45 ℃反应1 h, 95 ℃ 5 min终止反应.

1.2.5 Real-time PCR反应: 20 μL的PCR反应体系含: 10 μL的2×SYBR Green PCR Master Mix, 5.4 μL的RNase Free Water, 上、下游引物(0.05 g/L)各1.8 μL和1 μL的cDNA. 反应条件: 预变性, 94 ℃, 5 min; 变性, 95 ℃, 30 s; 退火, 58 ℃, 30 s, 延伸, 72 ℃, 30 s; 共进行40个循环的扩增, 72 ℃后延伸5 min. 实验中同步进行内参基因β-actin的定量检测, 以目的基因与内参基因相对浓度比作为目的基因的相对表达量. 扩增反应在ABI7000荧光定量PCR仪上进行, 各样品的荧光信号值由荧光定量PCR仪的支持软件ABI Prism7000SDS Software实时产生并自动计算定量数值.

统计学处理 各样品目标基因的相对表达水平通过内参基因进行校准后用mean±SD表示, 用SPSS13.0 for Windows统计软件包对数据进行统计, 采用单因素方差分析, 进行SNK两两比较.

2 结果

2.1 大鼠胃组织观察 正常组胃黏膜呈粉红色, 表面光滑有光泽, 被覆较多黏液, 皱襞面光滑, 走向规则, 胃壁弹性良好; 模型组黏膜薄弱, 色泽灰白, 表面黏液少, 皱裳低平、稀少甚至消失, 走向紊乱, 胃壁弹性减低, 安胃汤组及胃复春组部分胃黏膜基本恢复正常, 以安胃汤组为明显.

2.2 光学显微镜观察 正常组: 胃黏膜厚, 各层结构正常, 胃黏膜上皮细胞排列整齐, 固有腺体形状规则, 排列整齐, 未见萎缩、脱落或缺损, 可见少许嗜酸性粒细胞(图1A). 模型组: 胃黏膜全层明显变薄、局灶上脱落、糜烂, 黏膜固有腺体数量明显减少、排列稀疏紊乱, 腺体体积缩小, 个别呈囊状扩张, 黏膜固有层淋巴细胞浸润、部分有淋巴滤泡形成(图1B). 安胃汤组: 黏膜各层结构基本正常, 黏膜固有腺体丰富排列较规则, 无明显数量减少, 固有层见少许炎细胞浸润(图1C). 胃复春组: 胃黏膜上皮稍变薄, 黏膜

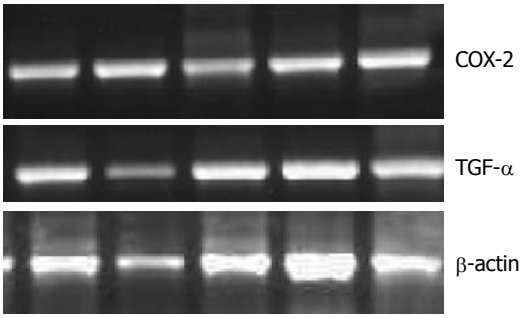


图 2 COX-2, TGF-α PCR扩增产物电泳图谱.

表 1 各组大鼠胃黏膜TGF-α及COX-2 mRNA表达 (n = 10, A值, mean ± SD)

分组	TGF-α mRNA /β-actin	COX-2 mRNA /β-actin
病理模型组	0.78 ± 0.08	0.72 ± 0.13
安胃汤组	1.54 ± 0.27[b]	0.36 ± 0.04[b]
胃复春对照组	1.30 ± 0.15[bc]	0.46 ± 0.06[bc]

[b]P<0.01 *vs* 病理模型组; [c]P<0.05 *vs* 胃复春组.

■应用要点
本研究验证全国名老中医的验方, 可进一步整理提高, 有利继承与发展名老中医的学术理论. 同时为安胃汤开发成治疗慢性萎缩性胃炎的中药新药提供理论和基础实验依据, 为研究高水准的中药新药提供基础研究.

上皮排列整齐, 未见明显缺损, 固有腺体排列稍紊乱, 部分腺体体积缩小, 个别扩张, 固有层可内见淋巴细胞浸润(图1D). 说明安胃汤与胃复春均能改善胃黏膜的病理形态, 但以安胃汤效果为佳.

2.3 总RNA的浓度测定 紫外-分光光度计检测总RNA显示, A_{260}/A_{280}值为1.7-1.9, 总RNA的浓度浓度符合实验要求.

2.4 标准曲线绘制 实验中, 目的基因和内参基因的标准曲线均由荧光定量PCR仪附带软件绘制, 其中TGF-α mRNA和COX-2 mRNA的相关系数分别为r = 0.999和0.986, 线性关系良好, 保证扩增结果的准确性.

2.5 复方中药安胃汤对CAG模型大鼠胃黏膜内COX-2、TGF-α mRNA的表达的影响 荧光定量扩增曲线光滑, 说明扩增反应呈指数扩增; 样本从各组扩增产物中随机选取, 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察PCR扩增结果, 各产物特异性条带明亮可见, 扩增片段符合设计片段长度(图2); 荧光定量PCR结果显示, 与病理模型组相比, 复方中药安胃汤组和胃复春对照组TGF-α mRNA表达显著增加(P<0.01), 复方中药安胃汤组优于胃复春对照组(P<0.05), 具有统计学意义. 与病理模型组相比, 复方中药安胃汤组和胃复春对照组COX-2 mRNA表达均显著降低(P<0.01), 复方中药安胃汤组优于胃复春对照组(P<0.05), 具有统计学意义(表1).

3 讨论

CAG与中医的“痞满”、“胃脘痛”、“嘈杂”等病症的症状表现非常类似. 其病机以脾胃虚弱、胃失和降为主, 气虚、阴虚及湿郁或湿热、血瘀并见, 临床多表现为虚实相兼, 寒热错杂. 病变脏腑涉及脾胃肝. 复方中药安胃汤安胃汤, 是在全国名老中医、广西中医学院林沛湘教授治疗慢性胃病验方基础上组方而成[4]. 方中黄连泻火解毒; 干姜温中逐寒, 寒热同施, 辛开苦降; 合半夏入胃, 更能和胃降逆, 燥湿开结, 通降气机; 百合味甘而性凉, 能清泻胃腑之邪热, 养护胃气; 乌药顺气开郁, 散寒止痛, 配合百合, 则养津护胃而无滋腻之虑, 行气散寒而无温燥之虞; 白芍、炙甘草酸甘化阴以生津液, 柔肝缓急而止疼痛; 丹参、木香行气滞而化血瘀. 黄连、干姜, 寒热并用; 辛开苦降, 和半夏入胃, 能和胃降逆, 燥湿开结, 通降气机为君, 师法仲景《伤寒论》半夏泻心汤之辛开苦降之义; 百合、乌药养津护胃, 行气散寒为臣; 白芍、炙甘草酸甘化阴以生津液, 柔肝缓急而止疼痛为佐; 丹参、木香行气滞而化血瘀为使. 本方组方严谨, 寒热并用, 活血行气, 畅通气机, 疗效独特, 并在临床上有显著疗效.

本研究结果表明, 复方中药安胃汤与胃复春均能改善胃黏膜的病理形态, 但以安胃汤效果为佳, 经安胃汤治疗后胃黏膜各层结构基本正常, 黏膜固有腺体丰富排列较规则, 无明显数量减少. 荧光定量PCR结果显示, 复方中药安胃汤组和胃复春对照组与病理模型组相比, 均显著提高TGF-α mRNA/β-actin值(P<0.01), 安胃汤组优于胃复春对照组(P<0.05).安胃汤组和胃复春对照组与病理模型组相比,显著降低COX-2 mRNA/β-actin值(P<0.01), 安胃汤组优于胃复春对照组(P<0.05).

TGF-α是EGF家族中另一类参与胃黏膜损伤后修复的主要调节肽, 由于胃黏膜本身合成TGF-α, 合成部位见于黏液上皮、壁细胞和主细胞等多种胃黏膜细胞成分, 所以TGF-α是维持胃黏膜完整性最重要的肽类物质[6]. TGF-α是作用于上皮细胞的重要生长因子之一, 可促使细胞增殖和发生转化, 梁卫江等[7]发现在慢性浅表性胃炎、肠上皮化生、不典型增生及胃癌组织中, TGF-α均有表达. COX-2既是正常胃肠组织表达的要素酶, 又是诱导酶, 在正常组织中几乎

■同行评价
本文为临床治疗慢性萎缩性胃炎提供了新的思路.

不能测出, 在炎症区域则表达增加, 其表达受多种因子(包括生长因子、细胞因子等)调节. 甘爱华等[8]研究显示从慢性浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠化生-不典型增生-早期胃癌-进展期胃癌的COX-2蛋白表达呈逐渐递增趋势, 提示COX-2参与了胃癌形成的全过程, 可能为其早期事件. 刘贵生等[9]研究发现随着肠上皮化生愈倾向于恶性趋势, COX-2表达水平也逐渐增高, 其有可能作为预测肠上皮化生恶变危险性的有用指标之一. Nakano等认为, COX-2的表达是由TGF-α等生长因子所调节[10-12].

总之, 我们认为复方中药安胃汤可能通过增加胃黏膜TGF-α mRNA表达, 降低胃黏膜COX-2 mRNA表达而起到防治CAG作用的, 至于TGF-α是否对COX-2有抑制调节作用仍需进一步探讨.

4 参考文献

1 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(上)(2006, 上海). 中华消化杂志 2007; 27: 45-49

2 de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC, Klausner RD, Gnarra JR, Pause A, Lee S. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel--Lindau (VHL)(-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1387-1392

3 DuBois RN, Eberhart CF, Williams CS. Introduction to eicosanoids and the gastroenteric tract. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 267-277

4 林寿宁. 中国百年百名中医临床丛书−林沛湘. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 99-117

5 王四旺, 施新猷, 黄传贵, 谢艳华. 中药药效学研究与评价. 第1版. 西安: 陕西科学技术出版社, 2001: 315-317

6 Romano M, Kraus ER, Boland CR, Coffey RJ. Comparison between transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in the protection of rat gastric mucosa against drug-induced injury. *Ital J Gastroenterol* 1994; 26: 223-228

7 梁卫江, 张万岱, 张亚历, 刘利民. 胃癌及癌前病变组织中TGF-α和cyclin E表达及两者关联性分析. 癌症 2004; 23: 259-263

8 甘爱华, 许岸高, 刘集鸿, 赵玉刚. 胃癌前病变环氧合酶-2蛋白的表达及中医辨证. 中国中西医结合急救杂志 2004; 11: 28-31

9 刘贵生, 龚均, 程鹏, 戴菲. 用组织芯片技术研究环氧合酶-2在不同亚型胃粘膜肠化生及胃癌中的表达. 中国肿瘤临床 2005; 32: 1085-1088

10 Nakano O, Sakamoto C, Matsuda K, Konda Y, Matozaki T, Nishisaki H, Wada K, Suzuki T, Uchida T, Nagao M. Induction of cyclooxygenase protein and stimulation of prostaglandin E2 release by epidermal growth factor in cultured guinea pig gastric mucous cells. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1679-1686

11 Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 297-306

12 Tan XD, Chen YH, Liu QP, Gonzalez-Crussi F, Liu XL. Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 12): 2149-2155

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1067-1070
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

内镜胆道内支架引流治疗伴肝脏转移的胰头癌16例

赵志峰, 麻树人, 张 宁, 杨 卓, 韩 笑, 赵云峰, 高 飞, 宫照杰, 杨 琳

赵志峰, 麻树人, 张宁, 杨卓, 韩笑, 赵云峰, 高飞, 宫照杰, 杨琳, 中国人民解放军沈阳军区总医院内窥镜科 辽宁省沈阳市 110840

作者贡献分布: 赵志峰、麻树人、张宁及杨卓对此文所作贡献均等; 此课题由赵志峰、麻树人、张宁及杨卓共同设计; 研究过程由赵志峰、麻树人、张宁、杨卓、韩笑、赵云峰、高飞、宫照杰及杨琳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵志峰提供; 数据分析由赵志峰与韩笑完成; 本论文写作由赵志峰与麻树人完成.

通讯作者: 麻树人, 主任医师, 110840, 辽宁省沈阳市, 中国人民解放军沈阳军区总医院内窥镜科. shuren_ma@163.com
电话: 024-28856596
收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-01-26
接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-04-08

Endoscopic biliary drainage by stent placement for carcinoma of the head of the pancreas with hepatic metastasis: a report of 16 cases

Zhi-Feng Zhao, Shu-Ren Ma, Ning Zhang, Zhuo Yang, Xiao Han, Yun-Feng Zhao, Fei Gao, Zhao-Jie Gong, Lin Yang

Zhi-Feng Zhao, Shu-Ren Ma, Ning Zhang, Zhuo Yang, Xiao Han, Yun-Feng Zhao, Fei Gao, Zhao-Jie Gong, Lin Yang, Department of Endoscopy, General Hospital of Chinese PLA Shenyang Military Region, Shenyang 110840, Liaoning Province, China

Correspondence to: Shu-Ren Ma, Department of Endoscopy, General Hospital of Chinese PLA Shenyang Military Region, Shenyang 110840, Liaoning Province, China. shuren_ma@163.com
Received: 2009-12-18 Revised: 2010-01-26
Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical significance of endoscopic biliary drainage by stent placement in the treatment of carcinoma of the head of the pancreas with hepatic metastasis.

METHODS: Sixteen patients with obstructive jaundice, who were diagnosed as carcinoma of the head of the pancreas with hepatic metastasis by imaging between May 2006 and December 2008, were included in the study. All patients underwent stent placement for endoscopic biliary drainage to cure obstructive jaundice.

RESULTS: Retroperitoneal lymph node metastasis was found in 5 patients. Of all patients, 12 underwent biliary drainage with expandable metallic biliary stents, 4 with plastic biliary stents, and 6 with pancreatic duct stents. Complete resolution of obstructive jaundice was achieved in all patients. Mental state, appetite and sleep were improved obviously in 75.0%, 25.0% and 37.5% of patients. The survival time was extended from 9 d to 134 d, with an average value of 81.4 d ± 50.2 d. The follow-up data showed that appreciable outcome and satisfactory outcome were achieved in 97% and 69% of patients, respectively.

CONCLUSION: Endoscopic biliary drainage by stent placement can not only cure completely obstructive jaundice but also improve survival quality in patients with carcinoma of the head of the pancreas with hepatic metastasis.

Key Words: Endoscopy; Endoscopic biliary drainage; Carcinoma of the head of the pancreas

Zhao ZF, Ma SR, Zhang N, Yang Z, Han X, Zhao YF, Gao F, Gong ZJ, Yang L. Endoscopic biliary drainage by stent placement for carcinoma of the head of the pancreas with hepatic metastasis: a report of 16 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1067-1070

摘要

目的: 评价伴肝脏转移的胰头癌患者内镜胆道内支架引流治疗的临床意义.

方法: 门诊就诊和转院的胰头癌伴有肝脏转移患者, 如具有严重的梗阻性黄疸则符合内镜逆行胆胰管造影救治指征, 然后按照知情同意的原则进入治疗研究计划. 均应用内镜胆道内支架引流技术, 包括金属内支架和塑料支架, 治疗出院后随访观察至患者死亡.

结果: 16例患者进入治疗研究, 其中伴有腹膜后淋巴结转移5例. 均采用内镜胆道支架引流术, 其中应用胆道金属支架12例, 胆道塑料支架4例, 胰管内支架6例. 治疗后1 wk时梗阻性黄疸缓解率100%, 精神状况明显好转75.0%(12/16), 食欲改善25.0%(4/16), 睡眠改

■背景资料
胰头癌是一种临床常见恶性肿瘤, 其具有根治率低、患者生存期短、生存质量低的特点. 胰头癌患者主要的并发症和相关致死因素包括梗阻性黄疸、十二肠道梗阻、贫血、厌食、腹痛等, 以前两者为主. 内镜技术是重要的姑息性治疗方法.

■同行评议者
何裕隆, 教授, 中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

善37.5%(6/16). 治疗后的患者最短生存期为9 d, 最长生存期为134 d, 平均81.4 d±50.2 d. 随访数据表明治疗有意义的97%, 治疗效果满意的11例.

结论: 对于伴有肝脏转移的胰头癌患者, 内镜胆道内支架引流技术不仅能解除梗阻性黄疸, 而且可以一定程度的改善生存质量, 具有一定的临床应用价值.

关键词: 内镜; 内镜胆道支架引流术; 胰头癌

赵志峰, 麻树人, 张宁, 杨卓, 韩笑, 赵云峰, 高飞, 宫照杰, 杨琳. 内镜胆道内支架引流治疗伴肝脏转移的胰头癌16例. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1067–1070
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1067.asp

■研发前沿
目前, 世界各国针对胰头癌患者治疗研究的热点主要是外科学Whipple手术的改良与内镜引流+局部治疗, 以及基因治疗研究. 关于胰头癌患者的治疗, 学术界存在的主要争议是治疗手段和方法的选择标准, 即治疗后生存质量与治疗手段的关系.

0 引言

胰头癌是常见的恶性肿瘤之一, 随着肿瘤的生长常导致胆道和胰管梗阻引起胰腺萎缩、梗阻性黄疸和胆系感染等, 转移主要发现在腹膜后淋巴结和肝脏[1]. 胰头癌患者的生存期一般为10 mo左右, 由于发病隐匿所以就诊时多为进展期, 常合并严重的继发疾病或者转移性病变, 导致多数患者无法完成传统的外科手术[2]. 内镜技术不仅是胆道梗阻的诊断方法[3], 内镜胆道引流术也是一种治疗胰头癌继发梗阻性黄疸的确切有效的方法[4,5]. 2006-05/2008-12我们应用内镜胆道支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)治疗伴肝脏转移的胰头癌患者梗阻性黄疸16例, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-05/2008-12在我院门诊就诊和转院救治的伴有肝脏转移的胰头癌患者中, 如果具有明确的梗阻性黄疸等内镜逆行胆胰管造影(endoscopy retrograde cholangiopancreatography, ERCP)救治指征, 则按照知情同意的原则进入治疗研究计划. 确定胰头癌诊断要求患者必须具备两种以上影像学资料证实, 肝脏转移诊断要求具有影像学证实, 梗阻性黄疸具有明确的实验室结论.

1.2 方法

1.2.1 入组病例筛选方法: 本研究入组的胰头癌患者认定标准: (1)首先患者具有明确的胰头癌诊断依据, 如果无病理证实, 可以根据影像学资料经两位影像学专家分别认定诊断为胰头癌; (2)患者需伴有明确的肝脏转移, 由影像学资料证实经影像学专家认定; (3)患者存在明确的梗阻性黄疸体征和实验室检查结果, 符合内镜救治指征. 3个入选要求完全满足的患者为本项研究的对象.

1.2.2 内镜治疗方法设计: 梗阻性黄疸治疗: 要求完成乳头括约肌切开术和胆道清理术, 均采用ERBD, 根据胆道情况和患者经济状况选择性应用胆道内支架(金属胆道内支架、塑料胆道内支架), 以金属胆道支架为首选. 要求胆道支架完全跨越胆道狭窄段并保持近十二指肠端暴露于肠腔内. 胰管梗阻治疗: 如造影显示胰管扩张, 要求完成胰管括约肌切开术, 观察胰液引流通畅即可. 如患者胰管扩张并考虑存在胰源性疼痛, 要求置入胰管内支架完成胰管减压.

1.2.3 研究相关数据统计要求: 临床实验室指标要求完成3个时间点(术前、术后24 h、术后1 wk)的血尿淀粉酶、血液分析、肝功、血糖检测.

