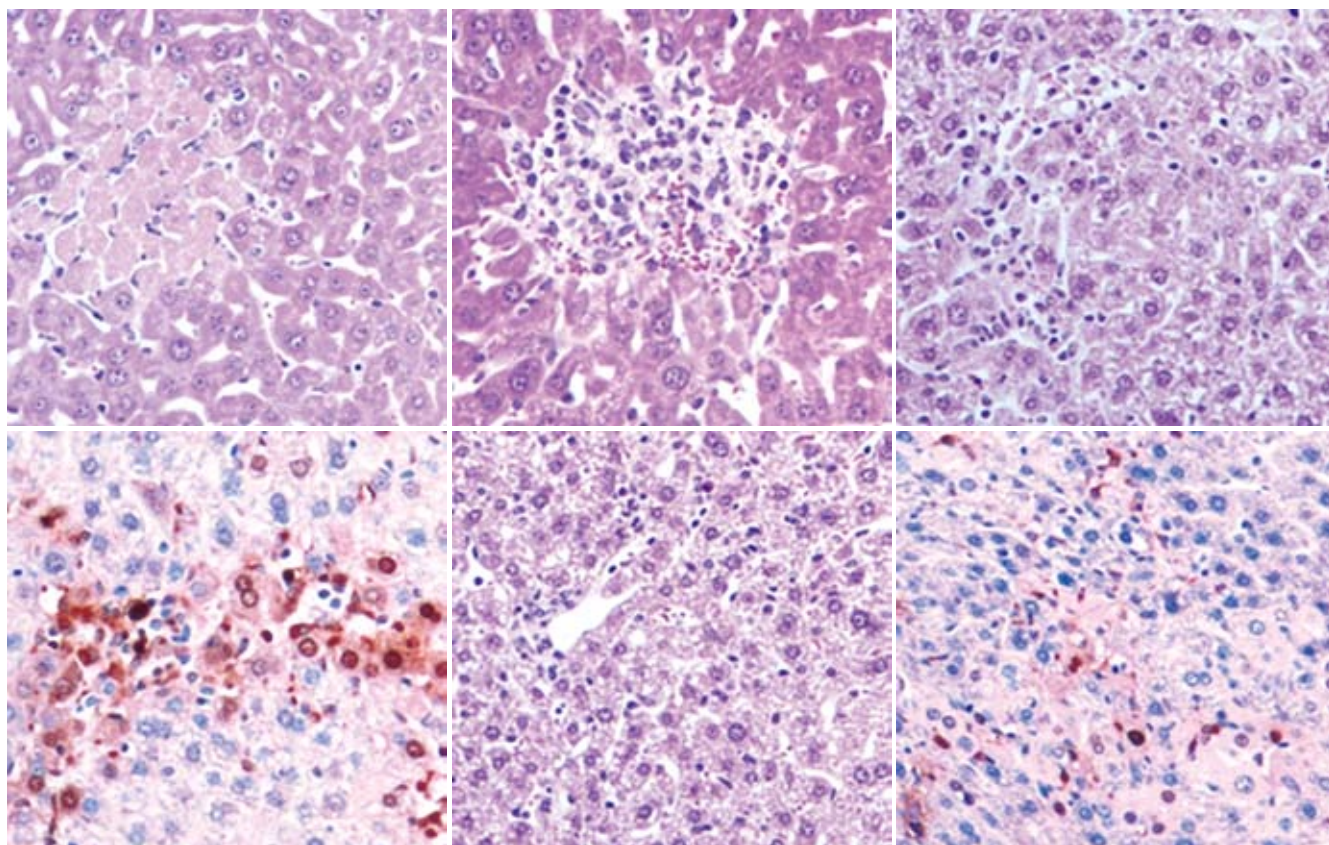


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010 年 8 月 28 日 第 18 卷 第 24 期 (Volume 18 Number 24)



24 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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
聂新明教授
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
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承尧教授
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
郑素军副主任医师
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
陈立波教授
陈凜教授
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
英卫东教授
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
邵升副教授
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

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
李璦教授
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
王钦红教授
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
阴赅宏研究员
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
李晟磊副主任医师
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8月28日 第18卷 第24期 (总第320期)

述 评

2511 食管癌新辅助放化疗对手术及生存率的影响

曹秀峰

基础 研究

2515 三氧化二砷在低氧下对人肝癌细胞株HepG2增殖、凋亡及HIF-1 α 表达的影响

夏德涛, 张栋, 肖伟玲

2521 生长抑素对应激下胆囊收缩素介导的胆汁反流的抑制作用

司新敏, 黄磊, 施瑞华, 罗和生

2528 Sphk1对人结肠癌细胞株Lovo增殖与侵袭的影响及其作用机制

钟月圆, 黄杰安, 刘诗权, 覃蒙斌, 金卉

临 床 研 究

2533 mTOR及CyclinD1蛋白在食管鳞癌中表达的相关性及临床病理意义

陈会枝, 崔黎, 李晟磊, 陈奎生, 杨建萍

2538 ATRA联合奈达铂对人肝癌细胞株Huh-7增殖与凋亡的影响

刘景, 徐晶, 丁剑午

2545 E-钙粘蛋白在进展期大肠癌转移淋巴结癌细胞中再表达的机制

李冬斌, 李晓宁, 许香梅, 段国强, 王影, 陈晓峰, 王凤安

文 献 综 述

2552 胃食管反流病的流行病学

张弓羽, 张振玉

2558 基于肝星状细胞的骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究现状

胡美迪, 郭贵海

2563 原发性肝癌的非手术治疗

刘煌, 刘静

2569 姜黄素对溃疡性结肠炎基础及临床疗效的研究进展

陈欧, 李昌平

研 究 快 报

2574 胰腺细胞中与HCV NS2蛋白相互作用蛋白中代谢相关基因的筛选

吴扬, 张锦前, 宁明

2579 幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因缺失突变体的构建

韩秀萍, 展德文, 王芑, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张丽, 邱炎, 李家奎, 刘纯杰

2584 酵母双杂交技术筛选人巨细胞病毒UL131A的相互作用蛋白

任高伟, 崔鑫, 齐莹, 马艳萍, 阮强, 孙峥嵘

临 床 经 验

2589 乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤的X线征象分析34例

鲁北

2594 Nissen胃底折叠术与前180度胃底折叠术的疗效比较

曹占国, 秦鸣放, 王庆, 赵宏志

2599 hMLH1及hPMS2 mRNA在胃癌组织中荧光定量RT-PCR的检测及其临床意义

潘光松, 刘希双, 杨堃

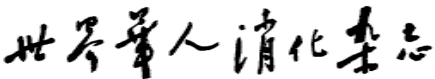
2604 家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异的调查

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王台, 任迎全

2608 自身免疫性肝炎46例

周淑芬, 刘树业, 贾艳会

附 录	2614 《世界华人消化杂志》投稿须知 2619 2010年国内国际会议预告
志 谢	2620 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2514 <i>WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR</i> 6本期刊被PMC收录 2520 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2527 《世界华人消化杂志》出版流程 2544 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2551 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 2557 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 2562 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 2578 《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》 2588 《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》 2593 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2598 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 2603 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 2613 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	Sakai N, Clarke CN, Schuster R, Blanchard J, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. Portal vein ligation accelerates tumor growth in ligated, but not contralateral lobes. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(30): 3816-3826 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i30/3816.htm
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 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

 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 2010-08-28 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 每册56.00元 全年2016.00元 广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

August 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 24

EDITORIAL	2511 Impact of neoadjuvant chemoradiotherapy on surgery and survival in patients with esophageal carcinoma <i>Cao XF</i>
BASIC RESEARCH	2515 Effects of arsenic trioxide on cell proliferation, apoptosis and HIF-1α expression in human liver cancer HepG2 cells cultured under hypoxic conditions <i>Xia DT, Zhang D, Xiao WL</i> 2521 Inhibitory effects of somatostatin on cholecystokinin octapeptide-mediated bile regurgitation under stress: ionic and molecular mechanisms <i>Si XM, Huang L, Shi RH, Luo HS</i> 2528 Role of Sphk1 in the proliferation and invasion of human colon cancer Lovo cells <i>Zhong YY, Huang JA, Liu SQ, Qin MB, Jin H</i>
CLINICAL RESEARCH	2533 Clinical pathological significance of mTOR and Cyclin D1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Chen HZ, Cui L, Li SL, Chen KS, Yang JP</i> 2538 ATRA in combination with nedaplatin inhibits cell proliferation but promotes apoptosis in human hepatoma cell line Huh-7 <i>Liu J, Xu J, Ding JW</i> 2545 Re-expression of E-cadherin in metastatic lymph nodes of patients with advanced colorectal carcinoma <i>Li DB, Li XN, Xu XM, Duan GQ, Wang Y, Chen XF, Wang FA</i>
REVIEW	2552 Epidemiology of gastroesophageal reflux disease <i>Zhang GY, Zhang ZY</i> 2558 Advances in hepatic stellate cell-targeted treatment of hepatic fibrosis with bone marrow-derived mesenchymal stem cells <i>Hu MD, Guo GH</i> 2563 Non-surgical treatment of primary hepatic carcinoma <i>Liu H, Liu J</i> 2569 Treatment of ulcerative colitis with curcumin: mechanisms and efficacy <i>Chen O, Li CP</i>
RAPID COMMUNICATION	2574 Screening of proteins binding to hepatitis C virus NS2 protein from a human pancreas cDNA library <i>Wu Y, Zhang JQ, Ning M</i> 2579 Construction of an <i>hp0596</i> gene deletion mutant of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Han XP, Zhan DW, Wang P, Li CS, Yuan SL, Tao HX, Zhang L, Qiu Y, Li JK, Liu CJ</i> 2584 Screening of proteins interacting with HCMV UL131A protein from a human fetal brain cDNA library by yeast two-hybrid assay <i>Ren GW, Cui X, Qi Y, Ma YP, Ruan Q, Sun ZR</i>
CLINICAL PRACTICE	2589 X-ray imaging features of esophageal papilloma and polypoid leiomyoma: an analysis of 34 cases <i>Lu B</i>

	2594 Efficacy of laparoscopic Nissen fundoplication versus anterior 180° fundoplication in the treatment of gastroesophageal reflux disease <i>Cao ZG, Qin MF, Wang Q, Zhao HZ</i> 2599 Clinical significance of detection of hMLH1 and hPMS2 mRNA expression in gastric cancer by real-time fluorescent quantitative RT-PCR <i>Pan GS, Liu XS, Yang K</i> 2604 Spontaneous HBV YMDD motif mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection <i>Qu JX, Zeng QL, Liu ZG, Xu GH, Feng JH, Zhao PD, Gao XH, Wang T, Ren YQ</i> 2608 Autoimmune hepatitis: an analysis of 46 cases <i>Zhou SF, Liu SY, Jia YH</i>
APPENDIX	2614 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 2619 Meeting events calendar in 2010
ACKNOWLEDGMENT	2620 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Sakai N, Clarke CN, Schuster R, Blanchard J, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB.</i> Portal vein ligation accelerates tumor growth in ligated, but not contralateral lobes. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(30): 3816-3826 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i30/3816.htm
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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 August 28, 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: wjcd@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: wjcd@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*

食管癌新辅助放化疗对手术及生存率的影响

曹秀峰

曹秀峰, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心外科 江苏省南京市 210006

曹秀峰, 教授, 南京医科大学肿瘤学博士生导师, 主要从事肿瘤外科工作。

通讯作者: 曹秀峰, 教授, 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肿瘤中心外科。

cx551101@sina.com

收稿日期: 2010-05-07 修回日期: 2010-08-10

接受日期: 2010-08-19 在线出版日期: 2010-08-28

Impact of neoadjuvant chemoradiotherapy on surgery and survival in patients with esophageal carcinoma

Xiu-Feng Cao

Xiu-Feng Cao, Department of Surgery, Oncology Center, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Xiu-Feng Cao, Department of Surgery, Oncology Center, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 68 Changle Road, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. cx551101@sina.com

Received: 2010-05-07 Revised: 2010-08-10

Accepted: 2010-08-19 Published online: 2010-08-28

Abstract

Neoadjuvant chemotherapy is often used to treat solid tumors before surgery or during the perioperative period. It is often combined with radiotherapy to improve survival and cure rate and to protect normal organs. Surgery is still the most effective therapy for esophageal cancer. Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy and radiotherapy as a treatment modality has been in existence for nearly 20 years. However, it remains controversial over whether neoadjuvant chemoradiotherapy can be used as the standard treatment for esophageal cancer. This paper sums up the impact of neoadjuvant chemotherapy on surgery and survival in patients with esophageal cancer. Moreover, we discuss the limitations and future directions of neoadjuvant chemotherapy for esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal neoplasm; Surgery; Radiotherapy; Antineoplastic agent; Postoperative complication; Prospective study; Randomized controlled trial; Meta-analysis

Cao XF. Impact of neoadjuvant chemoradiotherapy on surgery and survival in patients with esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2511-2514

摘要

新辅助化疗常应用于实体肿瘤的手术前或围手术期, 常联合应用放疗以提高生存率和治愈率, 并对器官加以保护。手术仍是最有效的食管癌单一治疗手段。术前的(新辅助)化疗加放疗虽已经作为治疗食管癌的3种方法中的综合治疗模式存在近20余年, 但他是否可作为食管癌的标准治疗模式仍存在争议。本文阐述了新辅助放化疗对食管癌手术及生存率的影响, 提出了新辅助放化疗在食管癌治疗中的不足和发展方向。

关键词: 食管肿瘤; 外科治疗; 放射治疗; 抗肿瘤药; 术后并发症; 前瞻性研究; 随机对照试验; Meta分析

曹秀峰. 食管癌新辅助放化疗对手术及生存率的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(24): 2511-2514

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2511.asp>

0 引言

食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 居世界癌症死因第7位^[1], 中国癌症死因第4位。大多数患者确诊时已是中晚期, 长期生存率较低^[2]。多数看似可切除的食管癌患者治愈前景黯淡。放疗可控制食管癌的局部复发, 同时化疗也具有抗肿瘤复发转移的作用, 这为食管癌的治疗带来了希望。已有研究提出化放疗联合手术治疗可切除性食管癌可延长患者长期生存率^[3-5]。同时, 术前放化疗食管癌患者看似比术后放化疗患者更能耐受放化疗所致毒性反应。基于此, 一些关于新辅助放化疗治疗食管癌的III期临床试验已开展起来。虽产生了令人鼓舞的结果, 但也带来了不容忽视的问题, 尤其对外科医生来说, 那就是新辅助放化疗可能会增加手术相关并发症和死亡率。虽然近20年来, 针对这些问题随机对照试验(randomized controlled trials, RCTs)已展开研究,

■背景资料

一些关于新辅助放化疗治疗食管癌的III期临床试验已开展起来。虽产生了令人鼓舞的结果, 但也带来了不容忽视的问题, 尤其对外科医生来说, 那就是新辅助放化疗可能会增加手术相关并发症和死亡率。

■同行评议者

张俊, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科

■ 研发前沿

毫无疑问,术前放化疗后,外科医生将面临手术难度和术后并发症增加的可能,例如放疗可能会增加吻合口漏和术后急性肺损伤的风险。总之,如何权衡新辅助放化疗获得的益处和该治疗手段带来的弊端,已引起众多学者的重视。

但意见并不一致。

1 新辅助放化疗对食管癌病理完全缓解率的影响

既往一些RCTs进行了术前化疗与单纯手术治疗食管癌的研究^[6,7],但新辅助化疗病理完全缓解率的结果令人失望。新辅助放化疗出现后在食管癌随机性研究中取得了令人瞩目的临床及病理缓解率^[8,9]。化疗联合放疗可提高杀伤不同周期肿瘤细胞的敏感性,当放疗在空间上发挥抗肿瘤作用时,化疗还可发挥抗肿瘤微转移灶的效用,疗效互补并增益。在最近的一篇Meta分析中,Lv等^[10]对14个入选的RCTs^[11-24](共包括1 737例患者)进行了分析,发现新辅助放化疗后病理完全缓解率10.0%-45.5%。虽然存在肿瘤的异质性和个体化的不同,但统计结果还是令人满意的,说明新辅助放化疗有可能使一些食管癌患者病理完全缓解,从而达到延长生存期的目的。

2 新辅助放化疗对食管癌复发转移率的影响

对于可切除的食管癌患者来说,外科手术仍是首选治疗手段,但单纯手术治疗中晚期食管癌患者的5年生存率只有10%-20%^[25-27]。疗效不佳的主要原因是肿瘤复发和转移。文献研究显示新辅助放化疗降低了食管癌的局部区域复发率($OR = 1.38$, 95%CI: 1.23-1.63; $P = 0.0002$),但并未显著降低食管癌的远处转移率($OR = 1.28$, 95%CI: 0.85-1.58; $P = 0.60$)和总体肿瘤复发率($OR = 1.27$, 95%CI: 0.86-1.65; $P = 0.19$),同时也显示同步放化疗的显著优越性,与序贯性放化疗相比,该治疗手段能最大限度地发挥化疗和放疗的抗肿瘤协同效用^[10]。可见新辅助放化疗有可能通过降低食管癌局部区域复发率来提高患者的生存率,同时也提示该治疗手段并未解决食管癌远处转移的问题。将来是否可以通过改进术前放疗或化疗方案,抑或联合应用分子靶向来抑制食管癌的远处转移,这个问题尚需深入研究。

3 新辅助放化疗对食管癌手术切除率及并发症、相关死亡率的影响

食管癌患者如无远处转移证据(cT₁₋₃N₀₋₁M₀),则认为是可切除性的,外科手术切除仍为首选手段,但由于食管邻近纵隔重要组织器官影响了肿瘤的完整切除,同时食管癌确诊时往往存在微转移灶,这为肿瘤的复发转移创造了条件,从而限制了手术治疗食管癌的疗效。研究结果显示,虽然单纯手术比新辅助放化疗似乎有较高

的食管癌手术切除率,但二者合并优势比显示无意义($OR = 0.82$, 95%CI: 0.39-1.73; $P < 0.34$)。然而,新辅助放化疗完全手术切除率明显比单纯手术高($OR = 1.53$, 95%CI: 1.33-2.84; $P = 0.007$)^[10]。虽然手术切除,淋巴结清扫的范围和效果与主刀外科医生的手术技能有很大关系,但有理由相信新辅助放化疗可通过肿瘤降期从而有利于肿瘤完全切除^[28,29],这也解释了为何新辅助放化疗后食管癌患者的局部区域复发率较低。

另外,研究表明新辅助放化疗的并发症发生率与单纯手术比较并未显示差异($OR = 1.33$, 95%CI: 0.94-1.88; $P = 0.04$)。虽然二组总体死亡率无差异($OR = 1.12$, 95%CI: 0.89-2.48; $P = 0.503$),但数据分析显示新辅助放化疗组的手术相关死亡率相对较高($OR = 1.78$, 95%CI: 1.14-2.78; $P = 0.79$)^[10]。毫无疑问,术前放化疗后,外科医生将面临手术难度和术后并发症增加的可能,例如放疗可能会增加吻合口漏和术后急性肺损伤的风险。总之,如何权衡新辅助放化疗获得的益处和该治疗手段带来的弊端,已引起众多学者的重视。

4 新辅助放化疗对食管癌患者生存率的影响

单纯手术治疗食管癌疗效并不满意。迄今为止,各式各样的综合治疗手段层出不穷^[30-32]。无论是术前放疗还是术后放疗,都缺乏有力证据显示有益于延长生存期^[33,34]。术后化疗常用以研究预防、延缓或治疗食管癌的复发转移,然而只有很少的RCTs能提供术后化疗有益于患者提高生存率的证据^[35,36]。此外,也有一些RCTs进行了新辅助化疗治疗食管癌的研究,但结果令人失望,当前新辅助化疗手段仍不足以提高食管癌患者的总体生存率^[37,38]。而新辅助放化疗是否能延长食管癌患者生存期意见仍未统一。但最新Meta分析显示新辅助放化疗与单纯手术比较,1年生存率对比无差异,但2、3、4、5年生存率新辅助放化疗显著提高。同时显示同步放化疗5年生存率显著优于单纯手术($OR = 1.45$, 95%CI: 1.26-1.79; $P = 0.015$),但序贯性放化疗5年生存率未显示优势($OR = 0.85$, 95%CI: 0.64-1.35; $P = 0.26$)^[10]。虽然放化疗治疗方法固有盲法在一定程度上限制了RCTs和Meta分析的研究质量^[39,40],但Meta分析结果相对更具说服力,说明新辅助放化疗有益于可切除性食管癌患者的长期生存,其原因与降低了肿瘤的局部区域复发率有关。

5 结论

在总体上, 大多数试验均发现新辅助放化疗的食管癌患者预后更好, 并且Meta分析结果显示新辅助放化疗与单纯手术治疗食管癌相比, 能提高患者长期生存率, 降低肿瘤局部区域复发率。二者切除率合并优势比显示虽无意义, 但新辅助放化疗与单纯手术治疗食管癌相比完全切除率显著提高。不容忽视的是, 新辅助放化疗治疗食管癌伴随着术后死亡率增加的风险。由于文献的研究对象来自不同种族、人群, 受到多种因素的影响, 故此结论尚需大样本多中心随机对照临床研究进一步论证, 欲证实该结论还需要大约2 000例患者甚至更多。另外, 该研究对单纯手术患者涉及到科学性和伦理道德问题, 因此, 在实践中临床医生对于该研究的可行性问题应慎重对待并妥善处理。

6 参考文献

- 1 Fisichella PM, Patti MG. Esophageal cancer: eMedicine: oncology, 2009-03-04; cited 2010-08-28. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/277930-overview>
- 2 Brenner B, Ilson DH, Minsky BD. Treatment of localized esophageal cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 554-565
- 3 Sutton P, Clark P. Neo-adjuvant treatment for oesophageal cancer. *GI Cancer* 2000; 3: 231-238
- 4 Lehnert T. Multimodal therapy for squamous carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg* 1999; 86: 727-739
- 5 Geh JL, Crellin AM, Glynne-Jones R. Preoperative (neoadjuvant) chemoradiotherapy in oesophageal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 338-356
- 6 Dixit S, Tilston M, Peter WM. Risk stratification for recurrence in patients with esophageal and junctional carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy and surgery. *Med Oncol* 2010; 27: 242-248
- 7 Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Locks FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 11-20
- 8 Bonnetain F, Bouché O, Michel P, Mariette C, Conroy T, Pezet D, Roulet B, Seitz JF, Paillet B, Arveux P, Milan C, Bedenne L. A comparative longitudinal quality of life study using the Spitzer quality of life index in a randomized multicenter phase III trial (FFCD 9102): chemoradiation followed by surgery compared with chemoradiation alone in locally advanced squamous resectable thoracic esophageal cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 827-834
- 9 Yano M, Inoue M, Shiozaki H. Preoperative concurrent chemotherapy and radiation therapy followed by surgery for esophageal cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 8: 123-130
- 10 Lv J, Cao XF, Zhu B, Ji L, Tao L, Wang DD. Effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on prognosis and surgery for esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4962-4968
- 11 Nygaard K, Hagen S, Hansen HS, Hatlevoll R, Hultborn R, Jakobsen A, Mäntylä M, Modig H, Munck-Wikland E, Rosengren B. Pre-operative radiotherapy prolongs survival in operable esophageal carcinoma: a randomized, multicenter study of pre-operative radiotherapy and chemotherapy. The second Scandinavian trial in esophageal cancer. *World J Surg* 1992; 16: 1104-1109; discussion 1110
- 12 Apinop C, Puttisak P, Preecha N. A prospective study of combined therapy in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 391-393
- 13 Le Prise E, Etienne PL, Meunier B, Maddern G, Ben Hassel M, Gedouin D, Boutin D, Campion JP, Launois B. A randomized study of chemotherapy, radiation therapy, and surgery versus surgery for localized squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994; 73: 1779-1784
- 14 Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 462-467
- 15 Bosset JF, Gignoux M, Triboulet JP, Tiet E, Mantion G, Elias D, Lozach P, Ollier JC, Pavy JJ, Mercier M, Sahmoud T. Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1997; 337: 161-167
- 16 Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 305-313
- 17 Walsh TN, Grennell M, Mansoor S, Kelly A. Neo-adjuvant treatment of advanced stage esophageal adenocarcinoma increases survival. *Dis Esophagus* 2002; 15: 121-124
- 18 An FS, Huang JQ, Xie YT, Chen SH, Rong TH. [A prospective study of combined chemoradiotherapy followed by surgery in the treatment of esophageal carcinoma] *Zhonghua Zhongliu Xue* 2003; 25: 376-379
- 19 Lee JL, Park SI, Kim SB, Jung HY, Lee GH, Kim JH, Song HY, Cho KJ, Kim WK, Lee JS, Kim SH, Min YI. A single institutional phase III trial of preoperative chemotherapy with hyperfractionation radiotherapy plus surgery versus surgery alone for resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2004; 15: 947-954
- 20 Burmeister BH, Smithers BM, Gebski V, Fitzgerald L, Simes RJ, Devitt P, Ackland S, Gotley DC, Joseph D, Millar J, North J, Walpole ET, Denham JW. Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase III trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 659-668
- 21 Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Yokomakura N, Ishigami S, Owaki T, Aikou T. Randomized controlled study on pre-operative chemoradiotherapy followed by surgery versus surgery alone for esophageal squamous cell cancer in a single institution. *Dis Esophagus* 2006; 19: 468-472
- 22 Cao XF, He XT, Ji L, Xiao J, Lv J. Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological staging and prognosis for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22:

■ 相关报道

Lv等对14个入选的RCTs(共包括1 737例患者)进行了分析, 发现新辅助放化疗后病理完全缓解率10.0%-45.5%。

■同行评价

本文选题实用, 观点鲜明, 论据充分, 具有较好的参考价值.

- 477-481
- 23 Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, Kiel K, Willett C, Sugarbaker D, Mayer R. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1086-1092
 - 24 彭林, 谢天鹏, 韩泳涛, 郎锦义, 李涛, 付彬玉, 陈利华, 方强. 术前放化疗与单纯手术治疗食管鳞癌的随机对照研究. *肿瘤* 2008; 28: 620-622
 - 25 Ellis FH Jr. Standard resection for cancer of the esophagus and cardia. *Surg Oncol Clin N Am* 1999; 8: 279-294
 - 26 Chan WH, Wong WK, Chan HS, Soo KC. Results of surgical resection of oesophageal carcinoma in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 2000; 29: 57-61
 - 27 Mariette C, Balon JM, Piessen G, Fabre S, Van Seuning I, Triboulet JP. Pattern of recurrence following complete resection of esophageal carcinoma and factors predictive of recurrent disease. *Cancer* 2003; 97: 1616-1623
 - 28 Brucher BL, Stein HJ, Zimmermann F, Werner M, Sarbia M, Busch R, Dittler HJ, Molls M, Fink U, Siewert JR. Responders benefit from neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma: results of a prospective phase-II trial. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 963-971
 - 29 Schneider PM, Baldus SE, Metzger R, Kocher M, Bongartz R, Bollschweiler E, Schaefer H, Thiele J, Dienes HP, Mueller RP, Hoelscher AH. Histomorphologic tumor regression and lymph node metastases determine prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy for esophageal cancer: implications for response classification. *Ann Surg* 2005; 242: 684-692
 - 30 de Manzoni G, Pedrazzani C, Pasini F, Bernini M, Minicozzi AM, Giacomuzzi S, Grandinetti A, Cordiano C. Chemoradiotherapy followed by surgery for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus with clinical evidence of adjacent organ invasion. *J Surg Oncol* 2007; 95: 261-266
 - 31 Mariette C, Piessen G, Lamblin A, Mirabel X, Adenis A, Triboulet JP. Impact of preoperative radiochemotherapy on postoperative course and survival in patients with locally advanced squamous cell esophageal carcinoma. *Br J Surg* 2006; 93: 1077-1083
 - 32 Bedenne L, Michel P, Bouché O, Milan C, Mariette C, Conroy T, Pezet D, Rouillet B, Seitz JF, Herr JP, Paillet B, Arveux P, Bonnetain F, Binquet C. Chemoradiation followed by surgery compared with chemoradiation alone in squamous cancer of the esophagus: FFCD 9102. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1160-1168
 - 33 Chen G, Wang Z, Liu XY, Liu FY. Adjuvant radiotherapy after modified Ivor-Lewis esophagectomy: can it prevent lymph node recurrence of the mid-thoracic esophageal carcinoma? *Ann Thorac Surg* 2009; 87: 1697-1702
 - 34 Schwer AL, Ballonoff A, McCammon R, Rusthoven K, D'Agostino RB Jr, Schefter TE. Survival effect of neoadjuvant radiotherapy before esophagectomy for patients with esophageal cancer: a surveillance, epidemiology, and end-results study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73: 449-455
 - 35 Lee J, Lee KE, Im YH, Kang WK, Park K, Kim K, Shim YM. Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in lymph node-positive thoracic esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2005; 80: 1170-1175
 - 36 Hejna M, Raderer M. [Neoadjuvant therapy for resectable esophageal cancer] *Z Gastroenterol* 2005; 43: 1141-1147
 - 37 Urschel JD, Vasan H, Blewett CJ. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemotherapy and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2002; 183: 274-279
 - 38 Malthaner RA, Wong RK, Rumble RB, Zuraw L. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a clinical practice guideline. *BMC Cancer* 2004; 4: 67
 - 39 Higgins J, Green S. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. The Cochrane collaboration. Available from: <http://www.cochrane.org/resources/handbook/>
 - 40 Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. Quality of Reporting of Meta-analyses. *Lancet* 1999; 354: 1896-1900

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 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

三氧化二砷在低氧下对人肝癌细胞株HepG2增殖、凋亡及HIF-1 α 表达的影响

夏德涛, 张栋, 肖伟玲

夏德涛, 肖伟玲, 潍坊医学院临床医学系 山东省潍坊市 261053

张栋, 潍坊医学院附属五莲县人民医院 山东省日照市 262300
夏德涛, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤方向的研究。

潍坊医学院青年教师科研启动基金资助项目, No. KQ07007
作者贡献分布: 此课题由夏德涛与肖伟玲设计; 研究过程由夏德涛、张栋及肖伟玲共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由夏德涛与张栋提供; 数据分析由夏德涛完成; 本论文写作由夏德涛、张栋及肖伟玲完成。

通讯作者: 夏德涛, 主治医师, 261053, 山东省潍坊市宝通西街 7166号, 潍坊医学院临床医学系. xiadt23@163.com
电话: 0536-8462510

收稿日期: 2010-05-01 修回日期: 2010-07-07

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Effects of arsenic trioxide on cell proliferation, apoptosis and HIF-1 α expression in human liver cancer HepG2 cells cultured under hypoxic conditions

De-Tao Xia, Dong Zhang, Wei-Ling Xiao

De-Tao Xia, Wei-Ling Xiao, Department of Clinical Medicine, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China

Dong Zhang, Wulian People's Hospital Affiliated to Weifang Medical College, Rizhao 262300, Shandong Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation for Young Teachers in Weifang Medical College, No. KQ07007

Correspondence to: De-Tao Xia, Department of Clinical Medicine, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China. xiadt23@163.com

Received: 2010-05-01 Revised: 2010-07-07

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on cell proliferation, apoptosis and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression in human liver cancer HepG2 cells cultured under hypoxic conditions.

METHODS: Hypoxia was induced with cobalt chloride ($CoCl_2$). After HepG2 cells were incubated with different concentrations of As_2O_3 (1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 $\mu mol/L$) for 12, 24 and 48 h under hypoxic conditions, cell proliferation was

determined by MTT assay, and cell apoptosis was evaluated by Hoechst staining. HepG2 cells were then divided into three groups: normal control group, hypoxia group, and As_2O_3 treatment group. After HepG2 cells were incubated with As_2O_3 at concentrations of 4.0 and 8.0 $\mu mol/L$ for 48 h under hypoxia, the expression of HIF-1 α protein was detected by immunocytochemistry.

RESULTS: As_2O_3 inhibited proliferation but induced apoptosis of HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner under both normoxic and hypoxic conditions (both $P < 0.01$). No significant differences were noted in the reduced proliferation rates of cell proliferation (38.40% vs 37.83%, $P > 0.05$) and apoptosis rates (45.25% vs 49.28%, $P > 0.05$) between HepG2 cells treated with 8.0 $\mu mol/L$ As_2O_3 for 48 h under normoxic and hypoxic conditions. Immunocytochemistry analysis revealed that HIF-1 α was weakly expressed in HepG2 cells under normoxia. After hypoxic induction for 48 h, HIF-1 α expression was significantly up-regulated ($t = 114.37$, $P < 0.05$). The expression of HIF-1 α protein gradually decreased with the increase in the concentration of As_2O_3 under hypoxia ($F = 347.042$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: As_2O_3 can inhibit proliferation but induce apoptosis of HepG2 cells under hypoxia possibly by down-regulating HIF-1 α protein expression.

Key Words: Arsenic trioxide; Hypoxia; Liver cancer cell; Hypoxia-inducible factor-1 α

Xia DT, Zhang D, Xiao WL. Effects of arsenic trioxide on cell proliferation, apoptosis and HIF-1 α expression in human liver cancer HepG2 cells cultured under hypoxic conditions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2515-2520

摘要

目的: 探讨低氧条件下三氧化二砷(As_2O_3)对人肝癌细胞株HepG2增殖、凋亡及HIF-1 α 表达的影响。

■背景资料

肿瘤低氧微环境是肿瘤化疗抵抗的重要原因, HIF-1 α 是重要的氧调节转录因子, 寻找以HIF-1 α 为靶点的、低氧下仍然有效的抗肿瘤药物成为国内外研究的热点。三氧化二砷对多种实体瘤具有杀伤作用, 近年来研究发现, 三氧化二砷在低氧条件下能诱导肺癌细胞、急性早幼粒白血病等一些肿瘤细胞发生凋亡, 但其对低氧条件下肝癌细胞的作用及相关机制报道不多。

■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科

■研究前沿

大量研究表明,低氧微环境是导致肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗的重要原因。因此,寻找低氧条件下仍然有效的抗肿瘤药物成为目前研究的热点。

方法: 用氯化钴(CoCl_2)创造低氧条件,取1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 分别在常氧和低氧条件下作用于HepG2细胞12、24和48 h后,MTT法检测细胞活力,Hoechst染色法检测细胞凋亡。设常氧对照组、低氧对照组、低氧下不同浓度 As_2O_3 (4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$)组,用免疫细胞化学法观察不同浓度 As_2O_3 作用于HepG2细胞48 h后HIF-1 α 蛋白表达的变化。

结果: MTT法和Hoechst染色法分别显示,在常氧和低氧两种条件下, As_2O_3 均呈时间剂量依赖性地抑制和诱导HepG2细胞增殖和凋亡(均 $P<0.01$),8.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用HepG2细胞48 h后其抑制率和凋亡率分别为38.40%,37.83%和45.25%,49.28%。在常氧和低氧两种条件下,HepG2细胞生长抑制率及凋亡率的差异均无统计学意义。免疫细胞化学法显示,常氧条件下HIF-1 α 蛋白呈弱阳性表达,低氧诱导48 h后HIF-1 α 蛋白表达显著升高($t=114.37$, $P<0.05$),低氧条件下HIF-1 α 蛋白表达随 As_2O_3 浓度的增加而逐渐降低($F=347.042$, $P<0.01$)。

结论: 低氧条件下, As_2O_3 能抑制HepG2细胞增殖并诱导其凋亡,其机制可能与 As_2O_3 下调HIF-1 α 的表达有关。

关键词: 三氧化二砷; 低氧; 肝癌细胞; 低氧诱导因子-1 α

夏德涛, 张栋, 肖伟玲. 三氧化二砷在低氧下对人肝癌细胞株HepG2增殖、凋亡及HIF-1 α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2515-2520

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2515.asp>

0 引言

研究已经证实,肿瘤内存在低氧微环境^[1,2]。低氧微环境导致多种实质性肿瘤包括肝癌发生一系列生物学效应,使肿瘤细胞发生一系列适应性变化,如促进肿瘤血管生成、增强无氧糖酵解、凋亡耐受等^[3],而低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)是肿瘤低氧应答的关键因子,HIF-1 α 与肿瘤血管生成、化疗抵抗、无氧糖酵解及恶性演进、浸润转移等密切相关^[4-7]。大量研究表明,低氧微环境是导致肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗的重要原因^[4-7]。因此,寻找低氧条件下仍然有效的抗肿瘤药物成为目前研究的热点^[8]。三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)是砒霜的主要成分之一,最初被用于急性早幼粒细胞白血病的治疗,随后发现其对胃癌、肺癌、肝癌等多种实体瘤具有明显的杀伤

作用^[9-11]。近年来研究表明, As_2O_3 在低氧条件下能诱导肺癌细胞、急性早幼粒白血病等一些肿瘤细胞发生凋亡^[12,13],但其对低氧条件下肝癌细胞的作用及相关机制有待进一步探讨。为此,我们以经典的化学缺氧剂 CoCl_2 模拟低氧微环境,分别在常氧和低氧条件下观察了不同浓度 As_2O_3 对人肝癌细胞HepG2增殖、凋亡的影响,探讨其与HIF-1 α 蛋白表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2购自山东省医学科学院。 As_2O_3 注射液购自黑龙江哈尔滨医药有限公司。Hoechst32258荧光染色试剂盒及 CoCl_2 购于美国Sigma公司。DMEM培养基及甲基噻唑基四唑(MTT)购自美国Gibco公司。胎牛血清(杭州四季青)、PV-9000免疫组织化学试剂盒及鼠抗人HIF-1 α 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 取指数生长期的人肝癌细胞株HepG2接种于含100 mL/L胎牛血清、青霉素、链霉素各 1×10^5 U/L的DMEM培养液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 培养箱内常规传代培养。

1.2.2 低氧培养条件: 预先在常氧条件下培养,待细胞贴壁进入对数生长期后加入化学缺氧剂 CoCl_2 ,其终浓度为150 $\mu\text{mol/L}$,置于37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 培养箱内常规传代培养。

1.2.3 MTT法检测HepG2细胞增殖抑制率: 分别观察常氧和低氧条件下不同浓度 As_2O_3 对人肝癌细胞株HepG2增殖抑制的影响。取对数生长期的人肝癌HepG2细胞,按照 $3 \times 10^7/\text{L}$ 的密度接种于96孔培养板,每孔体积为200 μL 。待细胞贴壁后分别加入 As_2O_3 (终浓度1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$),并设阴性对照组(细胞正常生长组),每个浓度组设5个复孔,四周加入不含药物的细胞培养液为空白对照。分别在常氧和低氧条件下培养至12、24和48 h后,每孔加入5 g/L的MTT溶液20 μL ,继续培养4 h,吸出培养液,每孔加入DMSO 150 μL ,振荡10 min,在酶标仪上以490 nm波长测每孔的吸光度 A 值,并取5孔的平均值。实验重复3次,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 = (对照孔 A 值-实验孔 A 值)/对照孔 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Hoechst染色法检测HepG2细胞凋亡率: 分别观察常氧和低氧条件下不同浓度 As_2O_3 对人肝癌细胞株HepG2凋亡的影响。取对数生长期

表 1 常氧和低氧条件下不同时间、As₂O₃浓度对HepG2细胞的增殖抑制率 (mean $\pm$ SD, %)

As ₂ O ₃ (μ mol/L)	12 h		24 h		48 h	
	常氧条件	低氧条件	常氧条件	低氧条件	常氧条件	低氧条件
对照组	2.85 $\pm$ 1.13	2.92 $\pm$ 1.08	2.83 $\pm$ 1.02	2.94 $\pm$ 1.17	2.92 $\pm$ 1.14	2.89 $\pm$ 1.03
1.0	5.75 $\pm$ 4.23 ^b	5.82 $\pm$ 2.11 ^b	9.23 $\pm$ 2.46 ^{bd}	9.46 $\pm$ 1.52 ^{bd}	16.73 $\pm$ 1.26 ^{bd}	17.03 $\pm$ 1.04 ^{bd}
2.0	9.57 $\pm$ 3.16 ^b	9.71 $\pm$ 3.21 ^b	18.33 $\pm$ 1.37 ^{bd}	17.96 $\pm$ 2.11 ^{bd}	26.35 $\pm$ 3.14 ^{bd}	27.13 $\pm$ 2.46 ^{bd}
4.0	16.19 $\pm$ 4.02 ^b	16.32 $\pm$ 5.13 ^b	24.14 $\pm$ 2.18 ^{bd}	24.36 $\pm$ 3.02 ^{bd}	31.63 $\pm$ 2.77 ^{bd}	32.04 $\pm$ 1.76 ^{bd}
8.0	22.01 $\pm$ 1.82 ^b	21.89 $\pm$ 1.79 ^b	28.26 $\pm$ 2.71 ^{bd}	28.69 $\pm$ 2.43 ^{bd}	38.40 $\pm$ 3.25 ^{bd}	37.83 $\pm$ 3.46 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 同样条件下的细胞对照组; ^d $P < 0.01$ vs 同样12 h浓度组。

的HepG2细胞制成 2×10^8 /L的细胞悬液, 每孔0.5 mL, 加入放有盖玻片的24孔板内。待细胞贴壁后分别加入As₂O₃(终浓度1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L), 并设阴性对照组(细胞正常生长组), 每个浓度组设5个复孔, 分别在常氧及低氧条件下培养12、24、48 h后, 取出细胞爬片, 甲醇/冰醋酸固定液固定5 min后, 加入荧光染液Hoechst33258重悬细胞, 室温避光1 h, PBS冲洗, 用抗荧光液封片。然后置于BH-2型荧光显微镜下, 采用激发波长350 nm, 发射波长460 nm镜检。判定标准: 正常细胞核为蓝色, 凋亡的细胞核为白色。每片连续观察10个细胞分布均匀的200倍镜视野, 每视野计数50个细胞, 共500个细胞, 计算其阳性率百分数, 并取其均值。凋亡率 = 凋亡细胞数/(正常细胞数+凋亡细胞数)。

1.2.3 免疫细胞化学两步法观察低氧条件下HepG2细胞HIF-1 α 的表达: 取对数生长期的HepG2细胞制成 2×10^8 /L的细胞悬液, 每孔0.5 mL, 加入放有盖玻片的24孔板内, 设常氧对照组、低氧对照组和低氧下不同浓度As₂O₃组, 待细胞贴壁后分别加入CoCl₂和As₂O₃(终浓度4.0、8.0 μ mol/L), 48 h后取出细胞爬片, 冷丙酮固定5 min, PBS冲洗, 按PV-9000试剂盒步骤检测HIF-1 α , DAB显色, 脱水, 透明, 中性树脂封片。用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。结果判定: 细胞核内出现棕黄色颗粒判定HIF-1 α 为阳性。采用HPAIS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统, 检测HIF-1 α 蛋白阳性细胞的平均A值, 以间接反映HIF-1 α 阳性蛋白的表达量, 并取其均值。

统计学处理 实验数据用mean $\pm$ SD表示, 数据均用统计软件SPSS16.0分析, 组间比较用 t 检验和单因素方差分析, 两变量间用Pearson直线相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧和低氧条件下不同浓度As₂O₃对人肝癌细胞株HepG2增殖抑制的影响 不同浓度As₂O₃在常氧和低氧条件下作用于HepG2细胞12、24和48 h后, 均呈时间剂量依赖性地抑制HepG2细胞增殖(常氧下 $F = 119.527, 218.732, 364.612$, 低氧下 $F = 283.116, 341.629, 514.721$, 均 $P < 0.01$), 在常氧和低氧条件下8.0 μ mol/L As₂O₃作用HepG2细胞48 h后其增殖抑制率分别为38.40%和37.83%。对照组内各时间点HepG2细胞增殖抑制率均无显著差异。HepG2细胞增殖抑制率在相同作用时间、相同处理浓度, 但在常氧和低氧两种条件下的差异无统计学意义(表1)。

2.2 Hoechst染色法检测As₂O₃对人肝癌细胞株HepG2凋亡的影响 不同浓度As₂O₃在常氧和低氧条件下作用于HepG2细胞12、24和48 h后, 均呈时间剂量依赖性地促进HepG2细胞凋亡(常氧下 $F = 382.429, 469.517, 719.262$, 低氧下 $F = 457.323, 639.216, 882.541$, 均 $P < 0.01$), 8.0 μ mol/L As₂O₃作用HepG2细胞48 h后其凋亡率分别为45.25%和49.28%。对照组内各时间点HepG2细胞凋亡率均无显著差异。HepG2细胞凋亡率在相同作用时间、相同处理浓度, 但在常氧和低氧两种条件下的差异无统计学意义(表2, 图1)。

2.3 低氧条件下不同浓度As₂O₃对HepG2细胞HIF-1 α 表达的影响 常氧条件下HIF-1 α 蛋白呈弱阳性表达, 加入CoCl₂创造低氧条件诱导48 h后HIF-1 α 蛋白表达显著升高($t = 114.37, P < 0.05$), 低氧条件下4.0、8.0 μ mol/L As₂O₃作用细胞48 h后, HIF-1 α 蛋白表达随As₂O₃浓度的增加而逐渐降低, 与低氧对照组比较有统计学意义($0.546 \pm 0.028, 0.395 \pm 0.017$ vs $0.773 \pm 0.047, F = 347.042$, 均 $P < 0.01$, 图2)。

3 讨论

低氧微环境是多种实质性肿瘤包括肝癌在内的

■创新盘点

本研究以经典的化学缺氧剂CoCl₂模拟低氧微环境, 分别在常氧和低氧两种条件下观察不同浓度三氧化二砷对人肝癌细胞增殖、凋亡的影响, 并研究其与低氧下重要的分子标志物HIF-1 α 蛋白表达的关系, 这有望为肝癌的治疗提供合理的用药及科学的理论基础。

■应用要点

本研究发现,在低氧条件下,三氧化二砷仍具有抗肿瘤活性,且与常氧条件下相比,其抗肿瘤能力没有减弱,这种作用可能与其抑制HIF-1 α 蛋白表达有关。研究表明,三氧化二砷作为一种对HIF-1 α 具有抑制作用的抑制剂,在临床治疗中可作为一种重要的辅助化疗药物与化疗药物联用,增强化疗药物的抗肿瘤能力。

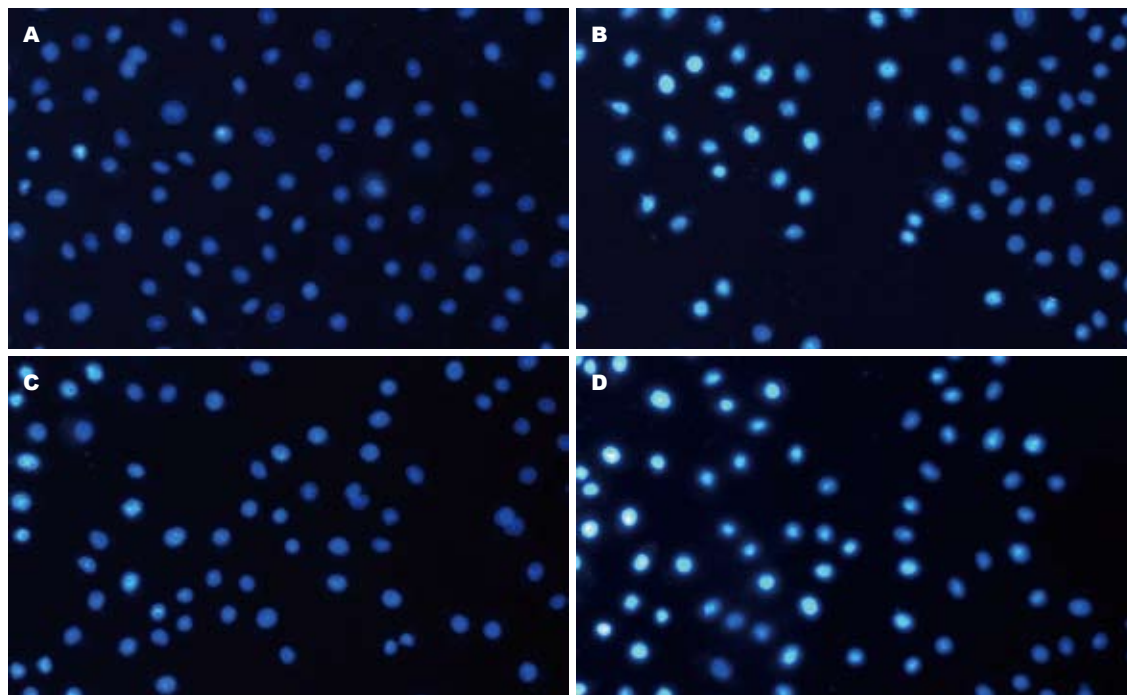


图1 Hoechst染色法检测As₂O₃作用48 h后HepG2细胞的凋亡($\times 200$)。A: 常氧对照组; B: 常氧下8.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组; C: 低氧对照组; D: 低氧下8.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组。

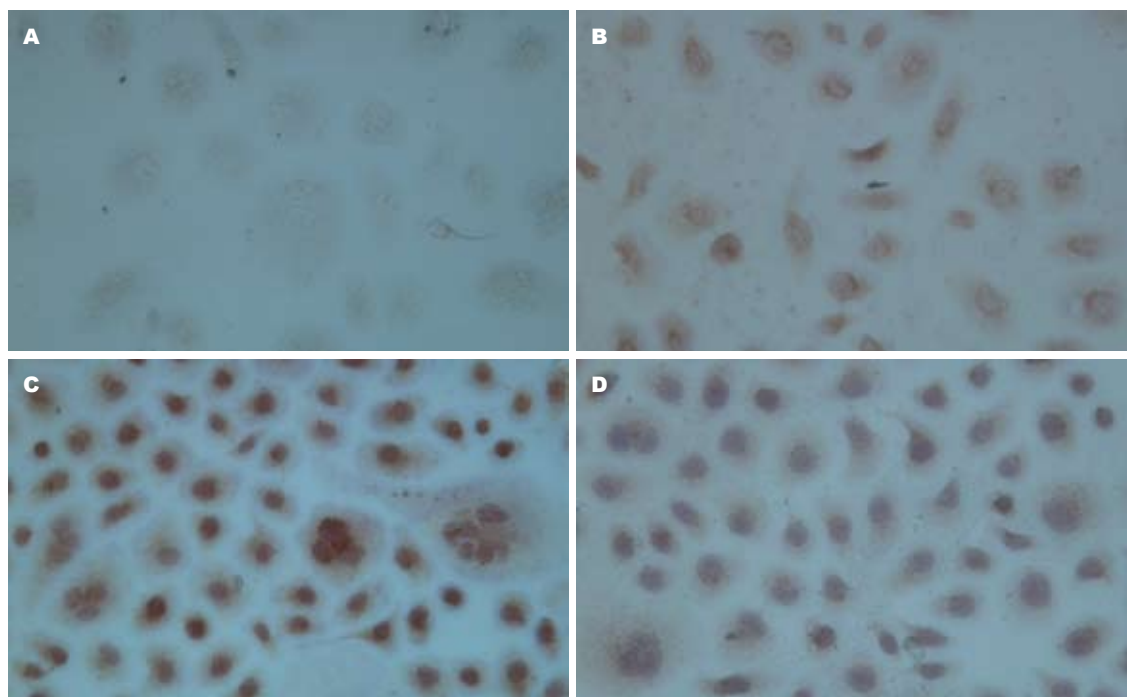


图2 免疫细胞化学检测HepG2细胞HIF-1 α 蛋白的表达(SP $\times 400$)。A: 阴性对照组; B: 常氧对照组; C: 低氧对照组; D: 低氧下8.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组。

共同特征,其缺氧主要是由于肿瘤细胞生长失控,而血管生长却相对滞后,致使耗氧量超过了微血管所能提供的氧量,从而导致肿瘤内低氧微环境的形成^[14]。低氧微环境可使肿瘤基因组和蛋白质组不稳定,导致介导肿瘤细胞的恶性筛选出现化疗耐受,进而浸润转移^[3]。而低氧诱导

HIF-1 α 表达与肿瘤的血管生成、凋亡耐受、化疗抵抗及侵袭转移等方面密切相关^[4-7]。低氧微环境是肿瘤细胞对多种化疗药物如氟尿嘧啶、阿霉素等产生抵抗性的重要原因^[15,16], Tan等^[17]体外实验发现,低氧可降低SW480细胞对氟尿嘧啶的敏感性,其机制可能与上调HIF-1 α 、血

表 2 常氧和低氧条件下不同时间、As₂O₃浓度对HepG2细胞凋亡的影响 (mean $\pm$ SD, %)

As ₂ O ₃ (μ mol/L)	12 h		24 h		48 h	
	常氧条件	低氧条件	常氧条件	低氧条件	常氧条件	低氧条件
对照组	1.04 $\pm$ 0.11	2.08 $\pm$ 0.47	1.32 $\pm$ 0.21	2.11 $\pm$ 0.17	1.24 $\pm$ 0.14	2.32 $\pm$ 0.12
1.0	4.85 $\pm$ 0.53 ^b	6.51 $\pm$ 0.36 ^b	8.93 $\pm$ 1.31 ^{bd}	12.37 $\pm$ 0.87 ^{bd}	12.41 $\pm$ 1.16 ^{bd}	17.58 $\pm$ 1.21 ^{bd}
2.0	6.73 $\pm$ 0.75 ^b	10.69 $\pm$ 0.93 ^b	15.12 $\pm$ 1.48 ^{bd}	18.75 $\pm$ 0.94 ^{bd}	20.50 $\pm$ 2.31 ^{bd}	24.86 $\pm$ 1.73 ^{bd}
4.0	12.79 $\pm$ 1.23 ^b	15.13 $\pm$ 1.21 ^b	20.36 $\pm$ 2.41 ^{bd}	24.13 $\pm$ 1.64 ^{bd}	29.22 $\pm$ 2.42 ^{bd}	32.31 $\pm$ 2.05 ^{bd}
8.0	23.26 $\pm$ 1.62 ^b	25.45 $\pm$ 1.23 ^b	27.39 $\pm$ 2.56 ^{bd}	31.18 $\pm$ 2.21 ^{bd}	45.25 $\pm$ 1.18 ^{bd}	49.28 $\pm$ 1.46 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 同样条件下的细胞对照组; ^d $P < 0.01$ vs 同样12 h浓度组。

红素氧合酶-1表达有关。因此, 寻找以HIF-1 α 为靶点的、低氧下仍然有效的抗肿瘤药物成为国内外研究的热点^[8,18]。研究发现, As₂O₃对胃癌、肺癌、肝癌等多种实体瘤具有明显的杀伤作用^[9-11], 近年来研究表明, As₂O₃在低氧条件下能诱导肺癌细胞、急性早幼粒白血病等一些肿瘤细胞发生凋亡^[12,13], 但其对低氧条件下肝癌细胞的作用及相关机制报道不多。

我们在常氧和低氧两种条件下系统地观察了不同浓度As₂O₃对HepG2细胞增殖、凋亡的影响及其与HIF-1 α 表达的关系。MTT实验发现: 在常氧和低氧两种条件下, As₂O₃均可呈剂量和时间依赖性地显著抑制HepG2细胞的增殖, 8.0 μ mol/L As₂O₃作用HepG2细胞48 h后, 其抑制率分别为38.40%和37.83%, 常氧和低氧两种条件下细胞增殖抑制率的差异无统计学意义。最近, Qu等^[13]研究发现, As₂O₃可以在低氧环境下抑制人肺癌细胞生长并诱导其凋亡, 可能与阻滞细胞周期进程有关。我们应用Hoechst染色法进一步观察, 结果显示在常氧和低氧两种条件下, 不同浓度As₂O₃均呈时间剂量依赖性促进HepG2细胞凋亡, 8.0 μ mol/L As₂O₃作用HepG2细胞48 h后其凋亡率分别为45.25%和49.28%, 常氧和低氧条件下细胞凋亡率的差异无统计学意义。上述结果表明, As₂O₃可以通过诱导细胞凋亡来发挥对HepG2细胞的杀伤作用, 这种作用不受低氧条件的影响。Pettersson等^[11]发现, As₂O₃对小细胞肺癌有高度细胞毒性, 能诱导肺癌细胞发生凋亡, 但其具体机制有待深入研究。刘晓川等^[19]研究亦发现, 缺氧条件下As₂O₃能诱导人肝癌BEL-7402细胞发生凋亡, 其机制可能与As₂O₃下调HIF-1 α 、多药耐药基因的表达有关。HIF-1是低氧条件下产生的一种异源二聚体转录因子, 主要由HIF-1 α 和HIF-1 β 两个亚单位组成, 其中HIF-1 α 是主要的氧调节亚单位, 对HIF-1的活性起着关键作用。

许多研究表明, 低氧诱导HIF-1 α 表达使肿瘤细胞耐受凋亡^[12,13]。为此, 我们进一步应用免疫细胞化学法观察发现, 低氧下HIF-1 α 表达较常氧下明显升高(均 $P < 0.05$), 而As₂O₃呈剂量依赖性地抑制HIF-1 α 表达, 与低氧对照组比较有统计学意义(均 $P < 0.01$)。近年来, 许多研究亦发现, HIF-1 α 表达下调可增强抗肿瘤药物的杀伤作用^[6,20]。Kung等^[21]实验发现, 应用一种多肽阻断HIF-1 α 与p300/CREB的结合以阻遏HIF-1 α 的转录活性, 该多肽可以抑制结肠癌和乳腺癌移植瘤的生长。研究发现, 低氧下As₂O₃能对急性早幼粒细胞白血病细胞产生生长抑制作用, 其中HIF-1 α 和维甲酸受体 α 发挥了重要作用^[12]。最近, 邢国辉等^[22]研究发现, 在低氧环境下, 丹参酮II A可增强5-氟尿嘧啶抑制SGC-7901细胞增殖及诱导凋亡作用, 可能与其抑制HIF-1 α 及突变型P53蛋白表达有关。因此, 我们推测, 低氧条件下As₂O₃可能通过下调HIF-1 α 的表达诱导HepG2细胞的凋亡, 从而发挥对HepG2细胞的杀伤作用。

我们的研究结果提示, As₂O₃可能通过下调HIF-1 α 的表达诱导细胞凋亡来发挥对HepG2细胞的杀伤作用, 这种作用不受低氧条件的影响, 为其合理的运用于临床提供理论思路。预示着As₂O₃在肝癌的治疗上有着广泛的前景, 其具体的作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-549
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91
- Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* 2006; 237: 10-21
- Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS,

■同行评价

本文设计合理, 为三氧化二砷将来应用于临床提供了一些数据, 有一定的实际应用价值。

- Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003; 22: 3213-3220
- 5 Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 790-797
- 6 Sermeus A, Cosse JP, Crespin M, Mainfroid V, de Longueville F, Ninane N, Raes M, Remacle J, Michiels C. Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol Cancer* 2008; 7: 27
- 7 Hu Y, Kirito K, Yoshida K, Mitsumori T, Nakajima K, Nozaki Y, Hamanaka S, Nagashima T, Kunitama M, Sakoe K, Komatsu N. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 function enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to melphalan. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2329-2338
- 8 Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorken JB. Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions. *Oncologist* 2007; 12: 690-712
- 9 Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 542-564
- 10 Bangoura G, Yang LY, Huang GW, Wang W. Expression of HIF-2alpha/EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 525-530
- 11 Pettersson HM, Pietras A, Munksgaard Persson M, Karlsson J, Johansson L, Shoshan MC, Pahlman S. Arsenic trioxide is highly cytotoxic to small cell lung carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 160-170
- 12 Yan H, Peng ZG, Wu YL, Jiang Y, Yu Y, Huang Y, Zhu YS, Zhao Q, Chen GQ. Hypoxia-simulating agents and selective stimulation of arsenic trioxide-induced growth arrest and cell differentiation in acute promyelocytic leukemic cells. *Haematologica* 2005; 90: 1607-1616
- 13 Qu GP, Xiu QY, Li B, Liu YA, Zhang LZ. Arsenic trioxide inhibits the growth of human lung cancer cell lines via cell cycle arrest and induction of apoptosis at both normoxia and hypoxia. *Toxicol Ind Health* 2009; 25: 505-515
- 14 Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1649-1660
- 15 Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* 2009; 45: 109-115
- 16 Ravizza R, Molteni R, Gariboldi MB, Marras E, Perletti G, Monti E. Effect of HIF-1 modulation on the response of two- and three-dimensional cultures of human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2009; 45: 890-898
- 17 Tan ZM, Wu Y, Zhang HL, Xiao XZ. [CoCl2-induced chemotherapy resistance in SW480 cells and its mechanism] *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2006; 31: 345-349
- 18 Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 601-605
- 19 刘晓川, 刘铁夫. 缺氧时三氧化二砷对人肝癌细胞株 BEL-7402生长及凋亡的影响及机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1983-1988
- 20 Hussein D, Estlin EJ, Dive C, Makin GW. Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2241-2250
- 21 Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 2000; 6: 1335-1340
- 22 邢国辉, 冯玉光, 宗绪山, 吴美英, 朱芸. 丹参酮IIA联合5-FU对低氧下人胃癌SGC7901细胞增殖、凋亡的影响及与HIF-1 α 和突变型P53表达变化的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 222-228

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》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang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角码号。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,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

生长抑素对应激下胆囊收缩素介导的胆汁反流的抑制作用

司新敏, 黄磊, 施瑞华, 罗和生

司新敏, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

黄磊, 南京医科大学附属南京市儿童医院普外科 江苏省南京市 210008

罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
司新敏, 博士, 讲师, 主治医师, 主要从事胃肠动力和胃肠激素方向的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30900666

作者贡献分布: 司新敏与黄磊对此文贡献均等; 此课题由司新敏、黄磊、施瑞华及罗和生设计; 研究过程由司新敏与黄磊操作完成; 施瑞华与罗和生共同指导了该课题的完成; 数据分析和论文撰写由司新敏与黄磊完成。

通讯作者: 司新敏, 主治医师, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科。sixinmin@126.com

收稿日期: 2010-05-24 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Inhibitory effects of somatostatin on cholecystokinin octapeptide-mediated bile regurgitation under stress: ionic and molecular mechanisms

Xin-Min Si, Lei Huang, Rui-Hua Shi, He-Sheng Luo

Xin-Min Si, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Lei Huang, Department of Pediatric Surgery, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30900666

Correspondence to: Xin-Min Si, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. sixinmin@126.com

Received: 2010-05-24 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To investigate the ionic and molecular mechanisms underlying the effects of changes in plasma cholecystokinin octapeptide (CCK-8S) and somatostatin (SS) on stress-induced bile regurgitation in rats.