1.2.4 随访统计设计: 根据胰腺癌患者的临床相关体征, 设定饮食状况、精神状况(睡眠、情绪)、生存期为研究评价指标. 研究开始后由患者护理家属完成记录, 所有统计资料于患者死亡后寄回或电话随访告知. 按照单项评分标准评分治疗前后评分上升1分认为治疗有效, 2分及以上认为效果显著. 患者总体评分上升3分认为治疗有意义, 上升4分及以上考虑治疗效果满意疗效确切. 饮食状况评分标准: 1分, 患者明显厌食, 表现主要包括拒绝饮食、饮食量少伴有明显饮食相关性烦躁; 2分, 患者少量进食, 表现患者在劝告下可进食但量少, 且存在明显的拒绝部分类型食物; 3分, 患者可一定量规范进食, 但与常规进食相比较量少; 4分, 患者可达到患病前进食状况水平. 睡眠状况评分标准: 1分, 患者表现为昏睡或失眠; 2分, 患者可入睡, 但梦多, 主诉醒后疲倦; 3分, 患者睡眠时间少于正常睡眠时间的2/3, 但醒后无不适感觉; 4分, 患者睡眠符合正常生活状况. 情绪状况评分: 1分, 患者明显烦躁、易怒, 或表现为沉默寡言神情痛苦; 2分, 患者痛苦面容, 但可少量谈话; 3分, 患者无明显痛苦面容, 可有一般生活活动, 例如读书、看报、看电视、听收音机等; 4分, 患者无痛苦面容, 可进行日常活动.

■相关报道
大量文献总结了多年来外科治疗方法研究的进展, 论证了内镜治疗技术在胰头癌治疗中的作用, 并且一部分文献作了两者的对比研究. 这些资料不仅总结了当前的治疗现状, 而且对于胰头癌临床治疗的研究方向产生了深远影响.

2 结果

16例患者进入治疗研究, 其中男9例, 女7例, 年龄55.2岁±11.9岁, 患者均存在较严重的黄疸体征, 其中2例伴有胆系感染. 术前诊断5例患者

图 1 ERCP造影典型胰头癌图. 胰管、胆道双导丝并造影显示胆总管中上段及肝内胆道扩张, 胰管颈后段扩张明显, 而胰头区胆胰管均因胰头肿瘤侵犯狭窄不显示.

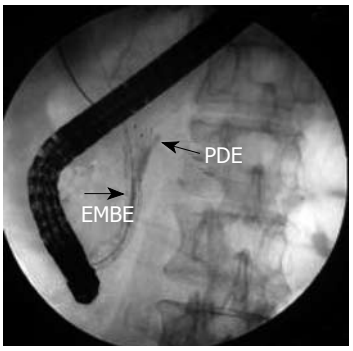


图 2 胰管支架引流(PDE)和胆道金属内支架引流(EMBE).

同时伴有腹膜后或肝门区淋巴结转移. 均采用ERCP(图1)检查胆胰系统, 并应用ERBD治疗, 治疗一次成功率93.8%(15/16), 1例治疗2次, 其中应用EST 16例, EPS 8例, 采用胆道金属支架引流12例, 胆道塑料支架引流4例, 胰管内支架6例(图2). 住院治疗期间死亡率为0, 住院期间无相关并发症发生. 治疗后1 wk时梗阻性黄疸缓解率100%.

治疗后随访观察显示精神状况明显好转75%(12/16), 精神状况略有改善3例, 无改善1例. 患者食欲出院时改善率56.3%(9/16), 随访时为43.8%(7/16)(表1). 睡眠改善37.5%(6/16).

患者死亡原因不明11例, 死亡前出现恶性贫血并多脏器功能衰竭4例, 无因梗阻性黄疸死亡病例. 治疗后的患者最短生存期为9 d, 最长生存期为134 d, 平均81.4 d±50.2 d. 随访结果表明治疗有意义的87.5%(14/16), 治疗效果满意的11例. 其中1例患者术后再度出现黄疸, 黄疸发生时间为术后49 d, 家属提示黄疸为突然快速出现, 考虑可能存在塑料支架移位或脱落的可能, 再次行内镜检查确认为支架脱落, 再次置放胆道支架引流, 梗阻性黄疸顺利解除.

3 讨论

胰腺癌是我国主要高发恶性肿瘤之一, 梗阻性黄疸是胰头癌的主要并发症, 也是直接威胁患者生命的主要因素, 因此有效地缓解梗阻性黄疸是无法完成肿瘤根治性手术时临床治疗最主要任务. 由于我国的特殊国情, 即医疗资源与实际的社会需求存在较大矛盾, 导致了全民保健和体检制度仍不完善, 从而使大量的患者就诊于肿瘤晚期, 多数患者因年龄过高或者伴有非手术指征而丧失外科治疗时机. 本次研究期间, 在我院内镜救治的晚期胰腺癌患者中, 伴有肝脏转移的比率为10.8%(16/147). 由此可见, 针对这种特殊群体患者的内镜治疗在日常临床工作中已经占有较大的比例, 所以开展其相关性临床研究是具有重要意义的.

表 1 饮食情况统计分析表 (*n*)

	厌食	少量进食	一般量	正常饮食
术前	12	3	1	0
出院	5	2	8	1
随访	8	4	4	0

晚期胰腺癌患者不能完成肿瘤根治性手术时的主要临床治疗策略包括外科手术肿瘤旷置胆道分流术、经皮经肝穿刺胆管引流术(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD)、内镜胆道引流术[6,7]. 目前, 随着对胰头癌患者生存状况的关注日益增加, 医学研究的深入和医疗技术的发展也不断地为胰头癌患者的治疗创造了更多方法, 例如超声内镜下的胆道十二指肠吻合术、放射性内支架的应用等[8,9]. 胰头癌的外科手术治疗难度较大, 文献报道单一的外科手术治疗效果较差, 多种方法的联合应用可以提高治疗效果[10-13]. 伴有肝脏转移的胰腺癌患者是胰腺癌患者中更加特殊的人群, 由于患者至少处于恶性肿瘤分类中的M1期, 根据恶性肿瘤患者的治疗规范一切外科治疗方法已经不建议实施, 因此在大多数医院采用的主要治疗方法是通过PTCD来缓解黄疸延长患者生命. 与PTCD相比较, ERBD治疗梗阻性黄疸具有明显的优势, 但是目前国内医院尚未能完全普及该治疗设备和技术. 其优点主要表现在以下几个方面[14,15]: (1)ERBD是一种微创治疗方法. ERBD是通过正常生理通道完成的, 即经十二指肠乳头逆行置放内支架实现生理性胆道的再通畅, 对患者机体没有损伤. (2)ERBD后患者与正常人生活完全一样, 可以有效地减少疾病以及治疗对患者造成的身心影响, 改善患者的精神状态. (3)ERBD是一种安全、方便的治疗方法. 治疗过程无严重并发症, 一般不需要麻醉, 因此

■创新盘点

本文在常规胰头癌内镜治疗的基础上, 进一步探讨了内镜技术在特殊胰头癌患者治疗方面的临床应用价值. 从而更深层次地论证了内镜技术在胰头癌治疗中独特的临床应用意义.

■同行评价
本研究评价了伴有肝脏转移的胰头癌患者内镜胆道内支架引流治疗的临床应用意义, 研究具有一定的新颖性.

是相对安全的检查和治疗方法. ERBD可以任何状况下快速实施, 不需要过多的术前准备和调整, 因此实施方便治疗迅速. 本次研究的结果显示治疗成功率100%, 住院期间死亡率和并发症发生率均为0, 治疗后期主要影响治疗效果的因素包括的肿瘤的生长阻塞支架或支架的移位、脱落, 但是这些影响因素完全可以通过再次治疗纠正. 随访资料表明患者治疗后的相关治疗问题多发生于胆道塑料支架引流病例, 说明金属胆道支架的治疗情况明显优于塑料支架, 但是临床选择支架类型还是要考虑经济效益比.

随访资料表明ERBD治疗伴有肝脏转移的胰头癌患者的临床效果满意率为68.7%(11/16), 认为治疗有意义87.5%(14/16). 这样的随访结果是令人满意的, 表明内镜胆道内支架治疗是有效的, 是能够为患者家属接受的. 患者家属主要反映的问题: (1)治疗后患者的生存期不理想; (2)患者的痛苦没有明显的缓解, 主要是食欲改善不佳, 并且患者逐渐走向衰弱. 食欲差是胰腺癌患者晚期最影响患者生存质量的因素, 也与患者生存期密切相关, 随访资料表明仅部分患者有了饮食上的轻微改善, 出院时改善率56.3%, 随访时为43.8%, 但是总体的改善状况仍然不能令人满意. 家属反映的问题提示我们在治疗前期与患者家属的沟通和交流仍存在不足, 如果进一步加强医患沟通, 应该可以增加满意率, 减少患者家属的不理解. 随访结果同时也证明ERBD治疗伴有肝转移的胰头癌患者临床效果并不能满足患者以及家属对于延长生存期的期望, 并不能真正彻底的改善患者的饮食状况.

总之, 伴有肝脏转移的胰头癌患者是更加复杂的胰腺癌治疗群体, ERBD是其重要的临床治疗方法之一, 具有安全有效、实施方便的特点. 在提高生存质量方面具有一定的作用, ERBD具有重要的临床应用意义.

4 参考文献

1 Hua YP, Liang LJ, Peng BG, Li SQ, Huang JF. Pancreatic head carcinoma: clinical analysis of 189 cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 79-84

2 Hwang SI, Kim HO, Son BH, Yoo CH, Kim H, Shin JH. Surgical palliation of unresectable pancreatic head cancer in elderly patients. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 978-982

3 任粉玉, 朴熙绪, 崔顺子. ERCP在梗阻性黄疸病因鉴别诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2955-2957

4 黄晓东, 范彦, 张姮, 刘文敏, 刘小明. 内镜下胆道支架置入术治疗恶性胆道梗阻122例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3234-3237

5 Prat F, Chapat O, Ducot B, Ponchon T, Pelletier G, Fritsch J, Choury AD, Buffet C. A randomized trial of endoscopic drainage methods for inoperable malignant strictures of the common bile duct. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 1-7

6 Smith AC, Dowsett JF, Russell RC, Hatfield AR, Cotton PB. Randomised trial of endoscopic stenting versus surgical bypass in malignant low bileduct obstruction. *Lancet* 1994; 344: 1655-1660

7 陈孝, 麻树人, 张子其. 892例胰腺癌的临床诊断与治疗分析. 中华胰腺病杂志 2008; 8: 3-5

8 Hanada K, Iiboshi T, Ishii Y. Endoscopic ultrasound-guided choledochoduodenostomy for palliative biliary drainage in cases with inoperable pancreas head carcinoma. *Dig Endosc* 2009; 21 Suppl 1: S75-S78

9 Liu Y, Lu Z, Zou DW, Jin ZD, Liu F, Li SD, Zhan XB, Zhang WJ, Wu RP, Yao YZ, Yang L, Li Z. Intraluminal implantation of radioactive stents for treatment of primary carcinomas of the peripancreatic-head region: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 1067-1073

10 Artifon EL, Sakai P, Cunha JE, Dupont A, Filho FM, Hondo FY, Ishioka S, Raju GS. Surgery or endoscopy for palliation of biliary obstruction due to metastatic pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2031-2037

11 Yamamoto M, Imagawa DK, Katz MH. Multidisciplinary management of resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 1611-1621

12 Cho YK, Shin JH, Oh SY. Significance of palliative gastrojejunostomy for unresectable pancreatic head carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 254-257

13 Sommerville CA, Limongelli P, Pai M, Ahmad R, Stamp G, Habib NA, Williamson RC, Jiao LR. Survival analysis after pancreatic resection for ampullary and pancreatic head carcinoma: an analysis of clinicopathological factors. *J Surg Oncol* 2009; 100: 651-656

14 麻树人, 张宁, 赵志峰, 张宁, 赵云峰, 高峰, 杨琳, 宫照洁. 胰头癌的内镜支架引流治疗. 中华消化内镜杂志 2009; 26: 20-22

15 Shepherd HA, Royle G, Ross AP, Diba A, Arthur M, Colin-Jones D. Endoscopic biliary endoprosthesis in the palliation of malignant obstruction of the distal common bile duct: a randomized trial. *Br J Surg* 1988; 75: 1166-1168

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1037-1040
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

衣霉素诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡

邢俊丽, 冯 若, 李海春, 王亚强, 许培仁, 张钦宪

邢俊丽, 王亚强, 许培仁, 河南大学淮河医院检验科 河南省开封市 475000
冯若, 张钦宪, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450052
李海春, 河南中医学院第一附属医院 河南省郑州市 450001
作者贡献分布: 此课题由张钦宪、冯若及邢俊丽设计; 研究过程由邢俊丽、李海春及许培仁操作完成; 数据分析由邢俊丽与王亚强完成; 本论文写作由邢俊丽完成.
通讯作者: 邢俊丽, 475000, 河南省开封市, 河南大学淮河医院检验科. xingjunli1982@126.com
电话: 0378-3906398
收稿日期: 2009-10-10 修回日期: 2010-01-09
接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-04-08

Tunicamycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823

Jun-Li Xing, Ruo Feng, Hai-Chun Li, Ya-Qiang Wang, Pei-Ren Xu, Qin-Xian Zhang

Jun-Li Xing, Ya-Qiang Wang, Pei-Ren Xu, Department of Clinical Laboratory, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China
Ruo Feng, Qin-Xian Zhang, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Hai-Chun Li, Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450001, Henan Province, China
Correspondence to: Jun-Li Xing, Department of Clinical Laboratory, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China. xingjunli1982@126.com
Received: 2009-10-10 Revised: 2010-01-09
Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate whether tunicamycin (TM) induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823.

METHODS: BGC-823 cells were treated with 10 mg/L of TM for 0, 24, 36 and 48 h. After treatment, apoptosis was evaluated by using annexin V-propidium iodide staining, and the expression of C/EBP-homologous protein (CHOP) mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: The apoptotic rates of BGC-823 cells treated with TM for 0, 24, 36 and 48 h were 0%, 11.8%, 16.3% and 20.4%, respectively, showing a time-dependent increase ($P < 0.01$). RT-PCR and Western blot results showed that the expression levels of CHOP mRNA and protein were significantly higher in cells treated with TM than in untreated cells. The expression levels of CHOP mRNA and protein increased with the prolongation of treatment duration (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: TM may induce endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823.

Key Words: BGC-823 cell; Tunicamycin; Apoptosis; Endoplasmic reticulum stress; C/EBP-homologous protein

Xing JL, Feng R, Li HC, Wang YQ, Xu PR, Zhang QX. Tunicamycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1037-1040

摘要

目的: 观察衣霉素(tunicamycin, TM)诱导胃癌BGC-823细胞发生内质网应激介导的细胞凋亡.

方法: 以浓度为10 mg/L的TM分别处理胃癌BGC-823细胞0、24、36和48 h, Annexin V-PI染色法检测细胞凋亡, 应用RT-PCR、Western blot检测CHOP的表达水平.

结果: PI染色法检测凋亡细胞且随时间增加凋亡细胞增多, 细胞凋亡率分别为0.0%、11.8%、16.3%、20.4%, 具有时间依赖性($P<0.01$). RT-PCR及Western blot结果显示, CHOP的表达明显高于对照组, 随着处理时间的增加表达量呈上调趋势, 差异均有统计学意义($P<0.01$).

结论: TM可诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡.

关键词: BGC-823细胞; 衣霉素; 凋亡; 内质网应激; C/EBP同源蛋白

邢俊丽, 冯若, 李海春, 王亚强, 许培仁, 张钦宪. 衣霉素诱导胃

■背景资料
衣霉素(TM)是一种天然的核苷抗生素, 也是*N*-糖链抑制剂, 可通过抑制蛋白糖基化途径中十四糖二磷酸长萜醇的生成, 使糖链加工受阻, 形成脱糖蛋白, 阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰, 介导细胞凋亡. 国内外研究证明了TM在神经系统、胰腺细胞等中可以通过ERS介导细胞凋亡, 但尚未有胃癌细胞中ERS介导细胞凋亡的报道. 本实验就TM能否诱导胃癌BGC-823细胞ERS介导的细胞凋亡进行了研究.

■同行评议者
王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

■相关报道
Okamoto等通过对CHOP野生型小鼠和CHOP缺陷型小鼠灌喂乙醇的实验发现, CHOP野生型小鼠的肝细胞发生了凋亡, 一些与凋亡相关基因也出现了变化, 如: Gadd45与组织蛋白酶B的上调和Jun D与Bcl-xL的下调, 而这些在CHOP缺陷型小鼠中并未观察到, 进一步说明了CHOP基因在ERS诱导细胞凋亡中的重要作用, 但其分子机制尚不清楚.

癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1037-1040
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1037.asp

0 引言

衣霉素(tunicamycin, TM)是一种天然的核苷抗生素, 也是*N*-糖链抑制剂, 可通过抑制蛋白糖基化途径中十四糖二磷酸长萜醇的生成, 使糖链加工受阻, 形成脱糖蛋白, 阻碍内质网内新生蛋白质糖基化修饰, 介导细胞凋亡, 内质网中钙离子紊乱和未折叠蛋白质蓄积可引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS), 引起具有保护作用的未折叠蛋白反应发生[1]. ERS直接影响应激细胞的转归, 如: 修复、损伤或凋亡. 正常情况下, 凋亡促进因子CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白即C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)表达量极低, 但是在ERS的情况下, 其表达量则显著增加, 所以CHOP是判断ERS的一个金标准[2]. 国内外研究证明了TM在神经系统、胰腺细胞等中可以通过ERS介导细胞凋亡[3], 但尚未有胃癌细胞中ERS介导细胞凋亡的报道. 本实验就TM能否诱导胃癌BGC-823细胞ERS介导的细胞凋亡进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 TM, 购于美国Sigma公司, 使用时用无水乙醇配制, 再用培养液配成10 mg/L浓度备用; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒, 购于美国BIPEC; CHOP一抗和HRP标记的二抗购于Santa Cruz公司; CHOP引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 胃癌BGC-823细胞培养及分组: BGC-823细胞(本教研室保存)培养于100 mL/L灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中, 在37 ℃、50 mL/L CO_2条件下贴壁生长. 取对数期细胞, 分为实验组和对照组. 实验组细胞用10 mg/L的TM分别处理24、36及48 h, 对照组补充等体积的培养液. 分别于相应的时间, 离心收集细胞.

1.2.2 Annexin V-PI染色法检测胃癌的细胞凋亡: 相应时间处理并设立阴性对照组; 对贴壁细胞进行胰酶消化, 1 000 r/min, 离心5 min, 收集脱壁细胞于EP管里; 然后用PBS洗涤细胞2次, 2 000 r/min, 离心5 min并收集(1-5)×10^5细胞; 加入400 μL的Binding Buffer悬浮细胞; 然后加入5 μL Annexin V-FITC混匀后, 再加入5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温、避光反应5-15 min; 于1 h内, 进行荧光显微镜的观察、照相(Annexin V-FITC荧光信号呈绿色, PI荧光信号呈红色). 高倍镜随机取5个视野(每个视野不少于50个细胞, 绿色荧光细胞为凋亡细胞), 凋亡率 = 5个视野凋亡细胞数的总和/5个视野细胞总数×100%.

1.2.3 RT-PCR方法检测TM诱导前后胃癌BGC823细胞CHOP表达水平的变化: 提取总的RNA, 参照GenBank中CHOP序列引物设计, 序列如下, 上游: 5'-AGGTCCTGTCTTCAGATGAA-3', 下游: 5'-GTCAATCAGAGCTCGGCGAGTC-3', 扩增产物长度为404 bp. 以β-actin为内参照, 引物序列为: 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3; 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'. PCR扩增反应条件为: 94 ℃预变性3 min, 共30个循环: 94 ℃变性30 s, 54.8℃退火30 s, 72 ℃延伸60 s, 最后72 ℃总延伸5 min, 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.2.4 Western blot法检测胃癌细胞中CHOP蛋白的表达: 低温离心收集蛋白, SDS-PAGE电泳、转膜等步骤参照文献[4]进行, 检测按北京中山金桥生物技术有限公司的ECL发光试剂说明书进行.

统计学处理 实验数据采用SPSS13.0统计软件进行统计处理.

2 结果

2.1 Annexin V-PI染色检测胃癌细胞凋亡 对照组和实验组的细胞凋亡率分别是0.0%、11.8%、16.3%、20.4%, 结果显示对照组凋亡率明显低于实验组(图1), 随着处理时间增加实验组凋亡率逐渐增加, 差异具有统计学意义(P<0.01).

2.2 CHOP mRNA在胃癌BGC823细胞中的表达 RT-PCR法扩增出CHOP基因片段约404 bp, 对照组未见相应的条带(图2). 用SPSS13.0统计软件分别对对照组和实验组的条带进行灰度扫描, CHOP/β-actin灰度比值结果分别是0、0.32±0.04、0.51±0.03、0.63±0.03, 方差分析结果显示不同TM作用时间存在显著性差异(P<0.05), 有统计学意义.