METHODS: The changes in plasma CCK-8S, SS and intragastric bile concentration under stress-

ful condition were measured by radioimmunoassay (RIA). The contractile response of gastric antral smooth strips isolated from healthy adult rats was recorded by poly physiography. The regulatory effect of protein kinase C (PKC) on the phosphorylation of type 3 inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (InsP₃R3) in gastric smooth muscle cells (SMC) was determined by immunoprecipitation. The changes in intracellular calcium fluorescence intensity (FI) of SMC (presented as [Ca²⁺]_i) were analyzed by laser scanning confocal microscopy. L-type voltage-dependent calcium currents (I_{Ca-L}) of SMC were recorded by the patch-clamp technique.

RESULTS: Both plasma CCK-8S level and gastric bile concentration significantly increased during the stress period and reached the peak at 2 h after stress, while reverse effect was observed in plasma SS level. Respective addition of CCK-8S and SS caused a rapid, sustained, concentration-dependent increase and decrease in muscle contraction of gastric antral strips, and CCK-8S-induced increase in the contractile response could be significantly blocked by administration of nifedipine or SS. Similar results were obtained for the changes in FI and I_{Ca-L} of SMC. Pretreatment with SS significantly increased CCK-8S-promoted phosphorylation of InsP₃R3 in SMC.

CONCLUSION: Gastric mucosal damage induced by bile regurgitation under stressful condition is closely associated with gastric antral dysmotility evoked by the changes in CCK-8S and SS. CCK-8S-enhanced gastric antral contraction depends on the release of intracellular calcium stores and the influx of extracellular calcium via L-type voltage-dependent calcium channels, and can be blocked with SS, suggesting that both CCK-8S and SS play important roles in the regulation of gastric motility.

Key Words: Stress; Bile regurgitation; Cholecystokinin octapeptide; Somatostatin; Gastric motility

■背景资料

近来研究认为, 各种应激可引起体内多种脑-肠肽含量及其功能的变化, 经中枢和局部神经系统影响胃肠道的功能状态。目前胃酸过多、黏膜缺血、黏膜屏障功能破坏被认为是应激性溃疡(SU)产生的重要因素, 而对于胆汁反流在SU形成中的作用及其与相关脑-肠肽间的作用报道甚少。

■同行评议者

周南进, 研究员, 江西省医学科学研究所

■ 研究前沿

应激性溃疡(SU)是临床危重疾病的常见而严重的并发症,具有较高的发病率和死亡率,防治效果不佳且发病机制尚未完全清楚。

Si XM, Huang L, Shi RH, Luo HS. Inhibitory effects of somatostatin on cholecystokinin octapeptide-mediated bile regurgitation under stress: ionic and molecular mechanisms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2521-2527

摘要

目的: 探讨应激下胃肠肽-八肽胆囊收缩素(CCK-8S)、生长抑素(SS)的变化,以及二者在应激所致胆汁反流中的相互作用和相关机制。

方法: (1)放射免疫方法检测血浆CCK-8S和SS水平,并与正常对照组进行比较;(2)多导生理记录仪记录胃窦离体肌条在不同条件下的收缩活动;(3)免疫印迹法和免疫沉淀法检测胃窦平滑肌细胞(SMC)三型1, 4, 5-三磷酸肌醇受体(InsP₃R3)磷酸化水平;(4)Fura-3/AM标记胃窦SMC,观察硫化CCK-8S和SS对胞内钙离子浓度([Ca²⁺]_i)的影响;(5)全细胞膜片钳检测胃窦SMC的L-型电压门控钙通道电流(I_{Ca-L})的变化情况。

结果: (1)应激各时段血浆CCK-8S浓度和胃内胆汁反流水平明显增强(均 $P<0.01$),以应激结束后1-2 h最为显著,而血浆SS浓度则呈下降趋势(均 $P<0.05$);(2)CCK-8S作用下胃窦和幽门纵行及环形肌条收缩幅值、频率改变明显(均 $P<0.01$),SS作用相反且能阻断CCK的增强效应;(3)CCK-8S显著增强胃窦平滑肌细胞[Ca²⁺]_i荧光强度和I_{Ca-L}(均 $P<0.01$),SS作用相反且能阻断CCK的增强效应;(4)SS作用下CCK-8S上调的InsP₃R3磷酸化水平可被显著增强。

结论: 应激下胆汁反流及其介导的损伤效应与CCK和SS变化介导的胃动力紊乱密切相关。CCK-8S通过增强胞内钙释放和促进外钙内流增强胃窦收缩,该效应可被SS所阻断,二者在应激所致的胃动力紊乱中起到重要作用。

关键词: 应激; 胆汁反流; 胆囊收缩素; 生长抑素; 胃动力

司新敏, 黄磊, 施瑞华, 罗和生. 生长抑素对应激下胆囊收缩素介导的胆汁反流的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(24): 2521-2527

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2521.asp>

0 引言

应激性溃疡(stress ulcer, SU)是临床危重疾病的常见而严重的并发症,具有较高的发病率和死亡率,防治效果不佳且发病机制尚未完全清楚^[1]。近来研究认为,各种应激可引起体内多种脑-肠肽

含量及其功能的变化,经中枢和局部神经系统影响胃肠道的功能状态^[2]。目前胃酸过多,黏膜缺血,黏膜屏障功能破坏被认为是SU产生的重要因素,而对于胆汁反流在SU形成中的作用及其与相关脑-肠肽间的作用报道甚少。胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)和生长抑素(somatostatin, SS)是两种广泛分布于胃肠道及中枢神经系统中,具有神经递质和胃肠激素双重作用的脑-肠肽,他通过与其自身受体相结合,刺激内外分泌、胃肠运动等起着重要的调节作用^[3,4]。本研究利用浸冷水束缚法建立大鼠SU模型,检测应激大鼠血浆中胆囊收缩素八肽(cholecystokinin octapeptide, CCK-8S)和SS变化,探讨二者的变化与应激时胆汁反流的可能联系,以及二者之间的相互作用和具体的分子生物学机制,从而为临床防治和治疗SU探索新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年清洁级SD大鼠40只,体质量250-300 g,雌雄不拘,随机分为:(1)正常对照组10只,不做任何处理;(2)应激组30只,分别于应激过程中2 h,应激结束后0、1、2、4和6 h进行观察。应激组大鼠禁食不禁水24 h后,固定四肢于鼠板上,浸入5℃±0.5℃水槽中,水面浸至剑突水平,持续4 h以制成SU模型^[5]。对照组不作任何处理。心脏采血放射免疫法检测大鼠血浆中CCK-8S和SS水平,抽胃液放射免疫法检测胃液胆汁酸浓度。

1.2 方法

1.2.1 离体肌条和单个平滑肌细胞制备: 健康成年清洁级SD大鼠,体质量250-300 g,猛击大鼠头部致昏,断颈放血,迅速取胃,沿胃大弯剪开并在Krebs液中漂洗干净后去除胃窦部黏膜。沿肌纤维方向分别切取宽3 mm,长8 mm的胃窦和幽门纵行及环形肌条。制备单个平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)时,将肌条剪成2 mm×4 mm小块置于消化酶中,36.0℃-36.5℃下轻微振荡孵育25-30 min,无钙PSS缓冲液洗5次,广口火抛光的吸管吹打组织块,产生细胞悬液。所有肌条和细胞备用时均保存于2℃-8℃的KBS液中。

1.2.2 离体肌条实验: 肌条放置于垂直灌流槽,一端固定在铂丝钩上,另一端与张力换能器相连,测量肌肉收缩力量。台氏液(3 mL/min)持续灌流肌条,37℃±0.5℃下持续充以O₂(950 mL/L)和CO₂(50 mL/L)的混合气体。将肌条处于自然长度

表 1 各组血浆CCK-8S、SS及胃内胆汁酸水平变化 (mean ± SD)

分组	CCK-8S(pmol/L)	SS(ng/L)	胆汁酸(μmol/L)
正常对照组	2.23 ± 0.88	45.83 ± 2.11	37.93 ± 23.76
应激过程中2 h	4.91 ± 1.44	41.59 ± 1.58 ^a	552.28 ± 75.69 ^a
应激结束后0 h	9.05 ± 2.93 ^b	31.29 ± 1.53 ^a	690.70 ± 64.69 ^b
应激结束后1 h	10.05 ± 3.89 ^b	27.52 ± 2.53 ^b	1 316.00 ± 197.36 ^d
应激结束后2 h	10.80 ± 3.82 ^b	23.06 ± 3.11 ^b	1 087.30 ± 252.75 ^d
应激结束后4 h	8.61 ± 4.17 ^b	26.20 ± 1.82 ^a	563.22 ± 117.97 ^b
应激结束后6 h	5.87 ± 4.95 ^a	31.87 ± 1.97 ^a	62.68 ± 55.13 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ vs 正常对照组.

(不过度牵拉或松弛), 孵育60 min, 当稳定的自发性收缩出现后通过八导生理记录仪记录给药前后肌条收缩活动幅值和频率的变化.

1.2.3 免疫沉淀, 凝胶电泳和免疫印迹: 取1 mL经过处理的SMC悬液加入500 μL裂解液, 冰上放置40 min后, 4 °C下12 000 r/min离心5 min, 取上清测定蛋白总量. 加入特异性的1, 4, 5-三磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5- triphosphate receptor, InsP₃R)单抗(1:100)4 °C下孵育2 h后, 再加入protein A beads, 4 °C轻微摇动1 h, 4 °C下2 000 r/min离心1 min弃上清. 对照组样本不加抗体进行相同处理. 缓冲液洗涤沉淀5次后加入上样缓冲液, 100 °C变性5 min. 上清经12% SDS-PAGE分离后转移到预先用phospho-(Ser/Thr)substrate抗体(1:1 000)孵育过的硝酸纤维素膜上, 以特异性检测包含在PKC酶解底物序列中的磷酸化的Ser/Thr残基. 免疫沉淀经12% SDS-PAGE分离后, 电转移至硝酸纤维素膜, 与InsP₃R3单抗(1:1 000)4 °C下孵育过夜, 检测InsP₃R3总量. 显色后置于X光胶片上曝光后显影.

1.2.4 Fura-3/AM负载细胞: 细胞悬液中加入Fura-3/AM(终浓度为10 μmol/L), 37 °C温育30 min后PSS液洗2次, 调细胞悬液为5 × 10⁹/L. 激发光波长为334 nm及380 nm, 发射光波长为540 nm, 采样间隔为3 ms, 记录SMC在给药前后的荧光强度变化.

1.2.5 细胞膜片钳实验: 选取边缘齐整、横纹清晰的SMC于室温(23 °C-25 °C)下进行实验. 取SMC悬液1 mL加入细胞池中并平放于倒置显微镜上, 贴壁5 min后台氏液灌流(1 mL/min). 控制电极使其阻抗为3-4 MΩ, 进行高阻封接后负压穿孔形成全细胞模式. 细胞膜片钳实验分两组进行, 一组为对照组, 用PSS灌流; 另一组为实验组, 将药物加入PSS灌流. 全细胞模式下采用

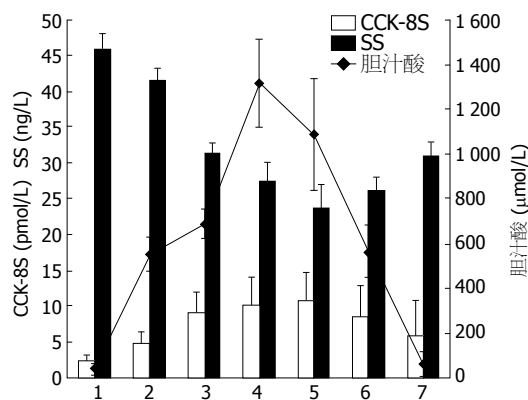


图 1 各组血浆CCK-8S、SS、胃内胆汁酸水平变化. 1: 正常对照组; 2: 应激过程中2 h; 3: 应激结束后0 h; 4: 应激结束后1 h; 5: 应激结束后2 h; 6: 应激结束后4 h; 7: 应激结束后6 h.

EPC-10-HEAKA膜片钳放大器记录L-型电压门控钙通道电流(L-type voltage-dependent calcium currents, I_{Ca-L}). 运行pCLAMP软件用于收集资料, 并用Clampfit8.0程序分析数据.

统计学处理 采用配对t检验, 实验结果以mean ± SD表示, n表示细胞或肌条例数. 肌条实验结果进行归一化处理, 即除以对照组中最大值所得的相对值, 然后用mean ± SE表示. 膜片钳实验采用膜片钳数据软件Clampfit8.0和统计软件SPSS13.0进行配对t检验, 并在GraphPad Instate 3.0制图. 所有统计结果 $P < 0.05$ 均认为有统计学意义.

2 结果

2.1 CCK-8S、SS及胆汁酸水平 应激后各时段组血浆CCK-8S和胃液胆汁酸浓度较对照组显著升高(均 $P < 0.05$ 或 0.01), 二者在应激结束后1-2 h均到达最高峰, 然后逐渐下降, 但在应激结束后6 h仍高于正常对照($P < 0.05$); SS应激后显著下降, 在应激结束后2 h达到最小值, 之后开始上升但仍低于正常对照(均 $P < 0.05$ 或 0.01 , 表1, 图1).

■ 相关报道

Castedal等近来证实十二指肠胃反流的发生与十二指肠肠逆蠕动的增强密切相关.

■ 创新盘点

本研究利用浸冷水束缚法建立大鼠SU模型,检测应激大鼠血浆中胆囊收缩素八肽(CCK-8S)和SS变化,探讨二者的变化与应激时胆汁反流的可能联系,以及二者之间的相互作用和具体的分子生物学机制。

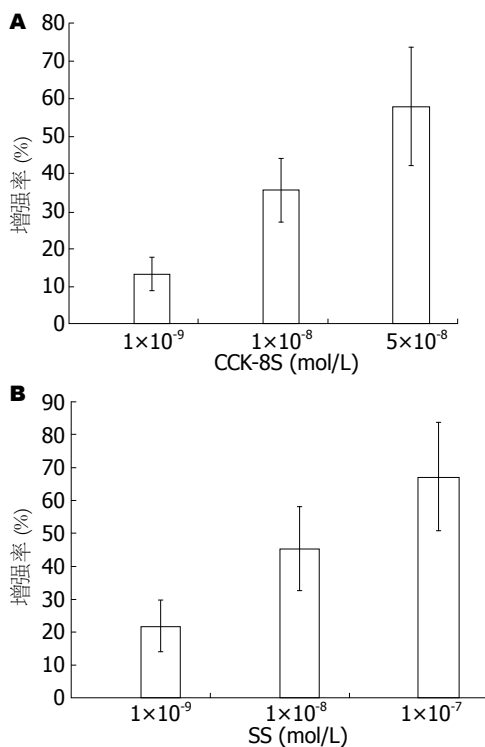


图2 不同浓度CCK-8S和SS对大鼠胃窦平滑肌收缩的影响。A: CCK-8S增强收缩效应; B: SS抑制收缩效应。

2.2 肌条实验结果 分别给予不同浓度CCK-8S(1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} mol/L)和SS(1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol/L)可呈浓度依赖性增强和抑制胃窦肌条的收缩效应($P < 0.05$, 图2)。分别给予L-型钙通道阻滞剂nifedipine(1×10^{-5} mol/L)和SS(1×10^{-7} mol/L),可降低CCK-8S(5×10^{-8} mol/L)作用下胃窦环行和纵行肌条的振幅和收缩频率(图3)。

2.3 荧光实验结果 大鼠胃窦平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光基础值为 651.3 ± 107.4 ($n = 20$)。给予CCK-8S(5×10^{-8} mol/L)后, $[Ca^{2+}]_i$ 荧光显著增强(651.3 ± 107.4 vs 764.5 ± 85.7 , 图4, 5); 给予SS (1×10^{-7} mol/L)后, $[Ca^{2+}]_i$ 荧光显著减弱(651.3 ± 107.4 vs 514.5 ± 54.9 , $P < 0.05$, 图6, 7)。

2.4 CCK-8S和SS刺激所致的PKC依赖的InsP₃R3磷酸化变化 样本预先给予和不给予PKC特异性抑制剂切勒斯埃(chelerythrine, 5×10^{-8} mmol/L)后分别加入CCK-8S(5×10^{-8} mmol/L); PKC激动剂豆蔻酰佛波醇乙酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA, 10^{-5} mmol/L)处理的样本作为阳性对照。所有样本均反应5 min。CCK-8S作用的样本中, InsP₃R3的磷酸化水平高于正常对照组(图8), SS(1×10^{-7} mmol/L)显著增强CCK-8S介导的InsP₃R3磷酸化, 而chelerythrine抑制PKC活性可阻断CCK-8S增强InsP₃R3磷酸化的效应。在PKC阳性对照组中, 给予PMA可介导InsP₃R3磷酸化

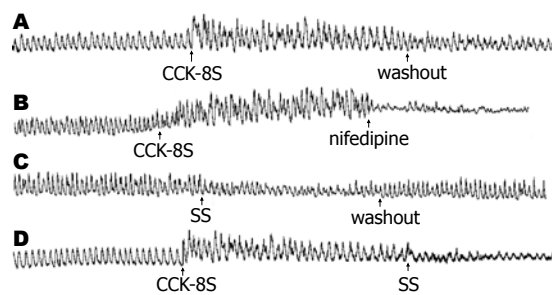


图3 L-型钙通道阻滞剂nifedipine和SS对胃窦环行和纵行肌条的振幅和收缩频率的影响。A: CCK-8S增强收缩效应; B: nifedipine可阻断CCK-8S作用下的收缩效应; C: SS抑制收缩效应; D: SS可阻断CCK-8S作用下的收缩效应。

的发生。

2.5 膜片钳实验结果 采用电压阶跃刺激模式记录时钳制电压为-40 mV, 以10 mV的阶跃从-40 mV开始去极化至40 mV, 维持400 ms, 刺激时隔10 ms。内向电流峰值在刺激后5-13 ms时出现, I-V曲线中10 mV时 I_{Ca-L} 最大, 硝苯吡啶(nifedipine, 1×10^{-5} mol/L)可抑制电压为10 mV的 I_{Ca-L} 约80% ($n = 3$), 证明该电流是 I_{Ca-L} 。与正常对照相比, CCK-8S(5×10^{-8} mol/L)作用下SMC的 I_{Ca-L} 明显增强($-56.42 \text{ pA} \pm 6.57 \text{ pA}$ vs $-88.54 \text{ pA} \pm 5.71 \text{ pA}$, $n = 10$, $P < 0.01$), 可被nifedipine(1×10^{-5} mol/L)显著抑制(图9)。SS(1×10^{-7} mol/L)可显著抑制 I_{Ca-L} (抑制率为 $87.51\% \pm 10.64\%$, $n = 10$, 图10)。此外, SS(1×10^{-7} mol/L)可阻断CCK-8S(5×10^{-8} mol/L)介导作用下SMC的 I_{Ca-L} 的增强效应(图11)。

3 讨论

胃肠道的各种功能由神经系统和各种胃肠肽类激素调节, 其中CCK和SS是众多胃肠肽中重要的两种^[6,7]。CCK-8S和SS在应激时胆汁反流中的作用不容忽视。一方面CCK结合相关CCK受体周期性松弛Oddi括约肌、促进胆囊收缩和胆汁分泌; 另一方面具有相反生理作用的SS不仅可抑制CCK的分泌还可拮抗CCK的作用, 直接抑制Oddi括约肌收缩而减少胆酸依赖性胆汁分泌的减少, 对胆囊也可产生完全和持久的抑制作用^[8]。在本研究中, 我们拟在前期研究基础上, 探讨应激所致CCK和SS变化在大鼠胃窦动力紊乱时胆汁反流的作用和相关机制。

胆汁酸对胃黏膜上皮细胞有时间及浓度依赖性细胞毒性作用。反流频率越高, 持续时间越长, 反流量越大, 引起的胃黏膜损伤越重^[9]。结果显示, 应激开始后大鼠血浆CCK-8S和胃液胆汁酸浓度即明显增强, 二者在应激结束后1-2 h均

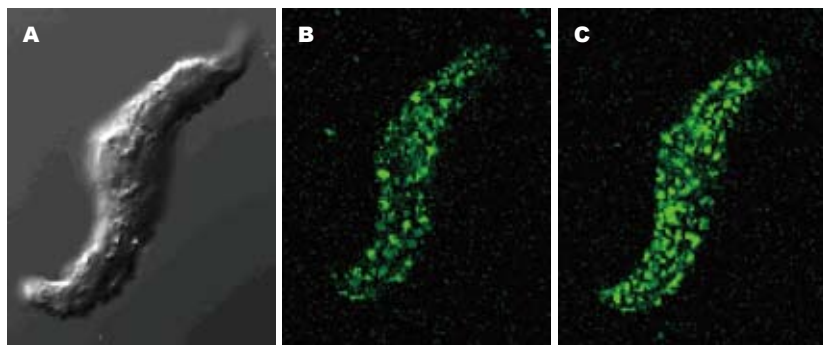


图 4 给予CCK-8S对SMC胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光变化的影响. A: 未负载fura-3/AM; B: 负载fura-3/AM; C: 给予CCK-8S.

■应用要点

应激所致体内CCK和SS变化在胃动力紊乱中起到重要作用, 并促进胆汁反流的发生; SS可通过影响CCK-8S介导的SMC胞内钙升高, 加重应激下胃动力紊乱.

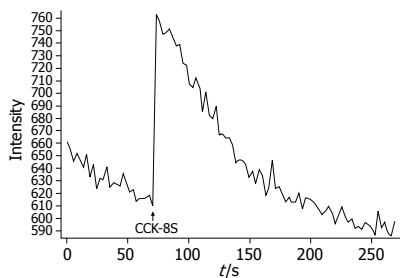


图 5 CCK-8S作用下SMC胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光变化.

达最大值, 随后开始下降但仍高于正常对照. 这与应激中胆汁反流造成的胃黏膜损伤的严重程度一致. 与CCK-8S和胆汁酸相反, 应激开始后血浆SS开始下降, 且在CCK-8S和胆汁酸水平达峰值时SS水平降至最低, 后缓慢上升. 由此可见, 应激过程中CCK分泌增加和SS分泌减少与应激中胆汁反流严重程度密切相关.

胃肠道协调运动反映在3个方面: 胃窦-幽门、胃窦-十二指肠、胃-胆囊-Oddi氏括约肌间, 应激下胆汁反流的发生是这3种协调运动紊乱的结果^[10]. 本研究结果显示CCK-8S可呈浓度依赖性的增强大鼠胃窦平滑肌肌条收缩, 而SS作用相反, CCK-8S的增强作用可被SS所抑制. 众所周知胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)升高是调节多种细胞生理过程的重要因素. 胞内钙库释放和/或外钙通过胞膜进入胞内是导致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的基础^[11]. 为进一步探明SS对CCK-8S增强胃窦肌条收缩抑制作用的机制, 我们检测二者对大鼠胃窦SMC $[Ca^{2+}]_i$ 的影响. 结果显示, CCK-8S可显著增强 $[Ca^{2+}]_i$ 水平而SS作用相反, 显著降低 $[Ca^{2+}]_i$. 胃窦-十二指肠压力梯度改变也将进一步增强应激时胆汁反流入胃. 应激时胃-十二指肠的协调运动被打破, 十二指肠逆蠕动显著增强, 胃窦-十二指肠间正常的压力梯度随之发生变化^[12]. Castedal等^[13]近来证实十二指肠胃反流的发生与十二指肠逆蠕动的增强密切相关. 应激时可导致十二指肠运

动紊乱逆蠕动显著增强, 此时胃窦环形平滑肌在频率不变的情况下收缩振幅被显著增强(在前期实验中已经得到证实)^[14], CCK升高和SS降低从而增强胃窦平滑肌收缩, 导致引起的十二指肠-胃窦压力梯度增加, 在胃窦幽门平滑肌舒张间期大量的胆汁更易反流入胃.

细胞质中钙离子浓度是胃肠平滑肌活动的决定性因素, 而 $InsP_3R$ 是动员胞内钙库的重要因素^[14]. 研究显示CCK可介导胞内三磷酸肌醇($InsP_3$)与内质网上 $InsP_3R$ 结合, 刺激胞内钙释放引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高引发细胞收缩、神经传递等生理性反应. PKC通过磷酸化 $InsP_3R$ 中不同位点上的丝/苏氨酸, 磷酸化后的 $InsP_3R$ 显著降低了对 $InsP_3$ 的敏感性, 从而抑制 $InsP_3$ 敏感的内质网钙库钙释放, 他是调节胞内钙信号的一种重要的丝氨酸-苏氨酸激酶^[15,16]. 在本实验中, 免疫沉淀结果显示分别给予PKC激动剂PMA和CCK-8S, CCK的增强作用可被PKC抑制剂chelerythrine所抑制. 此外, 给予SS则可显著增强CCK-8S介导的胃窦SMC $InsP_3R$ 磷酸化, 提示一方面PKC参与CCK介导的胃窦SMC $InsP_3R$ 磷酸化调节, 另一方面SS通过增强CCK介导的 $InsP_3R$ 磷酸化, 抑制胞内钙释放. 由于在本实验中, 应激过程中SS水平显著下降, 故SS对CCK介导的 $InsP_3R$ 磷酸化抑制效应降低, 促进了CCK介导的胞内钙释放, 从而加重应激过程中胃窦动力紊乱的发生. 此外, 我们在记录胃窦SMC I_{Ca-L} 时发现, SS对CCK介导的 I_{Ca-L} 增强效应具有明显的抑制作用. 然而在应激状态下, SS水平的显著下降削弱了对CCK的抑制效应, 促进了细胞外钙离子通过L-型钙通道进入胞内, 加重胞内钙离子紊乱导致胃窦动力紊乱的发生.

总之, 通过本实验我们得出; (1)应激状态下胆汁反流的确存在且在SU发生中起到重要作用; (2)应激所致体内CCK和SS变化在胃动力

■同行评价

本文设计合理, 数据可靠, 对预防应激所致的胃动力紊乱有一定借鉴价值。

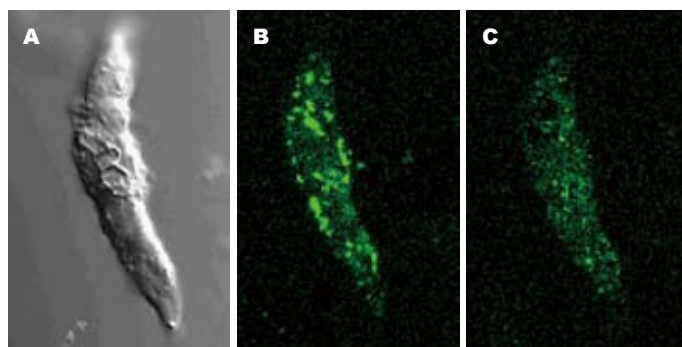


图 6 SS对SMC胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光变化的影响. A: 未负载fura-3/AM; B: 负载fura-3/AM; C: 给予SS.

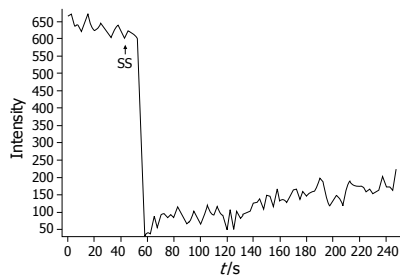


图 7 SS作用下SMC胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光变化.

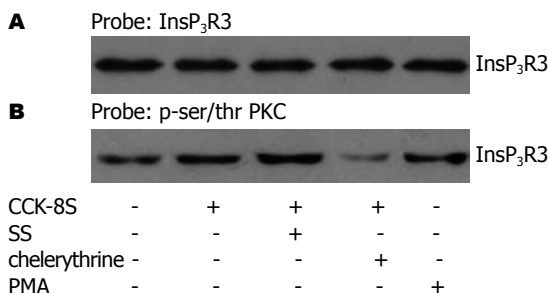


图 8 CCK-8S和SS刺激所致的PKC依赖的InsP₃R₃的磷酸化变化. A: 免疫沉淀法检测InsP₃R₃沉淀中磷酸化水平; B: 免疫印迹法检测A中InsP₃R₃沉淀水平.

紊乱中起到重要作用, 并促进胆汁反流的发生;
(3)SS可通过影响CCK-8S介导的SMC胞内钙升高, 加重应激下胃动力紊乱。

4 参考文献

- Spirt MJ. Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther* 2004; 26: 197-213
- 李勋, 余安国, 邓镇平, 刘有生, 李永炬, 杨承华, 林景泰, 胡以则. 大鼠应激性溃疡发病机理及防治研究. *中国普外基础与临床杂志* 2000; 7: 138-140
- 邹百仓, 魏睦新. 胆囊收缩素与消化道运动. *国外医学·消化疾病分册* 2002; 22: 112-115
- 刘燕强, 辛天蓉, 任自立. 生长抑素及其受体. *生理科学进展* 2005; 36: 86-91
- Dai Y, Liu JX, Li JX, Xu YF. Effect of pinaverium bromide on stress-induced colonic smooth muscle contractility disorder in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 557-561
- 陈陆代. 胆囊收缩素对消化道运动调节作用的研究进

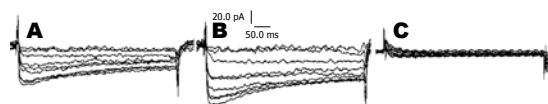


图 9 CCK-8S作用下胃窦SMC上 Ca^{2+} 变化. A: 正常的胃窦; B: 给予CCK-8S; C: 给予nifedipine.

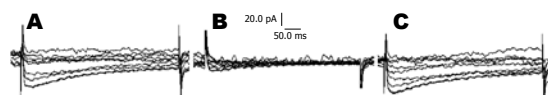


图 10 SS作用下胃窦SMC上 Ca^{2+} 变化. A: 正常的胃窦; B: 给予SS; C: 去除SS.

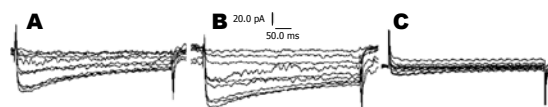


图 11 CCK-8S和SS作用下胃窦SMC上 Ca^{2+} 变化. A: 正常的胃窦; B: 给予CCK-8S; C: 给予SS.

展. *临床消化病杂志* 2002; 14: 185-187

- 王虹, 姜佳丽, 刘宾. 胆汁反流性胃炎. *中华内科杂志* 2003; 41: 189-190
- van der Schaar PJ, Bremer Y, Lamers CB, Masclee AA. Role of cholecystokinin in relaxation of the proximal stomach. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 361-366
- 陈敏, 罗和生, 陈继红, 全巧云, 李贤珍. 应激性溃疡时胃内胆汁酸的变化及铝碳酸镁的保护作用. *中华消化杂志* 2005; 25: 248-250
- 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: 10-11
- Muinuddin A, Neshatian L, Gaisano HY, Diamant NE. Calcium source diversity in feline lower esophageal sphincter circular and sling muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G271-G277
- Straathof JW, Mearadji B, Lamers CB, Masclee AA. Effect of CCK on proximal gastric motor function in humans. *Am J Physiol* 1998; 274: G939-G944
- Castedal M, Björnsson E, Gretarsdottir J, Fjalling M, Abrahamsson H. Scintigraphic assessment of interdigestive duodenogastric reflux in humans: distinguishing between duodenal and biliary reflux material. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 590-598
- Si XM, Huang L, Lv P, Xia H, Luo HS. Effects of cholecystokinin-8 induced gastric dysmotility on bile regurgitation during stress and molecular

- mechanisms. *Regul Pept* 2006; 136: 64-71
- 15 Li B, Wu Q, Shi JS, Sun AS, Huang XN. Effects of protopine on intracellular calcium and the PKC activity of rat aorta smooth muscle. *Shengli Xuebao* 2005; 57: 240-246
- 16 Bai M, Trivedi S, Lane CR, Yang Y, Quinn SJ, Brown EM. Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) inhibits coupling to Ca^{2+} store release. *J Biol Chem* 1998; 273: 21267-21275

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检查, 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, 包括原创文章、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)

Sphk1对人结肠癌细胞株Lovo增殖与侵袭的影响及其作用机制

钟月圆, 黄杰安, 刘诗权, 覃蒙斌, 金 卉

■背景资料

Sphk1催化反应的产物1-磷酸鞘氨醇(S1P)是一个同时具有细胞内第二信使和细胞外第一信使双重功能的脂类生物活性分子。Sphk1/S1P信号通路在调节细胞迁移、增殖、凋亡等过程中具有重要作用,但Sphk1及其信号传导通路在结肠肿瘤中的作用及机制目前尚未阐明。

钟月圆, 黄杰安, 刘诗权, 覃蒙斌, 金卉, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
钟月圆, 广西医科大学2008级硕士研究生, 主要从事消化系统疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30760275

广西科学基金资助项目, No. 0832008

作者贡献分布: 黄杰安是该研究项目的负责人; 此课题由黄杰安与刘诗权设计; 研究过程由钟月圆、覃蒙斌及金卉操作完成; 本文写作由钟月圆完成; 黄杰安与刘诗权对本次课题的完成给予指导。

通讯作者: 黄杰安, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院消化内科。jh23229@gmail.com

收稿日期: 2010-04-27 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-28

Role of Sphk1 in the proliferation and invasion of human colon cancer Lovo cells

Yue-Yuan Zhong, Jie-An Huang, Shi-Quan Liu, Meng-Bin Qin, Hui Jin

Yue-Yuan Zhong, Jie-An Huang, Shi-Quan Liu, Meng-Bin Qin, Hui Jin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760275; and the Scientific Foundation of Guangxi, No. 0832008

Correspondence to: Professor Jie-An Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jh23229@gmail.com

Received: 2010-04-27 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To investigate the role of sphingosine kinase 1 (Sphk1) in the proliferation, apoptosis and invasion of colon cancer cells.

METHODS: Human colon cancer Lovo cells were divided into three groups: Sphk1 activation group [treated with 100 nmol/L phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)], Sphk1 suppression group [treated with 50 μ mol/L N,N-dimethyl-D-erythro-sphingosine (DMS)], and control group (treated with 9 g/L NaCl). Cell proliferation activity was detected by MTT assay; cell apoptosis was detected by flow cytometry; cell invasion was detected by Transwell

chamber assay; and the protein expression of Sphk1, ERK1/2, p-ERK1/2, and NF- κ B p65 was detected by Western blot.

RESULTS: PMA significantly induced the expression of Sphk1 protein, promoted Lovo cell growth and invasion, inhibited cell apoptosis, and up-regulated the protein expression of ERK1/2, p-ERK1/2, and NF- κ B p65. In contrast, DMS significantly inhibited the expression of Sphk1 protein, suppressed cell growth, promoted apoptosis, and down-regulated the protein expression of ERK1/2, p-ERK1/2, and NF- κ B p65. The apoptosis rates in the Sphk1 activation group, Sphk1 suppression group and control group were 9.15%, 16.25% and 32.58%, respectively. The relative invasion rate in the Sphk1 activation group was significantly higher than that in the Sphk1 suppression group (190.57% vs 9.65%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Sphk1 promotes the proliferation and invasion but inhibits apoptosis of Lovo cells possibly via a mechanism associated with the activation of ERK1/2 and NF- κ B signaling pathways.

Key Words: Sphingosine kinase 1; Human colon cancer cell; Invasion; Apoptosis; Proliferation

Zhong YY, Huang JA, Liu SQ, Qin MB, Jin H. Role of Sphk1 in the proliferation and invasion of human colon cancer Lovo cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2528-2532

摘要

目的: 研究Sphk1对结肠癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响并探讨其机制。

方法: 将人结肠癌Lovo细胞株分成Sphk1激活组, Sphk1抑制组, 空白对照组。以佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)为Sphk1激活剂(终浓度为100 nmol/L), N, N-二甲基鞘氨醇(erythro-sphingosine N, N-Dimethyl, DMS)为Sphk1抑制剂(终

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

浓度为50 $\mu\text{mol/L}$)处理Lovo细胞24 h后, 用MTT方法测定细胞的增殖活性, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 用Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力, 用Western blot测定细胞Sphk1、ERK1/2、p-ERK1/2、NF- κ B p65蛋白水平的变化。

结果: PMA可以明显诱导Sphk1蛋白的表达, 促进Lovo细胞生长, 抑制细胞的凋亡, 并促进细胞的侵袭; 相反, DMS明显抑制Sphk1的表达, 抑制细胞生长, 促进细胞的凋亡, 并抑制细胞的侵袭。Sphk1激活组、对照组、抑制组的细胞凋亡率分别是9.15%, 16.25%, 32.58%。与对照组相比, Sphk1激活组、抑制组的细胞相对侵袭率分别是190.57%, 9.65%, 差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。PMA诱导Sphk1表达, 同时伴有ERK1/2、p-ERK1/2和NF- κ B p65蛋白表达的上调, DMS抑制Sphk1表达, 可抑制ERK1/2、p-ERK1/2、NF- κ B p65蛋白的表达。

结论: Sphk1可促进Lovo细胞的生长增殖与侵袭并抑制细胞的凋亡, 其机制可能与ERK1/2和NF- κ B信号通路的激活有关。

关键词: 鞘氨醇激酶-1; 人结肠癌细胞; 侵袭; 凋亡; 增殖

钟月圆, 黄杰安, 刘诗权, 覃蒙斌, 金开. Sphk1对人结肠癌细胞株Lovo增殖与侵袭的影响及其作用机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2528–2532

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2528.asp>

0 引言

鞘氨醇激酶-1(sphingosine kinase 1, Sphk1)是鞘脂代谢平衡的重要限速酶, Sphk1催化反应的产物1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)是一个同时具有细胞内第二信使和细胞外第一信使双重功能的脂类生物活性分子。Sphk1/S1P信号通路在调节细胞迁移、增殖、凋亡等过程中具有重要作用^[1], 但Sphk1及其信号传导通路在结肠肿瘤中的作用及机制目前尚未阐明。本研究通过化学方法调控Sphk1蛋白的表达, 观察Sphk1对结肠肿瘤Lovo细胞的生长增殖、凋亡、侵袭及细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK1/2)、p-ERK1/2和NF- κ B p65表达的影响, 以期明确Sphk1对人结肠癌细胞的增殖、凋亡及侵袭的影响并探讨其机制, 为结肠癌的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株Lovo购自南京凯基生

物科技发展有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; DMEM(高糖型)购自Invitrogen公司, PBS购自福州迈新生物技术开发有限公司; 细胞培养瓶及Transwell均购自Corning Costar公司; 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自Sigma-Aldrich公司; N, N-二甲基硝胺醇(erythro-sphingosine, N, N-Dimethyl-, DMS)购自Calbiochem公司; 四氮唑蓝购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术研究; 鼠抗人Sphk1单克隆抗体购自Sigma-Aldrich公司, 兔抗人ERK1/2、p-ERK1/2多克隆抗体购自Cell Signaling Technology公司, 鼠抗人NF- κ B p65多克隆抗体购自Santa Cruz, 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG2005、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG2004均购自Santa Cruz。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人结肠癌Lovo细胞置于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 , 饱和湿度条件下培养。

1.2.2 MTT法测定Lovo细胞的增殖活性: 取对数生长期细胞制备细胞悬液, 调整细胞密度为 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$, 接种至96孔板, 每孔200 μL (相当于5 000个细胞), 实验分3组: 空白对照组、Sphk1激活组和Sphk1抑制组, 每组重复3孔。培养12 h后细胞贴壁后, Sphk1激活组加终浓度为100 nmol/L的PMA, Sphk1抑制组加终浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 的DMS。作用后24 h后每孔加入MTT 20 μL (5 g/L), 继续培养4 h, 弃上清, 加入DMSO 150 μL , 上酶标仪, 以570 nm波长处测定吸光度(A)值, 以空白试剂为对照, 分析数据。重复实验3次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率: 细胞处理同上, 干预24 h后用不含EDTA的胰酶消化收集细胞, 然后用PBS洗涤细胞2次(2 000 r/min离心5 min), 收集 5×10^5 细胞, 加入500 μL Binding Buffer悬浮细胞, 加入5 μL Annexin V-FITC混匀后, 加入5 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI), 混匀, 室温避光反应10 min, 1 h内进行流式细胞仪的观察和检测。使用未经凋亡诱导处理的空白对照组的细胞进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

1.2.4 侵袭实验: 处理同上, 作用后24 h后用0.25%的胰酶消化细胞, 并用1%的含血清培养基洗涤细胞2次, 制备细胞悬液, 调整细胞密度为5

■ 研究前沿

现有资料表明, Sphk1在多种肿瘤包括结肠癌和胃癌的表达增高, 他参与肿瘤的发生发展, 但其机制及信号传导通路目前尚不明确。

■ 相关报道

Koda等报道Sphk1通过MEK/ERK信号通路参与双丁酰环磷酸苷(dbcAMP)诱导的HL60细胞增殖,而应用多西他塞抑制Sphk1活性后可以促进前列腺癌细胞的凋亡。

$\times 10^5/\text{mL}$, 取200 μL 细胞悬液种于铺好了Matrigel胶的Transwell小室中, 外室注入培养基。24 h后倒置Transwell小室, 滤膜下表面朝上, 自然风干, 结晶紫染色, 再次倒置Transwell小室, 自然风干, 刀片取下滤膜置于载玻片上, 滴中性树脂, 盖上盖玻片。显微镜计算3个视野中的细胞取平均值, 以空白试剂为对照, 分析数据。重复实验3次。

1.2.5 Western blot检测: 将人结肠癌Lovo细胞接种于直径为6 cm的细胞培养皿中, 接种细胞密度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$, 实验分组及细胞药物处理同上。作用24 h后收集细胞, 按照每20 μL 细胞沉淀加200 μL 已添加了PMSF的细胞质蛋白抽提试剂, 冰浴15 min, 4°C 12 000 r/min离心15 min, 上清即为抽提到的细胞质蛋白。余沉淀用滤纸吸尽残余液体, 加入50 μL 添加了PMSF的细胞核蛋白抽提试剂, 冰浴30 min, 4°C 12 000 r/min离心20 min, 收集上清, 即为抽提到的细胞核蛋白。Bradford法测定蛋白浓度, 将 $5 \times \text{SDS-PAGE}$ 蛋白上样缓冲液加入蛋白中煮沸变性。取适量(60 μg)蛋白于SDS-PAGE分离后转至PVDF膜, 用5%的脱脂奶粉封闭1 h, 根据抗体说明书稀释抗体(Sphk1 1:500, ERK1/2 1:1 000, p-ERK1/2 1:1 000, NF- κB p65 1:800), 孵一抗(4°C , 摇床, 过夜), 根据抗体说明书稀释二抗(Sphk1、ERK1/2、p-ERK1/2、NF- κB p65对应的二抗稀释倍数分别是: 1:3 000, 1:4 000, 1:4 000, 1:3 000), 孵二抗(1 h, 摇床), ECL显影。重复实验3次。显影结果采用quanty-one分析软件进行图像分析。

统计学处理 采用单因素方差分析方法, 用SPSS11.5统计软件进行处理, 各实验结果以mean $\pm$ SD表示, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 Sphk1在Lovo细胞的表达及Sphk1活性对ERK1/2, p-ERK1/2, NF- κB p65蛋白表达的影响 结肠癌Lovo细胞Sphk1在Western blot中显示一条明显的分子条带, 相对分子质量为44 000 Da。PMA可明显增加Sphk1的表达, 而DMS可明显抑制Sphk1蛋白的表达(图1)。增强Sphk1的活性, ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达上调, 相反, 抑制Sphk1的活性, ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达下调。ERK1/2、p-ERK1/2蛋白的表达在Sphk1激活组、对照组、抑制组逐渐减弱, 各组间差别均有显著性(均 $P < 0.05$)。Sphk1的活性亦与NF- κB p65蛋白表达呈正相关, 增强Sphk1的活性, NF-

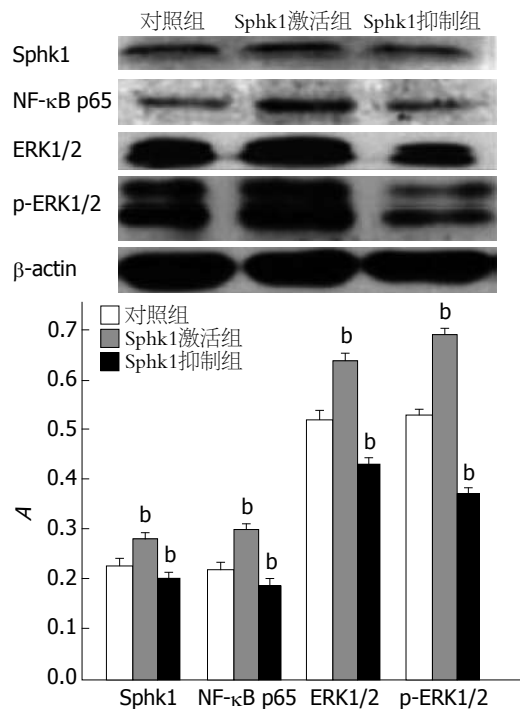


图1 结肠癌Lovo细胞Sphk1蛋白的表达。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

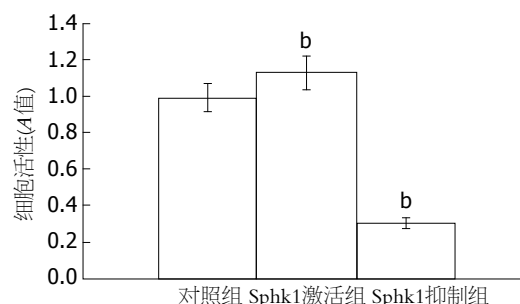


图2 Sphk1激活剂或抑制剂对Lovo细胞增殖活性的影响。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

κB p65蛋白表达上调, 相反, 抑制Sphk1的活性, NF- κB p65蛋白表达下调。NF- κB p65蛋白的表达在Sphk1激活组、对照组、抑制组逐渐减弱, 各组间差别均有显著性($P < 0.05$, 图1)。

2.2 Sphk1激活剂或抑制剂对Lovo细胞生长增殖的影响 Sphk1激活剂PMA具有促进Lovo细胞生长增殖的作用, 相反, Sphk1抑制剂DMS可抑制Lovo细胞生长增殖(图2)。

2.3 Sphk1激活剂或抑制剂对Lovo细胞凋亡的影响 PMA显著抑制细胞凋亡率($P < 0.01$), 而DMS明显促进细胞凋亡($P < 0.01$, 图3)。Sphk1激活组、对照组、抑制组的细胞凋亡率分别是9.15%, 16.25%, 32.58%。

2.4 Sphk1激活剂或抑制剂对Lovo细胞侵袭能力的影响 PMA显著促进细胞侵袭, 而DMS则明显抑制细胞侵袭。与对照组相比Sphk1激活组、抑

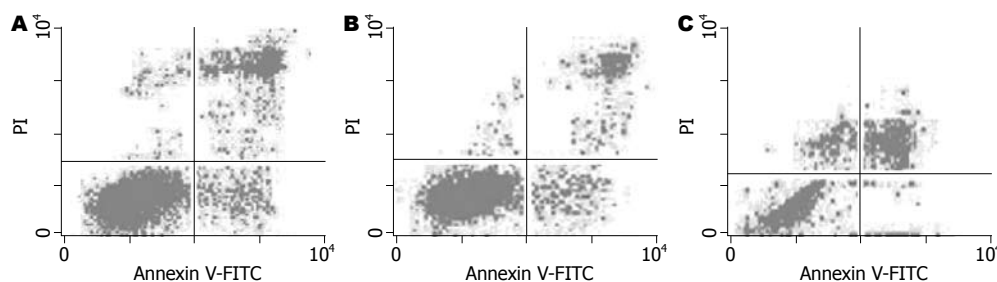


图3 Sphk1激活剂或抑制剂对Lovo细胞凋亡的影响. A: 对照组; B: Sphk1激活组; C: Sphk1抑制组.

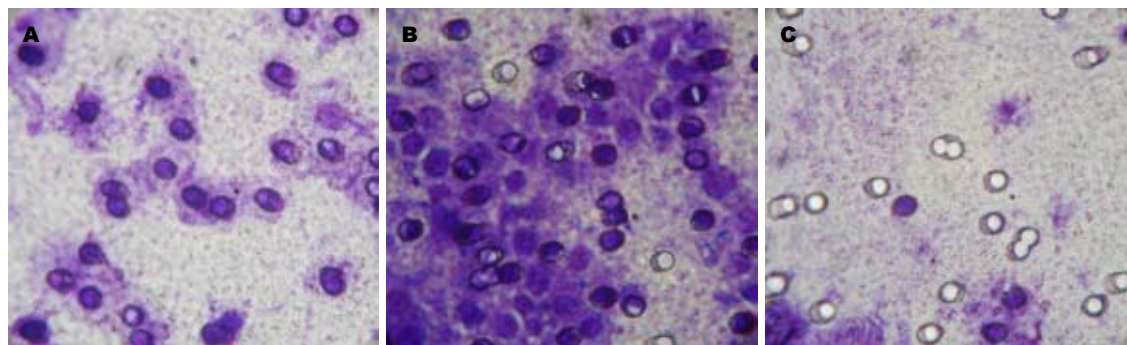


图4 Sphk1激活剂或抑制剂对Lovo细胞侵袭的影响(H&E × 400). A: 对照组; B: Sphk1激活组; C: Sphk1抑制组.

制组的细胞相对侵袭率分别是190.57%, 9.65%, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$, 图4).

3 讨论

现有资料表明, Sphk1在多种肿瘤包括结肠癌和胃癌^[2]的表达增高, 他参与肿瘤的发生发展, 但其机制及信号传导通路目前尚不明确. Sphk1已被认为是一种潜在靶向治疗目标^[3]. 有研究报道^[4]PMA刺激Sphk1聚集在质膜脂质筏微区(plasma membrane lipid raft microdomain)从而导致Sphk1代谢产物S1P增多, 进而促进细胞生长. Koda等^[5]报道Sphk1通过MEK/ERK信号通路参与双丁酰环磷酸腺苷(dibutyryl cyclic AMP, dbcAMP)诱导的HL60细胞增殖. 而应用多西他塞抑制Sphk1活性后可以促进前列腺癌细胞的凋亡^[6]. 同时, Sphk1抑制剂SK1- I通过抑制AKT磷酸化, 导致胶质母细胞瘤细胞生长受抑制, 引起细胞凋亡^[7]. 我们检测了不同Sphk1活性调节剂对人结肠癌细胞株Lovo的影响, MTT检测结果与流式细胞术检测结果发现PMA能促进细胞增殖, 而DMS则促进细胞凋亡. 初步证实Sphk1具有促进细胞增殖作用. 在我们随后的研究中, Sphk1调节剂干预Lovo后, 与对照组比较, Sphk1激活组的Sphk1、ERK与p-ERK1/2的蛋白表达量明显增多, Sphk1抑制组的Sphk1、ERK与p-ERK1/2的蛋白表达量则减

少. 我们推断Sphk1可能通过促进ERK1/2表达与活化而发挥促增殖的作用. 这是因为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径是调节细胞生长增殖最重要的细胞通路, MAPK家族有3个主要亚型: ERK1/2, JNK(c-Jun amino-terminal kinase), p38 MAPK, 虽然这些激酶有60%-70%的同源性, 但他们受不同的刺激, 激活不同的活性部位, 发挥不同的生物学功能. 一般来说, ERK1/2受有丝分裂刺激因子及生长因子激活, 与细胞增殖相关^[8]. 其中Ras/Raf/MEK/ERK通路 with 肿瘤细胞增殖的关系密切, 此信号通路被激活后, ERK1/2被磷酸化成p-ERK1/2, 转位至细胞核, 作用于转录因子(如NF- κ B, c-Myc等), 调控基因的表达从而产生不同的作用^[9]. 据McCubrey等报道^[10]使用MEK抑制剂抑制该信号通路后, 肿瘤细胞增殖受到抑制, 促进肿瘤细胞凋亡, 如Matsui等^[11]用MEK抑制剂JTP-70902作用人纤维肉瘤细胞后, 纤维肉瘤细胞生长增殖受到抑制并停留在G₁/S期. 同时, 有报道^[12]称血管活性肠肽激动剂VIP-DAP3(γ -glutamyl l6-diaminopropane derivative of vasoactive intestinal peptide)在拮抗抗氧化作用中通过激活ERK1/2及AKT信号通路来促进非小细胞肺癌细胞增殖及生长. 而NF- κ B p65作为一种转录因子, 其C末端有一转录激活区域, 这一结构是NF- κ B p65参与基因转录的基本结构. 而异

■应用要点

本研究通过化学方法调控Sphk1蛋白的表达, 观察Sphk1对结肠肿瘤Lovo细胞的生长增殖、凋亡、侵袭及ERK1/2、p-ERK1/2和NF- κ B p65表达的影响, 以期明确Sphk1对人结肠癌细胞的增殖与凋亡及侵袭的影响并探讨其机制, 为结肠癌的防治提供理论依据.

同行评价

本文观点新颖, 结果可靠, 分析有深度, 具有一定的临床实用价值。

常活化的NF- κ B p65与人类的诸多肿瘤有关, 其中抗凋亡作用在肿瘤治疗中降低了许多药物治疗的作用^[13]。本研究中Western blot检测结果发现与对照组比较, 在Sphk1激活组NF- κ B p65蛋白表达量明显增多, 而Sphk1抑制组表达量减少。我们认为在人结肠癌细胞株Lovo中Sphk1可能通过促进NF- κ B p65蛋白的表达, 而发挥促增殖的作用。其机制可能是NF- κ B信号通路在肿瘤细胞中抑制细胞凋亡、促进细胞增殖^[14]。有学者^[15]报道在鼠结肠肿瘤中虾青素通过抑制ERK2、NF- κ B、AKT引起细胞凋亡。

另外, Sphk1催化反应产物S1P通过其5种G蛋白偶联受体在肿瘤细胞侵袭、迁移中发挥作用^[16]。在体外实验中发现Sphk1受转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)受体刺激后, S1P生成增多, 进一步地激活ERK1/2, 促进食管肿瘤细胞侵袭与迁移^[17]。我们研究发现在用不同活性的Sphk1调节剂处理细胞24 h后, 采用Transwell侵袭实验检测细胞侵袭力, 结果发现, 与对照组相比Sphk1激活组的侵袭力明显增强, 而Sphk1抑制组侵袭力下降。其机制也可能与NF- κ B在肿瘤发展中调节与侵袭相关因子(如基质金属蛋白酶)转录发挥其作用^[18]有关。

总之, 我们在应用化学干预方法调控Sphk1的活性, 观察Sphk1对结肠癌细胞株Lovo的生长增殖, 凋亡及侵袭作用的研究中, 发现在人结肠肿瘤细胞株Lovo中, Sphk1通过提高ERK1/2蛋白表达, 促进ERK1/2磷酸化成p-ERK1/2, 促进NF- κ B p65蛋白的表达参与, 促进Lovo细胞增殖, 减少细胞凋亡, 促进细胞侵袭。

参考文献

- 1 Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 397-407
- 2 French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, Yun JK, Smith CD. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 2003; 63: 5962-5969
- 3 Cuvillier O. Sphingosine kinase-1--a potential therapeutic target in cancer. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 105-110
- 4 Hengst JA, Guilford JM, Fox TE, Wang X, Conroy EJ, Yun JK. Sphingosine kinase 1 localized to the plasma membrane lipid raft microdomain overcomes serum deprivation induced growth inhibition. *Arch Biochem Biophys* 2009; 492: 62-73
- 5 Koda M, Murate T, Wang S, Ohguchi K, Sobue S, Ikeda M, Tamiya-Koizumi K, Igarashi Y, Nozawa

- Y, Banno Y. Sphingosine kinase 1 is involved in dibutyryl cyclic AMP-induced granulocytic differentiation through the upregulation of extracellular signal-regulated kinase, but not p38 MAP kinase, in HL60 cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733: 101-110
- 6 Sauer L, Nunes J, Salunkhe V, Skalska L, Kohama T, Cuvillier O, Waxman J, Pchejetski D. Sphingosine kinase 1 inhibition sensitizes hormone-resistant prostate cancer to docetaxel. *Int J Cancer* 2009; 125: 2728-2736
- 7 Kapitonov D, Allegood JC, Mitchell C, Hait NC, Almenara JA, Adams JK, Zipkin RE, Dent P, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res* 2009; 69: 6915-6923
- 8 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81: 807-869
- 9 Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189-218
- 10 McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Chappell WH, Russo S, Ove R, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Stivala F, Nicoletti F, Libra M, Martelli AM, Montalto G, Cervello M. Emerging MEK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs* 2010; 15: 203-223
- 11 Matsui TA, Murata H, Sowa Y, Sakabe T, Koto K, Horie N, Tsuji Y, Sakai T, Kubo T. A novel MEK1/2 inhibitor induces G1/S cell cycle arrest in human fibrosarcoma cells. *Oncol Rep* 2010; 24: 329-333
- 12 Stiuso P, Giuberti G, Lombardi A, Dicitore A, Limongelli V, Carteni M, Abbruzzese A, Caraglia M. Gamma-glutamyl 16-diaminopropane derivative of vasoactive intestinal peptide: a potent anti-oxidative agent for human epidermoid cancer cells. *Amino Acids* 2010; 39: 661-670
- 13 Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-246
- 14 Orłowski RZ, Baldwin AS Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8: 385-389
- 15 Nagendraprabhu P, Sudhandiran G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2. *Invest New Drugs* 2009 Oct 30. [Epub ahead of print]
- 16 Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S. Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 662-673
- 17 Miller AV, Alvarez SE, Spiegel S, Lebman DA. Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4142-4151
- 18 Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6: 203-208

编辑 李军亮 电编 何基才

mTOR及CyclinD1蛋白在食管鳞癌中表达的相关性及临床病理意义

陈会枝, 崔黎, 李晟磊, 陈奎生, 杨建萍

陈会枝, 郑州大学第一附属医院检验科 河南省郑州市 450052
崔黎, 李晟磊, 陈奎生, 杨建萍, 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 45005
陈会枝, 副主任技师, 主要从事消化系统肿瘤研究.
河南省杰出青年科学基金资助项目, No. 07400510009
通讯作者: 杨建萍, 主治医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院病理科. lslbjys@126.com
电话: 0371-66658175
收稿日期: 2010-05-18 修回日期: 2010-07-08
接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Clinical pathological significance of mTOR and Cyclin D1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma

Hui-Zhi Chen, Li Cui, Sheng-Lei Li, Kui-Sheng Chen, Jian-Ping Yang

Hui-Zhi Chen, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Li Cui, Sheng-Lei Li, Kui-Sheng Chen, Jian-Ping Yang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Excellent Youth Foundation of Henan Province, No. 07400510009

Correspondence to: Jian-Ping Yang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lslbjys@126.com

Received: 2010-05-18 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To explore the relationship of mammalian target of rapamycin (mTOR) and Cyclin D1 protein expression with the development, progression, invasion, and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma.

METHODS: The expression of mTOR and Cyclin D1 proteins in 62 esophageal squamous cell carcinoma specimens and 56 normal esophageal epithelial tissue specimens was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method.

RESULTS: The positive rates of mTOR and Cyclin D1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma were significantly higher than those in normal esophageal epithelium (53.2% vs 30.4% and 77.4% vs 12.3%; $\chi^2 = 5.400$ and 48.106; both $P < 0.05$). The positive rate of mTOR protein expression is closely correlated with tumor histological grade in esophageal squamous cell carcinoma ($\chi^2 = 3.960$, $P < 0.05$). There is a positive correlation between the expression of mTOR and Cyclin D1 proteins ($\gamma_p = 0.344$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Both mTOR and Cyclin D1 play an important role in the invasion, metastasis and mucosal epithelial canceration of esophageal squamous cell carcinoma. Combined detection of mTOR and Cyclin D1 expression is a promising molecular parameter for early diagnosis and prognostic evaluation of esophageal squamous cell carcinoma.

Key Words: Mammalian target of rapamycin; Cyclin D1 protein; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; Invasion and metastasis

Chen HZ, Cui L, Li SL, Chen KS, Yang JP. Clinical pathological significance of mTOR and Cyclin D1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2533-2537

摘要

目的: 探讨哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及CyclinD1蛋白表达与食管癌发生、发展及浸润、转移的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测食管鳞癌组织62例及正常食管黏膜组织56例中mTOR及Cyclin D1蛋白表达。

结果: 食管鳞癌组织中mTOR及CyclinD1蛋白阳性表达率均显著高于正常食管黏膜组织中二者蛋白阳性表达率(53.2% vs 30.4%, 77.4% vs 12.3%), 组间比较差异均有统计学意义(χ^2

■背景资料

细胞信号转导通路的阐明, 极大地丰富了人们对细胞癌变机制的认识。现已发现, 许多肿瘤伴有mTOR信号通路的异常, 在该通路中mTOR过表达可对CyclinD1及Myc等癌基因在翻译水平上的表达产生影响。mTOR的下游因子S6K1扩增或过表达的现象在多种肿瘤中亦会发生。

■同行评议者

李媛, 教授, 广西肿瘤研究所

■ 研发前沿

食管鳞癌的发生与发展是一个多因素作用的过程,其中细胞信号传导通路上某些蛋白的异常对细胞恶变的影响已引起研究者的关注.如何从分子水平来寻找食管癌可能的分子治疗靶点长期以来备受人们关注.

= 5.400, 48.106, 均 $P < 0.05$);食管鳞癌组织中CyclinD1蛋白阳性表达率与癌的组织学分级密切相关,组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 3.960$, $P < 0.05$);mTOR与CyclinD1的蛋白表达呈正相关关系($\gamma_p = 0.344$, $P < 0.05$).

结论: mTOR和CyclinD1在食管癌的浸润、转移及黏膜上皮癌变过程中起重要作用, mTOR及CyclinD1的联合检测可望成为食管鳞癌早期诊断和判断预后的分子指标之一.

关键词: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;细胞周期调节蛋白D1;食管鳞癌;免疫组织化学;浸润转移

陈会枝, 崔黎, 李晟磊, 陈奎生, 杨建萍. mTOR及CyclinD1蛋白在食管鳞癌中表达的相关性及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2533-2537

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2533.asp>

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, mTOR信号通路对细胞的生长及增殖起重要调节作用^[1-3]. 细胞周期调节蛋白D1(cyclinD1 protein)是一类在细胞周期中含量呈周期性变化的细胞周期调节蛋白,作为细胞周期的启动因子,与多种恶性肿瘤的发生发展关系密切^[4,5]. mTOR信号通路对细胞的生长及增殖起重要调节作用. 目前,关于mTOR基因与食管癌浸润、转移的关系及mTOR与CyclinD1表达相关性的研究,迄今国内外均未见报道. 本文采用免疫组织化学SP法检测mTOR与CyclinD1在62例食管鳞癌组织及56例正常食管黏膜组织中的表达,探讨mTOR与CyclinD1在食管癌发生、发展中的作用,以期寻找食管癌早期诊断和判断预后的分子指标.

1 材料和方法

1.1 材料 所有标本选用2006-06/2007-06郑州大学一附院食管癌根治术中手术切除的食管癌组织石蜡包埋的标本62例,每例食管鳞癌组织病理切片均有病理专家确诊. 术前患者均未接受放疗、化疗及其他治疗. 兔抗人mTOR单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司,鼠抗人单克隆抗体CyclinD1及SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法 采用免疫组织化学SP法, mTOR及CyclinD1抗体稀释倍数为1:100及1:120, DAB

显色,苏木素复染. 染色步骤严格按说明书进行,以PBS代替一抗作为阴性对照. mTOR与CyclinD1阳性信号是黄色颗粒样物质,均位于细胞质内. 高倍镜下随机选取5个视野(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结果判定. 采用9分评分制:按照阳性细胞比例 $\leq 10\%$ 为1分,10%-50%为2分, $> 50\%$ 为3分;按染色强弱:阴性为0分;淡黄色染色为1分;中度黄色染色为2分,棕黄色染色为3分. 然后按照“阳性细胞得分 $\times$ 染色强弱得分”计总分,总分 < 3 为阴性,总分 ≥ 3 为阳性^[6,7].

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件,行 χ^2 检验和Spearman相关系数分析,检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 mTOR蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 mTOR阳性表达蛋白主要位于肿瘤细胞的胞质中,为浅黄色至深黄色颗粒样物质(图1). 其在食管鳞癌组织中的阳性表达率显著高于其在正常食管黏膜组织中的表达,组间比较差异具有统计学意义(53.2% vs 30.4%, $\chi^2 = 5.400$, $P < 0.05$, 表1). mTOR蛋白表达与食管鳞癌患者的组织学分级、浸润深度及有无淋巴结转移均无关(均 $P > 0.05$, 表2).

2.2 CyclinD1蛋白在食管鳞癌中的表达及其与临床生物学行为的关系 CyclinD1阳性蛋白着色定位于细胞质,为棕黄色或深黄色颗粒样物质(图2). 其在食管鳞癌组织中的阳性表达率显著高于其在正常食管黏膜组织中的表达,组间比较差异具有统计学意义(77.4% vs 12.3%, $\chi^2 = 48.106$, $P < 0.05$, 表1). CyclinD1蛋白表达与食管鳞癌患者的组织学分级密切相关($P < 0.05$),与浸润深度及有无淋巴结转移均无关(均 $P > 0.05$, 表2).

2.3 mTOR及CyclinD1在食管鳞癌组织中表达的相关性分析 在食管鳞癌组织mTOR阳性表达33例中,其CyclinD1蛋白表达阳性占30例,而mTOR阴性表达的29病例中,其CyclinD1蛋白表达阴性的占11例. mTOR及CyclinD1蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系($\gamma_p = 0.344$, $P = 0.006$, 表3).

3 讨论

食管鳞癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一,随着人类生活环境和饮食结构的改变,食管鳞癌的发病率呈逐年上升趋势. 食管鳞癌的发生

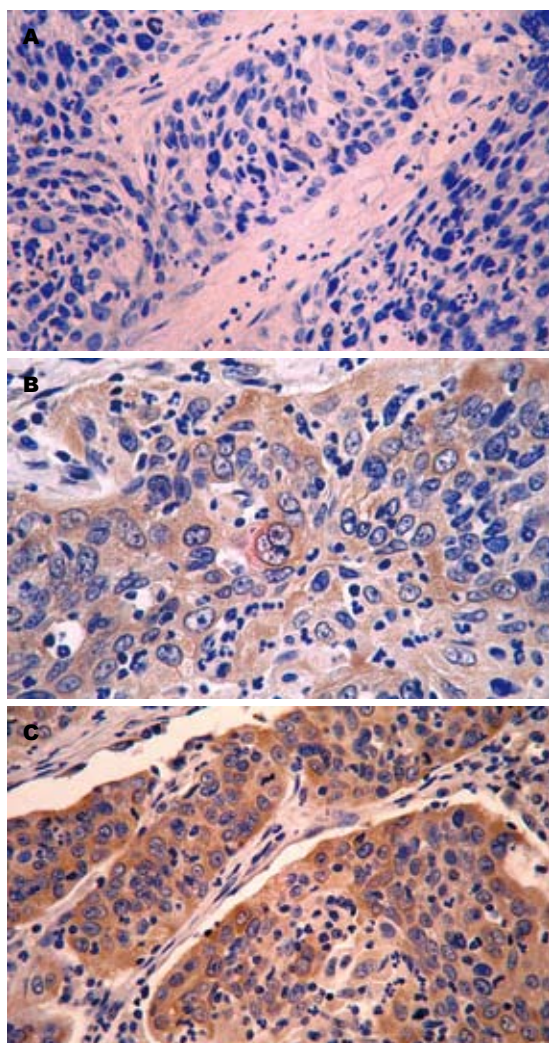


图 1 mTOR在食管鳞癌组织中的表达(SP × 200). A: 阴性; B: 弱阳性; C: 强阳性.

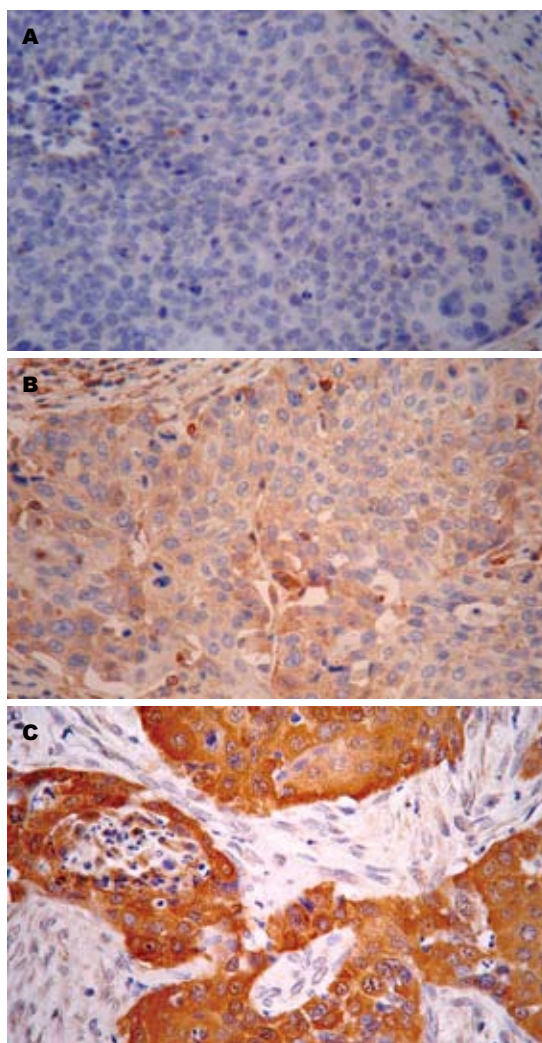


图 2 CyclinD1在食管鳞癌组织中的表达(SP × 200). A: 阴性; B: 弱阳性; C: 强阳性.

■创新盘点

目前,关于mTOR基因与食管癌浸润、转移的关系及mTOR与CyclinD1表达相关性的研究,迄今国内外均未见报道.本文采用免疫组织化学SP法检测mTOR与CyclinD1在62例食管鳞癌组织及56例正常食管黏膜组织中的表达,探讨mTOR与CyclinD1在食管癌发生、发展中的作用,以期寻找食管癌早期诊断和判断预后的分子指标.

表 1 mTOR 及CyclinD1在食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中的表达

	<i>n</i>	mTOR			χ^2 值	<i>P</i> 值	CyclinD1			χ^2 值	<i>P</i> 值
		-(<i>n</i>)	+(<i>n</i>)	阳性率(%)			-(<i>n</i>)	+(<i>n</i>)	阳性率(%)		
正常黏膜上皮	56	39	17	30.4	5.400	0.020	49	7	12.3	48.106	0.000
鳞癌	62	29	33	53.2			14	48	77.4		

与发展是一个多因素作用的过程,其中细胞信号传导通路上某些蛋白的异常对细胞恶变的影响已引起研究者的关注.如何从分子水平来寻找食管癌可能的分子治疗靶点长期以来备受人们关注.我们应用免疫组织化学技术系统对比研究了食管黏膜上皮癌变过程中mTOR及CyclinD1蛋白的变化规律及其与食管鳞癌临床生物学行为的关系.

*tor*基因是1991年在啤酒酵母的突变株TOR1和TOR2中发现的,*tor1*和*tor2*基因编码

两个高度同源(70%)的TOR1和TOR2^[8].后来在哺乳动物中也发现了结构和功能高度保守的TOR,称为mTOR.人类*mtor*基因定位于1p36.2,编码的蛋白质含有2 549个氨基酸,相对分子质量为280 000 Da. mTOR是一种高度保守的蛋白质,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶PIKK家族(PtdInS3k-related kinase family)的成员.在细胞周期中,mTOR在G₁期向S期的转换过程中起着重要作用,其主要功能是对蛋白的翻译进行调节. mTOR通过多条信号途径发挥其作用,其中

■同行评价

本文可读性较好,有一定的临床参考价值.

表 2 mTOR 及CyclinD1蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

病理特征	n	mTOR			CyclinD1		
		阳性表达n(%)	χ^2 值	P值	阳性表达n(%)	χ^2 值	P值
分化程度							
高-中分化	32	15(46.9)	0.609	0.435	21(65.6)	3.960	0.047
低分化	30	18(60.0)			27(90.0)		
浸润深度							
浅层	25	12(48.0)	0.175	0.676	20(80.0)	0.008	0.928
深层	37	21(56.8)			28(75.7)		
淋巴结转移							
无	33	16(48.5)	0.295	0.587	33(69.7)	1.555	0.212
有	29	17(58.6)			25(86.2)		

表 3 mTOR及CyclinD1在食管鳞癌组织中表达的相关性

CyclinD1	n	mTOR(n)		γ_p 值	P值
		+	-		
+	48	30	18	0.344	0.006
-	14	3	11		

最重要的一条是PI3K/AKT途径^[3,9],细胞外界信号和膜受体结合后可激活位于膜上的PI3K,活化PI3K激活下游的AKT,AKT活化后即可激活mTOR,mTOR两个下游底物分别是S6K1和4EBP1,他们磷酸化后均可促进mRNA的翻译,从而表达出大量与细胞生长增殖有关的蛋白质.肿瘤的发生,发展与细胞信号转导关系异常密切,正常的细胞信号转导机制在肿瘤细胞中过度活跃,或正常信号分子过度表达对肿瘤的发生有重要作用.由于PI3K/AKT/mTOR信号通路被发现,人类对PI3K/AKT/mTOR信号通路异常在肿瘤发生中的作用产生了浓厚的兴趣.研究证明,在肿瘤细胞中,mTOR上游负调节因子功能失调是mTOR信号通路激活的主要原因.目前已知的上游调节因子包括PTEN、LKB1及SC1/TSC2等,其中研究比较多的是PTEN^[10],他是一种重要的抑癌基因,PTEN的突变或缺失在乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌等肿瘤中已被发现^[11].PTEN失活导致AKT信号活性增强,从而进一步增强mTOR信号,引发一系列细胞效应,导致细胞恶变.

肿瘤的发生与发展是一个多因素作用的结果,以往人们对肿瘤的研究多集中在癌基因和抑癌基因方面,细胞信号转导通路的阐明,极大地丰富了人们对细胞癌变机制的认识^[12].现已发现,许多肿瘤伴有mTOR信号通路的异常,在

该通路中mTOR过表达可对CyclinD1及Myc等癌基因在翻译水平上的表达产生影响^[13].mTOR的下游因子S6K1扩增或过表达的现象在多种肿瘤中亦有发生^[14],S6K1中多个磷酸化位点受mTOR的直接调控,其第389位苏氨酸残基可直接被mTOR磷酸化^[15],从而使S6K1活化.mTOR对S6K1的活化同时受TSC1/TSC2的影响.有研究表明,细胞内TSC1/TSC2的缺失可引起mTOR调节的S6K1活性升高^[16,17].mTOR的另一个下游因子为4EBP1,4EBP1可被mTOR磷酸化,磷酸化的4EBP1失去与eIF4E结合的能力,从而促进mRNA的翻译^[18].而eIF4E主要调控CyclinD1、Myc、Ras、NF- κ B及Ki-67等蛋白质翻译,其中很多蛋白质为细胞生长增殖所必须,它具有促肿瘤发生作用^[19].我们采用免疫组织化学法检测mTOR及CyclinD1在食管鳞癌组织及其相应正常黏膜组织中的表达.结果显示,二者在正常食管黏膜组织表达显著低于在食管鳞癌组织中的表达.mTOR蛋白表达与食管鳞癌组织的分化程度、浸润深度及淋巴结转移均无显著关系;CyclinD1蛋白表达与组织学分级密切相关,而与食管癌的浸润、转移无明显关系.这提示他在食管鳞癌的发生发展过程中起重要作用.mTOR蛋白与CyclinD1蛋白在食管鳞癌组织中的表达有显著的正相关性,提示mTOR的过度表达,可能通过上调CyclinD1蛋白的表达扰乱细胞正常的生长增殖周期,从而促进细胞恶变.两者在肿瘤的发生与分化中可能存在一定的相互协同效应.结果还显示mTOR蛋白与CyclinD1表达的升高在食管鳞癌的发生与分化程度上起着重要的作用,二者联合检测有助于准确评价食管癌的分化并估计其预后.

总之,对mTOR及CyclinD1基因的深入研究

有利于我们进一步的了解食管癌的生物特性, 为食管癌的早期诊断和治疗提供一个新的发展方向.

4 参考文献

- 1 Habib N, Salaro C, Al-Ghaithi K, Phelps RG, Saggari S, Cohen SR. Severe aphthous stomatitis associated with oral calcineurin and mTOR inhibitors. *Int J Dermatol* 2010; 49: 91-94
- 2 Wulschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124: 471-484
- 3 Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121: 179-193
- 4 Lim EJ, Joung YH, Jung SM, Park SH, Park JH, Kim SY, Hwang TS, Hong DY, Chung SC, Ye SK, Moon ES, Park EU, Park T, Chung IM, Yang YM. Hemin inhibits cyclin D1 and IGF-1 expression via STAT5b under hypoxia in ERalpha-negative MDA-MB 231 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2010; 36: 1243-1251
- 5 Lehrbach DM, Cecconello I, Ribeiro U Jr, Capelozzi VL, Ab'saber AM, Alves VA. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: relationship between clinicopathological data and p53, cyclin D1 and Bcl-2 immunoections. *Arq Gastroenterol* 2009; 46: 315-320
- 6 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
- 7 李晟磊, 赵秋民, 刘宗文, 赵志华, 高冬玲, 郑湘予, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌中RECK和MMP-9蛋白表达的相关性及临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1082-1086
- 8 Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 105-118
- 9 Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 401-414
- 10 Peyrou M, Bourgoin L, Foti M. PTEN in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Dig Dis* 2010; 28: 236-246
- 11 Law BK. Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 47-60
- 12 Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, Han Y, Rychahou PG, Doan HQ, Weiss HL, Evers BM. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2010; 210: 767-776, 776-778
- 13 Gera JF, Mellinshoff IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu JH, Sawyers CL, Lichtenstein AK. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 2737-2746
- 14 Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 335-348
- 15 Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1432-1437
- 16 Veilleux A, Houde VP, Bellmann K, Marette A. Chronic inhibition of the mTORC1/S6K1 pathway increases insulin-induced PI3K activity but inhibits Akt2 and glucose transport stimulation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 766-778
- 17 Alain T, Lun X, Martineau Y, Sean P, Pulendran B, Petroulakis E, Zemp FJ, Lemay CG, Roy D, Bell JC, Thomas G, Kozma SC, Forsyth PA, Costa-Mattioli M, Sonenberg N. Vesicular stomatitis virus oncolysis is potentiated by impairing mTORC1-dependent type I IFN production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 1576-1581
- 18 Chen TJ, Wang DC, Chen SS. Amyloid-beta interrupts the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway that could be involved in brain-derived neurotrophic factor-induced Arc expression in rat cortical neurons. *J Neurosci Res* 2009; 87: 2297-2307
- 19 Rosenwald IB. The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene* 2004; 23: 3230-3247

编辑 李军亮 电编 何基才

ATRA联合奈达铂对人肝癌细胞株Huh-7增殖与凋亡的影响

刘景, 徐晶, 丁剑午

■背景资料

原发性肝癌恶性程度高, 患者发现时大多已是晚期, 治疗棘手。而经过多年的临床证实, ATRA对多种肿瘤治疗有效。因此, 将ATRA联合其他化疗药物应用于癌症的综合治疗已成为当前研究的热点之一。

刘景, 丁剑午, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006

徐晶, 永新县人民医院内科 江西省吉安市 343400

刘景, 2008年南昌大学研究生院在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤综合治疗的基础和临床研究。

作者贡献分布: 刘景与徐晶对此文所作贡献均等; 此课题由刘景、徐晶及丁剑午设计; 研究过程由刘景与丁剑午操作完成; 研究所用试剂及分析工具由刘景提供; 数据分析由徐晶完成; 本文写作由刘景与徐晶完成。

通讯作者: 丁剑午, 副教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院肿瘤科, 江西省分子医学重点实验室。

physicliujing@163.com

电话: 0791-6292193 传真: 0791-6292212

收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-07-10

接受日期: 2010-07-08 在线出版日期: 2010-08-28

ATRA in combination with nedaplatin inhibits cell proliferation but promotes apoptosis in human hepatoma cell line Huh-7

Jing Liu, Jing Xu, Jian-Wu Ding

Jing Liu, Jian-Wu Ding, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Jing Xu, Department of Internal Medicine, the People's Hospital of Yongxin County, Ji'an 343400, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Associate Professor Jian-Wu Ding, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. physicliujing@163.com

Received: 2010-05-13 Revised: 2010-07-10

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To observe the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) and nedaplatin, alone or in combination, on cell proliferation and apoptosis in human hepatoma cell line Huh-7, and to determine whether the two drugs in combination have a synergistic effect in treating hepatocarcinoma.

METHODS: After Huh-7 cells were incubated with different concentrations of ATRA (10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} mol/L) and nedaplatin (1, 2 and 5

mg/L), alone or in combination, for 24, 48 and 72 h, cell morphology changes were observed using an inverted microscope; cell proliferation was evaluated by MTT assay; and apoptosis was evaluated by flow cytometry.

RESULTS: Both ATRA and nedaplatin could markedly inhibit cell proliferation in a time- and concentration-dependent manner (all $P < 0.01$). ATRA and nedaplatin in combination had a significant synergistic effect on cell proliferation compared with ATRA or nedaplatin alone (both $P < 0.01$). Both ATRA and nedaplatin promoted the apoptosis of Huh-7 cells. The apoptosis rate was significantly lower in Huh-7 cells treated with ATRA and nedaplatin alone for 48 h than in those treated with the two drugs in combination ($28.49\% \pm 0.6\%$, $42.57\% \pm 1.03\%$ vs $55.35\% \pm 1.30\%$, both $P < 0.01$), suggesting a synergistic effect of combined nedaplatin and ATRA on the apoptosis of Huh-7 cells.

CONCLUSION: Both ATRA and nedaplatin can inhibit cell proliferation and promote apoptosis in human hepatoma cell line Huh-7. ATRA combined with nedaplatin has a significant synergistic effect on the proliferation and apoptosis of Huh-7 cells.

Key Words: All-trans retinoic acid; Nedaplatin; Huh-7 cell; Cell proliferation; Apoptosis

Liu J, Xu J, Ding JW. ATRA in combination with nedaplatin inhibits cell proliferation but promotes apoptosis in human hepatoma cell line Huh-7. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2538-2544

摘要

目的: 探讨化疗药物全反式维甲酸(ATRA)与奈达铂(nedaplatin)单独及联合应用对人肝癌细胞株Huh-7增殖与凋亡的影响。

方法: 选取不同浓度的ATRA(1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L)、奈达铂(1、2、5 mg/L)并选用ATRA 1×10^{-5} mol/L联合不同浓度奈达

■同行评议者

刘宝瑞, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

铂(1、2、5 mg/L)分别作用于肝癌细胞24、48、72 h;另外,通过预实验筛选有效终浓度的ATRA(1×10^{-5} mol/L)+奈达铂(1 mg/L)作为联合处理组作用于肝癌细胞24、48、72 h;采用倒置显微镜观察细胞形态学改变,MTT法观察ATRA、奈达铂及两药联合对Huh-7细胞增殖的影响;应用流式细胞仪分析其对细胞凋亡率的影响。

结果:不同浓度的ATRA(1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L)和奈达铂(1、2、5 mg/L)单独作用于Huh-7细胞均有明显的抑制作用,该作用随着时间的延长、浓度的增加而逐渐增强($P < 0.01$);两药联合表现为协同作用,与单药相比具有显著性差异($P < 0.01$)。Huh-7细胞经ATRA 1×10^{-5} mol/L、NDP 1 mg/L及两药联合作用48 h后,流式细胞仪检测凋亡率分别为 $28.49\% \pm 0.6\%$ 、 $42.57\% \pm 1.03\%$ 、 $55.35\% \pm 1.30\%$,单药组与联合组比较具有显著性差异(均 $P < 0.01$)。提示ATRA(1×10^{-5} mol/L)+奈达铂(1 mg/L)联合作用时具协同效应。

结论:ATRA与奈达铂对人肝癌细胞株Huh-7均有抑制增殖和促进凋亡的作用,且与单药比较,ATRA联合奈达铂能够明显提高肝癌细胞对化疗的敏感性。

关键词:全反式维甲酸;奈达铂;Huh-7细胞;细胞增殖;凋亡

刘景,徐磊,丁剑干. ATRA联合奈达铂对人肝癌细胞株Huh-7增殖与凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2538-2544
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2538.asp>

0 引言

肝癌是目前最常见的恶性肿瘤之一,手术、放疗、化疗、介入是其治疗的主要措施。但肝癌常规化疗效果差,而且容易产生对原化疗药物明显的耐药性。为此,寻求协同、增敏等肝癌有效的综合治疗方案成为人们一直研究的热点。大量的研究表明^[1-3],全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是治疗急性早幼粒细胞白血病的一种最有效的药物之一。同时,ATRA在其他领域也发挥了很好的抗肿瘤效果,如神经母细胞瘤、皮肤癌、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、口腔癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤等^[4-18]。而奈达铂(nedaplatin, NDP)作为肝癌一线化疗药物顺铂的新的衍生物,他较顺铂具有更宽的剂量域,显示出更优越的抗肿瘤效果,且不良反应较少。本研究将以ATRA联合奈达铂

作用于人肝癌细胞株Huh-7,探讨两药对Huh-7细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株Huh-7由南昌大学第二附属医院分子生物中心提供。ATRA购自美国Sigma公司,使用浓度为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L;注射用NDP购自南京东捷药业公司,使用浓度分别为1、2、5 mg/L,MTT试剂购自美国Sigma公司,DMEM培养液及胎牛血清购自Hyclon公司,Annexin-V-PI凋亡试剂盒购自南京凯基公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物配制:Huh-7细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液,在50 mL/L CO₂, 37 °C条件下的孵箱中培养,细胞长满至瓶底80%左右时传代。ATRA用无水乙醇溶解配制成 1×10^{-2} mol/L(100 mg ATRA溶于33.3 mL无水乙醇),NDP用生理盐水溶解配制成100 mg/L(10 mg NDP溶于100 mL生理盐水)的备用液,需要时用培养液稀释至所需浓度。

1.2.2 分组:根据预实验结果设ATRA单药浓度为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L 3组。经MTT分析,单药ATRA 1×10^{-5} mol/L对细胞有明显的抑制作用,且在各时间点与ATRA 1×10^{-4} mol/L比较无明显统计学差异(均 $P > 0.05$),因此选用ATRA 1×10^{-5} mol/L作为联合用药的处理浓度。而NDP参照其药物动力学参数,其在人体内达血药浓度峰值(总铂浓度、游离铂浓度)分别为6.72、6.5 mg/L,选择其血浆峰浓度的0.1-1倍内设单药浓度为1、2、5 mg/L 3组。最后筛选出细胞凋亡率明显且坏死率相对较低的NDP 1 mg/L+ATRA 1×10^{-5} mol/L作为联合用药组的有效终浓度。将只加培养液组设为对照组。设24、48、72 h 3个时间点。

1.2.3 倒置显微镜观察细胞形态变化:倒置显微镜下观察各组细胞处理前后的形态变化。

1.2.4 MTT法观察药物对细胞增殖的影响:将生长活力良好的Huh-7细胞以8 000个/孔接种于96孔板,在37 °C条件下,含50 mL/L CO₂的孵箱中培养24 h后按要求分别加入各实验组药物,每组设4个复孔,同时设空白对照组,培养24、48、72 h后,每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL,继续培养4 h后,弃掉培养液,每孔加入DMSO 100 μL,振荡10 min,使充分溶解混匀。用酶标仪在492 nm处测定吸光度(A)值。按公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = [(对照孔A值-实验孔A值)/对

■ 研发前沿

肝癌是目前最常见的恶性肿瘤之一,手术、放疗、化疗、介入是其治疗的主要措施。但肝癌常规化疗效果差,而且容易产生对原化疗药物明显的耐药性。为此,寻求协同、增敏等肝癌有效的综合治疗方案成为人们一直研究的热点。

■相关报道

Das等研究发现, 维甲酸能通过诱导分化及下调端粒酶的活性和原癌基因N-Myc表达而提高其对恶性神经母细胞瘤SH-SY5Y的促凋亡作用。

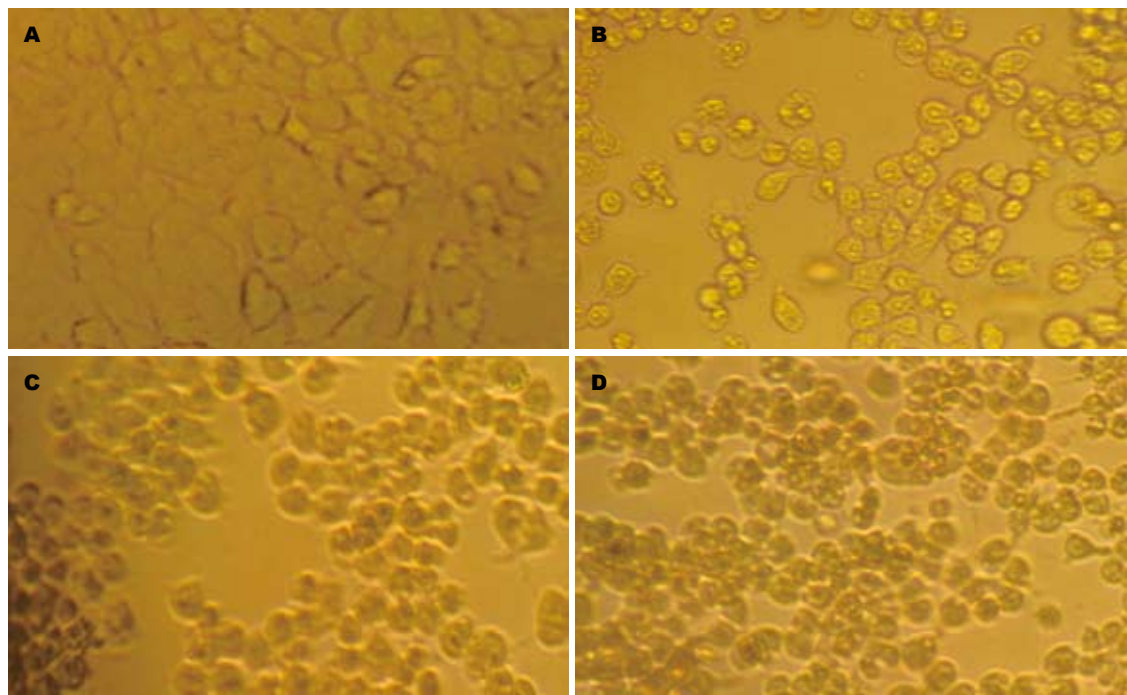


图1 倒置显微镜下Huh-7细胞处理前后的形态学变化($\times 200$)。A: 对照组; B: NDP组(1 mg/L); C: ATRA组(1×10^{-5} mol/L); D: 联合用药组(ATRA 1×10^{-5} mol/L+NDP 1 mg/L)。

照孔 A 值] $\times 100\%$ 。重复MTT法, 计算24、48、72 h后的细胞抑制率。另外根据Web系数来判定联合用药后两药是否具有协同作用。采用以下公式计算: 预估效应 $C = A_1 \times A_2$, 其中 A_1 、 A_2 代表两种单药作用后的细胞存活率(%). 当 $C >$ 实际存活率时, 代表两药作用协同。当 $C =$ 实际存活率时, 代表两药作用相加。 $C <$ 实际存活率时 $< A_1$ 、 A_2 时, 代表两药作用次相加。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 将生长活力良好的Huh-7细胞接种于96孔板, 在37℃条件下, 含50 mL/L CO_2 的孵箱中培养24 h后按要求分别加入各实验组药物, 同时设对照组, 继续培养48 h后用2.5 g/L的胰酶消化成单细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用PBS洗涤1次, 1 000 r/min再次离心5 min, 弃上清, 按Annexin-V-PI试剂盒步骤操作后上机检测。记录激发波长488 nm处红色荧光, 记数细胞为1 000个, 检测凋亡率。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行配对 t 检验分析, 所有数据采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 相关性以Pearson相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.01$ 为差异性显著。

2 结果

2.1 不同药物组处理Huh-7细胞的形态学变化 在倒置显微镜下观察, 正常细胞呈现弥漫均匀分

布, 细胞边缘界线清楚, 凋亡细胞形态变圆, 大小不等, 体积缩小, 核碎裂或溶解。本实验对照组活细胞生长良好, 而各处理组活细胞数目较对照组不同程度减少, 并可见较多的凋亡细胞, 而且ATRA+NDP联合用药组凋亡细胞明显较单药组增多(图1)。

2.2 ATRA、NDP及两药联合对Huh-7细胞增殖的影响

2.2.1 ATRA、NDP对Huh-7细胞生长抑制的效应: ATRA和NDP对Huh-7细胞均有明显的生长抑制作用, 且该作用呈时间、浓度依赖性, 即同一时间其抑制作用随药物浓度增加而增强, 同一浓度其抑制作用随作用时间延长而增强。另外, ATRA 1×10^{-5} mol/L与NDP联合作用时, 其对Huh-7细胞的抑制作用较NDP单药相比有显著增加。而相反, 随各组药物浓度增加、作用时间延长, 其活细胞 A_{492} 下降明显。各药物组作用后与对照组比较, 有显著统计学意义(均 $P < 0.01$, 表1)。

2.2.2 ATRA联合NDP对Huh-7细胞的抑制作用: 选择ATRA 1×10^{-5} mol/L与NDP 1 mg/L联合作用于Huh-7细胞, 计算24、48、72 h的细胞抑制率(表2)。结果显示: (1) ATRA和NDP联合组与两单药组的作用比较, 抑制率有明显提高(均 $P < 0.01$); (2) 根据单药作用结果计算出联合用药后24、48、72 h的预估细胞存活率 C 值分别为

表 1 各药物组对Huh-7细胞的生长抑制作用 (mean ± SD, n = 5)

分组	药物浓度	作用时间		
		24 h	48 h	72 h
ATRA(mol/L)	1 × 10 ⁻⁴	0.315 ± 0.166 ^b	0.592 ± 0.008 ^b	0.594 ± 0.018 ^b
	1 × 10 ⁻⁵	0.322 ± 0.017 ^b	0.609 ± 0.016 ^b	0.628 ± 0.020 ^b
	1 × 10 ⁻⁶	0.346 ± 0.026 ^b	0.732 ± 0.025 ^b	0.753 ± 0.035 ^b
NDP(mg/L)	5	0.321 ± 0.019 ^b	0.677 ± 0.027 ^b	0.670 ± 0.039 ^b
	2	0.331 ± 0.021 ^b	0.701 ± 0.018 ^b	0.716 ± 0.012 ^b
	1	0.342 ± 0.025 ^b	0.715 ± 0.016 ^b	0.759 ± 0.020 ^b
ATRA(mol/L)+	1 × 10 ⁻⁵ +5	0.213 ± 0.004 ^b	0.321 ± 0.014 ^b	0.227 ± 0.015 ^b
NDP(mg/L)	1 × 10 ⁻⁵ +2	0.250 ± 0.015 ^b	0.390 ± 0.010 ^b	0.302 ± 0.009 ^b
	1 × 10 ⁻⁵ +1	0.275 ± 0.011 ^b	0.446 ± 0.017 ^b	0.377 ± 0.025 ^b
对照组	0	0.380 ± 0.024	0.849 ± 0.021	0.969 ± 0.042

^bP<0.01 vs 对照组.

表 2 不同时间点各药物组Huh-7细胞的增殖抑制率 (mean ± SD, n = 5, %)

时间(h)	抑制率			C值
	ATRA(1 × 10 ⁻⁵ mol/L)组	NDP(1 mg/L)组	ATRA+NDP组	
24	15.27	9.84	27.65 ^b	76.42
48	28.28	15.78	47.52 ^b	60.76
72	35.49	21.98	61.29 ^b	50.33

^bP<0.01 vs 单药组.

76.42%、60.76%、50.33%，三者均高于其实际细胞存活率72.35%、52.48%、38.71%，表现为两药协同作用。

2.3 流式细胞术检测各药物组对Huh-7细胞凋亡率变化 Huh-7细胞经ATRA 1 × 10⁻⁵ mol/L、NDP 1 mg/L及两药联合作用48 h后, 用流式细胞仪进行凋亡率检测, 结果显示: 对照组为0.82% ± 0.15%, NDP 1 mg/L组为28.49% ± 0.6%, ATRA 1 × 10⁻⁵ mol/L组为42.57% ± 1.03%, ATRA 1 × 10⁻⁵ mol/L+NDP 1 mg/L联合作用组为55.35% ± 1.30%。与单药比较差异有显著统计学意义(均 P<0.01, 图2)。

3 讨论

众所周知, 维甲酸类药物是一种良好的诱导分化剂, 他能够完全缓解急性早幼粒细胞白血病的症状, 并已成功应用于临床白血病的治疗^[1]。除此以外, 维甲酸还能参与并调节细胞的其他活动, 包括细胞增殖、代谢、繁殖、形态并且可诱导细胞凋亡^[19]。在肝癌研究领域, Hsu等^[20]使用终浓度为10 μmol/L的维甲酸处理人肝癌

Hep3B细胞, 24 h即可见癌细胞凋亡迹象, 48-72 h用免疫荧光显微镜及DNA碎片分析显示明显的细胞凋亡, 其表现为核的固缩和碎裂, 并出现180-200 bp的DNA碎片梯度。Nakanishi等^[21]也使用50 μmol/L的ATRA作用于肝癌HepG2细胞, 48 h后开始呈现细胞生长抑制现象, 凋亡明显。因此, 从细胞形态学和分子生物学水平都进一步验证了维甲酸类药物可以诱导肝癌细胞凋亡。同样, 在其他肿瘤实验研究中, Srivastava等^[22]应用维甲酸与cAMP类似物8-Cl-cAMP分别作用于人卵巢癌细胞OVCAR-3和OVCAR-8, 实验发现两药物均能引起细胞生长抑制, 并产生细胞凋亡, 且维甲酸与8-Cl-cAMP联合诱导细胞凋亡的作用较单药作用增强。Das等^[23]研究发现, 维甲酸能通过诱导分化及下调端粒酶的活性和原癌基因N-Myc表达而提高其对恶性神经母细胞瘤SH-SY5Y的促凋亡作用。还有, Zhang等^[24]将10 μmol/L的ATRA作用于黑色素瘤细胞后, 经流式细胞仪检测发现肿瘤细胞凋亡明显。Dutta等^[8]通过应用RT-PCR、Western blot等方法研究发现, ATRA作用于乳腺癌MCF-7细胞

■创新盘点

本研究是国内首次将ATRA联合NDP应用于肝癌的研究, 其结果为治疗肝癌提供新的、初步的实验依据, 同时也为进一步寻找肝癌的综合化学治疗拓宽了思路。

■应用要点

本研究联合ATRA与NDP作用于人肝癌细胞株Huh-7的实验结果可能成为肝癌综合化疗的一个新选择,同时也有望在进一步的肝癌分子靶向研究中取得新的突破。

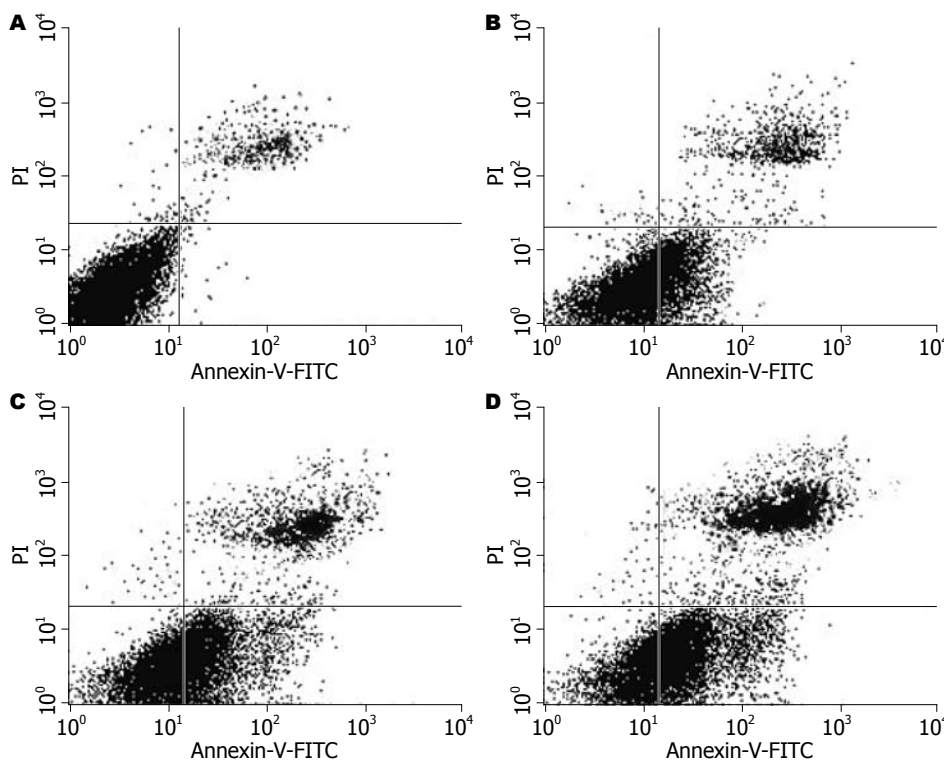


图2 NDP、ATRA、ATRA+NDP对Huh-7细胞凋亡的作用。A: 对照组; B: 1 mg/L NDP组; C: 1×10^{-5} mol/L ATRA组; D: ATRA+NDP组。

后,能有效抑制基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)在肿瘤中的高表达。而最近的研究, Jiménez-Lara等^[25]发现维甲酸的抗肿瘤作用,可通过介导NF-kappaB的途径实现抑制乳腺癌细胞的增殖,促进其凋亡。除此之外,在联合用药方面, Kucukzeybek等^[26]发现ATRA和多西紫杉醇在前列腺癌DU-145细胞中有协同促凋亡作用,主要因为联合用药后能大幅下调生存素BIRC5、髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, MCL-1)蛋白和淋巴毒素 β 受体(lymphotoxin β receptor, LT β R)基因的表达,而这三者都是细胞凋亡和细胞周期调控中的关键角色。基于维甲酸以上的多种功能,又有研究者认为^[27]维甲酸类化合物发挥其基因调控的作用是通过与两种不同的核受体相结合,即RAR和RXR,二者各自包括3种亚型 α , β , γ , 属于类固醇和甲状腺家族的一部分,他们能与癌细胞中特异的DNA片段结合,而达到抗肿瘤的效果。

而同样是作为目前广泛应用的第二代铂类抗癌药物-NDP,其抗癌谱广,尤其对于头颈部肿瘤疗效显著^[28,29]。NDP的抗癌机制主要是与DNA结合从而抑制DNA的复制达到抗癌作用。且NDP与顺铂比较,其治疗指数高,不良反应小,安全性好,尤其是NDP消化系统反应和肝、肾及

神经毒性非常小^[30]。

在本研究中我们发现ATRA和NDP对人肝癌细胞株Huh-7均有抑制细胞生长、促进凋亡的作用,经MTT法、流式细胞仪测定凋亡率可见,在一定浓度范围内随浓度增加其抑制作用增强,并且无论ATRA与NDP单用或联合作用,随着时间的延长同一药物浓度组对细胞的抑制作用逐渐增大。此外,ATRA及NDP联合应用时两药表现为协同作用,即两种药物对人肝癌细胞株Huh-7的联合作用效果优于单独用药。

由此可见,本研究联合应用ATRA与NDP作用于人肝癌细胞株Huh-7的实验结果为治疗肝癌提供了新的、初步的实验依据,同时也为进一步寻找肝癌的综合化学治疗拓宽了思路。但是ATRA联合NDP能否用于临床治疗肝癌的推广,其深入的作用机制仍然不很清楚,因此,还有待从分子靶向水平及综合不良反应的处理等诸多方面进行更进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Zhou GB, Zhang J, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Treatment of acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; 362: 959-971.
- 2 Frankfurt O, Tallman MS. Strategies for the treat-

- ment of acute promyelocytic leukemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2006; 4: 37-50
- 3 Ozeki M, Shively JE. Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 769-779
- 4 Jiang M, Zhu K, Grenet J, Lahti JM. Retinoic acid induces caspase-8 transcription via phospho-CREB and increases apoptotic responses to death stimuli in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 1055-1067
- 5 Alique M, Herrero JF, Lucio-Cazana FJ. All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1/2. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 1
- 6 Chlapek P, Redova M, Zitterbart K, Hermanova M, Sterba J, Veselska R. Enhancement of ATRA-induced differentiation of neuroblastoma cells with LOX/COX inhibitors: an expression profiling study. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 45
- 7 Cheepala SB, Yin W, Syed Z, Gill JN, McMillian A, Kleiner HE, Lynch M, Loganantharaj R, Trutschl M, Cvek U, Clifford JL. Identification of the B-Raf/Mek/Erk MAP kinase pathway as a target for all-trans retinoic acid during skin cancer promotion. *Mol Cancer* 2009; 8: 27
- 8 Dutta A, Sen T, Banerji A, Das S, Chatterjee A. Studies on Multifunctional Effect of All-Trans Retinoic Acid (ATRA) on Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Its Regulatory Molecules in Human Breast Cancer Cells (MCF-7). *J Oncol* 2009; 2009: 627840
- 9 Patel JB, Mehta J, Belosay A, Sabnis G, Khandelwal A, Brodie AM, Soprano DR, Njar VC. Novel retinoic acid metabolism blocking agents have potent inhibitory activities on human breast cancer cells and tumour growth. *Br J Cancer* 2007; 96: 1204-1215
- 10 Phipps SM, Love WK, White T, Andrews LG, Tollefsbol TO. Retinoid-induced histone deacetylation inhibits telomerase activity in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29: 4959-4964
- 11 Hong J, Samudio I, Chintharlapalli S, Safe S. 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes decrease mitochondrial membrane potential and induce apoptosis in endometrial and other cancer cell lines. *Mol Carcinog* 2008; 47: 492-507
- 12 Malik M, Webb J, Catherino WH. Retinoic acid treatment of human leiomyoma cells transformed the cell phenotype to one strongly resembling myometrial cells. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69: 462-470
- 13 Radu M, Soprano DR, Soprano KJ. S10 phosphorylation of p27 mediates atRA induced growth arrest in ovarian carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* 2008; 217: 558-568
- 14 Xu Q, Zhang Z, Zhang P, Chen W. Antisense oligonucleotides and all-trans retinoic acid have a synergistic anti-tumor effect on oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2008; 8: 159
- 15 Choi EJ, Whang YM, Kim SJ, Kim HJ, Kim YH. Combinational treatment with retinoic acid derivatives in non-small cell lung carcinoma in vitro. *J Korean Med Sci* 2007; 22 Suppl: S52-S60
- 16 Singh B, Murphy RF, Ding XZ, Roginsky AB, Bell RH Jr, Adrian TE. On the role of transforming growth factor-beta in the growth inhibitory effects of retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2007; 6: 82
- 17 Huynh CK, Brodie AM, Njar VC. Inhibitory effects of retinoic acid metabolism blocking agents (RAM-BAs) on the growth of human prostate cancer cells and LNCaP prostate tumour xenografts in SCID mice. *Br J Cancer* 2006; 94: 513-523
- 18 Lee JH, Kishikawa M, Kumazoe M, Yamada K, Tachibana H. Vitamin A enhances antitumor effect of a green tea polyphenol on melanoma by upregulating the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. *PLoS One* 2010; 5: e11051
- 19 Zhang XK. Vitamin A and apoptosis in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 87-102
- 20 Hsu SL, Chen MC, Chou YH, Hwang GY, Yin SC. Induction of p21(CIP1/Waf1) and activation of p34(cdc2) involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells. *Exp Cell Res* 1999; 248: 87-96
- 21 Nakanishi M, Tomaru Y, Miura H, Hayashizaki Y, Suzuki M. Identification of transcriptional regulatory cascades in retinoic acid-induced growth arrest of HepG2 cells. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 3443-3454
- 22 Srivastava RK, Srivastave AR, Cho-Chung YS. Synergistic effects of 8-Cl-cAMP and retinoic acids in the inhibition of growth and induction of apoptosis in ovarian cancer cells: induction of retinoic acid receptor beta. *Mol Cell Biochem* 2000; 204: 1-9
- 23 Das A, Banik NL, Ray SK. Retinoids induce differentiation and downregulate telomerase activity and N-Myc to increase sensitivity to flavonoids for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Int J Oncol* 2009; 34: 757-765
- 24 Zhang H, Satyamoorthy K, Herlyn M, Rosdahl I. All-trans retinoic acid (atRA) differentially induces apoptosis in matched primary and metastatic melanoma cells -- a speculation on damage effect of atRA via mitochondrial dysfunction and cell cycle redistribution. *Carcinogenesis* 2003; 24: 185-191
- 25 Jiménez-Lara AM, Aranda A, Gronemeyer H. Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF-kappaB-dependent but cIAP2-independent mechanisms. *Mol Cancer* 2010; 9: 15
- 26 Kucukzeybek Y, Gul MK, Cengiz E, Erten C, Karaca B, Gorumlu G, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R. Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of survivin (BIRC5), MCL-1 and LTbeta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 37
- 27 Chen Y, Dokmanovic M, Stein WD, Ardecky RJ, Roninson IB. Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 8749-8761
- 28 Sekine I, Sumi M, Ito Y, Kato T, Fujisaka Y, Nohhara H, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T. Phase I study of cisplatin analogue nedaplatin, paclitaxel, and thoracic radiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*

■同行评价

本文选题新颖, 具有一定的临床实用价值。

- 2007; 37: 175-180
- 29 Fuwa N, Kodaira T, Tachibana H, Nakamura T, Daimon T. Dose escalation study of nedaplatin with 5-fluorouracil in combination with alternating radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 161-167
- 30 Takaoka E, Kawai K, Ando S, Shimazui T, Akaza H. Neutropenic colitis during standard dose combination chemotherapy with nedaplatin and irinotecan for testicular cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 60-63

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)所有作者均审阅过该文并同意发表,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、补充或删除时,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。

E-钙粘蛋白在进展期大肠癌转移淋巴结癌细胞中再表达的机制

李冬斌, 李晓宁, 许香梅, 段国强, 王影, 陈晓峰, 王凤安

李冬斌, 段国强, 王影, 王凤安, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000

李晓宁, 河北大学第二医院 河北省保定市 071000

许香梅, 河北省石家庄市第一医院 河北省石家庄市 050011

陈晓峰, 河北省保定市第二中心医院外科 河北省保定市 072750

李冬斌, 2004年河北医科大学硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的临床研究与治疗。

作者贡献分布: 课题由王凤安设计; 李冬斌与李晓宁操作完成并撰写论文; 许香梅与段国强参与标本的收集及实验数据的统计分析; 王影和陈晓峰协助实验完成及数据整理。

通讯作者: 王凤安, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科。wfa2983@163.com

电话: 0311-66002983

收稿日期: 2010-05-09 修回日期: 2010-07-08

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-28

Re-expression of E-cadherin in metastatic lymph nodes of patients with advanced colorectal carcinoma

Dong-Bin Li, Xiao-Ning Li, Xiang-Mei Xu,
Guo-Qiang Duan, Ying Wang, Xiao-Feng Chen,
Feng-An Wang

Dong-Bin Li, Guo-Qiang Duan, Ying Wang, Feng-An Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Xiao-Ning Li, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Xiang-Mei Xu, the First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Xiao-Feng Chen, Department of Surgery, the Second Central Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei Province, China

Correspondence to: Feng-An Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. wfa2983@163.com

Received: 2010-05-09 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To investigate the re-expression of E-cadherin (E-cad) in metastatic lymph node of advanced colorectal carcinoma and its clinical importance.

METHODS: The expression of E-cad in 32 specimens of primary colorectal carcinoma and meta-

static lymph nodes was examined by means of immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR to analyze the mechanism behind the re-expression of E-cad in metastatic lymph nodes.

RESULTS: The abnormal expression rate of E-cad in primary colorectal carcinoma was 90.6% (29/32), and the re-expression rate of E-cad in metastatic lymph nodes was 37.5% (12/32). The re-expression rate of E-cad in metastatic lymph nodes was significantly higher in patients with well/moderately differentiated carcinoma than in those with poorly differentiated carcinoma (55.6% vs 14.3%, $P < 0.05$). Western blot analysis showed that the relative expression intensity of E-cad in metastatic lymph nodes was higher than that in primary carcinoma ($P < 0.05$). The relative expression intensity of E-cad protein in metastatic lymph nodes was significantly higher in patients with well/moderately differentiated adenocarcinoma than in those with poorly differentiated adenocarcinoma (98.56 ± 36.09 vs 66.21 ± 29.74 , $P < 0.05$). The relative expression intensity of E-cad protein in metastatic lymph nodes is correlated with tumor histological type. RT-PCR analysis showed that the relative expression level of E-cad mRNA in primary carcinoma was significantly lower than that in metastatic lymph nodes and normal mucosal tissue (0.733 ± 0.009 vs 0.739 ± 0.010 and 0.796 ± 0.016 , both $P < 0.05$). The re-expression of E-cad mRNA in metastatic lymph nodes is associated with tumor differentiation degree and tumor histological type (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: E-cad expression shows characteristic changes during the development and progression of colorectal cancer. E-cad is a possible new target for diagnosis and treatment of colorectal cancer.

Key Words: E-cadherin; Advanced colorectal carcinoma; Metastatic lymph node; Re-expression; Immunohistochemistry; Western blot; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Li DB, Li XN, Xu XM, Duan GQ, Wang Y, Chen XF, Wang

■背景资料

E-钙粘蛋白作为钙依赖性同型细胞黏附分子, 是分布在所有上皮组织中的跨膜糖蛋白, 介导同种细胞间、细胞与基质之间的黏附反应, 维持细胞极性和参与分化调节。研究表明, 肿瘤细胞E-cadherin表达水平下降, 而在转移淋巴结中出现再表达, 从而使肿瘤细胞在转移部位定植生长。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■ 研发前沿

大肠癌严重威胁着人们的健康,其具有的侵袭、转移的恶性生物学行为是影响临床治疗效果和导致死亡的主要原因。肿瘤细胞从原发部位脱落作为肿瘤浸润和转移的重要环节,与细胞黏附功能降低密切相关,近年来已被广泛关注。

FA. Re-expression of E-cadherin in metastatic lymph nodes of patients with advanced colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(24): 2545-2551

摘要

目的: 探讨E-钙粘蛋白(E-cad)在大肠癌转移淋巴结中的再表达机制及临床价值。

方法: 采用免疫组织化学SP法, Western blot, 逆转录-多聚合酶链反应(RT-PCR)等方法联合检测32例大肠癌患者原发灶及相应转移淋巴结中E-cad的表达。

结果: 免疫组织化学结果显示: 大肠癌原发灶中E-cad的异常表达率为90.6%(29/32)。在转移淋巴结中, 37.5%(12/32)E-cad再表达阳性, 其中在高中分化、低分化腺癌E-cad再表达阳性率分别为55.6%(10/18)、14.3%(2/14), 差异显著($P<0.05$)。Western blot结果显示: 转移淋巴结组织中E-cad蛋白相对强度高于原发癌组织($P<0.05$), 但低于正常大肠黏膜($P<0.05$)。在转移淋巴结中, E-cad在高中分化、低分化腺癌蛋白相对强度分别为 $28-127(98.56\pm36.09)$ 、 $11-62(66.21\pm29.74)$, 差异显著($P<0.05$)。管状及乳头状腺癌转移淋巴结中E-cad蛋白相对强度高于黏液腺癌转移淋巴结($P<0.05$)。RT-PCR结果显示: 大肠癌原发灶E-cad mRNA表达量相对值明显低于在正常大肠黏膜的表达量(0.733 ± 0.009 vs 0.796 ± 0.016 , $P<0.05$); 大肠癌转移淋巴结中E-cad mRNA表达量相对值明显高于在大肠癌原发灶的表达量(0.739 ± 0.010 vs 0.733 ± 0.009 , $P<0.05$), 但低于正常大肠黏膜表达量($P<0.05$)。高中分化腺癌转移淋巴结中E-cad mRNA表达量相对值高于低分化腺癌转移淋巴结($P<0.05$), 管状及乳头状腺癌转移淋巴结中E-cad mRNA表达量高于黏液腺癌转移淋巴结($P<0.05$)。

结论: 大肠癌发生发展过程中E-cad在基因及蛋白水平的表达存在一定的变化特征, 这种特征可能使其成为大肠癌诊断与治疗的新靶点。

关键词: E-钙粘蛋白; 人进展期大肠癌; 转移淋巴结; 再表达; 免疫组织化学; 蛋白免疫印迹; 逆转录-多聚合酶链反应

李冬斌, 李晓宁, 许香梅, 段国强, 王影, 陈晓峰, 王凤安. E-钙粘蛋白在进展期大肠癌转移淋巴结癌细胞中再表达的机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2545-2551

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2545.asp>

0 引言

大肠癌在我国多见, 近年来发病率呈上升趋势。

目前大肠癌难以有效根治的主要原因就是肿瘤的复发和转移, 因此我们有必要深入研究与肿瘤浸润转移倾向有关的因素, 从而指导正确合适的诊疗措施。淋巴结转移是大肠癌扩散的主要途径, 而且是影响大肠癌患者预后的最主要因素之一。肿瘤细胞间黏附的丧失, 是肿瘤浸润转移的第一步, 也是关键的一步。E-钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)作为钙依赖性同型细胞黏附分子, 是分布在所有上皮组织中的跨膜糖蛋白, 介导同种细胞间、细胞与基质之间的黏附反应, 从而维持细胞极性和参与分化调节。同种上皮细胞间的E-cad细胞外区以一种 Ca^{2+} 依赖形式形成二聚体拉链式结构, 细胞内区必须与连接素(catenins)形成复合物并锚定于肌动蛋白细胞骨架上^[1]才能发挥作用。目前发现的catenins有4个亚型, 即 α , β , γ -catenin及P120。E-cad在癌细胞的异质性表达可影响癌细胞的脱落和再附着。以往可见关于E-cad在肿瘤转移灶中再表达的报道, 但其机制尚未完全清楚。我们拟采用免疫组织化学, 蛋白免疫印迹, RT-PCR等方法联合检测E-cad在大肠癌原发灶及转移淋巴结内癌细胞中的表达情况, 以期探讨E-cad在大肠癌转移淋巴结中的再表达机制及临床价值。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选择进展期大肠癌原发灶及相应转移淋巴结标本共32例, 均为河北医科大学第二医院2007-12/2009-06手术切除标本, 并选取对应的非肿瘤的正常大肠黏膜组织25例作对照, 标本在 -80°C 低温冰箱中冻存。患者男29例, 女16例, 年龄29-78(中位年龄57.63)岁。入选病例皆查实未进行化疗或放疗, 无长期服用非甾体类抗炎药、皮质激素药物史。所有标本术后均经病理证实, 各例淋巴结转移癌组织的病理学类型与原发灶基本相同。每份标本除部分经常规固定脱水后石蜡包埋切片外, 其他则分别提取蛋白质和mRNA。依据大肠癌分化程度及生物学行为特征分为6组: (1)分化程度: 高中分化、低分化; (2)组织学类型: 管状及乳头状腺癌、黏液腺癌; (3)肿瘤大小: $\geq 5\text{ cm}$, $< 5\text{ cm}$; (4)浸润深度: 未侵入浆膜层, 已侵入浆膜层; (5)部位: 结肠, 直肠; (6)年龄 < 50 岁, ≥ 50 岁。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 标本经常规石蜡包埋切片后, 按说明书采用SP法进行免疫组织化学染色(SP试剂盒购自北京中山科技公司)。兔抗人

多克隆E-cad抗体购于NeoMarkers公司. 原发灶切片内非癌性大肠黏膜细胞作为内部阳性对照. 染色完成后在光镜下观察结果, E-cad免疫组织化学正常情况下阳性染色定位于细胞膜, 即连续的细胞膜染色. 染色结果评价, 通过HE染色确认原发灶和转移淋巴结内癌细胞, 如癌细胞染色情况与临近非癌性黏膜细胞相近, 且没有胞质、胞核染色情况出现, 则被评定为正常染色; 如染色不连续, 明显减弱或缺失, 或出现胞质、胞核染色情况, 则被评定为不正常染色. 每张切片按其全部癌细胞中出现正常染色细胞的百分率评定为3级: 1级为0-50%; 2级为51%-80%; 3级为81%-100%^[2]. 原发灶中E-cad 3级染色则被认为正常表达; 1级和2级染色被认为不正常表达; 转移淋巴结中如E-cad染色等级高于其原发灶中, 则被评定为再表达阳性.