2.3 胃癌细胞CHOP蛋白的表达 Western blot结果显示, 对照组细胞中出现相对分子质量约2.7 kDa的条带, 对照组未出现(图3). 用SPSS13.0统计软件分别对对照组和实验组的条带进行灰度扫描, CHOP/β-actin灰度比值结果分别是0、0.32±0.02、0.59±0.04、0.68±0.03, 方差分析结果

■创新盘点
本研究首次将TM应用于胃癌, 并观察其在胃癌细胞凋亡中的作用.

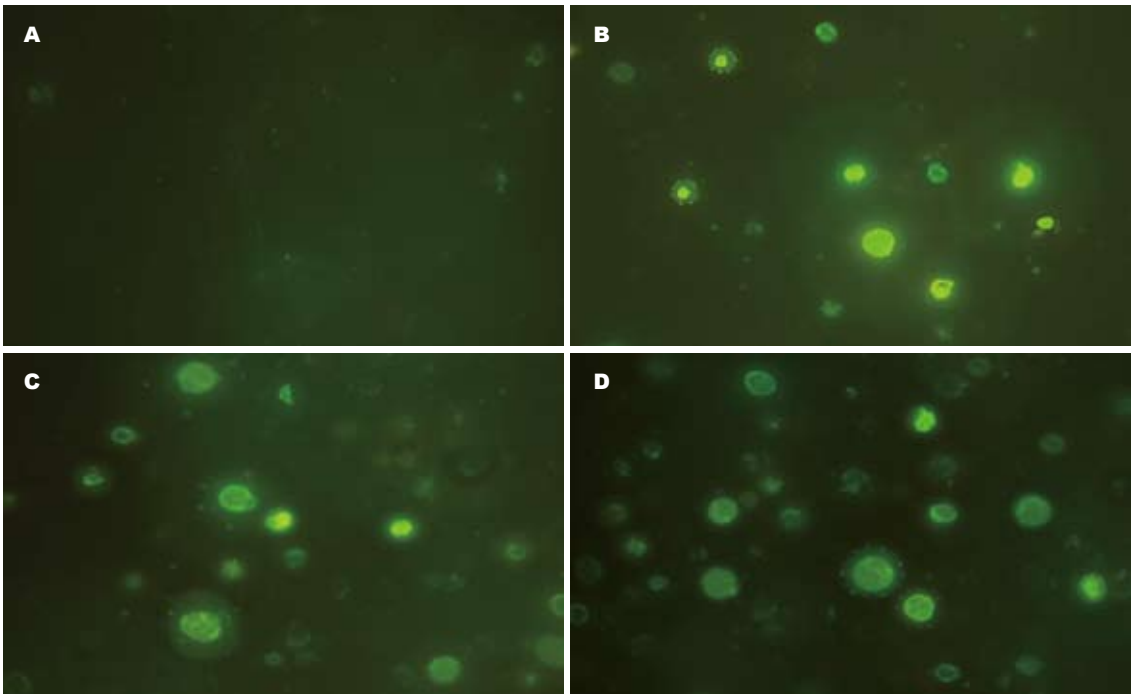


图 1 Annexin V-PI染色检测胃癌细胞凋亡. A: 0 h; B: 24 h; C: 36 h; D: 48 h.

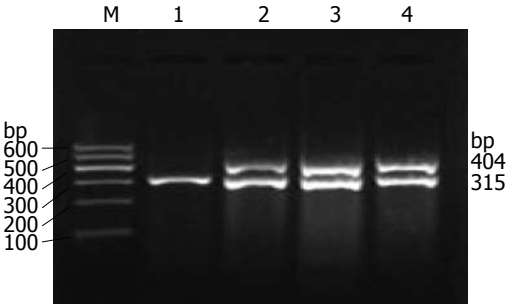


图 2 RT-PCR法检测胃癌细胞CHOP的表达. M: DNA Marker; 1: 对照组; 2: 24 h; 3: 36 h; 4: 48 h.

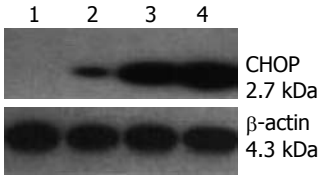


图 3 Western blot法检测胃癌细胞中CHOP蛋白的表达. 1: 对照组; 2: 24 h; 3: 36 h; 4: 48 h.

显示不同TM作用时间存在显著性差异(P<0.05), 有统计学意义.

3 讨论

ERS是细胞的一种应激反应过程, 糖饥饿、钙平衡紊乱、糖基化抑制或二硫键合成减少等情况下, 内质网的微环境发生改变, 蛋白质的折叠受到影响, 导致大量未折叠或错误折叠的蛋白质堆积于内质网内, 从而引起一系列以分子伴侣和折叠酶表达上调为标志的应答反应, 也称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR). CHOP/GADD153(growth arrest and DNA-damage-inducible gene 153或生长停滞和DNA损伤可诱导基因)是内质网应激特异的转录因子[5], 属C/EBP转录因子家族成员, 在非应激状态下, 他的表达水平很低, 而当发生ERS时, 其表达量大大增加. 凋亡促进因子CHOP是ERS时表达增多的一种伴侣分子, 被看做是ERS发生的标志, 在ERS中起着非常重要的作用. CHOP促进细胞凋亡, 因此通过药物干预后研究他们的表达情况可以进一步了解药物对ERS的作用[6]. Okamoto等[7]通过对CHOP野生型小鼠和CHOP缺陷型小鼠灌喂乙醇的实验发现, CHOP野生型小鼠的肝细胞发生了凋亡, 一些与凋亡相关基因也出现了变化, 如: Gadd45与组织蛋白酶B的上调和Jun D与Bcl-xL的下调, 而这些在CHOP缺陷型小鼠中并未观察到, 进一步说明了CHOP基因在ERS诱导细胞凋亡中的重要作用, 但其分子机制尚不清楚.

本实验结果发现CHOP参与细胞凋亡, 以浓度为10 mg/L的TM处理胃癌细胞, Annexin V-PI染色法检测结果显示细胞出现凋亡, 且随着作用时间的增加凋亡细胞增多, 呈明显的时间依赖性, 与Okamoto等[8]和Pérez-Sala等[9]报道相似. 在本研究中, TM处理24 h后, 部分胃癌细胞变圆形或椭圆形, 继而脱壁, 提示细胞黏附性丧失, 细胞发生凋亡. 实验中除了对照组无凋亡外, 对照组随着处理时间增加, 细胞凋亡率呈增加趋

■同行评价
本文有一定参考价值, 内容较新, 提供了较可靠的信息, 但研究方法一般.

势. 随后用TM处理不同时间收集细胞, 应用RT-PCR与Western blot技术检测CHOP的表达结果显示, TM处理组出现ERS标志物CHOP的mRNA和蛋白的表达. 综合实验结果可以推断TM可以诱导胃癌细胞ERS介导的细胞凋亡.

本研究首次将TM应用于胃癌, 并观察其在胃癌细胞凋亡中的作用. 结果显示, TM诱导胃癌细胞ERS介导的细胞凋亡, 这初步解释了TM与ERS介导的细胞凋亡之间的密切关系, 为胃癌的临床防治提供了一条新的途径.

4 参考文献

1 战丽彬, 钟军华, 路小光, 隋华, 韦巍. 滋补脾阴方药含药血清对内质网应激神经元损伤的保护作用及机制研究. 中西医结合学报 2007; 5: 445-450
2 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展. 中国生物化学与分子生物学报 2004; 20: 283-288
3 孙抒, 孙百研, 智慧兰, 许向范, 孙东植. 胃癌及其癌前病变中细胞凋亡及其调控基因的表达. 中国病理生理杂志 2002; 18: 395-397
4 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 226-234
5 Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000; 5: 897-904
6 Ma YJ, Hendershot LM. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 13792-13799
7 Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-389
8 Okamoto T, Tsuburaya A, Yanoma S, Yoshikawa T, Cho H, Takanashi Y, Noguchi Y. Inhibition of peritoneal metastasis in an animal gastric cancer model by interferon-gamma and interleukin-2. *Anticancer Res* 2003; 23: 149-153
9 Pérez-Sala D, Mollinedo F. Inhibition of N-linked glycosylation induces early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J Cell Physiol* 1995; 163: 523-531

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, t = 4.56 *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1041-1045
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

HBV复制子pHY106-BHBV转染HepG2细胞基因表达差异

赵凤林, 崔长青, 张锦前, 魏红山

赵凤林, 崔长青, 北京市和平里医院外一科 北京市 100013
张锦前, 魏红山, 北京地坛医院 北京市 100015
作者贡献分布: 此课题由赵凤林、崔长青、张锦前及魏红山共同设计; 研究过程由赵凤林、崔长青、张锦前及魏红山共同操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵凤林、崔长青、张锦前及魏红山共同提供; 数据分析由赵凤林、崔长青、张锦前及魏红山共同完成; 本论文写作由赵凤林、崔长青、张锦前及魏红山共同完成.
通讯作者: 赵凤林, 副主任医师, 100013, 北京市和平里北街18号, 北京市和平里医院外一科. mrzhaofenglin@sina.com
电话: 010-58043221
收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-01-18
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-04-08

Differential gene expression profiling of HepG2 cells transfected with a hepatitis B virus replicon

Feng-Lin Zhao, Chang-Qing Cui, Jing-Qian Zhang, Hong-Shan Wei

Feng-Lin Zhao, Chang-Qing Cui, Department of Surgery, Beijing Hepingli Hospital, Beijing 100013, China
Jing-Qian Zhang, Hong-Shan Wei, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China
Correspondence to: Feng-Lin Zhao, Department of Surgery, Beijing Hepingli Hospital, Beijing 100013, China. mrzhaofenglin@sina.com
Received: 2009-12-11 Revised: 2010-01-18
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the changes in gene expression profile of HepG2 cells transfected with HBV replicon pHY106-BHBV by cDNA microarray, and to identify differential genes involved in cholesterol metabolism.

METHODS: A cDNA microarray (Affymetrix) that contains 20 000 gene sequences was used to examine gene expression between HepG2 cells transfected with HBV replicon pHY106-BHBV and control plasmid. Differentially expressed genes that may contribute to cholesterol metabolism were subjected to real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis.

RESULTS: The differentially expressed genes identified mostly encode transcription factors, cytokines, and molecules that are involved in signal transduction, glucose metabolism and lipid metabolism. Real-time RT-PCR results indicated that cholesterol metabolism-related genes 7-dehydrocholesterol reductase (dhcr7) and NADH-cytochrome b5 reductase (cyb5r) were down-regulated in HepG2 cells transfected with HBV replicon pHY106-BHBV.

CONCLUSION: Differential gene expression profile is detected between HepG2 cells transfected with HBV replicon pHY106-BHBV and control plasmid. The expression of cholesterol metabolism-related genes dhcr7 and cyb5r may be suppressed by HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus; HepG2 cell; Replicon; Cholesterol metabolism

Zhao FL, Cui CQ, Zhang JQ, Wei HS. Differential gene expression profiling of HepG2 cells transfected with a hepatitis B virus replicon. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1041-1045

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒复制子pHY106-BHBV转染肝癌细胞系基因表达谱的差异, 分析参与胆固醇代谢的差异表达基因.

方法: 应用包含20 000条人类全长基因的寡聚核苷酸芯片ImaGene3.0检测乙型肝炎病毒复制子pHY106-BHBV转染肝癌细胞系基因表达谱差异, 并选择其中参与胆固醇代谢的表达下调基因7-脱氢胆固醇还原酶和NADH-细胞色素b5还原酶, 用RT-PCR方法进行验证分析.

结果: 基因芯片筛选出差异表达的基因, 其中包括转录因子、细胞周期素、细胞因子相关蛋白、糖脂类物质代谢相关酶及细胞信号转导相关因子等, RT-PCR验证参与胆固醇代谢的几种表达差异的基因, 其中7-脱氢胆固醇还原酶和NADH-细胞色素b5还原酶表达明显下调, 与基因芯片分析结果一致.

■背景资料
肝炎病毒慢性持续感染除了引起肝脏损害外, 还与一些肝外组织的损害密切相关. 近年来, 研究资料显示慢性HBV感染与糖尿病和脂肪肝等代谢性疾病的发病密切相关. 肝脏是脂类物质代谢的重要器官, 其病变常影响脂质代谢的正常进行, 大量研究表明肝病患者常伴有脂类物质代谢异常.

■同行评议者
曹洁, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■研发前沿
肝炎病毒慢性持续感染导致糖尿病和脂肪肝等代谢性疾病已是不争的事实, 国内外大量研究文献可供参考, 该领域也是目前慢性肝炎病毒感染研究的研究的热点, 而相关机制的研究则鲜见报道且并不明确, 均亟待研究.

结论: 乙型肝炎病毒复制子pHY106-BHBV转染肝癌细胞系存在基因表达差异, 乙型肝炎病毒感染可能通过抑制参与胆固醇代谢的7-脱氢胆固醇还原酶和NADH-细胞色素b5还原酶从而进一步影响机体胆固醇代谢.

关键词: 乙型肝炎病毒; HepG2细胞; 复制子; 胆固醇代谢

赵凤林, 崔长青, 张锦前, 魏红山. HBV复制子pHY106-BHBV转染HepG2细胞基因表达差异. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1041-1045
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1041.asp

0 引言

肝炎病毒慢性持续感染除了引起肝脏损害外, 还与一些肝外组织的损害密切相关[1]. 近年来, 研究资料显示慢性HBV感染与糖尿病和脂肪肝等代谢性疾病的发病密切相关. 肝脏是脂类物质代谢的重要器官[2], 其病变常影响脂质代谢的正常进行, 大量研究表明肝病患者常伴有脂类物质代谢异常[1]. 此前未见HBV影响胆固醇代谢的相关报道, 因此本研究选用较常用的肝癌细胞系HepG2为实验对象, 应用HBV复制子pHY106-BHBV转染模拟HBV的感染过程, 并进行基因表达谱芯片分析后筛选其中的胆固醇代谢相关基因, 进行相关实验验证. 以期进一步深入研究HBV感染影响机体胆固醇代谢以及导致肝细胞膜结构的稳定性下降、胆固醇合成异常及能量代谢异常的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 pHY106空载体由本所保存, HBV复制子pHY106-BHBV由本所构建(该质粒为B型HBV的全长基因组DNA与pHY106连接组成), 人肝癌母细胞瘤细胞系HepG2为本所保存, 细胞培养相关试剂DMEM, 转染试剂Lipofectamine 2000, 总RNA提取试剂TRIzol, 购自Invitrogen公司, Oligotex mRNA Midi Kit购自Qiagen公司, 基因芯片检测由上海联合基因有限公司完成, 7-脱氢胆固醇还原酶(7-dehydrocholesterol reductase, 7DCR)、NADH-细胞色素b5还原酶(NADH-cytochrome b5 reductase, NADH-CYB5R)及磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)Realtime PCR引物由北京奥科生物公司合成, SYBR Green多聚酶链反应试剂购自TaKaRa公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞转染: 取6孔培养板, 向每孔中加入2 mL含(1-2)×10^5个细胞, 37 ℃ 50 mL/L CO_2培养至50%-70%汇合时, 用2 mL不含血清培养液漂洗两次, 再加入1 mL不含血清培养液. 在聚苯乙烯管中制备以下两液(为转染每一个孔细胞所用的量)A液: 用不含血清培养基稀释3-5 μg DNA, 终量250 μL; B液: 用不含血清培养基稀释10 μL Lipofectamine 2000, 终量250 μL, 轻轻混合A、B液, 室温中置20 min, 把A/B复合物缓缓加入培养液中, 摇匀, 37 ℃温箱置4-6 h, 吸除无血清转染液, 换入正常培养液继续培养.

1.2.2 总RNA提取及mRNA纯化: 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时分别将pHY106(对照组)及HBV复制子pHY106-BHBV(实验组)转染细胞48 h后收获细胞. 使用TRIzol试剂一步法分别提取细胞总RNA, 样品经分光光度计检测吸光度*A*值, 并行热稳定实验, 于-20 ℃和70 ℃保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化. 以Qiagen公司Oligotex mRNA Midi Kit纯化得mRNA, 并行电泳检测.

1.2.3 探针标记和芯片制备: 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记转染pHY106对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记转染HBV复制子pHY106-BHBV实验组细胞mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在20 μL 5×SSC+2 g/L SDS杂交液中. 芯片包含的20 000个cDNA由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 探针标记和芯片制备由上海联合基因有限公司完成.

1.2.4 杂交及洗涤: 将基因芯片和杂交探针在95 ℃水浴变性5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于60 ℃杂交15-17 h. 后用SSC及SDS混合液洗涤10 min, 室温晾干. 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片. 预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值.

1.2.5 实时荧光定量多聚酶链反应: 实时荧光定量多聚酶链反应(QRT-PCR)由北京奥科生物公司合成7DCR、NADH-CYB5R及内参照物GAPDH基因的RT-PCR引物(表1), 将RNA反转录为cDNA, 随后将其与SYBR Green多聚酶链

表 1 Real-time PCR引物列表

扩增基因	上游引物	下游引物
7-脱氢胆固醇还原酶	5'-GCCAACATCCTTGGCTATG-3'	5'-GGGGAAGAAGTAGCCCTTGA-3'
NADH-细胞色素b5还原酶	5'-CTTGGTCTGCCATCCTGAAC-3'	5'-GGTCGCTGAGCACTCACA-3'
GAPDH	5'-CCTGTTCGACAGTCAGCCG-3'	5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3'

表 2 RT反应液配置

试剂	使用量
SYBR Premix Ex Taq	10 μL
PCR Forword primer(10 μm)	0.4 μL
PCR reverse primer(10 μm)	0.4 μL
模板(cDNA)	1 μL
ddH_2O	加至 20 μL

表 3 pHY106-BHBV复制子转染HepG2细胞基因芯片结果中与代谢相关的表达上调基因

序号	GenBank_ID	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_004525	低密度脂蛋白相关蛋白2	2.075
2	NM_018947	细胞色素c	2.007
3	NM_014912	胞质多聚腺苷化组件结合蛋白3	2.201
4	D86550	丝苏氨酸蛋白激酶	2.224

反应试剂及引物加入八联管中(反应体系见表2), 短暂离心后用ABI 7500以两步法PCR扩增, 其标准程序反应条件如下: 步骤1: 预变性: 95 ℃ 10 s, 20 ℃/s 1个循环. 步骤2: PCR反应: 95 ℃ 5 s, 20 ℃/s, 60 ℃ 20 s, 20 ℃/s, 40循环. 步骤3: 融解曲线分析: 95℃ 0 s, 20 ℃/s, 65 ℃ 15 s, 20 ℃/s, 95 ℃ 0 s, 0.1 ℃/s.

2 结果

2.1 基因芯片的筛选 以Signal Log Ratio值定为±2标准, 用高通量基因表达谱芯片筛选. 基因芯片的阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱. 实验组(HBV复制子pHY106-BHBV转染细胞)与对照组(pHY106转染细胞)比较: 筛选出差异表达基因共182条(上调基因36条, 下调基因146条), 其中与代谢相关基因的差异表达基因10条(上调基因4条, 下调基因6条)(表3, 4).

2.2 Real-time PCR验证 为进一步研究基因芯片的发现, 经基因数据库的检索发现7DCR、NADH-CYB5R基因可能与胆固醇代谢密切相关, 应用RT-PCR的方法检测基因表达水平, 分别得到其基因扩增曲线. 7DCR Realtime Ration值为0.59, NADH-CYB5R Realtime Ration值为0.18(图1). 结果提示HBV复制子转染HepG2细胞后使其7DCR和NADH-CYB5R基因表达下调.