1.2.2 蛋白印迹分析: 将组织粉碎后加入裂解液(北京普利来公司). 蛋白提取过程按照说明书操作进行. 在提取出的蛋白中加入5% SDS煮沸10 min, 12 000 r/m离心10 min, 提取上清液. 测定各样本蛋白含量, 等量蛋白质加入SDS-PAGE中, 电泳约3 h后, 将凝胶中的蛋白转移到PVDF膜上. 用5%脱脂奶粉浸泡转移膜1 h, 以封闭非特异性蛋白结合位点. 采用的E-cad抗体种类和工作浓度与免疫组织化学染色所用抗体相同, 二抗为辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG(北京博奥森公司), 工作浓度为1:1 000. 采用ECL化学发光法检测蛋白含量. 于暗室中用胶片显影、定影, 采用分析软件Optimas 6.0比较各个样本蛋白条带的显影强度, 以显影相对强度(Relative Intensity)作为蛋白表达的计量标准.

1.2.3 逆转录-多聚合酶链反应: 将组织标本研磨后, 采用TRIzol细胞裂解法按照说明书提取组织样本总RNA. 紫外分光光度计定量总RNA, 调整浓度为1 g/L. AMV逆转录试剂盒和Taq mDNA聚合酶购自Promega公司. 用 β -actin作为内参照进行PCR. 步骤: (1)逆转录: 25 μ L反应体系中加入等量的变性后的RNA(3 μ g)及Oligo(dt) 0.1 μ L、AMV 0.5 μ L(20 U/ μ L)、5 $\times$ Buffer 10 μ L、RNasin 100 U及无RNA酶的水, 混匀、离心5 s, 42 $^{\circ}$ C孵育1 h, 95 $^{\circ}$ C 5-7 min使逆转录酶失活后立即置冰浴, 待用或-20 $^{\circ}$ C保存. (2)PCR反应: 参照文献设计E-cad引物, E-cad引物序列: 上游: 5'-TGCTGTTTCTGGTTTCTGTTGG-3', 下游: 5'-CCTTCTCCGTATTCTCCTCCCT-3', 扩增长度250 bp; 以 β -actin为对照, 上游: 5'-CTGTCTG-

GCGGCACCACCAT-3', 下游5'-GCAACTAAGT-CATAGTCCGC-3', 扩增长度300 bp. 引物由北京生物制品研究所合成, 反应体系为10 $\times$ Buffer 5 μ L、25 mmol MgCl₂ 4 μ L、dNTP 1 μ L(各10 mmol/ μ L)、Taq酶0.3 μ L(5 U/ μ L)、逆转录的cDNA为模板2 μ L、上下游引物各0.5 μ L(50 pmol/ μ L)、加水至50 μ L. 混匀、加入50 μ L石蜡油覆盖液面, 离心10 s. 将反应管置于PCR仪内, 先95 $^{\circ}$ C 7 min变性, 再95 $^{\circ}$ C变性90 s、54 $^{\circ}$ C复性1 min、72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 共35个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. 反应终止后置-20 $^{\circ}$ C保存. (3)PCR产物定量: PCR扩增结束后, E-cad和 β -actin各取10 μ L样品于1.5%琼脂糖凝胶中电泳60 min, 电压为5-7 V/cm, 每毫升凝胶内含0.5 μ g的溴化已啶, GelID凝胶图像分析系统摄片并测定分析其吸光度. 分别计算各个样本E-cad基因表达量的相对值(relative expression value) = 待测基因扩增条带的灰度值/ β -actin基因扩增条带的灰度值.

统计学处理 数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS17.0统计软件对所得数据进行 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组织化学结果及其与临床病理因素的关系 根据免疫组织化学染色结果, 25例正常大肠黏膜E-cad均在细胞膜中正常表达(图1A). 对照临床病理学因素, 大肠癌原发灶32例中29例患者E-cad表达降低, 其中高中分化腺癌18例, 低分化腺癌14例, 管状腺癌及乳头状腺癌21例, 黏液腺癌11例. 高中分化腺癌18例中E-cad 1级染色10例, 2级染色5例, 3级染色2例, 正常染色1例, 14例低分化癌中E-cad 1级染色12例, 2级染色2例. 21例管状及乳头状腺癌中E-cad 1级染色12例, 2级染色6例, 正常染色3例, 11例黏液腺癌E-cad 1级染色9例, 2级染色2例. E-cad的再表达阳性率为34.4%(11/32), 其中高中分化腺癌的再表达阳性率为55.6%(10/18), 低分化腺癌的再表达阳性率分别为13.3%(2/14), 高中分化腺癌相对于低分化腺癌更易出现E-cad的再表达阳性($P<0.05$). E-cad在管状及乳头状腺癌再表达阳性率为57.1%(12/21), 在黏液腺癌的再表达阳性率为9.1%(1/11), 差异显著($P<0.05$). E-cad在转移淋巴结癌细胞中的再表达与肿瘤的大小、浸润深度、肿瘤部位及患者年龄无关($P>0.05$, 表1, 图1).

2.2 Western blot结果及E-cad再表达与临床病理因素的关系 大肠癌患者32例原发灶及转移

■相关报道

Nakamura等通过分析黏膜、黏膜下及肿瘤浸润最深部位的E-cad免疫活性, 发现其在细胞分化和侵袭的过程中呈现动态变化. 癌细胞从原发部位分离时E-cad表达下调, 但癌细胞向远处侵袭和转移时, 他的内聚力和保持能力强.

■创新盘点

以往研究只采用免疫组织化学实验方法研究钙粘蛋白复合体在肿瘤转移淋巴结再表达的情况,而本研究同时联合使用免疫组织化学、Western blot、RT-PCR等方法检测E-cadherin在大肠癌转移淋巴结再表达情况。

表 1 免疫组织化学分析E-cad在大肠癌转移淋巴结的再表达

病理组织学分型	n	转移灶(n)		阳性率(%)	P值
		+	-		
分化程度					
高中分化	18	10	8	55.6	0.0276
低分化	14	2	12	13.3	
组织学类型					
管状及	21	12	9	57.1	0.0109
乳头状腺癌					
黏液腺癌	11	1	10	9.1	
肿瘤大小(cm)					
≥5	19	7	12	36.8	1.0000
<5	13	5	8	38.5	
浸润深度					
侵及浆膜	23	8	15	37.8	0.0690
未侵及浆膜	9	4	5	44.4	
肿瘤部位					
结肠	15	5	10	33.3	0.7257
直肠	17	7	10	41.2	
年龄(岁)					
<50	10	3	7	30.0	0.7026
≥50	22	9	13	40.9	

表 2 Western blot分析E-cad在大肠癌转移淋巴结的再表达 (mean ± SD)

病理特征	n	E-cad蛋白相对强度	P值
分化程度			
高分化	18	98.56 ± 36.09	$t = 2.71$
中低分化	14	66.21 ± 29.74	$P = 0.0110$
组织学类型			
管状及	21	93.38 ± 37.05	$t = 2.08$
乳头状腺癌			
黏液腺癌	11	67.09 ± 31.24	$P = 0.0460$
肿瘤大小(cm)			
≥5	19	87.11 ± 36.79	$t = 0.57$
<5	13	79.54 ± 37.52	$P = 0.5750$
浸润深度			
侵及浆膜	23	80.78 ± 38.85	$t = 0.80$
未侵及浆膜	9	92.33 ± 30.85	$P = 0.4321$
部位			
结肠	15	85.87 ± 43.02	$t = 0.26$
直肠	17	82.41 ± 31.31	$P = 0.7952$
年龄(岁)			
<50	10	77.90 ± 36.65	$t = 0.64$
≥50	22	86.86 ± 37.14	$P = 0.5300$

淋巴结均检测到不同程度的E-cad蛋白表达(图2)。通过Optimas 6.0蛋白印迹分析软件对所有病例的蛋白条带进行分析后发现, E-cad蛋白相对强度在大肠癌转移淋巴结为13-149(84.41 ± 36.75), 明显高于在大肠癌原发灶蛋白相对强度6-107(63.25 ± 36.46, $t = 2.2$, $P = 0.0314$), 但低于正常大肠黏膜22-145(83.26 ± 31.42, $t = 2.51$, $P = 0.016$)。在低分化腺癌转移淋巴结中E-cad蛋白相对强度为13-109(66.21 ± 29.74), 在高中分化腺癌转移淋巴结中E-cad蛋白相对强度为43-149(98.56 ± 36.09), 差异显著($t = 2.71$, $P = 0.011$)。在管状及乳头状腺癌转移淋巴结E-cad蛋白相对强度为30-149(93.38 ± 37.05), 黏液腺癌转移淋巴结中E-cad蛋白相对强度为13-113(67.09 ± 31.24), 差异显著($t = 2.08$, $P = 0.046$)。E-cad在转移淋巴结癌细胞中蛋白相对强度与肿瘤的大小、浸润深度、肿瘤部位及患者年龄无关(表2)。

2.3 RT-PCR结果及其与临床病理因素的关系 E-cad和 β -actin引物的扩增基因片段经电泳和EB染色后可见清晰电泳条带, 其扩增片段大小与所设计的大小完全一致, 分别为250、300 bp。E-cad mRNA表达量相对值在大肠癌转移淋巴结为0.739 ± 0.010, 明显高于在大肠癌原发灶基

因表达量(0.733 ± 0.009, $t = 2.15$, $P = 0.0362$), 但低于在正常大肠黏膜基因表达量(0.796 ± 0.016, $t = 17.01$, $P < 0.0001$, 图3)。E-cad mRNA表达量相对值在中低分化腺癌转移淋巴结组织中是0.734 ± 0.008, 在高中分化腺癌转移淋巴结组织中是0.743 ± 0.008, 两者比较有统计学意义($t = 3.12$, $P = 0.004$)。E-cad mRNA表达量相对值在管状及乳头状腺癌转移淋巴结中是0.742 ± 0.009, 在黏液腺癌转移淋巴结中是0.733 ± 0.008, 二者差异显著($t = 3.1$, $P = 0.0042$)。E-cad mRNA在转移淋巴结癌细胞中相对表达量与肿瘤的大小、浸润深度、肿瘤部位、患者年龄无关($P > 0.05$, 表3)。

3 讨论

大肠癌严重威胁着人们的健康, 其具有的侵袭、转移的恶性生物学行为是影响临床治疗效果和导致死亡的主要原因。肿瘤细胞从原发部位脱落作为肿瘤浸润和转移的重要环节, 与细胞黏附功能降低密切相关, 近年来已被广泛关注。但通过免疫组织化学, Western blot, RT-PCR等方法联合检测E-cad在肿瘤原发灶及转移淋巴结的表达情况及意义, 国内外尚少见报道。

肿瘤浸润和转移是一个极为复杂的多步骤过程^[3], 而整个过程的关键是钙黏附系统崩溃所致的细胞黏附异常而导致癌细胞脱离原发灶再

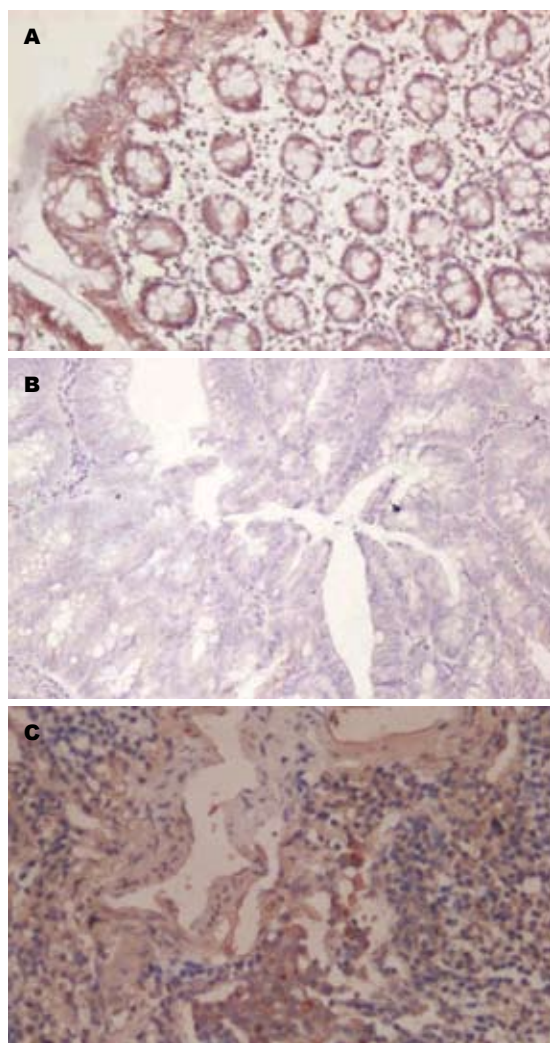


图 1 E-cad在各组大肠组织中的蛋白表达. A: 正常大肠黏膜(SP × 100); B: 大肠癌原发灶(SP × 200); C: 转移淋巴结(SP × 200).

附着于转移部位^[4]. E-cad作为上皮细胞间连接的主要介导者, 其基因位于人染色体16q22.1, 是I型钙粘蛋白超家族的单链跨膜糖蛋白分子, 全长4.8 kb, 编码884个氨基酸, 于1995年由Berx首先克隆^[5]. 同种上皮间的E-cad胞外区在细胞间 Ca^{2+} 的作用下形成反向平行的二聚体, 使相邻同种上皮黏附在一起^[8].

E-cad已被公认在上皮源性恶性肿瘤的浸润转移过程中起重要作用^[6]. E-cad失活可导致细胞间黏附下降及极性紊乱促使肿瘤细胞浸润和转移^[7]. 而且, E-cad是上皮细胞的分化标记, 他的表达强度与多种恶性肿瘤的分化程度呈负相关^[8]. 本研究结果显示, 大肠癌中普遍存在E-cad的表达下降, 随着肿瘤增殖程度增强、分化程度的下降, E-cad异常表达率逐渐增高, 且管状及乳头状腺癌E-cad异常表达率显著高于黏液腺癌($P < 0.05$). 因此我们认为E-cad与大肠癌的恶性行

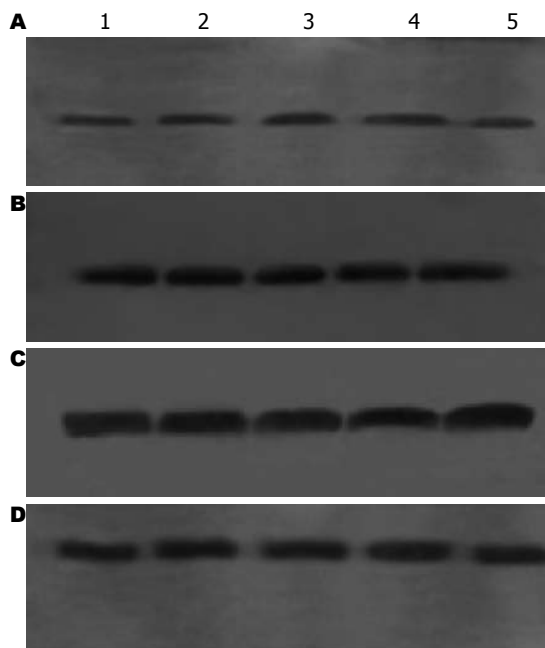


图 2 Western blot示E-cad在各组大肠组织中的蛋白表达. A: 大肠癌原发灶; B: 原发灶相应β-actin; C: 转移淋巴结; D: 转移灶相应β-actin. 1, 5: 低分化; 2-4: 高分化.

为和低分化有一定的相关性, 这是肿瘤细胞获得去分化和高浸润性的关键.

迄今, 绝大多数的研究都是关于肿瘤原发灶的, 很少涉及到转移灶. 临床流行病学调查发现E-cad-cates复合物在众多恶性肿瘤中表达异常, 而该复合物在转移淋巴结癌细胞中会出现再表达. Nakamura等^[9]通过分析黏膜、黏膜下及肿瘤浸润最深部位的E-cad免疫活性, 发现其在细胞分化和侵袭的过程中呈现动态变化. 癌细胞从原发部位分离时E-cad表达下调, 但癌细胞向远处侵袭和转移时, 他的内聚力和保持能力增加. Peter等^[10]已经注意到乳腺癌患者转移灶内癌组织E-cad再表达的情况, 我们的免疫组织化学结果发现原发癌组织中E-cad呈膜表达减弱或丧失, 但相应的淋巴结转移灶中重新出现胞膜的表达, 且淋巴结转移灶E-cad的表达较原发癌组织显著增强($P < 0.05$). 有学者在非小细胞肺癌的研究中也提到类似的现象^[11]. 提示这种现象是蛋白表达的一种动态调节过程, 可随微环境的变化而变化. 可以认为, 黏附分子在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中发挥着双重作用, 原发灶E-cad在原发部位表达的下调使得癌细胞易于脱落而迁徙, 而当癌细胞到达转移的靶组织, 他们又会重新表达, 促进癌细胞定植于受侵组织, 开始增殖、侵袭形成转移灶, 极大影响患者预后.

同时, 我们还发现, E-cad在转移淋巴结内癌

■应用要点

本研究通过对E-cadherin在大肠癌转移淋巴结再表达机制的研究进一步明确其在转移淋巴结癌细胞再表达的始动因素, 可以为大肠癌分子水平的诊断、治疗提供线索及依据.

■同行评价

本研究新颖性尚可,有一定的可读性,对临床研究有较好的指导意义。

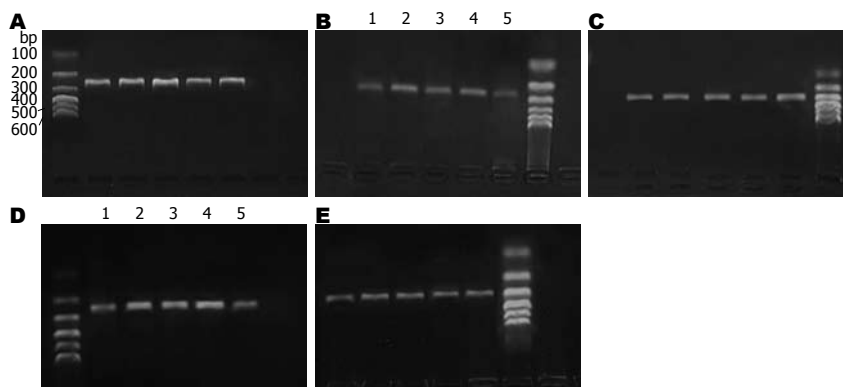


图3 RT-PCR示E-cad在各组大肠组织中的mRNA表达。A: 正常大肠黏膜; B: 大肠癌原发灶; 2-4: 高分化; 1, 5: 低分化; C: 原发灶相应 β -actin; D: 转移淋巴结; 2-4: 高分化; 1, 5低分化; E: 转移灶相应 β -actin。

表3 RT-PCR分析E-cad在大肠癌转移淋巴结的再表达 (mean $\pm$ SD)

病理特征	n	E-cad基因表达量相对值	t值/P值
分化程度			
高中分化	18	0.743 $\pm$ 0.008	$t = 3.12$
低分化	14	0.734 $\pm$ 0.008	$P = 0.004$
组织学类型			
管状及乳头状腺癌	21	0.742 $\pm$ 0.009	$t = 3.10$
黏液腺癌	11	0.733 $\pm$ 0.008	$P = 0.0042$
肿瘤大小(cm)			
≥ 5	19	0.740 $\pm$ 0.011	$t = 0.38$
< 5	13	0.738 $\pm$ 0.007	$P = 0.7054$
浸润深度			
侵及浆膜	23	0.739 $\pm$ 0.010	$t = 0.27$
未侵及浆膜	9	0.740 $\pm$ 0.007	$P = 0.7862$
肿瘤部位			
结肠	15	0.740 $\pm$ 0.007	$t = 0.87$
直肠	17	0.737 $\pm$ 0.009	$P = 0.3909$
年龄(岁)			
< 50	10	0.739 $\pm$ 0.008	$t = 0.14$
≥ 50	22	0.738 $\pm$ 0.008	$P = 0.8931$

细胞中再表达阳性率与大肠癌的分化程度及组织学类型密切相关,但与肿瘤大小、浸润深度、肿瘤部位及患者年龄没有显著相关性,原发灶中肿瘤分化程度越低,恶性程度越高,E-cad的表达水平越低。在转移淋巴结中分化程度越高越易出现E-cad再表达阳性,且管状及乳头状腺癌较黏液腺癌更易出现E-cad再表达。

我们进一步通过RT-PCR检测E-cad在大肠癌原发灶与转移淋巴结癌组织中基因水平的变化,采用Western blot法检测大肠癌原发灶与转移淋巴结癌组织中E-cad及 β -actin蛋白水平的表达变化,从而明确其在淋巴转移灶再表达的始动因素。

已有资料证明E-cad的合成和表达是在转

录和翻译水平发生变化的^[12]。Wang等^[13]在研究胃癌侵袭、转移与E-cad-cats复合体的相关性时,也证实了E-cad-cats复合体的异常表达和胃癌的侵袭转移显著相关($P < 0.05$)。我们的RT-PCR结果表明在进展期大肠癌原发灶及其相应转移淋巴结中均有不同程度的E-cad mRNA表达,且在转移淋巴结中的表达量高于原发灶mRNA表达量,但低于正常对照大肠黏膜表达量。推测在肿瘤原发灶中由于突变等原因导致基因水平的改变,从而造成E-cad表达水平的降低,进而促进大肠癌浸润转移,而在转移淋巴结中也是由于基因水平的变化造成两者再次出现表达升高。Western blot研究结果表明,大肠癌原发灶及其相应转移淋巴结中均有不同程度的E-cad蛋白表达,转移淋巴结癌细胞中E-cad蛋白表达量高于原发灶中癌细胞E-cad蛋白表达量。以上结果显示,E-cad蛋白及其mRNA的表达显示出一定的一致性。因此可以认为E-cad蛋白表达量的变化是由于基因水平的变化造成的。

通过大肠癌转移淋巴结中E-cad蛋白及mRNA表达水平与临床病理因素的分析,表明肿瘤转移淋巴结内E-cad蛋白及mRNA的表达与肿瘤的分化程度紧密相关,但与肿瘤的浸润深度、大小、部位及患者年龄无关,同时E-cad蛋白的表达还与肿瘤的病理学类型有显著相关性,这与免疫组织化学的研究结果相一致。

大肠癌的发生是遗传、环境、生物等多种因素造成癌基因激活以及抑癌基因失活的过程,对E-cad的研究只是这个认知过程中的冰山一角,但认识黏附分子在大肠癌侵袭和转移过程中作用的分子机制将为寻找抑制肿瘤侵袭的靶点提供希望,这将为基因治疗作为一种崭新的肿瘤治疗手段应用于临床提供重要的理论基础。

4 参考文献

- 1 Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cad-

- herin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000; 87: 992-1005
- 2 Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997; 431: 167-172
- 3 Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336
- 4 Gumbiner BM, McCreary PD. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl* 1993; 17: 155-158
- 5 Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJ, van Bokhoven A, van Roy F. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 1995; 26: 281-289
- 6 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 987-993
- 7 Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R. Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1002-1009
- 8 Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014: 155-163
- 9 Nakamura E, Sugihara H, Bamba M, Hattori T. Dynamic alteration of the E-cadherin/catenin complex during cell differentiation and invasion of undifferentiated-type gastric carcinomas. *J Pathol* 2005; 205: 349-358
- 10 Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 1994; 79: 181-184
- 11 邱雪杉, 杨秀, 李庆昌, 王恩华. 上皮性钙黏附蛋白和 β -连环素的表达与非小细胞肺癌预后的关系. *中华病理学杂志* 2002; 31: 318-321
- 12 Becker KF, Reich U, Schott C, Becker I, Berx G, van Roy F, Höfler H. Identification of eleven novel tumor-associated E-cadherin mutations. Mutations in brief no. 215. Online. *Hum Mutat* 1999; 13: 171
- 13 Wang CX, Chen J, Yang Z, Song W, Du ZL, Li ZH. [Correlation of E-cadherin, beta-catenin and gamma-catenin gene expression with the invasion and metastasis of gastric carcinoma] *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao* 2003; 23: 1198-1201

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 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology*(*WJG*)(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(WJG编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

胃食管反流病的流行病学

张弓羽, 张振玉

■背景资料

胃食管反流病(GERD)是指胃内容物反流入食管,引起不适症状和(或)并发症的一种疾病。可分为非糜烂性反流病(NERD),反流性食管炎(RE)和Barrett's食管(BE)三型。探讨GERD的危险因素,了解GERD在人群中的分布情况,将有利于对GERD的进一步研究。

张弓羽, 张振玉, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 本文由张弓羽完成; 张振玉审校。

通讯作者: 张振玉, 副教授, 主任医师, 210006, 江苏省南京市乐山路68号, 南京医科大学附属南京第一医院消化科。
ahwangzhibing776@163.com

电话: 025-87726246

收稿日期: 2010-05-18 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Epidemiology of gastroesophageal reflux disease

Gong-Yu Zhang, Zhen-Yu Zhang

Gong-Yu Zhang, Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Associate Professor Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 68 Changle Road, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. ahwangzhibing776@163.com

Received: 2010-05-18 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

Gastroesophageal reflux disease (GERD), a common disorder in Western society, is less seen in Asian countries, but there is an evidence that the incidence of GERD and its complications is rising. Many factors are believed to be responsible for the pathogenesis of GERD. In addition to some recognized factors, the role of other factors, such as obesity and *Helicobacter pylori* infection, in the pathogenesis of GERD is still unclear. Furthermore, GERD is believed to be associated with the development of many other diseases. This review summarizes the prevalence and risk factors of GERD and its complications.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Epidemiology; Risk factors

Zhang GY, Zhang ZY. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2552-2557

摘要

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)在西方国家是一种常见病,易反复发作,严重影响患者的生活质量,他是近年来医学研究的热点之一。亚太地区GERD患病率较低,但近年来流行病学调查显示其患病率有上升趋势。GERD的流行病学、发生发展的危险因素等方面存在诸多问题需进行研究。我们就此领域的研究及最新进展作一综述。

关键词: 胃食管反流病; 流行病学; 危险因素

张弓羽, 张振玉. 胃食管反流病的流行病学. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2552-2557

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2552.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是指胃内容物反流入食管,引起不适症状和(或)并发症的一种疾病。他可分为非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD),反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)和Barrett's食管(barrett's esophagus, BE)三型。GERD在西方国家比较常见,对人们的生活质量有显著影响,亚洲的患病率相对较低,但近年来呈上升趋势。现就GERD的流行病学特点作一综述。

1 GERD的地区分布

1.1 GERD患病率 (1)欧洲及美洲: 系统评价结果显示: 以每周至少发作1次烧心或反酸为诊断标准, 西方国家GERD患病率为10%-20%^[1]。西班牙至少每周1次烧心或反酸发生率分别为20.3%和11.5%^[2]; 法国31.3%的人曾有过GERD的典型症状, 7.8%的人每周至少有1次GERD典型症状^[3]; 意大利人群反流症状发生率为44.3%, 每周至少2 d有反流症状的发生率为23.7%^[4]; 英国GERD发生率为21%^[5]; 瑞士成人GERD患病率为17.6%^[6]; 瑞典人群40.4%有反流症状^[7]; 美国频发GERD患病率为14%^[8]; 巴西城市人群每周至少1次烧心发生率为7.3%^[9]; (2)亚洲地区: 以

■同行评议者

黄晓东, 主任医师, 武汉市中心医院消化内科

每周至少发生1次烧心或反酸为标准, 亚洲大部分地区GERD患病率为2.5%-7.1%, 近年来呈上升趋势^[10]。韩国人群每周至少1次GERD症状发生率为7.1%, 每周至少2次为3.8%^[11]; 日本每天有烧心反流症状者占2.1%, 1 wk发作2次者占4.6%, 以烧心或反酸症状至少每周发作2次为标准, GERD的患病率为6.6%^[12]; 新加坡GERD发生率为10.5%±2.0%^[13]; 西亚及南亚的患病率相对较高, 巴基斯坦城市人口中GERD症状的发生率为24%^[14]; 伊朗至少每周1次、每月1次烧心反酸的症状发生率分别为26.8%和34.1%^[15]; (3)中国: 新近1项GERD多中心研究显示中国人群每周烧心、反流的发生率分别为1.83%和4.23%, 烧心和(或)反流总发生率为5.16%^[16], 低于欧美国家。克拉玛依市GERD患病率为8.33%^[17]; 北京反流症状发生率为10.19%^[18]; 西安每周反酸、烧心的发生率分别为4.07%和7.78%^[19]; 上海GERD患病率为6.2%^[20]; 安徽省铜陵地区消化门诊人群GERD患病率为2.7%^[21]; 浙江省内科门诊人群的GERD患病率为7.28%^[22]; 贵州省安顺地区人群GERD的患病率为6.9%^[23]; 广东至少每周1次烧心和(或)反酸的发生率为6.2%, 校正性别和年龄后GERD患病率为2.3%^[24]; 以前1周有烧心或反酸发作为诊断标准, 香港GERD患病率为2.7%^[25]; 以此看来, 中国的GERD患病率总体呈现出南低北高的趋势, 可能与饮食习惯等因素有关。

1.2 RE患病率 因RE诊断需行胃镜检查, 故针对普通人群的大样本调查较少, 流行病学资料较多为各地的胃镜检出率。意大利人群RE患病率为11.8%^[4]; 瑞典人群RE患病率为15.5%^[7]; 土耳其RE胃镜检出率为12.8%^[26]; 亚洲关于一般人群的RE患病率研究较少, 病例研究中RE的患病率为3.4%-16.3%^[27]; 韩国人群RE患病率为8%^[28]; 日本RE胃镜检出率为14.9%^[29]; 马来西亚检出率为13.4%^[30]; 伊朗的RE胃镜检出率高达48%^[31]; 中国大样本调查研究显示普通人群RE患病率为15.7%^[32]。北京RE胃镜检出率为4.1%^[33]; 上海RE患病率为6.41%^[16], 较1996年的1.92%^[18]明显上升; 福建胃镜检出率为2.07%^[34]; 广东检出率为1.99%^[35]; 台湾检出率为12%, 其中87%为洛杉矶分型的A、B型^[36]。

1.3 BE患病率 BE的发病率相对较低, 意大利普通人群BE患病率为1.3%^[4]; 伊朗的BE患病率较高为8.3%^[16]; 土耳其BE胃镜检出率为0.4%^[26]; 韩国BE检出率为0.22%^[37]; 马来西亚检出率为

2%^[30]; 我国一项大样本普通人群研究中胃镜诊断BE患病率为0.28%(台湾BE检出率为1.77%)^[38]。病理证实率为0.06%, 其中91.7%为短段BE^[32]。

1.4 NERD患病率 目前对NERD的流行病学研究较少, 综合近年来的GERD流行病学调查结果, NERD占GERD的绝大部分(50%-85%), 安徽省铜陵地区消化内科门诊人群NERD患病率为1.4%, 占GERD的51.8%^[21]。由此可推测出一般人群中NERD的患病率为11%-12%, 而胃镜检查人群中占37%-87%^[39]。马来西亚胃镜检查人群中患病率为25.4%, 占GERD患者的65.5%^[30]; 国内尚缺少关于NERD全国范围内的流行病学资料。

2 GERD的人群分布

2.1 性别 Meta分析表明RE男女之比为1.57:1(95%CI: 1.40-1.76:1), BE为1.96:1(95%CI: 1.77-2.17:1); NERD为0.72:1(95%CI: 0.62-0.84:1)^[40]。一项大规模调查显示女性为GERD症状的独立危险因素($OR = 1.596$, 95%CI: 1.303-1.955), 而男性为RE的独立危险因素($OR = 2.943$, 95%CI: 2.359-3.671)^[41], 同时男性也是BE的独立危险因素($OR = 2.70$, 95%CI: 2.18-3.35)^[42], 此外男性的GERD病程较女性更长^[43]。我国台湾研究亦支持男性是RE独立危险因素($OR = 4.2$, 95%CI: 1.9-9.0, $P < 0.001$)^[36], 广东省、安徽省、克拉玛依市男性GERD患病率均高于女性, 但两者差异无统计学意义^[17,44,45]。

2.2 年龄 普遍认为, GERD的发病随年龄的增长而增加, 不同国家发病高峰年龄段存在差异, 西方国家一般为55-69岁, 日本为20-29岁^[46], 韩国BE的发病率随年龄增长而升高, BE患者多为中老年人, 平均年龄为53.8岁±10.9岁^[37]。中国的调查显示BE患者平均年龄(61.6岁)高于非BE的GERD患者(51.7岁), 发病率随年龄增长而升高^[32]。北京RE平均年龄55.34岁, 随年龄增长RE检出率升高, 病变程度加重^[33]。上海C级以上RE患者21-40岁组占8.57%, 41-60岁组占41.43%, 61-90岁组占50%, 差异有统计学意义, RE的发生率随年龄增长而增高^[47]。

2.3 人种 关于GERD在种族间的分布情况尚不是很明确。白种人与南亚BE发病率之比为2.8%:0.3%($OR = 6.03$, 95%CI: 3.56-10.22), RE患病率之比为17.7%:10.7%($OR = 1.76$, 95%CI: 1.57-1.97)^[42]。白种人BE患病率高于非洲裔(15.8%:4.5%, $P < 0.01$), RE患者更是显著高于非洲裔(28.1%:7.9%, $P < 0.001$)^[48], 推测白种人可

■ 研发前沿

*H. pylori*感染及其根除与GERD是否存在直接因果关系尚待研究证实, GERD三种类型相互之间可转化亦或为相对独立的疾病亦存在争议, 亟需基因学证据。

■相关报道

Yaghoobi等对25年来比较*H.pylori*根除及持续感染者GERD发病率的文献进行Meta分析,结果发现消化不良患者的*H.pylori*根除不会引起新发GERD,而消化性溃疡患者根除*H.pylori*后患GERD的风险增加了两倍。

能为GERD的危险因素。

3 GERD发病的相关因素

3.1 体质质量指数 目前普遍认为肥胖与GERD具有一定相关性。有Meta分析表明体质质量指数(body mass index, BMI)增加与GERD发病相关,超质量时OR为1.57(95%CI: 1.36-1.80),肥胖时OR为2.15(95%CI: 1.89-2.45)^[49]。另一项Meta分析结果表明GERD症状与BMI间存在量效关系, BMI在25-30 kg/m²时, OR为1.43(95%CI: 1.16-1.77), BMI>30 kg/m²时, OR为1.94(95%CI: 1.47-2.57)^[50]。西班牙的一项调查发现,不论BMI为多少,1年内的体质质量增加与GERD症状相关,体质质量增加越多,越易出现GERD症状^[51]。且肥胖与反流的严重程度亦存在密切相关,女性患者OR为2.11(95%CI: 1.60-2.77),男性OR为2.15(95%CI: 1.59-2.90)^[52]。我国台湾研究结果亦支持肥胖是RE的独立危险因素(OR = 1.41, 95%CI: 1.05-1.89)^[53]。

3.2 *H.pylori*感染 *H.pylori*感染及其治疗与GERD的关系尚存在争议。2003年的Meta分析显示: *H.pylori*阴性与GERD存在显著相关性OR = 1.34(95%CI: 1.15-1.55), *H.pylori*根治亦会增加GERD发病风险(OR = 2.54, 95%CI: 1.92-3.37),其中初发GERD的OR值为3.25(95%CI: 2.09-5.33),复发或加重者OR为2.39(95%CI: 1.75-3.34),且其相关性亚洲高于北美及欧洲国家^[54]。亚洲的研究显示*H.pylori*感染可减轻GERD严重程度^[55],北京市RE人群*H.pylori*阳性率低于一般人群, *H.pylori*阳性人群RE检出率低于阴性人群^[33]。以上结果均提示*H.pylori*感染可能是GERD的保护因素,但亦有意见认为*H.pylori*根除并不会导致GERD的发生或加重^[56]。最近的一项Meta分析表明消化不良患者的*H.pylori*根除并不会引起新发GERD,而消化性溃疡患者根除*H.pylori*后患GERD的风险增加了两倍^[57]。

3.3 吸烟与饮酒 研究表明吸烟与GERD相关(OR = 1.35, 95%CI: 1.01-1.82)^[58],且反流症状的发生率随吸烟时间的延长而增加,烟龄20年以上者OR为1.7(95%CI: 1.5-1.9)^[59]。美国调查表明饮酒与GERD相关(OR = 1.47, 95%CI: 1.08-1.99)^[60],我国西安的流行病学调查显示,重度吸烟(OR = 4.94, 95%CI: 3.70-6.61)、大量饮酒(OR = 2.85, 95%CI: 1.67-4.49)是GERD的危险因素^[19]。

3.4 精神心理因素 GERD中有相当比例的患者

合并精神心理异常,已证实各种应激、精神心理异常等因素均与烧心症状密切相关。NERD患者合并精神心理异常的比例显著高于RE组,且NERD组较RE组有更明显的抑郁倾向^[61]。2006年一项大样本前瞻性研究显示神经质是GERD症状的独立危险因素(OR = 1.046, 95%CI: 1.032-1.06)^[41]。我国广东的研究发现离婚、分居或丧偶人群(OR = 4.61)及工作压力大者(OR = 3.43)倾向于发生GERD^[45],精神紧张亦被证实是GERD患病的独立危险因素(OR = 2.11)^[62]。提示精神心理因素在GERD发病中起一定的作用。

3.5 食管裂孔疝 食管裂孔疝与GERD发病显著相关,可预测GERD症状的发生^[63]。意大利BE患者中76.9%合并有食管裂孔疝^[4];我国有39.52%的RE患者合并食管裂孔疝,而食管裂孔疝中61.68%合并RE^[64],我国台湾研究结果也显示食管裂孔疝是RE的独立危险因素(OR = 12.2, 95%CI: 5.0-29.9, $P < 0.0001$)^[36]。

3.6 遗传因素 对双胞胎的研究发现,在同卵双生子中GERD的发病率比异卵双生高^[65],提示遗传因素在GERD发病中有重要作用。已有研究证实与小儿严重GERD相关的基因(GERD1)位于染色体13q14上,位置可能靠近SNP160或SNP168^[66]。我国研究发现IL-1 β -31位点和IL-1RN基因多态性与GERD发生有关,IL-1RN*2和IL-1 β -31C/C纯合子基因型是GERD的保护性因素^[67]。

4 相关疾病

已证实GERD相关的食管外并发症为反流性喉炎、反流性哮喘、反流性咳嗽、反流性牙侵蚀症。对于GERD是否为咽炎、鼻窦炎、特发性肺纤维化、复发性中耳炎的致病或加重因素,还存在争议^[68]。系统回顾报道哮喘患者伴GERD症状者占59.2%,食管炎占37.3%,而GERD患者中伴哮喘者占4.6%,表明哮喘与GERD明显相关^[69]。慢性咳嗽同时患GERD者达20%^[70],GERD患者患咳嗽的风险增高(OR = 1.7, 95%CI: 1.4-2.1)^[1]。36.5%的牙侵蚀患者有反流症状,8%的患者食管测压异常,17.7%食管pH异常,GERD与牙侵蚀OR值为2.772^[71]。Raghu等^[72]对特发性肺纤维化患者65例进行24 h pH监测和食管压力测定,证实异常酸反流的发生率为87%,其中47%的患者有典型的反流症状。我国调查中GERD伴随症状以咽炎、打鼾、支气管炎及哮喘为主,所占比例分别为27.03%、30.63%、

12.61%及5.41%, 明显高于非GERD组^[62].

5 结论

GERD是世界范围内的常见病, 受多种因素影响, 对患者生活质量有很大影响, 且对国家造成很大的经济负担. 虽然目前我国该病的患病率较西方国家低, 但随着我国生活方式西化、人口的老齡化, GERD患者逐渐增多. 因此, 探讨GERD的危险因素, 了解GERD在人群中的分布情况, 将有利于对GERD的进一步研究.

6 参考文献

- Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005; 54: 710-717
- Ponce J, Vegazo O, Beltrán B, Jiménez J, Zapardiel J, Calle D, Piqué JM. Prevalence of gastro-oesophageal reflux disease in Spain and associated factors. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 175-184
- Bretagne JF, Richard-Molard B, Honnorat C, Caekaert A, Barthélemy P. [Gastroesophageal reflux in the French general population: national survey of 8000 adults] *Presse Med* 2006; 35: 23-31
- Zagari RM, Fuccio L, Wallander MA, Johansson S, Fiocca R, Casanova S, Farahmand BY, Winchester CC, Roda E, Bazzoli F. Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and Barrett's oesophagus in the general population: the Loiano-Monghidoro study. *Gut* 2008; 57: 1354-1359
- Mohammed I, Nightingale P, Trudgill NJ. Risk factors for gastro-oesophageal reflux disease symptoms: a community study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 821-827
- Schwenkglens M, Marbet UA, Szucs TD. Epidemiology and costs of gastroesophageal reflux disease in Switzerland: a population-based study. *Soz Präventivmed* 2004; 49: 51-61
- Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, Graffner H, Vieth M, Stolte M, Engstrand L, Talley NJ, Agréus L. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 275-285
- Farup C, Kleinman L, Sloan S, Ganoczy D, Chee E, Lee C, Revicki D. The impact of nocturnal symptoms associated with gastroesophageal reflux disease on health-related quality of life. *Arch Intern Med* 2001; 161: 45-52
- Moraes-Filho JP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol* 2005; 42: 122-127
- Wu JC. Gastroesophageal reflux disease: an Asian perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1785-1793
- Yang SY, Lee OY, Bak YT, Jun DW, Lee SP, Lee SH, Park GT, Yoon BC, Choi HS, Hahm JS, Lee MH, Lee DH. Prevalence of gastroesophageal reflux disease symptoms and uninvestigated dyspepsia in Korea: a population-based study. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 188-193
- Fujiwara Y, Higuchi K, Watanabe Y, Shiba M, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Nishikawa H, Arakawa T. Prevalence of gastroesophageal reflux disease and gastroesophageal reflux disease symptoms in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 26-29
- Lim SL, Goh WT, Lee JM, Ng TP, Ho KY. Changing prevalence of gastroesophageal reflux with changing time: longitudinal study in an Asian population. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 995-1001
- Jafri N, Jafri W, Yakoob J, Islam M, Manzoor S, Jalil A, Hashmi F. Perception of gastroesophageal reflux disease in urban population in Pakistan. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005; 15: 532-534
- Somi MH, Farhang S, Nasseri-Moghaddam S, Jazayeri ES, Mirinezhad SK, Godrati SM, Golchin M. Prevalence and Risk Factors of Gastroesophageal Reflux Disease in Tabriz, Iran. *Iranian J Publ Health* 2008; 37: 85-90
- 陈胜良. 亚太地区胃食管反流病的特点. *胃肠病学* 2009; 14: 713-715
- 张军汉, 周黎黎, 杨晓燕, 肖翠兰, 迟雪梅, 原旭华, 张晖. 克拉玛依市区胃食管反流症状流行病学调查及防治. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1621-1624
- 潘国宗, 许国铭, 郭慧平, 柯美云, 韩少梅, 李兆申, 方秀才, 邹多武, 鲁素彩, 刘婧. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. *中华消化杂志* 1999; 19: 223-226
- Wang JH, Luo JY, Dong L, Gong J, Tong M. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease: a general population-based study in Xi'an of Northwest China. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1647-1651
- Ma XQ, Cao Y, Wang R, Yan X, Zhao Y, Zou D, Wallander MA, Johansson S, Liu W, Gu Z, Zhao J, He J. Prevalence of, and factors associated with, gastroesophageal reflux disease: a population-based study in Shanghai, China. *Dis Esophagus* 2009; 22: 317-322
- 瞿国强, 王巧民. 安徽省铜陵地区胃食管反流病临床流行病学调查. *中国临床保健杂志* 2009; 12: 377-379
- 章宏, 徐晶, 厉有名, 虞朝辉, 许国强, 陈春晓, 季峰. 浙江省内科门诊人群胃食管反流病及危险因素流行病学调查. *中华消化杂志* 2007; 27: 443-446
- 朱健, 周力, 王岚, 吕锐, 郑州云. 贵州省安顺地区人群胃食管反流病流行病学调查. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2087-2090
- Chen M, Xiong L, Chen H, Xu A, He L, Hu P. Prevalence, risk factors and impact of gastroesophageal reflux disease symptoms: a population-based study in South China. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 759-767
- Wong WM, Lai KC, Lam KF, Hui WM, Huang JQ, Xia HH, Hu WH, Lam CL, Chan CK, Lam SK, Wong BC. Onset and disappearance of reflux symptoms in a Chinese population: a 1-year follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 803-812
- Yilmaz N, Tuncer K, Tunçyürek M, Özütemiz O, Bor S. The prevalence of Barrett's esophagus and erosive esophagitis in a tertiary referral center in Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 79-83
- Wong BC, Kinoshita Y. Systematic review on epidemiology of gastroesophageal reflux disease in Asia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 398-407
- Kim N, Lee SW, Cho SI, Park CG, Yang CH, Kim HS, Rew JS, Moon JS, Kim S, Park SH, Jung HC, Chung IS. The prevalence of and risk factors for erosive oesophagitis and non-erosive reflux disease: a nationwide multicentre prospective study in Korea. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 173-185
- Inamori M, Togawa J, Nagase H, Abe Y, Umezawa

■同行评价

本文思路清晰, 文献信息丰富, 具有一定的科学意义及临床价值.

- T, Nakajima A, Saito T, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H, Kaifu H, Tsuboi H, Kayama H, Tominaga S, Nagura H. Clinical characteristics of Japanese reflux esophagitis patients as determined by Los Angeles classification. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 172-176
- 30 Rosaida MS, Goh KL. Gastro-oesophageal reflux disease, reflux oesophagitis and non-erosive reflux disease in a multiracial Asian population: a prospective, endoscopy based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 495-501
- 31 Rezailashkajani M, Roshandel D, Shafae S, Zali MR. High prevalence of reflux oesophagitis among upper endoscopies of Iranian patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 499-506
- 32 Tseng PH, Lee YC, Chiu HM, Huang SP, Liao WC, Chen CC, Wang HP, Wu MS, Lin JT. Prevalence and clinical characteristics of Barrett's esophagus in a Chinese general population. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 1074-1079
- 33 胡兆元, 周丽雅, 林三仁, 薛艳. 十年2088例反流性食管炎临床分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 717-719
- 34 王雯, 张志坚, 林克荣, 李达周, 文晓冬, 吴秋萍. 福建地区Barrett食管的发病情况和内镜及临床特点. *中华内科杂志* 2006; 45: 393-395
- 35 李初俊, 陈村龙, 梁远国, 黄开红, 周宇, 崔西玉, 聂玉强, 杨见权, 郑丰平, 刘婉薇, 钟敏, 丁元伟, 陈惠新, 陈旻湖. 广东省糜烂性食管炎内镜检出情况调查. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 319-322
- 36 Chen TS, Chang FY. The prevalence and risk factors of reflux esophagitis among adult Chinese population in Taiwan. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 819-822
- 37 Kim JH, Rhee PL, Lee JH, Lee H, Choi YS, Son HJ, Kim JJ, Rhee JC. Prevalence and risk factors of Barrett's esophagus in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 908-912
- 38 Kuo CJ, Lin CH, Liu NJ, Wu RC, Tang JH, Cheng CL. Frequency and risk factors for Barrett's esophagus in Taiwanese patients: a prospective study in a tertiary referral center. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1337-1343
- 39 El-Serag HB. Epidemiology of non-erosive reflux disease. *Digestion* 2008; 78 Suppl 1: 6-10
- 40 Cook MB, Wild CP, Forman D. A systematic review and meta-analysis of the sex ratio for Barrett's esophagus, erosive reflux disease, and nonerosive reflux disease. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 1050-1061
- 41 Lee YC, Wang HP, Chiu HM, Liao SC, Huang SP, Lai YP, Wu MS, Chen MF, Lin JT. Comparative analysis between psychological and endoscopic profiles in patients with gastroesophageal reflux disease: a prospective study based on screening endoscopy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 798-804
- 42 Ford AC, Forman D, Reynolds PD, Cooper BT, Moayyedi P. Ethnicity, gender, and socioeconomic status as risk factors for esophagitis and Barrett's esophagus. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 454-460
- 43 Kulig M, Nocon M, Vieth M, Leodolter A, Jaspersen D, Labenz J, Meyer-Sabellek W, Stolte M, Lind T, Malfertheiner P, Willich SN. Risk factors of gastroesophageal reflux disease: methodology and first epidemiological results of the ProGERD study. *J Clin Epidemiol* 2004; 57: 580-589
- 44 王亚雷, 许建明, 胡乃中. 安徽省部分地区胃食管反流病诊治状况多中心问卷调查分析. *安徽医学* 2008; 29: 398-400
- 45 陈惠新, 熊理守, 许岸高, 贺龙君, 胡品津, 陈旻湖. 社区人群中胃食管反流病的危险因素及其对生活质量的影响. *中华内科杂志* 2006; 45: 202-205
- 46 Watanabe T, Urita Y, Sugimoto M, Miki K. Gastroesophageal reflux disease symptoms are more common in general practice in Japan. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4219-4223
- 47 高建萍, 王虹, 顾清, 周磊, 张悦. 胃食管反流病患者的临床分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 350-351
- 48 Vega KJ, Chisholm S, Jamal MM. Comparison of reflux esophagitis and its complications between African Americans and non-Hispanic whites. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2878-2881
- 49 Corley DA, Kubo A. Body mass index and gastroesophageal reflux disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2619-2628
- 50 Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143: 199-211
- 51 Rey E, Moreno-Elola-Olaso C, Artalejo FR, Locke GR 3rd, Diaz-Rubio M. Association between weight gain and symptoms of gastroesophageal reflux in the general population. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 229-233
- 52 Nocon M, Labenz J, Jaspersen D, Meyer-Sabellek W, Stolte M, Lind T, Malfertheiner P, Willich SN. Association of body mass index with heartburn, regurgitation and esophagitis: results of the Progression of Gastroesophageal Reflux Disease study. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1728-1731
- 53 Chua CS, Lin YM, Yu FC, Hsu YH, Chen JH, Yang KC, Shih CH. Metabolic risk factors associated with erosive esophagitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1375-1379
- 54 Cremonini F, Di Caro S, Delgado-Aros S, Sepulveda A, Gasbarrini G, Gasbarrini A, Camilleri M. Meta-analysis: the relationship between Helicobacter pylori infection and gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 279-289
- 55 Rajendra S, Ackroyd R, Robertson IK, Ho JJ, Karim N, Kutty KM. Helicobacter pylori, ethnicity, and the gastroesophageal reflux disease spectrum: a study from the East. *Helicobacter* 2007; 12: 177-183
- 56 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 57 Yaghoobi M, Farrokhyar F, Yuan Y, Hunt RH. Is there an increased risk of GERD after Helicobacter pylori eradication?: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1007-1013; quiz 1006, 1014
- 58 Watanabe Y, Fujiwara Y, Shiba M, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Nishikawa H, Higuchi K, Arakawa T. Cigarette smoking and alcohol consumption associated with gastroesophageal reflux disease in Japanese men. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 807-811
- 59 Nilsson M, Johnsen R, Ye W, Hveem K, Lagergren J. Lifestyle related risk factors in the aetiology of gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004; 53: 1730-1735
- 60 Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. No association between gallstones and gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2858-2862
- 61 张艳丽, 孙晓红, 陈春晓, 柯美云, 王智凤, 方秀才. 反流性食管炎和非糜烂性反流病患者症状谱、生活质

- 量和精神心理状态调查. 胃肠病学 2008; 13: 82-86
- 62 胡水清, 张玫, 牛小羽, 周俊. 门诊患者胃食管反流病的流行病学调查. 实用医学杂志 2009; 25: 141-143
- 63 Mishima I, Adachi K, Arima N, Amano K, Takashima T, Moritani M, Furuta K, Kinoshita Y. Prevalence of endoscopically negative and positive gastroesophageal reflux disease in the Japanese. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1005-1009
- 64 杨晓梅, 沈皓, 马世华. 内镜检查中反流性食管炎及相关因素的调查分析. 中国内镜杂志 2005; 11: 265-266
- 65 Cameron AJ, Lagergren J, Henriksson C, Nyren O, Locke GR 3rd, Pedersen NL. Gastroesophageal reflux disease in monozygotic and dizygotic twins. *Gastroenterology* 2002; 122: 55-59
- 66 Hu FZ, Donfack J, Ahmed A, Dopico R, Johnson S, Post JC, Ehrlich GD, Preston RA. Fine mapping a gene for pediatric gastroesophageal reflux on human chromosome 13q14. *Hum Genet* 2004; 114: 562-572
- 67 李熯, 张志广, 闻淑军. 天津地区胃食管反流病患者IL-1 β 基因多态性的研究. 天津医药 2007; 35: 893-896
- 68 Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
- 69 Havemann BD, Henderson CA, El-Serag HB. The association between gastro-oesophageal reflux disease and asthma: a systematic review. *Gut* 2007; 56: 1654-1664
- 70 Ford AC, Forman D, Moayyedi P, Morice AH. Cough in the community: a cross sectional survey and the relationship to gastrointestinal symptoms. *Thorax* 2006; 61: 975-979
- 71 Holbrook WP, Furuholm J, Gudmundsson K, Theodórs A, Meurman JH. Gastric reflux is a significant causative factor of tooth erosion. *J Dent Res* 2009; 88: 422-426
- 72 Raghu G, Freudenberger TD, Yang S, Curtis JR, Spada C, Hayes J, Sillery JK, Pope CE 2nd, Pellegrini CA. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2006; 27: 136-142

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 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

基于肝星状细胞的骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究现状

胡美迪, 郭贵海

■背景资料

肝纤维化严重威胁人类健康,但目前仍缺乏有效的治疗手段,鉴于骨髓间充质干细胞诸多优势,利用其治疗肝纤维化、肝硬化的研究已逐渐展开。

胡美迪, 郭贵海, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本综述由胡美迪完成, 郭贵海审校。

通讯作者: 郭贵海, 主任医师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科. guoguihai@163.com
电话: 0791-8692705

收稿日期: 2010-06-01 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-28

Advances in hepatic stellate cell-targeted treatment of hepatic fibrosis with bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Mei-Di Hu, Gui-Hai Guo

Mei-Di Hu, Gui-Hai Guo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Gui-Hai Guo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Avenue, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. guoguihai@163.com

Received: 2010-06-01 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

Hepatic fibrosis is one of the most serious diseases that pose a great threat to human health. Liver transplantation is currently the most effective treatment for these patients. However, the worldwide shortage of donor livers has greatly limited the use of this treatment. As a result, searching for alternative cell therapy has attracted great interest in preclinical studies. The transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) holds great promise for treating hepatic fibrosis because experimental and clinical studies have shown that it has beneficial effects on hepatic fibrosis. However, the precise cellular and molecular mechanisms behind such treatment remain to be elucidated. In this article, we will review the advances in treatment of hepatic fibrosis with BMSCs using hepatic stellate cells (HSCs) as a target.

Key Words: Bone marrow-derived mesenchymal

stem cell; Hepatic stellate cell; Hepatic fibrosis

Hu MD, Guo GH. Advances in hepatic stellate cell-targeted treatment of hepatic fibrosis with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2558-2562

摘要

肝纤维化(hepatic fibrosis)是严重威胁人类健康的疾病之一,肝移植是目前最行之有效的治疗方法,但世界范围的肝源缺乏,导致学者努力向细胞替代方面加以探索。鉴于骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)的诸多优势, BMSCs在肝纤维化治疗上的应用价值已受到广泛关注,其优点已通过动物实验和临床研究初步证实,而关于细胞和分子层面的深层次机制,还有待进一步研究。我们结合参与肝纤维化的重要因素-肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs),就 BMSCs治疗肝纤维化的研究现状作一综述。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝星状细胞; 肝纤维化

胡美迪, 郭贵海. 基于肝星状细胞的骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究现状. *世界华人消化杂志* 2010; 18(24): 2558-2562
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2558.asp>

0 引言

肝纤维化是肝脏对慢性炎症坏死或其他损伤的修复反应,肝硬化(hepatic cirrhosis)则是肝纤维化的终末结局^[1]。肝纤维化和硬化的病因种类繁多,在国内,主要是慢性乙型肝炎;在欧美国家,以酒精性肝病和丙型肝炎为主^[2]。肝硬化患者通常因各种并发症死亡,比如食管胃底静脉曲张出血、肝性脑病等。全球每年有1 400万患者死于肝脏疾病,其中,因肝硬化而致死的比例达到55%以上^[3]。肝纤维化、肝硬化严重影响着人类健康,但其治疗仍是尚未完全攻破的难题。目前,肝移植是比较有效的治疗手段之一。但是,受到肝源的缺乏、并发症多、排异反应和价格昂贵等诸多方面因素的影响,使肝移植的开展举

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

步维艰^[4-6]. 在少数接受了肝移植的患者中, 3、12、36 mo的生存率约为94%、88%、79%^[3]. 为了与严重影响人类健康的肝纤维化、肝硬化作斗争, 学者们正致力于找到更合适、更有效的治疗手段, 这已成为近二十年来肝硬化研究的一大热点. 随着骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在临床治疗上的应用价值受到广泛关注, 已有许多学者开始将BMSCs应用于肝纤维化、肝硬化的治疗研究, 并从动物模型和临床患者身上观察到良好的效应, 为众多肝纤维化、肝硬化患者带来了新的福音.

1 肝纤维化的发病机制

肝纤维化发生、发展的直接原因是肝脏受到长期反复刺激^[7], 导致肝纤维化的主要成分-细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成过多, 降解减少, 堆积增加^[4].

目前, 国内外主流观点认为, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是受损肝脏中过多ECM的主要来源^[1,4]. HSCs存在于肝窦周围间隙中^[8], 占肝非实质细胞的5%-10%^[9], 是储存维生素A的主要细胞, 曾被称为储脂细胞^[10]. 当肝实质受到损伤时, HSCs被激活, 并由此始动肝纤维化的中心环节^[11], 此时, HSCs转变成肌成纤维细胞样细胞^[12], 表达 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)^[13], 同时获得新的表型: 增殖性、收缩性、趋化性、纤维增生性和炎症表型^[3,7]. 细胞大量增殖, 凋亡减少, 产生大量的ECM是已被激活的HSCs的主要特点^[14], 同时, 对ECM的降解出现不足, 最终导致纤维化. 鉴于HSCs在肝纤维化形成过程中起到的重要作用, 抑制HSCs活化便成为抗纤维化治疗的一条重要途径.

在全身各组织器官受损后的纤维化修复过程中, 会产生许多抗炎因子, 如, 白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-5(interleukin-5, IL-5)、白介素-13(interleukin-13, IL-13)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等^[15], 而因肝脏是IL-6的主要靶器官^[16], 故当发生肝纤维化时, IL-6在血清中的浓度会明显升高^[17].

传统观念认为, 肝纤维化不可逆转, 但近年来的动物实验和临床观察却发现, 肝纤维化有逆转的可能^[11]. 由于肝纤维化主要是由于ECM的堆积增加和降解减少造成的, 因此, 采用减少ECM合成和(或)增加ECM降解的方法都能取得逆转的效果. 如抑制HSCs的激活(即抑制HSCs的增殖和胶原蛋白的产生)及促进活化HSCs的凋亡.

2 关于MSCs的研究近况

MSCs具有多向分化的潜能^[18], 能够向受损组织的病灶、炎症病灶甚至肿瘤病灶迁徙^[19], 因此许多学者都对探究其在各种疾病治疗方面所能发挥的作用抱有极大兴趣. 当组织、器官受损时, 在各种诱导条件下, 利用MSCs的可塑性, 令其分化成所需细胞, 在自分泌、旁分泌及信号通路作用的影响下, 发挥相应的治疗作用. 近年来, MSCs在缺血性心脏病^[20,21]、缺血性脑病^[22-24]等疾病的治疗方面已有较深入的研究, 并已取得了一定的成果. 现在, 国内外众多消化界同仁也开始对MSCs在肝纤维化治疗中的潜在价值投入越来越多的关注, 其中重点放在MSCs抗肝纤维化的机制和效果方面, 且在部分临床试验性实践中, 取得了一些可喜的成绩^[25,26].

体内实验均发现, MSCs能够被诱导分化成表达CK18、CK19、AFP和白蛋白等肝细胞表面标志物的细胞^[27,28], 其向肝细胞横向分化的潜能已得到证实, 在诱导分化的过程中, 有许多影响因素和基因信号通路参与^[29]. 如细胞凋亡信号通路、Focal Adhesion通路、MAPK信号通路等. 目前, 许多科学家正致力于应用这种分化得来的肝细胞治疗肝纤维化, 既利用分化出的类肝细胞直接替代已受损肝细胞发挥功能. 在动物实验中, 学者已针对MSCs不同移植途径(门静脉、肝内、股动脉、脾内、腹腔及尾静脉)的治疗效果进行观察, 总体而言, MSCs可在移植后, 在相关引领归巢的细胞因子影响下^[3], 例如干细胞因子(stem cell factor, SCF)及其受体c-kit、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)等, 到达受损肝脏, 分化为类肝细胞, 起到一定的保护肝脏和抗纤维化的作用. 当然, 各种移植途径各有优、缺点^[30], 在此基础上, 国内外学者进行的临床试验, 也获得了较满意效果.

3 MSCs对HSCs的影响

目前, 上述直接替代的思路是应用MSCs抗肝纤维化的主要思路, 但随着科研工作的不断推进, 针对HSCs的研究方向已开始崭露头角. 归纳MSCs对HSCs的影响可分为以下两方面.

3.1 MSCs对HSCs的增殖、凋亡和ECM合成产生影响 研究证实, MSCs在肝损伤的动物模型中能起到抗纤维化的作用^[31]. 学者们大胆设想, 这是通过调整ECM的沉积实现的, 是MSCs改善肝纤维化的一大原因. 而HSCs正是导致肝纤维化时ECM过度沉积的重要因素, 当肝脏受到损伤

■研发前沿

为了与严重影响人类健康的肝纤维化、肝硬化作斗争, 学者们正致力于找到更合适、更有效的治疗手段, 这已成为近二十年来肝硬化研究的一大热点.

■相关报道

美国学者Parek-kadan等通过一组实验, 证实HSCs与MSCs间接共培养后, HSCs细胞增殖和胶原蛋白的合成均明显减少, 细胞凋亡明显增加, 这表明MSCs可抑制HSCs的激活, 由此起到延缓肝脏纤维化进程的作用.

■创新盘点

本文重点从MSCs对HSCs作用的角度,通过综合目前国内外的研究成果,总结MSCs在治疗肝纤维化方面的作用。

时, HSCs被激活, 由静息状态的储脂细胞转变成肌成纤维样细胞, 产生大量ECM, 倘若这个过程被阻断, 再加上抑制HSCs的增殖和促使活化的HSCs凋亡, 就能达到较理想的效果. 2007年, 美国学者Parekkadan等^[32]的实验为这一机制提供了理论依据, 通过将活化的人HSCs与人MSCs间接共培养后, HSCs的细胞增殖和胶原蛋白的合成均明显减少, 细胞凋亡明显增加, 这表明MSCs可抑制HSCs的激活, 由此起到延缓肝脏纤维化进程的作用。

3.2 MSCs通过旁分泌机制和信号通路传导发挥重要作用

3.2.1 旁分泌机制: Parekkadan等^[32]通过他们的间接共培养提出, MSCs主要是通过旁分泌某些细胞因子和生长因子影响了HSCs的激活. 由共培养MSCs分泌的IL-10、TNF- α 、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)被认为是参与这一影响过程的最主要因子. 其中, IL-10、TNF- α 与抑制HSCs的细胞增殖和胶原产生有关, HGF则能介导HSCs的凋亡^[33]. 除此之外, 其他学者还提出, 共培养的MSCs能分泌其他细胞因子, 如神经生长因子(nerve growth factor, NGF)^[34], 他可通过与活化的HSCs表达的p75受体结合, 发挥促进HSCs凋亡的作用^[35,36].

3.2.2 信号通路的作用: Mizunuma等^[37]称Rho激酶(Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase, ROCK)是调控HSCs状态的关键因素, 且抑制ROCK的活性, 可使HSCs活性受抑. 国内学者苏思标等^[38]通过一组细胞间接共培养实验表明, MSCs可通过下调Rho-ROCK信号转导通路活性调控HSCs的细胞周期G₁/S期转换, 抑制HSCs增殖并促进其凋亡. 其他学者研究发现, 还有FAK-ERK信号转导通路、TGF- β 1/T β R/Smads信号转导通路等与HSCs活化调控有关, 但关于在这些通路中MSCs对HSCs进一步的影响。

实际上, MSCs与HSCs间的直接作用和MSCs的旁分泌、信号通路机制是密切相关的. Parekkadan等假设, 活化的HSCs分泌IL-6诱导MSCs产生IL-10等细胞因子, 反过来又会抑制HSCs的活化, 他们通过实验证实了前提假设是正确的, 并由此揭示了MSCs与HSCs间存在一个相互作用的能动效应^[3,32].

总之, 当MSCs归巢至肝脏, 与HSCs存在于同一环境中时, MSCs可通过减少HSCs的增殖, 促进HSCs凋亡, 抑制胶原蛋白产生的方式达到

抑制HSCs活性的目的, 由此, 也能达到抗肝纤维化的目的. 国内学者胡昆鹏等^[39]也通过一组MSCs与HSCs共培养的实验, 证实人MSCs对人HSCs有促进凋亡, 减少胶原蛋白合成的作用. 但是, 这个研究领域尚没有太多学者涉及. 目前, 学者们仅揭示出MSCs可能从相关细胞因子水平及信号通路等方面起到抑制HSCs活性的作用, 并阻止肝纤维化的发展, 但这其中的具体因子、具体信号通路非常复杂, 细胞因子与各通路间又存在复杂联系, 相关内容尚待深入研究。

4 临床应用与前景

目前, 全球肝硬化患者日益增多, 而其他治疗手段尚有诸多弊端, 利用MSCs攻克肝纤维化、肝硬化治疗难关已成为消化界学者抢滩的新大陆. 现阶段, 随着介入技术的不断发展, 临床学者更推崇在X光透视下, 经股动脉插管至肝固有动脉, 将分离好的MSCs注入肝内, 此方法操作简单、创伤小, 临床应用前景广泛. 一些国内外学者业已开始进行相关小规模前瞻性试验^[6,25-27,40], 应用结果表明此方法安全、有效, 患者耐受情况良好^[6].

研究发现, 将肝硬化患者自身来源的MSCs, 经介入技术再注入患者体内, 其肝功能的各项指标、Child分级、生活质量都有明显好转. 2007年, Mohamadnejad等^[27]选取了4位失代偿期肝硬化患者为临床研究对象. 从患者自身提取的MSCs经过一系列处理后, 制备成细胞混悬液, 以 $(1-1.5) \times 10^6$ 个/mL细胞悬液的细胞浓度向患者自身回输20 mL, 在随后的1年里定期随访, 发现患者的血浆白蛋白(albumin, ALB)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、直接胆红素(direct bilirubin)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)等指标均有一定程度好转, 且随访期间无明显不良反应, 并发症也得到控制, 甚至连原已萎缩的肝脏还有所增大, 生活质量和精神状态均得到明显改善. 2008年, 国内学者王迪等^[40]通过40例经肝动脉移植MSCs病例作类似的研究(移植方案: 提取自身来源的骨髓干细胞, 并制成10 mL MSCs细胞悬液, 其CD34⁺干细胞数为 $1 \times 10^6-1 \times 10^9$ /mL, 再将上述10 mL细胞悬液移植到肝脏), 所得结果与Mohamadnejad等很相似. 通过他们及其他学者的研究结论推断, MSCs移植是一种行之有效的、能够控制并缓解肝硬化的治疗手段, 在治疗经费、来源缺乏、排异反

应等方面都优于肝移植. 诸多学者的前驱研究, 为今后临床治疗的借鉴及推广提供了重要参考.

5 结论

MSCs具有多向分化的潜能, 学者们正大力探索其在肝纤维化治疗方面的应用价值. 目前, 相关研究主要包括两个方面: 其一, 利用MSCs分化而来的类肝细胞代替受损肝细胞发挥治疗作用; 其二, 利用MSCs对HSCs的影响, 延缓肝纤维化进程, 达到抗肝纤维化的目的. 虽然, 少数学者开展的小规模临床研究, 已令我们看见了些许曙光. 但是, 关于MSCs的移植方案、治疗机制等还需作进一步研究. 另外, 要获取MSCs移植的长期生存率、长期不良反应等信息, 都有待今后开展大规模临床双盲试验. MSCs移植的成功实现无疑将会造福于千万肝纤维化、肝硬化患者, 这是国内外全体消化界同仁共同努力的一大方向.

6 参考文献

- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 199-210
- 胡品津, 刘新光, 厉有名, 林菊生. 消化内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 127
- Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res* 2009; 2: 16-25
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117: 539-548
- Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292-2298
- Yannaki E, Anagnostopoulos A, Kapetanios D, Xagorari A, Iordanidis F, Batsis I, Kaloyannidis P, Athanasios E, Dourvas G, Kitis G, Fassas A. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells. *Exp Hematol* 2006; 34: 1583-1587
- Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 58-66
- 李定国, 汪保灿. 肝内肌成纤维细胞和星状细胞在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2473-2476
- 杨军, 陈曦, 周光文. 肝脏星状细胞与免疫系统. 外科理论与实践 2008; 13: 473-476
- 纪辉, 迟宝荣, 张一宁. 肝纤维化与肝星状细胞. 吉林大学学报(医学版) 2008; 34: 538-542
- Ismail MH, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 72-79
- Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, Moon YM. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39: 960-966
- 陈玮, 陈维雄, 朱金水. 细胞因子与肝纤维化相关的靶向治疗进展. 中国临床医学 2007; 14: 840-842
- 翁山耕, 冷希圣, 魏玉华, 彭吉润, 张佑彬, 吕建锋, 杜如昱. 白细胞介素10抑制枯否细胞诱导的肝星状细胞激活的研究. 中华医学杂志 2002; 82: 104-107
- Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 524-529
- Tiggelman A, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, Chamuleau R. Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 β and TNF α . *J Hepatology* 1995; 23: 295-306
- Ataseven H, Bahcecioğlu IH, Kuzu N, Yalniz M, Celebi S, Erensoy A, Ustundag B. The levels of ghrelin, leptin, TNF- α , and IL-6 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma due to HBV and HDV infection. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 78380
- Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int* 2008; 32: 724-732
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 815-820
- Gao F, He T, Wang H, Yu S, Yi D, Liu W, Cai Z. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. *Can J Cardiol* 2007; 23: 891-898
- Hare JM. Translational development of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular diseases. *Tex Heart Inst J* 2009; 36: 145-147
- Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatoopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics* 2008; 9: 166
- Camp DM, Loeffler DA, Farrah DM, Borneman JN, LeWitt PA. Cellular immune response to intrastrially implanted allogeneic bone marrow stromal cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 2009; 6: 17
- Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med* 2008; 40: 387-397
- 朱康顺, 单鸿, 何可可, 李征然, 关守海, 黄明声, 钱结胜, 庞鹏飞, 姜在波. 自体骨髓干细胞肝内移植治疗失代偿期肝硬化的初步临床观察. 中国医学影像技术 2007; 23: 1863-1865
- 潘兴南, 沈建坤, 庄岳鹏, 陈先礼, 李奕鑫, 陈丽娟, 杨红. 自体骨髓干细胞移植治疗终末期肝病临床研究. 南方医科大学学报 2008; 28: 1207-1209
- Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007; 10: 459-466
- Luk JM, Wang PP, Lee CK, Wang JH, Fan ST. Hepatic potential of bone marrow stromal cells:

■应用要点

通过本文可以了解到基于HSCs的骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究现状, 为广大学者在今后的深入研究上提供参考.

■同行评价

本文阐述了骨髓间充质干细胞对肝纤维化治疗的机制及临床应用前景,有助于读者了解骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究现状,有一定的可读性。

- development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods* 2005; 305: 39-47
- 29 李晶津, 李瀚旻, 高翔, 晏雪生. 移植雄性骨髓的雌性小鼠肝组织肝再生相关基因的信号通路. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 150-155
- 30 穆丽雅, 韩明子. 骨髓干细胞分化为肝细胞的多种移植途径. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 607-610
- 31 Alison MR, Choong C, Lim S. Application of liver stem cells for cell therapy. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 819-826
- 32 Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 247-252
- 33 Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, Ozono K, Matsumoto K, Nakamura T, Hara J. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol* 2004; 32: 955-961
- 34 Lin N, Hu K, Chen S, Xie S, Tang Z, Lin J, Xu R. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci* 2009; 85: 291-295
- 35 Oakley F, Trim N, Constantinou CM, Ye W, Gray AM, Frantz G, Hillan K, Kendall T, Benyon RC, Mann DA, Iredale JP. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1849-1858
- 36 Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1235-1243
- 37 Mizunuma K, Ohdan H, Fudaba Y, Tashiro H, Asahara T. ROCK inhibitor, Y-27632, inhibits anoxia-reoxygenation-induced contraction of hepatic stellate cells. *Transplant Proc* 2003; 35: 111-113
- 38 苏思标, 姜海行, 王东旭, 覃山羽, 梁梓宇. 骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞RhoA、P27的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3283-3291
- 39 胡昆鹏, 林楠, 林继宗, 邓美海, 汤照峰, 项鹏, 许瑞云. 人骨髓间质干细胞对肝星状细胞的体外调控. *中国组织工程研究与临床康复* 2009; 13: 5257-5260
- 40 王迪, 郭晓钟, 刘峰, 赵佳军, 邵晓冬, 李宏宇, 崔忠敏. 经肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化40例. *现代消化及介入诊疗* 2008; 13: 258-261

编辑 曹丽鸥 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)

原发性肝癌的非手术治疗

刘煌, 刘静

刘煌, 刘静, 厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第175医院)普外科 福建省漳州市 363000

作者贡献分布: 刘煌与刘静对此文所作贡献均等; 本综述由刘煌撰写完成, 刘静审校。

通讯作者: 刘静, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 363000, 福建省漳州市华中路269号, 厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第175医院)普外科. ljdoctor@hotmail.com
电话: 0596-2975769

收稿日期: 2010-05-07 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Non-surgical treatment of primary hepatic carcinoma

Huang Liu, Jing Liu

Huang Liu, Jing Liu, Department of General Surgery, Dongnan Hospital Affiliated to Xiamen University (the 175th Hospital of Chinese PLA), Zhangzhou 363000, Fujian Province, China.

Correspondence to: Associate Professor Jing Liu, Department of General Surgery, Dongnan Hospital Affiliated to Xiamen University (the 175th Hospital of Chinese PLA), Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. ljdoctor@hotmail.com

Received: 2010-05-07 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

Primary hepatic carcinoma is the sixth most common cancer and the third most common cause of cancer-related death worldwide. As most patients with primary hepatic carcinoma have unresectable tumor, their median survival is short. In recent years, great advances have been made in non-surgical treatment of primary hepatic carcinoma. Here, we review the advances of non-surgical treatment of primary hepatic carcinoma.

Key Words: Primary hepatic carcinoma; Interventional therapy; Biotherapy

Liu H, Liu J. Non-surgical treatment of primary hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2563-2568

摘要

目前, 原发性肝癌是居全球第6位的常见肿瘤, 并且在肿瘤相关性死亡中排第3位。大部分原

发性肝癌患者诊断时已无法手术切除并且中位生存期很短。近年来, 原发性肝癌的非手术治疗得到了很大的发展和应用, 弥补了手术治疗的不足。我们简要的总结了目前原发性肝癌非手术治疗的最新进展。

关键词: 原发性肝癌; 介入治疗; 生物治疗

刘煌, 刘静. 原发性肝癌的非手术治疗. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2563-2568

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2563.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是居全球第6位的常见肿瘤, 并且在肿瘤相关性死亡中排第3位^[1]。大部分原发性肝癌患者诊断时已无法手术切除并且中位生存期很短, 使得PHC手术治疗的机率不超过20%^[2]。近年来, PHC的非手术治疗得到了很大的发展和应用, 弥补了手术治疗的不足, 本综述简要的总结了PHC非手术治疗方面的最新进展。

1 肝癌的临床分期

肝癌经常发生于肝硬化和慢性肝炎病毒感染的基础之上, 因此对肝癌的分期除了要考虑肿瘤病理、淋巴结、转移(TNM分类系统), 还要对肝硬化的程度进行正确的评估。国内外学者习惯使用Child-Pugh评分系统对肝硬化进行评估。Okuda等^[3]制定了第1个将肿瘤情况与肝脏功能结合在一起的评分系统, 该分期系统包括了肝脏被肿瘤取代的比例、腹水、血清白蛋白和总胆红素4项指标; 4项都没出现为I级, 出现1-2项为II级, 出现3-4项为III级。其后意大利肝癌小组于1998年提出了CLIP(the cancer of the liver italian program)评分法, 这一方法包含了Child-Pugh评分、肿瘤形态、甲胎蛋白、门静脉癌栓4项指标^[4,5]。随后Leung等建立了香港中文大学预后系数(the Chinese university prognostic index, CUPI)评分系统, 他包含TNM分期、临床症状、腹水、甲胎蛋白、总胆红素和碱性磷酸酶等6

■背景资料

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 由于经常伴发肝硬化与慢性肝炎病毒感染, 使其手术治疗的机率不超过20%。近年来, 原发性肝癌在非手术治疗方面取得了重大的进展。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

■ 研发前沿

目前临床上对于原发性肝癌的治疗多以手术为主,但近年来介入、基因、免疫等相关非手术综合治疗逐渐成为研究热点。

个参数,并给以相应分值,根据总的积分将患者分为高、中、低3个危险组^[6]。CLIP与CUPI是建立在不同基础上的评估系统,丙型肝炎患者主要参照CLIP指数,而乙型肝炎患者主要参照CUP指数。这一发现表明,不同的分期标准只适用于特定的患者群体。近年来巴塞罗那(the Barcelona Clinical Liver Cancer, BCLC)分期法被广泛推崇,该方法是1999年巴塞罗那肝癌小组提出的,他们将肝癌患者分为5期:极早期、早期、中期、晚期和终末期,归纳出每期中对预后有明显影响的因素,合并后形成新的分期方法,每期又适用于不同治疗措施。BCLC分期法最大的特点是其对治疗的指导作用以及对早期患者的鉴别作用,临床实用性很强^[7]。

2 局部消融

局部消融认为是禁忌手术的早期肝癌患者最好的治疗选择^[8],主要包括:经皮无水酒精瘤内注射术(percutaneous ethanol injection, PEI)、射频消融治疗(radiofrequency ablation, RFA)、微波固化治疗(microwave coagulation therapy, MCT)、超声聚焦疗法(high intensity focused ultrasound, HIFU)、激光凝固治疗(interstitial laser photocoagulation, ILP)和冷冻治疗。

2.1 PEI PEI疗法是在超声引导下通过穿刺针直接穿刺肿瘤,将95%的酒精缓慢注入瘤内,利用高浓度乙醇渗透肿瘤组织引起肿瘤细胞脱水,蛋白质降解,肿瘤及周围组织凝固性坏死,具有操作简便,费用低廉等优点。小肝癌PEI治疗的完全缓解率为70%-80%,5年累计存活率可达到40%-60%^[9]。PEI对直径<3 cm的小肝癌的治疗效果显著好于直径>5 cm的肝癌,影响其疗效因素主要包括肝癌大小、Child-Pugh评分、BCLC分期、治疗前甲胎蛋白水平^[10]。当肝癌位于胆管、胆囊、横膈膜周围或肝癌直径<1.5 cm时强烈推荐PEI^[11]。其最大的缺点是肿瘤周边残存癌细胞很高的复发率^[12],其次PEI往往需要多次注射,大量酒精逸入肝实质可造成累积性肝损害,甚至肝硬化,还有就是对酒精不耐受。近年来采用冷冻或经皮穿刺肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)联合治疗方案可提高患者生存率^[13]。

2.2 RFA RFA是通过电极传导交流电产生热量来杀死肿瘤细胞。近年来也有通过腹腔镜途径和开放途径以便更好地观察肿瘤和周围组织。目前国际上公认适合RFA治疗的指征是:(1)不能

或不宜手术的小肝癌;(2)单发肿瘤,最大直径≤5 cm;或者肿瘤数目≤3个,最大直径≤3 cm;(3)没有脉管癌栓、邻近器官侵犯;(4)肝功能分级Child-Pugh A或B级^[14]。张耀军等^[14]报道了分别应用RFA为主和手术切除治疗≤5.0 cm的小肝癌71和90例的前瞻性临床随机对照研究,结果术后1、3、4年生存率分别为95.8%、71.4%、67.9%和93.3%、73.4%、64.0%,两组间没有统计学差异,但是RFA组的术后并发症发生率明显低于手术切除组(3/71 vs 50/90),术后住院时间明显较短(9.18 d±3.06 d vs 19.70 d±5.61 d)。Waki等^[15]对88例小肝癌患者进行RFA治疗,其中1、3年局部肿瘤复发率分别为4.8%、4.8%,3、5年生存率分别为83.0%、70.0%,3、5年无病生存率分别为34.0%、24.0%。RFA的主要缺点是:(1)热力散失射频所产生的热力被附近大血管中流动的血液带走,使疗效降低;(2)肿瘤邻近器官受损;(3)较大的肿瘤,射频所致的肿瘤坏死率低。RFA后复发的独立危险因素有肿瘤直径>3 cm、肿瘤临近肝内血管、包膜下肿瘤、PT延长超过3 s。如果在临床实践中对这些风险因素加以考虑,将有利于RFA的疗效^[16]。

2.3 其他经皮消融治疗 MCT、ILP等治疗与射频机制相似,Shibata等^[17]用微波治疗肝癌234例,3年生存率与5年生存率分别为73%和57%。另一试验证明18例小肝癌患者采用微波治疗肿瘤全部坏死率为89%^[18]。近来氩氦冷冻治疗多通过内镜途径,据国外一项长期随访资料结果显示冷冻手术后生存率与肝切除生存率相当,但降低了综合死亡率,提高了生存质量^[19]。HIFU对肝癌的治疗尚处于研究阶段,由于呼吸运动的影响使肝脏移动较大以及肋骨对声能的反射和阻挡,使其临床应用受到一定的限制,有待技术上的进一步突破。

3 经导管动脉栓塞化疗术

正常肝脏的血供25%-30%来源于肝动脉,而PHC的血供90%-99%来自肝动脉,只有少部分由门静脉供血。TACE应用化疗药物和超液化碘油混合成乳剂,栓塞肿瘤血管,使肿瘤缺血坏死,而对正常的肝脏影响较小。目前,TACE是不能手术切除的中晚期肝癌的首选疗法,对于小肝癌也是首选疗法之一。主要适应证:PHC不能根治性切除且肝功能尚好,无门脉主干完全栓塞;肿瘤体积不大于全肝70%;巨大PHC术前应用使肿瘤缩小以期二期切除者;姑息性控制肿瘤所

致疼痛、出血及动静脉瘘; PHC切除后的预防性治疗等^[20]. 有学者报道8 510例无法手术切除的PHC患者, 接受TACE患者的中位生存时间约为34 mo, 患者的1、3、5和7年的生存率分别为82%、47%、26%和16%^[21]. 对伴有门静脉癌栓的患者, 如采用合适的TACE治疗, 也可延长平均生存时间^[22,23]. 对于直径在5 cm以下的小肝癌也取得了不错的效果^[24]. TACE的缺点是大多数肿瘤坏死不完全, 需要多次治疗. TACE术后手术切除标本病理检测表明大多数瘤灶的周围仍有残存的成活肿瘤细胞, 主要与肿瘤细胞的耐药、栓塞不完全以及肿瘤侧枝血供的重新建立有关.

4 放射治疗

近年来对PHC的放射治疗有以下最新认识: (1) 正常肝脏组织对放射线较为敏感, 而我国的肝癌患者多半合并有病毒性肝炎, 在此基础上肝脏肿瘤的放疗可能引起较严重的放射性肝损伤^[25]; (2) Zeng等^[26]从放射生物学角度验证了HCC的放射敏感性几乎等同于鼻咽低分化鳞癌; (3) 放疗技术不断发展, 如应用的立体定向放射治疗(stereotactic radiotherapy, SRT)包括伽玛刀(γ 刀)、X刀、三维适形放疗(three-dimensional conformal radiation therapy, 3DCRT)和调强适形放疗(intensity modulated radiation therapy, IMRT)既能提高肿瘤的照射剂量, 又能最大限度减小射线对正常肝组织的损伤. 图像引导的放射治疗技术(image-guided radiotherapy, IG-RT)则充分考虑了呼吸所导致的治疗靶区的位移误差, 引入了包括时间因素在内的4D放射治疗概念, 使肿瘤的照射剂量明显加大, 使放疗疗效得到明显增强. Kim等^[27]总结了70例原发性肝癌患者接受三维适形放疗的结果, 原发肿瘤病灶的有效率为54.3%, 门静脉癌栓的有效率为39%, 放疗显效患者的中位生存期延长11.2 mo. 放射治疗可应用于巨大PHC和晚期PHC的姑息治疗或与其他治疗方法相结合的综合治疗^[28,29]. 放疗对于较大肿瘤或发生转移者具有一定的姑息治疗作用, 对于病情较重者也可通过放疗来使症状得到缓解. 对于PHC合并肝门淋巴结或腹腔淋巴结转移者, 在控制肝脏原发病灶后, 可将放疗应用于门静脉癌栓、下腔静脉癌栓、肝门淋巴结或腹腔淋巴结转移以及远处转移病灶的姑息性治疗^[30-32]. 但正常肝的放射耐受量因肝硬化程度不同而存在差异, 究竟多少体

积的肝脏, 应控制在多少放疗剂量才安全, 现尚无统一标准; PLC的放疗剂量如何分割也存在很大争议. 肝炎、肝硬化对肝细胞再生的影响如何, 合并肝炎、肝硬化时放射治疗的总剂量和分割方式以及与放射性并发症的关系等问题仍需进一步探索. 目前通常主张采用较小剂量、较长疗程和积累总剂量足够大的方法, 以提高疗效和减少不良反应.

此外, 用单克隆抗体携带放射性物质的导向治疗也可以取得一定的疗效(内放疗), 对于术中探查无法切除的肝癌可在术中经肝动脉注入Y球形微粒, 起到内照射治疗作用, 对缩小肿块、缓解症状和延长生命有一定的意义, 有少数患者经此法治疗, 肿瘤缩小而获得二期切除^[33,34].

5 化学治疗

肝癌是一种化疗抵抗肿瘤, 这种抵抗与肝癌的肿瘤生物学特性, 药代动力学属性和其固有的获得性耐药相关联; (1) P53基因突变在肝癌中经常发生, 肝炎病毒感染和化学药物都对P53突变的分子机制产生影响, 化疗药物引起细胞凋亡需要P53的参与, 肝癌P53通路被破坏从而导致肝癌普遍存在着原发性耐药^[35]. 此外DNA拓扑异构酶II α 在肝癌细胞高表达, 而阿霉素的靶点是DNA拓扑异构酶II α , 肝癌细胞DNA拓扑异构酶II α 的过度表达可能是肝癌阿霉素抵抗的缘故^[36]; (2) 在肝癌的药代动力学方面, 由于肝细胞数量减少、肝微循环障碍和转化功能(如CYP450系统等)降低, 使常规的化疗药物的吸收、分布、代谢和利用度差, 难以达到预期的目的, 且化疗药物本身的毒性作用, 往往会加重肝功能不全, 增加患者感染、黄疸、腹水和消化系出血的机率, 难以保证化疗的剂量强度和疗程的完整; (3) 肝癌细胞具有固有耐药性, 可以通过药物外排机制(ATP结合盒蛋白药物转移家族: 多耐药基因蛋白、P-糖蛋白、多药耐药蛋白)而耐药^[37].

迄今为止, 还没有令人信服的证据证明全身化疗可以改善晚期肝癌患者的总生存率^[38]. 大多数化疗药物都曾试用于肝细胞癌, 但成效甚微, 有研究证明单药阿霉素的有效率为10%-15%, 但并不能提高患者生存率, 有些病例甚至产生3或4级严重不良反应, 特别是中性粒细胞减少^[39]. 其他化疗药如顺铂、5-FU、表阿霉素、依托泊甙、吉西他滨、依立替康和阿霉素脂质体等也未显示有明显的疗效, 但伴有较明显的化疗相

■创新盘点

本文总结了原发性肝癌在介入、放疗、生物治疗等非手术治疗方面的最新研究成果.

■名词解释

三维适形放射治疗: 三维适形放射治疗是一种高精度的放射治疗。他利用CT图像重建三维的肿瘤结构, 通过在不同方向设置一系列不同的照射野, 并采用与病灶形状一致的高剂量区的分布形状在三维方向(前后、左右、上下)上与靶区形状一致, 同时使得病灶周围正常组织的受量降低。

关的全身不良反应^[40-42]。过去认为, 联合化疗的客观疗效优于单药化疗, 虽然一些方案在临床研究中表现出一定的作用, 但大多数的方案未能提高患者总生存率^[43,44]。

6 激素治疗

众所周知, 性类固醇激素能够促进多种癌细胞的生长。临床上, 激素治疗已经用于治疗许多种实体瘤。如女性的乳腺癌, 子宫内膜癌和男性的前列腺癌。事实上, 激素治疗通过阻断性激素受体的相互作用达到治疗目的。肝癌表达雌激素受体, 孕激素受体和雄激素受体^[45,46]。因此, 激素类药物曾经一度被用来治疗晚期肝癌患者, 他莫昔芬因为其良好的耐受性和可口服而被选用。然而, 一些前瞻性随机对照试验未能证明其能提高晚期肝癌患者的总体生存率^[47]。此外, Nowak等^[48]的荟萃分析未能证明其对晚期肝癌患者存在生存优势。总之, 目前没有充分的证据证明肝癌的激素治疗的有效性。

7 生物治疗

7.1 免疫治疗 近年来, 国内外在肝癌的基因治疗, 过继免疫治疗, 细胞因子治疗及单克隆抗体导向治疗方面的研究取得了一定进展。目前临床上比较常用的生物治疗方法是细胞因子如干扰素的应用。干扰素是病毒性肝炎经常采用的治疗药物, 但对肝癌治疗的作用仍存在争议。Lai等^[49]进行的研究取得了一定的疗效, 他们使用高剂量的干扰素(2.5×10^7 - 5.0×10^8 IU/m², 3次/周)治疗晚期肝癌患者, 有效率为30%, 提高了患者的总体生存率, 其缺点主要是存在明显的治疗相关性不良反应。当采用低剂量干扰素(3×10^6 IU/m², 3次/周)时, 虽然不良反应有所减轻, 但是无显著临床受益。

7.2 靶向性药物治疗 随着对肝细胞癌分子结构的了解不断加深, 针对肿瘤细胞的细胞内信号转导开发的靶向性药物已取得了令人可喜的进展^[50]。这些分子靶向治疗主要针对肝癌细胞的生长因子及其受体, 细胞内的信号转导和细胞周期控制。最近对酪氨酸激酶抑制剂索拉非尼治疗肝癌的初步研究已取得积极成果^[51,52]。索拉非尼是作为一种口服的多靶点、多激酶抑制剂, 可以靶向作用于肿瘤增殖、肿瘤血管生成过程中的多种激酶(血管内皮生长因子、血小板源性生长因子、c-kit受体、Raf)。在一项针对137例患者的II期临床试验中, 高表达磷酸化细

胞外信号调节激酶和Raf患者的生存期得到了明显的延长, 显示了索拉非尼具有良好的靶向性^[53]。血管内皮生长因子的单克隆抗体贝伐单抗(bevacizumab)也已进入了治疗PHC的II期临床试验阶段, 试验证明贝伐单抗与铂类化疗药物之间具有良好的协同性, 可使患者的中位生存期延长至9.6 mo^[54]。表皮生长因子受体阻断剂如埃罗替尼(erlotinib), 西妥昔单抗(cetuximab), 拉帕替尼(lapatinib)也均在各自临床试验中取得了良好的疗效, 但其有效性还有待进一步证明^[55-57]。

8 综合治疗或联合治疗

综合治疗或联合治疗是目前肝癌治疗的方向, 已有较多的研究表明联合治疗优于单一治疗。但如何来实施联合治疗尚无统一的认识, 也未能提出一种或多种标准的联合治疗方案。对于一些被随机对照试验研究证实了的有效的治疗手段并不意味着对某一个体患者一定有效, 由于每一个患者均有其特殊的临床表现, 因此治疗的策略也应该随机应变, 提出一套适用于该患者的特殊治疗方案, 也就是肝癌患者治疗的个体化方案。但治疗方案的制定切忌因需个体化而导致了随意化的结果^[58]。

9 结论

虽然目前对肝癌的治疗还没有出现一个根本性的转折, 但是肝癌的各种治疗方法和手段都取得了长足的进步。以手术为主, 联合TACE及其他各种局部消融治疗, 并根据个体情况选用放疗、化疗、生物治疗、分子靶向治疗、中医中药治疗等综合治疗, 在较长的时间内仍将作为治疗肝癌的主要模式。合理选择各种治疗方法是提高肝癌治疗效果的关键。

10 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Llovet JM, Bruix J, Gores GJ. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy. *Hepatology* 2000; 31: 1019-1021
- 3 Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56: 918-928
- 4 A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28: 751-755
- 5 Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and

- hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology* 2000; 31: 840-845
- 6 Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, Lau JT, Yu SC, Johnson PJ. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer* 2002; 94: 1760-1769
 - 7 Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711
 - 8 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236
 - 9 Yin XY, Lu MD. Percutaneous ablation for small hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3: 121-130
 - 10 Danila M, Sporea I, Sirlin R, Popescu A. Percutaneous ethanol injection therapy in the treatment of hepatocarcinoma--results obtained from a series of 88 cases. *J Gastrointest Liver Dis* 2009; 18: 317-322
 - 11 Kim SR, Imoto S, Nakajima T, Ando K, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Matsuoaka T, Kudo M, Hayashi Y. Well-differentiated hepatocellular carcinoma smaller than 15 mm in diameter totally eradicated with percutaneous ethanol injection instead of radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2009; 3: 411-415
 - 12 Khan KN, Yatsushashi H, Yamasaki K, Yamasaki M, Inoue O, Koga M, Yano M. Prospective analysis of risk factors for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma following ethanol injection. *J Hepatol* 2000; 32: 269-278
 - 13 Xu ZM, Wang JH, Zhen ZJ, Chen HW, Cui WZ. [Percutaneous radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection for recurrent small hepatocellular carcinoma] *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2006; 26: 1626-1628
 - 14 张耀军, 陈敏山. 射频消融治疗肝癌的指征和应用. *肝胆外科杂志* 2010; 18: 9-10
 - 15 Waki K, Aikata H, Katamura Y, Kawaoka T, Takaki S, Hiramatsu A, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Percutaneous radiofrequency ablation as first-line treatment for small hepatocellular carcinoma: results and prognostic factors on long-term follow up. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 597-604
 - 16 Yang B, Zou J, Xia J, Ren Z, Gan Y, Wang Y, Zhang B, Ge N, Wang D, Chen Y, Chen R, Li L, Ye S, Wang X. Risk factors for recurrence of small hepatocellular carcinoma after long-term follow-up of percutaneous radiofrequency ablation. *Eur J Radiol* 2010 Mar 18. [Epub ahead of print]
 - 17 Shibata T, Iimuro Y, Yamamoto Y, Maetani Y, Ametani F, Itoh K, Konishi J. Small hepatocellular carcinoma: comparison of radio-frequency ablation and percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology* 2002; 223: 331-337
 - 18 Yamashiki N, Kato T, Bejarano PA, Berho M, Montalvo B, Shebert RT, Goodman ZD, Seki T, Schiff ER, Tzakis AG. Histopathological changes after microwave coagulation therapy for patients with hepatocellular carcinoma: review of 15 explanted livers. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2052-2059
 - 19 Kerkar S, Carlin AM, Sohn RL, Steffes C, Tyburski J, Littrup P, Weaver D. Long-term follow up and prognostic factors for cryotherapy of malignant liver tumors. *Surgery* 2004; 136: 770-779
 - 20 Vogl TJ, Naguib NN, Nour-Eldin NE, Rao P, Emami AH, Zangos S, Nabil M, Abdelkader A. Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications. *Eur J Radiol* 2009; 72: 505-516
 - 21 Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* 2006; 131: 461-469
 - 22 Tezuka M, Hayashi K, Kubota K, Sekine S, Okada Y, Ina H, Irie T. Growth rate of locally recurrent hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization: comparing the growth rate of locally recurrent tumor with that of primary hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 783-788
 - 23 Georgiades CS, Hong K, D'Angelo M, Geschwind JF. Safety and efficacy of transarterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma and portal vein thrombosis. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1653-1659
 - 24 Maluccio MA, Covey AM, Porat LB, Schubert J, Brody LA, Sofocleous CT, Getrajdman GI, Jarnagin W, Dematteo R, Blumgart LH, Fong Y, Brown KT. Transcatheter arterial embolization with only particles for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 2008; 19: 862-869
 - 25 王中堂, 李宝生, 闫婧, 张自成, 尹勇, 刘娟. 原发性肝癌三维适形放疗后放射性肝病的相关因素分析. *中华放射肿瘤学杂志* 2007; 16: 281-285
 - 26 Zeng ZC, Jiang GL, Wang GM, Tang ZY, Curran WJ, Iliakis G. DNA-PKcs subunits in radiosensitization by hyperthermia on hepatocellular carcinoma hepG2 cell line. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 797-803
 - 27 Kim TH, Kim DY, Park JW, Kim YI, Kim SH, Park HS, Lee WJ, Park SJ, Hong EK, Kim CM. Three-dimensional conformal radiotherapy of unresectable hepatocellular carcinoma patients for whom transcatheter arterial chemoembolization was ineffective or unsuitable. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 568-575
 - 28 Meng MB, Cui YL, Lu Y, She B, Chen Y, Guan YS, Zhang RM. Transcatheter arterial chemoembolization in combination with radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2009; 92: 184-194
 - 29 Dawson LA, McGinn CJ, Normolle D, Ten Haken RK, Walker S, Ensminger W, Lawrence TS. Escalated focal liver radiation and concurrent hepatic artery fluorodeoxyuridine for unresectable intrahepatic malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2210-2218
 - 30 Nakagawa K, Yamashita H, Shiraishi K, Nakamura N, Tago M, Igaki H, Hosoi Y, Shiina S, Omata M, Makuuchi M, Ohtomo K. Radiation therapy for portal venous invasion by hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7237-7241
 - 31 You CR, Jang JW, Kang SH, Bae SH, Choi JY, Yoon SK, Choi IB, Lee DH, Chun HJ, Choi BG. [Efficacy of transarterial chemolipiodolization with or without 3-dimensional conformal radiotherapy for huge HCC with portal vein tumor thrombosis] *Korean J Hepatol* 2007; 13: 378-386
 - 32 Kim DY, Park W, Lim DH, Lee JH, Yoo BC, Paik SW, Kho KC, Kim TH, Ahn YC, Huh SJ. Three-

同行评价

本文比较全面地综述了当前原发性肝癌的非手术治疗方法, 叙述客观、简要, 对原发性肝癌的临床治疗有指导意义。

- dimensional conformal radiotherapy for portal vein thrombosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 2419-2426
- 33 Dancey JE, Shepherd FA, Paul K, Sniderman KW, Houle S, Gabrys J, Hendler AL, Goin JE. Treatment of nonresectable hepatocellular carcinoma with intrahepatic 90Y-microspheres. *J Nucl Med* 2000; 41: 1673-1681
- 34 Geschwind JF, Salem R, Carr BI, Soulen MC, Thurston KG, Goin KA, Van Buskirk M, Roberts CA, Goin JE. Yttrium-90 microspheres for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S194-S205
- 35 Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2166-2176
- 36 Watanuki A, Ohwada S, Fukusato T, Makita F, Yamada T, Kikuchi A, Morishita Y. Prognostic significance of DNA topoisomerase II α expression in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 1113-1119
- 37 Ng IO, Liu CL, Fan ST, Ng M. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 355-363
- 38 Palmer DH, Hussain SA, Johnson PJ. Systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Invest Drugs* 2004; 13: 1555-1568
- 39 Gish RG, Porta C, Lazar L, Ruff P, Feld R, Croitoru A, Feun L, Jeziorski K, Leighton J, Gallo J, Kennealey GT. Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3069-3075
- 40 Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? *Oncologist* 2006; 11: 790-800
- 41 O'Reilly EM, Stuart KE, Sanz-Altamira PM, Schwartz GK, Steger CM, Raeburn L, Kemeny NE, Kelsen DP, Saltz LB. A phase II study of irinotecan in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 101-105
- 42 Halm U, Etzrodt G, Schiefke I, Schmidt F, Witzigmann H, Mössner J, Berr F. A phase II study of pegylated liposomal doxorubicin for treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2000; 11: 113-114
- 43 Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Takezako Y, Morizane C. A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 756-762
- 44 Lee J, Park JO, Kim WS, Park SH, Park KW, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Yoo BC, Joh J, Kim K, Jung CW, Park YS, Im YH, Kang WK, Lee MH, Park K. Phase II study of doxorubicin and cisplatin in patients with metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 385-390
- 45 Nagasue N, Ito A, Yukaya H, Ogawa Y. Estrogen receptors in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1986; 57: 87-91
- 46 Boix L, Bruix J, Castells A, Fuster J, Bru C, Visa J, Rivera F, Rodes J. Sex hormone receptors in hepatocellular carcinoma. Is there a rationale for hormonal treatment? *J Hepatol* 1993; 17: 187-191
- 47 Chow PK, Tai BC, Tan CK, Machin D, Win KM, Johnson PJ, Soo KC. High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: A multicenter randomized controlled trial. *Hepatology* 2002; 36: 1221-1226
- 48 Nowak A, Findlay M, Culjak G, Stockler M. Tamoxifen for hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD001024
- 49 Lai CL, Lau JY, Wu PC, Ngan H, Chung HT, Mitchell SJ, Corbett TJ, Chow AW, Lin HJ. Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1993; 17: 389-394
- 50 Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76
- 51 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
- 52 Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-1327
- 53 Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figuer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Saltz LB. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4293-4300
- 54 Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Clark JW, Muzikansky A, Horgan K, Sheehan S, Hale KE, Enzinger PC, Bhargava P, Stuart K. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1898-1903
- 55 Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, Donehower RC, Fitch T, Picus J, Erllichman C. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6657-6663
- 56 Huether A, Höpfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1568-1578
- 57 Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, Tanaka M, Lenz HJ, Yen Y, Kindler HL, Iqbal S, Longmate J, Mack PC, Lurje G, Gandour-Edwards R, Dancey J, Gandara DR. A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 777-783
- 58 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

姜黄素对溃疡性结肠炎基础及临床疗效的研究进展

陈欧, 李昌平

陈欧, 李昌平, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 本文综述由陈欧完成; 选题和审校由李昌平完成. 通讯作者: 李昌平, 教授, 主任医师, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 泸州医学院附属医院消化内科.

lichangping1965@sina.com

电话: 0830-3163674

收稿日期: 2010-05-14 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-19 在线出版日期: 2010-08-28

Treatment of ulcerative colitis with curcumin: mechanisms and efficacy

Ou Chen, Chang-Ping Li

Ou Chen, Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Avenue, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. lichangping1965@sina.com

Received: 2010-05-14 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-19 Published online: 2010-08-28

Abstract

Curcumin is a natural product isolated from rhizome of *Curcuma longa* (turmeric). Extensive research over the past five decades has revealed several important functions of curcumin. Animal studies and clinical trials have suggested that curcumin has antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor and immunoregulatory effects. Ulcerative colitis (UC) is a chronic, idiopathic, relapsing intestinal inflammatory disorder of unknown etiology. In experimental colitis, curcumin mediates anti-inflammatory effects by modulating the release of cytokines, inhibiting nuclear factor- κ B (NF- κ B) and its upstream signaling pathway, activating peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and down-regulating the activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). At present, although there are studies suggesting that curcumin has therapeutic value for patients with UC, further studies are still needed to evaluate the clinical potential of curcumin in these patients.

Key Words: Curcumin; Ulcerative colitis; Cytokine; Nuclear factor- κ B; Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; Cyclooxygenase-2; Inducible nitric oxide synthase

Chen O, Li CP. Treatment of ulcerative colitis with curcumin: mechanisms and efficacy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2569-2573

摘要

姜黄素是姜科植物姜黄的提取物, 现代药理学研究证实其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等作用. 溃疡性结肠炎是一种病因尚不清楚的肠道非特异性炎症性疾病. 许多研究表明姜黄素可以通过调节细胞因子释放, 抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路, 激活过氧化物酶增殖剂激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)表达及下调环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2), 诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性等多种途径阻断多种炎症因子的转录, 在实验性的溃疡性结肠炎中发挥抗炎作用. 目前有临床研究也证实了姜黄素对溃疡性结肠炎患者具有治疗价值, 但临床研究资料相对较少, 仍需大量的临床研究来评估姜黄素临床潜力.

关键词: 姜黄素; 溃疡性结肠炎; 细胞因子; 核因子- κ B; 过氧化物酶增殖剂激活受体- γ ; 环氧化酶-2; 一氧化氮合酶

陈欧, 李昌平. 姜黄素对溃疡性结肠炎基础及临床疗效的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(24): 2569-2573
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2569.asp>

0 引言

姜黄素来源于姜科植物姜黄的干燥根茎, 主要产于日本、中国、印度等地, 具有价格低廉、无毒的特性, 传统中医认为姜黄有破血行气, 通经止痛之功效^[1]. 现代药理学研究证实姜黄素具有抗炎、抗氧化、抑制血小板聚集、免疫调节、抗肿瘤等功能^[2-4]. 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种肠道非特异性炎症性疾病^[5], 属

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)是一种肠道非特异性炎症性疾病, 其病因及发病机制尚未完全阐明, 治疗上也缺乏特异有效的药物, 因此研究其发病机制, 以及寻找治疗新策略和新药物是当今UC研究领域的一大热点. 近年来的研究表明姜黄素具有强大的抗炎作用, 对UC有一定的治疗作用, 但其抗炎机制复杂, 有必要进行深入、广泛的研究, 而姜黄素价格低廉、来源广泛, 有很好的开发利用价值.

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

■研发前沿

姜黄素对UC的抗炎机制的研究及其临床应用是目前研究的热点之一,对其抗炎机制的研究可以为UC发病机制及治疗提供有力的理论证据,而对其疗效和安全性的评价则具有临床实用价值。

于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种,其病因及发病机制尚未清楚,大多数研究认为与免疫反应异常有关^[6,7]。遗传、环境因素、肠道黏膜屏障的破坏、持续的肠道感染等多种因素共同参与了UC的发生^[8]。研究表明姜黄素可以通过调节细胞因子的释放,抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的活化,激活过氧化物酶增殖剂激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)的表达及下调环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2),诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达等多种途径发挥抗炎作用,在UC的治疗中具有重要价值。

1 姜黄素对UC的抗炎机制的研究

1.1 姜黄素调节细胞因子释放 细胞因子分为促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-8等)和抑炎性细胞因子(IL-4、IL-10等),他们在UC中的发病作用已经得到公认,正常机体内促炎和抗炎细胞因子处于平衡状态,UC时肠黏膜促炎细胞因子表达升高,而抑炎细胞因子分泌相对不足,使肠黏膜产生强烈的炎症反应,引起肠道损伤^[9-11]。近来使用TNF- α 抗体^[12]和IL-2R^[13]单抗治疗UC取得了一定效果,更证实了细胞因子在UC发病中的作用。姜黄素可以通过抑制促炎细胞因子及增加抑炎细胞因子表达而在肠道炎症中发挥抗炎作用。

Jian等^[14]采用RT-PCR测定三硝基氯苯(TNBS)诱导的小鼠结肠炎的结肠组织中IL-1 β mRNA和IL-10 mRNA的表达,发现经姜黄素治疗后结肠组织中IL-1 β mRNA的表达显著地被抑制,而IL-10 mRNA表达增加,肠道的炎症反应减轻,表明姜黄素可以调节炎症因子的释放而在UC中发挥抗炎作用。Arafa等^[15]使用姜黄素100 mg/(kg·d)预防性保护葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的鼠UC,发现小鼠肠道的TNF- α 表达较模型组明显下降,而脂质过氧化的产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的表达水平下降,可见姜黄素可以调节炎症因子TNF- α 等的释放,调整氧化剂与抗氧化剂的平衡,对DSS诱导的鼠UC有预防性的保护作用。Zhang等^[16]使用姜黄素治疗TNBS诱导的鼠结肠炎,用流式细胞仪测定细胞因子的表达,发现姜黄素降低了Th1细胞因子(IL-12、TNF- α 、IL-1)的表达,增加了Th2细胞因子(IL-4、IL-10)在肠黏膜的表达,且改善了肠道病理图像,对鼠结肠炎具有治疗作

用。Epstein等^[17]将来自于儿童和成人UC活检的肠道黏膜与姜黄素一起进行半体内培养,使用ELISA测量IL-1 β 、IL-10的表达,通过免疫印迹测量p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)MAPK活性,发现肠黏膜p38 MAPK的活性降低,IL-10表达增加,而IL-1 β 表达下降,这进一步证明姜黄素可以通过调节细胞因子释放而在UC中发挥抗炎作用。

1.2 姜黄素抑制NF- κ B信号通路

1.2.1 NF- κ B与UC: 细胞因子在UC中的发病作用已得到公认,而这些细胞因子均含有NF- κ B的结合位点,TNF- α 、IL-1等可促进NF- κ B活化^[18,19],而NF- κ B活化后能促进多种促炎因子TNF- α 、IL-6、INF- γ 等的表达,使炎症反应放大和持续,导致了黏膜的炎症反应及肠道的组织损害,诱导了UC的发生^[20]。NF- κ B活化所需要的中心激酶IKK- γ (I κ B kinase-gamma)或IKK的其他亚基如IKK- α 、IKK- β 的缺失及NF- κ B p65的缺失都会导致小鼠自发的严重的肠道炎症^[21,22]。NF- κ B信号通路在肠道的免疫稳态中具有重要作用。有研究通过免疫组织化学测定UC患者病变黏膜组织NF- κ B的表达,发现UC患者的NF- κ B表达水平较对照组显著提高,提示NF- κ B在UC的发病中居重要地位^[23]。Gan等^[24]研究发现UC患者肠道活检组织中NF- κ B p65水平明显高于对照组,且肠黏膜组织IL-1 β mRNA和IL-8 mRNA表达比对照组明显升高,并与NF- κ B DNA结合活性成正相关,表明NF- κ B是UC细胞因子释放的关键调控因素。

1.2.2 姜黄素与NF- κ B信号通路: 姜黄素可以通过抑制I κ B的降解及IKK上游的通道信号而阻断细胞因子诱导的NF- κ B的激活及致炎因子的表达,从而减轻肠道炎症反应。Deguchi等^[25]研究发现DSS诱导的小鼠UC,经姜黄素治疗后肠黏膜细胞NF- κ B活性被抑制了。小鼠体质量减轻不明显,疾病活动指数、组织学评分、髓过氧化物酶活性都降低,黏膜水肿、细胞浸润、上皮破坏都明显减轻,其机制可能是通过抑制NF- κ B活性而减轻结肠炎症。Venkataranganna等^[26]使用25、50、100 mg/(kg·d)姜黄素治疗二硝基氯苯诱导的鼠结肠炎,发现经姜黄素治疗的小鼠肠道长度缩短,体质量下降减轻,并且与姜黄素的剂量成正相关,且髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、脂质过氧化(lipid peroxide, LPO)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性都有所降低,其中100 mg/(kg·d)组的治疗作用最为

■创新盘点

本文着重从分子角度对姜黄素在UC中的抗炎作用进行阐述,综述了姜黄素通过调节细胞因子、NF- κ B、PPAR γ 及COX-2, iNOS活性而发挥抗炎作用,同时综述了姜黄素在UC中的临床研究成果。

明显, 其等效剂量相当于100 mg/kg的柳氮磺吡啶, 并且该组NF- κ B的表达下降, 姜黄素通过促进肠道的氧化应激和下调肠道NF- κ B表达而减轻肠道炎症及损害. Lubbad等^[27]通过使用姜黄素治疗TNBS诱导的鼠UC, 采用Western blot技术检测结肠组织的Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR-4), MyD88, NF- κ B蛋白含量, 发现姜黄素治疗组的结肠炎症组织中的TLR-4, MyD88, NF- κ B被抑制了, 而姜黄素对非炎症组没有影响. Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)介导NF- κ B信号传递途径, MyD88是NF- κ B信号通路传递过程中的接头蛋白, 说明姜黄素可以通过抑制TLR-4、MyD88而抑制NF- κ B的活化, 从而缓解肠道炎症. Binion等^[28]发现姜黄素通过阻止Akt、MAPK、NF- κ B信号通路而抑制了血管细胞间黏附因子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)在人类肠道微血管内皮细胞(human intestinal microvascular endothelial cells, HIMEC)中的表达, VCAM-1的表达对IBD的微血管系统有重要作用, 他在炎性细胞向炎症部位移位、活化过程中起重要作用.

1.3 姜黄素调节PPAR γ 活性

1.3.1 PPAR γ 与UC: 许多研究认为PPAR γ 通路是炎症反应信号通路之一, PPAR γ 在肠道黏膜的上皮细胞中高表达, 可能参与了UC炎症的调控^[29,30]. 肠道菌群, TLR等都参与了PPAR γ 及其抗炎机制的调节. PPAR γ 活化后可通过抑制TNF- α 及其诱导的VCAM-1, 细胞间黏附因子-1(intercellular adhesion molecule -1, ICAM-1)的表达, 而在IBD中发挥抗炎作用^[31]. PPAR γ 配体可抑制巨噬细胞活性以及iNOS和促炎因子, 如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的产生, 抑制NF- κ B活化, 故PPAR γ 可能是通过抑制NF- κ B的活化而发挥抗炎作用, 可能对炎症性肠病具有治疗作用^[32]. Shrestha等^[33]通过PCR测定UC患者与正常对照组的PPAR γ C161T基因的多态性, 得出PPAR γ C161T的多态性与中国的UC患者之间存在联系.

1.3.2 姜黄素与PPAR γ : 目前有研究认为, 姜黄素可以通过上调PPAR γ 的活性、抑制促炎细胞因子TNF- α 等的表达和释放来发挥抗炎作用^[34]. PPAR γ 在结肠黏膜的上皮细胞中高表达^[35], 因此姜黄素可能通过调节PPAR γ 活性而在UC中发挥治疗作用. Zhang等^[36]通过使用30 mg/(kg·d)的姜黄素治疗TNBS诱导的鼠UC 2 wk, 姜黄素促进了小鼠的存活率、体质量的恢复以及降低肉眼评分, PPAR γ 、15D-PGJ2和PGE2表达增加, 而对

照组地塞米松的治疗也增加了PPAR γ 表达. 15D-PGJ2是PPAR γ 的配体, 可激活PPAR γ 而抑制NF- κ B活化, 姜黄素可能通过激活PPAR γ 的活性来治疗鼠结肠炎. 有实验表明TNBS诱导的大鼠UC经姜黄素治疗后大鼠死亡率、组织学和结肠黏膜大体评分降低, 结肠组织中PPAR γ 表达增高, 而NF- κ B表达降低, 进一步证明姜黄素可激活PPAR γ 而负性调节NF- κ B表达, 从而增加抗炎因子、减少促炎因子释放, 而缓解鼠结肠炎症^[37]. 现有学者研究认为姜黄素不是PPAR γ 的配体^[38]. 因此姜黄素是否通过直接结合并激活PPAR γ 发挥抗炎作用, 或是通过作用于其受体激活某些信号通路, 导致PPAR γ 表达上调和细胞因子表达受抑, 尚需进一步研究.

1.4 姜黄素下调COX-2, iNOS活性 COX-2, iNOS为两种诱生型酶, 静息状态下不表达, 当细胞接受各种刺激, 如TNF- α 、IL-1 β 刺激后表达大量增加, 参与UC的炎症及损伤过程. 有研究表明UC患者肠黏膜内COX-2和PPAR γ 表达成显著负相关^[39]. COX-2的代谢产物15D-PGJ2是PPAR γ 的配体, COX-2的表达增加导致15D-PGJ2增加, 激活PPAR γ 而抑制NF- κ B活化和MAPK通路, 进而抑制COX-2及促炎细胞因子^[40]. iNOS启动子含有NF- κ B应答元件, 炎症反应时细胞因子水平增高, 激活NF- κ B并与iNOS启动子上的特异 κ B序列结合, 调节iNOS活性, 从而调节NO的产量, 导致UC黏膜损伤.

Jiang等^[41]通过使用姜黄素30 mg/(kg·d)的剂量治疗TNBS诱导的UC, 大鼠的生存率、病理图像和肉眼评分都得到改善, 并且通过RT-PCR和Western blot检测肠道黏膜COX-2表达, 使用RT-PCR检测细胞因子表达, 通过ELISA检测前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2), 发现经姜黄素治疗后鼠肠道黏膜的COX-2和细胞因子的表达下降而PGE2的表达上升, 姜黄素可能通过抑制COX-2而发挥抗炎作用. Camacho-Barquero等^[42]使用50-100 mg/(kg·d)的姜黄素治疗TNBS诱导的鼠UC, 使用Western blot及免疫组织化学测量结肠组织中COX-2、iNOS及细胞因子的表达, 发现经姜黄素治疗后结肠组织中的COX-2、iNOS、细胞因子表达下降, p38 MAPK信号通路被抑制, 肠道炎症减轻. 姜黄素可能通过抑制p38 MAPK而下调COX-2、iNOS表达. 此外, 姜黄素还能抑制炎症调节因子NF- κ B、COX-2、iNOS, 在肠道疾病、肿瘤、呼吸系统疾病等方面具有预防和治疗价值^[43].

■应用要点

通过阐述姜黄素在分子水平对UC的抗炎机制及其临床研究, 为姜黄素治疗UC提供了有力的证据, 表明姜黄素有很好的应用前景, 有望开发成为治疗UC的新药.