表 4 pHY106-BHBV复制子转染HepG2细胞基因芯片结果中与代谢相关的表达下调基因

序号	GenBank_ID	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_012218	磷酸甲羟戊酸激酶	0.411
2	NM_000292	磷酸化酶激酶α2	0.444
3	U53347	中性氨基酸转运蛋白B	0.471
4	Y11312	磷酸肌醇3激酶	0.344
5	BC000054	7-脱氢胆固醇还原酶	0.376
6	NM_007326	NADH-细胞色素b5还原酶	0.490

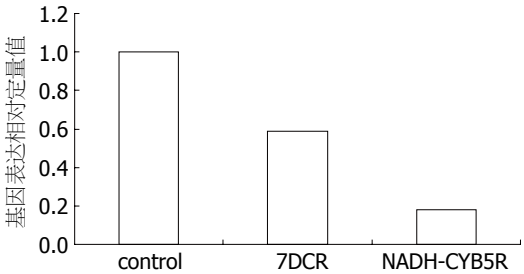


图 1 HBV复制子转染HepG2细胞胆固醇代谢相关酶类表达变化. control: HepG2细胞; 7DCR: 7-脱氢胆固醇还原酶; NADH-CYB5R: NADH-细胞色素b5还原酶.

3 讨论

肝脏是胆固醇的主要合成场所, 占合成总量的70%-80%. 胆固醇合成酶系存在于胞液及光面内质网膜上, 胆固醇的合成主要在肝细胞细胞质及内质网中进行[3], 胆固醇是细胞膜的重要组成部分. HBV慢性持续感染引起慢性肝炎主要导致肝脏持续性病变, 引起肝细胞变性坏死, 导致肝功能的损害, 同时还可引起机体脂类物质代谢异常.

本研究利用基因表达谱芯片技术筛选出大量差异表达的基因, 其中包括转录因子、细胞

■相关报道

近年来, 国内外大量的研究报道提示HBV慢性感染与糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病密切相关, 尤其是糖代谢异常比例明显高于普通人群.

■应用要点
本研究证实7-脱氢胆固醇还原酶和NADH-细胞色素b5还原酶二者在HBV感染过程中存在表达下调，这可能与HBV感染所致的肝细胞膜结构稳定性下降及脂质代谢异常相关，而这种影响的可能性仍需进一步研究确定其相关机制也有待深入研究.

周期素、细胞因子相关蛋白、物质代谢相关酶类及细胞信号转导相关因子等，说明HBV感染可能影响细胞增殖、基因表达、信号转导及物质代谢等多个方面，HBV的慢性持续感染可能改变了细胞的代谢模式，从而影响器官的功能. 因此，为研究HBV感染发病机制的环节中是否与胆固醇代谢相关，所以从所筛选出的差异表达基因中选择参与胆固醇代谢的基因用RT-PCR的方法验证，发现7-脱氢胆固醇还原酶和NADH-细胞色素b5还原酶存在表达下调.

NADH-细胞色素b5还原酶(NADH-cytochrome b5 reductase, NADH-b5R)是一种广泛分布于人体各组织细胞、具有重要生理功能的氧化还原酶类，包括体细胞中的膜结合形式(结合与内质网、线粒体和其他内膜)和胚胎细胞中的游离形式. 膜结合形式主要存在于内质网的胞质侧其功能主要是脂肪酸的去饱和化和链延伸，胆固醇的生物合成以及P450介导的药物代谢. 胚胎形式存在于循环细胞的可溶片段，参与高铁血红蛋白的降解，主要是使红细胞内的高铁血红蛋白还原为有携氧能力的亚铁血红蛋白. 膜结合形式既有膜结合又有催化结构域，而可溶性形式只有催化形式. 这两种形式来源于基因的不同剪切体. 我们的实验证实该基因在HBV复制子转染的肝癌细胞中下调，可能与HBV感染患者存在的脂质代谢异常及细胞膜结构的稳定性下降相关. 此前该基因的相关研究[4-7]多集中在其基因突变后会导致遗传性高铁血红蛋白血症，而HBV感染过程中该基因表达下调的意义还需深入研究.

7-脱氢胆固醇还原酶(7-dehydrocholesterol reductase, 7DCR)参与多种细胞中胆固醇生成过程的最终步骤[8]. 具体地说，7DCR将7-脱氢胆固醇转换成胆固醇. 胆固醇既可自身制造也可从食物中获取，在生长发育及物质代谢方面其功能重要. 胆固醇与信号蛋白的相互作用和控制在大脑、四肢、生殖道和其他结构的发育中起着非常重要的作用；其同时也是细胞膜、髓磷脂的结构成分；另外，胆固醇也是合成某些激素的原料并在胆汁酸的生成中起重要作用. 本研究中基因芯片及RT-PCR的实验结果发现并证实该基因也在HBV感染过程中存在表达下调，这可能导致胞膜结构稳定性下降、类固醇激素降低，但临床上此类激素并不降低且多数升高说明还有其他因素参与激素的代谢，然而大部分文献[8-11]报道该基因突变可导致Smith-Lemli-Opitz综合征的一种隐形遗传病，关于在HBV感染过程中该基因表达下调的意义仍有待进一步研究.

总之，HBV感染可能对细胞增殖、基因表达、信号转导、糖脂类物质代谢[12-14]等诸多方面存在不同程度的影响. RT-PCR和基因芯片技术都证实7DCR和NADH-b5R二者在HBV感染过程中存在表达下调，这可能与HBV感染所致的肝细胞膜结构稳定性下降及脂质代谢异常相关，而这种影响的可能性仍需进一步研究确定其相关机制也有待深入研究. 这可能对HBV感染所致相关疾病的发病机制和治疗方案提供新的研究思路、方法及方案.

4 参考文献

1 Mohammad Alizadeh AH, Fallahian F, Alavian SM, Ranjbar M, Hedayati M, Rahimi F, Khedmat H, Etemadi A, Zali MR, Azizi F. Insulin resistance in chronic hepatitis B and C. *Indian J Gastroenterol* 2006; 25: 286-289

2 Custro N, Carroccio A, Ganci A, Scafidi V, Campagna P, Di Prima L, Montalto G. Glycemic homeostasis in chronic viral hepatitis and liver cirrhosis. *Diabetes Metab* 2001; 27: 476-481

3 周爱儒. 生物化学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 128-131

4 Fermo E, Bianchi P, Vercellati C, Marcello AP, Garatti M, Marangoni O, Barcellini W, Zanella A. Recessive hereditary methemoglobinemia: two novel mutations in the NADH-cytochrome b5 reductase gene. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41: 50-55

5 Maran J, Guan Y, Ou CN, Prchal JT. Heterogeneity of the molecular biology of methemoglobinemia: a study of eight consecutive patients. *Haematologica* 2005; 90: 687-689

6 Percy MJ, Oren H, Savage G, Irken G. Congenital methaemoglobinaemia Type I in a Turkish infant due to a novel mutation, Pro144Ser, in NADH-cytochrome b5 reductase. *Hematol J* 2004; 5: 367-370

7 Lukyanenko LM, Kozlova NM, Slobozhanina EI. Activity of membrane-bound NADH-methemoglobin reductase and physical state of lipids in erythrocyte membranes. *Bioelectrochemistry* 2004; 62: 191-193

8 Jezela-Stanek A, Ciara E, Malunowicz EM, Korniszewski L, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, Krajewska-Walasek M. Mild Smith-Lemli-Opitz syndrome: further delineation of 5 Polish cases and review of the literature. *Eur J Med Genet* 2008; 51: 124-140

9 Waye JS, Eng B, Potter MA, Nowaczyk MJ, McFadden D, Langlois S. De novo mutation of the DHCR7 gene in a fetus with severe Smith-Lemli-Opitz (or RSH) syndrome. *Am J Med Genet A* 2007; 143A: 1799-1801

10 Waye JS, Eng B, Nowaczyk MJ. Prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS) by DHCR7 mutation analysis. *Prenat Diagn* 2007; 27: 638-640

11 Witsch-Baumgartner M, Clayton P, Clusellas N, Haas D, Kelley RI, Krajewska-Walasek M, Lechner

S, Rossi M, Zschocke J, Utermann G. Identification of 14 novel mutations in DHCR7 causing the Smith-Lemli-Opitz syndrome and delineation of the DHCR7 mutational spectra in Spain and Italy. *Hum Mutat* 2005; 25: 412
12 柴艳云, 张锦前, 赵龙凤, 王琪, 成军. HBV pre-X转染HepG2细胞后差异表达基因的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3724-3728
13 张晨宇, 张锦前, 王克霞, 成军. 慢性肝炎病毒感染导致糖代谢异常的分子机制. 现代预防医学 2008; 35: 3028-3030
14 张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 王晓春, 张晨宇, 杨涤, 成军. 酵母双杂交技术对人胰腺cDNA文库中HBcAg结合蛋白基因的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1746-1750

■同行评价
本研究设计尚可, 结果可靠, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即Ar(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、－及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 ℃±1.2 ℃, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^{9}/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B_{12}用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外*uv*, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用*g*; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1071-1073
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

急性肠系膜动脉性缺血26例

顾全凯, 王 军, 张宝良, 袁庆鑫

顾全凯, 王军, 张宝良, 袁庆鑫, 河北医科大学附属唐山工人医院普外科 河北省唐山市 063000
作者贡献分布: 顾全凯、王军、张宝良及袁庆鑫对此文所作贡献均等; 此课题由顾全凯、王军、张宝良及袁庆鑫设计; 研究过程由顾全凯、王军、张宝良及袁庆鑫完成; 数据分析由顾全凯、王军、张宝良完成; 本论文写作由顾全凯完成.
通讯作者: 袁庆鑫, 主任医师, 063000, 河北省唐山市, 河北医科大学附属唐山工人医院普外科. jscn005@gmail.com
电话: 0315-3722469
收稿日期: 2009-12-16 修回日期: 2010-01-26
接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-04-08

Diagnosis and treatment of acute mesenteric artery ischemia: an analysis of 26 cases

Quan-Kai Gu, Jun Wang, Bao-Liang Zhang, Qing-Xin Yuan

Quan-Kai Gu, Bao-Liang Zhang, Jun Wang, Qing-Xin Yuan, Department of General Surgery, Tangshan Workers' Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Correspondence to: Qing-Xin Yuan, Department of General Surgery, Tangshan Workers' Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. jscn005@gmail.com
Received: 2009-12-16 Revised: 2010-01-26
Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To evaluate the diagnosis and treatment of acute mesenteric artery ischemia.

METHODS: A total of 26 patients with acute mesenteric artery ischemia were included in the study. The clinical features, diagnosis, treatment and prognosis of these patients were retrospectively analyzed.

RESULTS: Definite diagnosis was preoperatively established in 11 patients, of which 6 were diagnosed by color Doppler ultrasonography, 9 by spiral CT, and 6 by digital subtraction angiography (DSA). The remaining 15 patients with bloody ascites were diagnosed by exploratory laparotomy. Of all patients, 4 received systemic anticoagulation, 5 were subjected to Fogarty balloon catheterization for thrombus removal and completely recovered, 8 underwent partial small bowel resection, 7 underwent subtotal small bowel and right-sided colon resection, and 2 underwent second-look operation. Six patients died in six months after operation.

CONCLUSION: Ultrasound is considered as a first-line diagnostic technique for acute mesenteric artery ischemia. Exploratory laparotomy should be performed in patients with bloody ascites. Early diagnosis and treatment are key to decreasing the mortality and morbidity of acute mesenteric artery ischemia.

Key Words: Mesenteric vascular occlusion; Diagnosis; Therapy

Gu QK, Wang J, Zhang BL, Yuan QX. Diagnosis and treatment of acute mesenteric artery ischemia: an analysis of 26 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1071-1073

摘要

目的: 探讨急性肠系膜动脉性缺血的诊断及治疗.

方法: 回顾分析26例急性肠系膜动脉性缺血的临床特征、诊断、治疗及预后.

结果: 入院后确诊11例, 其中: 彩色多普勒超声6例, 螺旋CT 9例, 血管造影5例. 其余15例因血性腹水探查术中确诊. 全身抗凝治疗4例, Fogarty导管取栓术后完全恢复5例, 小肠部分切除8例, 小肠大部及右半结肠切除7例, 2次探查术2例. 术后6 mo内死亡6例.

结论: 超声可作为急性肠系膜动脉性缺血患者的初步检查, 发现血性腹水者及早行剖腹探查术. 早期诊断与治疗使降低肠系膜血管死亡率和致残率的关键.

关键词: 肠系膜血管闭塞; 诊断; 治疗

顾全凯, 王军, 张宝良, 袁庆鑫. 急性肠系膜动脉性缺血26例. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1071-1073
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1071.asp

0 引言

急性肠系膜动脉性缺血可累及全部或部分小肠

■**背景资料**
急性肠系膜动脉性缺血发病率低, 早期诊断较为困难, 探讨其诊断和治疗具有重要意义.

■**同行评议者**
邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科

■研发前沿
急性肠系膜动脉性缺血的早期诊断以及根据病情合理的选择治疗方法是提高该病预后的关键.

和/或肠系膜上动脉供血的右半结肠, 症状与体征变化较大, 诊断较为困难. 但随着对本病认识的提高以及诊断手段的改进, 其诊断与治疗均有显著改善[1]. 本文回顾分析2000-01/2008-12我院诊治的26例急性肠系膜动脉性缺血患者的临床资料, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组26例患者中, 男16例, 女10例, 年龄43-75(平均年龄58)岁, 病程4-51(平均25) h. 临床表现为急性持续性腹痛26例, 腹胀18例, 恶心呕吐15例, 便血5例, 肠鸣音减弱或消失20例, 腹膜刺激征16例. 合并心房纤颤14例, 动脉粥样硬化4例, 冠心病心导管介入术后3例, 胶原性疾病5例.

1.2 方法 全部患者中白细胞均升高, 立位腹平片26例, 提示肠梗阻10例, 腹部彩色多普勒超声检查26例, 确诊6例, 超声引导下行腹腔穿刺术15例, 均为血性腹水; 螺旋CT 10例, 确诊9例; 行血管造影5例, 均确诊. 入院后确诊11例, 其余均因血性腹水行剖腹探查术后确诊.

确诊11例患者中, 4例为肠系膜上动脉血栓形成, 给予全身抗凝治疗, 其余7例为肠系膜上动脉栓塞, 血性腹水行剖腹探查术后确诊7例为肠系膜上动脉栓塞, 8例局灶性阶段性缺血. 局灶性阶段性缺血均行小肠部分切除吻合术, 14肠系膜上动脉栓塞中, 探查后先行肠系膜上动脉切开Fogarty导管取栓术, 观察肠管30 min后, 5例肠管恢复血运及功能, 7例小肠大部及升结肠坏死, 行近端空肠与横结肠吻合, 2例不能完全肯定肠管是否仍有活力, 且切除后有短肠可能者, 暂不切除, 将可疑肠管外置. 2次探查术后, 1例肠管恢复活力, 1例肠管坏死长度较第一次手术时减少, 行小肠大部切除, 保留约1.2 m小肠及回盲部.

所有患者术后均严密监测生命体征变化, 控制感染及营养支持, 禁食期间给予低分子肝素抗凝, 恢复饮食后改为华法林钠口服3-6 mo.

2 结果

所有患者均随访6 mo, 8例局灶性阶段性缺血及4例肠系膜上动脉血栓形成患者无复发, 14例肠系膜上动脉栓塞患者, 4例于术后2-3 d因多脏器功能衰竭死亡, 2例分别于术后2 mo、3 mo死于心脏病, 其余8例均随访无复发.

3 讨论

随着社会人口的老龄化, 急性肠系膜缺血的发病率呈上升趋势[2]. 急性肠系膜动脉性缺血占急性肠系膜缺血中90%以上, 病因包括: 肠系膜上动脉栓塞、非闭塞性肠系膜缺血、肠系膜上动脉血栓形成、局灶性阶段性缺血[3]. 本病的易患因素为心房纤颤、动脉粥样硬化、各种原因造成肠道的低灌注状态、系统性血管炎等, 因此对患有上述疾病患者发生急性腹痛时, 应提高警惕, 考虑到存在急性肠系膜动脉性缺血可能.

该病临床表现起病急, 发展快, 病情危重, 多存在伴随疾病, 易与其他急腹症混淆, 缺乏特异性的临床表现和化验指标, 因此, 提高对本病的认识程度和经验, 早期诊断和及时治疗, 对降低其并发症发生率和病死率至关重要[4,5].

影像学检查仍是本病确诊的主要方法[6]. 立位腹平片检查不能用于该病诊断, 但可除外消化系穿孔, 晚期可显示出肠梗阻, 本组26例, 提示肠梗阻10例.

超声检查为诊断肠系膜血管病的一种经济、简单、无创的检查方法, 可以显示受累动脉的血栓或血流缺损, 腹腔内游离液体、肠壁增厚[7,8]. 同时, 如发现腹腔内游离液体, 可以在超声引导下行腹腔穿刺术. 本组26例患者中, 经腹部彩色多普勒超声检查确诊6例, 并在超声引导下行腹腔穿刺术15例, 均为血性腹水. 对于血性腹水患者, 未再行其他检查, 而直接行剖腹探查术确诊[9]. 因此, 超声检查可作为急性肠系膜动脉性缺血患者的初步检查, 并可根据检查结果进一步选择CT、血管造影的检查及治疗.

螺旋CT是诊断急性肠系膜缺血的快捷、正确的影像学检查方法之一, 其增强扫描动脉期图像可直接显示肠系膜动脉内充盈缺损, CT增强后处理显示的血管可与DSA媲美, 此外还包括肠腔扩张积液、肠壁增厚、腹腔积液等间接征象[10,11]. 本组患者行螺旋CT 10例, 确诊9例, 因此可作为大多数患者确诊的依据.

动脉造影仍是诊断缺血性肠病的金标准, 可以提供病变部位、程度及侧枝循环状况, 并可进行治疗[12]. 但其存在可能假阳性、造影剂的肾脏毒性、耗费时间, 可能延误剖腹探查手术[13]. 因此要严格掌握时机, 指征需个体化, 适于只有不明原因腹痛, 而无腹膜炎体征患者. 本组行血管造影5例, 均确诊.

急性肠系膜动脉性缺血的治疗原则应迅速去除血管内的栓子, 恢复肠系膜动脉的血管供应[11], 早期外科干预治疗是提高疗效的关键[14]. 介入治疗可经肠系膜动脉灌注扩血管药, 同时

可行介入下血栓切除术、溶栓治疗, 适合于病史短(<8 h)肠管尚未坏死者[12], 本组4例肠系膜上动脉血栓形成患者, 经肠系膜动脉灌注罂粟碱后联合全身抗凝治疗, 效果明显. 急性肠系膜动脉性缺血患者大多诊断后已经肠管坏死, 丧失进行血管再通或重建机会, 因此及时果断剖腹探查非常重要. 肠系膜上动脉栓塞患者首先应恢复肠系膜血供, 再判断肠管活力, 必须切除已经梗死的肠管, 仔细观察保护可能恢复活力的肠管. 本组14肠系膜上动脉栓塞中, 探查取栓术, 5例肠管恢复血运及功能, 7例小肠大部及升结肠坏死, 行近端空肠与横结肠吻合. 2例估计切除后剩余小肠小于100 cm, 只切除明显坏死的肠管, 在12-24 h内进行有计划的二次探查手术, 同时给予积极措施促使肠管恢复生机, 避免术后短肠综合征的发生[15]. 局灶性阶段性缺血累及小肠长度较短, 可直接行小肠部分切除吻合术, 本组8例患者均预后良好.

总之, 提高对急性肠系膜动脉性缺血的认识, 各种影像学方法的合理应用, 早期诊断, 根据病情, 采取不同方法尽早恢复肠系膜血管血供降低死亡率和致残率.

4 参考文献

1 张振书. 急性肠系膜缺血的诊断与治疗. 中国实用内科杂志(临床版) 2006; 26: 983-985
2 Ujiki M, Kibbe MR. Mesenteric ischemia. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2005; 17: 309-318
3 吕俞敏. 缺血性肠病的诊治. 中国消化内镜 2008; 2: 13-18
4 Berland T, Oldenburg WA. Acute mesenteric ischemia. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 341-346
5 王玉琦. 重视肠系膜血管性疾病的诊治. 中国实用外科杂志 2006; 26: 412-414
6 Kim AY, Ha HK. Evaluation of suspected mesenteric ischemia: efficacy of radiologic studies. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 327-342
7 Dietrich CF, Jedrzejczyk M, Ignee A. Sonographic assessment of splanchnic arteries and the bowel wall. *Eur J Radiol* 2007; 64: 202-212
8 杨云生, 窦艳. 缺血性肠病. 临床内科杂志 2006; 23: 509-511
9 郝清斌, 刘建复, 钱海鑫. 急性肠系膜缺血性疾病早期诊断及手术时机的探讨. 中国普通外科杂志 2008; 17: 1204-1206
10 Furukawa A, Kanasaki S, Kono N, Wakamiya M, Tanaka T, Takahashi M, Murata K. CT diagnosis of acute mesenteric ischemia from various causes. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 192: 408-416
11 Aschoff AJ, Stuber G, Becker BW, Hoffmann MH, Schmitz BL, Schelzig H, Jaeckle T. Evaluation of acute mesenteric ischemia: accuracy of biphasic mesenteric multi-detector CT angiography. *Abdom Imaging* 2009; 34: 345-357
12 Stamatakos M, Stefanaki C, Mastrokalos D, Arampatzi H, Safioleas P, Chatziconstantinou C, Xiromeritis C, Safioleas M. Mesenteric ischemia: still a deadly puzzle for the medical community. *Tohoku J Exp Med* 2008; 216: 197-204
13 张纪蔚. 动脉造影在肠系膜缺血性疾病中的应用. 中国实用外科杂志 2006; 26: 412-414
14 Eltarawy IG, Etman YM, Zenati M, Simmons RL, Rosengart MR. Acute mesenteric ischemia: the importance of early surgical consultation. *Am Surg* 2009; 75: 212-219
15 Yanar H, Taviloglu K, Ertekin C, Ozcinar B, Yanar F, Guloglu R, Kurtoglu M. Planned second-look laparoscopy in the management of acute mesenteric ischemia. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3350-3353

■同行评价
本文有一定的科学性和可读性, 能反映目前我国胃肠病学临床研究的水平.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告 – RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1046-1050
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

N-乙酰半胱氨酸对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的抑制作用

刘石龙, 廖雯俊, 邬林泉

■**背景资料**
急性胰腺炎(AP)是一种发病急, 进展快, 易导致远隔脏器损伤, 病死率较高的急腹症. 近年临床研究发现, AP并发肝损伤的发生率为40.0%-56.6%, 而重症胰腺炎并发肝损伤者高达88.9%. 肝脏对毒性物质、生物活性产物的解毒以及清除能力下降, 致病因子更易通过肝脏屏障而进入体循环, 对全身其他组织器官造成损害, 为多器官功能衰竭奠定了基础.

■**同行评议者**
王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科; 张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

刘石龙, 廖雯俊, 邬林泉, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006
作者贡献分布: 此课题由邬林泉负责实验设计、指导及论文写作修改工作; 由刘石龙与廖雯俊负责实验的实施及论文书写.
通讯作者: 邬林泉, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肝胆外科. liubonc@hotmail.com
电话: 0791-6300249
收稿日期: 2009-11-17 修回日期: 2010-01-20
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-04-08

N-acetylcysteine protects against liver injury in rats with severe acute pancreatitis

Shi-Long Liu, Wen-Jun Liao, Lin-Quan Wu

Shi-Long Liu, Wen-Jun Liao, Lin-Quan Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Professor Lin-Quan Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. liubonc@hotmail.com
Received: 2009-11-17 Revised: 2010-01-20
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To explore whether *N*-acetylcysteine (NAC) reduces liver injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Fifty-four Sprague-Dawley rats were randomized into sham-operation group, SAP group and NAC treatment group. SAP was induced in rats by retrograde injection of 4% sodium taurocholate into the pancreatic duct. Rats in the NAC treatment group received an intravenous injection of NAC (200 mg/kg) one hour after sodium taurocholate injection. All the animals were sacrificed at 3, 6 and 12 h after SAP induction. The activation of nuclear factor-κB (NF-κB) in the liver was determined by immunohistochemistry. The hepatic expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Meanwhile, plasma amylase and liver function (ALT and AST) were measured.

RESULTS: SAP induction significantly enhanced NF-κB binding activity and up-regulated iNOS mRNA expression in the liver of rats. NAC treatment for different durations could significantly suppress the activation of NF-κB (3 h: 0.32 ± 0.05 *vs* 0.46 ± 0.04, 6 h: 0.56 ± 0.07 *vs* 0.97 ± 0.18 and 12 h: 0.87 ± 0.14 *vs* 1.13 ± 0.11, respectively; all $P < 0.05$) and reduce the levels of plasma amylase, ALT and AST.

CONCLUSION: NF-κB activation and iNOS mRNA expression are associated with liver injury in SAP. NAC protects against SAP-induced liver injury perhaps by blocking the activation of NF-κB.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Nuclear factor-κB; Inducible nitric oxide synthase; Liver injury; *N*-acetylcysteine

Liu SL, Liao WJ, Wu LQ. *N*-acetylcysteine protects against liver injury in rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1046-1050

摘要

目的: 探讨*N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)对大鼠重症急性胰腺炎(SAP)肝损伤的抑制作用机制.

方法: 54只SD大鼠随机分为假手术组(SO组)、胰腺炎组(SAP组)及NAC干预组(NAC组), 各组18只. 以4%牛磺胆酸钠溶液逆行注入胰胆管制作SAP模型. NAC组于造模后1 h行股静脉注入NAC(200 mg/kg). 分别于3 h、6 h、12 h时间点随机剖杀大鼠. 采用SP免疫组织化学法检测肝组织NF-κB活性; 利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肝组织iNOS mRNA表达; 胰、肝组织行病理切片观察, 同时行血清淀粉酶、肝功能(AST、ALT)检测.

结果: SO组肝组织可见散在肝细胞NF-κB活化和iNOS mRNA低表达, SAP组NF-κB活化和iNOS mRNA高表达; NAC对肝组织NF-κB活性有抑制作用, 降低iNOS mRNA表达, 与

SAP组比较差异显著(3 h: 0.32±0.05 *vs* 0.46±0.04, 6 h: 0.56±0.07 *vs* 0.97±0.18, 12 h: 0.87±0.14 *vs* 1.13±0.11, 均$P<0.05$), 并可降低血清淀粉酶、AST、ALT水平.

结论: 肝组织NF-κB活化及iNOS mRNA过度表达可能是SAP肝损伤发生的原因之一, NAC可抑制肝NF-κB活性及iNOS mRNA的表达, 对SAP肝损伤具有一定的抑制作用.

关键词: 重症急性胰腺炎; 核因子-κB; 诱导型一氧化氮合酶; 肝损伤; *N*-乙酰半胱氨酸

刘石龙, 廖雯俊, 邬林泉. *N*-乙酰半胱氨酸对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1046-1050

http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1046.asp

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种发病急, 进展快, 易导致远隔脏器损伤, 病死率较高的急腹症. AP发病机制目前尚不清楚, 主要死亡原因是并发多器官功能衰竭, 死亡率10%-35%. 近年临床研究发现, AP并发肝损伤的发生率为40.0%-56.6%, 而重症胰腺炎并发肝损伤者高达88.9%[1]. 肝脏对毒性物质、生物活性产物的解毒以及清除能力下降, 致病因子更易通过肝脏屏障而进入体循环, 对全身其他组织器官造成损害, 为多器官功能衰竭奠定了基础. 本实验通过大鼠重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)模型, 探讨NAC对大鼠SAP肝损伤的保护作用机制.

1 材料和方法

1.1 *材料* 实验动物采用健康的8-10周龄SD大鼠, 共54只, 雌雄不限, 体质量为230-280 g, 由南昌大学医学院实验动物中心提供. NF-κB p65抗体(兔抗大鼠)购于北京博奥森公司; *N*-乙酰半胱氨酸购于Solarbio公司; 牛磺胆酸钠购于美国Sigma公司; iNOS及β-actin引物系根据GenBank中相应的基因序列自行设计, 由上海生工生物工程公司合成.

1.2 *方法*

1.2.1 *分组*: 实验前大鼠在实验室适应性饲养1 wk. 随机分成3个组, 假手术组(sham operation, SO组, n = 18)、SAP组(n = 18)、*N*-乙酰半胱氨酸干预组(*N*-acetylcysteine, NAC组, n = 18).

1.2.2 *模型制作和标本检测*: 采用逆行胰胆管注入法制作SAP模型, 分别在造模后3、6、12 h的规定时间点, 随机剖杀大鼠取下腔静脉血3 mL, 用于血淀粉酶, 肝功能(AST、ALT)测定. 即刻取肝组织100 mg左右, 投入液氮罐中冻存, 用于mRNA测定. 取胰腺、肝组织放入100 g/L中性甲醛固定24 h, 常规制成石蜡切片, 由病理专职病理技术人员对胰腺组织、肝组织HE染色及免疫组织化学染色观察.

1.2.3 *RT-PCR法检测肝组织iNOS mRNA表达*: 用TRIzol提取总RNA, 逆转录后行PCR. iNOS及β-actin引物序列如下: iNOS(514 bp): 5'-TGTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3'; 5'-CAGTTTCTGGTCGATGTCATGAG-3'; β-actin(395 bp): 5'-GCAAGTACTCTGTGTGGATTGG-3'; 5'-AATCAAAGTCCTCAGCCACATT-3'. RT-PCR反应条件: 预变性95 ℃ 5 min, 变性94 ℃ 45 s, 延伸72 ℃ 75 s, 最后72 ℃延伸7 min, 共36循环. 其中iNOS、β-actin引物的退火温度分别为: 48 ℃、60 ℃. 将PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳(75 mV, 50 min), 用凝胶图像扫描仪测算每条带的光密度值. 用iNOS扩增产物带与β-actin扩增产物带值之比表示每个样本的iNOS的表达.

1.2.4 *肝组织NF-κB的免疫组织化学染色*: 采用SP(Streptavidin/Peroxidase)法检测肝组织NF-κB的活性. 一抗(兔抗p65抗体)工作浓度为1∶200. 阴性对照不加一抗, 以正常PBS代替. 结果判断: 在400倍光镜下对每张切片随机取5个视野, 计算每个视野的阳性细胞数取其均数代表该样本的阳性表达. 细胞核和(或)细胞质呈棕色即为阳性.

统计学处理 数据采用mean±SD表示. 采用SPSS13.0软件进行方差分析, 同时段的组间比较用t检验, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *血清淀粉酶指标变化* 与SO组、NAC组比较, ANP组血清淀粉酶在造模后3 h就明显地升高, 各组间比较有显著性差异($P<0.05$). 各时间点NAC组血清淀粉酶较SAP组明显降低(表1).

2.2 *血清ALT和AST指标测定* NAC组和SAP组血清ALT和AST含量在3-12 h内持续升高, 显著高于SO组. NAC组ALT和AST浓度较SAP组显著降低($P<0.05$), 但仍高于SO组($P<0.05$, 表2).

2.3 *肝组织病理观察* 肝脏外观变化: SO组肝脏无明显变化. SAP组3 h肝脏充血; 6 h充血加重肝脏淤血样改变; 12 h肝脏表面偶见坏死灶. NAC组3 h肝脏充血; 6 h充血加重; 12 h肝脏表面出现散在的可疑坏死灶. 肝脏病理光镜观察: SO组肝小叶结构清晰, 细胞形态正常. SAP组3 h肝细胞

■**研发前沿**
急性胰腺炎发病机制目前尚不清楚, 主要死亡原因是并发多器官功能衰竭, 死亡率10%-35%. 急性胰腺炎并发肝损伤是目前研究的热点问题.

■相关报道
周家华等研究发现NF-κB在6 h时间点明显升高, 6 h后无进一步升高, 12 h后无进一步升高, 且证明PDTC可抑制NF-κB活性并与给药时间有关; 田勇等研究发现: SAP肝损伤在24 h点的NF-κB活性增高; 袁耀宗、赵永福等研究发现大鼠SAP模型NF-κB在12 h内持续升高且证明NF-κB在重症胰腺炎肝损伤其重要作用.

表 1 实验各组血清淀粉酶指标测定结果 (U/L, mean ± SD)

分组	3 h	6 h	12 h
SO组	1 532.23 ± 165.27	1 763.83 ± 159.32	2 097.83 ± 182.21
SAP组	3 841.23 ± 543.29[ac]	5 967.16 ± 763.82[ac]	7 921.14 ± 933.65[ac]
NAC组	2 941.32 ± 702.45[a]	3 832.46 ± 659.37[a]	5 382.29 ± 870.89[a]

[a]P<0.05 *vs* SO组; [c]P<0.05 *vs* NAC组.

表 2 实验各组肝功能指标测定结果 (U/L, mean ± SD)

分组	3 h		6 h		12 h	
	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST
SO组	60.5 ± 9.8	178.4 ± 35.2	82.3 ± 12.3	203.5 ± 42.1	97.3 ± 21.5	302.3 ± 39.2
SAP组	198.5 ± 32.2	521.6 ± 89.4[ac]	387.5 ± 36.9	753.2 ± 123.4[ac]	453.2 ± 86.2	863.3 ± 46.3[ac]
NAC组	126.7 ± 21.3	432.7 ± 57.6[a]	253.1 ± 35.8	576.3 ± 76.5[a]	278.2 ± 12.9	642.1 ± 69.2[a]

[a]P<0.05 *vs* SO组; [c]P<0.05 *vs* NAC组.

表 3 实验各组肝组织NF-κB检测结果 (mean ± SD)

分组	3 h	6 h	12 h
SO组	2.12 ± 0.46	5.32 ± 0.53	6.12 ± 0.58
SAP组	16.35 ± 2.38[ac]	45.31 ± 4.14[ac]	52.69 ± 4.21[ac]
NAC组	10.63 ± 2.13[a]	19.35 ± 3.69[a]	28.34 ± 5.41[a]

[a]P<0.05 *vs* SO组; [c]P<0.05 *vs* NAC组.

表 4 实验各组肝组织iNOS mRNA表达测定结果 (iNOS mRNA/β-actin, mean ± SD)

分组	3 h	6 h	12 h
SO组	0.15 ± 0.07	0.18 ± 0.04	0.21 ± 0.02
SAP组	0.46 ± 0.04[ac]	0.97 ± 0.18[ac]	1.13 ± 0.11[ac]
NAC组	0.32 ± 0.05[a]	0.56 ± 0.07[a]	0.87 ± 0.14[a]

[a]P<0.05 *vs* SO组; [c]P<0.05 *vs* NAC组.

胞质染色变淡, 嗜酸性小体偶见, 部分细胞质小圆形空泡样变性未见明显的肝细胞坏死和肝细胞凋亡出现, 炎性细胞浸润不明显; 6 h肝细胞肿胀, 个别缺血样改变数个细胞核皱缩, 碎裂, 周围散在中性粒细胞; 12 h呈灶性坏死, 皱缩、碎裂核增多及肿胀的库普弗细胞. NAC组3 h肝细胞胞质染色变淡, 细胞质小圆形空泡样变性偶见; 6 h肝细胞肿胀, 偶见肝细胞嗜酸性变; 12 h肿胀的库普弗细胞较少见, 主要肝脏缺血样改变.

2.4 肝组织NF-κB的活化 NF-κB免疫组织化学染色结果显示在SO组大鼠肝组织内散在的NF-κB阳性染色细胞. 高倍镜下可见其阳性染色主要位于胞质, 而细胞核不着色; SAP组大鼠肝组织中可见明显深染的NF-κB阳性细胞, 其染色以细胞核为主, 染色重, 胞核轮廓清晰, 胞质也有少量着色, 但染色较SO组淡; NAC组细胞核及细胞质虽有NF-κB染色但普遍较胰腺炎组明显变淡, 且细胞轮廓不清楚(表3).

2.5 肝组织炎性介质iNOS基因表达变化 RT-PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用Gene Genius全自动凝胶成像系统进行半定量分析. 显示SO组大鼠肝组织iNOS mRNA不表达或低表达, SAP组iNOS mRNA表达明显上调. NAC组与胰腺炎组比较iNOS mRNA的表达明显降低(图1, 表4).

3 讨论

研究证明AP引起的肝损害不但会加重AP病情且肝损害程度与胰腺炎程度密切相关, 并影响其病程及预后, 甚至可以发展为肝功能衰竭导致患者死亡[2,3]. 近年的研究还发现NF-κB在肝损伤发病机制中起重要的作用, 他在肝脏中的高表达与继发引起的下游调控基因的激活共同参与肝损伤的发生和发展[4-6]. 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因, 含有κB位点, NF-κB在调控其表达方面起到重要作用, 研究发现: 体内iNOS被激活后, 释放大量的NO与多种病理状态相关, 包括组织损伤和多种炎症疾病、神经疾病等[7-10]. 因此, 选择性地抑制iNOS进而抑制过量的NO产生将具有一定的治疗前景. 有效地抑制iNOS能阻

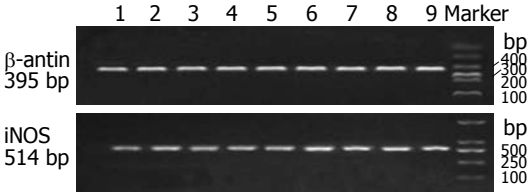


图 1 各组3、6、12 h肝组织iNOS mRNA的表达. 1−3: SO组; 4−6: SAP组; 7−9: NAC组.

断炎症信息传递通道的作用, 有效地抑制iNOS不仅能在初始阶段影响炎症的发生, 也对抑制和终结炎症有作用.

国内外研究表明: NF-κB的早期高表达在SAP的发病中起重要作用, 周家华等研究发现NF-κB在6 h时间点明显升高, 6 h后无进一步升高, 12 h后无进一步升高, 且证明PDTC可抑制NF-κB活性并与给药时间有关[11]; 田勇等研究发现: SAP肝损伤在24 h点的NF-κB活性增高[12]; 袁耀宗、赵永福等研究发现大鼠SAP模型NF-κB在12 h内持续升高且证明NF-κB在重症胰腺炎肝损伤其重要作用[13,14]. Ethridge等发现在SAP 3-6 h内NF-κB表达会出现两个高峰, 表明NF-κB的早期高表达介导了第1次炎症打击与胰外脏器损伤有关[15]. 本实验中我们发现造模后在SO组, 大鼠肝组织内可见散在的NF-κB阳性染细胞, 高倍镜下可见主要位于胞质, 而细胞核少量着色; SAP组大鼠肝组织可见明显深染的NF-κB阳性肝细胞且染色以胞核为主, SAP组在3-12 h时间点内肝脏组织中NF-κB的活性持续性升高, 与SO组各时间点相比有显著差异($P<0.05$), 此研究与袁耀宗、赵永福等研究基本一致. 随SAP病程发展, 肝脏病理变化出现不同程度的加重; 血清ALT、AST水平明显升高. NAC治疗组肝细胞核及细胞质虽有染色但普遍较胰腺炎组明显变淡且细胞轮廓不清楚, 说明NAC有抑制NF-κB活化的作用. SO组大鼠肝组织iNOS mRNA不表达或低表达, SAP组肝组织iNOS mRNA表达明显上调; NAC组肝组织iNOS mRNA的表达较SAP组明显降低, 有统计学意义($P<0.05$). 说明NAC对肝组织iNOS mRNA的表达有抑制作用.

NAC是细胞内还原性谷胱甘肽的前体. 主要作为一种黏液溶解剂临床上应用于治疗呼吸系统疾病, 迄今已30多年. *N*-乙酰半胱氨酸具有清除氧自由基, 抑制NF-κB激活, 减少细胞因子的合成和释放的作用. 实验中我们发现NAC组大鼠胰腺炎肝损伤较SAP组明显减轻. 本实验中NAC治疗组NF-κB活化及iNOS mRNA的表达较SAP组明显降低, 有显著的统计学意义($P<0.05$), 且肝功能明显改善、肝脏的病理变化明显减轻. 从实验中可观察到NF-κB异常活化与iNOS mRNA的表达呈一定的平行关系.

本实验证实: SAP时, NF-κB活化及其引起的下游iNOS mRNA表达参与了AP并发的肝损伤, *N*-乙酰半胱氨酸可能通过抑制NF-κB的活性从而抑制了iNOS mRNA的表达, 对AP并发的肝损伤有一定的抑制作用.

总之, AP肝损伤其机制复杂, 多种机制参与其的发生, AP引起的肝损害不但会加重AP病情且肝损害程度与胰腺炎程度密切相关, 并影响其病程及预后, 甚至可以发展为肝功能衰竭导致患者死亡. 早期诊断SAP、控制病情的发展是防治肝功能不全的关键. 实验中我们发现NAC对SAP并发肝功能不全有一定的治疗作用.

■同行评价

本研究具有很高的学术价值和临床指导作用, 能够很好地反映了我国在胃肠领域临床和基础研究的先进水平.