■名词解释

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK): 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 分为 ERK、JNK、p38 3条通路, MAPK 通过磷酸化而激活下游激酶和转录因子, 在炎症反应中具有重要作用, 阻断这条通路可减少细胞因子的产生、影响NF- κ B活性, 进而减轻炎症反应。

2 姜黄素对UC的临床疗效的研究

Hanai等^[44]对89个被诊断为静止期UC的患者使用姜黄素进行随机、双盲、多中心治疗, 以阻止疾病复发。45个患者接受姜黄素和柳氮磺吡啶或氨基水杨酸治疗, 姜黄素剂量为早晚餐后各1 g; 44例患者接受安慰剂和柳氮磺吡啶或氨基水杨酸治疗, 一共治疗6 mo, 并进行6 mo的随访, 期间进行临床活动指数和内镜指数评分。接受姜黄素治疗组的患者在6 mo后复发率为4.65%, 而接受安慰剂组治疗的患者复发率为20.5%, 两者复发率有显著性差异($P = 0.049$), 同时姜黄素改善了患者的临床活动指数和内镜指数的评分, 表明姜黄素是一种能够缓解静止期UC患者复发的安全、有效的用药, 具有很好的治疗前景。姜黄素的临床I期实验研究显示使用姜黄素(12 g/d)3 mo, 对人类无明显毒性, 其他的临床试验也证实了姜黄素对家族性腺瘤性息肉病、胰腺炎、胰腺癌、肠道肿瘤等消化系统疾病具有潜在的治疗价值^[3]。姜黄素的临床研究取得了一定成效, 但是目前的临床研究资料相对较少, 仍需大量的临床研究来评估其临床潜力。

3 结论

细胞因子、NF- κ B、PPAR γ 以及COX-2, iNOS之间关系复杂, 细胞因子可能为NF- κ B、PPAR γ 、COX-2、iNOS直接或间接的共同诱导物, 而NF- κ B与PPAR γ 、NF- κ B与iNOS、PPAR γ 与COX-2在炎症反应中联系紧密。应进一步研究他们之间的相互关系及确切的信号转导通路, 为UC的发病机制、临床诊断及治疗提供更多的依据。姜黄素作为姜黄属植物的天然提取物, 具有来源广泛、价格低廉、安全性高、无毒等优点。近年来的研究证实姜黄素具有强大的抗炎作用和良好的应用前景, 有望成为治疗UC的新药^[45]。但是姜黄素的抗炎机制复杂, 目前为止仍未系统、明确地了解, 有必要进行深入、广泛的研究。

4 参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005: 186
- 2 Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM. Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 127-148
- 3 Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 787-809
- 4 Giri B, Gomes A, Sengupta R, Banerjee S, Nautiyal J, Sarkar FH, Majumdar AP. Curcumin synergizes the

growth inhibitory properties of Indian toad (*Bufo melanostictus* Schneider) skin-derived factor (BM-ANF1) in HCT-116 colon cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29: 395-401

- 5 中华医学分会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
- 6 Endo K, Shiga H, Kinouchi Y, Shimosegawa T. [Inflammatory bowel disease: IBD] *Rinsho Byori* 2009; 57: 527-532
- 7 Matricon J. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease] *Med Sci (Paris)* 2010; 26: 405-410
- 8 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- 9 Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4280-4288
- 10 Polńska B, Matowicka-Karna J, Kemon H. [The cytokines in inflammatory bowel disease] *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63: 389-394
- 11 Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5784-5788
- 12 Wilhelm SM, McKenney KA, Rivait KN, Kale-Pradhan PB. A review of infliximab use in ulcerative colitis. *Clin Ther* 2008; 30: 223-230
- 13 Creed TJ, Probert CS, Norman MN, Moorghe M, Shepherd NA, Hearing SD, Dayan CM. Basiliximab for the treatment of steroid-resistant ulcerative colitis: further experience in moderate and severe disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1435-1442
- 14 Jian YT, Wang JD, Mai GF, Zhang YL, Lai ZS. [Modulation of intestinal mucosal inflammatory factors by curcumin in rats with colitis] *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2004; 24: 1353-1358
- 15 Arafa HM, Hemeida RA, El-Bahrawy AI, Hamada FM. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1311-1317
- 16 Zhang M, Deng CS, Zheng JJ, Xia J. Curcumin regulated shift from Th1 to Th2 in trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1071-1077
- 17 Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1 β and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br J Nutr* 2010; 103: 824-832
- 18 Li H, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. *Cytokine* 2008; 41: 1-8
- 19 Yamazaki K, Gohda J, Kanayama A, Miyamoto Y, Sakurai H, Yamamoto M, Akira S, Hayashi H, Su B, Inoue J. Two mechanistically and temporally distinct NF- κ B activation pathways in IL-1 signaling. *Sci Signal* 2009; 2: ra66
- 20 Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF- κ B in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; 263: 591-596
- 21 Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal

- nal inflammation. *Nature* 2007; 446: 557-561
- 22 Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 92-99
 - 23 刘一品, 李延青. 核因子- κ B的表达在溃疡性结肠炎发病机制中的意义. *胃肠病学* 2006; 11: 103
 - 24 Gan H, Ouyang Q, Jia D, Xia Q. [Activation of nuclear factor-kappaB and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients] *Zhonghua Neike Zazhi* 2002; 41: 252-255
 - 25 Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Araki Y, Hata K, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2993-2998
 - 26 Venkataranganna MV, Rafiq M, Gopumadhavan S, Peer G, Babu UV, Mitra SK. NCB-02 (standardized Curcumin preparation) protects dinitrochlorobenzene-induced colitis through down-regulation of NFkappa-B and iNOS. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1103-1107
 - 27 Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem* 2009; 322: 127-135
 - 28 Binion DG, Heidemann J, Li MS, Nelson VM, Otterson MF, Rafiee P. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by PI 3-kinase/Akt/MAPK/NF-kappaB: inhibitory role of curcumin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G259-G268
 - 29 Riccardi L, Mazzon E, Bruscoli S, Esposito E, Crisafulli C, Di Paola R, Caminiti R, Riccardi C, Cuzzocrea S. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha modulates the anti-inflammatory effect of glucocorticoids in a model of inflammatory bowel disease in mice. *Shock* 2009; 31: 308-316
 - 30 Rousseaux C, Desreumaux P. [The peroxisome-proliferator-activated gamma receptor and chronic inflammatory bowel disease (PPARgamma and IBD)] *J Soc Biol* 2006; 200: 121-131
 - 31 Sasaki M, Jordan P, Welbourne T, Minagar A, Joh T, Itoh M, Elrod JW, Alexander JS. Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol* 2005; 5: 3
 - 32 Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82
 - 33 Shrestha UK, Karimi O, Crusius JB, Zhou F, Wang Z, Chen Z, van Bodegraven AA, Xiao J, Morré SA, Wang H, Li J, Xia B. Distribution of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma polymorphisms in Chinese and Dutch patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 312-319
 - 34 Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR-gamma Activation. *PPAR Res* 2007; 2007: 89369
 - 35 Wang Q, Herrera-Ruiz D, Mathis AS, Cook TJ, Bhardwaj RK, Knipp GT. Expression of PPAR, RXR isoforms and fatty acid transporting proteins in the rat and human gastrointestinal tracts. *J Pharm Sci* 2005; 94: 363-372
 - 36 Zhang M, Deng C, Zheng J, Xia J, Sheng D. Curcumin inhibits trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1233-1242
 - 37 杨彩虹, 吴正祥, 吴强, 杨枫, 姚霞, 葛相栓. 姜黄素通过过氧化物酶体增生物激活受体- γ 在大鼠实验性结肠炎中发挥抗炎作用. *胃肠病学* 2008; 13: 149-153
 - 38 Narala VR, Smith MR, Adapala RK, Ranga R, Panati K, Moore BB, Leff T, Reddy VD, Kondapi AK, Reddy RC. Curcumin is not a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Gene Ther Mol Biol* 2009; 13: 20-25
 - 39 谢勇, 周南进, 周小江, 陈江, 朱俊, 吕农华, 王崇文. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜内过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和环氧合酶-2的表达及意义. *中华消化杂志* 2007; 27: 770-771
 - 40 Yeo M, Hahm KB. [Role of COX-2 and PPAR in gastric carcinogenesis] *Korean J Gastroenterol* 2004; 44: 53-56
 - 41 Jiang H, Deng CS, Zhang M, Xia J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3848-3853
 - 42 Camacho-Barquero L, Villegas I, Sánchez-Calvo JM, Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 333-342
 - 43 Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 45-51
 - 44 Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1502-1506
 - 45 Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 2087-2094

■同行评价

本文思路清晰, 综述较全面, 具有一定的可读性。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

胰腺细胞中与HCV NS2蛋白相互作用蛋白中代谢相关基因的筛选

吴扬, 张锦前, 宁明

■背景资料

目前, 随着中国经济迅速发展, 人们生活水平的不断提高, 生活及饮食结构的迅速改变, 2型糖尿病的发病率逐年上升, 2型糖尿病已成为严重威胁人类健康的社会公共问题, 而糖尿病与慢性肝病(尤其是慢性乙、丙型肝炎)密切相关。

吴扬, 宁明, 清华大学第一附属医院 北京市 100016
张锦前, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100015
国家自然科学基金资助项目, No. 30600524
作者贡献分布: 此课题由张锦前设计; 研究过程由吴扬与张锦前操作完成; 数据分析由吴扬与张锦前完成; 本论文写作由吴扬、张锦前及宁明完成。
通讯作者: 宁明, 副主任医师, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院. ningming1956@yahoo.cn
电话: 010-64308585
收稿日期: 2010-05-27 修回日期: 2010-07-10
接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-28

Screening of proteins binding to hepatitis C virus NS2 protein from a human pancreas cDNA library

Yang Wu, Jin-Qian Zhang, Ming Ning

Yang Wu, Ming Ning, the First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China
Jin-Qian Zhang, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100016, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600524
Correspondence to: Ming Ning, the First Hospital of Tsinghua University, 6 Yijiefang, Jiuxianqiao, Chaoyang District, Beijing 100016, China. ningming1956@yahoo.cn
Received: 2010-05-27 Revised: 2010-07-10
Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To screen proteins interacting with hepatitis C virus (HCV) NS2 protein from a human pancreas cDNA library.

METHODS: A human pancreas cDNA library was amplified, purified and identified. The purified library plasmid was transformed into yeast strain Y187. The bait plasmid pGBKT7-NS2 was transformed into yeast strain AH109 and screened on SD/-Trp agar plates. The transformed AH109 strain was then mated with Y187 strain that contained the library plasmid. The diploid yeast cells were selected on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade and SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade agar plates containing X- α -gal. The plasmid in diploid yeast cells was extracted and electro-transformed into *E.coli* DH5 α strain for plasmid

preparation, sequencing and sequence blasting.

RESULTS: A human pancreas cDNA library was constructed successfully. The reconstructed bait plasmid (pGBKT7-HCV NS2) was successfully transformed into yeast strain AH109. Seven proteins interacting with the HCV NS2 protein were identified.

CONCLUSION: Seven proteins interacting with the HCV NS2 protein is identified from a human pancreas cDNA library, some of which may be related with glucose and lipid metabolism.

Key Words: Pancreas; Hepatitis C virus; Pancreas cDNA library; Yeast two-hybrid system

Wu Y, Zhang JQ, Ning M. Screening of proteins binding to hepatitis C virus NS2 protein from a human pancreas cDNA library. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2574-2578

摘要

目的: 研究人胰腺细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)包膜糖蛋白NS2相互作用的结合蛋白中的代谢相关基因。

方法: 扩增人胰腺细胞cDNA文库并进行纯化鉴定, 将文库质粒转化酵母菌株Y187. 诱饵质粒pGBKT7-NS2转化酵母菌株AH109, 在色氨酸缺陷型培养基(SD/-Trp)上筛选阳性菌落. 应用酵母双杂交系统3将阳性重组AH109菌株与重组酵母菌株Y187进行配合, 在4缺培养基(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)和铺有X- α -gal的4缺培养基上进行筛选, 提取蓝色酵母菌落质粒, 电转化大肠埃希菌DH5 α 后再提取质粒测序. 测序结果进行序列比对。

结果: 成功构建人胰腺cDNA文库以及pGBKT7-HCV NS2重组质粒, 筛选出7种与HCV NS2蛋白相结合的蛋白基因。

结论: 筛选出的与HCV NS2蛋白结合的部分人胰腺细胞蛋白基因与糖、脂类代谢密切相关。

■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院
分子医学中心

关键词: 胰腺细胞; 丙型肝炎病毒; 胰腺细胞cDNA文库; 酵母双杂交

吴扬, 张锦前, 宁明. 胰腺细胞中与HCV NS2蛋白相互作用蛋白中代谢相关基因的筛选. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2574-2578
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2574.asp>

0 引言

目前, 随着中国的经济迅速发展, 人们生活水平的不断提高, 生活及饮食结构的迅速改变, 2型糖尿病的发病率逐年上升, 据杨文英教授最新流行病学调查, 2007-2008年中国2型糖尿病发病率高达9.7%, 而糖耐量受损达15.5%^[1]. 2型糖尿病已成为严重威胁人类健康的社会公共问题, 而糖尿病与慢性肝病又有着密切关系, Trombetta等^[2]综合报道后发现, 肝硬化患者同时患有2型糖尿病的几率为12.3%-57.0%. Knobler等^[3]报道, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是肝病患者发生糖尿病的独立危险因素. 糖尿病患者中发现合并肝病的患者亦高于普通人群, 一项涉及13个中心的5 003例糖尿病患者, 98%的患者是脂肪肝和慢性肝炎, 目前糖尿病病因还尚未明确, 2008年美国糖尿病学会定义糖尿病是一组由于胰岛素分泌缺陷, 或胰岛素作用缺陷, 或两者兼之所引起的以高血糖为特征的代谢性疾病. 2型糖尿病与肥胖、高脂血症、高血压病、心血管系统疾病以及结肠癌、肾癌、胰腺癌和肝细胞癌等有关, 以中心性肥胖和胰岛素抵抗为重要致病因素, 主要病理生理基础是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR). Park等^[4]研究了HCV感染患者的胰岛素敏感性改变, 得出了HCV感染是发展为IR的独立危险因素. 有相关研究报道, HCV感染与糖尿病、移植后糖尿病、地中海贫血患者伴发的糖尿病或糖代谢异常均有相关性^[5]. 而且, 脂肪肝的存在与慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的疾病进展有关^[6]. 另外, Mason等^[7]指出HCV感染与糖尿病(diabetes mellitus, DM)密切相关. Parolin等^[8]研究了HCV与2型糖尿病的流行病学关系, 也发现2型糖尿病中HCV发病率高. HCV包膜糖蛋白NS2是一种多功能蛋白质, 与HCV感染的慢性化和抗病毒免疫关系密切. 因此我们应用酵母双杂交技术筛选人胰腺细胞cDNA文库中的HCV NS2结合蛋白基因, 为研究HCV慢性感染与2型糖尿病、IR之间的相关性及其作用机制, 以及影响糖、脂类代谢的分子生物学机制提供

重要信息.

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂及培养基: YPDA SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His以及SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基均购自美国Clontech公司. 酵母双杂交系统3试剂盒: 其中包括人胰腺细胞cDNA文库、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-BD克隆载体、pGADT7-T对照质粒、pGBKT7-53对照质粒、酵母菌株AH109及酵母菌株Y187, 购自美国Clontech公司. 引物合成由北京奥科生物技术公司完成.

1.2 方法

1.2.1 酵母胰腺细胞cDNA文库的构建: 按试剂盒说明书对文库进行扩增, 纯化文库质粒后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 随机挑取6个单克隆提取质粒, *Eco*R I、*Xho* I 双酶切鉴定cDNA文库的多样性. 然后将该文库转化酵母菌株Y187, 制备酵母胰腺细胞cDNA文库. 提取新鲜生长的Y187酵母菌落(直径>2 mm)接种于150 mL YPDA液体培养基中, 30 °C振荡培养至 A_{600} >1.5时, 将该培养物转移至850 mL YPDA液体培养基中, 30 °C振荡培养至 A_{600} = 0.4-0.6. 以醋酸锂法将胰腺细胞cDNA文库质粒(0.25 mg)转化入酵母菌株Y187进行文库转化, 然后将转化物铺SD/-Leu板50块, 30 °C倒置温育7 d. 同时将转化产物按1:10、1:10²、1:10⁴、1:10⁶和1:10⁸分别铺于SD/-Leu培养基上检验转化效率. 同时将pGADT7-AD和pGADT7-T对照质粒转化酵母菌株Y187.

1.2.2 诱饵质粒转化酵母菌株及其鉴定: HCV NS2蛋白的酵母表达载体pGBKT7-HCV NS2由北京地坛医院传染病研究所构建, 醋酸锂法转入酵母菌株AH109. 转化后铺板于SD/-Trp固体培养基进行筛选, 对直径>2 mm的菌落随机挑取进行菌落PCR鉴定. 同时将pGBKT7-BD和pGBKT7-53对照质粒转化酵母菌株AH109.

1.2.3 pGBKT7-HCV NS2质粒转化的酵母菌株AH109与胰腺细胞cDNA文库质粒转化的酵母菌株Y187的配合: 挑取新鲜生长的经菌落PCR鉴定正确的AH109酵母菌落(直径>2 mm), 接种于SD/-Trp液体培养基中, 30 °C振荡至 A_{600} 为0.8-1.0. 重悬于50 mL 2×YPDA培养基中, 与4 mL含胰腺细胞cDNA文库的酵母细胞于摇床中30 °C 45 r/min(离心半径为5 mm)振荡培养配合24 h. 观察到三叶草状的二倍体细胞后, 将其重

■研发前沿

HCV包膜糖蛋白NS2是一种多功能蛋白质, 与HCV感染的慢性化和抗病毒免疫关系密切. 因此HCV NS2结合蛋白基因, 成为研究HCV慢性感染与2型糖尿病、胰岛素抵抗(IR)之间相关性及其作用机制的热点, 这将为研究影响糖、脂类代谢的分子生物学机制提供更广阔的思路.

■相关报道

Mason等指出HCV感染与糖尿病(DM)密切相关. Parolin等研究了HCV与2型糖尿病的流行病学关系, 也发现2型糖尿病中HCV发病率高.

■创新盘点

本研究在胰腺细胞cDNA文库中筛选出HCV NS2的结合蛋白,从中筛选出代谢相关基因并进一步验证其相互作用,为研究CHC患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制提供了新的研究思路 and 方向.相关工作在国内外研究领域均未见报道.

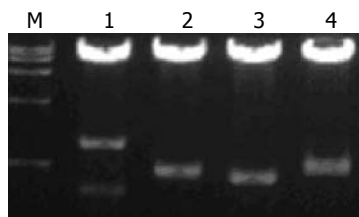


图1 部分文库质粒鉴定. M: DNA Marker; Lane 1-4为部分文库质粒BglII酶切鉴定结果.

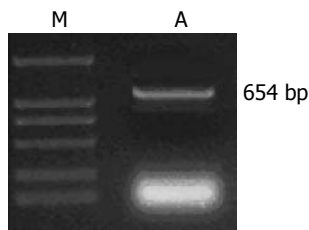


图2 PCR鉴定pGBKT7-HCV NS2质粒转化AH109酵母菌株后的菌落. M: DNA Marker; A: pGBKT7-HCV NS2质粒转化AH109酵母菌株后的单克隆菌株.

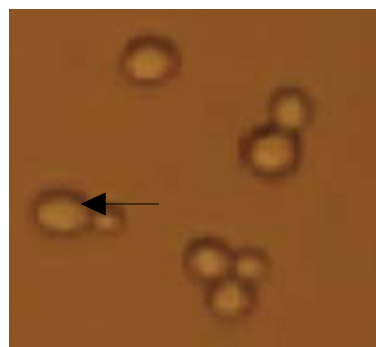


图3 显微镜示三叶草状二倍体酵母细胞($\times 40$).

表1 阳性克隆测序后比对结果

序号	已知同源序列编码蛋白的基因	相同克隆数	同源性(%)
1	人弹性蛋白酶3A	5	100
2	人胰凝乳蛋白酶原B1	3	100
3	人淀粉酶 $\alpha 2B$	2	99
4	人胰脂肪酶	2	99
5	人弹性蛋白酶2A	1	100
6	人辅脂肪酶	1	98
7	人胆盐刺激酯酶	1	98

悬于10 mL 0.25 $\times$ YPDA培养基中,然后铺SD/-Trp/-Leu/-His平板和SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade平板各25块,置30 $^{\circ}$ C温箱培养.同时将配合产物按1:10、1:10²和1:10³分别铺于SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp、SD/-Leu培养基上检验配合效率.生长16 d后把直径>2 mm的菌落画线于铺有X- α -gal的SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上,在此培养基上生长的蓝色菌落为阳性菌落.同时设立阳性对照和阴性对照,阳性对照为pGADT7-T质粒转化的酵母菌株Y187与pGBKT7-53质粒转化的酵母菌株AH109配合;阴性对照为pGBKT7-BD质粒转化的酵母菌株AH109与胰腺细胞文库质粒转化的酵母菌株Y187配合、pGBKT7-HCV NS2质粒转化的酵母菌株AH109、胰腺细胞cDNA文库质粒转化的酵母菌株Y187.

1.2.4 阳性质粒的分析:于SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade固体培养基上挑取阳性菌落,于摇床中30 $^{\circ}$ C, 250 r/min(离心半径为5 mm)振摇5 d后用酸化玻璃珠法提取酵母质粒.电穿孔法将提取的质粒转化DH5 α ,并于含氨苄西林的LB平板上培养,所获得菌落质粒用BglII酶切鉴定后测序,测序结果与GenBank中的序列进行比对分析.

2 结果

2.1 酵母胰腺细胞cDNA文库的构建及其鉴定 待转化的胰腺cDNA文库滴度在5 $\times 10^7$ CFU/mL左右时,纯化后的质粒DNA浓度约为0.32 g/L.随机挑取文库菌落,提取质粒,用BglII酶切鉴定胰腺细胞cDNA文库的多样性,结果显示插入片段大小不一,说明文库具有良好的多样性(图1).胰腺细胞cDNA文库转化酵母菌株Y187后,检验转化效率,确定其滴度>1 $\times 10^6$ CFU/mL,胰腺细胞

cDNA文库转化成功.

2.2 pGBKT7-HCV NS2质粒转化AH109酵母菌株 用醋酸锂法转化酵母细胞后在缺陷型SD-Trp培养基上筛选生长培养4 d后,挑取菌落,PCR扩增HCV NS2基因,结果显示转化成功(图2).

2.3 胰腺细胞cDNA文库转化的酵母菌株Y187与pGBKT7-HCV NS2质粒转化的AH109酵母菌株配合 酵母双杂交系统3筛选与HCV NS2结合的胰腺蛋白,配合时观察到了三叶草状二倍体酵母细胞(图3).

2.4 阳性质粒的分析 筛选出的胰腺细胞cDNA文库质粒测序与同源性分析,初步结果共筛选出15个阳性克隆,其测序结果与基因库进行同源序列比对,发现HCV NS2蛋白与7种人类基因表达蛋白可能存在相互作用(表1).阴性对照无酵母菌落生长,阳性对照可见酵母菌落生长.

3 讨论

目前我国丙型肝炎抗体阳性率为3.2%,而糖尿病患者群的丙型肝炎患病率4.2%,有报道,丙型肝炎患者比乙型肝炎患者更易患糖尿病(21% vs 10%),提示不是肝病本身而是HCV与糖尿病的发病密切相关.近期有研究提示,HCV的核心蛋白影响胰岛素底物相关的信号转导过程;脂肪

肝患病率在HCV3型丙型肝炎中不成比例地显著升高,可能与IR相关;国内外研究证实CHC发病机制之一是肝脏脂肪变性, HCV与MS密切相关, 肝脏脂肪变性及IR可能是HCV致代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的中心环节^[9,10]。2型糖尿病和脂肪肝是MS的部分表现, 且大都存在IR, IR使胰岛 β 细胞代偿性增加, 胰岛素分泌并促使胰岛 β 细胞功能逐步衰退, 导致糖耐量异常和2型糖尿病, 而糖、脂代谢异常也会加重IR, 三者之间关系密切、互为因果、也可能相互促进, 其中IR可能是中心环节, 提示CHC也是一种代谢性疾病^[11]。因此IR被广泛认为是MS发病的核心, 与糖代谢、脂代谢、高血压、肥胖等密切相关。由此, 我们认为HCV慢性感染可能与MS密切相关。

目前, HCV感染引起的肝脏脂肪变的分子生物学机制尚无定论, 但是推测HCV的结构蛋白和非结构蛋白干扰肝脏细胞脂类代谢, 甚至HCV RNA与肝细胞脂类代谢物质的结合, 都可能是肝脏脂肪变形成的主要原因^[12,13]。王琳等^[14]运用酵母双杂交技术证实HCV核心蛋白可与肝细胞中的载脂蛋白Apo-A1结合, 他们的结合可能会影响Apo-A1的结构以及其脂质转运的功能, 进而影响脂类的代谢过程。通过对重组的E1/E2包膜蛋白与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)结合的分子特性进行研究, 认为HCV进入血液后与脂滴结合形成复合物, 通过LDL受体进入肝脏, 进行复制, 其产物与肝细胞中合成的载脂蛋白相互作用影响脂肪代谢, 形成脂肪肝等表现^[15,16]。

酵母双杂交系统是近年来新发展的分析蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用的一种有效的分析方法, 为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法。酵母双杂交系统3中有3个表达基因进行筛选及作为严格的对照, 且在增加报告基因的基础上, 利用 α 型和 α 型酵母配合形成的二倍体细胞内, 诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可相互作用的原理, 解决了共转染两种质粒所带来的低效率问题, 并将真阳性率提高至95%以上, 而假阳性率在5%以下, 增大了结果的可靠性。我们选择以HCV NS2作为酵母双杂交的诱饵蛋白, 从人胰腺细胞cDNA文库中筛选与其相互作用的蛋白基因, 寻找其中与糖、脂代谢相关的蛋白

基因, 为相关的机制研究奠定基础。

我们将胰腺细胞cDNA文库质粒扩增后成功转化酵母菌株Y187, 成功构建酵母胰腺细胞cDNA文库, 以备进一步更广泛的酵母双杂交筛选工作使用。成功构建pGBKT7-HCV NS2诱饵质粒, 在酵母菌株AH109中表达HCV NS2蛋白, 并进一步与前述构建好的酵母胰腺细胞cDNA文库进行配合, 筛选出可能与HCV NS2蛋白存在相互作用的已知胰腺细胞蛋白基因7种。这些蛋白以参与3大物质消化、吸收的酶类为主, 其中参与糖、脂代谢的酶主要有胰蛋白酶(原)、胆盐刺激酯酶、弹性蛋白酶和辅脂肪酶。另外实验发现, 胰凝乳蛋白酶原B1前体是胰凝乳蛋白酶的前体, 在小肠中受到胰蛋白酶的分解, 可转变成具有活性的胰凝乳蛋白酶, 主要分解多肽链中的芳香族氨基酸; 羧肽酶B主要分解碱性氨基酸, 其活性与锌有关。同时还发现, 人类v-Ki-ras2鼠Kirsten肉瘤病毒致癌基因同源物(KRAS)蛋白也可以与HCV NS2蛋白相互作用, KRAS在人类正常组织的增殖、分化和凋亡中有着非常重要的作用。有研究表明, HCV可在胰腺细胞中复制, HCV NS2在胰腺细胞中与前述这些蛋白结合后可能会影响他们的结构和功能, 从而影响糖、脂代谢过程。

根据此项研究, 我们认为, 2型糖尿病可能与HCV感染有关, 我们应用经典的验证蛋白质-蛋白质相互作用的酵母双杂交方法, 在胰腺细胞cDNA文库中筛选出HCV NS2结合蛋白, 为研究CHC患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制提供了研究依据和方向。为临床工作中相关疾病的诊治提供新思路。根据本研究结果, 我们推测HCV NS2可能与胰腺细胞中的蛋白结合后进一步导致IR和糖、脂代谢异常, 最终发展为2型糖尿病、脂肪肝和MS等代谢性疾病。

4 参考文献

- 1 Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, Shan Z, Liu J, Tian H, Ji Q, Zhu D, Ge J, Lin L, Chen L, Guo X, Zhao Z, Li Q, Zhou Z, Shan G, He J. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med* 2010; 362: 1090-1101
- 2 Trombetta M, Spiazzi G, Zoppini G, Muggeo M. Review article: type 2 diabetes and chronic liver disease in the Verona diabetes study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 24-27
- 3 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 1: S55-S60
- 4 Park SK, Cho YK, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI. Change of insulin sensitivity

■应用要点

本研究应用酵母双杂交技术筛选人胰腺细胞cDNA文库中的HCV NS2结合蛋白基因, 为研究HCV慢性感染与2型糖尿病、IR、肝脏脂肪变性之间的相关性及其作用机制奠定了实验研究基础, 提供了崭新的研究思路 and 方向, 为临床工作中相关疾病的诊断及治疗提供新方法。

■同行评价

本文选题新颖, 数据可靠, 有系统的分析和科学的结论, 有一定的科学性和可读性。

- in hepatitis C patients with normal insulin sensitivity; a 5-year prospective follow-up study variation of insulin sensitivity in HCV patients. *Intern Med J* 2010; 40: 503-511
- 5 Saliba F, Lakehal M, Pageaux GP, Roche B, Vanlemmens C, Duvoux C, Dumortier J, Salamé E, Calmus Y, Maugendre D. Risk factors for new-onset diabetes mellitus following liver transplantation and impact of hepatitis C infection: an observational multicenter study. *Liver Transpl* 2007; 13: 136-144
- 6 Soresi M, Tripi S, Franco V, Giannitrapani L, Alessandri A, Rappa F, Vuturo O, Montalto G. Impact of liver steatosis on the antiviral response in the hepatitis C virus-associated chronic hepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 1119-1125
- 7 Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 328-333
- 8 Parolin MB, Réa R, Vargas RM, de Almeida AC, Baldanzi GR, Lopes RW. [Prevalence of hepatitis C infection in patients with type 2 diabetes mellitus] *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 77-80
- 9 Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: Implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33: 145-150
- 10 Douglas MW, George J. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4356-4364
- 11 张锦前, 范小玲. 慢性丙型肝炎与代谢综合征. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3482-3486
- 12 Cortez-Pinto H. Concluding remarks: metabolic syndrome, liver and HCV. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 83-85
- 13 Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, Chen LS, Wu HM, Huang CC, Yen MF, Chen TH. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10). *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 794-799
- 14 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A1结合的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1018-1021
- 15 Sanyal AJ. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C--risk factors and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 48-51
- 16 Yoon EJ, Hu KQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int J Med Sci* 2006; 3: 53-56

编辑 曹丽鸥 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)

幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因缺失突变体的构建

韩秀萍, 展德文, 王 芑, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张 丽, 邱 炎, 李家奎, 刘纯杰

韩秀萍, 展德文, 王 芑, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张丽, 邱炎, 刘纯杰, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071

韩秀萍, 李家奎, 华中农业大学动物医学院 湖北省武汉市 430070

十一·五863“疫苗与抗体工程”重大基金资助项目, No. 2006AA02A219

十一·五国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2008BAI66B03
十一·五重大传染病专项课题基金资助项目, No. 2008ZX10004-015

作者贡献分布: 韩秀萍与展德文对此文所作贡献均等; 此课题由韩秀萍与王芑设计, 研究过程由韩秀萍、展德文、李丛胜、陶好霞、袁盛凌、张丽及邱炎操作完成; 本论文写作由韩秀萍、刘纯杰、李家奎及展德文完成。

通讯作者: 刘纯杰, 副研究员, 100071, 北京市丰台区东大街20号, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所。

liucj@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2010-02-21 修回日期: 2010-05-02

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-08-28

Construction of an $hp0596$ gene deletion mutant of *Helicobacter pylori*

Xiu-Ping Han, De-Wen Zhan, Peng Wang, Cong-Sheng Li, Sheng-Ling Yuan, Hao-Xia Tao, Li Zhang, Yan Qiu, Jia-Kui Li, Chun-Jie Liu

Xiu-Ping Han, De-Wen Zhan, Peng Wang, Cong-Sheng Li, Sheng-Ling Yuan, Hao-Xia Tao, Li Zhang, Chun-Jie Liu, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Beijing 100071, China

Xiu-Ping Han, Jia-Kui Li, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Supported by: the Major Foundation of Vaccines and Antibody Program during the 11th Five-Year Plan Period (863 Program), No. 2006AA02A219; the National Key Technologies Research and Development Program of China during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008BAI66B03; and the National Specialized Research Fund for Control of Major Infectious Diseases during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008ZX10004-015

Correspondence to: Chun-Jie Liu, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences of Chinese PLA, Beijing 100071, China. liucj@nic.bmi.ac.cn

Received: 2010-02-21 Revised: 2010-05-02

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To construct an $hp0596$ gene deletion mutant of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) to provide a basis for further study of the functions of the $hp0596$ gene.

METHODS: Two homologous arms upstream

and downstream of the $hp0596$ gene were amplified from *H. pylori* 26695 genomic DNA and cloned into a pBluescript SK II(-) vector carrying a chloramphenicol resistance cassette flanked by two FRT sites to construct a recombinant vector. The target fragment was then amplified from the recombinant vector and transformed into *H. pylori* 26695. Under antibiotic selective pressure, homologous recombination occurred between the target fragment and the genome of host strain. The recombinants were selected on chloramphenicol agar plates and identified by PCR.

RESULTS: Restriction endonuclease analyses showed that the recombinant vector (pBs-0596) was successfully constructed. An $hp0596$ gene deletion mutant of *H. pylori* 26695 was successfully obtained after identification by PCR, direct sequencing, resistance analysis, and detection of $hp0596$ expression at RNA and protein levels. After culturing for 7 generations, it was confirmed that the $hp0596$ gene deletion mutant of *H. pylori* 26695 was stable.

CONCLUSION: An $hp0596$ gene deletion mutant of *H. pylori* 26695 has been obtained successfully.

Key Words: *Helicobacter pylori*; $hp0596$ gene; Mutant

Han XP, Zhan DW, Wang P, Li CS, Yuan SL, Tao HX, Zhang L, Qiu Y, Li JK, Liu CJ. Construction of an $hp0596$ gene deletion mutant of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2579-2583

摘要

目的: 构建幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) $hp0596$ 基因缺失突变体, 为进行 $hp0596$ 基因功能研究奠定基础。

方法: 利用PCR技术, 从*H. pylori* 26695基因组分别扩增得到 $hp0596$ 基因的上游同源臂和下游同源臂, 与两端带有FRT位点的氯霉素抗性基因片段共同构建同源重组载体; 以重组载体为模板扩增打靶片段, 将其转化入*H. pylori* 26695; 在抗生素选择压力下, 打靶片段和菌体基因组发生同源重组, 通过氯霉素抗性筛选

■背景资料

$hp0596$ 是*H. pylori*特有的基因, 与目前已知的*H. pylori*毒力基因 $cagA$ 、 $urease$ 、 $vacA$ 等没有序列相似性, 他只与J99株的jhp0543、SR7791株的HP-MP1同源以及一些临床分离菌株的相似基因有同源性, 在*H. pylori*以外的生物中还未发现与其相似的基因。

■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

■相关报道

大量调查研究显示, *H. pylori* 阳性慢性胃炎患者胃黏膜组织 TNF- α 蛋白水平明显高于对照组, 而且 *H. pylori* 阳性慢性活动性胃炎患者经抗 *H. pylori* 治疗后, 胃窦黏膜组织分泌 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$).

得到带有抗性标记的重组菌.

结果: 构建的突变载体经限制性内切酶酶切分析显示, 产生的条带与预计结果完全一致. PCR方法扩增突变株 0596, cm^r 基因显示, 0596 基因已经被完全敲除, 经 DNA 测序, RNA 水平, 蛋白质水平证实筛选得到了 0596 基因缺失的 *H. pylori* 26695 Δ 0596 突变株. 连续培养 7 代后, *H. pylori* 26695 Δ 0596 突变株具有良好的稳定性.

结论: 获得了 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因缺失突变体.

关键词: 幽门螺杆菌; *hp0596* 基因; 突变体

韩秀萍, 展德文, 王凡, 李丛胜, 袁盛凌, 陶好霞, 张丽, 邱炎, 李家奎, 刘纯杰. 幽门螺杆菌 *hp0596* 基因缺失突变体的构建. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2579-2583

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2579.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种革兰氏阴性微需氧菌, 定居在胃黏膜上皮细胞间沟内及胃小凹内黏液深层中. 该菌感染呈全球性分布, 人类感染率在 50% 以上, 尤其在发展中国家, 感染率高达 80%^[1], 婴幼儿和儿童感染也很普遍. 研究表明, *H. pylori* 感染是慢性胃炎、消化性溃疡的主要病因, 并且也是诱发胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的因素之一. 机体感染 *H. pylori* 后常常导致促炎症因子的释放, 进而诱发机体发生炎症. 促炎症因子包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 和白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 等^[2]. 近期研究发现 *H. pylori* HP0596 蛋白被鉴定为一种新的毒力致病因子^[3], 他能激活 NF- κ B, 诱导机体产生 TNF- α , 增强基质细胞因子的表达, 上调 *bcl-2* 基因表达和下调 *p53* 基因表达, 而这两类因子在人类胃癌形成过程中扮演着重要的角色. 基因敲除技术是功能基因组学研究的有力工具, 即通过目的基因的缺失, 结合相应的手段分析突变体与野生株之间的差异, 以研究基因功能. 为进一步探讨 *H. pylori* 的致癌机制, 我们利用同源重组技术敲除了 *H. pylori* 26695 株的 *hp0596* 基因, 构建了幽门螺杆菌 *H. pylori* 26695 Δ 0596 缺失突变体, 为系统研究 *hp0596* 基因功能创造了条件, 也为进一步阐明 *H. pylori* 致病机制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* 国际标准菌株 *H. pylori* 26695、克隆载体 pBluescript SK II (-)、质粒 pKD3、*E. coli* DH5 α 为本实验室保存. DNA 聚合酶、限制性内切酶、dNTPs 和 DNA 连接酶购自 NEB 公司、小量质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司. 细菌基因组提取试剂盒、DNA Marker 购自天根生化试剂公司, 低分子量蛋白 Marker 为 GE 公司产品. *hp0596* 多抗由本实验室制备.

1.2 方法

1.2.1 打靶载体的构建: 根据国际标准株 *H. pylori* 26695 基因组序列, 设计两对引物 p1/p2 和 p7/p8, 并引入相应的酶切位点, 用于扩增目的基因 *hp0596* 的上游同源臂 (452 bp)、下游同源臂 (380 bp); 引物 p3/p4 扩增质粒 pKD3 上氯霉素抗性片段 (1 033 bp); 引物 p5/p6 和 p5/p8 用于鉴定目的基因两端是否丢失 (引物序列见表 1). 以 *H. pylori* 26695 基因组为模板, 用引物 p1/p2 和高保真 Pfu DNA 聚合酶扩增 *hp0596* 基因上游臂 452 bp 的片段, 即 *hp0596* 基因上游同源臂; 按照同样的方法扩增出氯霉素片段和下游同源臂; PCR 产物纯化后, 将上游臂用 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切, 氯霉素片段用 *Xho* I / *Sal* I 双酶切, 下游臂用 *Sal* I / *Bam* H I 双酶切, 他们分别与 T 载体连接, 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 具体方法参考文献 [4]. 通过蓝白斑筛选单克隆, 同时采用菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定, 初步鉴定正确的菌株送英骏公司测序. 将测序正确后的产物上游同源臂双酶切, 连接到经相同酶切的 pBluescript SK II (-) 载体上, 用化学方法转化到 *E. coli* DH5 α , 经菌落 PCR 和质粒双酶切进行鉴定后, 再将氯霉素抗性片段和下游同源臂分别双酶切, 切胶回收后连到 pBluescript SK II (-) 载体上转化 *E. coli* DH5 α , 构建出打靶载体 pBS0596, 并进行 PCR 和酶切鉴定^[5].

1.2.2 电转感受态的制备及电击转化: 参照 Yuan 等^[6] 的方法, *H. pylori* 26695 在空肠弯曲菌血琼脂生长培养基上生长, 37 °C 微需氧环境 (50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂) 下培养 48 h, 用改良布氏肉汤收集菌体 1 mL, 离心 10 min 弃上清, 用 10% 甘油重复洗涤离心 3 次 (4 °C, 6 000 r/min, 10 min), 然后将沉淀重悬于 100 μ L 10% 甘油, 4 °C 静置 10 min, 然后取 5 μ L 打靶载体质粒 pBS0596 与 48 mL 感受态混合, 将混合物加入 0.1 cm 电击杯中, 迅速将 500 mL 预冷的布氏肉汤涂于无抗空肠弯曲菌血琼脂生长培养基上, 24 h

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
P1	GGGGTACCGCATTAGAAGATGGTCGC
P2	CCGCTCGAGGATTTTCTAACACGC
P3	CCGCTCGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
P4	ACGCGTCGACATGGGAATTAGCCATGGTCC
P5	GATGGTAAGAAACTGAAGAG
P6	AAAGTCCCTATAGCCATG
P7	ACGCGTCGACCGTTCTCGCTATCGTCTGTTC
P8	CGGGATCCCTTTCAGTGCTGATGGATG

后转涂于氯霉素(20 mg/L)空肠弯曲菌血琼脂生长培养基上, 37 °C微需氧环境(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂)下培养5 d后观察转化子。

1.2.3 全菌PCR鉴定含重组质粒的转化子: 随机挑取单克隆用布氏肉汤扩增, 用1 mL的布氏肉汤收菌, 提取基因组, 用引物p1/p8进行PCR扩增鉴定, PCR反应条件为: 95 °C预变性 5 min; 然后94 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 扩增35个循环; 最后72 °C延伸 10 min^[7]。

1.2.4 *H.pylori* 26695 Δ 0596基因缺失突变株的RNA水平分析: 取敲除株*H.pylori* 26695 Δ 0596和野生株的*H.pylori* 26695单菌落, 接种到空肠弯曲菌血琼脂生长培养基中, 生长3 d后, 用1 mL的布氏肉汤收菌, 并且取1 mL培养物(约 1×10^9 CFU), 加生理盐水处理, 离心收集菌体, 500 μ L TE缓冲液重悬(终浓度为30 g/L), 然后用TRIzol提取菌体的总RNA, 具体操作按照说明书进行。得到的总RNA测定浓度后取约1 μ g作为模板, 利用随机引物反转录合成cDNA第一链, 然后再以此cDNA作为模板, 使用引物p5/p6, p5/p8进行RT-PCR分析。

1.2.5 *H.pylori* 26695 Δ 0596基因缺失突变株的全菌蛋白和免疫印迹分析: 通过PCR鉴定的菌确定在基因水平发生了重组, 取其500 μ L 3 d培养物, 4 °C, 17 000 g离心5 min, 弃上清, 再用等体积PBS洗涤3次, 最后用30 μ L PBS重悬菌体, 按照实验手册制备全菌蛋白样品, 进行SDS-PAGE电泳分析和免疫印迹分析。硝酸纤维素膜用5%脱脂奶粉室温封闭2 h; 再与HP0596兔多抗血清(1:10 000)37 °C共孵育2 h; 用PBST洗涤3次, 每次5 min, 然后与HRP标记的羊抗兔IgG抗体(1:5 000)共孵育1 h, 最后将硝酸纤维素膜用PBST洗干净后用HRP显色试剂盒进行显色。

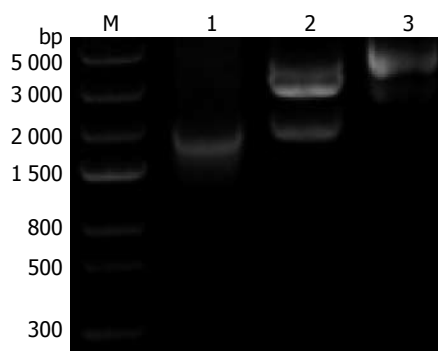


图 1 打靶突变载体的鉴定。M: DNA Marker; 1: 打靶突变载体的PCR扩增(引物p1/p8); 2: 打靶突变载体*Kpn* I /*Bam* H I 双酶切鉴定; 3: 打靶突变载体质粒pBS0596。

2 结果

2.1 打靶载体 PCR扩增上下游同源臂和抗性片段, 经琼脂糖凝胶电泳分析表明, PCR扩增出的产物与目的片段预期大小一致, 其中上游同源臂为452 bp、下游同源臂为380 bp, 氯霉素抗性片段为1 033 bp片段。打靶载体构建上述3种片段纯化后, 连接pBluescript SK II(-)载体构建打靶载体pBS0596, 双酶切实验鉴定表明, 用*Kpn* I /*Xho* I 双酶切鉴定可以得到约452 bp的上游同源臂片段, 用*Sal* I /*Bam* H I 双酶切可以得到约380 bp的下游同源臂片段, 用*Xho* I /*Sal* I 双酶切可以得到约1 033 bp的氯霉素抗性片段。同样用PCR方法鉴定表明, 将pBS0596用引物p1/p8扩增得到了约1 800 bp的片段, 打靶载体用上游同源臂起始处的*Kpn* I 和下游同源臂终结处的*Bam* H I 双酶切鉴定也得到约1 800 bp的片段(图1)。鉴定结果表明上下游同源臂均成功地连接到载体pBluescript SK II(-)上, 测序鉴定结果也说明序列完全正确。

2.2 基因的敲除及PCR鉴定 随机挑选在含氯霉素的空肠弯曲菌血琼脂平板上生长出的4个单菌落做全菌PCR鉴定(图2), 用基因上游同源臂起始处的p1引物和下游同源臂终结处的p8引物对重组转化子进行PCR鉴定。结果表明, 扩增得到两条片段。一条为约为1.5 kb的片段, 与以正常对照*H.pylori* 26695为模板扩增的片段理论长度一致。另一条约为1.8 kb, 与重组菌片段理论长度一致, 说明对应的菌株已经在基因位点发生了重组。将该1.8 kb片段克隆到T载体中, 进行克隆和测序, 结果显示该序列的上下游分别含有基因上下游同源臂的片段, 中间为氯霉素抗性基因元件, 说明在基因组水平重组成功。将新菌株命名为*H.pylori* 26695 Δ 0596。研究结果显示

■创新盘点

本文通过同源重组方法敲除*H.pylori* 26695 Δ 0596基因, 首次构建出源自幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因全部缺失的 $hp0596$ 阴性突变株, 为研究中国幽门螺杆菌 $hp0596$ 基因的生物学功能及其在毒力相关蛋白表达中的作用, 从而在明确 $hp0596$ 基因与幽门螺杆菌致病性的关系等方面奠定实验基础。

应用要点

为进一步探讨 *hp0596* 致病机制, 本研究利用同源重组技术敲除了 *H. pylori* 26695 株的 *hp0596* 基因, 构建了 *H. pylori* 26695 Δ 0596 缺失突变体。为系统研究 *hp0596* 基因功能创造了条件, 为进一步阐明 *H. pylori* 致病机制奠定基础。

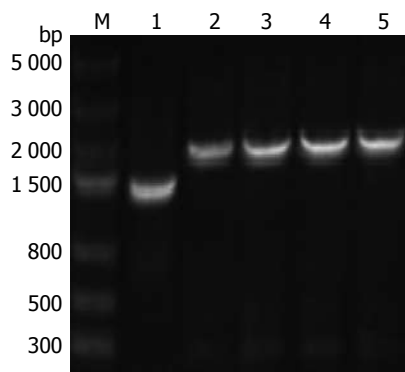


图2 重组菌的PCR鉴定。M: DNA Marker; 1: 引物p1/p8扩增 *H. pylori* 26695; 2-5: 引物p1/p8扩增 *H. pylori* 26695 Δ 0596。

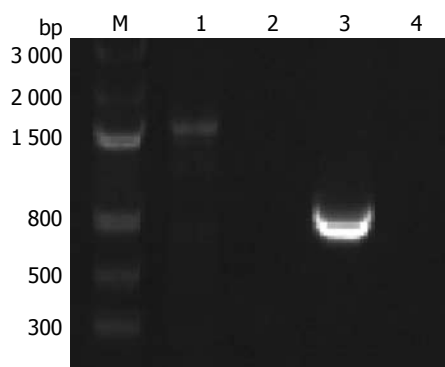


图3 重组菌的RT-PCR鉴定。M: DNA Marker; 1, 3: 以 *H. pylori* 26695 为模板; 2, 4: 以 *H. pylori* 26695 Δ 0596 为模板。1, 2: 引物p5/p8。3, 4: 引物p5/p6。

在2-5号重组克隆中克隆都得到了1.8 kb 特异性扩增带, 可见此基因打靶的克隆阳性率非常高。

2.3 *hp0596* 基因缺失突变株的RT-PCR分析 对于DNA水平鉴定为阳性菌株, 应用TRIzol提取细菌总RNA。以 *hp0596* 基因特异性的引物p5/p8和p5/p6进行RT-PCR鉴定。对于 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因完全敲除菌株, 用引物p5/p8和p5/p6扩不出条带, 而对照菌株则分别扩出一条1 500 bp 和576 bp 的条带, 实验结果说明在RNA水平上, *hp0596* 基因已经被成功敲除(图3)。

2.4 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因缺失突变株的全菌蛋白分析 将在DNA、RNA水平鉴定为阳性 *hp0596* 基因缺失的菌株(两株)进行SDS-PAGE 电泳分析, HP0596 蛋白相对分子质量大小为21.7 000 Da, 在电泳上样量大致相当的情况下, 对照菌株 *H. pylori* 26695 的HP0596 蛋白表达水平很高。而相比之下, 缺失突变株在对应位置表达的蛋白却很少几乎没有表达, 这一结果也就从蛋白水平进一步证实成功敲除 *hp0596* 基因。另外, 以HP0596 蛋白的兔多抗血清作为一抗对其

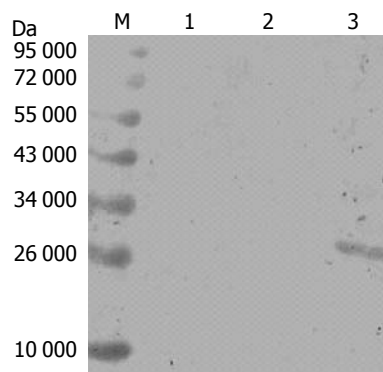


图4 Western blot检测重组突变株 *H. pylori* 26695 Δ 0596。M: 预染蛋白Marker; 1, 2: 缺失突变株 *H. pylori* 26695 Δ 0596; 3: 野生株 *H. pylori* 26695。

中两株重组菌进行免疫印迹分析也从另一个侧面证实了上述实验结果(图4)。

3 讨论

hp0596^[8] 是 *H. pylori* 特有的基因, 与目前其他已知的 *H. pylori* 其他毒力基因如 *cagA*、*urease*、*vacA* 等没有序列相似性, 他只与 *H. pylori* J99 株的 *jhp0543*、*H. pylori* SR7791 株的 HP-MP1^[9] 以及一些临床分离菌株的相似基因有同源性, 在 *H. pylori* 以外的生物中还未发现与其相似的基因。

H. pylori 定植于胃黏膜上皮表面黏液层中的中性微需氧环境中, 通过刺激上皮细胞产生细胞因子, 并促使黏膜固有层的免疫炎症细胞的聚集与活化, 造成慢性胃炎。已证实 *H. pylori* 相关的胃炎与IL-1、IL-6和TNF- α 等因子的升高有关^[10]。大量调查研究显示^[11], *H. pylori* 阳性慢性胃炎患者胃黏膜组织TNF- α 蛋白水平明显高于对照组, 而且 *H. pylori* 阳性慢性活动性胃炎患者经抗 *H. pylori* 治疗后, 胃窦黏膜组织分泌TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$)。提示 *H. pylori* 感染后, 胃窦黏膜组织TNF- α 表达升高, 并引起胃黏膜细胞损伤^[12]。这些都说明TNF- α 在慢性胃炎中起重要作用。TNF- α 过度表达诱发炎症反应, 导致出现临床胃炎症状。而 *H. pylori* 26695 菌株的基因产物HP0596 蛋白已被鉴定为TNF- α 诱发的蛋白, 与巨噬细胞共孵育可以刺激其分泌TNF- α ^[13]。

为了更好地研究HP0596 蛋白的功能, 本实验通过同源重组原理构建了 *H. pylori* 26695 Δ 0596 基因缺失突变株。利用PCR技术, 分别扩增得到目的基因的上游同源臂和下游同源臂, 与两端带有FRT位点的氯霉素抗性基因片段共同构建同源重组载体pBS0596; 以重组载体为模板扩增打靶片段, 我们采用电穿孔转化技术, 将打

靶载体pBS0596转化入*H.pylori* 26695. 在抗生素压力的帮助下, 打靶片段和菌体基因组发生同源重组, 通过氯霉素抗性筛选得到带有抗性标记的重组菌. 随后因突变载体不能在*H.pylori* 26695菌体内生长复制而丢失.

检测突变株*H.pylori* 26695 Δ 0596是否还存在 $hp0596$ 基因或蛋白, 是最后认证 $hp0596$ 基因缺失突变株构建成功与否的关键. 我们对野生株和突变株的基因组进行了PCR鉴定, 用 $hp0596$ 基因两侧的引物进行长片段扩增, 野生株可以扩出完整的 $hp0596$ 基因和非编码序列的长约1 500 bp片段, 而突变株可以扩出约1 800 bp的基因片段. 提示 $hp0596$ 基因完整编码区(576 bp)被氯霉素抗性片段(1 033 bp)所取代. 另外, 在RNA水平和蛋白水平上也得到了相同的验证, 使用引物p5/p6, p7/p8进行RT-PCR分析. 野生株可以扩出约1 500 bp/576 bp大小的片段, 而突变株中没有相同的条带. 这一结果也就从RNA水平进一步证实 $hp0596$ 基因敲除成功. 以HP0596蛋白的兔多抗血清作为一抗, 羊抗兔作为二抗重组菌进行免疫印迹分析的结果表明, 野生菌株特异蛋白表达约22 000 Da, 而突变株蛋白并未表达, 从而在蛋白水平上证实了上述实验结果. 本研究构建的 $hp0596$ 基因缺失突变株为进一步研究幽门螺杆菌中 $hp0596$ 基因的功能, 阐明其在*H.pylori*致病中的地位及作用奠定了实验基础. 目前, *H.pylori* 26695 Δ 0596与突变株相关功能的研究正在进行之中.

4 参考文献

- 1 Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37
- 2 陈晓露, 彭孝伟. 肿瘤坏死因子- β 、白细胞介素-4基因多态性与胃癌. *中华消化杂志* 2007; 27: 136-137
- 3 Jang JY, Yoon HJ, Yoon JY, Kim HS, Lee SJ, Kim KH, Kim do J, Jang S, Han BG, Lee BI, Suh SW. Crystal structure of the TNF-alpha-Inducing protein (Tipalpha) from Helicobacter pylori: Insights into Its DNA-binding activity. *J Mol Biol* 2009; 392: 191-197
- 4 J. 萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 50-51
- 5 黄志刚, 段广才. cagA基因缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3190-3194
- 6 Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257
- 7 Zeng X, He LH, Yin Y, Zhang MJ, Zhang JZ. Deletion of cagA gene of Helicobacter pylori by PCR products. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3255-3259
- 8 Kuzuhara T, Suganuma M, Tsuge H, Fujiki H. Presence of a motif conserved between Helicobacter pylori TNF-alpha inducing protein (Tipalpha) and penicillin-binding proteins. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 2133-2137
- 9 Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, Fujiki H. Helicobacter pylori membrane protein 1: a new carcinogenic factor of Helicobacter pylori. *Cancer Res* 2001; 61: 6356-6359
- 10 Gobert AP, Bambou JC, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP, Ferrero RL. Helicobacter pylori heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 245-250
- 11 Nahar IK, Shojania K, Marra CA, Alamgir AH, Anis AH. Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 1256-1265
- 12 Tilly K, Elias AF, Bono JL, Stewart P, Rosa P. DNA exchange and insertional inactivation in spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; 2: 433-442
- 13 Godlewska R, Pawlowski M, Dzwonek A, Mikula M, Ostrowski J, Drela N, Jagusztyn-Krynicka EK. Tip-alpha (hp0596 gene product) is a highly immunogenic Helicobacter pylori protein involved in colonization of mouse gastric mucosa. *Curr Microbiol* 2008; 56: 279-286

■同行评价

本文结果可靠, 具有一定的研究意义及实用价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

酵母双杂交技术筛选人巨细胞病毒UL131A的相互作用蛋白

任高伟, 崔鑫, 齐莹, 马艳萍, 阮强, 孙峥嵘

■背景资料

内皮细胞作为HCMV感染的主要靶细胞之一, 是病毒在体内持续存在、体内各组织器官之间播散以及个体间传播过程中的重要角色, 近年来多项研究均证实了HCMV UL131A-UL128基因座在内皮细胞感染过程中发挥重要的作用。

任高伟, 崔鑫, 齐莹, 马艳萍, 阮强, 孙峥嵘, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室 辽宁省沈阳市 110004

国家自然科学基金资助项目, No. 30770109

作者贡献分布: 本课题设计和书写由任高伟与孙峥嵘完成; 实验操作由任高伟、崔鑫及孙峥嵘完成; 齐莹、马艳萍及阮强参与实验设计。

通讯作者: 孙峥嵘, 研究员, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室, sunzr@sj-hospital.org

电话: 024-96615-13447

收稿日期: 2010-04-13 修回日期: 2010-06-18

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-08-28

Screening of proteins interacting with HCMV UL131A protein from a human fetal brain cDNA library by yeast two-hybrid assay

Gao-Wei Ren, Xin Cui, Ying Qi, Yan-Ping Ma, Qiang Ruan, Zheng-Rong Sun

Gao-Wei Ren, Xin Cui, Ying Qi, Yan-Ping Ma, Qiang Ruan, Zheng-Rong Sun, Laboratory of Virology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770109

Correspondence to: Zheng-Rong Sun, Laboratory of Virology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunzr@sj-hospital.org

Received: 2010-04-13 Revised: 2010-06-18

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To screen proteins that interact with the human cytomegalovirus (HCMV) UL131A protein from a human fetal brain cDNA library using yeast two-hybrid system.

METHODS: The "bait plasmid" (named pGBKT7-UL131A) was constructed and used as a bait to screen a human fetal brain cDNA library to find proteins interacting with the UL131A protein. The positive clones were sequenced and analyzed using bioinformatic methods.

RESULTS: The "bait plasmid" was constructed successfully and co-transformed together with a

human fetus brain cDNA library into yeast cells. At last twenty-three proteins interacting with the HCMV UL131A were identified, and one of them shares 99% homology with the Thy-1 gene.

CONCLUSION: Some proteins interacting with HCMV UL131A have been successfully screened from a human fetal brain cDNA library.

Key Words: Human cytomegalovirus; UL131A protein; Yeast two-hybrid system; Human fetal brain cDNA Library

Ren GW, Cui X, Qi Y, Ma YP, Ruan Q, Sun ZR. Screening of proteins interacting with HCMV UL131A protein from a human fetal brain cDNA library by yeast two-hybrid assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2584-2588

摘要

目的: 利用酵母双杂交系统从人胎脑cDNA文库中筛选与人巨细胞病毒(HCMV)UL131A编码蛋白相互作用的蛋白。

方法: 将成功构建的酵母诱饵表达载体pGBKT7-UL131A转化到酵母菌AH109中, 再将人胎脑文库DNA转化到含有pGBKT7-UL131A的酵母细胞中, 筛选与HCMV UL131A编码蛋白相互作用的细胞蛋白, 并对筛选得到的阳性克隆进行测序和生物信息学分析。

结果: 成功构建酵母诱饵表达载体pGBKT7-UL131A, 并将其与人胎脑cDNA文库共转化到酵母细胞AH109中, 最终确认有23种人胎脑文库蛋白与HCMV UL131A编码蛋白相互作用, 其中一种与Thy-1蛋白高度同源, 其同源性高达99%。

结论: 成功应用酵母双杂交系统筛选出与HCMV UL131A编码蛋白相互作用的蛋白, 其中Thy-1在HCMV感染致病过程中可能起重要作用。

关键词: 人巨细胞病毒; UL131A 蛋白; 酵母双杂交

■同行评议者

任浩, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

系统; 人胎脑cDNA文库

任高伟, 崔鑫, 齐莹, 马艳萍, 阮强, 孙峥嵘. 酵母双杂交技术筛选人巨细胞病毒UL131A的相互作用蛋白. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2584-2588

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2584.asp>

0 引言

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是疱疹病毒科 β 属病毒, 种属特异性强, 人是其感染的唯一宿主. HCMV感染在人群中非常普遍, 在正常人群中常没有明显症状, 但在免疫功能低下人群中(如HIV感染者、肿瘤患者和器官移植受者等), 则可引起多种严重甚至致死性疾病^[1]. HCMV的先天感染及婴儿期感染可引起患儿黄疸性肝炎、胆道闭锁、先天性巨结肠、小头畸形以及智力低下、耳聋等多器官、多系统病变, 危害较大. HCMV可以感染多种类型的细胞, 而内皮细胞作为HCMV感染的主要靶细胞之一, 是病毒在体内持续存在、体内各组织器官之间播散以及个体间传播过程中的重要角色^[2]. 在HCMV感染内皮细胞机制的研究中发现, HCMV实验室株由于在成纤维细胞内不断的传代最终导致其感染内皮细胞的能力丧失, 分别对保留和丧失了内皮细胞感染能力的病毒株的表型进行研究发现内皮细胞的感染嗜性依赖于多重的病毒基因^[3,4]. Hahn等^[5]通过研究显示HCMV在内皮细胞和树突状细胞的感染嗜性, 以及在白细胞之间播散的遗传决定子为位于UL/b'区的UL131A-128基因座. UL131A-128通过与糖蛋白gH/gL形成gH/gL/UL131A-128复合物在低pH环境中通过胞吞作用促进HCMV进入内皮细胞^[6]. Ryckman等^[7]也通过研究证明了gH/gL/UL128-131A与gH/gL均是HCMV进入内皮和上皮细胞所不可缺少的. Wang等^[8]在研究HCMV UL131A基因在内皮细胞感染嗜性的研究中发现, 修复HCMV实验室株AD169突变的UL131A基因可以使AD169重新获得感染内皮细胞的能力, 证实了HCMV UL131A基因在内皮细胞感染过程中所发挥的重要作用. HCMV在内皮细胞中的复制是病毒的持续感染、传播及疾病发生的关键, 而多项研究均证实了HCMV UL131A-UL128基因座在内皮细胞感染过程是必不可少的. 因此, 本研究应用酵母双杂交技术从人胎脑cDNA文库中筛选与HCMV UL131A基因编码蛋白相互作用的蛋白, 进而从蛋白水平探讨HCMV先天感染的致病机制, 为解决HCMV先

天感染的防治、减少先天畸形儿出生等医学问题奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 HCMV病毒株为中国医科大学附属盛京医院病毒室保存的临床低传代HCMV分离株H(传代<5次), 来源于2006年中国医科大学附属盛京医院就诊患儿. 临床表现包括: 巨细胞病毒性肝炎、多器官畸形、巨细胞病毒性肺炎等. 患儿的尿液应用荧光定量PCR方法检测HCMV DNA, 结果为阳性, 临床株从患儿的尿液中分离得到, 人胚肺成纤维细胞为本室保存. HCMV分离株H株UL/b'区基因序列已被GenBank收录, 序列号为: GQ981646. 酵母菌AH109, pGBKT7质粒均为本室保存. 3'RACE及5'RACE试剂盒购自TaKaRa公司, 酵母双杂交系统(Matchmaker GAL Two-Hybrid System)购自Clontech公司; Matchmaker™ cDNA Libraries人胎脑cDNA文库由武汉大学生命科学院肖庚富教授惠赠. BECKMAN台式低温高速离心机; Perkin Elmer PCR循环仪; 电穿孔仪(BioRad); 引物合成及测序由Invitrogen公司完成. 引物设计: 按照HCMV分离株H株(GenBank Accession number: GQ981646)的基因序列, 设计用于扩增HCMV UL131A全序列的引物, 并根据载体pGBKT7的多克隆位点序列, 分别加入了EcoR I 及Sal I 识别位点(下划线)以及保护性碱基. 引物序列如下: 上游引物: 5'-CCGGAATTC^{CGGCTGTGTCGGGTGTG-GCT}-3'; 下游引物: 5'-CGCGTCGAC^{CTAGTTGGCAAAGAGCCGCA}-3'.