4 参考文献

1 孔瑞, 孙备. 重症急性胰腺炎并发肝损伤的研究进展. 国际外科学杂志 2006; 33: 401-404

2 郭佳, 薛平, 黄宗文, 游真, 李永红, 王忠朝. 肝损害持续时间对重症急性胰腺炎的影响. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 779-780

3 Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 195-203

4 Heyninck K, Wullaert A, Beyaert R. Nuclear factor-kappa B plays a central role in tumour necrosis factor-mediated liver disease. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1409-1415

5 Mason NJ, Artis D, Hunter CA. New lessons from old pathogens: what parasitic infections have taught us about the role of nuclear factor-kappaB in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 2004; 201: 48-56

6 Rakonczay Z Jr, Jármay K, Kaszaki J, Mándi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takács T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709

7 Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 1998; 118: 215-229

8 Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol* 2001; 114: 8-18

9 Rau B, Bauer A, Wang A, Gansauge F, Weidenbach H, Nevalainen T, Poch B, Beger HG, Nussler AK. Modulation of endogenous nitric oxide synthase in experimental acute pancreatitis: role of anti-ICAM-1 and oxygen free radical scavengers. *Ann Surg* 2001; 233: 195-203

10 Ueno N, Kashiwamura S, Ueda H, Okamura H, Tsuji NM, Hosohara K, Kotani J, Marukawa S. Role of interleukin 18 in nitric oxide production and pancreatic damage during acute pancreatitis. *Shock* 2005; 24: 564-570

11 周家华, 朱海涛, 王凤臣. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对大鼠急性坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2602-2606

12 田勇, 谭纪龙. 核因子-κB在重症胰腺炎模型肝脏损伤

中的作用. 中国血液流变学杂志 2006; 16: 346-347
13 袁耀宗, 纪龙, 朱颖, 翟祖康, 章永平, 徐家裕. 核因子-κB在重症急性胰腺炎肝损伤中的作用研究. 上海医药 2002; 25: 172-175
14 赵永福, 翟文龙, 张水军, 陈孝平. 雷公藤内酯醇对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用. 中华实验外科杂志 2005; 22: 689-691
15 Ethridge RT, Hashimoto K, Chung DH, Ehlers RA, Rajaraman S, Evers BM. Selective inhibition of NF-kappaB attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 497-505

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	−0.99	0.043	41	−0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	−0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	−0.44	0.294	34	−0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	−0.43	0.379	28	−0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	−0.50	0.441	22	−0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	−0.32
G257	临床内科杂志	875	16	−0.24	0.412	24	−0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	−0.73	0.294	34	−0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	−0.28	0.371	29	−0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	−0.65	0.329	33	−0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	−0.86	0.158	40	−0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	−0.73	0.279	36	−0.46
G523	内科理论与实践	34	40	−0.97	0.171	39	−0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	−0.73	0.562	14	0.08
G190	**世界华人消化杂志**	**2480**	**6**	**1.15**	**0.547**	**17**	**0.05**
G800	胃肠病学	619	23	−0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病学杂志	580	28	−0.50	0.415	23	−0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	−0.79	0.361	31	−0.31
G419	心血管病学进展	585	26	−0.49	0.410	25	−0.21
G260	心脏杂志	553	29	−0.52	0.406	26	−0.22
G610	胰腺病学	268	35	−0.77	0.366	30	−0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	−0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	−0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	−0.78	0.225	37	−0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	−0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	−0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	−0.40	0.406	26	−0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	−0.86	0.207	38	−0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	−0.49	0.442	21	−0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	−0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	−0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177–178.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1051-1055
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠NF-κB活性、NF-κB及TNF-α mRNA表达的影响

张超贤, 郭晓凤, 秦咏梅

张超贤, 秦咏梅, 新乡医学院第一附属医院消化内科 河南省卫辉市 453100
郭晓凤, 杭州市第六人民医院肝病科 浙江省杭州市 310014
作者贡献分布: 张超贤为此文的主要贡献者; 此课题由张超贤、郭晓凤及秦咏梅设计; 研究过程由张超贤与郭晓凤操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郭晓凤提供; 数据分析由张超贤完成; 本论文写作由张超贤完成.
通讯作者: 张超贤, 主治医师, 453100, 河南省卫辉市, 新乡医学院第一附属医院消化内科. nn21882001@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-12-20 修回日期: 2010-02-10
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Huangqi Injection reduces NF-κB activity and down-regulates TNF-α mRNA expression in rats with acute pancreatitis

Chao-Xian Zhang, Xiao-Feng Guo, Yong-Mei Qin

Chao-Xian Zhang, Yong-Mei Qin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China
Xiao-Feng Guo, Department of Hepatology, the Sixth People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Chao-Xian Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China. nn21882001@yahoo.com.cn
Received: 2009-12-20 Revised: 2010-02-10
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of Huangqi Injection on nuclear factor-κB (NF-κB) activity and NF-κB and tumor necrosis factor-α (TNF-α) mRNA expression in rats with acute pancreatitis.

METHODS: Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: sham-operation group, model control group, and low- [0.10 mL/(100 g•d)], medium- [0.15 mL/(100 g•d)] and high-dose [0.20 mL/(100 g•d)] Huangqi Injection groups. Acute pancreatitis was induced by injection of 5% sodium taurocholate [0.10 mL/(100 g•d)] into the pancreatic duct of rats. Huangqi Injection was injected into the tail vein 30 min before sodium taurocholate injection in the three treatment groups. The rats were killed 6 h after sodium taurocholate injection. The histomorphologic structure of the pancreas was observed under an optical microscope, and the severity of pancreatitis was evaluated using a pathologic grading system. The NF-κB activity in pancreatic acinar cells was determined by immunohistochemistry. The expression of NF-κB and TNF-α mRNAs in the pancreas was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with the sham-operation group, the pathologic grading score, NF-κB activity and TNF-α mRNA expression level increased obviously in the model group (both $P < 0.01$). The pathologic grading score, NF-κB activity and TNF-α mRNA expression level were significantly lower in the treatment groups than in the model group (all $P < 0.05$ or 0.01). A positive correlation was noted between NF-κB activity and TNF-α mRNA expression level ($r = 0.542$, $P < 0.05$). No significant difference was noted in NF-κB mRNA expression level among each group (all $P > 0.01$).

CONCLUSION: NF-κB activity and TNF-α mRNA expression are closely related with the severity of acute pancreatitis. Active NF-κB may play an important role in the pathogenesis of acute pancreatitis by up-regulating TNF-α mRNA expression. Huangqi Injection can significantly decrease NF-κB activity and TNF-α mRNA expression and therefore alleviate pancreatic injury in rats with acute pancreatitis.

Key Words: Huangqi injection; Acute pancreatitis; Nuclear factor-κB; Tumor necrosis factor-α

Zhang CX, Guo XF, Qin YM. Huangqi Injection reduces NF-κB activity and down-regulates TNF-α mRNA expression in rats with acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1051-1055

摘要

目的: 探讨黄芪注射液对实验性急性胰腺炎大鼠NF-κB活性、NF-κB mRNA及TNF-α

■背景资料
急性胰腺炎时, 炎症介质、细胞因子的过量产生与全身各系统的炎症反应和多器官功能衰竭的出现呈明显的因果关系. 核转录因子-κB(NF-κB)是一种能与体内多种细胞基因启动子部位相结合的核蛋白, 在机体的免疫和炎症反应、凋亡调控等方面发挥重要作用, 其过度活化可引起多种病理生理反应. 在AP发生、发展过程中NF-κB的过度活化可引起多种炎症反应相关基因的表达上调, 导致炎症介质、细胞因子的大量产生而参与AP的炎症反应进程.

■同行评议者
陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研发前沿
抑制NF-κB活化进而下调下游炎症因子的表达是有效改善胰腺炎损伤一个重要途径. 中药黄芪对AP有良好的治疗作用, 但这种作用是否与影响NF-κB活性及下游炎症因子的表达有关尚不清楚.

mRNA的影响.

方法: ♂SD大鼠60只, 随机分为假手术组、模型组和黄芪小剂量治疗组[0.10 mL/(100 g•d)]、中剂量治疗组[0.15 mL/(100 g•d)]、大剂量治疗组[0.20 mL/(100 g•d)]. 用5%牛磺胆酸钠胰管内注入[0.10 mL/(100 g•d)]诱导大鼠急性胰腺炎模型, 黄芪注射液各组造模前30 min给予黄芪注射液尾静脉注射, 造模6 h后处死大鼠取胰腺组织标本. 光镜观察胰腺组织的病理变化, 并对胰腺组织标本进行病理评分; 免疫组织化学法测定胰腺细胞NF-κB活性, RT-PCR法检测胰腺组织中NF-κB mRNA和TNF-α mRNA表达.

结果: 与假手术组比较, 模型组胰腺组织病理评分、NF-κB活性及TNF-α mRNA表达显著增加(P<0.01); 与模型组比较, 治疗各组病理评分、NF-κB活性及TNF-α mRNA表达显著下降(P<0.05或0.01). NF-κB活性及TNF-α mRNA表达呈正相关关系(r = 0.542, P<0.05), 各组NF-κB mRNA的表达均为阳性, 差异无显著性(P>0.05).

结论: 活化的NF-κB可通过上调TNF-α mRNA的表达参与急性胰腺炎的发生、发展, 黄芪注射液能显著降低实验性急性胰腺炎大鼠的NF-κB活性、TNF-α mRNA表达, 从而减轻急性胰腺炎损害程度.

关键词: 黄芪注射液; 急性胰腺炎; 核转录因子-κB; 肿瘤坏死因子-α

张超贤, 郭晓凤, 秦咏梅. 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠NF-κB活性、NF-κB及TNF-α mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1051-1055
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1051.asp

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)时, 炎症介质、细胞因子的过量产生与全身各系统的炎症反应(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭(multiple organ dysfunction, MODF)的出现呈明显的因果关系[1]. 核转录因子-κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)是一种能与体内多种细胞基因启动子部位相结合的核蛋白, 在机体的免疫和炎症反应、凋亡调控等方面发挥重要作用, 其过度活化可引起多种病理生理反应. 在AP发生、发展过程中NF-κB的过度活化可引起多种炎症反应相关基因的表达上调, 导致炎症介质、细胞因子的大量产生而参与AP的炎症反应进程[2]. 中药黄芪对AP有良好的治疗作用[3,4], 但这种作用是否与影响NF-κB活性及下游炎症因子的表达有关尚不清楚. 本实验旨在通过大鼠实验性AP时NF-κB活性及TNF-α mRNA的变化及黄芪处理对其影响的观察, 进一步探讨黄芪治疗AP的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康清洁级SD大鼠60只, ♂, 体质量220-250 g, 由新乡医学院实验动物中心提供. 黄芪注射液(地奥成都地奥九泓制药厂生产, 批号: 0706071, 每支10 mL, 相当于20 g生药), 牛黄胆酸钠(Sigma公司), NF-κB鼠单克隆抗体(Santa Cruz公司). DelDoc2000凝胶扫描仪(BLO-Rad公司, 美国), TRIzol试剂(美国Invitrogen公司), TNF-α、NF-κB及β-actin引物(上海生工生物工程公司), RT-PCR(一步法)试剂盒(宝生物工程有限公司).

1.2 方法

1.2.1 急性胰腺炎模型建立: SD大鼠术前禁食12 h, 自由饮水, 随机分为5组: 假手术组、模型组、黄芪注射液小剂量组、中剂量组和大剂量组, 各12只. 参考文献[5,6]方法造模, 戊巴比妥钠35 mg/kg腹腔注射麻醉, 正中切口入腹, 入腹后寻及十二指肠, 于主胰管开口附近十二指肠系膜对缘切开十二指肠, 置一细塑料管于主胰管内, 用无损伤动脉钳夹闭胆胰管近肝门端, 经细塑料管缓慢注入5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g), 滞留5 min后拔去塑料管, 松开动脉钳, 缝合十二指肠, 关闭腹腔. 黄芪注射液各组在造模前30 min分别给予黄芪注射液0.10、0.15及0.20 mL/(100 g•d)尾静脉注射, 模型组在造模前予0.15 mL/(100 g•d)生理盐水注射, 假手术组注射生理盐水时间、剂量、途径均同模型组, 进腹后仅显露、牵拉十二指肠即关腹. 造模后6 h, 处死动物并剖腹, 快速切取胰腺组织供实验用.

1.2.2 胰腺组织病理观察: 取胰腺脾侧叶用200 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, HE染色, 用于胰腺组织形态观察、光镜观察. 胰腺病理学评分, 胰腺组织病理积分参照评分标准参照相关文献[7]的标准.

1.2.3 NF-κB活性的检测: 胰腺4 μm厚石蜡切片, 常规脱蜡, 乙醇梯度脱水, 3% H_2O_2灭活内源性过氧化物酶以修复抗原, 5%羊血清封闭30 min, 1∶100的NF-κB p65(一抗)37 ℃孵育1 h, 滴加羊抗兔IgGHRP室温15 min, DAB显色, 苏木素复

表 1 各组大鼠胰腺组织病理评分、NF-κB活性、TNF-α及NF-κB mRNA表达的比较 (n = 12, mean ± SD)

分组	病理评分	NF-κB活性	TNF-α mRNA	NF-κB mRNA
假手术组	0.6 ± 0.8	10.54 ± 1.92	0.31 ± 0.17	0.38 ± 0.03
模型组	6.4 ± 2.3[b]	20.57 ± 5.85[b]	0.92 ± 0.12[b]	0.41 ± 0.01
黄芪注射液治疗组				
小剂量	5.2 ± 1.9[c]	15.43 ± 5.94[c]	0.75 ± 0.21[c]	0.40 ± 0.01
中剂量	3.5 ± 1.9[d]	12.64 ± 4.61[d]	0.48 ± 0.13[d]	0.40 ± 0.02
大剂量	3.4 ± 0.7[d]	12.05 ± 5.30[d]	0.46 ± 0.08[d]	0.38 ± 0.05

[b]P<0.01 *vs* 假手术组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型组.

■相关报道
TNF-α被认为是在AP中最早升高并起着重要作用的细胞因子, 是与重症急性胰腺炎(SAP)的严重性相关并可作为SAP预后的指标之一, NF-κB活化是众多炎症介质作用机制的共同通道, 诸多炎症因子在基因水平上都受到NF-κB的调控.

染, 切片烤干封片. 阴性对照用PBS代替一抗. 阳性反应细胞胞质、胞核呈棕黄色染色. 在3个高倍镜视野下观察阳性细胞数N_1和总细胞数N, 阳性率 = N_1/N×100%.

1.2.4 NF-κB mRNA的检测: 采用RT-PCR法检测NF-κB mRNA, NF-κB p65引物序列: 上游5'-GAAGAAGCGAGACCTGGAG-3', 下游5'-TCCGGAACACAATGGCCAC-3', 扩增产物长度398 bp. 内参β-肌动蛋白序列: 上游5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3', 下游5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3', 扩增产物长度190 bp. PCR条件: 各扩增管先置于55 ℃水浴逆转录40 min, 然后直接置PCR扩增仪94 ℃变性45 s, 54 ℃退火45 s, 72 ℃延伸60 s, 共40个循环, 再72 ℃延伸5 min, PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 在凝胶成像系统中计算NF-κB p65 mRNA与β-肌动蛋白的吸光度比值.

1.2.5 TNF-α mRNA的检测: 用TRIzol(Invitrogen公司)抽提RNA后, RT-PCR半定量法检测mRNA表达量, 以β-actin为内参照. TNF-α上游引物序列: 5'-TCTCAAAACTCGAGTGACAAG-3'; TNF-α下游引物序列为: 5'-AGTTGGTTGTCTTTGAGATCC-3', 产物长度446 bp; 设β-actin为内参照, 其上流引物序列为5'-TGGTACCACTGGCATTGTGA-3', 下游引物序列为5'-TCCTGCTTGCTGATCCACAT-3', 产物长度545 bp. 反应条件: 50 ℃ 1 h, 90 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 min, 65 ℃ 30 min, 68 ℃ 1 min 30个循环; 65 ℃延伸2 min, 4 ℃保存. 2.0 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统中计算TNF-α mRNA与β-肌动蛋白的电泳条带的吸光度比值.

统计学处理 用SPSS11.5统计学软件进行分析, 数据以mean±SD表示, 组间比较经方差齐性检验示方差齐, 进行单因素方差分析. 相关分析采用直线相关的积差相关分析, 以P<0.05为有统计学意义.

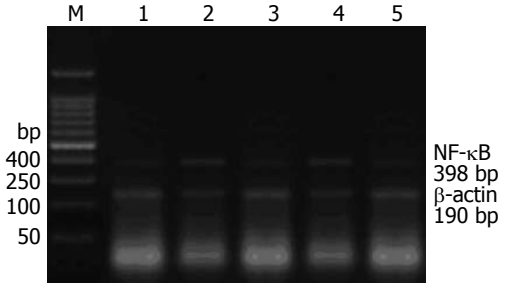


图 1 各组胰腺组织NF-κB mRNA的表达. M: Marker; 1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 中剂量治疗组; 4: 小剂量治疗组; 5: 大剂量治疗组.

2 结果

2.1 病理形态学 假手术组胰腺正常, 小叶结构存在, 间质清晰. AP组小叶结构破坏, 腺泡排列紊乱, 间质明显水肿、出血、红细胞呈片状冲毁胰腺组织, 炎症细胞明显浸润; 大片腺细胞溶解坏死, 细胞膜溶解, 核消失. 黄芪治疗组可见胰腺小叶结构破坏明显减轻. 间质水肿好转, 变性情况明显改善, 炎细胞浸润减少. 胰腺细胞较清晰, 排列较整齐. 各组胰腺病理评分见表1.

2.2 黄芪注射液对大鼠胰腺NF-κB活性、NF-κB及TNF-α mRNA表达的影响 模型组胰腺组织NF-κB活性、TNF-α mRNA表达较假手术组显著增高, 治疗组胰腺组织NF-κB活性、TNF-α mRNA表达明显低于模型组(P<0.01), 两指标呈正相关关系(r = 0.542, P<0.05), 模型组 NF-κB mRNA较假手术组有所升高, 治疗组较模型组有所降低, 但差异无统计学意义(P>0.05, 表1, 图1, 2).

3 讨论

TNF-α被认为是在AP中最早升高并起着重要作用的细胞因子, 是与重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的严重性相关并可作为SAP预后的指标之一[8]. 较高浓度的TNF-α不但

■**创新盘点**
本研究首次通过大鼠实验性AP时NF-κB活性及TNF-α mRNA的变化及黄芪处理对其影响的观察, 探讨黄芪治疗AP的作用机制.

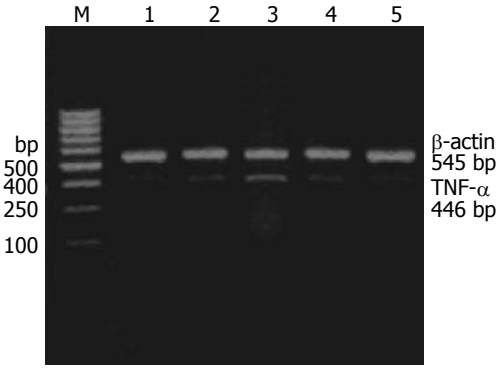


图 2 各组胰腺组织TNF-α mRNA的表达. M: Marker; 1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 中剂量治疗组; 4: 小剂量治疗组; 5: 大剂量治疗组.