1.2 方法

1.2.1 扩增HCMV UL131A cDNA: 以TRIzol法从感染了HCMV的人胚肺成纤维细胞中提取H株的总RNA. 提取HCMV病毒株H株的mRNA并逆转录成cDNA, 利用HCMV UL131A特异性引物与试剂盒的3'RACE或5'RACE的外引物进行PCR扩增, 再以第一轮PCR产物为模板, 以HCMV UL131A特异性引物进行半巢式-PCR扩增HCMV UL131A cDNA. 反应体系为50 μ L, PCR条件为: 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 50 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共30个循环.

1.2.2 酵母表达重组质粒的构建: 将HCMV UL131A扩增产物纯化后用EcoR I 及Sal I 进行双酶切、纯化, 与同样双酶切并纯化的酵母表达载体pGBKT7在T4 DNA 连接酶的作用下连接. 将连接产物转化入大肠杆菌Top10中, 转化

■ 研发前沿

鉴于HCMV UL131A-UL128基因在病毒感染及传播过程中发挥重要作用, 近年来针对其发挥哪些具体作用, 如何发生作用进行了大量的研究与实验.

■相关报道

2004年Hahn等通过研究显示HCMV在内皮细胞和树突状细胞的感染嗜性以及白细胞之间播散的遗传决定子为位于UL/b'区的UL131A-128基因座。

后的Top10接种于含有卡那霉素的LB固体培养基, 37 °C温箱过夜. 利用PCR方法扩增菌落, 电泳筛选出阳性结果, 挑取阳性克隆, 经含卡那霉素的LB液体培养基培养过夜后, 将菌液提取质粒经酶切、测序验证克隆结果。

1.2.3 应用酵母双杂交技术从人胎脑cDNA文库中筛选与UL131A编码蛋白相互作用的蛋白: (1) 将以pACT2(含转录激活域)为酵母表达载体的人胎脑cDNA文库分别扩大培养, 采用碱裂解法提取文库质粒. (2) 分别将含有pGBKT7 UL131A重组质粒转化到AH109酵母细胞中, 然后再将提取的文库质粒转化到含有pGBKT7 UL131A重组质粒的AH109酵母细胞中, 转化后的菌液分别涂2缺(亮氨酸/色氨酸缺陷, -Leu/-Trp)、4缺平板(腺嘌呤/组氨酸/亮氨酸/色氨酸, -Ade/-His/-Leu/-Trp), 在2缺平板上计算转化效率, 计算公式为 $\text{cfu} \times \text{total suspension vol.}(\mu\text{L}) / \text{Vol. plated}(\mu\text{L}) \times \text{dilution factor} \times \text{amt DNA used}(\mu\text{g})$, 4缺平板上长出的单菌落参照酵母双杂交系统操作说明做显色反应. (3) 将显蓝色的酵母单菌落扩大培养并用玻璃珠法提酵母质粒, 用电穿孔转化方法将质粒转化到大肠杆菌中, 然后在含氨苄青霉素的平板上筛选出人胎脑文库克隆. (4) 采用PCR方法剔除重复克隆, 提取大肠杆菌中的文库克隆质粒并将其回转到含pGBKT7 UL131A的酵母菌中, 观察其在2缺及4缺培养基平板上的检测结果. 将与HCMV UL131A蛋白相互作用的cDNA文库蛋白的相关基因进行测序, 利用GenBank的数据库资源, 运用BLAST分析测序结果。

2 结果

2.1 重组质粒pGBKT7-UL131A的构建及鉴定 采用特异性引物扩增出HCMV UL131A基因片段, 片段长度为391 bp, 并成功将HCMV UL131A片段克隆到酵母表达载体pGBKT7上, 命名为pGBKT7-UL131A. 用EcoR I 及Sal I 双酶切的方法鉴定pGBKT7-UL131A质粒的克隆, 测序分析显示结果与预期一致(图1)。

2.2 重组质粒pGBKT7-UL131A转化酵母菌AH109 用醋酸锂法将pGBKT7-UL131A转化酵母细胞AH109后, 在SD/-Trp培养基上进行筛选, 由于AH109 株为Trp营养缺陷, 转化成功后的AH109可以在缺少Trp的培养基上生长, 结果显示酵母转化成功。

2.3 与pGBKT7-UL131A相互作用的人胎脑cDNA文库蛋白的筛选 利用大剂量醋酸锂酵母

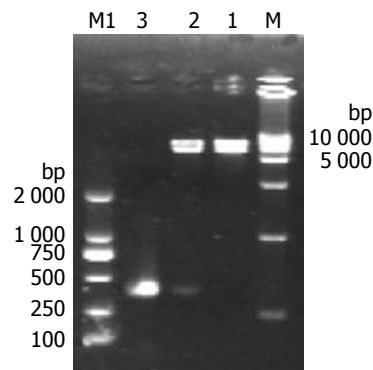


图 1 pGBKT7-UL131A的克隆. M: Marker DL15000; M1: Marker DL 2000; 1: EcoR I 及Sal I 双酶切质粒pGBKT7; 2: EcoR I 及Sal I 双酶切pGBKT7-UL131A; 3: UL131A 的PCR扩增产物。

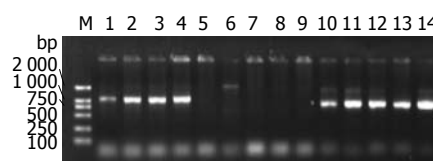


图 2 部分电转化后菌落的PCR鉴定. M: Marker DL2000; 1-14: 部分电转后菌落的PCR鉴定结果; 5-9: 阴性结果, 其余为阳性结果。

转化方法将人胎脑cDNA文库转化入含有重组质粒pGBKT7-UL131A的酵母菌AH109中, 分别铺板于2缺和4缺两种营养缺陷的培养基中, 30 °C温箱中孵育. 4缺培养基中观察到酵母菌落生长, 计算2缺培养基中的菌落数其转化效率, 得出转化效率为 $1.5 \times 10^4 \text{ cfu}/\mu\text{g}$, 满足后续实验要求。

2.4 阳性克隆质粒的PCR鉴定 筛选的阳性克隆通过菌落观察及显色反应排除假阳性结果后, 将筛选出的25个克隆提取质粒, 通过电穿孔的方法转化入感受态细胞TG1中, 在含有氨苄青霉素的LB固体培养基中, 37 °C温箱过夜培养, 用捕获蛋白载体pACT-2的引物进行插入基因片段的PCR扩增, 每个含有氨苄青霉素的LB固体培养基中随机选取5个单菌落, 观察插入的片段大小, 获得大小不等的片段(图2)。

2.5 文库质粒的回转验证和测序结果分析 阳性克隆质粒回转入含诱饵蛋白的酵母菌AH109中进行再次验证及测序结果分析, 将阳性克隆质粒回转入含pGBKT7-UL131A基因的酵母细胞AH109中, 在2缺和4缺培养基中均生长, 测序结果及BLAST分析结果显示, 筛选出的25个克隆包含23种不同蛋白(表1), 而关于这23种蛋白都有相应的报道. 其中一种蛋白与Thy-1蛋白高度

表 1 阳性克隆与GenBank序列同源性比较

序号	同源基因	相同克隆数	同源性(%)
1	Homo sapiens Thy-1 cell surface antigen (Thy-1)	2	99
2	Homo sapiens proteasome maturation protein (POMP)	2	100
3	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 10	1	99
4	Homo sapiens metallothionein 2A (MT2A)	1	99
5	Homo sapiens melanoma antigen family D, 4B (MAGED4B)	1	99
6	Homo sapiens isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)	1	99
7	Homo sapiens RAB1B, member RAS oncogene family (RAB1B)	1	99
8	Homo sapiens ferritin, light polypeptide (FTL)	1	100
9	Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	100
10	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 21	1	99
11	Homo sapiens hypothetical protein LOC339047	1	99
12	Homo sapiens transketolase (TKT)	1	99
13	Homo sapiens forkhead box J3 (FOXJ3)	1	99
14	Homo sapiens scleraxis homolog B (mouse) (SCXB)	1	99
15	Homo sapiens HLA-B associated transcript 3 (BAT3)	1	99
16	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig	1	99
17	Homo sapiens clathrin interactor 1 (CLINT1)	1	99
18	Homo sapiens chaperonin containing TCP1	1	99
19	Homo sapiens centrosome and spindle pole associated protein 1 (CSPP1)	1	99
20	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	1	99
21	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein	1	99
22	Homo sapiens misato homolog 1 (Drosophila) (MSTO1)	1	99
23	Homo sapiens ataxin 2-binding protein 1 (A2BP1)	1	98

■应用要点
本研究应用酵母双杂交技术从人胎脑cDNA文库中筛选与HCMV UL131A基因编码蛋白相互作用的蛋白,进而从蛋白水平探讨HCMV先天感染的致病机制,为解决HCMV先天感染的防治、减少先天畸形儿出生等医学问题奠定基础。

同源,其同源性达99%,基因登录号为7070.

3 讨论

酵母双杂交是一种在细胞内检测蛋白质相互作用的技术,无需分离纯化蛋白质,是实现大规模高通量分析的主要方法.真核转录因子含有两个相对独立的功能域:DNA结合域(DNA binding domain, BD)和转录激活域(activation domain, AD).当两者独立存在时,无转录激活功能,但两者只要相互接近,即可激活转录.酵母双杂交技术即利用上述特性,将酵母的转录因子的两个功能域分解,由编码BD和AD的DNA片段与需要研究的蛋白质(X和Y)的cDNA分别构建重组体BD-X和AD-Y.将两个重组体在同一酵母细胞中表达,产生的融和蛋白分别称之为诱饵和猎物蛋白.如果蛋白质X和Y之间存在相互作用,则BD和AD被拉近,转录活性恢复,即可激活下游报告基因的表达.因此应用酵母双杂交可以分析已知蛋白质之间是否存在相互作用.本研究构建了pGBKT7-UL131A诱饵质粒,对人胎脑细胞cDNA文库进行了双杂交筛选,筛选了25个阳

性克隆并进行测序分析,发现2个克隆基因编码的同一种蛋白与Thy-1高度同源.

Thy-1又称CD90,是40年前首先从鼠的大脑和甲状腺组织中发现的一种糖蛋白,他通过二酰甘油(diacylglycerol, DAG)锚定于糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylirositol, GIP)的C末端而附着于细胞膜,是细胞膜表面最小的免疫球蛋白家族成员,相对分子质量为25 000 Da^[9].人类Thy-1的表达仅限制于神经细胞,成纤维细胞和CD34+亚型造血干细胞^[10],而在成纤维细胞中Thy-1的表达水平很高,可认为是成纤维细胞的标志性蛋白^[11].

HCMV感染可引起患儿的神经系统的多种疾病,他已成为引起新生儿疾病和先天畸形的重要感染因素之一,鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)先天感染的神经系统病理表现与HCMV感染极其相似, van den Pol等^[12]通过对新生鼠和成年鼠颅内注射MCMV研究发现,由于没有免疫系统的保护,正在发育中的脑组织较发育完善的脑组织受MCMV感染更严重,尤其是正在发育中的海马、下丘脑、纹

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 具有一定的可读性.

状体、皮层和小脑等脑组织. 而Thy-1对促进脑内神经元生长、稳定神经突触和抑制成熟神经元再生起到一定的作用^[13]. 近年来有研究证实了HCMV的感染可导致Thy-1蛋白水平的下调, 这提示Thy-1在HCMV感染导致的中枢神经系统损害中可能起到重要作用^[14].

而我们在对HCMV UL/b'区的其他基因编码的蛋白进行蛋白筛选后发现有些基因的蛋白(如pUL135, pUL128)也与Thy-1蛋白相互作用, 推测在HCMV感染导致的中枢神经系统损害中, 可能通过HCMV UL/b'区基因编码的蛋白干扰Thy-1蛋白在体内正常作用的发挥, 从而导致了HCMV感染患儿的神经系统症状的出现. 虽然本研究仅为蛋白功能研究的初级阶段, 但此文为深入研究HCMV的致病机制奠定了基础. 我们所做的研究可能为从蛋白水平探讨HCMV先天感染的致病机制提供了很多有价值的线索.

4 参考文献

- 1 de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* 1998; 39: 141-162
- 2 Gerna G, Baldanti F, Revello MG. Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum Immunol* 2004; 65: 381-386
- 3 Bolovan-Fritts C, Wiedeman JA. Human cytomegalovirus strain Toledo lacks a virus-encoded tropism factor required for infection of aortic endothelial cells. *J Infect Dis* 2001; 184: 1252-1261
- 4 Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, Kahl M, Beck R, Waldman J, Hebart H, Einsele H, Jahn G. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 11): 2867-2877
- 5 Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Wagner M, Gallina A, Milanesi G, Koszinowski U, Baldanti F, Gerna G. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol* 2004; 78: 10023-10033
- 6 Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC. HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14118-14123
- 7 Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC. Human cytomegalovirus TR strain glycoprotein O acts as a chaperone promoting gH/gL incorporation into virions but is not present in virions. *J Virol* 2010; 84: 2597-2609
- 8 Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol* 2005; 79: 10330-10338
- 9 Firer MA, Zacharia BZ, Kostikov M, Irlin Y. The Thy-1 molecule: its properties and functions. *Isr J Med Sci* 1995; 31: 382-386
- 10 Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1331-1342
- 11 Fairley JA, Baillie J, Bain M, Sinclair JH. Human cytomegalovirus infection inhibits epidermal growth factor (EGF) signalling by targeting EGF receptors. *J Gen Virol* 2002; 83: 2803-2810
- 12 van den Pol AN, Reuter JD, Santarelli JG. Enhanced cytomegalovirus infection of developing brain independent of the adaptive immune system. *J Virol* 2002; 76: 8842-8854
- 13 Rege TA, Hagoood JS. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 991-999
- 14 Leis M, Marschall M, Stamminger T. Downregulation of the cellular adhesion molecule Thy-1 (CD90) by cytomegalovirus infection of human fibroblasts. *J Gen Virol* 2004; 85: 1995-2000

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32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500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1980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)

乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤的X线征象分析34例

鲁北

鲁北, 河北省邢台市人民医院放射科 河北省邢台市 054031
通讯作者: 鲁北, 副主任医师, 054031, 河北省邢台市, 河北省邢台市人民医院放射科. xtlubei@163.com
收稿日期: 2010-06-04 修回日期: 2010-07-13
接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-28

X-ray imaging features of esophageal papilloma and polypoid leiomyoma: an analysis of 34 cases

Bei Lu

Bei Lu, Department of Radiology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054031, Hebei Province, China
Correspondence to: Bei Lu, Department of Radiology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054031, Hebei Province, China. xtlubei@163.com
Received: 2010-06-04 Revised: 2010-07-13
Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To analyze the X-ray imaging features of esophageal papilloma and polypoid leiomyoma to improve the diagnosis of the two diseases.

METHODS: Twenty-three patients with esophageal papilloma and 11 patients with polypoid leiomyoma undergoing double-contrast radiography of the esophagus and pathological examination were analyzed in this study. The X-ray imaging features of the two diseases were summarized.

RESULTS: Of 23 cases of esophageal papilloma, 17 (73.9%) showed marginal notches or lobulations, 19 (82.6%) showed a twisted contour line and uneven thickness, 17 (73.9%) showed a granular or map-like appearance of barium meal, 15 (65.2%) had rigid vein walls, and 9 (39.1%) demonstrated a "double-ring" appearance. Of 11 cases of polypoid leiomyoma, 8 (72.7%) had a regular and smooth edge, 9 (81.8%) had a sharp and even contour line, 9 (81.8%) demonstrated a thin wash-like appearance of barium meal, and 8 (72.7%) had soft vein walls.

CONCLUSION: Barium meal X-ray examination

plays an important role in diagnosing esophageal papilloma and polypoid leiomyoma.

Key Words: Double-contrast radiography of the esophagus; Esophageal papilloma; Polypoid leiomyoma; X-ray imaging feature

Lu B. X-ray imaging features of esophageal papilloma and polypoid leiomyoma: an analysis of 34 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2589-2593

摘要

目的: 分析乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤X线征象, 提高对该类型食管良恶性肿瘤的诊断及鉴别能力。

方法: 通过食管双对比造影检查并经病理证实发现, 乳头状食管癌23例, 息肉样平滑肌瘤11例, 对其X线征象进行分析, 归纳其特点。

结果: 在乳头状食管癌23例中, 边缘伴切迹或分叶状17例(73.9%), 轮廓线扭曲、粗细不均19例(82.6%), 钡剂涂抹为颗粒或地图状17例(73.9%), 管壁僵直15例(65.2%), 形态呈“双环”征9例(39.1%); 11例息肉样平滑肌瘤中, 边缘规整、圆滑8例(72.7%), 轮廓线锐利、均匀呈素描线条状9例(81.8%), 钡剂涂抹呈淡薄均匀的水墨画样9例(81.8%), 其中显示正常黏膜的5例(45.5%), 管壁柔软8例(72.7%)。

结论: X线钡餐检查对于早期乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤的诊断及良恶性鉴别具有重要价值。

关键词: 食管双对比造影术; 乳头状食管癌; 息肉样平滑肌瘤; X线征象分析

鲁北. 乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤的X线征象分析34例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(24): 2589-2593
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2589.asp>

0 引言

食管癌与平滑肌瘤分别占食管良恶性肿瘤的首位, 早期乳头型食管癌长度一般在3 cm以内, 呈

■背景资料

目前随着一些新的食管检查手段出现, 人们对食管钡餐造影这种基础性检查有逐渐淡薄趋势, 但在日常工作中由于其便利、经济、无创、准确率高等优点而广受患者欢迎。而乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤在形态上的鉴别又是钡餐检查的强项。

■同行评议者

赵卫, 主任医师, 昆明医学院第一附属医院医学影像中心

■相关报道

赵小华等报道利用双重造影数字成像检查出31例食管局限隆起性病变,包括长径小于3 cm的隆起性食管癌及平滑肌瘤,其主要观察数字胃肠机与普通胃肠机对食管局限隆起性病变的检出率及形态学定性的准确率,结果数字胃肠机对局限隆起性病变的检出率为2.46%形态学定性的准确率为93.5%,明显高于普通胃肠机(1.99%, 88%)。

小结节状、乳头状或息肉样向食管腔内隆起,癌组织局限于黏膜下层以内,未累及肌层,无淋巴结转移^[1]。本组乳头状食管癌23例中有16例属于早期乳头型,其余7例长径同样在3 cm以内,也呈乳头状隆起,但已不属于早期;乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤在大小、形态上有许多相似之处。数字胃肠机的应用为提高其检出率创造了条件^[2],利用胃肠机的数字连续点片模式,可进行动态回放,从而可获得更多的图像诊断信息^[3],同时由于乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤均为腔内隆起起性病变,钡餐造影时形成充盈缺损,更利于病变的检出。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2002-09/2009-09经X线钡餐检查发现,并通过病理证实的乳头状食管癌23例,息肉样平滑肌瘤11例。乳头状食管癌中,男14例,女9例。年龄32-76(平均53.6)岁。在息肉样平滑肌瘤中,男6例,女5例。年龄29-80(平均51.4)岁。34例中,临床症状主要为吞咽障碍,表现吞咽时异物感、胸骨后不适、咽下食物时有停滞感有22例;因胃肠道其他症状检查者9例;正常体检发现1例。

1.2 方法 采用低张食管气钡双对比造影方法,上午检查者空腹,下午检查者,早餐可进清淡食物,午餐禁食。使用美国GE公司生产Prestiger Si数字胃肠机,检查前10 min肌注20 mg 654-2,造影时口服产气粉3 g,大口吞钡法,口含约50 mL浓度1 800-2 000 g/L的钡剂,一口咽下,依次从食管左、右前斜位、正位等多体位观察,进行连续数字点片。

2 结果

2.1 34例乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤的发病部位、数目及大小 食管癌23乳头状例中发生在胸上段、胸中段及胸下段的分别为2例、16例、5例,11例平滑肌瘤的分布为1例、7例、3例,可以看出两种病变多数都发生在食管胸中段,其中食管癌占69.6%,平滑肌瘤占63.6%。食管癌中有4例为多发,占17.4%,而平滑肌瘤均为单发。病变直径小于1 cm的食管癌与平滑肌瘤各有2例,病变直径大于1 cm并小于3 cm的食管癌与平滑肌瘤各有21例和9例,分别占91.3%和81.8%(表1)。

2.2 乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤的病理结果 乳头状食管癌23例中,鳞癌19例,腺癌4例,属



图1 胸中段乳头状食管癌图像。A: 正面呈圆形,浅分叶状; B: 切线位沿一侧壁呈弧形突向腔内,轮廓线扭曲、毛糙、粗细不均,管壁僵直。



图2 胸下段乳头状食管癌图像。A: 病变呈圆形,可见颗粒状及地图样钡剂涂抹; B: 左前斜位轮廓线粗细不均匀,呈分叶状。

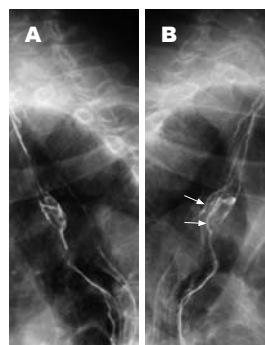


图3 胸上段乳头状食管癌图像。A: 病变呈椭圆形,钡剂涂抹不均,管壁僵直; B: 左前斜位瘤体呈现“双环”影,轮廓线局部增粗。

于早期乳头型16例,侵犯肌层的有6例,1例虽未侵犯肌层,但已有淋巴结转移;有4例多灶癌,均为鳞癌,1例病灶多达5处,X线发现4处。11例息肉样平滑肌瘤均为单发。以上病变均小于3 cm,最小者0.6 cm。

2.3 乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤的X线表现 乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤X线表现均以充盈缺损为主,围绕其特点主要从病变的形态、边缘、轮廓及钡剂涂抹状况和管壁的软硬度等方面进行分析(图1-9)。

2.3.1 形态: 肿瘤正面呈类圆形改变的,乳头状食管癌16例(69.6%),息肉样平滑肌瘤7例(63.6%);切线位呈半圆或弧形改变的,乳头状食管癌19例(82.6%),息肉样平滑肌瘤8例(72.7%);乳头状食管癌出现“双环”征象的有9例(39.1%),息肉样平滑肌瘤无此征象。

2.3.2 边缘: 乳头状食管癌边缘伴切迹或分叶状的17例(73.9%),息肉样平滑肌瘤为3例(27.3%);

表 1 34例乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤的发病部位、数目及大小

病变类型	n	发病部位			病灶数目		病变大小(cm)	
		胸上段	胸中段	胸下段	单发	多发	直径≤1	1<直径<3
食管癌	23	2	16	5	19	4	2	21
平滑肌瘤	11	1	7	3	11		2	9
合计	34	3	23	8	30	4	4	30

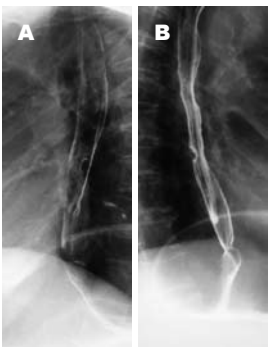


图 4 胸中段食管息肉样平滑肌瘤图像. A: 正面呈环状, 边缘清晰、锐利; B: 切线位呈圆弧形突向腔内, 轮廓线均匀光整.



图 7 息肉样平滑肌瘤伴食管癌图像. A: 胸上段可见“瓜子”形病变, 轮廓线均匀, 边光整, 术后病理为平滑肌瘤; B: 在胸中段可见食管黏膜破坏, 管腔狭窄, 术后病理为鳞癌.



图 5 胸中段食管息肉样平滑肌瘤图像. A: 正位内部可见平行排列的正常食管黏膜, 拐角圆滑, 管壁柔软; B: 钡剂涂抹均匀, 轮廓线走行自然, 呈淡薄的水墨画样改变.

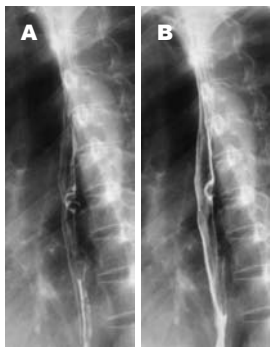


图 8 分叶状息肉样平滑肌瘤图像. A: 正面形态呈马鞍状, 钡剂涂抹均匀, 轮廓线锐利; B: 切线位线条粗细均匀, 管壁柔软.



图 6 食管多灶性乳头状癌图像. 共显示4个病灶, 呈圆形, 伴有切迹, 轮廓线毛糙、不均匀, 周围黏膜紊乱, 一侧管壁僵直.

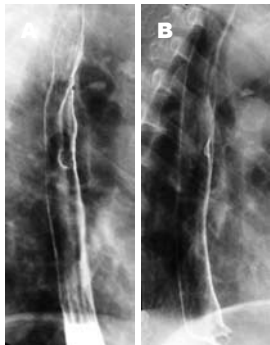


图 9 不典型食管乳头状癌图像. A: 轮廓线半边清晰, 半边模糊, 伴有切迹; B: 切线位轮廓呈均匀小弧线改变, 但底部轮廓线增粗明显, 对应管壁僵直, 术后病理鳞癌.

息肉样平滑肌瘤边缘规则、圆滑8例(72.7%), 乳头状食管癌有4例(17.4%).

2.3.3 轮廓线: 轮廓线扭曲、粗细不均, 乳头状食管癌19例(82.6%), 息肉样平滑肌瘤2例(18.2%); 轮廓线锐利、粗细均匀呈素描线条状, 息肉样平滑肌瘤9例(81.8%), 乳头状食管癌4例(17.4%).

2.3.4 钡剂涂抹情况: 钡剂涂抹不均呈颗粒或地图状, 乳头状食管癌17例(73.9%), 息肉样平滑肌瘤2例(18.2%); 钡剂涂抹均匀呈淡薄的水墨画

样, 乳头状食管癌5例(21.7%), 息肉样平滑肌瘤9例(81.8%), 其中5例(45.5%)病变区显示连续的食管正常黏膜, 乳头状食管癌无此表现.

2.3.5 管壁: 乳头状食管癌出现管壁内陷、僵硬的15例(65.2%), 病变区管壁柔软的4例(17.4%); 息肉样平滑肌瘤出现病变区管壁僵硬的2例(18.2%), 但无内陷改变, 管壁柔软的8例(72.7%).

2.3.6 乳头状食管癌病变大小与X线表现: 乳头状食管癌瘤体越小, 肿瘤边缘相对较光整, 分

■创新盘点

关于食管癌及平滑肌瘤单病种相关报道较多, 本文首次提出乳头状食管癌“双环征”表现, 并对乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤的轮廓、边缘、钡剂涂抹状况、管壁的扩张度等方面的特点进行了详细描述和对比, 为临床治疗提供了一定参考价值.

■应用要点

在实际工作中,根据乳头状食管癌级息肉样平滑肌瘤的隆起性特点,可提高X线钡餐对该类型病变的检出率.通过本文对上述良恶性病变X线特点的总结,继而达到提高该类型肿瘤的诊断符合率和良恶性肿瘤鉴别诊断的正确率.

叶少,轮廓线较规整,钡剂涂抹也相对均匀,管壁僵硬程度低;随着瘤体的增大其肿瘤边缘分叶、轮廓线毛糙、扭曲和钡剂涂抹不均、管壁僵硬等恶性征象越显著.

2.3.7 乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤的发病特点:乳头状食管癌及息肉样平滑肌瘤发生在食管中段的分别为16例和7例,占乳头状食管癌的69.6%和息肉样平滑肌瘤的63.6%;乳头状食管癌有4例为多发,占17.4%,而息肉样平滑肌瘤11例均为单发.

2.3.8 其他:本组有平滑肌瘤伴有食管癌1例,平滑肌瘤呈小“瓜子”样改变,轮廓清晰、规整,其下方食管癌呈大范围的黏膜破坏,十分醒目.另外,本组有小于1 cm的乳头状隆起病变1例,X线表现不典型,征象介于良恶性之间,诊断较困难.

3 讨论

乳头状食管癌以充盈缺损为特点,据统计,与斑块型、平坦型早期食管癌相比,乳头型食管癌X线钡餐检查阳性率明显高于前两者^[4].X线特点为一侧食管向腔内突出的环影、半环影,多数伴有分叶,黏膜及功能改变较轻微^[5].钡剂涂抹为浓淡不一的斑状,切线位轮廓线增粗、紊乱似花纹状^[6],管壁属舒张度减低,偏侧性壁僵硬、毛糙,黏膜破坏轻微^[7],上述特点与本组X线表现基本一致.对于食管息肉样平滑肌瘤,形态上也表现为环形、半环形,也可呈分叶状,边缘锐利、光滑,与正常食管分界清楚,典型平滑肌瘤,在肿瘤上下方食管收缩时,肿瘤处食管被撑开,覆盖在肿瘤上下端的钡剂可表现为与食管长轴垂直的弧形阴影称“环形征”^[8],此征象为食管平滑肌瘤的特征性表现^[9].当肿瘤向腔内生长时只是将黏膜推压展平,而没有黏膜破坏,钡剂均匀淡薄涂抹形成“涂抹征”,也是食管平滑肌瘤的特征性表现^[10].在该病的诊断上,食管气钡双对比造影是诊断本病的首选检查手段^[11-13].上述征象对于直径大于3 cm瘤体的平滑肌瘤较多见,对于本组瘤体较小的息肉样食管平滑肌瘤,“环形征”、“涂抹征”并不十分典型.

食管癌在食管肿瘤中占首位,而在食管良性肿瘤中,平滑肌瘤发病率最高,约占食管良性肿瘤的90%左右^[14],因此乳头状食管癌与息肉样平滑肌瘤鉴别诊断在日常工作中具有十分重要意义.形态上两者呈类圆形的,在本组中分别占到69.6%和82.6%,多数形态相似,不易鉴别.但

部分乳头状食管癌出现“双环征”,可能因瘤体上下生长不均或浸润生长的基底部形成水肿带所致,而息肉样平滑肌瘤无此征象,可以作为鉴别点.肿瘤边缘伴切迹或分叶状的,乳头状食管癌占73.9%,而息肉样平滑肌瘤仅27.3%,有一定的鉴别价值.轮廓线扭曲、粗细不均,乳头状食管癌占82.6%,相反,息肉样平滑肌瘤81.8%表现为轮廓线锐利、粗细均匀,可作为重点鉴别.在钡剂涂抹方面,尤其是病变的正面,乳头状食管癌73.9%为不均匀的颗粒或地图状,息肉样平滑肌瘤81.8%为钡剂涂抹均匀,这是十分重要的鉴别征象,因病变正面钡剂涂抹可更好显示局部细节,观察更清晰,有利于病变的定性诊断^[15].本组中约65.2%乳头状食管癌出现管壁僵直,这与管壁柔软占72.7%的息肉样平滑肌瘤形成鲜明对比,有助于鉴别诊断.另外,本组乳头状食管癌有17.4%为多发,而息肉样平滑肌瘤均为单发,也可作为鉴别参考之一,当息肉样平滑肌瘤伴有食管癌时应注意避免漏诊或误诊.在本组中呈分叶的息肉样平滑肌瘤,轮廓线仍清晰、锐利,线条粗细均匀,钡剂在其中迂曲行走,涂抹依然均匀,周围管壁张缩性良好,管壁无僵硬之感,良性征象占据多数.另外,有个别小的乳头状食管癌,轮廓线半边清晰、锐利,另半边模糊,伴有切迹;切线位轮廓呈均匀的小弧线,但基底部轮廓线增粗,对应管壁僵直,对于这种良、恶征象各半的肿瘤,鉴别确有一定困难,因此还必须结合其他检查确诊.

总之,食管气钡双重造影检查对于乳头状食管癌、息肉样平滑肌瘤有较高的检出率和诊断符合率,对于其良恶性鉴别诊断具有重要价值.

4 参考文献

- 1 赵刚,黄为宁,曹长健.数字胃肠机双对比造影诊断早期食管癌的临床价值.实用医学杂志 2009; 25: 3067-3069
- 2 Zhang X, Watson DI, Jamieson GG, Lally C, Bes-sell JR, Devitt PG. Outcome of oesophagectomy for adenocarcinoma of the oesophagus and oesophago-gastric junction. ANZ J Surg 2005; 75: 513-519
- 3 Kouzu T, Hishikawa E, Miyazaki S. What are the findings of esophageal cancer to be treated endo-scopically? Abdom Imaging 2003; 28: 470-476
- 4 芦春花,陆金云,王学勤,李晓,张文昌,肖新兰,陈峰. X线钡剂造影检查及CT、MRI、电子胃镜在早期食管癌诊断中的对比研究.实用癌症杂志 2003; 18: 641-643
- 5 吴德红,杨松,蔡克涛,陈平友.数字成像在早期食管癌诊断中的应用.实用医学杂志 2007; 23: 2694-2695
- 6 贺建元,李汝敏,李予镇,贺舜尧,许小超,李复兴,张玉斌,唐显成.早期食管癌X线诊断(附276例分析).实

- 用放射学杂志 2005; 21: 152-154
- 7 李亚新, 崔志强. 数字胃肠机对45例早期食管癌X线诊断分析. 中国误诊学杂志 2008; 8: 3941
- 8 王庆彬, 马效德, 吴希诗, 任军华, 闫向远. 食管平滑肌瘤的影像学表现. 医学影像学杂志 2001; 11: 323-324
- 9 聂玫, 许有进, 黄淑贞. 食管平滑肌瘤的影像学诊断. 现代医用影像学 2004; 13: 223-224
- 10 韩洪利, 王学勤, 韩庆良. 食管平滑肌瘤的外科治疗(附32例报告). 中国肿瘤临床 2006; 33: 894-896
- 11 陈起航, 严伟忠, 刘甫庚, 潘纪成. CT在食管平滑肌瘤诊断和鉴别诊断中的价值. 中国医学影像技术 2000; 16: 456-458
- 12 郑如恒, 冯明祥, 葛棣, 侯英勇. 食管平滑肌瘤的诊断与治疗. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 26-28
- 13 肖利华, 宁永见, 唐志萍. 6例食管平滑肌瘤的临床和影像学诊断. 中国医学影像学杂志 2005; 13: 302-303
- 14 刘峰, 张志庸, 李单青, 李力. 食管平滑肌瘤的诊断及外科处理. 现代预防医学 2007; 34: 2577-2578
- 15 赵小华, 胡道予, 姜志红. 双重造影数字成像对食管隆起性病变的诊断价值. 放射学实践 2000; 15: 248

■同行评价

本文对乳头状食管癌和息肉样平滑肌瘤的X线征象进行了较全面的分析、对比、提出鉴别诊断要点, 有较强的临床参考价值.

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》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, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}¹, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-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, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, 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.

Nissen胃底折叠术与前180度胃底折叠术的疗效比较

曹占国, 秦鸣放, 王庆, 赵宏志

■背景资料

欧美国家360度Nissen胃底折叠术是目前应用最广泛的手术方式,但其术后吞咽困难、腹胀等胃肠功能障碍症状发生率较高。近年来外科医生正在寻求一种效果良好而对胃肠功能影响更小的手术方式,因此产生了各种部分胃底折叠术。

曹占国, 天津医科大学研究生院 天津市 300193
秦鸣放, 王庆, 赵宏志, 天津南开医院 天津市 300100
作者贡献分布: 本论文写作由曹占国完成; 秦鸣放指导; 本文部分资料由王庆与赵宏志提供。
通讯作者: 曹占国, 300100, 天津市南开区南开三纬路122号, 天津南开医院微创外科中心. czhg2008@yahoo.cn
收稿日期: 2010-06-01 修回日期: 2010-07-16
接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-28

Efficacy of laparoscopic Nissen fundoplication versus anterior 180° fundoplication in the treatment of gastroesophageal reflux disease

Zhan-Guo Cao, Ming-Fang Qin, Qing Wang,
Hong-Zhi Zhao

Zhan-Guo Cao, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300193, China
Ming-Fang Qin, Qing Wang, Hong-Zhi Zhao, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China
Correspondence to: Zhan-Guo Cao, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. czhg2008@yahoo.cn
Received: 2010-06-01 Revised: 2010-07-16
Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To compare the efficacy and safety of laparoscopic Nissen fundoplication versus anterior 180° fundoplication in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD).

METHODS: A total of 409 patients with severe GERD who underwent laparoscopic Nissen fundoplication (group N, $n = 253$) or anterior 180° fundoplication (group A, $n = 156$) from June 2004 to May 2008 were included in the study. The pre- and post-operative gastrointestinal quality of life index (GIALI) was assessed in all the patients.

RESULTS: Approximately 76.1% (311/409) of patients had a lower esophageal sphincter (LES) pressure less than 15 mmHg. The mean operation time was significantly longer in group N than in group A (116 min $\pm$ 8 min vs 96 min $\pm$ 5 min, $P < 0.05$). The mean duration of postopera-

tive hospitalization was 3.6 d in group N and 3.4 d in group A. Postoperative complications occurred in 3 patients in group N and in 2 patients in group A, and no death occurred. There were 33 patients with postoperative abdominal bloating and 24 patients with postoperative dysphagia in group N, and the corresponding figures in group A were 16 and 14, respectively. The mean duration of follow-up was 46.3 mo $\pm$ 6.5 mo (57.2 mo $\pm$ 7.3 mo in group N vs 27.6 mo $\pm$ 4.2 mo in group A). No statistical differences were noted in life quality score and the results of esophageal manometry and ambulatory 24-h pH monitoring at 2 years of follow-up between the two groups.

CONCLUSION: Both laparoscopic Nissen fundoplication and anterior 180° fundoplication are effective for GERD. Anterior 180° fundoplication is associated with less postoperative adverse effects compared with Nissen fundoplication.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Laparoscopic Nissen fundoplication; Anterior 180° fundoplication

Cao ZG, Qin MF, Wang Q, Zhao HZ. Efficacy of laparoscopic Nissen fundoplication versus anterior 180° fundoplication in the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2594-2598

摘要

目的: 比较前180度折叠术与360度Nissen胃底折叠术的两年临床效果及术后并发症发生率。

方法: 2004-06/2008-05共409例重度胃食管反流病患者接受了腹腔镜前180度或Nissen胃底折叠术。对两组患者两年随访结果进行比较分析。

结果: 共253例患者接受了Nissen胃底折叠术(N组), 156例患者接受了180度前折叠术(A组)。N组和A组各有83例患者(47例腹胀和36例吞咽困难)和26例患者(16例腹胀和10例吞咽困难)出现术后胃肠功能障碍($P < 0.05$)。术后平均随访46.3 $\pm$ 6.5(24-92) mo。两组病例在术后两

■同行评议者

何裕隆, 教授, 中山大学附属第一医院胃肠胰脾外科

年生活质量评分、食管炎及24 h pH监测无显著差异。

结论: 两种折叠术式对改善大多数胃食管反流病患者生活质量, 控制反流的效果相当, 但前180度折叠较Nissen折叠对胃肠功能影响更小。

关键词: 胃食管反流病; 腹腔镜Nissen胃底折叠术; 前180度胃底折叠术

曹占国, 秦鸣放, 王庆, 赵宏志. Nissen胃底折叠术与前180度胃底折叠术的疗效比较. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2594-2598

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2594.asp>

0 引言

随着腹腔镜胃底折叠术逐步被推广应用, 外科治疗胃食管反流疾病越来越重要。腹腔镜360度Nissen胃底折叠术是被国内外多数学者所推崇的手术方式, 但其术后吞咽困难及腹胀的发生率相对较高。因此, 近年来出现了各种部分胃底折叠术, 临床报道证实前180度折叠术具有与360度Nissen胃底折叠术类似的临床效果并且术后吞咽困难及腹胀的发生率较小。本文研究比较两种术式的两年临床效果及两者对术后胃肠功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-06/2008-05在天津南开医院接受了腹腔镜前180度或360度Nissen胃底折叠术的重度胃食管反流疾病患者共409例。2006-08之前214例患者均接受了Nissen胃底折叠术。2006-08之后共156例患者接受了180度前折叠术, 39例患者接受了Nissen胃底折叠术(DeMeester评分>200且年龄<50岁)。其中男178例, 女231例, 年龄21-74(平均年龄 45.5 ± 1.6)岁。腹腔镜前180度组(A组)的平均年龄为 44.3 ± 2.1 (21-65)岁, 360度Nissen胃底折叠术组(N组)的平均年龄为 46.1 ± 1.3 (32-74)岁。多数患者以胸骨后烧灼感伴疼痛为主要症状, 其他症状有反流、消化不良、吞咽困难及呼吸道症状。患者从出现反流性食管炎症状到行外科手术的平均时长为 $76 \text{ mo} \pm 6.4 \text{ mo}$, 所有患者在接受手术治疗之前均至少口服质子泵抑制剂6(平均时长为 41 ± 8.7) mo。所有患者术前均进行了胃镜、食管测压及24 h pH监测等检查, 且所有患者均具有明确的手术适应证^[1,2]: 长期服药治疗无效者; 因药物依赖影响生活质量或出现药物不良反应者; 无法耐受终生

表 1 患者术前临床症状 $n(\%)$

临床症状	总例数 ($n = 409$)	N组 ($n = 253$)	A组 ($n = 156$)
烧心	344(84.1)	211(83.4)	133(85.3)
反流	287(70.2)	180(71.4)	107(68.6)
胸骨后疼痛	47(11.5)	26(10.3)	21(13.5)
吞咽困难	20(4.9)	14(5.5)	6(3.8)
哮喘	11(2.7)	5(1.8)	6(3.8)

服药者; 规律服药但出现反流相关并发症者(食管炎、食管狭窄及Barrett's食管)及伴有食管裂孔疝者。

1.2 方法

1.2.1 临床症状: 所有患者在术前均进行了生活质量评价(gastrointestinal quality of life index GIQLI)^[3]见表1。

1.2.2 胃镜检查: 按照Savary-Miller指南^[4]对所有患者食管炎情况进行胃镜下分级, 其中0级66例(16.1%), 1级150例(36.7%), 2级99例(24.2%), 3级51例(12.5%), 4级23例(5.6%), Barrett's食管20例(4.9%)。236例(57.7%)患者伴有食管裂孔疝, 其中47例(11.5%)患者伴有巨大裂孔疝。

1.2.3 食管测压: 所有患者在行食管测压前禁食12 h, 并停用质子泵抑制剂5 d以上。其中311例(76.1%)患者术前食管下括约肌压力<15 mmHg, 94例(23.0%)患者食管下端蠕动压<35 mmHg。

1.2.4 24 h pH监测: 所有患者在行食管测压前禁食12 h, 并停用质子泵抑制剂5-7(平均6.6) d。349例(85.3%)患者术前DeMeester评分>15(平均 56.7 ± 13.8), 其中N组221例(87.4%)患者术前DeMeester评分>15(平均 58.4 ± 11.7)及A组128例(82.1%)患者术前DeMeester评分>15(平均 53.9 ± 15.8 , 表2)。

统计学处理 数值表达方式为mean $\pm$ SD, 所有数据采用 t -test及卡方检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

两组病例术前在年龄、性别、患者病程、内科治疗、临床症状(表1)、食管测压及24 h pH监测上无统计学差异。术前所有患者均接受过至少6 mo正规内科治疗且既往未接受过抗反流手术。术前胃镜证实N组和A组病例分别有200例(79.1%)和123例(78.8%)患者具有食管炎, 有8例(3.2%)和12例(7.7%)具有Barrett's食管。患者术前平均食管下括约肌压力为 $11.4(0-41)$ mmHg及术

■ 相关报道

Wong等经大宗随机对照研究结果证实前180度胃底折叠术抗酸反流效果较为理想, 与Nissen胃底折叠术短期控制酸反流效果相同。

■创新盘点

在我国,目前大多数医院多选用360度Nissen胃底折叠术,很少有部分胃底折叠术的报道,更缺乏部分胃底折叠术与360度Nissen胃底折叠术的对比研究。本文研究比较两种术式的两年临床效果及两者对术后胃肠功能的影响。

表 2 患者术前食管炎分级、食管测压及24 h pH监测 *n*(%)

	总例数 (<i>n</i> = 409)	N组 (<i>n</i> = 253)	A组 (<i>n</i> = 156)
食管炎分级			
0级	66(16.1)	45(17.8)	21(13.5)
1级	150(36.7)	77(30.4)	53(34.0)
2级	99(24.2)	64(25.3)	45(28.8)
3级	51(12.5)	46(18.2)	15(9.6)
4级	23(5.6)	13(5.1)	10(6.4)
Barrett's	20(4.9)	8(3.2)	12(7.7)
食管下括约肌压			
正常	98(23.9)	52(20.6)	46(29.5)
降低	311(76.1)	201(79.4)	110(70.5)
食管蠕动压			
正常	315(77.0)	203(80.3)	112(71.8)
降低	94(23.0)	50(19.8)	44(28.2)
DeMeester评分			
正常	60(14.7)	33(13.0)	27(17.3)
>15	349(85.3)	221(87.4)	128(82.1)
食管裂孔疝			
有	236(57.7)	143(56.5)	93(59.6)
无	362(88.5)	233(92.1)	129(82.7)

前平均食管下括约肌长度为1.2(0-4) cm。N组221例(87.4%)及A组128例(82.1%)患者术前24 h pH监测>15。N组和A组的平均手术时间分别为116 min±8 min和96 min±5 min($P<0.05$), N组和A组术后平均住院时间分别为3.6 d和3.4(2-21) d。N组及A组术后分别有3例(1例食管后壁穿孔、1例胃壁穿孔和1例胃短血管出血)和2例患者出现手术相关并发症(2例食管后壁穿孔), 无死亡及术中中转开腹病例。N组出现术后早期腹胀及吞咽困难的病例分别为47例(18.6%)和34例(13.4%), A组出现术后早期腹胀及吞咽困难的病例分别为16例(10.3%)和10例(6.4%), 其中N组有4例患者因严重吞咽困难进行了胃镜扩张治疗, 1例因经胃镜扩张后仍存在吞咽困难而进行了再次腹腔镜手术将360度Nissen胃底折叠术改为前180度折叠术, 术后未在出现吞咽困难(表3)。

术后平均随访时间为24-92(46.3±6.5) mo, N组平均随访25-92(57.2±7.3) mo, A组平均随访24-41(27.6±4.2) mo。N组中共有218例(86.2%)患者及A组共有140例(89.7%)患者完成两年及以上随访。在所有完成两年随访的患者均进行了生活质量评估, 其中N组中194例(89.1%)患者及A组中119例(85.0%)患者烧心及反酸症状消失, 两组中有每周小于1次反酸和/或烧心症状者为18例(8.3%)及15例(10.7%)。术后仍口服质子泵

表 3 术后两组患者发生腹胀及吞咽困难的比较 *n*(%)

	N组(<i>n</i> = 253)	A组(<i>n</i> = 156)	<i>P</i> 值
吞咽困难	34(13.4)	10(6.4)	0.026
术后腹胀	47(18.6)	16(10.3)	0.024

抑制剂的患者两组均为22例(10.1%, 15.7%), 其中N组中有2例术后间断反酸患者因症状较轻未服用质子泵抑制剂, A组中1例患者术后虽然无反流及烧心症状, 仍间断服用药物。在所有完成2年随访的患者中, N组中有175例(80.3%)和182例(83.5%)患者分别进行了胃镜检查及24 h pH监测, A组中有112例(80%)和123例(87.9%)患者分别进行了胃镜检查及24 h pH监测, 其中N组术前DeMeester评分从平均为58.4±11.7下降为12.3±6.2, A组从术前53.9±15.8下降为14.6±5.8($P>0.05$)。食管炎表现有不同程度减轻(表4)。

3 讨论

在欧美等发达国家反流性食管炎的发病率约为10%^[5,6], 在我国发病率大约为6%^[7,8]并呈逐年上升趋势, 因此反流性食管炎的治疗也越来越为我国的医疗工作者所重视。近年来随着腹腔镜技术的发展, 外科手术已成为治疗中、重度反流性食管炎的首选治疗方式。在欧美国家360度Nissen胃底折叠术是目前应用最广泛的手术方式, 但其术后吞咽困难、腹胀等胃肠功能障碍症状发生率较高。近年来外科医生正在寻求一种效果良好而对胃肠功能影响更小的手术方式, 因此产生了各种部分胃底折叠术。在我国, 该手术发展较晚, 目前大多数医院多选用360度Nissen胃底折叠术, 很少有部分胃底折叠术的报道, 更缺乏部分胃底折叠术与360度Nissen胃底折叠术的对比研究。

Nissen胃底折叠术对90%以上的患者中远期效果良好^[9,10], 目前已被临床广泛应用, 但术后吞咽困难、腹胀、嗝气困难等胃肠功能障碍症状却是困扰着临床医生和患者的一道难题, 也成为影响术后患者生活质量, 降低患者对手术满意度的主要原因。天津南开医院微创外科中心已开展Nissen胃底折叠术6年, 其5年有效率可达85%以上, 术后早期吞咽困难、腹胀的发生率达15%左右。为解决上述问题, 国外一些医学中心^[11,12]已开展了部分胃底折叠术, 其中远期临床效果与Nissen胃底折叠术相似, 而术后吞咽困难、腹胀等发生率较低。Wong等^[13]经大宗随机

表 4 两组患者术前、术后两年胃镜检查比较 $n(\%)$

食管炎	术前			术后		
	≤1级	≥2级	Barrett's	≤1级	≥2级	Barrett's
N组($n = 175$)	77(44.0)	93(53.1)	5(2.9)	142(81.1)	31(17.8)	2(1.1)
A组($n = 112$)	46(41.1)	56(50.0)	10(8.9)	83(74.1)	24(21.4)	5(4.5)
P 值	0.625	0.603	0.047	0.158	0.435	0.165

■同行评价

本文创新性较强, 具有一定的临床指导价值。

对照研究结果证实前180度胃底折叠术抗酸反流效果较为理想, 与Nissen胃底折术短期控制酸反流效果相同。天津南开医院微创外科中心于2006年底开展前180度折叠术。在我们完成两年及以上随访的患者中, 其有效率达85%左右, 而术后早期吞咽困难、腹胀的发生率较前者降低。

本研究术者体会腹腔镜前180度胃底折叠手术操作相对简单、易于掌握、手术时间短, 术中折叠胃可于直视下完成, 通常不需分离胃短血管、折叠胃无张力, 避免了胃、食管及脾损伤, 上述因素可能对减少术后吞咽困难、腹胀的发生具有一定意义。腹腔镜前180度胃底折叠术属于新术式, 目前虽有一些否定的研究结论, 但已有较多的研究肯定了他的长期抗酸反流效果和患者满意度, 受到一定程度的关注^[14]。相对于Nissen胃底折叠术, 前180度胃底折叠术对伴有食管运动功能紊乱的患者术后改善率更高, 因此, 术前评估患者食管和食管下端括约肌功能、食管运动功能, 有助于选择不同的术式^[15,16]。

我们认为不能为了选择某种术式而以牺牲长期抗酸反流效果为代价, 即使一些医生在抗反流手术中长期首选该术式, 但也不能盲目、不加选择的对所有患者实施同一种术式, 而应当针对每例患者的具体特点量体裁衣选择最好的术式。在我们的研究中, 为保证长期有效的抗反流效果, 39例年轻严重反流患者接受了Nissen胃底折叠术(DeMeester评分>200且年龄<50岁)。

前180度折叠术在改善患者反流症状上可达到或接近与360度Nissen胃底折叠术相近的效果, 而术后早期胃肠功能紊乱症状较后者减少。但在我们的研究中, 前180度折叠术后随访时间较短, 其远期效果还有待于进一步的随访证实。

4 参考文献

- 1 Klaus A, Gadenstaetter M, Mühlmann G, Kirchmayr W, Profanter C, Achem SR, Wetscher GJ. Selection of patients with gastroesophageal reflux disease for antireflux surgery based on esophageal manometry. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1719-1722
- 2 Lund RJ, Wetscher GJ, Raiser F, Glaser K, Perdakis

- G, Gadenstätter M, Katada N, Filipi CJ, Hinder RA. Laparoscopic Toupet fundoplication for gastroesophageal reflux disease with poor esophageal body motility. *J Gastrointest Surg* 1997; 1: 301-308; discussion 308
- 3 Wetscher GJ, Glaser K, Wieschemeyer T, Gadenstaetter M, Prommegger R, Profanter C. Tailored antireflux surgery for gastroesophageal reflux disease: effectiveness and risk of postoperative dysphagia. *World J Surg* 1997; 21: 605-610
- 4 Jobe BA, Wallace J, Hansen PD, Swanstrom LL. Evaluation of laparoscopic Toupet fundoplication as a primary repair for all patients with medically resistant gastroesophageal reflux. *Surg Endosc* 1997; 11: 1080-1083
- 5 Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005; 54: 710-717
- 6 Moraes-Filho JP. Gastroesophageal reflux disease: prevalence and management in Brazil. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18 Suppl: 23-26
- 7 Chen M, Xiong L, Chen H, Xu A, He L, Hu P. Prevalence, risk factors and impact of gastroesophageal reflux disease symptoms: a population-based study in South China. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 759-767
- 8 Fock KM, Poh CH. Gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol* 2010 Jun 29. [Epub ahead of print]
- 9 Robertson AG, Dunn LJ, Shenfine J, Karat D, Griffin SM. Randomized clinical trial of laparoscopic total (Nissen) versus posterior partial (Toupet) fundoplication for gastro-oesophageal reflux disease based on preoperative oesophageal manometry (Br J Surg 2008; 95: 57-63). *Br J Surg* 2008; 95: 799; author reply 799-800
- 10 Mark LA, Okrainec A, Ferri LE, Feldman LS, Mayrand S, Fried GM. Comparison of patient-centered outcomes after laparoscopic Nissen fundoplication for gastroesophageal reflux disease or paraesophageal hernia. *Surg Endosc* 2008; 22: 343-347
- 11 Rice S, Watson DI, Lally CJ, Devitt PG, Game PA, Jamieson GG. Laparoscopic anterior 180 degrees partial fundoplication: five-year results and beyond. *Arch Surg* 2006; 141: 271-275
- 12 Zügel N, Jung C, Bruer C, Sommer P, Breitschaft K. A comparison of laparoscopic Toupet versus Nissen fundoplication in gastroesophageal reflux disease. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 386: 494-498
- 13 Wong AS, Myers JC, Jamieson GG. Esophageal pH profile following laparoscopic total fundoplication compared to anterior fundoplication. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1341-1345
- 14 Jamieson GG. [Results of laparoscopic antireflux surgery at five years and beyond] *Bull Acad Natl Med* 2005; 189: 1519-1525; discussion 1526-1527
- 15 el-Sherif AE, Adusumilli PS, Pettiford BL, d'Amato

TA, Schuchert MJ, Clark A, DiRenzo C, Landreneau JP, Luketich JD, Landreneau RJ. Laparoscopic clam shell partial fundoplication achieves effective reflux control with reduced postoperative dysphagia and

gas bloating. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 1704-1709
16 Böttger T, Terzic A, Müller M. [Laparoscopic Dor-hemifundoplication for therapy of gastroesophageal reflux disease] *Zentralbl Chir* 2006; 131: 376-382

编辑 曹丽鸥 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.

hMLH1及hPMS2 mRNA在胃癌组织中荧光定量RT-PCR的检测及其临床意义

潘光松, 刘希双, 杨堃

潘光松, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科 山东省青岛市 266003

杨堃, 青岛大学医学院附属医院中心实验室 山东省青岛市 266003

青州市科技计划基金资助项目, No. 06-2-2-5-nsh-3

作者贡献分布: 本课题由潘光松、刘希双及杨堃设计; 研究过程由潘光松实施; 研究器材及技术支持由杨堃提供; 数据分析及论文写作由潘光松与刘希双完成。

通讯作者: 刘希双, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科。

liuxishuang1@sina.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2010-04-21 修回日期: 2010-06-18

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-08-28

Clinical significance of detection of hMLH1 and hPMS2 mRNA expression in gastric cancer by real-time fluorescent quantitative RT-PCR

Guang-Song Pan, Xi-Shuang Liu, Kun Yang

Guang-Song Pan, Xi-Shuang Liu, Center for Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Kun Yang, Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program Foundation of Qingdao, No. 06-2-2-5-nsh-3

Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Center for Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2010-04-21 Revised: 2010-06-18

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of DNA mismatch repair genes hMLH1/hPMS2 and to analyze their clinical significance in gastric cancer.

METHODS: The expression of hMLH1/hPMS2 mRNAs in 40 specimens of gastric cancer and cancer-adjacent mucosa tissue and 21 specimens of chronic gastritis tissue was detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The human glyceraldehydes-3-phosphate dehydro-

genase (hGAPDH) gene was used for normalization of gene expression levels.

RESULTS: The level of hMLH1 mRNA in gastric cancer was significantly higher than those in cancer-adjacent mucosa tissue and chronic gastritis tissue (7.23 ± 11.91 vs 3.80 ± 5.13 and 2.01 ± 1.25 , respectively; both $P < 0.05$). The level of hMLH1 mRNA was significantly higher in cancer-adjacent mucosa tissue than in chronic gastritis tissue ($P < 0.05$). The level of hPMS2 mRNA was significantly higher in gastric cancer and cancer-adjacent mucosa tissue than in chronic gastritis tissue (0.43 ± 0.35 and 0.55 ± 0.39 vs 0.32 ± 0.15 , respectively; both $P < 0.05$). No significant difference was noted in the level of hPMS2 mRNA between gastric cancer and cancer-adjacent mucosa tissue. The expression levels of hMLH1/hPMS2 mRNAs in gastric cancer showed no significant correlation with tumor size, infiltration degree, and lymph node metastasis. However, the expression level of hMLH1 mRNA was significantly higher in gastric cancer with lymph node metastasis than in that without lymph node metastasis (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression levels of hMLH1/hPMS2 gene in gastric cancer and cancer-adjacent mucosa tissue are abnormal when compared with that in chronic gastritis. Abnormal transcription of hMLH1/hPMS2 may be related with the genesis of gastric cancer, but not involved in the progression of the disease.