具有直接损伤机体细胞的作用, 还能够诱发和调控多种炎性细胞因子如IL-1、IL-6、IL-8等的释放, 直接和间接参与引起了机体内两次高水平细胞因子血症, 引起炎症瀑布样级联反应, 进而导致SIRS并继发MODS[9,10]. NF-κB活化是众多炎症介质作用机制的共同通道, 诸多炎症因子在基因水平上都受到NF-κB的调控. NF-κB是一种具有多向转录调节作用的蛋白, p50/p65异源二聚体是NF-κB活化的最常见形式. 生理情况下NF-κB同其抑制因子(inhibitor of NF-κB, IκB)结合以无活性状态存在于细胞质内; 疾病过程中, 内毒素、脂多糖、磷脂酶A、溶血磷脂酰胆碱、氧化应激代谢产物、病毒、缺血-再灌注等均可诱导IκB的磷酸化和蛋白降解, 使IκB和NF-κB分离, NF-κB便迅速活化, 然后进入细胞核, 与其靶基因上的启动子或增强子结合而调节基因转录, 激活与细胞应激相关的基因和炎症早期反应基因, 如细胞因子、生长因子和急性期蛋白等, 产生大量的包括TNF-α、IL-1β等炎症因子. 另外, TNF-α等细胞因子也可以通过激活NF-κB诱导激酶(NIK)和丝裂原蛋白激酶的激酶1(MEKK1), 从而使IKK磷酸化而激活, 激活后的IKK再使IκB磷酸化, 后者最后被蛋白酶降解, 从而使NF-κB游离出来而活化, 使信号进一步放大[11]. 大量研究表明, NF-κB在AP中高度表达并诱导TNF-α、IL-1β、IL-6大量表达在AP中发挥重要的作用[12]. 研究显示, 用*N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)阻滞NF-κB活性, 能显著减少胰腺炎症细胞浸润, 降低TNF-α、IL-6等细胞因子基因表达, 有效改善胰腺组织炎症反应[13], 说明NF-κB在SAP发生与发展中发挥关键作用. 这些研究提示通过抑制NF-κB活化进而下调TNF-α mRNA表达是有效改善胰腺炎症损伤一个重要途径.

本研究显示, 模型组大鼠胰腺组织NF-κB活性、TNF-α mRNA表达与假手术组比较明显增高($P<0.01$), 两者呈同一化的进程, 且与病理上胰腺炎症损害严重程度相平行, 这印证了细胞因子在体内呈现网络式的调节, 在AP的发生、发展过程中发挥着重要作用. 研究显示大鼠胰腺组织中NF-κB mRNA在各组间表达差异不明显, 提示NF-κB的活性并非完全由NF-κB mRNA表达所决定. NF-κB mRNA的表达从分子角度反映了基因的转录水平, 转录水平越高, NF-κB表达的数量越多, 一定程度上就可提高NF-κB的活性, 但NF-κB活性变化是受多因素影响的, 在AP发生发展过程中, NF-κB活性的增强主要是因为活化因素的变化导致, 而非NF-κB mRNA表达增多所致, 所以抑制NF-κB活性的有效手段是减少NF-κB活化因素、阻断NF-κB活化途径.

本研究显示黄芪注射液能显著降低大鼠模型胰腺组织NF-κB活性、TNF-α mRNA, 表明其能抑制NF-κB活性, 下调TNF-α等多种炎性因子基因的表达, 使炎症介质、细胞因子的产生减少, 减轻AP的炎症反应, 其机制可能是: (1)AP发生时机体内氧自由基产生增加, 大量产生的氧自由基可以一方面引发链式脂质过氧化反应损伤细胞膜, 产生大量脂质过氧化物, 而氧自由基和脂质过氧化物都是NF-κB重要刺激物, 黄芪有效成分硒、黄芪多糖、木糖-葡萄糖-环黄芪醇可启动DNA修补酶、刺激抗体产生、清除有害自由基, 启动使谷胱甘肽过氧化物酶、阻止黄嘌呤及黄嘌呤酶的氧化损伤发挥抗氧化作用, 抑制的脂质过氧化物的生成[14]; (2)黄芪甲苷可阻止TNF-α、细菌脂多糖诱导NF-κB的核移位与靶基因的κB位点的结合, 从而抑制TNF-α等相应基因的转录[15]. 这就从基因分子水平角度解释了黄芪治疗AP的机制.

4 参考文献

1 盛晓赟, 曹农, 李鸣明. 急性胰腺炎发病机制的研究进展. 甘肃中医学院学报 2008; 25: 52-54
2 Algül H, Tando Y, Schneider G, Weidenbach H, Adler G, Schmid RM. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. *Pancreatology* 2002; 2: 503-509
3 张宇, 李进京, 孙红岩, 苏明. 黄芪叶对损伤胰腺的保护作用. 中药材 2007; 30: 1433-1434
4 孙海燕, 黄民, 关溯. 黄芪总苷对实验性急性胰腺炎的保护作用. 时珍国医国药 2006; 17: 1980-1981
5 Zhang XH, Zhu RM, Xu WA, Wan HJ, Lu H. Therapeutic effects of caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute

pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 623-627
6 Rau B, Paszkowski A, Lillich S, Baumgart K, Möller P, Beger HG. Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis. *Lab Invest* 2001; 81: 1001-1013
7 Zhang XP, Zhang L, He JX, Zhang RP, Cheng QH, Zhou YF, Lu B. Experimental study of therapeutic efficacy of Baicalin in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 717-724
8 程石, 杨彬, 闫文貌, 史敬东, 宋茂民. 抗TNF-α治疗对重症急性胰腺炎肺损伤NF-κB信号通路的影响. 中国普通外科杂志 2008; 17: 219-223
9 Zyromski N, Murr MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 235-237
10 Zhang Q, Ni Q, Cai D, Zhang Y, Zhang N, Hou L. Mechanisms of multiple organ damages in acute necrotizing pancreatitis. *Chin Med J* (Engl) 2001; 114: 738-742
11 Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-288
12 Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1197-G1208
13 邹忠东, 张再重, 宋香全, 王烈, 涂小煌, 陈少全, 王瑜. N-乙酰半胱氨酸对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3894-3899
14 陈国辉, 黄文凤. 黄芪化学成份、药理活性与临床应用概述. 海峡药学 2008; 20: 13-16
15 Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR, Wojta J. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Thromb Haemost* 2003; 90: 904-914

■同行评价
本研究的贡献是从基因分子水平解释了黄芪治疗急性胰腺炎的机制, 对临床治疗有指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T1/2不能写成tl/2或$T_{\frac{1}{2}}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1074-1078
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)》是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊. OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍. OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展.

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版. 《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术.

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录. 2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位. 《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位.

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H.pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或T^1_2, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、－及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 ℃±1.2 ℃, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1×10^{12}/L, WBC数用1×10^{9}/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁.例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希文小写υ; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用$^aP<0.05$, $^bP<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第三套为$^eP<0.05$, $^fP<0.01$等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名，按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线"-"分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: "潘伯荣"的汉语拼写法为"Bo-Rong Pan".

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写P, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进.

角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf. 审稿过程平均时间需要14-28 d. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬).

5 修回稿须知

5.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

5.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部
北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-8538-1901
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http: //www.wjgnet.com

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1056-1062
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

中医药治疗慢性萎缩性胃炎的系统评价

黄宣, 吕宾

■背景资料
慢性萎缩性胃炎(CAG)是以胃黏膜萎缩变薄, 固有腺体减少或消失, 可伴有肠上皮化生、异型增生为病理特点的消化系常见病、疑难病. 多项研究表明CAG检出率与胃癌病死率正相关, 肠化生与胃癌的发病亦正相关. 现有西药可改善CAG的一些症状, 但对于逆转萎缩, 特别是伴有肠腺化生或不典型增生的病理改变疗效不明确. 中医药在治疗CAG上有其独特的优势, 具有辨证论治、个体化、方药随证加减, 不良反应少等特点. 为了客观评价中医药在CAG治疗中的作用, 本课题组从循证医学的角度进行了该研究.

■同行评议者
李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心

黄宣, 吕宾, 浙江中医药大学附属第一医院消化内科 浙江省杭州市 310006
作者贡献分布: 黄宣与吕宾对此文所作贡献均等; 此课题由黄宣与吕宾设计; 研究过程由黄宣与吕宾操作完成; 数据分析由黄宣与吕宾完成; 本论文写作由黄宣与吕宾完成.
通讯作者: 吕宾, 教授, 主任医师, 博士生导师, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江中医药大学附属第一医院消化内科. lvbin@medmail.com.cn
收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-02-09
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-04-08

Treatment of chronic atrophic gastritis with Chinese medicines: a systematic review

Xuan Huang, Bin Lv

Xuan Huang, Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Professor Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn
Received: 2009-12-18 Revised: 2010-02-09
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To systematically evaluate the efficacy and safety of traditional Chinese medicines and Western medicines in the treatment of chronic atrophic gastritis.

METHODS: The randomized clinical trials (RCTs) that compared the efficacy or safety of traditional Chinese medicines and Western medicines in the treatment of chronic atrophic gastritis were retrieved by searching Cochrane library, PubMed, OVID, CNKI, and VIP Chinese Scientific and Technological Periodical Database. Trials were considered to be of high quality if the Jaded scale score was 3 or more. Statistical heterogeneity between trials was evaluated using Revman 4.2. Heterogeneity of the included articles was tested to select proper effect models for calculation. Publication bias was investigated through visual inspection of funnel plots and Egger's regression model.

RESULTS: Eight RCTs including 804 patients were analyzed. Compared with Western medicine group, Chinese medicines significantly improved excellent response rate, overall response rate, pathological symptoms (atrophy, intestinal metaplasia, and dysplasia) and adverse effects, and the total odd ratios (*OR*) were 4.17 [95% confidence interval (CI): 2.32-7.52], 5.79 (95%CI: 4.09-8.21), 5.06 (95%CI: 2.83-9.08), 5.67 (95%CI: 2.74-11.73), 4.72 (95%CI: 1.93-11.51), and 0.20 (95%CI: 0.09-0.47), respectively. No significant difference was noted in the total OR of negative conversion of *Helicobacter pylori* infection between the two groups ($P > 0.05$). Inspection of the funnel plots for all outcome measures did not reveal evidence of publication bias ($P = 0.781$, 0.791, 0.702, 0.645, 0.593 and 0.779, respectively).

CONCLUSION: Chinese medicines are superior to Western medicines in improving excellent response rate, overall response, and pathological symptoms and adverse effects in patients with chronic atrophy gastritis.

Key Words: Chronic atrophy gastritis; Traditional Chinese medicine; Meta-analysis

Huang X, Lv B. Treatment of chronic atrophic gastritis with Chinese medicines: a systematic review. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(10): 1056-1062

摘要

目的: 系统评价中医药与西医治疗慢性萎缩性胃炎的疗效与安全性.

方法: 检索Cochrane图书馆、PubMed、OVID数据库和中国期刊网中与维普中文科技期刊全文数据库的英文和中文随机对照试验(RCT)文献, 将Jadad积分≥3分高质量文章纳入研究, 并提取纳入研究的特征信息. 数据分析采用Revman软件,检验异质性, 并根据异质性结果选择相应的效应模型. 最后绘制漏斗图及Egger回归方程评定有无发表偏倚.

结果: 8项RCT, 804例患者入选. 与对照组相比, 中医药组的总显效率(OR = 4.17, 95%CI: 2.32-7.52)、总有效率(OR = 5.79, 95%CI:

4.09-8.21)、病理学改善: 萎缩(OR = 5.06, 95%CI: 2.83-9.08)、肠化(OR = 5.67, 95%CI: 2.74-11.73)、不典型增生(OR = 4.72, 95%CI: 1.93-11.51)、不良反应发生方面(OR = 0.20, 95%CI: 0.09-0.47), 差异具统计学意义(均P<0.05). 在中、西医治疗*H.pylori*方面, 两组无统计学差异(OR = 5.56, 95%CI: 0.55-56.67). 中医药组与对照组在CAG治疗中总显效率、总有效率、*H.pylori*转阴率、病理改善情况(萎缩、肠化、不典型增生)的漏斗图均基本呈现下宽上窄左右对称的图形, 线性回归常数项检验统计量表明无发表偏倚, P值分别为0.781、0.791、0.702、0.645、0.593及0.779.

结论: 中医药组对CAG的总显效率、总有效率、病理学改善等方面明显优于西医组, 同时在不良反应发生率方面, 中医药组明显低于西医组.

关键词: 慢性萎缩性胃炎; 中医药疗法; Meta分析

黄宣, 吕宾. 中医药治疗慢性萎缩性胃炎的系统评价. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 1056–1062
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1056.asp

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophy gastritis, CAG)是以胃黏膜萎缩变薄, 固有腺体减少或消失, 可伴有肠上皮化生、异型增生为病理特点的消化系常见病、疑难病. 多项研究表明CAG检出率与胃癌病死率正相关, 肠化生与胃癌的发病亦正相关[1]. 现代医学的检查手段对萎缩性胃炎的确诊有重要作用, 可以早期发现病变. 现有西药可改善CAG的一些症状, 但对于逆转萎缩, 特别是伴有肠腺化生或不典型增生的病理改变疗效不明确. CAG属中医学痞满、嘈杂、胃脘痛等病证范畴, 因其病因、机制复杂, 病势缠绵, 且易癌变而备受重视. 中医药在治疗CAG上有其独特的优势, 具有辨证论治、个体化、方药随证加减, 不良反应少等特点. 重视整体治疗、侧重健脾扶正的思想, 从而改善患者症状, 延缓萎缩进展, 甚或逆转萎缩. 为了客观评价中医药在CAG治疗中的作用, 我们从循证医学的角度进行了该研究.

1 材料和方法

1.1 材料 以萎缩性/胃炎、随机对照、临床试验、随机对照试验、随机、中医、randomized controlled trial、chronic atrophic gastritis、Chinese medicine、herbal medicine、traditional medicine、random等为检索词, 检索Cochrane图书馆、PubMed、OVID数据库、中国期刊网、维普数据库, 共检出中医药治疗CAG的RCT文献254篇, 其中治疗组为中西医结合24篇、对照组为中西医结合36篇、对照组为中医药110篇(其中1篇为英文发表)、对照组为单纯西医治疗为84篇.

1.2 方法

1.2.1 文献纳入与排除标准: 文献符合下列标准时纳入本研究: (1)文献提供病例入选标准, 研究方法为RCT, 且文献质量要求Jadad评分[2]≥3分者; (2)研究对象为CAG, 研究中诊断及疗效判定采用1982年重庆会议制订的《慢性萎缩性胃炎(CAG)胃镜及病理诊断标准和慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准》, 或1989年南昌会议制定的《慢性胃炎中西医结合诊断、辨证标准(试行方案)》、或《中药新药治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究指导原则》[3]等; (3)入选研究方案: 研究组为中医药治疗, 对照组为西药治疗; (4)入选文献语种: 英文或中文; (5)比较中医药与其他疗法疗效时, 含1个或1个以上下列疗效评价指标: 痊愈率、总显效率、总有效率、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)阴转率、病理改善情况、不良反应等; 排除标准: 治疗组合并有西医药治疗, 对照组为中医药或合用有中医药. 仅有摘要者, 因为提供信息不充分, 亦排除本研究.

1.2.2 资料提取与质量的评价: 由两名评价员对纳入试验独立进行质量评价和资料提取, 然后交叉核对, 如有分歧通过讨论解决. 主要内容包括: (1)一般资料: 题目、研究者姓名、时期和文献来源; (2)研究特征: 研究对象的特征、干预措施(干预措施、剂量、疗程、随访时间等)和质量控制; (3)结果测量: 痊愈率、总显效率、总有效率、*H.pylori*阴转率、病理改善情况等. 如遇不一致时通过讨论解决. 纳入研究的方法学质量评估按照Jadad评分, 对随机对照试验的质量进行评价, 详见表1. 此外, 还评价各研究的患者依从性以判断实施性偏倚; 对研究的基线相似性进行分析以辅助评价选择性偏倚.

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan 4.2.7软件进行Meta分析. 对各研究的两组的OR值进行异质性检验. 如果OR值齐性, 采用固定效应模型Peto法作合并效应量估计. 如果OR值非齐性, 尽可能找出异质性的来源, 如不

■研发前沿
中医药被广泛用于CAG的治疗, 并获得了不少经验. 临床医生在临床研究中采用固定方加减、基础方加减, 或随证加减治疗, 取得了较好的疗效. 但由于方法不同, 临床研究仍然存在科研设计不合理、诊疗评价不规范等问题, 故疗效或好或差, 尚缺乏统一的认识.

■应用要点
现代医学的检查手段对萎缩性胃炎的确诊有重要作用，可以早期发现病变.

表 1 Jadad评分标准

指标	符合要求	不符合要求
分组方案	根据随机数字表或计算机随机产生的数字(2分)	未有描述(1分)、半随机或假随机(0分)
分组隐藏	随机数字置于封好的信封中或类似方法(2分)	未有描述(1分)、随机数字打开或轻易可见(0分)
双盲	对照组严格采用安慰剂或类似的盲法方案(2分)	未采用安慰剂方案(1分)、两组用药途径完全不同或无盲法(0分)
随访	描述了任何失访或退出的人数及理由(1分)	未描述失访或退出的人数及理由(0分)

总分<3分者为低质量文章，≥3分者为高质量文章.

表 2 纳入研究的临床资料特征

作者	年份	*n*	平均年龄	中医证候	治疗组	对照组	疗程
张占海等[5]	1998	31/29	–	虚痞	胃安胶囊	维酶素	3–6 mo
王铁武等[6]	2001	61/20	–	–	胃康灵	雷尼替丁	1 mo
钟力等[7]	2001	47/43	50.4/52.1	–	胃萎消胶囊	维酶素	6 mo
黄修解[8]	2002	59/59	48	脾虚兼血瘀气滞型	胃萎康合剂	维酶素	6 wk
蓝惠玲等[9]	2005	30/30	53.3/50.9	脾胃虚弱型	胃炎I号	多酶片	14 wk
刘启泉等[10]	2005	89/75	56.3/54.3	–	胃安颗粒	雷尼替丁 维酶素	3 mo
王宇光[11]	2006	48/48	–	肝胃不和型、脾胃虚弱型、脾胃湿热	清幽愈萎汤	丽珠铋三联	1 mo
孟兆君等[12]	2006	75/60	48.9/–	肝胃不和型、脾胃虚弱型等5型	胃舒饮	阿莫西林、甲硝唑、果胶铋、吗丁啉	2 mo

存在临床异质性和方法学异质性，则采用随机效应模型进行合并分析，即Der Simonian和Laird方法进行统计. 同时我们根据美国医学会杂志(JAMA)建议的办法，使用固定效应模型和随机效应模型计算合并统计量，当两模型研究结果不一致时，分析可能产生临床异质性和统计学异质性的原因；若排除以上因素干扰后，结果仍存在异质性时，报告使用随机效应模型的结果. 分别以纳入Meta分析的总显效率、总有效率、*H.pylori*转阴率、病理改善情况(萎缩、肠化、不典型增生)、不良反应的*OR*值为横坐标，以SE(log*OR*)为纵坐标绘制漏斗图，通过观察其对称性，评估发表偏倚的影响. 并根据Egger等[4]提出的偏倚线性回归方法分析发表偏倚. *OR*值除以其标准误(作用大小)与标准误的倒数(精确度)回归分析，$P>0.05$，提示无发表偏倚.

2 结果

2.1 检索结果处理 254篇RCT中，采用的诊断标准不下10余种，其中诊断标准最常见的是使用最多的是1982年重庆全国胃炎会议制定的诊断标准，占27%，而中医药诊断1989-11中国中西医结合研究会消化系统专业委员会南昌会议制订的《慢性胃炎中西医结合诊断辨证标准(试行草案)》占19%. 2000年全国慢性胃炎研讨会制定的诊断标准约占3%，悉尼分类占4%，2002年《中药新药治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究指导原则》占6%，不参照任何标准，随意下诊断的有20%以上. 对照组为单纯西医治疗的84篇文献中高质量的RCT研究仅8项[5-12]，详见表2.

2.2 总显效率 总显效率包括痊愈率与显效率. 异质性分析显示，$\chi^2 = 20.76$，$P = 0.004$；采用随机效应模型：$OR = 4.17$，95%CI: 2.32-7.52，$P<0.00001$，中医药治疗至少可增加CAG总显效率的1.32倍(表3).

2.3 总有效率 总有效率包括痊愈率、显效率与有效率. 异质性分析显示，$\chi^2 = 11.41$，$P = 0.12$，采用固定效应模型：$OR = 5.79$，95%CI: 4.09-8.21，$P<0.00001$，中医药治疗至少可增加CAG总有效率的3.09倍(表4).

2.4 *H.pylori*转阴率 见表5，共有3项RCT报道了*H.pylori*复查情况，但有2项研究未说明*H.pylori*

■同行评价
本研究选题实用, 结果可靠, 有一定的临床指导价值.

表 3 中、西医治疗CAG总显效率

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	OR (random) 95%CI	Weight (%)	OR (random) 95%CI
张占海等[5]	25/31	9/29		10.84	9.26 [2.82, 30.39]
王铁武等[6]	14/61	3/20		9.50	1.69 [0.43, 6.61]
钟力等[7]	22/47	6/43		12.14	5.43 [1.93, 15.28]
黄修解[8]	45/59	7/59		12.53	23.88 [8.86, 64.34]
蓝惠玲等[9]	15/30	10/30		12.07	2.00 [0.70, 5.68]
刘启泉等[10]	74/89	42/75		15.08	3.88 [1.89, 7.95]
孟兆君等[12]	45/75	21/60		15.22	2.79 [1.38, 5.63]
王宇光[11]	40/48	34/48		12.62	2.06 [0.77, 5.49]
Total (95%CI)	440	364		100.00	4.17 [2.32, 7.52]

Total events: 280(Treatment), 132(Control)
Test for heterogeneity: χ^2 = 20.76, df = 7 (P = 0.004), I^2 = 66.3%
Test for overall effect: Z = 4.76 (P<0.00001)

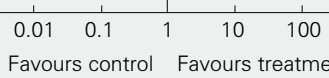
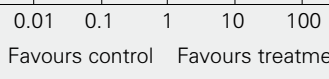


表 4 中、西医治疗CAG总有效率

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	Peto OR 95%CI	Weight (%)	Peto OR 95%CI
张占海等[5]	30/31	22/29		5.58	5.93 [1.35, 25.96]
王铁武等[6]	55/61	7/20		8.67	20.79 [6.36, 67.96]
钟力等[7]	43/47	23/43		14.06	6.83 [2.70, 17.32]
黄修解[8]	55/59	27/59		19.97	9.20 [4.22, 20.08]
蓝惠玲等[9]	26/30	18/30		9.45	3.82 [1.23, 11.89]
刘启泉等[10]	83/89	56/75		16.75	4.18 [1.78, 9.80]
孟兆君等[12]	69/75	40/60		16.53	5.04 [2.14, 11.88]
王宇光[11]	43/48	40/48		8.99	1.70 [0.53, 5.43]
Total (95%CI)	440	364		100.00	5.79 [4.09, 8.21]

Total events: 404(Treatment), 233(Control)
Test for heterogeneity: χ^2 = 11.41, df = 7 (P = 0.12), I^2 = 38.6%
Test for overall effect: Z = 9.87 (P<0.00001)



复查时间, 因此我们采用*H.pylori*转阴率描述. 异质性分析显示, χ^2 = 15.26, P = 0.0005, 采用随机效应模型, 得OR = 5.56, 95%CI: 0.55-56.67, P = 0.15.

2.5 病理学改善情况 病理学改善根据萎缩、肠化、不典型增生3方面. 共有3项RCT报道了病理学改善情况. 异质性检验均提示P>0.1, 故采用固定效应模型, 得: OR = 5.06, 95%CI: 2.83-9.08, P<0.00001; OR = 5.67, 95%CI: 2.74-11.73, P<0.00001; OR = 4.72, 95%CI: 1.93-11.51, P = 0.0006(表6).

2.6 不良反应发生率 仅1项RCT报道了不良反应的发生情况, 中医药组发生率为14.6%, 西药组为50%(OR = 0.20, 95%CI: 0.09-0.47, P = 0.0002). 常见的不良反应均为恶心、呕吐(表7).

2.7 发表偏倚 中医药组与对照组在CAG治疗中总显效率、总有效率、*H.pylori*转阴率、病理改善情况(萎缩、肠化、不典型增生)的漏斗图均基本呈现下宽上窄左右对称的图形, 线性回归常数项检验统计量: P = 0.781、0.791、0.702、

表 5 中、西医治疗CAG的*H.pylori*转阴率

Study or sub-category	Treatment *n/N*	Control *n/N*	*OR* (random) 95%CI	Weight (%)	*OR* (random) 95%CI
01 Sub-category					
张占海等[5]	10/13	2/12		30.19	16.67 [2.27, 122.21]
钟力等[7]	26/33	5/29		34.76	17.83 [4.98, 63.78]
Subtotal (95%CI)	46	41		64.96	17.48 [5.97, 51.16]
Total events: 36(Treatment), 7(Control)					
Test for heterogeneity: χ^2 = 0.00, df = 1 (P = 0.96), I^2 = 0%					
Test for overall effect: Z = 5.22 (P<0.00001)					
02 sdfsfd					
王宇光[11]	41/48	43/48		35.04	0.68 [0.20, 2.32]
Subtotal (95%CI)	48	48		35.04	0.68 [0.20, 2.32]
Total events: 41(Treatment), 43(Control)					
Test for heterogeneity: not applicable					
Test for overall effect: Z = 0.61 (P = 0.54)					
Total (95%CI)	94	89		100.00	5.56 [0.55, 56.67]
Total events: 77(Treatment), 50(Control)					
Test for heterogeneity: χ^2 = 15.26, df = 2 (P = 0.0005), I^2 = 86.9%					
Test for overall effect: Z = 1.45 (P = 0.15)					

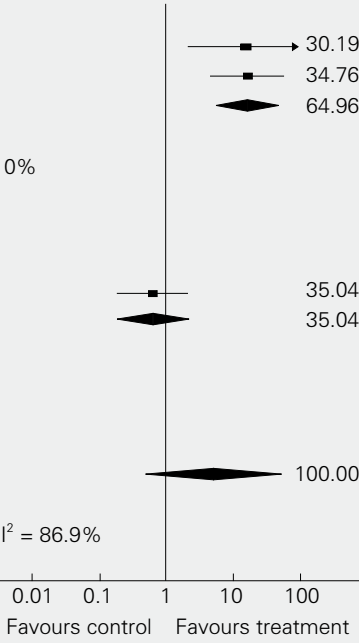


表 6 中、西医治疗CAG病理学

Study or sub-category	Treatment *n/N*	Control *n/N*	Peto *OR* 95%CI	Weight (%)	Peto *OR* 95%CI
01 萎缩					
张占海等[5]	5/31	0/29		4.98	7.97 [1.30, 49.05]
钟力等[7]	33/47	17/43		23.99	3.42 [1.49, 7.82]
黄修解[8]	20/59	2/59		19.31	7.35 [2.92, 18.48]
Subtotal (95%CI)	137	131		48.28	5.06 [2.83, 9.08]
Total events: 58(Treatment), 19(Control)					
Test for heterogeneity: χ^2 = 1.73, df = 2 (P = 0.42), I^2 = 0%					
Test for overall effect: Z = 5.45 (P<0.00001)					
02 肠化					
张占海等[5]	10/12	1/7		4.87	14.64 [2.33, 91.93]
钟力等[7]	19/37	4/32		16.56	5.60 [2.07, 15.17]
黄修解[8]	9/23	3/22		9.62	3.58 [0.97, 13.22]
Subtotal (95%CI)	72	61		31.05	5.67 [2.74, 11.73]
Total events: 38(Treatment), 8(Control)					
Test for heterogeneity: χ^2 = 1.50, df = 2 (P = 0.47), I^2 = 0%					
Test for overall effect: Z = 4.67 (P<0.00001)					
03 不典型增生					
张占海等[5]	3/4	0/2		1.71	12.18 [0.55, 270.15]
钟力等[7]	14/21	3/18		10.47	7.25 [2.07, 25.39]
黄修解[8]	7/18	4/19		8.49	2.29 [0.57, 9.23]
Subtotal (95%CI)	43	39		20.67	4.72 [1.93, 11.51]
Total events: 24(Treatment), 7(Control)					
Test for heterogeneity: χ^2 = 1.84, df = 2 (P = 0.40), I^2 = 0%					
Test for overall effect: Z = 3.41 (P = 0.0006)					

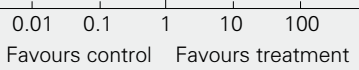
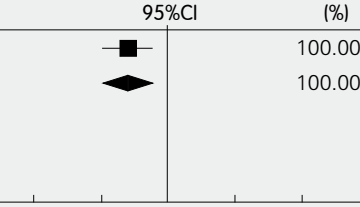


表 7 中、西医治疗CAG不良反应发生率

Study or sub-category	Treatment *n/N*	Control *n/N*	Peto *OR* 95%CI	Weight (%)	Peto *OR* 95%CI
王宇光[11]	7/48	24/48		100.00	0.20 [0.09, 0.47]
Subtotal (95%CI)	48	48		100.00	0.20 [0.09, 0.47]
Total events: 7(Treatment), 24(Control)					
Test for heterogeneity: not applicable					
Test for overall effect: Z = 3.69 (P = 0.0002)					



0.645、0.593及0.779, 无发表偏倚.

3 讨论

近年来西药在治疗CAG方面却一直未能取得突破性进展, 目前他的治疗多以对症治疗为主, 药用抗酸剂、促动力药、叶酸、维甲酸等, 有*H.pylori*感染者进行根除治疗, *H.pylori*根除后多数或全部胃黏膜炎症的活动度消失[13], 但对肠化生及萎缩的影响仍存在争议[14,15]. 中药治疗作为中国传统医药的主要治疗手段, 目前在治疗CAG方面受到了国内外相当的关注, 中医药被广泛用于CAG的治疗, 并获得了不少经验. 临床医生在临床研究中采用固定方加减、基础方加减, 或随证加减治疗, 取得了较好的疗效. 但由于方法不同, 临床研究仍然存在科研设计不合理、诊疗评价不规范等问题, 故疗效或好或差, 尚缺乏统一的认识. 因此我们采用循证医学的方法, 对国内外中医药治疗CAG的疗效与安全性的RCT作一系统评价.

我们研究发现, 与西医组相比, 中医药组的总显效率、总有效率、病理学改善(萎缩、肠化、不典型增生)的分析结果为: OR = 4.17(95%CI: 2.32-7.52)、OR = 5.79(95%CI: 4.09-8.21)、OR = 5.06(95%CI: 2.83-9.08); OR = 5.67(95%CI: 2.74-11.73); OR = 4.72(95%CI: 1.93-11.51). 合并OR值越大, 中医药组的对CAG的总显效率、总有效率、病理学改善等较西医组越明显. 同时两组在不良反应发生方面的OR值为0.20, 提示中医药组不良反应的发生率明显低于西医组. 对中医药与西医治疗*H.pylori*方面的分析: OR = 5.56(95%CI: 0.55-56.67), 表明两组无统计学差异. 由于存在异质性, 我们作了进一步分析, 发现由于2项研究对照组采用的是维酶素, 药理学上无抗*H.pylori*疗效, 另一项对照组采用的是有抗*H.pylori*疗效的丽珠胃三联, 故根据对照组药理学上有无抗*H.pylori*疗效作了亚组分析, 显示异质性主要来源于此.

纳入本文的8项RCT研究诊断标准统一, 各研究采用随机分组, 论文的Jada分均>3分, 可以较好地控制混杂因素对Meta分析的影响. 考虑到阳性结果的研究文章有可能比阴性结果的文章更易于发表而造成发表性偏倚问题, 本研究通过多种途径(包括微机检索、手工检索和文献追溯)尽可能全面收集有关文献. 对于重复发表的文献, 一律剔除其中的短篇文献, 使重复发表偏倚得以控制. 在异质性检验时, P<0.1, 采用随机效应模型, 对异质性进行部分纠正及提高估算的可信区间的精度, 并进行亚组分析, 以明确异质性的来源. 同时我们采用了绘制倒漏斗与Egger回归分析, 发现总显效率、总有效率、*H.pylori*转阴率、病理改善情况等的漏斗图均呈对称的倒漏斗形, 线性回归常数项检验统计量, 均P>0.05, 提示无发表偏倚. 因此说明本研究结果可靠. 但分析文献, 我们认为中医药治疗CAG的研究存在以下问题: (1)需建立规范的疗效评价体系: 在254篇RCT中, 采用的诊断标准不下10余种, 其中诊断标准最常见也是使用最多的为1982年重庆全国胃炎会议制定的诊断标准, 占27%, 而中医药诊断1989-11中国中西医结合研究会消化系统专业委员会南昌会议制订的《慢性胃炎中西医结合诊断辨证标准(试行草案)》占19%. 2000年全国慢性胃炎研讨会制定的诊断标准约占3%, 悉尼分类占4%, 2002年《中药新药治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究指导原则》占6%, 不参照任何标准, 随意下诊断的有20%以上. 因此目前我国临床对慢性胃炎的诊断无论是内镜还是病理检查, 即便有诊断标准, 标准也不统一, 且多已陈旧过时, 这在基层医院尤为突出. 这一现状将严重影响我国慢性胃炎诊断水平的提高. 同时, 诊断标准的不统一既影

响对临床资料的评价, 使某地研究结果不能在另一地重复, 更使我国在该领域的研究难以与国际接轨. (2)规范临床科研设计: RCT文献数量较多, 但高质量的RCT偏少. 在对照组为西医组84篇研究中, 目前存在以下问题: 纳入文献中6篇正确地说明随机分组方法, 而绝大多数仅提到“随机”而未对随机分组方法进行简要描述, 这使读者无法判断其随机分组方法正确与否. 由于CAG分为3度, 程度不同其预后存在较大差异, 所以研究应用分层随机法. 而纳入文献中均未采用分层随机法. 纳入文献无1篇交代样本含量的估算依据, 并且分组后每组例数大于50例(大样本)的仅3篇. 普遍缺乏大样本多中心的协作研究, 结论缺乏充分依据, 加上小样本的阴性结论未能被充分发表, 易产生发表性偏倚. 在研究中常有样本失访、无应答、干扰、退出等情况出现, 此时就应采用意向性分析, 把上述病例作无效处理, 以免夸大干预的效果. 而纳入文献无1篇用意向性分析. 许多研究措施存在不良反应, 读者应全面了解该研究措施的有益和不良效应, 才能对该措施有更客观的了解, 以便权衡利弊. 而纳入文献仅1篇[11]报道不良反应. (3)科研设计尚需合理严密: 对照组设置的不合理, 有研究者西医对照组连续服用丽珠胃三联等含有抗生素药物1-2 mo. 疗程较短, 部分学者采用的疗程是1 mo, 而CAG的病程较长, 而胃黏膜萎缩腺体的恢复需要3-5 mo, 因此以3 mo为1个疗程较适宜, 根据病情轻重, 选择治疗1-2个疗程后进行复查, 判断疗效, 使中医药治疗CAG的疗效具客观性, 有说服力.

本研究表明, 我国目前治疗性RCT的数量、质量均有待提高, 应加强RCT的临床方法的设计, 尽量做到真正的随机化、正确分配样本量, 采用盲法、选择合理的对照, 制定适宜的纳入和排除标准, 严格观察并如实记录药物不良反应等. 进一步提高临床试验的质量, 同时需组织大规模、多中心的临床研究来进一步论证, 为临床实践提供可靠有力的证据.

4 参考文献

1 Hoshi T, Sasano H, Kato K, Ohara S, Shimosegawa T, Toyota T, Nagura H. Cell damage and proliferation in human gastric mucosa infected by Helicobacter pylori--a comparison before and after H pylori eradication in non-atrophic gastritis. *Hum Pathol* 1999; 30: 1412-1417

2 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12

3 郑筱萸. 中药新药治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究指导原则. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 125-129

4 Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315: 629-634

5 张占海, 杨丽彩, 危北海, 赵子厚, 金敬善, 朱纯周, 刘晋生, 赵敏, 赵荣莱, 李乾构. 中药胃安胶囊治疗慢性萎缩性胃炎(虚痞)60例临床观察. 中医杂志 1998; 39: 539-541

6 王铁武, 吕建国. 胃康灵治疗浅表性和萎缩性胃炎221例疗效观察. 宁夏医学杂志 2001; 23: 415-416

7 钟力, 俞一新, 张萍, 王淑惠. 胃萎消胶囊治疗慢性萎缩性胃炎47例临床观察. 湖南中医药导报 2001; 7: 362-363

8 黄修解. 胃萎康合剂治疗慢性萎缩性胃炎59例. 陕西中医 2002; 23: 595-596

9 蓝惠玲, 刘友章, Thongdavanh S. 胃炎Ⅰ号方治疗慢性萎缩性胃炎30例疗效观察. 广州中医药大学学报 2005; 22: 170-173

10 刘启泉, 王志坤, 白海燕, 杜艳如. 胃安颗粒治疗慢性萎缩性胃炎合并消化性溃疡临床观察. 辽宁中医杂志 2005; 32: 1264-1265

11 王宇光. 清幽愈萎汤治疗幽门螺杆菌相关萎缩性胃炎临床观察. 沈阳部队医药 2006; 19: 40-41

12 孟兆君, 张汝建, 徐信杰, 房泽岱. 中医辨证治疗慢性萎缩性胃炎75例. 中国中医药信息杂志 2006; 13: 53-54

13 Valle J, Seppälä K, Sipponen P, Kosunen T. Disappearance of gastritis after eradication of Helicobacter pylori. A morphometric study. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 1057-1065

14 吕宾, 王慧萍, 陈明涛, 范一宏, 孟立娜. 根除幽门螺杆菌对胃黏膜萎缩和肠化影响的随访研究. 中华内科杂志 2004; 43: 299-301

15 Satoh K, Kimura K, Takimoto T, Kihira K. A follow-up study of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after eradication of Helicobacter pylori. *Helicobacter* 1998; 3: 236-240

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志 2010年4月8日; 18(10): 1079
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

2010年国内国际会议预告

2010-04-14/18
第四十五届欧洲肝脏研究协会会议(EASL)
会议地点: 奥地利, 维也纳
联系方式: http://www2.kenes.com/liver-congress/pages/home.aspx

2010-04-16/17
2010消化疾病诊断与鉴别诊断临床思维医师论坛
会议地点: 北京市
联系方式: cmdabm@yahoo.com.cn

2010-05-01/05
美国消化疾病周(DDW)
会议地点: 美国, 新奥尔良
联系方式: http://www.ddw.org/wmspage.cfm?parm1=679

2010-05-13/16
第四届MDCA肿瘤分子靶向及个体化医疗高峰论坛
会议地点: 北京市
联系方式: 010-58430577

2010-05-13/15
第五届全国疑难及重症肝病大会
会议地点: 南京市
联系方式: office@cnsld.org

2010-05-28/31
2010中国普外科焦点问题学术论坛
会议地点: 兰州市
联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06
2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会
会议地点: 合肥市
联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06
第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛
会议地点: 北京市
联系方式: luoch301@gmail.com; luoch301@gmail.com

2010-06-17/21
2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日
会议地点: 厦门市
联系方式: zhgz@vip.163.com

2010-08-18/21
第二十一届世界癌症大会
会议地点: 深圳市
联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22
第二十二次全国中西医结合消化学术会议
会议地点: 苏州市
联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01
中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议
会议地点: 成都市
联系方式: http://www.csgd.org.cn/2010/

2010-09-08/12
第九届全国介入放射学学术大会
会议地点: 广州市
联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11
中华医学会第十一次全国感染病学术会议
会议地点: 重庆市
联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12
第四届国际肝病学会年会
会议地点: 加拿大, 蒙特利尔
联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19
第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会
会议地点: 北京市
联系方式: http://reg.csco.org.cn/reg2010/

2010-10-23/27
第十八届欧盟胃肠病周
会议地点: 西班牙, 巴塞罗那
联系方式: http://uegw10.uegf.org/

2010-08-19/22
第二十二次全国中西医结合消化学术会议
会议地点: 苏州市
联系方式: szzyy88@163.com; czs.xiaohua@163.com

2010-10-28/30
中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议
会议地点: 成都市
联系方式: yjliu@cma.org.cn

2010-11-18/21
第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛
会议地点: 上海市
联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

•志谢•

志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!

曹洁 副教授
中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

曹秀峰 教授
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

高泽立 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

顾岩 教授
上海交通大学医学院附属上海第九人民医院外科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

陆伦根 教授
上海交通大学附属第一人民医院消化科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

朴云峰 教授
吉林大学第一临床医院消化科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院外科

任超世 研究员
中国医学科学院生物医学工程研究所

沈克平 主任医师
上海龙华医院肿瘤五科

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

王蒙 副教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

宣世英 教授
山东省青岛市市立医院肝病内科

颜宏利 教授
中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

于则利 教授
首都医科大学附属北京同仁医院外科

余宏宇 教授
中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张声生 教授
首都医科大学附属北京中医医院消化中心

周伟平 教授
上海东方肝胆外科医院肝外三科

邹小明 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科