Key Words: hMLH1 mRNA; hPMS2 mRNA; Gastric cancer; DNA mismatch repair gene; Real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Pan GS, Liu XS, Yang K. Clinical significance of detection of hMLH1 and hPMS2 mRNA expression in gastric cancer by real-time fluorescent quantitative RT-PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2599-2603

摘要

目的: 探讨DNA错配修复基因hMLH1及hPMS2在胃癌组织中的表达水平及其临床

■背景资料

DNA错配修复(MMR)基因是生物进化过程中的保守基因, 具有修复DNA错配、增强DNA复制忠实性、维持基因组稳定, 降低自发性突变的功能。MMR发生异常时, 无法修复DNA复制过程中出现的碱基错配, 造成细胞内遗传物质突变率增加, 产生遗传不稳定性, 最终引起细胞恶性转化。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研究前沿

hMLH1基因改变与胃癌发生密切相关, hPMS2基因改变在胃癌发生中的作用亦逐渐受到重视, 亟待研究探讨其能否成为早期诊断胃癌的确切指标。

意义。

方法: 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对40例胃癌患者的癌组织、40例癌旁胃炎组织及21例慢性胃炎患者的慢性胃炎组织hMLH1 mRNA及hPMS2 mRNA进行定量检测, 以三磷酸甘油醛脱氢酶基因(hGAPDH)为内参照。

结果: 胃癌组织、癌旁组织、慢性胃炎组织中hMLH1 mRNA的相对含量分别是 7.23 ± 11.91 , 3.80 ± 5.13 , 2.01 ± 1.25 , 三组相比差异有统计学意义($F = 3.272$, 均 $P = 0.042$), 胃癌组织中hMLH1 mRNA含量明显高于其他两组, 癌旁组织中含量明显高于慢性胃炎组织中的含量(均 $P < 0.05$); 各组织中hPMS2 mRNA的相对含量分别是 0.43 ± 0.35 , 0.55 ± 0.39 , 0.32 ± 0.15 , 3组相比差异有统计学意义($F = 3.349$, 均 $P = 0.039$), 胃癌组织与癌旁组织中hPMS2 mRNA的含量差异无统计学意义, 但均高于慢性胃炎组织中的含量(均 $P < 0.05$)。除hMLH1 mRNA含量在有、无淋巴结转移的胃癌组织中有显著差异(均 $P < 0.05$)外, 在胃癌组织中hMLH1 mRNA及hPMS2 mRNA相对含量受肿瘤直径、浸润深度、淋巴结转移的影响不大(均 $P > 0.05$)。

结论: 胃癌组织和癌旁组织与慢性胃炎组织相比存在hMLH1及hPMS2 mRNA转录差异, 这种基因的转录差异可能与胃癌的发生有关, 而与胃癌的发展关系不显著。

关键词: hMLH1 mRNA; hPMS2 mRNA; 胃癌; DNA错配修复基因; 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应

潘光松, 刘希双, 杨堃. hMLH1及hPMS2 mRNA在胃癌组织中荧光定量RT-PCR的检测及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2599-2603
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2599.asp>

0 引言

胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率长期居消化系肿瘤之首, 他的发生及发展是一个涉及多基因、多步骤的复杂过程。其中错配修复基因(mismatch repair genes, MMR genes)属管家基因, 负责对细胞内错配碱基进行修复, 其中任何一个或多个的变异都会引起DNA错配修复错误致肿瘤易感^[1,2]。本研究采用实时荧光定量RT-PCR技术检测在人胃癌、癌旁及慢性胃炎组织中hMLH1及hPMS2 mRNA的相

对含量水平, 探讨hMLH1及hPMS2基因与胃癌发生、发展的关系, 进一步了解胃癌发生发展的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-01/2008-06青岛大学医学院附属医院外科手术切除的胃癌组织40例, 男29例, 女11例, 年龄36-79(平均年龄60.5)岁, 术前未经放、化疗。每例均取相应癌旁组织, 即距离癌组织边缘 >5 cm的胃黏膜组织, 其中浅表性胃炎17例, 萎缩性胃炎23例。胃镜活检21例慢性胃炎组织(每例以活检钳取3块), 其中浅表性胃炎10例, 萎缩性胃炎11例, 男11例, 女10例, 年龄31-76(平均年龄50.19)岁。将新鲜组织置液氮速冻后存于 -70°C 冰箱备用。全部病例均经病理检验证实。引物采用fastPCR设计, hMLH1上游引物为5'-TCTCAGGCCAGCAGAGTGAA-3', 下游引物为5'-TGTGTGAGCGCAAGGCTT-TA-3', PCR产物为93 bp; hPMS2上游引物为5'-GCACTGAGCGATGTCACCATT-3', 下游引物为5'-TTCCTTATGGCGCACAGGTAGT-3', PCR产物长度为171 bp; 内参三磷酸甘油醛脱氢酶(hGAPDH)上游引物为5'-TCATGGGTGT-GAACCATGAGAA-3', 下游引物为5'-GGCATG-GACTGTGGTCATGAG-3', PCR产物长度为146 bp, 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。hMLH1的TaqMan荧光探针序列为5'(FAM)-AACTCCTGGAAGTGGACTGTGGAACACA T(TAMRA)-3', hPMS2的TaqMan荧光探针序列为5'(FAM)-TATCCAGAAAACCCCTAC CCCC GC(TAMRA)-3', 内参hGAPDH的Taq-Man荧光探针序列为5'(FAM)-TCATCAGCAAT GCCTCCTGCACCA(TAMRA)-3'均由宝生物工程(大连)有限公司合成。总RNA提取及荧光定量RT-PCR试剂购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法 采用TRIzol法提取总RNA。10 μL 逆转录反应体系: 5 $\times$ PrimeScriptTM Buffer 2 μL , PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer 0.5 μL , Random 6 mers 0.5 μL , Total RNA 2 μL , RNase Free dH₂O 4.5 μL 。反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s, -20°C 保存备用。20 μL PCR反应体系: Premix Ex TaqTM 10 μL , PCR Forward Primer(6 $\mu\text{mol/L}$)0.7 μL , PCR Reverse Primer(6 $\mu\text{mol/L}$)0.7 μL , 荧光探针溶液0.8 μL , 模板(cDNA溶液)2 μL , dH₂O 5.8 μL 。PCR扩增条件: 95°C 10 min预变性; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 共40

表 1 不同胃黏膜组织中hMLH1、hPMS2 mRNA相对含量水平 (mean ± SD)

分组	n	hMLH1 mRNA	t值	P值	hPMS2 mRNA	t值	P值
胃癌组	40	7.23 ± 11.91	3.272	0.042	0.43 ± 0.35	3.349	0.039
癌旁组	40	3.80 ± 5.13			0.55 ± 0.39		
慢性胃炎组	21	2.01 ± 1.25			0.32 ± 0.15		

■创新盘点

本研究采用实时荧光定量RT-PCR技术对hMLH1及hPMS2 mRNA水平进行检测, 较传统PCR技术更为精确。

表 2 不同临床参数中胃癌组织hMLH1 mRNA含量水平 (mean ± SD)

临床参数	n	hMLH1 mRNA水平	t值	P值
肿瘤大小(cm)				
>5	27	8.53 ± 13.76	0.992	0.056
<5	13	4.54 ± 6.25		
浸润深度				
浆膜外	34	8.27 ± 12.66	1.321	0.053
浆膜内	6	1.36 ± 1.06		
淋巴结转移				
有	32	8.55 ± 12.99	1.423	0.031
无	8	1.94 ± 1.84		

表 3 不同临床参数中胃癌组织hPMS2 mRNA含量水平 (mean ± SD)

临床参数	n	hMLH2 mRNA水平	t值	P值
肿瘤大小(cm)				
>5	27	0.33 ± 0.28	2.730	0.292
<5	13	0.63 ± 0.39		
浸润深度				
浆膜外	34	0.42 ± 0.37	0.172	0.130
浆膜内	6	0.45 ± 0.20		
淋巴结转移				
有	32	0.42 ± 0.36	0.182	0.498
无	8	0.45 ± 0.31		

个循环. 采用LightCycler Real-Time PCR仪进行反应. 反应结束后, 由LightCycler Real-Time PCR软件自动记录荧光曲线并分析计算出Ct值. 以hGAPDH作为内对照, 检测被测样品RNA的完整性和可靠性. 结果的计算: $\Delta\Delta Ct = (\text{样品Ct均值} - \text{内参照Ct均值}) - (\text{对照样品Ct均值} - \text{对照内参照Ct均值})$, 然后取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即代表被检样品初始hMLH1及hPMS2 mRNA的含量.

统计学处理 采用SPSS11.5软件处理系统进行统计学分析. hMLH1 mRNA、hPMS2 mRNA的相对含量以mean ± SD表示. 统计学方法采用单因素方差分析及t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

胃癌组织、癌旁组织及非胃癌患者的慢性胃炎组织中hMLH1 mRNA、hPMS2 mRNA相对含量见图1, 表1.

hMLH1 mRNA含量在胃癌组织中>癌旁组织>非胃癌患者慢性胃炎组织, 两两比较均有统计学意义($t = 2.665, 2.669, 2.005, P = 0.010, 0.009, 0.042$), 3组相比有统计学意义(均 $P < 0.05$).

hPMS2 mRNA含量在胃癌组织与癌旁组织中均高于非胃癌患者慢性胃炎组织, 差异有统计学意义($t = 2.391, 2.555, P = 0.020, 0.013$), 但胃癌组织与癌旁组织中hPMS2 mRNA的含量差异无统计学意义($t = 1.497, P = 0.138$). 3组相比

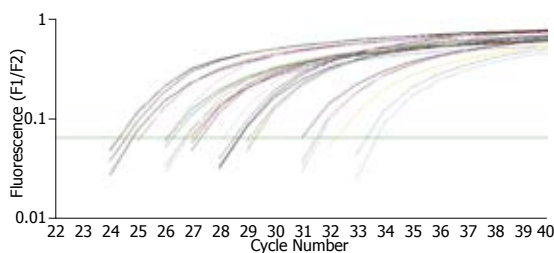


图 1 实时荧光扩增曲线.

差异有统计学意义(均 $P < 0.05$).

胃癌组织中hMLH1 mRNA含量水平受肿瘤大小、浸润程度影响不大(均 $P > 0.05$), 与淋巴结转移有关($P < 0.05$, 表2); hPMS2 mRNA含量水平受肿瘤大小、浸润程度、有无淋巴结转移影响不大(均 $P > 0.05$, 表3).

3 讨论

DNA错配修复基因是一组保守基因, 具有修复DNA错配、维持基因组稳定降低自发性突变的功能^[3,4]. 目前从人体细胞中共分离克隆到9个MMR基因, 其通过编码不同的MMR蛋白, 特异性识别并修复错配碱基, 保持遗传物质的稳定性^[5], 并能够诱导受到DNA严重损伤的细胞凋亡^[6]. hMLH1是最先发现的错配修复基因之一, 与肿瘤关系密切^[7]. hMLH1在执行错配修复功能时与hPMS2构成异源二聚体hMutL α , 具有提高与错配位点结合效率的功能, 对hMutS α 具有辅助作

■同行评价

本文设计合理, 创新性尚可, 有一定的可读性.

用, 同时hPMS2基因也通过介导DNA损伤细胞的凋亡发挥抗肿瘤作用^[8-10].

一般认为错配修复基因表达减少会引起错配修复功能下降或缺失, 进而导致DNA复制时产生的错配碱基因得不到修复而发生积累, 最后使细胞发生癌变. 但是一些恶性肿瘤如胶质母细胞瘤、支气管肺泡细胞癌、膀胱癌、子宫内膜癌, 却出现hMLH1或hMSH2表达增加^[11-13]. 亦有多项研究证实, 在胃癌组织中hMLH1启动子区的甲基化导致hMLH1基因失活, 使组织中仅表达少量的hMLH1蛋白^[14,15]. 但本研究结果显示, hMLH1 mRNA、hPMS2 mRNA含量在胃癌及癌旁组织中均明显高于非胃癌患者胃炎组织中含量, 提示胃癌及癌旁组织中hMLH1、hPMS2基因转录增加. hMLH1、hPMS2基因在胃癌及癌旁组织中不但没有失活或表达减少, 反而存在过度激活和表达增多的现象. 有学者认为肿瘤细胞过度增殖时会伴有DNA碱基错配增多, 从而引起错配修复蛋白代偿性表达增多^[16]. 但错配修复蛋白的高表达是否代表错配修复功能的增强尚不清楚. hMLH1、hPMS2基因过度激活的机制亦可能为: 机体细胞在正常生理状态下, 不存在遗传物质的变异, 所以hMLH1、hPMS2基因处于低转录状态. 细胞在增殖过程中一旦出现遗传物质的错配, hMLH1、hPMS2基因则被激活, 修复错配的基因, 但hMLH1、hPMS2基因可能存在突变产生不全蛋白导致错配基因不能修复^[17], 从而形成恶性循环, 导致hMLH1、hPMS2 mRNA含量增加. 有研究指出hMLH1基因在遗传性非息肉性结肠癌(hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC)、胃癌中存在多位点的突变^[18-20]. 也有研究提出hPMS2基因在乳腺癌组织中发生移码或点突变, mRNA出现错误, 产生缺陷蛋白最终导致不能修复错配基因, 其研究结果^[21]亦支持上述推论. 但胃癌组织中hMLH1、hPMS2基因过度激活的具体机制仍有待进一步研究. 癌旁组织细胞与癌细胞处于同一机体, 有着同样的遗传背景, 受到同样的环境刺激, 有着同样基因突变的积累, 被看做肿瘤易发组织^[22,23]. 本研究显示癌旁组织中hMLH1 mRNA、hPMS2 mRNA含量明显高于非胃癌患者的慢性胃炎组织, 更接近甚至高于胃癌组织中含量, 提示hMLH1及hPMS2基因转录异常积累到一定水平后可能诱发组织向癌的演变, 与肿瘤发生密切相关, 但其作用机制尚不明确, 有待于进一步研究. 这可能是胃癌术后残胃癌的发生机制之一,

对胃癌术后患者定期复查残胃组织中hMLH1、hPMS2 mRNA含量, 有望早期发现残胃的癌变, 以便早期进行治疗.

胃癌的发生是一个漫长过程, 一般认为胃癌的发生过程是从正常胃黏膜细胞经内外环境因素作用发展到慢性胃炎进而到胃癌前病变, 包括肠上皮化生、腺瘤和不典型增生, 经过一系列基因突变的积累最终导致胃癌的发生^[24]. 本研究中hMLH1 mRNA在慢性胃炎组织、癌旁组织及癌组织中的含量逐渐增加, 亦即随着组织损伤的加重, hMLH1基因转录异常增加, 反映了异常基因的积累促使癌发生进展. hPMS2 mRNA表达情况与hMLH1 mRNA类似, 癌旁组织与癌组织中差异不显著, 但均显著高于非胃癌患者慢性胃炎组织中的含量. hMLH1 mRNA及hPMS2 mRNA受肿瘤组织的直径、浸润程度及淋巴结转移影响不大(均 $P>0.05$), 仅hMLH1 mRNA在有淋巴结转移时表达更高($P<0.05$). 提示hPMS2基因转录失调可能只与肿瘤的发生有关, 与肿瘤的发展关系不大; hMLH1基因转录失调不仅与肿瘤的发生相关, 还与淋巴结转移有关. 因此应用实时荧光定量RT-PCR技术对hPMS2 mRNA进行定量检测有望对胃癌的发生起到警示作用. 对hMLH1 mRNA的检测可对胃癌术前患者有无淋巴结转移进行初步评估.

hMLH1基因改变与胃癌发生密切相关, hPMS2基因改变在胃癌发生中的作用亦逐渐受到重视, 但对其机制了解尚不完全明确, 仍需进一步研究, 可对其进行基因测序及蛋白质表达水平测定.

4 参考文献

- 1 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 2 Buermeier AB, Deschênes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 533-564
- 3 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47
- 4 Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1451-1457
- 5 余细球. 错配修复基因与消化道肿瘤. 国外医学·消化系疾病分册 2002; 22: 182-184
- 6 Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*

- 1995; 332: 305-311
- 7 Fishel R, Ewel A, Lee S, Lescoe MK, Griffith J. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science* 1994; 266: 1403-1405
- 8 Gras E, Catasus L, Argüelles R, Moreno-Bueno G, Palacios J, Gamallo C, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability, MLH-1 promoter hypermethylation, and frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in ovarian tumors. *Cancer* 2001; 92: 2829-2836
- 9 Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* 2000; 24: 27-35
- 10 Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JY. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2420-2425
- 11 Srivastava T, Chattopadhyay P, Mahapatra AK, Sarkar C, Sinha S. Increased hMSH2 protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2004; 66: 51-57
- 12 Aubry MC, Halling KC, Myers JL, Tazelaar HD, Yang P, Thibodeau SN. DNA mismatch repair genes hMLH1, hMSH2, and hMSH6 are not inactivated in bronchioloalveolar carcinomas of the lung. *Cancer* 2001; 92: 2898-2901
- 13 Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, Saboorian MH, McConnell JD, Sagalowsky AI. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer* 2000; 88: 2333-2341
- 14 Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-1095
- 15 Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-164
- 16 Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem* 2000; 275: 18424-18431
- 17 Yao Y, Tao H, Kim JJ, Burkhead B, Carloni E, Gasbarrini A, Sepulveda AR. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Lab Invest* 2004; 84: 915-922
- 18 De Rosa M, Fasano C, Panariello L, Scarano MI, Belli G, Iannelli A, Ciciliano F, Izzo P. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19: 1719-1723
- 19 王朝夫, 周晓燕, 张太明, 孙孟红, 徐烨, 施达仁. MLH1、MSH2基因mRNA突变分析与遗传性非息肉性结直肠癌的基因诊断. *中华医学遗传学杂志* 2006; 23: 32-36
- 20 房殿春, 罗元辉, 李小安, 凌贤龙, 杨仕明, 方丽, 汪荣泉. 胃癌错配修复基因hMLH1突变和启动子甲基化与基因不稳的关系. *中华消化杂志* 2002; 22: 327-330
- 21 Balogh GA, Heulings RC, Russo J. The mismatch repair gene hPMS2 is mutated in primary breast cancer. *Int J Mol Med* 2006; 18: 853-857
- 22 Sipponen P. Atrophic gastritis as a premalignant condition. *Ann Med* 1989; 21: 287-290
- 23 Correa P. Chronic gastritis as a cancer precursor. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984; 104: 131-136
- 24 Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001; 204: 49-95

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 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人, 全部为副教授及副主任医师以上。WCJD编委会审稿费结算工作于次年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费费用, 共计40 850元, 数据以稿件审回日期为准。WCJD共计审稿1 418篇, 其中送审专家377位, 共计送审次数2 094次, 成功审回次数1 634, 成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为: 西安交通大学医学院第二附属医院感染科双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位, 各17篇; 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位, 16篇; 中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位, 各15篇。

WCJD编辑部感谢各位编委2009年对WCJD工作的支持, 同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款, 如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差, 请各位编委与编辑部联系, 联系电话: 010-85381892, 联系人: 李军亮。(编辑部主任: 李军亮 2010-04-20)

家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异的调查

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王 台, 任迎全

■背景资料

临床上应用核苷类似物(特别是拉米夫定)进行抗HBV治疗之后易出现HBV P基因的YMDD变异,但HBV P基因也可发生未经抗病毒治疗情况下的YMDD自然变异。主要是由于HBV在复制过程中要经逆转录形成HBV DNA的负链,这一过程是在HBV聚合酶逆转录功能区的指导下完成的,由于HBV聚合酶逆转录功能区不具有校正功能,所以HBV在复制过程中具有较高的自然变异率。

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王台, 任迎全, 延安大学附属医院感染病科 陕西省延安市 716000

延安市科技计划基金资助项目, No. 2007

作者贡献分布: 屈军校与曾庆磊对此文所作贡献均等; 本文由屈军校、徐光华及任迎全设计; 实验操作由冯继红与曾庆磊完成; 部分病例资料由刘志刚、赵培东、高晓红及王台提供; 数据分析和论文写作由曾庆磊完成。

通讯作者: 徐光华, 教授, 主任医师, 716000, 陕西省延安市, 延安大学附属医院感染病科. yaxugh@yahoo.com.cn

电话: 0911-2881196

收稿日期: 2010-04-25 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Spontaneous HBV YMDD motif mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection

Jun-Xiao Qu, Qing-Lei Zeng, Zhi-Gang Liu, Guang-Hua Xu, Ji-Hong Feng, Pei-Dong Zhao, Xiao-Hong Gao, Tai Wang, Ying-Quan Ren

Jun-Xiao Qu, Qing-Lei Zeng, Zhi-Gang Liu, Guang-Hua Xu, Ji-Hong Feng, Pei-Dong Zhao, Xiao-Hong Gao, Tai Wang, Ying-Quan Ren, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Supported by: the Science and Technology Program Foundation of Yan'an, No. 2007

Correspondence to: Professor Guang-Hua Xu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China. yaxugh@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-25 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To survey the spontaneous hepatitis B virus (HBV) YMDD mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection.

METHODS: Ninety-five chronic hepatitis B (CHB) patients, who came from 34 CHB cluster families and did not underwent treatment with any antiviral drugs, and 82 sporadic CHB patients, who did not underwent treatment with any antiviral drugs, were included in this study. YMDD mutations were detected and compared between the two groups of patients.

RESULTS: Of the 95 patients with familial clus-

tering of chronic HBV infection, spontaneous YMDD variants were detected in 51 patients (53.68%). Of the 82 sporadic CHB patients, YMDD variants were detected in 21 patients (25.61%). The detection rate of spontaneous YMDD mutations was significantly higher in CHB patients with familially clustering than in sporadic CHB patients ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The detection rate of spontaneous YMDD mutations is higher in CHB patients with familially clustering than in those without familially clustering.

Key Words: Chronic hepatitis B; Familial clustering; Spontaneous YMDD motif mutation

Qu JX, Zeng QL, Liu ZG, Xu GH, Feng JH, Zhao PD, Gao XH, Wang T, Ren YQ. Spontaneous HBV YMDD motif mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2604-2607

摘要

目的: 探讨家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异发生情况以及影响其变异的因素。

方法: 筛选34个共95例有乙型肝炎家庭聚集现象且未经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者作为家庭组, 进行YMDD检测; 随机选择82例无乙型肝炎家庭聚集现象且未接受过抗病毒治疗的CHB患者作为对照组, 进行YMDD检测。

结果: 家庭组95例中有51例(53.68%)检测到YMDD自然变异, 对照组82例中有21例(25.61%)检测到YMDD自然变异; YMDD自然变异检出率有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: 有乙型肝炎家族聚集史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率较没有乙型肝炎家族聚集史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率高。

关键词: 慢性乙型肝炎; 家庭聚集性疾病; YMDD自

■同行评议者

陈志辉, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科

自然变异

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王台, 任迎全. 家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异的调查. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2604-2607
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2604.asp>

0 引言

临床上应用核苷类似物(nucleoside analogue, NUC)(特别是拉米夫定)进行抗HBV治疗之后易出现HBV聚合酶(polymerase, P)基因的酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)变异, 但HBV P基因也可发生未经抗病毒治疗情况下的YMDD自然变异. 本研究对34个有乙型肝炎家庭聚集现象的家庭且未经抗病毒治疗的95例HBV感染者和无乙型肝炎家庭聚集现象也未接受过抗病毒治疗的82例患者进行YMDD检测, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 筛选2006-05/2009-10在延安大学附属医院感染病科就诊有乙型肝炎家庭聚集现象的34个家庭中未经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者95例为家庭组; 并随机选择82例无乙型肝炎家庭聚集现象且未接受过抗病毒治疗的CHB患者为对照组. 两组患者的诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南》(2005年版)^[1].

1.2 方法 采集患者外周血, 检测HBV血清学标志物定量、HBV YMDD变异. HBV血清学标志物定量检测采用美国PE公司1235全自动时间分辨荧光免疫分析系统进行, 乙型肝炎五项时间分辨荧光诊断试剂盒购自苏州新波生物技术有限公司; YMDD变异检测采用美国PE公司GeneAmp5700型荧光PCR检测仪进行, HBV YMDD基因突变诊断试剂盒(PCR荧光法)购自上海克隆生物高技术有限公司.

其中HBV YMDD变异检测的基础是核酸序列分析, 这种直接测序是HBV测序的经典方法. 大部分测序的基本原理均采用Sanger发明的双脱氧DNA链末端终止法. 其基本原理为: DNA链在进行复制时, 在DNA P作用下以互补单链DNA为模板, 以带有3'-OH末端的单链寡核苷酸为引物, 不断地将4种dNTP(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)加到新生链的3'-OH末端, dNTP为单脱氧核糖核酸, 即脱去了第二位C原子上的氧原子, 而第三位C原子上的氧原子能够与另一

表 1 34个家庭亲子两代HBV感染情况 (n)

	家庭数	子女感染	合计
仅母亲感染	21	38	59
仅父亲感染	4	10	14
父母未感染	9	22	22
合计	34	70	95

dNTP第五位C原子上的磷酸基团形成3'、5'磷酸二酯键, ddNTP的第三位C原子上的氧原子也被脱去, 这样在DNA合成过程中, 他能够与正常核苷酸形成磷酸二酯键, 但由于其3'-OH中氧原子的脱去而不能与下一个核苷酸形成3'、5'磷酸二酯键, 延伸中的DNA链被终止. 所以在进行DNA延伸时当dNTP掺入时, 链能够继续延伸, 而当ddNTP掺入时, 链被终止, 由于ddNTP的掺入是随机的, 能够发生在链延伸的任何一点, 这样便形成相差仅一个碱基的大小不等的一系列DNA片段, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影后即可读出所测DNA的序列.

统计学处理 采用t检测和卡方检验, 并采用SPSS17.0统计软件包进行分析.

2 结果

2.1 34个家庭亲子两代HBV感染 家庭组的34个家庭共95人感染HBV, 21个家庭仅母亲感染HBV而父亲没感染HBV, 有子女38人感染HBV. 4个家庭仅父亲感染HBV而母亲没感染, 有子女10人感染HBV. 9个家庭父母双方都没感染HBV, 有子女22人感染HBV. 家庭组的平均年龄为34岁±5.78岁, 对照组的平均年龄为36.5岁±6.84岁(表1).

2.2 34个家庭亲子两代HBV感染者YMDD阳性分布 21例仅母亲为慢性HBV感染者中有12例母亲为YMDD阳性, 这12例母亲为YMDD阳性的23例HBV感染的子女中有20例为YMDD阳性; 其他9例YMDD阴性母亲的15例子女中有4例为YMDD阳性. 4例仅父亲为慢性HBV感染者中有2例父亲为YMDD阳性, 2例父亲为YMDD阳性的4例慢性HBV感染子女中2例为YMDD阳性; 其他2例为YMDD阴性. 2例父亲为YMDD阴性的6例子女中有2例为YMDD阳性, 此2例YMDD阳性患者处于一个家庭. 父母均未感染HBV的9个家庭22例患者中9例患者为YMDD阳性, 其中有3个家庭有2例及其以上YMDD阳性患者(2家有YMDD阳性患者各2例, 1家有YMDD阳性

■研发前沿

YMDD的变异和自然变异与血清病毒载量等有一定的关系. HBV自然变异可能会对抗病毒治疗有一定的影响, 在应用NUC抗病毒治疗前检测YMDD变异有重要意义, 但目前检测YMDD自然变异尚没有一个公认统一的标准.

■相关报道

HBV变异主要突变为YI(异亮氨酸)DD或YV(缬氨酸)DD, 即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V), 在抗病毒药物的压力下变异率可能更高, 从而影响抗病毒的疗效. HBV自然变异可能会对抗病毒治疗提出一定的挑战.

■创新盘点

本研究对有乙型肝炎家庭聚集现象且未经抗病毒治疗的HBV感染者和无乙型肝炎家庭聚集现象也未接受过抗病毒治疗的HBV感染者进行YMDD检测,结果经统计学处理,得出了部分阳性结论。

■应用要点

本研究发现有乙型肝炎家聚史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率较没有乙型肝炎家聚史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率高,对临床乙型肝炎抗病毒治疗药物的选择有实际指导意义。

表 2 34个家庭亲子两代HBV感染者YMDD(+)分布状况 (n)

	n	HBV感染 子女	子代中 YMDD(+)	亲代中 YMDD(+)
母亲YMDD阳性	12	23	20	12
母亲YMDD阴性	9	15	4	0
父亲YMDD阳性	2	4	2	2
父亲YMDD阴性	2	6	2	0
父母未感染家庭	9	22	9	0
合计	34	70	37	14

患者3例),有2个家庭各有1例YMDD阳性患者(表2)。

2.3 两组YMDD变异分布状况 本研究中家庭组95例共有51例(53.68%)检测到YMDD自然变异,对照组82例共有21例(25.61%)检测到YMDD自然变异(表3);YMDD自然变异检出率差异有统计学意义($P<0.05$)。家庭组95例研究对象中有女性42例,YMDD阳性患者23例(54.76%);53例男性中有28例(52.83%)YMDD变异阳性;男女比例差异无统计学意义($P>0.05$)。95例家庭组研究对象中有HBeAg阳性患者64例,其中YMDD阳性患者35例(54.69%);另外31例HBeAg阴性患者有16例(51.61%)YMDD阳性;HBeAg的状态对YMDD的自然变异检出率无显著影响($P>0.05$)。家庭组95例研究对象中有HBV携带者36例,其中19例(52.78%)YMDD阳性;有CHB 32例,其中17例(53.12%)YMDD阳性;有乙型肝炎肝硬化27例,其中15例(55.56%)YMDD阳性;CHB的进展状态对YMDD的自然变异检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。

12例母亲为YMDD阳性的23例HBV感染的子女中有20例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为86.96%;其他9例YMDD阴性母亲的15例子女中有4例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为26.67%;两组比较YMDD的自然变异检出率有统计学差异($P<0.05$)。2例父亲为YMDD阳性的4例慢性HBV感染子女中2例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为50%;其他2例为YMDD阴性父亲的6例子女中有2例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为33.33%;两组比较YMDD的自然变异检出率有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

本研究家庭组的样本是来自有CHB家庭背景的患者,之所以没把样本收集扩大到有家族背景

表 3 家庭组和对照组YMDD变异分布状况 (n)

分组	n	变异	YMDD(V)	YMDD(I)	YMDD(V+I)
家庭组	95	51	16	7	28
对照组	82	21	5	4	12

的患者,主要考虑到病史追溯较为困难、范围较大、不便操作等原因。

由上述结果可见有乙型肝炎家聚史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率较没有乙型肝炎家聚史的慢性HBV感染者的YMDD自然变异率高($P<0.05$),我们还发现亲代已有YMDD自然变异的患者其子女的YMDD自然变异率要高于亲代没有YMDD自然变异的患者($P<0.05$),这方面国内鲜有报道。患者性别、HBeAg状态、CHB的进展状态对YMDD自然变异检出率无显著影响(均 $P>0.05$),本结论与国内相关报道一致^[2,3]。

CHB是我国最主要的慢性肝炎类型,其主要的治疗方法是抗病毒治疗。目前抗HBV的药物主要有两大类,一类是干扰素(interferon, IFN),另一类是NUC。IFN的疗效相对确定,但不良反应相对多见,且一般不用于某些特殊病情(如失代偿期肝硬化)。NUC使用方便、价格相对低廉、疗效相对确切且耐受性较好,其中拉米夫定目前在临床上应用最广。但长期使用NUC可导致HBV变异并对其产生耐药性。主要是由于HBV在复制过程中要经过一个逆转录过程,经逆转录形成HBV DNA的负链,这一过程是在HBV P的指导下完成的,由于HBV P缺乏校正功能,所以HBV在复制过程中具有较高的自然变异率^[4],且每24 h可以产生 $3.2 \times (10^{10} - 10^{11})$ 含有单位点突变的HBV DNA^[5]。最常见的是HBV P基因的YMDD区域发生变异,主要突变为YI(异亮氨酸)DD或YV(缬氨酸)DD,即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V),在抗病毒药物的压力下变异率可能更高^[6],从而会影响抗病毒的疗效。HBV自然变异可能会对抗病毒治疗提出一定的挑战。近年来HBV基因诊断技术不断进步,目前已有多种较为敏感的YMDD变异检测试剂盒,使得对CHB患者YMDD自然变异毒株的检测成为可能^[7,8]。

在应用NUC(特别是拉米夫定)之后易出现HBV P基因的YMDD变异,实际上有些患者体内HBV变异株与野生株共存,只是野生株占优势,不易被一般检测方法检测,长期的药物作用抑制了野生株的复制,此时耐药的变异株成了

优势株, 临床上就会表现出耐药^[9]. 近年日本学者检测18例未经拉米夫定和其他抗病毒药物治疗的HBV无症状携带者, 且ALT保持正常范围1年以上, 结果发现有5例发生了YMDD变异, 证明了HBV无症状携带者YMDD变异是自然存在的^[10,11]. 韩国学者^[12]报道40例未经拉米夫定治疗的乙型肝炎患者中发现有3例患者出现YMDD基因序列变异, 变异率为7.5%. 研究还发现肝硬化患者中也存在YMDD自然变异的现象, 变异率为26.41%^[3]. 以上主要是东亚的报道, 而伊朗学者发现没有接受拉米夫定治疗的CHB患者YMDD变异率为0%^[13].

研究发现YMDD自然变异毒株的检出率为10%-30%^[10,14], 本研究中对对照组的检出率为25.61%, 与该结论相符. 需要指出的是我们测出的YMDD基序自然变异的病例, 是变异株占总病毒量9%以上的病例, 这主要是受该试剂盒对变异株检出效能的限制. 有报道显示变异株占总病毒量5%以上者可出现表型耐药^[15], 由此可以推测本研究中检出的YMDD自然变异病例均有可能对拉米夫定产生表型耐药. 在抗病毒治疗前检测是否存在YMDD自然变异, 对于合理制定抗HBV治疗方案具有重要参考价值.

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431
- 2 霍红, 赵书民, 蔡雄, 缪晓辉. YMDD自然变异毒株流行病学调查. 肝脏 2006; 11: 232-234
- 3 屈军校, 刘蓉, 任迎全, 冯继红. 乙型肝炎肝硬化发生HBV YMDD自然变异的探讨. 临床肝胆病杂志 2008; 24: 116-117
- 4 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 5 Villet S, Billioud G, Pichoud C, Lucifora J, Hantz O, Sureau C, Dény P, Zoulim F. In vitro characterization of viral fitness of therapy-resistant hepatitis B variants. *Gastroenterology* 2009; 136: 168-176.e2
- 6 Conzelmann I, Wintermeyer P, Wirth S, Radke R, Gerner P. Complete hepatitis B virus genome analysis in chronically infected children before and during lamivudine treatment. *J Med Virol* 2005; 77: 194-202
- 7 Sablon E, Shapiro F. Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. *Int J Med Sci* 2005; 2: 8-16
- 8 Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, Wang Y. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1353-1357
- 9 Kobayashi S. Clinical characteristics of asymptomatic hepatitis B virus carriers with YMDD mutant not treated with lamivudine. *Kurume Med J* 2003; 50: 87-90
- 10 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586
- 11 Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, Sayiner AA, Topalak O, Akpinar H, Abacioglu YH. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1783-1788
- 12 Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. [Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients] *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9
- 13 Ramezani A, Velayati AA, Roshan MR, Gachkar L, Banifazl M, Keyvani H, Aghakhani A. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 252-255
- 14 颜鸣鹤, 张长, 凌乔, 周仁芳. 未经拉米夫定治疗的乙型肝炎病毒YMDD变异检测. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 430-432
- 15 拉米夫定临床应用专家组. 2004年拉米夫定临床应用专家共识. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 425-428

■同行评价

本文选题具有一定创新性, 研究方法恰当, 具有较显著的临床流行病学意义.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

自身免疫性肝炎46例

周淑芬, 刘树业, 贾艳会

■背景资料

我国是肝病高发地区, 临床上大约有10%的肝炎病因未明, 其中AIH可能是一个重要原因. AIH在临床表现、生化、免疫及组织学变化等方面常常交叉重叠, 使AIH的临床诊断和治疗出现困难.

周淑芬, 刘树业, 贾艳会, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170

通讯作者: 周淑芬, 副主任技师, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院. zhshfen566@sina.com

电话: 022-84112153 传真: 022-24384350

收稿日期: 2010-05-19 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Autoimmune hepatitis: an analysis of 46 cases

Shu-Fen Zhou, Shu-Ye Liu, Yan-Hui Jia

Shu-Fen Zhou, Shu-Ye Liu, Yan-Hui Jia, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin 300170, China

Correspondence to: Shu-Fen Zhou, Tianjin Third Central Hospital, 38 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. zhshfen566@sina.com

Received: 2010-05-19 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical, biochemical and immunological features, treatment, and outcome of autoimmune hepatitis (AIH) in elderly patients.

METHODS: Forty-six patients with AIH diagnosed from January 2005 to June 2009 according to the diagnostic criteria revised by international autoimmune hepatitis group (IAIHG) were included in this study. These patients were divided into two groups: those ≥ 60 years ($n = 21$) and those < 60 years ($n = 25$). The general information, clinical, biochemical and immunological features, initial diagnostic accuracy, and outcome in these patients were retrospectively analyzed.

RESULTS: Elderly and younger AIH patients shared similar clinical manifestations, mainly including fatigue, body mass loss, jaundice, and hepatosplenomegaly. Compared with younger patients, elderly ones had higher incidence of cirrhosis (57.1% vs 12.0%, $P < 0.01$) and morbidity of associated autoimmune diseases (52.3% vs 17.4%, $P < 0.01$), but lower initial diagnostic accuracy (28.5% vs 56.0%, $P < 0.05$). The detection rates of ANA, SMA, AMA-M2 and SSA/SSB in

elderly patients were 61.9%, 14.3%, 23.8% and 23.8%, respectively, while those of ANA, SMA, LKM1, SLA, AMA-M2, SSA/SSB, Sm and pANCA in younger patients were 65.2%, 26.0%, 4.3%, 4.3%, 4.3%, 4.3% and 4.3%, respectively. Both groups of patients showed increased serum γ -GT, ALT, AST, IgG and bilirubin at initial diagnosis. The increase in the levels of serum γ -GT, bilirubin, IgG and IgM was more significant in elderly patients than in younger ones (all $P < 0.05$ or 0.01). At 24 wk of follow-up, biochemical blood tests showed that the majority of patients had excellent immune response, and better improvement in immune response was achieved in younger patients than in elderly ones ($P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Long course of disease and late diagnosis are associated with severe liver damage and slow recovery in elderly AIH patients. Misdiagnosis or missed diagnosis is the main reason for delayed treatment of AIH.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Autoantibody; Clinical feature; Treatment

Zhou SF, Liu SY, Jia YH. Autoimmune hepatitis: an analysis of 46 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2608-2613

摘要

目的: 分析老年人自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的临床、生化、免疫学及治疗转归等特征.

方法: 按照国际自身免疫性肝炎小组(international autoimmune hepatitis group, IAIHG)修订的诊断标准, 对2005-01/2009-06期间确诊的AIH患者46例进行回顾性分析, 比较老年(≥ 60 岁)和中青年(< 60 岁)患者的一般资料、临床表现、生物化学、免疫学、首诊确诊率及转归等特征.

结果: AIH患者46例中, 21例老年患者的临床表现和中青年患者相似, 以乏力、体质量下降、黄疸、肝脾大为主要特征, 老年组出现

■同行评议者

禄韶英, 副主任医师, 西安交通大学医学院第一附属医院普外科

肝硬化发生率高于中青年组(57.1% vs 12.0%, $P<0.01$); 老年组的首诊确诊率低于中青年组(28.5% vs 56.0%, $P<0.05$); 老年组伴发其他自身免疫性疾病高于中青年组(52.3% vs 17.4%, $P<0.01$). 老年组ANA、SMA、AMA-M2、SSA/SSB检出率分别为61.9%、14.3%、23.8%、23.8%; 中青年组ANA、SMA、LKM1、SLA、AMA-M2、SSA/SSB、Sm、pANCA检出率分别为65.2%、26.0%、4.3%、4.3%、4.3%、4.3%、4.3%; 首次血液生化检验结果显示, 两组患者均以 γ -GT、ALT、AST、IgG、血清胆红素升高为主, 其中 γ -GT、血清胆红素、IgG、IgM水平老年组较中青年组升高更明显, 两组比较具有显著性差异(均 $P<0.05$ 或 0.01); 两组患者随诊24 wk后血液生化检验结果显示, 大部分患者免疫应答良好, 中青年患者改善程度好于老年患者, 两组比较具有显著性差异($P<0.05$ 或 0.01).

结论: 老年患者肝脏损害严重、转归慢与其病程长、确诊晚有关; 误诊或漏诊成为延误早期治疗的主要原因, 应引起临床医生的重视.

关键词: 自身免疫性肝炎; 自身抗体; 临床特点; 治疗

周淑芬, 刘树业, 贾艳会. 自身免疫性肝炎46例. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2608-2613

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2608.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一类非传染性慢性肝病, 其临床症状与一般慢性病毒性肝炎无明显的差异. 由于起病隐匿缓慢, 早期症状不特异, 且与其他自身免疫性疾病的发生交叉重叠, 所以易造成漏诊、误诊. AIH自发缓解率低, 不治疗可发展为肝硬化. 因此正确诊断和早期治疗对改善AIH患者预后有着重要意义.

1 材料和方法

1.1 材料 AIH患者46例系来自天津市第三中心医院肝胆病科, 均有详细的病史记录和较完整的检查报告结果, 除2009年确诊病例11例, 其他患者均进行了大于2年的跟踪随访. 本组患者选择标准: (1)AIH诊断符合2008年, 国际自身免疫性肝炎小组提出的简化的AIH评分标准^[1]; (2)PBC诊断符合美国肝病协会2000年制订的PBC诊断标准^[2]; (3)影像学检查排除胆道梗阻.

1.2 方法

1.2.1 临床表现: 包括患者性别、发病及确诊年

龄、就诊科室、临床症状、体征和伴发自身免疫性疾病等.

1.2.2 实验室检查: (1)生化指标: 包括血清胆红素(TBIL、DBIL)、转氨酶(ALT、AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl peptidase, γ -GT)、白蛋白/球蛋白比值、免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)等; (2)血清病毒学指标: 包括甲型肝炎抗体、乙型肝炎五项、丙型肝炎抗体、戊型肝炎抗体、EB病毒和巨细胞病毒抗体等. (3)免疫学指标: 自身抗体检测包括抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)、抗平滑肌抗体(anti-smooth muscle antibodies, SMA)、I型肝肾微粒体抗体(liver kidney microsomal antibody-1, LKM-1)、抗线粒体抗体亚型-M2(anti-mitochondrial antibody-M2, AMA-M2)、抗可溶性肝抗原抗体(anti-soluble liver antigen antibody, SLA)、抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)和抗干燥综合征抗体(sjogren's syndrome type A, B, SSA、SSB)、抗史密斯抗体(Sm)等. ANA、SMA、ANCA采用间接免疫荧光法检测, ANA、SMA $\geq 1:100$ 为阳性, ANCA $\geq 1:10$ 为阳性; LKM-1、SLA、AMA-M2、SSA、SSB采用免疫印迹法检测, LKM-1、SLA、AMA-M2、SSA、SSB $\geq 1:100$ 为阳性.

1.2.3 肝穿刺组织学病理: B超引导下经皮穿刺取肝组织, 采用HE染色.

1.2.4 影像学检查: 患者做了常规腹部B超46例, 患者做了腹部CT检查5例, 观察肝脏、胆管、脾脏等表现, 并除外肝外胆道梗阻.

统计学处理 两样本均数比较用 t 检验, 方差不齐时用 t' 检验; 两样本率的比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 性别、年龄和病程 根据患者的年龄分为两组: 老年组(≥ 60 岁)和中青年组(<60 岁), 两组患者的性别、年龄、病程结果见表1.

2.2 初诊科室和确诊 两组患者因不同的症状就诊于不同科室, 其中初次就诊于肝内科23例, 消化科6例, 还有部分患者到皮肤科、内分泌科和中医科就诊(表2).

2.3 临床表现 两组患者的临床症状及并发症结果见表3.

2.4 实验室检查

2.4.1 生化检查: 入院后首次生化检测结果见表4.

2.4.2 自身抗体检查情况: 检测AIH患者血清中的多种自身抗体(表5).

■ 相关报道

AIH发病率在世界各地差异较大. Czaja、Al-Chalabi等研究显示AIH患者中60岁后发病的超过20%. 这些老年患者更易出现肝纤维化、肝硬化、腹水.

■应用要点

本文将46例AIH患者分为两组(老年组和中青年组),详细的分析和比较了两组患者的临床表现、生物化学、免疫学、首诊确诊率及转归等特征,以提高临床医生对该类疾病的认识、研究和防治,为本病的临床诊断提供帮助。

表 1 两组患者的性别、年龄、病程结果 (mean ± SD)

分组	n	男n(%)	女n(%)	男:女	年龄(岁)	平均年龄(岁)	病程(年)	平均病程(年)
老年组	21	7(33.3)	14(66.7)	1:2.00	60-82	66 ± 4.1	0.04-26	3.9 ± 7.1
中青年组	25	3(12.0)	22(88.0)	1:7.33	23-59	49 ± 8.1	0.02-15	2.1 ± 4.3

表 2 两组患者首诊确诊情况比较 n(%)

分组	n	AIH	肝硬化	急性黄疸性肝炎	慢性活动性肝炎	过敏性皮炎	糖尿病	胆囊炎	其他疾病
老年组	21	6(28.5) ^b	11(52.4)	0(0.0)	0(0.0)	1(4.8)	1(4.8)	1(4.8)	1(4.8)
中青年组	25	14(56.0)	3(12.0)	2(8.0)	2(8.0)	2(8.0)	0(0.0)	1(4.0)	1(4.0)

^bP<0.01 vs 中青年组.

表 3 两组患者的临床症状及并发症比较 n(%)

分组	n	乏力	发热	体质量下降	腹胀	皮肤瘙痒	黄疸	肝硬化	脾大	腹水	消化系出血	合并症
老年组	21	13(61.9)	9(42.9) ^b	13(61.9) ^b	15(71.4)	5(23.8) ^b	12(57.1)	12(57.1) ^b	14(66.7)	3(14.3) ^b	3(14.3) ^b	11(52.3) ^b
中青年组	25	15(60.0)	3(12.0)	9(36.0)	13(54.1)	2(8.0)	11(44.0)	3(12.0)	15(60.0)	1(4.0)	0(0.0)	4(16.0)

^bP<0.01 vs 中青年组.

表 4 两组患者入院后首次血液生化检验结果 (mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	γ-GT(U/L)	白蛋白/球蛋白(比值)	TBIL(μmol/L)	DBIL(μmol/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)
老年组	21	143.6 ± 104.1	141.5 ± 135.2	235.1 ± 96.3 ^b	1.06 ± 0.31	135.6 ± 98.9 ^a	79.3 ± 51.5 ^a	32.1 ± 11.5 ^a	6.9 ± 3.12	4.5 ± 1.65 ^b
中青年组	25	133.9 ± 91.6	156.4 ± 86.3	155.6 ± 122.2	1.21 ± 0.38	91.3 ± 76.5	53.6 ± 29.7	23.9 ± 6.7	5.61 ± 2.92	2.02 ± 0.97

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 中青年组.

表 5 两组患者自身抗体检查结果 n(%)

分组	n	ANA	SMA	LKM-1	SLA	AMA-M2	SSA/SSB	Sm	pANCA
老年组	21	13(61.9)	3(14.3) ^b	0(0.0) ^b	0(0.0) ^b	5(23.8) ^b	5(23.8) ^b	0(0.0) ^b	0(0.0) ^b
中青年组	25	15(65.2)	6(26.0)	1(4.3)	1(4.3)	1(4.3)	1(4.3)	1(4.3)	1(4.3)

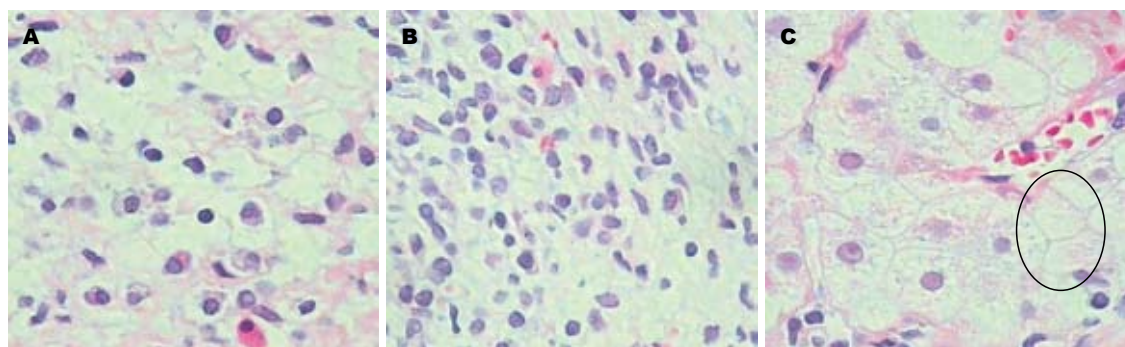
^bP<0.01 vs 中青年组.

2.4.3 血清肝炎病毒学指标: 所有患者均未检测到乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎抗体、甲型肝炎抗体、戊型肝炎抗体及非洲淋巴瘤病毒抗体。

2.5 组织病理学表现 中青年组中做了肝穿病理活检的患者7例, 仅2例呈现以浆细胞、淋巴

细胞浸润为主的界面性肝炎; 老年组做了肝穿病理活检的患者1例, 可见肝细胞核消失, 肝细胞坏死(图1)。

2.6 影像学检查 B超和CT: 中青年组中肝弥漫性病变, 脾大者15例, 肝硬化者3例, 男性患者1例在内镜下逆行胰胆管造影后, 诊断为AIH/原



■同行评价
本文选题新颖, 具有一定的临床实用价值。

图 1 肝病理组织图(HE染色×400)。A: 浆细胞、淋巴细胞浸润为主的界面性肝炎; B: 淋巴细胞、浆细胞浸润为主的界面性肝炎; C: 肝细胞核消失、肝细胞坏死。

表 6 两组患者治疗24 wk的血液生化检验结果 (mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	γ-GT(U/L)	白蛋白/球蛋白(比值)	TBIL (μmol/L)	DBIL (μmol/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)
老年组	21	93.2 ± 36.1 ^b	101.1 ± 43.6 ^b	121.7 ± 63.2 ^b	1.10 ± 0.26 ^a	91.6 ± 60.7 ^b	53.5 ± 32.6 ^b	29.5 ± 11.6 ^a	5.96 ± 1.93	3.95 ± 1.01 ^b
		67.7 ± 26.6	62.5 ± 23.9	70.2 ± 31.6	1.39 ± 0.23	59.6 ± 16.9	32.6 ± 17.8	21.6 ± 6.7	4.65 ± 2.06	2.16 ± 0.67
中青年组	25									

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 中青年组。

发性硬化胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)重叠综合征。肝脾未见明显异常者7例;老年组中肝弥漫性病变,脾大者14例,肝硬化者12例,腹水6例,脂肪肝1例。两组患者脾脏大小无显著差异。

2.7 治疗和随访 中青年组中8例患者因病情轻微口服熊去氧胆酸治疗,其他38例患者采用联合应用泼尼松龙与硫唑嘌呤,同时口服熊去氧胆酸。泼尼松龙起始剂量为30 mg/d,硫唑嘌呤剂量50 mg/d。联合治疗最初2-3 wk后,若肝功能(AST和/或ALT)水平下降至原水平的1/3以下时,则激素的剂量减至20 mg/d,1 mo后复查肝功能,若肝功能有进一步改善时,则激素的剂量再减少并维持在10-15 mg/d。本组病例每月随访肝功能1次,肝功能(AST和/或ALT)接近恢复正常则药物治疗剂量改为维持量^[3],在泼尼松龙完全撤掉后仍需继续使用熊去氧胆酸至少6 mo,总疗程不少于2年^[4]。两组患者24 wk随诊,临床症状均有不同改善,复查血液生化检验结果(表6)。

3 讨论

近年来国内开始重视AIH的研究,但是目前尚缺乏我国该病的流行病学调查资料。从国内报道的资料来看,该病并不少见^[5-7]。AIH以女性多见,

本组资料AIH总计46例,女性占80.4%,男女比为1:4.1;平均年龄56.3岁±16.6岁,发病年龄呈双峰趋势分布,24-32岁(15例)及60-70岁(19例)两个高峰。与谭立明等^[8]报道略有差异,较欧美报道^[9]的发病年龄偏大。

本组研究中,以乏力、体质量下降、黄疸、肝脾大多见,临床表现易与病毒性肝炎混淆。所有病例中,都表现不同程度的临床症状,未见无症状患者。与文献显示^[10]的约13%-38%无明显症状有明显差异。老年组、中青年组的首诊确诊率分别为28.5%和56.0%,误诊或漏诊成为延误早期治疗的主要原因,应引起临床医生的重视。

Czaja等^[11]报道AIH患者中60岁后发病的患者超过20%,这些老年患者更易出现肝纤维化、肝硬化、腹水(发生率与中青年患者比为33% vs 10%)^[12];合并其他自身免疫性疾病(发生率与中青年患者比为13% vs 0%)^[13]。本组患者中,60岁后发病的占成年AIH人数的21/25(84.0%);出现肝硬化发生率与中青年患者比为57.1% vs 12.0%;合并自身免疫性疾病发生率与中青年组比52.3% vs 17.4%。本研究明显高于文献报道,说明老年患者肝脏损害严重与其病程长、确诊晚有关。

自身抗体是诊断AIH的依据之一,同时也用

于AIH的分型. AIH目前分为以下4型: I型: 即经典型, ANA和SMA为其特征性抗体; 其中ANA可单独出现, 也可与SMA的共同出现; II型: anti-LKM1阳性; III型: anti-SLA/LP阳性; W型: 重叠综合征, 包括AIH/原发性胆汁肝硬化重叠综合征或AIH/PSC重叠综合征. 本组研究中, 老年组ANA、SMA、AMA-M2、SSA/SSB检出率分别为61.9%、14.3%、23.8%; 中青年组ANA、SMA、LKM1、SLA、AMA-M2、SSA/SSB、Sm、pANCA检出率分别为65.2%、26.0%、4.3%、4.3%、4.3%、4.3%、4.3%、4.3%. 老年组21例全部确诊为I型AIH, 其中11例伴随其他合并证(AIH/干燥综合征5例; AIH/PBC5例; 伴随糖尿病1例). 中青年组1例确诊II型AIH, 确诊III型AIH 1例, 确诊I型AIH23例, 其中伴随其他合并证4例(AIH/干燥综合征1例, AIH/PSC 1例, 伴随系统性红斑狼疮1例, 亚临床甲状腺功能减退1例). 与国外AIH各亚型之间的发病率相比, II、III型发病率明显偏少.

本研究两组患者入院后首次血液生化检验结果显示, 两组患者均以 γ -GT、ALT、AST、IgG、血清胆红素升高为主, 其中 γ -GT、血清胆红素、IgG、IgM水平老年组较中青年组升高更明显, 两组比较具有显著性差异(均 $P<0.05$ 或 0.01).

界面性肝炎和门脉浆细胞浸润是AIH的特征性组织学改变, 但并非诊断必须具备, 缺少浆细胞浸润也不能排除是AIH的诊断. 本组病例中青年组通过肝穿病理检查明确诊断者仅有2例, 占肝穿人数的28.6%. 与文献^[14,15]报道相符.

有研究显示^[16], 未经治疗的重症AIH患者在诊断后3-5年内的死亡率高达40%, 幸存者中有40%发展为肝硬化, 54%的患者在肝硬化2年内出现食管静脉曲张, 最终有20%的患者死于食管静脉曲张破裂引起的大出血. 因此及时诊断, 并给予合理恰当的治疗, 对于延缓或逆转此病有非常重要的意义.

对激素及免疫抑制剂的应答是AIH的特点之一, 特别是完全应答后出现复发支持AIH的诊断. 国际自身性免疫性肝炎小组推荐对确定或可能诊断的AIH患者进行免疫治疗, 以改善患者生活质量和预后, 方案主张免疫抑制剂长期维持治疗^[3], 但提倡个体化^[4].

两组患者随诊24 wk的血液生化检验结果显示, 70%患者免疫应答良好, 部分肝功能指标虽未完全恢复正常, 但各项结果均有所改善. 并且中青年患者改善程度好于老年患者, 两组比较

具有显著性差异(均 $P<0.05$ 或 0.01). 但在长期随访的患者21例(>2年)中, 有停用激素或激素减量过程中出现复发6例, 表明AIH对激素治疗有着良好的反应, 但也存在依赖性的问题, 因此一般主张疗程至少为2年, 复发者需长期低剂量维持治疗. 如何在治疗缓解后维持剂量、撤药及防止复发尚需进一步临床研究和积累经验.

AIH的预后主要取决于对糖皮质激素的治疗反应. 本组患者16例由于误诊, 延误了治疗, 以致使12例老年组的患者发现时已经发生肝硬化. 因此提高对本病的诊断直接关系到预后. 对进展至终末期肝硬化的患者, 肝移植是唯一有效可行的治疗方法, 但所需费用昂贵.

总之, 老年人AIH的发生率及病死率均高, 应提高临床医生对该病的认识, 对不明原因转氨酶、 γ -谷氨酰转氨酶、胆红素增高的老年患者, 应注意检测自身抗体, 以使患者早确诊、早治疗, 延缓生命并提高生存质量.

4 参考文献

- 1 Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; 48: 169-176
- 2 Silveira MG, Brunt EM, Heathcote J, Gores GJ, Lindor KD, Mayo MJ. American Association for the Study of Liver Diseases endpoints conference: design and endpoints for clinical trials in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2010; 52: 349-359
- 3 邱德凯, 马雄. 自身免疫性肝病基础与临床. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 103-116
- 4 Ishibashi H, Komori A, Shimoda S, Gershwin ME. Guidelines for therapy of autoimmune liver disease. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 214-226
- 5 姚光弼. 应重视自身免疫性肝病的研究. 中国实用内科杂志 2006; 26: 1839
- 6 李蕴铷, 魏来, 王文冰, 王培之, 张黎颖, 欧蔚妮, 谢雯, 成军. 自身免疫性肝炎临床、免疫学及病理学特征分析142例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3534-3538
- 7 孙艳玲, 赵景民, 孟欣, 李文淑. 自身免疫性肝炎与原发性胆汁性肝硬化重叠综合征的临床与病理学研究. 解放军医学杂志 2006; 31: 662-665
- 8 谭立明, 彭卫华, 董叶, 李华, 刘宁, 蔡莉莉, 章白苓, 王园园. 抗髓过氧化物酶抗体检测对诊断自身免疫性肝炎的临床意义. 免疫学杂志 2009; 25: 697-700
- 9 Choudhuri G, Somani SK, Baba CS, Alexander G. Autoimmune hepatitis in India: profile of an uncommon disease. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 27
- 10 Kogan J, Safadi R, Ashur Y, Shouval D, Ilan Y. Prognosis of symptomatic versus asymptomatic autoimmune hepatitis: a study of 68 patients. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 75-81
- 11 Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 255-262
- 12 Al-Chalabi T, Boccato S, Portmann BC, McFarlane

- IG, Heneghan MA. Autoimmune hepatitis (AIH) in the elderly: a systematic retrospective analysis of a large group of consecutive patients with definite AIH followed at a tertiary referral centre. *J Hepatol* 2006; 45: 575-583
- 13 Czaja AJ, Carpenter HA. Distinctive clinical phenotype and treatment outcome of type 1 autoimmune hepatitis in the elderly. *Hepatology* 2006; 43: 532-538
- 14 张会爱, 王邦茂, 章明放, 常毅湘, 弓艳霞. 自身免疫性肝病临床病理特征分析28例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3338-3342
- 15 Shankarkumar U, Amarapurkar DN, Kankonkar S. Human leukocyte antigen allele associations in type-1 autoimmune hepatitis patients from western India. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 193-197
- 16 Vergani D, Mieli-Vergani G. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 589-593

编辑 曹丽鸥 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》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

《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}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-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, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, 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 °C ± 1.2 °C, 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 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《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: wjcd@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)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希腊文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 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1000-1500 kg, 3.5 mmol/L $\pm$ 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6347意指6000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 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 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1486800.475 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 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 , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 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,则在论述的句末右上角注角码号。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。

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 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 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)。

6 修回稿须知

6.1 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。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,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。

6.3 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: 010-8538-1892

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

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/>

2010-09-01

第二次肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2010-09-03

消化道肿瘤内镜诊治学术大会

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83620692

2010-09-03/05

国际胃食管反流学术论坛

会议地点: 郑州市

联系方式: <http://www.gerd2010.org/cn/>

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

2010-09-10/13

第三届老年消化内镜及消化病学术会议

会议地点: 乌鲁木齐市

联系方式: niezg@vip.sina.com

2010-09-16

2010上海国际消化高峰论坛

会议地点: 杭州市

联系方式: 021-25077345

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/>

2010-09-21/25

肝脏疾病病理基础及治疗进展

会议地点: 西安市

联系方式: 029-85323924

2010-10-12/16

无创性肝纤维化诊断及常见肝病新进展学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80864021

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/>

2010-10-28/30

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

2010-11-12/15

内镜黏膜下剥离术(ESD)及其并发症防治学习班

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: liubingrong@medmail.com.cn

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-17/21

消化及消化内镜前沿理论和技术学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80004616

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

2010-12-02/06

第九届广东省消化内镜学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 020-61641541

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

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!

曹鹏 副研究员

江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室

曹志成 英国生物医学科学研究所院士

香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

陈积圣 教授

中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈汝福 教授

中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

丁惠国 主任医师

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

高国全 教授

中山大学中山医学院生化系

高毅 主任医师

南方医科大学珠江医院肝胆外科

高英堂 研究员

天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

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

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

黄晓东 主任医师

武汉市中心医院消化内科

黄志勇 教授

华中科技大学同济医院普外科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李华山 主任医师

中国中医科学院广安门医院肛肠科

刘凤斌 教授

广州中医药大学第一附属医院消化内科

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院消化科

邱伟华 副主任医师

上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

任浩 副教授

中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

沈柏用 副教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

谭学瑞 教授

汕大医学院第一附属医院院长室

唐晓鹏 教授

中南大学肝病研究所, 中南大学湘雅二医院感染科

王炳元 教授

中国医科大学附属第一医院消化内科

肖文华 主任医师

中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

喻荣彬 副教授

南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张国梁 主任医师

天津市第一中心医院消化内科

张青云 研究员

北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院检验科

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科

周霞秋 主任医师

上海瑞金医院感染科